



Etude cellulaire de la genèse et de l'apprentissage d'un comportement motivé chez l'aplysie

Alexis Bedecarrats

► To cite this version:

Alexis Bedecarrats. Etude cellulaire de la genèse et de l'apprentissage d'un comportement motivé chez l'aplysie. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Bordeaux, 2014. Français. NNT : 2014BORD0452 . tel-01135957

HAL Id: tel-01135957

<https://theses.hal.science/tel-01135957>

Submitted on 26 Mar 2015

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

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

THÈSE PRÉSENTÉE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE Sciences de la Vie et de la Santé

SPÉCIALITÉ Neurosciences

Par Alexis BÉDÉCARRATS

**Étude cellulaire de la genèse et de l'apprentissage d'un
comportement motivé chez l'aplysie**

Sous la direction de : Romuald NARGEOT

Soutenue le 19 Décembre 2014

Membres du jury :

M.CHAMPAGNAT Jean,	DR, CNRS, Gif-sur-Yvette,	Président
M. BAL Thierry,	DR, CNRS, Gif-sur-Yvette	Rapporteur
M. SANDOZ Jean-Christophe,	DR, CNRS, Gif-sur-Yvette	Rapporteur
M.CATTAERT Daniel,	DR, CNRS, Université de Bordeaux	Examineur
M. NARGEOT Romuald,	MCU, CNRS, Université de Bordeaux	Examineur

Remerciements

Ces travaux de thèse ont été réalisés dans la continuité de mon stage de master 2 à l'Institut des Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine UMR CNRS 5287, dirigé par le docteur Jean-René Cazalets à qui j'adresse toute ma reconnaissance pour m'avoir accueilli dans cette structure. Cet environnement de travail dynamique et pointu m'aura permis d'accomplir ce travail de recherche dans les meilleures conditions possibles.

Je voudrais exprimer ma gratitude envers les docteurs Thierry Bal et Jean-Christophe Sandoz pour m'avoir fait l'honneur d'évaluer ce manuscrit de thèse. Je tiens également à remercier les docteurs Jean Champagnat et Daniel Cattaert pour avoir accepté de consacrer de leur temps précieux, à participer à mon jury de thèse.

Je me dois bien sûr de remercier Romuald Nargeot, mon directeur de thèse pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe Organisation et Adaptabilité des Systèmes Moteurs (OASM). Je te remercie infiniment pour le temps que tu m'as consacré durant ces quatre années, depuis le début de mon Master 2, jusqu'à la correction de ce manuscrit. Je suis bien conscient de la chance que j'ai d'avoir pu évoluer en profitant de la générosité qui te caractérise, tant dans le travail, que dans les rapports humains. Ton exemple n'a eu de cesse de me rappeler qu'une grande créativité va nécessairement de pair avec une grande discipline. Je ne te remercierai jamais assez de m'avoir permis de structurer ma pensée.

L'environnement de travail exceptionnel que j'ai connu dans l'équipe OASM doit évidemment beaucoup aux figures tutélaires que sont Muriel Thoby-Brisson et John Simmers. Je remercie particulièrement John pour ses retours inestimables sur mon travail, et pour son travail d'écriture lors de la soumission des résultats publiés au cours de cette thèse. Je remercie Denis, Didier, Marc et François pour leurs retours sévères, mais justes lors de mes présentations orales, sans oublier Lionel qui s'est occupé de mes animaux pendant quatre ans. Marc, nos discussions en salle d'expérimentation ont été de constantes sources d'inspirations.

Je tiens aussi à remercier les membres de l'équipe CPG, Sandrine, Didier, Laurent, Maurice et Grégory pour leur bonne humeur communicative. Ma reconnaissance va à Maurice Garret pour m'avoir invité à communiquer oralement lors de la « Journée

Synapse » à Bordeaux. Je remercie également Laurent pour avoir accepté d'être mon tuteur lors d'un module d'enseignement de TD et TP. Merci encore de m'avoir permis d'apprendre à ton contact sans même m'en rendre compte (ce qui rend le processus d'apprentissage nettement moins douloureux).

Je remercie également Morgane Le Bon Jego pour son travail de relecture lors de l'écriture de mon rapport de Master 2.

Je remercie évidemment les membres actuels et anciens du personnel de l'INCLIA : Anne, Geneviève, Martine, Karine, Marie-Christine, Laura, Frédérique, Loïc, Elizabeth et Jérôme, pour leur aide plus que précieuse et pour avoir créée une ambiance chaleureuse.

Enfin j'adresse une pensée chaleureuse aux étudiants Quentin, John et Marine qui ont partagé mes joies et mes peines lors d'expériences nouvelles pour moi, comme pour eux. John, ce sera un plaisir de continuer à travailler avec toi dans le cadre de ton stage de Master 2. Enfin, le bureau étudiant... Après le départ de Jean-Patrick devenu trappeur et pêcheur de lamproies au Canada, et de Coralie dont la franchise sera toujours appréciée, j'adresse un grand salut aux derniers des mohicans, Laurianne et Léa. Laurianne, ton calme et ta modestie font de toi une personne remarquable. Léa, ton humour et ta joie de vivre illuminent régulièrement le quotidien de tous les gens qui te côtoient. Où que tu ailles, tes qualités seront toujours reconnues. Je salue les nouveaux venus Mélissa et Angelo. Mélissa ne te fais pas trop de soucis pour la rédaction de la thèse. Angelo, je sais que tu ne t'en fais pas encore, mais ça viendra.

A mes parents, votre présence dans cette partie de ma thèse est plus que méritée et je ne pourrais jamais assez-vous remercier, vous avez su développer ma curiosité depuis mon plus jeune âge, ce que je suis aujourd'hui, je n'aurais jamais pu l'être sans votre soutien indéfectible. Je remercie également Samuel mon frère, complice et ami depuis plus de 25 ans. Maintenant que je t'ai cité dans ma thèse tu seras bien obligé d'en faire de même.

Enfin, je me dois de remercier mon épouse, Margaux, chercheuse et trouveuse émérite d'aplysies, à qui je ne pourrais jamais exprimer toute ma gratitude pour m'avoir soutenu lors de cette aventure.

Titre : Étude cellulaire de la genèse et de l'apprentissage d'un comportement motivé chez l'aplysie

Résumé : Les comportements motivés tels que les comportements alimentaires ou sexuels sont émis de façon irrégulière sous l'impulsion du système nerveux central. Ils sont régulés par des informations sensorielles et des apprentissages. Dans un apprentissage associatif, le conditionnement opérant appétitif, l'animal apprend les conséquences de son action par l'association d'une action à l'obtention d'une récompense (un stimulus à forte valeur appétitive). Il est établi que cet apprentissage induit la transition d'une motricité initialement peu fréquente et irrégulière en une motricité rythmique, fréquente et régulière. Cependant, les mécanismes cellulaires du système nerveux central qui sont responsables de cette transition, restent largement méconnus. Notre étude chez le mollusque aplysie nous a permis d'identifier ces mécanismes dans un réseau neuronal identifié et générateur des patterns moteurs du comportement alimentaire. Sur des préparations du système nerveux isolé, nous avons sélectivement contrôlé l'expression fréquente d'une part et régulière d'autre part de la motricité apprise grâce à la manipulation expérimentale de la plasticité fonctionnelle de neurones pacemakers identifiés. Ainsi, nous avons nouvellement établi un lien de causalité entre (1) des modifications membranaires et l'accélération motrice et (2) le renforcement de synapses électriques et la régularité motrice. Nous avons mis en évidence le rôle du transmetteur dopamine dans l'induction de ces plasticités fonctionnelles et l'expression de la motricité fréquente et régulière. Enfin, nous avons analysé les propriétés intrinsèques du neurone responsable de l'impulsion spontanée et irrégulière de la motricité des animaux naïfs. Pour conclure, l'ensemble de ces travaux de thèse offre une vue étendue des mécanismes cellulaires qui déterminent la variabilité d'un comportement motivé et sa régulation par apprentissage.

Mots clés : comportement motivé, comportement compulsif, apprentissage opérant, réseaux de neurones, neurones pacemaker, dopamine

Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine, CNRS UMR 5287
Université de Bordeaux
Bât. 2A- 3e étage-Case 22
146 rue Leo Saignat

33076 BORDEAUX CEDEX

Title : Cellular study of the genesis and learning of a motivated behavior in *Aplysia*

Abstract : Motivated behaviors such as feeding or sexual behavior are irregularly expressed by impulsive drives from the central nervous system. However, such goal-directed acts are regulated by sensory inputs and learning. In a form of associative learning, appetitive operant conditioning, an animal learns the consequences of its own actions by making the contingent association between an emitted act and delivery of a rewarding (highly appetitive) stimulus. It is now established that this learning procedure induces the transition from an initially infrequent and irregular motor activity to a frequent and regular behavior. However the cellular and central network mechanisms that mediate this behavioral plasticity remain poorly understood. Our study on the marine sea slug *Aplysia* has allowed us to analyze these mechanisms in an identified neuronal network that is responsible for generating the motor patterns of the animal's feeding behavior. Using *in vitro* neuronal preparations, we selectively controlled the frequency and regularity of the motor activity induced by operant learning with experimental manipulations of the functional plasticity in identified pacemaker neurons. We found for the first time a causal relationship between the learning-induced plasticity and (1) changes in pacemaker neuron membrane properties and the increased frequency of feeding motor activity, and (2), in the strength of their interconnecting electrical synapses and the regularized phenotype of this motor activity. We then addressed the role of the transmitter dopamine in the induction of this functional plasticity and specifically the expression of a frequent and stereotyped rhythmic feeding motor pattern. Finally, we analyzed the intrinsic membrane properties of the essential pacemaker neuron for generating the irregular motor drive in naïve animals. In conclusion, the data from this thesis work have provided novel insights into the cellular and synaptic mechanisms underlying the intrinsic variability of a motivated behavior and its regulation by learning.

Keywords : Motivated behavior, compulsive behavior, neuronal networks, pacemaker neurons, dopamine

The Aquitaine Institut for Cognitive and Integrative Neuroscience, CNRS UMR 5287
Université de Bordeaux
Bât. 2A- 3e étage-Case 22
146 rue Leo Saignat

33076 BORDEAUX CEDEX

Table des matières

Liste des abréviations	8
Introduction générale	11
I. Bases neuronales des actes moteurs	12
I.1. Actes réflexes	12
I.2. Motricité rythmique	14
I.2.1. Les générateurs centraux de patterns moteurs (CPG)	14
I.2.2. Organisation synaptique des CPG	14
I.2.3. Propriétés oscillatoires endogènes : neurones « pacemaker »	17
I.2.4. Neuromodulation et adaptabilité des CPG	19
I.3. Genèse de comportements motivés	22
I.3.1. Motivation comportementale	22
I.3.2. Prise de décision	23
I.3.3 Systèmes modulateurs monoaminergiques	24
II. Bases neuronales des Apprentissages	28
II.1. Approches « réductionnistes » de l'apprentissage	28
II.2. Apprentissages élémentaires (non-associatifs)	30
II.3. Apprentissages associatifs	32
II.3.1. Conditionnement classique	32
II.3.2. Conditionnement opérant	34
II.4. Questions scientifiques	36
III. Conditionnement opérant appétitif chez l'aplysie	39
III.1. Comportement alimentaire chez l'aplysie	39
III.2. Conditionnement opérant du comportement alimentaire	40
III.3. Réseau générateur des patterns moteurs radulaires	42
 Problématique	 44
Matériels et Méthodes	45
I. Animaux	46
II. Conditionnement opérant	46
III. Préparations nerveuses <i>in vitro</i>	47
IV. Solutions ioniques	48

V. Techniques électrophysiologiques	49
V.1. Enregistrements extracellulaires « en passant » et stimulations	49
V.2. Enregistrements intracellulaires	50
V.2.1. Seuil d'excitabilité :	51
V.2.2. Propriétés oscillatoires :	51
V.2.3. Couplage électrique et résistance membranaire :	51
V.2.4. « Dynamic clamp » :	52
V.3. Visualisation et traitement des données électrophysiologiques	53
VI. Pharmacologie	53
VII. Analyse statistique.....	54
 Résultats	 56
Chapitre 1 : Rôles différentiels des plasticités membranaires et synaptiques dans l'expression compulsive du comportement alimentaire.....	57
I. Introduction	57
II. Résultats.....	60
II.1. Modifications des conductances membranaires et synaptiques induites par l'apprentissage	60
II.2. L'augmentation d'excitabilité neuronale est responsable de l'accélération de la genèse des patterns moteurs radulaires.....	63
II.3. Un renforcement sélectif des synapses électriques régularise de la genèse des PMR.	67
II.4. Une modification concomitante des propriétés neuronales intrinsèques et de la force des synapses électriques reproduit tous les aspects de la plasticité motrice.	70
II.5. Une modification des propriétés membranaires et synaptiques opposée aux effets de l'apprentissage restaure un phénotype d'activité naïf.	74
III. Discussion	77
 Chapitre 2 : Implication d'une modulation dopaminergique dans la plasticité comportementale et neuronale induite par apprentissage opérant.....	81
I. Introduction	81
II. Résultats.....	84
II.1. Connectivité monosynaptique dopaminergique de l'afférence En.2 sur les neurones déclencheurs du pattern.	84
II.2. Une libération contingente de dopamine induit une plasticité d'expression du pattern moteur radulaire.	90

II.3. La libération contingente de DA induit une plasticité des propriétés membranaires intrinsèques de B63.....	94
II.4. Une libération contingente de DA augmente le couplage électrique entre les neurones B63.....	98
III. Discussion	101
 Chapitre 3 : Mécanismes cellulaires supportant la variabilité des émissions motrices du comportement alimentaire.....	105
I. Introduction	105
II. Résultats.....	107
II.1. Activité oscillatoire spontanée des neurones B63.....	107
II.2. Potentiel de plateau.....	109
II.3. Terminaison du plateau	112
II.4. Déclenchement des plateaux : propriétés oscillatoires de B63	114
II.5. Flux ioniques impliqués dans l'oscillation du potentiel de membrane.....	116
II.6. Régulation de l'oscillation par une dynamique calcique intracellulaire	117
II.7. Comportement variable des propriétés bioélectriques de B63	119
III. Discussion	121
III.1. Courants ioniques responsables de l'activité pacemaker de B63.....	121
III.2. Sources possibles de variabilité de l'activité de B63	124
 Discussion générale.....	128
 Bibliographie.....	133
 Annexes.....	145

Table des matières figures

Introduction générale.....	11
Figure 1. Arcs réflexes monosynaptiques et polysynaptiques impliqués dans la réponse à l'étirement d'un muscle.	13
Figure 2. Rythme cardiaque chez la sangsue et diagramme de connexion segmentaire du CPG cardiaque.	16
Figure 3. Propriétés neuronales intrinsèques impliquées dans la genèse de patterns moteurs.....	18
Figure 4. Contrôle neuromodulateur de la sortie motrice du système nerveux stomatogastrique.	21
Figure 5. Représentation schématique non-exhaustive des connexions anatomiques impliquées dans l'initiation des comportements motivés.	25
Figure 6. Sensibilisation du réflexe de retrait de la branchie et voies mono- et polysynaptiques impliquées.	31
Figure 7. Conditionnement classique.	33
Figure 8. Conditionnement opérant.	35
Figure 9. Facilitation associative des synapses sensorimotrices supportant le conditionnement classique chez l'aplysie.	38
Figure 10. Conditionnement opérant appétitif.....	41
Figure 11. CPG buccal responsable de la genèse des patterns moteurs radulaires.....	43
Matériels et méthodes	45
Figure 12. Préparations nerveuses <i>in vitro</i>	50
Résultats : Chapitre I	57
Figure 13. Accélération et augmentation de la régularité de la genèse motrice induite par l'apprentissage et activités associées des neurones B63/B30/B65.	58
Figure 14. L'apprentissage induit une plasticité membranaire des neurones B63/B30/B65	61
Figure 15. L'apprentissage induit une plasticité des synapses électriques des neurones B63/B30/B65.....	62
Figure 16. Une augmentation artificielle de l'excitabilité des neurones B63/B30/B65 dans les préparations naïves mime l'augmentation de la fréquence de la genèse des PMR, mais ne réduit pas la variabilité des intervalles inter-PMR.	65
Figure 17. Modification de la conductance d'entrée des neurones B63/B30/B65 et de leur couplage électrique apparent par la manipulation d'une conductance de fuite (G_{leak}).....	66
Figure 18. Une augmentation artificielle de la force des synapses électriques entre les neurones B63/B30/B65 dans les préparations naïves mime l'augmentation de la régularité des intervalles inter-PMR, sans modifier la fréquence de la genèse des PMR.	68
Figure 19. Les conductances simulées de jonction synaptique (G_{junc}) modifient la conductance d'entrée naturelle et l'excitabilité des neurones B63/B30/B65	69

Figure 20. Effets de changements concomitants dans G_{leak} et G_{junc} sur les propriétés cellulaires.....	72
Figure 21. Dans les préparations naïves, une augmentation concomitante de l'excitabilité et de la force des synapses électriques des neurones B63/B30/B65 induit simultanément l'accélération de la genèse des PMR et la régulation de la variabilité inter-PMR.....	73
Figure 22. Effets indépendants de G_{leak} ou G_{junc} sur les bouffées d'activité de B63/B30/B65 et sur la genèse des PMR dans les préparations Contingentes.	75
Figure 23. Dans les préparations Contingentes, une diminution concomitante de l'excitabilité et de la force des synapses électriques des neurones B63/B30/B65 induit un retour à un phénotype Contrôle de la genèse motrice.....	76
Résultats : Chapitre II	81
Figure 24. Influence monosynaptique des nerfs sensoriels œsophagiens sur les neurones B63.	85
Figure 25. Le blocage pharmacologique des récepteurs dopaminergiques supprime la dépolarisation de B63 évoquée monosynaptiquement par En.2.....	87
Figure 26. Le Flupenthixol ne bloque pas la genèse motrice incitée par la stimulation incitative des nerfs 2,3.	89
Figure 27. Analogue <i>in vitro</i> du conditionnement opérant.....	91
Figure 28. Le blocage des récepteurs dopaminergiques empêche la mise en place d'une plasticité motrice induite par un analogue <i>in vitro</i> du conditionnement opérant.	93
Figure 29. Le Flupenthixol bloque la plasticité des propriétés membranaires induite par le conditionnement opérant <i>in vitro</i>	96
Figure 30. Le blocage des récepteurs dopaminergiques empêche la mise en place de propriétés oscillatoires rythmiques du potentiel de membrane.	97
Figure 31. Le Flupenthixol bloque l'augmentation de couplage électrique induite par le conditionnement opérant <i>in vitro</i>	100
Résultats : Chapitre III	105
Figure 32. Activité générée par les B63 isolés synaptiquement.	108
Figure 33. Bistabilité du potentiel de B63.....	110
Figure 34. Contribution de flux cationiques entrants au potentiel de plateau	111
Figure 35. Implication d'un courant potassique activé par le calcium dans la terminaison spontanée du plateau de B63	113
Figure 36. Mise en évidence d'une propriété oscillatoire du potentiel membranaire de B63 distincte des potentiels de plateau	115
Figure 37. L'oscillation du potentiel dépend strictement du Na^+ extracellulaire, mais pas du Ca^{2+} extracellulaire.....	116
Figure 38. Implication d'une dynamique calcique intracellulaire dans la genèse de l'oscillation membranaire de B63	118
Figure 39. Variabilité temporelle des activités endogènes de B63.....	120
Figure 40. Modèle proposé	123

Liste des abréviations

5-HT : Sérotonine

ADN : Acide désoxyribonucléique

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

ASW : Artificial Sea Water (eau de mer artificielle)

ATP : Adénosine tri-phosphate

B : Neurone buccal (ces neurones sont distingués par un nombre qui leur est propre ; par exemple : B63, neurone buccal 63)

BAPTA : 1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid

Ca²⁺ : ion calcium

Ca Free : Solution d'eau de mer artificielle privée de l'ion Ca²⁺

CAN : Canal cationique non-spécifique

Co²⁺ : ion cobalt

Cont. : Contingent

CPA : Acide cyclopianoïque

CPG : Central Pattern Generator (Réseau générateur de pattern moteur)

CS : Stimulus conditionnel

CR : Réponse conditionnée

C.V. ou c.v. : Coefficient de Variation

DA : Dopamine

DMSO : Diméthylsulfoxyde

EC50 : Concentration excitatrice médiane

En.2 : Branche antérieure du nerf œsophagien

FFA : Acide flufénamique

Flu : Flupenthixol

G_{junc} : Conductance de jonction d'une synapse électrique

G_{leak} : Conductance membranaire de fuite (« leak »)

G_{nat.} : Conductance naturelle

Hi Div : High Divalent ions saline (eau de mer artificielle riche en ions divalents)

I ou i : Courant électrique ou ionique

IC50 : Concentration inhibitrice médiane

ICAN : Courant cationique non-spécifique

I_{cav} : Courant calcique supporté par des canaux voltage-dépendants

I_h : courant cationique activé par hyperpolarisation

I_{KCa} : Courant potassique supporté par des canaux potassiques activés par le voltage

I_{NaP} : Courant sodique persistant

IP3 : Inositol tri-phosphate

K⁺ : ion potassium

Low Ca, Co : Solution d'eau de mer artificielle (ASW) appauvrie en calcium, additionnée de cobalt

LP : Neurone pylorique latéral

n. : nerf

NA : Noradrénaline

Na⁺ : ion sodium

Na Free : Solution d'eau de mer artificielle privée de l'ion Na⁺

Non-cont. : Non contingent

N.S. ou n.s. : Non significatif

PKA : Protéine kinase A

PKC : Protéine kinase C

PMR : Pattern moteur radulaire

PA : Potentiel d'action

SERCA : Sarco/reticulo calcium ATPases

RyR : Récepteur ryanodine

TEA : Tétra-éthyl-amonium

TRP : Transient Receptor Potential channel

US : Stimulus inconditionnel

Introduction générale

Depuis les travaux de Sir Charles Scott Sherrington sur l'origine centrale des actes réflexes, notre connaissance des mécanismes neuronaux impliqués dans la genèse et l'adaptation des comportements découle essentiellement de l'étude des motricités stéréotypées ou automatiques. Dans cette catégorie de comportements, on distingue des actes moteurs réflexes déclenchés de façon prévisible par des stimulations sensorielles périphériques et des motricités générées de façon autonome par le système nerveux central telles que la respiration ou la locomotion (Sherrington, 1906; Delcomyn, 1980). Bien que l'émission des actes moteurs automatiques soit prédictible, ces comportements sont adaptés constamment et plus ou moins durablement en fonction des informations sensorielles. Par exemple, l'intensité des actes réflexes peut être modifiée par des procédures d'apprentissages simples (habituation, sensibilisation) mettant en jeu l'application répétée d'un stimulus. L'établissement de ces apprentissages implique des plasticités synaptiques (dépression et facilitation synaptique) au niveau des ensembles de neurones centraux impliqués dans l'action (Kandel, 2001).

Pour autant, le répertoire comportemental des animaux ne se résume pas à des motricités automatiques exprimées de façon stéréotypée. Ainsi, dans un environnement constant, la satisfaction de besoins fondamentaux tels que le besoin de s'alimenter, de boire ou de se reproduire requiert l'émission de comportements motivés. Contrairement aux actes moteurs automatiques, ces comportements sont émis sporadiquement avec une grande variabilité d'expression. Une des propriétés remarquable de ces comportements est leur flexibilité qui caractérise leur capacité à adapter leur expression en fonction des informations sensorielles ou de la motivation à agir de l'animal. Aussi, des processus d'apprentissages impliquant des stimuli sensoriels appétitifs (satisfaisants pour l'organisme) ou aversifs contribuent à la sélection des stratégies motrices les plus pertinentes pour accomplir une tâche ou assouvir un besoin particulier (Skinner, 1938). Cependant, les mécanismes neuronaux qui déterminent l'émission de ces comportements motivés ainsi que les processus de plasticité impliqués dans leur régulation par des apprentissages restent largement méconnus.

Dans cette introduction, je m'attacherai à décrire les principes généraux d'organisation des ensembles de neurones responsables des actes moteurs automatiques ou motivés. Je décrirai ensuite le lien fonctionnel entre les apprentissages et la plasticité du système nerveux. Enfin, je présenterai le modèle expérimental utilisé au cours de cette étude : le conditionnement opérant du comportement alimentaire chez le mollusque aplysie. Ce modèle d'étude nous a permis d'aborder avec succès l'étude des mécanismes cellulaires qui sous-tendent la genèse et l'adaptation d'un comportement motivé.

I. Bases neuronales des actes moteurs

I.1. Actes réflexes

Un réflexe est une réponse motrice automatique qui dépend de l'activation par un stimulus sensoriel d'un circuit du système nerveux central ou arc réflexe qui va générer une réponse motrice innée. On retrouve ces actes moteurs aussi bien chez les invertébrés que chez les vertébrés. Suite à la détection d'un stimulus par un capteur sensoriel, un signal nerveux est intégré par un ou plusieurs relais synaptiques au niveau du système nerveux central et une réponse motrice brève et proportionnée au stimulus est générée. Un des réflexes les plus simples et les mieux étudié chez les vertébrés supérieurs est le réflexe responsable de la réponse à l'étirement d'un muscle. Cette réponse dépend de l'activation d'un relai unique entre les neurones sensoriels et les neurones effecteurs de la moelle épinière (Figure 1). Suite à l'étirement d'un muscle, un retour excitateur direct sur les motoneurones innervant le muscle qui a été étiré va induire la contraction de ce dernier. Des connexions synaptiques indirectes (voies polysynaptiques) impliquant des interneurones inhibiteurs vont quant à elles aboutir à l'inhibition des motoneurones innervant les muscles antagonistes au muscle étiré. Ce type d'organisation des circuits réflexes spinaux est appelé innervation réciproque et assure la contraction rapide du muscle étiré et la relaxation simultanée des muscles antagonistes.

Dans son influente monographie intitulée « The Integrative Action of The Nervous System », Sherrington formula la théorie selon laquelle le système nerveux coordonne les mouvements des différentes parties du corps par l'intermédiaire des actes réflexes qui sont l'expression la plus élémentaire de l'interaction du système nerveux avec son environnement (Sherrington, 1906). Sherrington considérait alors que le système nerveux était inactif avant d'être engagé par des stimulations sensorielles dans la genèse d'un acte moteur approprié. Cependant, sa position ainsi que celle de ses contemporains évolua considérablement suite aux travaux de Thomas Graham Brown qui montra qu'une moelle épinière de chat, isolée de tout retour sensoriel, produit de façon endogène une activité organisée de commande motrice (Brown, 1911; Brown, 1914). De fait, il a été montré par la suite que la genèse d'activités rythmiques et organisées requiert l'existence de réseaux neuronaux centraux capables de coordonner de façon autonome des séquences de décharge (ou patterns moteurs) sur différentes populations de motoneurones.

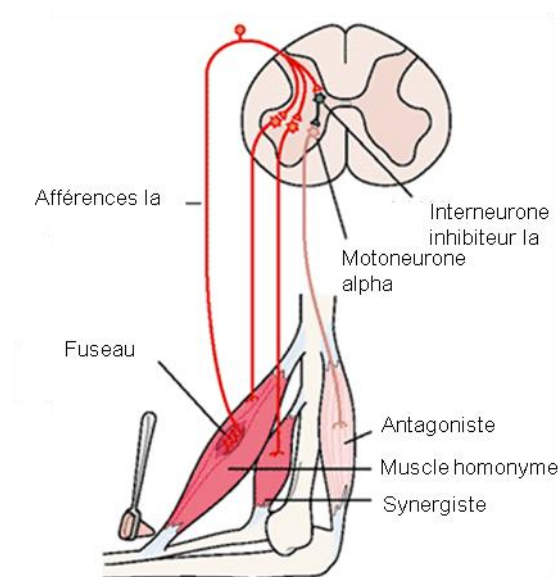


Figure 1. Arcs réflexes monosynaptiques et polysynaptiques impliqués dans la réponse à l'étirement d'un muscle.

Les réflexes d'étirement dépendent d'une voie monosynaptique. Des fibres nerveuses la afférentes provenant des fuseaux neuromusculaires forment des connexions excitatrices sur deux groupes de motoneurones : Les motoneurones alpha qui innervent le muscle étiré dont elles sont issues et des motoneurones qui innervent des muscles synergistes. Les fibres Ia contactent également des neurones inhibiteurs qui vont inhiber les motoneurones alpha projetant sur les muscles antagonistes au muscle étiré.

Adapté de Kandel et al., 2000.

I.2. Motricité rythmique

Les comportements automatiques rythmiques et vitaux pour l'organisme tels que la respiration, la locomotion ou encore la mastication dépendent de l'activité autonome de générateurs centraux de patterns moteurs (CPG) (Grillner & Wallen, 1985; Nusbaum & Beenhakker, 2002). Ces réseaux sont capables de générer et d'organiser spontanément des activités de commande motrice en l'absence de tout retour sensoriel. L'étude systématique de certains CPG chez les vertébrés et les invertébrés, permet de dégager des principes généraux de leur organisation.

I.2.1. Les générateurs centraux de patterns moteurs (CPG)

Pour étudier les propriétés fonctionnelles de ces réseaux, un grand nombre de préparations de systèmes nerveux isolés de vertébrés et d'invertébrés a été développé. En l'absence de muscles effecteurs de la commande motrice dans ces préparations *in vitro*, les patterns d'activités électriques sont enregistrés au niveau des nerfs moteurs. Ces patterns moteurs décrivent les séquences et la dynamique des contractions musculaires générées lors d'un comportement et sont ainsi parfois qualifiés de comportements fictifs. Les réseaux CPG qui les produisent ont été décrits chez des invertébrés qui possèdent des atouts simplifiant grandement l'étude de leur organisation cellulaire et synaptique : (1) Le nombre de cellules est réduit ; (2) il est possible de montrer l'appartenance d'un neurone au réseau CPG et (3) il est possible de déterminer son rôle dans la genèse du pattern.

I.2.2. Organisation synaptique des CPG

La description systématique de certains CPG d'invertébrés a permis l'établissement de diagrammes de connexion entre des neurones identifiés. Certains types d'organisation sont conservés dans les différents circuits étudiés. Par exemple, beaucoup de CPG présentent des synapses inhibitrices réciproques entre les neurones, alors que les synapses excitatrices sont généralement moins nombreuses. L'activité de décharge alternée entre deux neurones ou deux groupes de neurones connectés par des synapses inhibitrices réciproques peut être à l'origine de cycles répétés d'activités motrices. Les inhibitions réciproques qui caractérisent ces organisations dites en « half-center » peuvent également être responsables de la stricte alternance de la décharge de deux neurones oscillateurs endogènes ou de

deux groupes de neurones oscillants. C'est notamment le cas des CPG responsables des rythmes cardiaques chez la sangsue (Figure 2) (Cymbalyuk et al., 2002; Ambroise et al., 2013). Ce principe d'organisation très simple se retrouve à l'échelle d'ensembles de neurones plus grands comme les réseaux locomoteurs chez les vertébrés. Chez ces derniers, on suppose que les connexions inhibitrices réciproques entre oscillateurs sont à l'origine de la contraction alternée de segments musculaires antagonistes, ainsi que de l'alternance droite gauche entre les membres (Brown, 1911; Cohen et al., 1992; Ijspeert et al., 2007).

En plus des synapses chimiques, il est courant que les neurones des CPG soient connectés par des synapses électriques. Une synapse électrique permet le passage direct des ions et des petites molécules hydrophiles entre les cytoplasmes de deux cellules couplées. Elle permet donc à la fois un couplage électrique (passage de courants portés par les ions) et un couplage métabolique (passage de petites molécules de moins de 900 Da telles que les seconds messagers). Les synapses électriques contribuent dans de nombreux cas à synchroniser les activités neuronales entre neurones couplés électriquement. Cet effet synchronisateur contribue vraisemblablement à coordonner les activités électriques entre des neurones déchargeant en phase dans les réseaux (Bennett & Zuckin, 2004). Cependant, le rôle des couplages électriques ne s'avère pas univoque. Ainsi, des travaux de modélisation indiquent qu'en fonction de la force des couplages électriques ces synapses pourraient également contribuer au maintien des relations de phase alternées entre les activités de neurones déchargeant en antiphase (Bem & Rinzel, 2004). Par ailleurs, plusieurs travaux théoriques suggèrent que les synapses électriques pourraient contribuer à la genèse et à la synchronisation d'oscillations du potentiel de membrane dans les neurones en réseaux (Loewenstein et al., 2001).

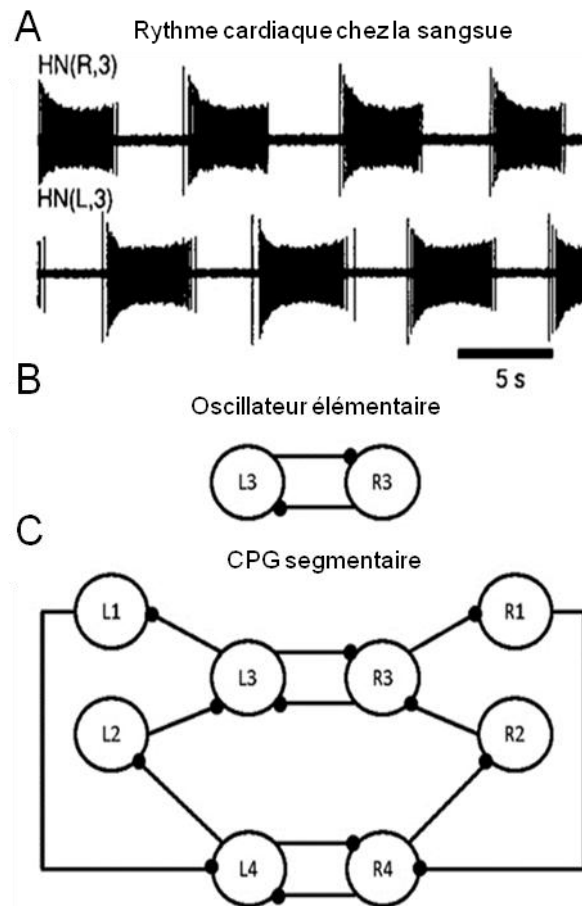


Figure 2. Rythme cardiaque chez la sangsue et diagramme de connexion segmentaire du CPG cardiaque.

Les synapses chimiques inhibitrices sont représentées par des cercles pleins. (A) Activité électriques générées par deux interneurons enregistrés dans une chaîne ganglionnaire par des électrodes extracellulaires. (B) Diagramme d'un oscillateur élémentaire constitué de deux neurones dans le système générateur du rythme cardiaque. (C) Diagramme d'un oscillateur segmentaire dans le générateur de rythme incluant les deux oscillateurs élémentaires L3/R3 et L4/R4 et deux paires de neurones coordinateurs L1/R1 et L2/R2.

Adapté de Ambroise et al., 2013.

Néanmoins, si la connaissance des connexions entre les neurones est une condition nécessaire pour comprendre le fonctionnement des CPG, elle n'est en aucun cas une condition suffisante. Par exemple, pour qu'un réseau minimal de deux neurones interconnectés par des synapses inhibitrices puisse produire des cycles de décharges alternées, les deux cellules doivent posséder l'une ou l'autre des deux propriétés suivantes : elles doivent être capables de « sortir » de l'inhibition, ou d'adapter leur décharge pour que leur partenaire puisse à nouveau être actif (Sharp et al., 1996). Par ailleurs, l'étude des CPG les mieux décrits (tels que les réseaux contenus dans le système nerveux stomatogastrique des crustacés) démontre que l'émergence des activités organisées à l'échelle des réseaux découle de l'interaction entre les propriétés synaptiques d'une part et les propriétés intrinsèques individuelles des neurones d'autre part (Figure 3). Ces propriétés intrinsèques de bistabilité, d'adaptation à la décharge, de rebond post-inhibiteur ou encore d'oscillation spontanée sont déterminées par des flux ioniques transmembranaires dépendant de pores membranaires (canaux ioniques). Chaque neurone exprime ainsi un ensemble de canaux membranaires qui détermine son comportement individuel et lui confère des propriétés dynamiques au sein des réseaux dans lesquels il est connecté à d'autres neurones.

1.2.3. Propriétés oscillatoires endogènes : neurones « pacemaker »

Dans un grand nombre de réseaux neuronaux les propriétés rythmiques dépendent d'oscillations endogènes du potentiel de membrane d'un petit nombre de neurones dits pacemakers. Le potentiel de ces neurones oscille périodiquement entre une phase de dépolarisation suivie d'une phase d'hyperpolarisation du potentiel de membrane. Lors de leur phase de dépolarisation, ces neurones génèrent des bouffées de potentiels d'actions (PA) qui vont déclencher une impulsion synaptique sur d'autres éléments du réseau. Ainsi, les neurones pacemakers, lorsqu'ils sont isolés fonctionnellement des autres neurones (c'est à dire coupés de toute connexion synaptique), conservent leur capacité à générer spontanément des oscillations du potentiel de membrane supportant des bouffées de PA. Les propriétés oscillatoires de ces neurones résultent de l'interaction coordonnée entre des canaux ioniques impliqués dans la dépolarisation et des canaux ioniques responsables de l'hyperpolarisation du potentiel de membrane. Les propriétés oscillatoires endogènes

dépendent de canaux membranaires voltage-dépendants, tels les canaux responsables des courants activés par l'hyperpolarisation, de courants calciques ou sodiques persistants, ainsi que de canaux modulés par le calcium intracellulaire, responsables de courants cationiques non-spécifiques CAN (DiFrancesco et al., 1986; Pape, 1996; Tazerart et al., 2008; Ransdell et al., 2013). Des canaux potassiques voltage-dépendants ou activés par le calcium de type K_{Ca} contribuent quant à eux à la phase de terminaison des bouffées d'activités (Meech & Standen, 1975). Les pompes impliquées dans le maintien du potentiel de repos des cellules telles que la Na^+/K^+ ATPase peuvent également contribuer aux propriétés oscillatoires endogènes du potentiel de membrane (Angstadt & Friesen, 1991).

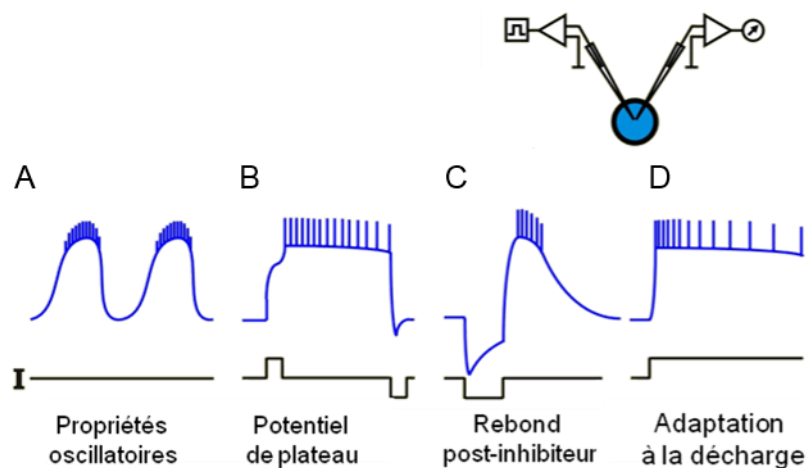


Figure 3. Propriétés neuronales intrinsèques impliquées dans la genèse de patterns moteurs.

Les neurones impliqués dans la genèse de patterns ont des propriétés membranaires différentes. (A) Les neurones spontanément rythmiques ont un potentiel membranaire oscillant entre le potentiel de repos et le seuil de déclenchement de potentiels d'action (PA). (B) Dans certains neurones des pulses de courant dépolarisant déclenchent un potentiel de plateau qui excède dans le temps la durée du pulse injecté mais peut être terminé par un pulse de courant hyperpolarisant. (C) Certains neurones répondent à l'hyperpolarisation avec une propriété de rebond post-inhibiteur. (D) Enfin, certains neurones adaptent leur décharge de PA lorsqu'ils sont dépolarisés. Les tracés du bas correspondent à l'injection de courant.

Modifié d'après Marder & Bucher 2001.

I.2.4. Neuromodulation et adaptabilité des CPG

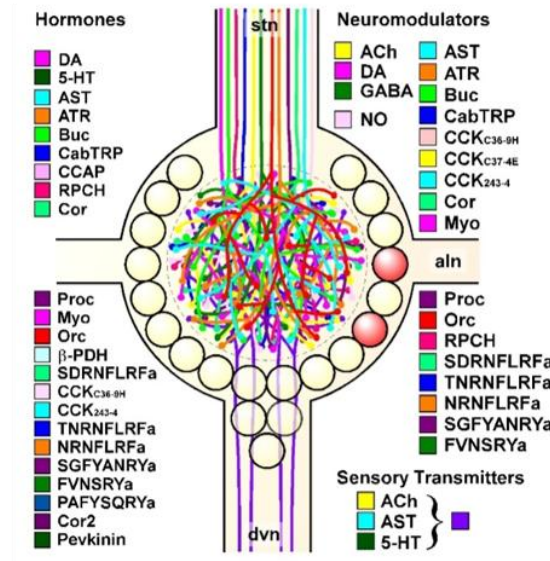
Les propriétés des canaux ioniques des neurones ainsi que la force de connexion des synapses chimiques ou électriques peuvent être modifiées par l'action d'agents modulateurs. Ces modifications neuronales et synaptiques entraînent une reconfiguration fonctionnelle des réseaux de neurones qui contribue à leur adaptation lors de processus tels que le développement, les modifications environnementales ou les apprentissages (Johnson et al., 1995; Ducret et al., 2007; Díaz-Ríos & Miller, 2006). Les neuromodulateurs impliqués dans ces adaptations motrices regroupent un grand nombre de substances libérées par des neurones telles que les bioamines (dopamine, sérotonine, noradrénaline...), plusieurs familles de neuropeptides (substance P, proctoline...) et des petites molécules telles que l'acétylcholine. L'action de ces substances neuromodulatrices est permise par des récepteurs couplés à des protéines G. La liaison d'un neuromodulateur à son récepteur induit l'activation de cascades moléculaires intracellulaires qui vont aboutir à une modification du comportement des canaux ioniques et/ou des synapses. Cette action neuromodulatrice excède dans le temps la simple neurotransmission dépendante de l'activation de récepteurs canaux et peut agir simultanément sur plusieurs sites cellulaires. Les sources de neuromodulation peuvent dépendre de neurones modulateurs appartenant au réseau ou projetant sur celui-ci. Elles sont alors respectivement qualifiées d'intrinsèques ou d'extrinsèques (Katz et al., 1994). Les voies neuronales impliquées peuvent dépendre de voies de commande descendantes ou de voies directement activées par des neurones sensoriels.

Chez les vertébrés, les CPG sont puissamment modulés par ces systèmes. Ainsi, l'activité des CPG locomoteurs chez les vertébrés supérieurs, peut être induite et modulée par l'application exogène des monoamines telles que la sérotonine (5-HT) et la dopamine (DA) (Cazalets et al., 1992; Barriere et al., 2004). En outre, des données indiquent que la sortie motrice de ces CPG est modulée de façon endogène par la 5-HT (Dunbar et al., 2010). Des voies descendantes noradrénergiques issues du pont exercent également une influence modulatrice importante sur les réseaux locomoteurs (Jordan et al., 2008). Cependant, la description la plus exhaustive des rôles joués par la neuromodulation dans l'adaptation de motricités automatiques rythmiques provient de l'étude des CPG contenus dans le ganglion stomatogastrique

des crustacés décapodes contrôlant les différentes activités motrices de l'appareil digestif antérieur (Marder & Bucher, 2007). Un nerf unique, le nerf stomatogastrique, connecte le ganglion au reste du système nerveux. Il forme une voie descendante qui contient des dizaines de neuromodulateurs différents et contrôle la sortie motrice du système nerveux (Figure 4A). Ainsi, la mise au silence ou l'ablation de ces fibres entraîne une mise au silence du réseau. Dans ce système, les neurones individuels expriment des récepteurs spécifiques pour plusieurs types de neuromodulateurs. En conséquence, ces réseaux sont capables de produire différentes sorties motrices en fonction de l'action spécifique des différents agents neuromodulateurs présents dans le système nerveux (Figure 4B).

Des études mettent également en évidence la capacité des CPG à modifier leur sortie motrice en fonction d'informations sensorielles (Hooper & Moulins, 1989, 1990; Nargeot & Moulins, 1997). Chez les gastéropodes marins *Tritonia diomedea* et *Pleurobranchaea californica*, une modulation sérotoninergique intrinsèque activée par des stimuli environnementaux est nécessaire au déclenchement d'un comportement locomoteur de fuite (Lillvis & Katz, 2013). Chez les vertébrés, des informations sensorielles vont moduler directement ou indirectement l'activité des CPG locomoteurs afin d'adapter le comportement aux contraintes de l'environnement (Pearson & Collins, 1993; Pearson, 2000; Burke et al., 2001; McCrea, 2001). Comme nous venons de le voir, les afférences sensorielles *via* l'action d'agents neuromodulateurs contribuent à rendre flexibles les activités motrices automatiques produites par des CPG. Cependant la variabilité motrice n'est pas uniquement d'origine périphérique ou sensorielle. Cette dernière peut également dépendre de facteurs centraux comme on l'observe dans le cas des comportements motivés.

A



B

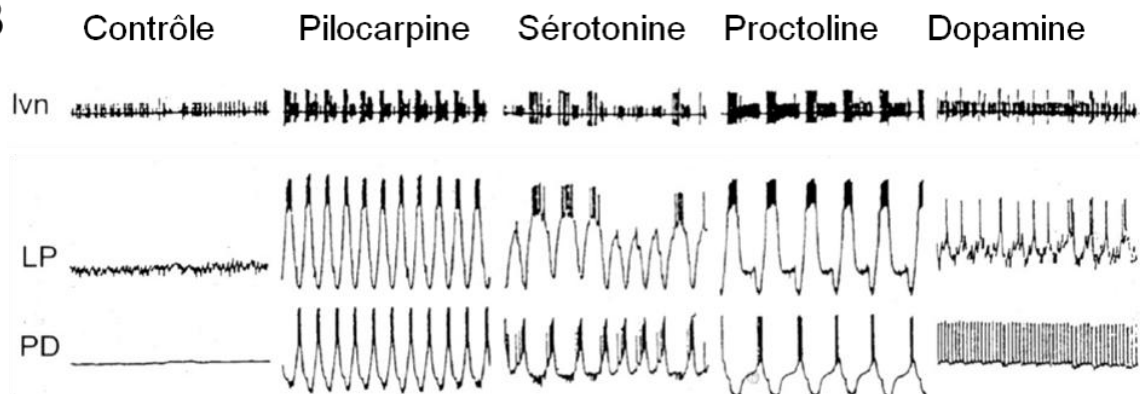


Figure 4. Contrôle neuromodulateur de la sortie motrice du système nerveux stomatogastrique.

(A) Le ganglion stomatogastrique est directement modulé par des fibres descendantes de neurones modulateurs et des fibres ascendantes de neurones sensoriels. Ces projections neuronales directes libèrent un grand nombre de substances modulatrices dans les neuropiles (axones et dendrites) des neurones des réseaux stomatogastriques. (B) Après désafférenciation le CPG pylorique, responsable des mouvements coordonnés de la chambre pylorique, est réduit au silence (Contrôle). L'application exogène de neuromodulateurs tels que la pilocarpine, la sérotonine, la proctoline ou la dopamine module de façon différente la sortie motrice du réseau (enregistrée sur un nerf moteur), ainsi que la fréquence oscillatoire et le profil de décharge des neurones LP et PD appartenant au CPG pylorique.

Modifié d'après Marder, 2012.

I.3. Genèse de comportements motivés

Contrairement aux comportements automatiques émis en réponse à des stimuli ou générés à intervalles de temps réguliers par des CPG, l'émission des comportements motivés (alimentaire, sexuel...) est variable et dirigée vers l'obtention de stimuli satisfaisants pour l'organisme. Les processus déterminant la genèse de ces actes moteurs dépend de processus motivationnels et de fonctions exécutives du système nerveux central telles que la prise de décision. Ces processus exécutifs permettent de faire varier le traitement des informations sensorielles et la genèse du comportement à chaque instant en fonction des objectifs actuels et ceci d'une manière adaptative.

I.3.1. Motivation comportementale

La motivation est un état variable qui précède et stimule l'émission d'actions dirigées vers un but. En l'absence de mesure directe, cet état est inféré à partir de l'expression comportementale de l'animal. Les états motivationnels élémentaires tels que la soif et la faim résultent du besoin pour l'organisme de réguler son homéostasie. On peut définir cette dernière comme la maintenance de l'ensemble des paramètres physico-chimiques de l'organisme qui doivent rester relativement constants. La faim résulte d'une diminution de la glycémie et sa régulation dépend de fluctuations de neuropeptides dans la circulation sanguine (leptines, grehline) et dans l'hypothalamus (neuropeptide Y, orexines, melanocortines...) (Saper et al., 2002; Horvath & Diano 2004). La soif est contrôlée à la fois par des fluctuations des informations vagues associées à l'hypovolémie ainsi que par la déshydratation de cellules de l'aire préoptique de l'hypothalamus (Blass & Epstein, 1971; Peck & Novin, 1971). La motivation dépend également de l'action du système hormonal. Ce dernier régule notamment les comportements de cour associés à la recherche d'un partenaire sexuel. L'émission variable des comportements motivés résulte en partie de ces états motivationnels internes. Ces derniers sont eux même régulés par des stimuli sensoriels appétitifs. En fonction des expériences passées de l'animal (encodées dans le système nerveux *via* des apprentissages) certains stimuli incitatifs du comportement peuvent prédire l'obtention de stimuli plaisants pour l'organisme, ou récompenses, qui contribuent à la satisfaction d'un besoin fondamental. Cependant, le terme de récompense présente différentes acceptions selon les

auteurs qui l'utilisent (Wise, 2009). Aussi, la composante hédonique ou affective d'une récompense peut primer dans certains cas sur la satisfaction d'un besoin physiologique. Par exemple des expériences permettant à des animaux de déclencher la stimulation directe de leurs circuits de la récompense induisent une autostimulation effrénée qui ne répond pas à un besoin physiologique (Olds & Milner, 1954). Par ailleurs, dans de nombreuses études le concept de récompense n'est pas dissocié du concept de renforcement positif qui désigne dans les apprentissages associatifs le processus par lequel un stimulus satisfaisant pour l'organisme va entraîner une augmentation de la probabilité d'émission d'un comportement (Cette notion de renforcement sera développée plus amplement dans un chapitre consacré à l'apprentissage).

En plus de stimuli internes et externes, la genèse des comportements motivés dépend de mécanismes décisionnels associés à des circuits complexes du système nerveux central.

I.3.2. Prise de décision

La décision d'agir implique que le système nerveux central possède des mécanismes structurels et fonctionnels qui déterminent la sélection d'une action particulière entre plusieurs actions possibles et le moment approprié pour son expression. Ces processus décisionnels dépendent de l'état motivationnel et sont sujets à une régulation par les stimuli sensoriels et les apprentissages associatifs. Chez les vertébrés, il a été longtemps supposé que l'ensemble de ces processus dépendaient uniquement de mécanismes d'intégration sensoriels et de contrôle des sorties motrices générées par le globus pallidus, le thalamus et les cortex moteurs et pré-moteurs (Mink, 1996). Plus récemment, de nombreuses études neuroanatomiques ont largement mis en avant le rôle de ganglions de la base dans la genèse et l'organisation des actions dirigées vers un but (Miller, 2008; Balleine & O'Doherty, 2009). Dans les ganglions de la base, le striatum, c'est-à-dire le complexe formé par le noyau caudé, le putamen et le noyau accumbens, reçoit la plupart des informations issues du cortex préfrontal. Il est organisé en régions topographiques définies comme la région dorsolatérale qui reçoit des informations sensori-motrices, la région dorsomédiane (recevant majoritairement des informations du cortex cingulaire et des informations du système limbique) et la région ventrolatérale (le

‘cœur’ du noyau accumbens qui reçoit des informations issues du système limbique de l’amygdale et de l’hippocampe dorsal). Cette organisation anatomo-fonctionnelle complexe traduit un rôle dans l’intégration sensorielle et dans la sélection des comportements, mais ne suffit pas à elle seule à rendre compte des mécanismes qui sous-tendent la prise de décision. Il apparaît toutefois que les mécanismes décisionnels sont déterminés par plusieurs régions du cerveau qui agissent en coopération ou de façon antagoniste pour générer des patterns d’action (Figure 5). Cependant, si les mécanismes qui président l’émission des comportements motivés restent méconnus, de nombreuses études mettent en évidence le rôle des monoamines dans leur adaptation.

I.3.3 Systèmes modulateurs monoaminergiques

Les monoamines sont une famille de neuromodulateurs dérivés d’acides aminés ayant pour point commun l’expression d’un groupe éthylamine lié à un noyau aromatique. La famille des monoamines est vaste et comprend de nombreuses substances neuromodulatrices telles que l’histamine, la dopamine, la noradrénaline (NA), l’adrénaline, la sérotonine, la mélatonine ou encore l’octopamine. Les catécholamines dont la DA, sont issues de l’hydroxylation la tyrosine en L-DOPA puis de la décarboxylation de celle-ci en DA. La DA est le précurseur de la noradrénaline et l’adrénaline qui sont obtenues respectivement par hydroxylation (NA) puis ajout d’un groupement méthyl (adrénaline). L’octopamine, dont la structure est très proche de la NA, résulte de l’hydroxylation de la tyramine, elle-même produite par décarboxylation de la tyrosine. Les monoamines jouent un rôle central dans le système nerveux central où elles sont impliquées dans la modulation de nombreuses fonctions du système nerveux telles que la vigilance, l’humeur, l’apprentissage, la récompense, le plaisir, ou encore la prise de décision et la motricité (Wise, 2009; Hamon & Blier, 2013). Des altérations de ces systèmes monoaminergiques sont impliquées dans de nombreuses pathologies telles que la dépression, les troubles psychiatriques, ou encore dans la maladie de Parkinson.

Je m’attarderai plus largement sur le rôle de la DA, en raison notamment de son implication dans les processus motivationnels et le contrôle moteur.

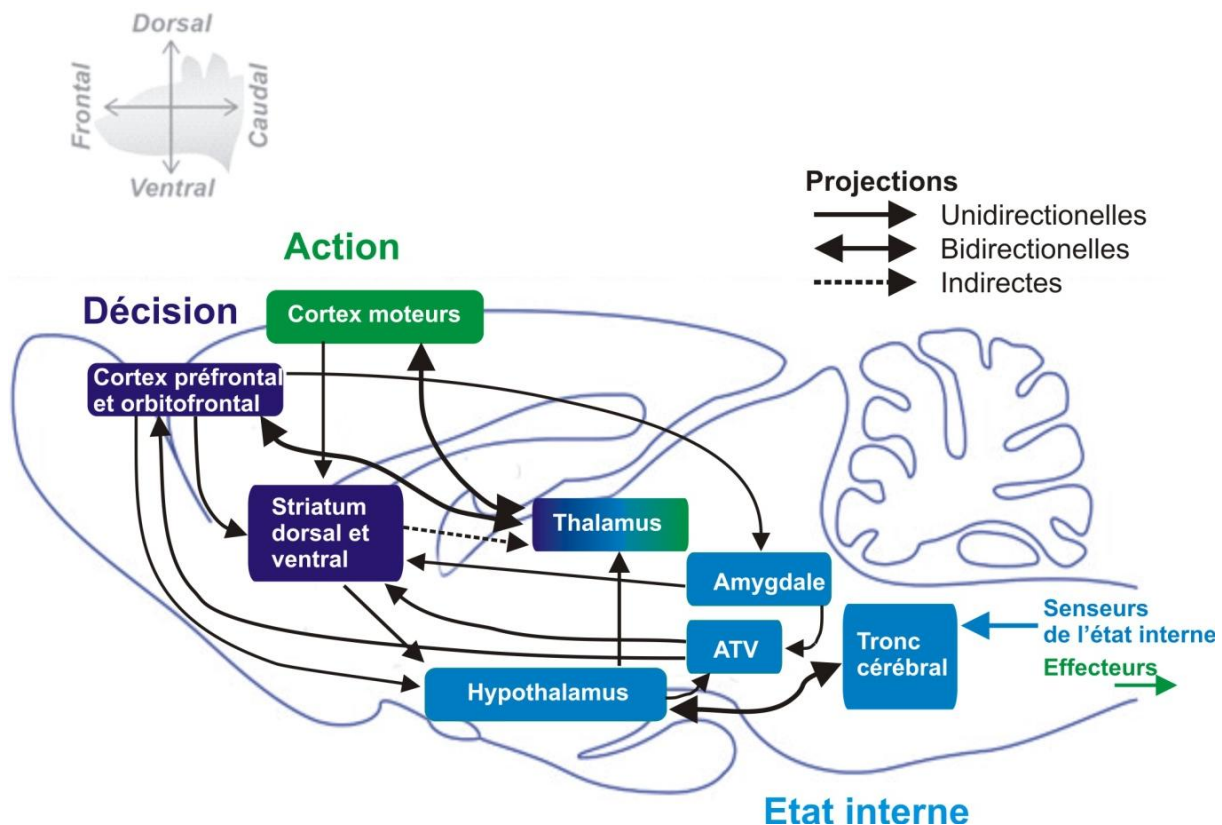


Figure 5. Représentation schématique non-exhaustive des connexions anatomiques impliquées dans la genèse des comportements motivés.

Dans cette représentation les structures en bleu clair contiennent les systèmes senseurs des variations de l'homéostasie de l'organisme telles que l'hypothalamus et certaines structures du tronc cérébral. Ces structures déterminent les états motivationnels qui définissent la nécessité de générer des actions dirigées. Les structures impliquées dans les processus décisionnels sont représentées en bleu foncé. Ces processus incluent l'évaluation des contraintes, but et valeurs des indices issus de l'environnement ainsi que l'évaluation des options par les cortex prémoteurs et orbitofrontaux. La sélection des actions dépend quant à elle du striatum (ainsi que d'autres structures des ganglions de la base recevant des projections de ce dernier). Les flèches du striatum au thalamus représentent des projections indirectes. Dans un souci de simplification les afférences émises par le cortex préfrontal sur le tronc cérébral, l'amygdale et de l'aire tegmentale ventrale (ATV) n'ont pas été représentées.

Modifié et simplifié d'après Verschure et al., 2014.

Chez les mammifères, le rôle critique de la dopamine (DA) dans les systèmes de récompense et dans la motivation est clairement établi. Les stimuli appétitifs, notamment alimentaires, activent des neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale (Wise, 2004; Schultz et al., 1993). La perception des récompenses est associée à une libération centrale de DA dans le noyau accumbens (Di Chiara & Bassareo, 2007) et les modifications comportementales qui en résultent sont induites en partie par la libération de ce neurotransmetteur dans les ganglions de la base (Balleine et al., 2007). Ainsi, la stimulation électrique ou optogénétique des voies dopaminergiques centrales induit des états motivationnels comparables à ceux observés après l'obtention de récompenses particulièrement appétissantes (Corbet & Wise, 1980; Adamantis et al., 2011; Steinberg et al., 2014).

La stimulation directe des centres dopaminergiques ou l'application exogène de DA induisent une modulation des propriétés membranaires et synaptiques des neurones striataux et corticaux impliqués dans les processus décisionnels (Gao et al., 2003; Yao et al., 2004; Trisch & Sabatini, 2012). Cependant, plusieurs limites se posent à l'étude du rôle fonctionnel des plasticités induites par la DA. En effet, les réseaux décisionnels innervés par les voies dopaminergiques centrales sont constitués de populations neuronales hétérogènes dont les rôles fonctionnels ne sont pas encore complètement établis. En outre, les effets de la DA diffèrent en fonction des populations de neurones ciblées et du type de récepteur exprimé par les neurones. Au total, 5 types de récepteurs à la DA sont exprimés chez les vertébrés (D1 à D5). Ces derniers sont classés généralement en deux familles : les «D1-like» (comprenant les D1 et D5) et les «D2-like» (D2, D3 et D4). «Les D1-like» sont couplés à une protéine Gs activant l'adénylate cyclase qui est l'enzyme de conversion de l'ATP en AMPc. En revanche, les «D2-like» sont couplés à une protéine Gi qui, à l'inverse, inhibe la production d'AMPc par l'adénylate cyclase (Missale et al., 1998). En raison de cette diversité de cibles et d'effets, l'action modulatrice de la DA sur les propriétés bioélectriques des réseaux de neurones décisionnels semble dans de nombreux cas contradictoire.

Cependant, l'implication des monoamines dans les adaptations comportementales ne se limite pas aux mammifères. Ces agents neuromodulateurs sont également présents dans le système nerveux des invertébrés (Barron et al., 2010). Chez les insectes, l'octopamine joue un rôle important dans la régulation des

comportements agressifs ainsi que dans les apprentissages appétitifs (Giurfa, 2006; Zhou et al., 2008). Toutefois, des données récentes chez la drosophile indiquent que l'action des neurones octopaminergiques sur les systèmes de récompense n'est pas directe, mais résulte de l'activation d'une population de neurones dopaminergiques (Burke et al., 2012). Il est par ailleurs établi chez l'abeille que la DA joue un rôle critique dans les apprentissages aversifs (Vergoz et al., 2007). Toujours chez les insectes la DA régule les états motivationnels, la motricité et contribue à donner une valeur appétitive à des stimuli sensoriels (Van Swinderen & Andretic, 2011; Inagaki et al., 2012). Enfin, chez les mollusques la DA contribue aux modifications durables de comportements motivés par des récompenses alimentaires (Brembs et al., 2004). Cela laisse à penser que les monoamines sont des substances essentielles à l'induction des modifications fonctionnelles du système nerveux qui sous-tendent les processus motivationnels et l'acquisition de nouveaux comportements dans une large partie du phylum animal. Ainsi, elles contribuent à de nombreux apprentissages et à la mémorisation des expériences sensori-motrices passées.

II. Bases neuronales des Apprentissages

Au milieu du XIX^e siècle, Charles Darwin suggéra que les caractéristiques mentales, comme les caractéristiques physiologiques se retrouvent à travers les espèces. Ceci inclut la formation de souvenirs et la mémoire des expériences passées. A la même époque, le psychologue allemand Hermann Hebbinghaus a posé des paradigmes expérimentaux d'apprentissage qui lui ont permis de mettre en évidence certaines propriétés essentielles de la mémoire. Il a ainsi montré que la durée des souvenirs est variable et que la répétition des sessions d'apprentissage augmente leur durabilité. Dès la fin du XIX^e siècle Santiago Ramón y Cajal postula que le stockage des souvenirs liés à l'apprentissage résultait d'un changement anatomique dans la force des connexions (ou synapses) entre les neurones du système nerveux central (Cajal, 1894). Un demi-siècle plus tard, Jerzy Konorski reprit l'idée initiale de Cajal et formula le concept de plasticité synaptique pour désigner la modulation de la force des connexions synaptiques par l'apprentissage (Konorski, 1948). Le terme de plasticité a depuis été étendu aux modifications des propriétés neuronales résultant de la modulation des canaux membranaires de neurones individuels. Ces plasticités ont largement été étudiées sur des préparations *in vitro*. Néanmoins, il a fallu attendre le développement de modèles expérimentaux suffisamment simples pour corrélérer leur expression à des processus adaptatifs des comportements.

II.1. Approches « réductionnistes » de l'apprentissage

A partir des années 1960, plusieurs modèles expérimentaux ont été développés dans le but de déterminer les bases cellulaires et synaptiques des apprentissages et de la mémoire. Des modèles tels que le réflexe de flexion chez le chat, les réponses de fermeture palpébrale (clignement de paupière) chez le lapin et une variété de réflexes simples chez les invertébrés ont été utilisés. On peut citer par exemple des apprentissages appétitifs chez la drosophile ou chez l'abeille, ou dans des circuits réflexes chez les gastéropodes marins *Tritonia*, aplysie, *Hermisenda*, et *Pleurobranchae*, ainsi que chez les limaces terrestres ou encore des modèles de modifications comportementales chez l'écrevisse (Spencer et al., 1966; Kupfermann & Kandel, 1969; Krasne, 1969; Alkon, 1974; Quinn et al., 1974; Dudai et al., 1976; Menzel & Erber, 1978; Thompson et al., 1983; Giurfa & Sandoz, 2012). Ces

approches ont bénéficié du développement de méthodes électrophysiologiques intracellulaires ainsi que de l'essor de la biologie moléculaire et plus récemment de méthodes d'imagerie fonctionnelle (Perisse et al., 2009; Plaçais et al., 2012). Ces travaux ont très largement contribué à établir le paradigme selon lequel la plasticité synaptique constitue un support neurophysiologique à l'encodage des souvenirs par le système nerveux central. Par la suite, diverses formes de plasticités synaptiques, supportées par des mécanismes de renforcement ou de diminution de la force des synapses, à court ou long terme, ont été découvertes chez les mammifères. Une des formes de plasticité les plus largement décrites est la potentialisation à long terme (LTP), mise en évidence dans les synapses de l'hippocampe (Bliss & Lømo, 1973). L'hippocampe étant une structure impliquée dans la mémoire déclarative (celle des faits et des événements), ce mécanisme contribue vraisemblablement à des processus d'apprentissage. De nombreuses études mettent également en évidence des plasticités plus ou moins durables dans des régions telles que le cervelet, l'amygdale, le cortex ou encore les ganglions de la base qui sont des régions impliquées dans des apprentissages sensori-moteurs ou émotionnels ainsi que dans les mécanismes décisionnels (Clugnet & LeDoux, 1990; Bell et al., 1997; Kreitzer & Malenka, 2008).

Les premières données suggérant un substrat moléculaire différent en fonction de la durée de rétention des apprentissages proviennent d'études comportementales et pharmacologiques menées chez le poisson rouge et chez le rongeur (Casola et al., 1968; Flexner & Flexner, 1968). Par la suite, Eric Kandel et ses collaborateurs ont montré chez l'aplysie que la mise en place de plasticités supportant la mémoire à court terme implique des modifications structurales des protéines impliquées dans la transmission synaptique et des canaux impliqués dans les propriétés neuronales intrinsèques. Ces modifications résultent notamment de l'activité de protéines kinases telles que la PKA et la PKC (Ghirardi et al., 1992). En revanche, dans le cas de la mémoire à long terme, l'activation des cascades moléculaires va induire une translocation de facteurs de transcription dans le noyau des cellules. Ces processus vont aboutir à la synthèse de nouvelles protéines impliquées dans la machinerie synaptique *via* la transcription et la traduction de segments de l'ADN nucléaire. L'apprentissage à long terme aboutit à des

modifications morphologiques des circuits avec notamment une modification du nombre de synapses actives (Bailey & Chen, 1983). La découverte de ces processus cellulaires supportant la formation et le maintien de mémoires à court et à long terme ont valu à Eric Kandel l'obtention du Prix Nobel de Médecine en 2000.

II.2. Apprentissages élémentaires (non-associatifs)

Chez les vertébrés comme chez les invertébrés les réponses réflexes de retrait défensif peuvent être modifiées par des procédures d'apprentissages simples telles que l'habituation et la sensibilisation. L'habituation permet à un animal d'apprendre à diminuer ou même à éliminer ses réponses comportementales à des stimuli monotones qui sont identifiés comme non pertinents. A l'inverse, la sensibilisation permet à un animal d'apprendre les propriétés des stimuli menaçants ou appétissants. En conséquence elle exacerbe les réponses motrices provoquées par un stimulus répété. Chez l'aplysie, les deux formes d'apprentissage peuvent modifier un circuit réflexe identifié, responsable du retrait de la branchie suite à une stimulation tactile du siphon (Castellucci et al., 1970; Castellucci & Kandel, 1976).

Eric Kandel et son équipe ont ainsi montré que l'application répétée d'une stimulation tactile inoffensive sur le siphon induisait une diminution de la force de rétraction de la branchie. Cette modification de la réponse motrice s'apparente à une habituation telle qu'elle peut être observée au niveau des réflexes de retrait défensif de la patte chez les vertébrés supérieurs. La diminution de la force de retrait est associée à une diminution de la force des synapses ou dépression synaptique entre les neurones sensoriels du siphon et les motoneurones contactant la branchie. Le mécanisme impliqué à court terme repose sur une diminution progressive du nombre de vésicules de neurotransmetteur prêtes à être libérées au niveau des zones actives de la synapse. A l'inverse, un choc électrique douloureux sur la queue de l'animal va sensibiliser pendant quelques minutes la réponse défensive de retrait de la branchie en réponse à la stimulation tactile appliquée sur le siphon (Figure 6). Le choc sur la queue active une voie synaptique différente de la voie réflexe mais qui converge sur celle-ci. Cette seconde voie synaptique va augmenter la force des synapses entre les neurones sensoriels du siphon et les motoneurones de la branchie *via* une libération du modulateur 5-HT sur les neurones du circuit réflexe. Cette modification appelée facilitation synaptique contribue à sensibiliser le réflexe.

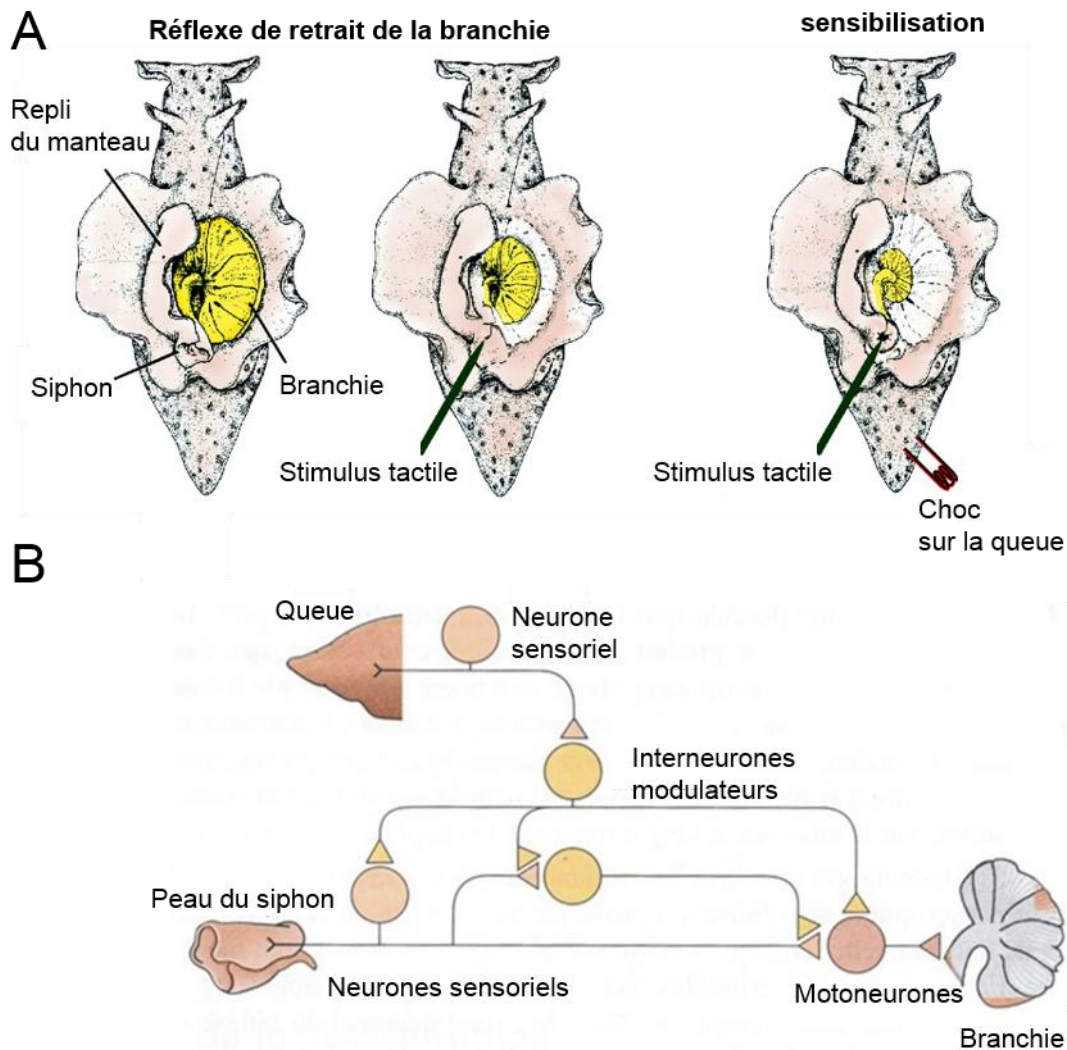


Figure 6. Sensibilisation du réflexe de retrait de la branchie et voies mono- et polysynaptiques impliquées.

Eric Kandel et Irving Kupferman ont montré que le mollusque marin aplysie possède un réflexe de retrait défensif analogue à ceux pouvant être décrits chez les vertébrés supérieurs. Chez cet animal l'organe respiratoire externe ou branchie, se prolonge par une structure charnue appelé le siphon. Lorsque l'on touche le siphon, la branchie et le siphon se rétractent simultanément dans une cavité située sous le repli du manteau de l'animal. Une sensibilisation de ce réflexe est induite par un choc sur la queue. Le circuit neuronal responsable de ce réflexe est contrôlé par un ensemble de neurones situés dans le ganglion nerveux abdominal de l'animal. Les motoneurones innervant le siphon reçoivent directement l'information à partir de neurones sensoriels. Ces derniers activent également plusieurs interneurones inhibiteurs et excitateurs qui contactent les motoneurones du siphon et de la branchie. La sensibilisation de l'arc réflexe du retrait de la branchie résulte de l'activation d'une voie synaptique distincte libérant de la 5-HT sur les synapses entre les neurones sensoriels du siphon et les motoneurones de la branchie.

Adapté de Kandel, 2001.

Ces apprentissages élémentaires constituent une part importante des mécanismes d'adaptation des comportements automatiques. Cependant, ils ne rendent pas compte de la capacité du système nerveux à associer des informations et des concepts, or cette faculté constitue un des traits les plus fondamentaux de l'apprentissage et de l'acquisition de connaissances. Aussi, des apprentissages associatifs existent dans l'ensemble du règne animal, que ce soit chez les mammifères ou chez les animaux possédant les systèmes nerveux les plus simples.

II.3. Apprentissages associatifs

Au début du XXe siècle, le physiologiste russe Ivan Pavlov et le psychologue américain Edward Thorndike ont découvert indépendamment deux modalités d'apprentissage associatif capables de modifier les réponses comportementales des animaux. Pavlov mit en évidence une forme d'apprentissage permettant à un animal d'associer deux stimuli sensoriels entre eux. Les procédures utilisées par Pavlov ont été ultérieurement appelé conditionnement classique. Thorndike et à sa suite Burrhus Frederic Skinner ont, quant à eux, développé un conditionnement dit instrumental ou opérant permettant à l'animal d'apprendre des conséquences positives ou négatives de son propre comportement. Ces travaux ont inspiré une tradition empiriste de la psychologie expérimentale appelée le béhaviorisme.

II.3.1. Conditionnement classique

Le conditionnement classique, ou pavlovien, désigne le processus par lequel un stimulus conditionnel (CS) donné devient capable d'induire une réponse conditionnée (CR) après un certain nombre d'associations avec un autre stimulus dit inconditionnel (US) (Figure 7). On met généralement en évidence de telles réponses conditionnées sur des réflexes involontaires. Le conditionnement classique s'effectue lorsqu'un CS, par exemple un stimulus auditif, est associé à un US, une odeur par exemple. Le US déclenche automatiquement une certaine réponse, par exemple une réaction de salivation. Par le truchement de l'apprentissage, le CS devient un stimulus capable de produire une réponse CR similaire à celle évoquée par le US.

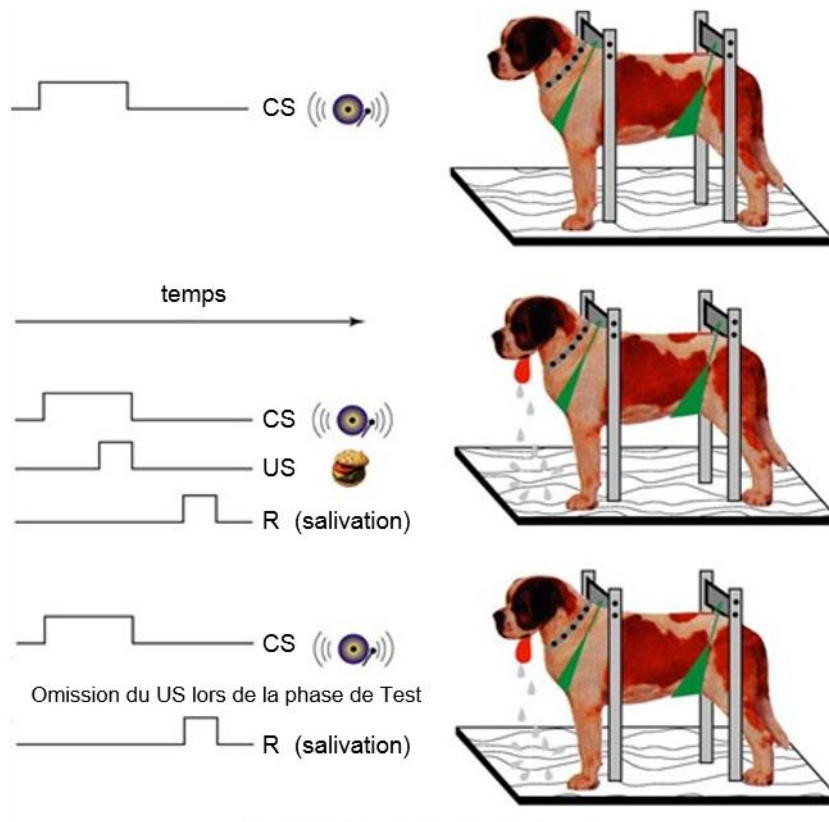


Figure 7. Conditionnement classique.

Dans la procédure développée par Pavlov la salivation est mesurée constamment. Le comportement de salivation est produit de façon prédictible par la présentation de nourriture, mais n'est pas induit par la présentation d'un stimulus auditif neutre (pour la réponse de salivation). Après plusieurs appariements du stimulus auditif et de la présentation de viande, l'animal apprend que ce bruit prédit la présentation de nourriture et salive à la présentation de ce seul stimulus initialement neutre.

Modifié d'après Heidelberg et al., 2009.

Ces apprentissages initialement mis en évidence chez les vertébrés existent également chez les invertébrés. Chez l'aplysie, le réflexe induit par un stimulus tactile sur le siphon est augmenté suite à l'application d'un choc sur la queue de l'animal lors d'une procédure de sensibilisation (voir chapitre précédent). Cette augmentation peut être encore plus forte et plus durable si le CS, un stimulus tactile déclencheur du réflexe, est associé au choc sur la queue qui constitue alors le US. Cette procédure, où le CS précède d'un court délai et persiste pendant le US, est dite appariée. Après cet apprentissage, la réponse conditionnée induite par le CS seul traduit l'association des deux stimuli caractéristique du conditionnement classique (Carew et al., 1981; Carew et al., 1983). En revanche, si le stimulus tactile n'est pas associé temporellement au choc sur la queue l'entraînement ne va pas induire une augmentation aussi importante et durable du réflexe de retrait. Cette procédure dite non-appariée révèle ici l'importance de l'association temporelle des stimuli sensoriels dans l'induction de l'apprentissage classique.

II.3.2. Conditionnement opérant

Apprendre ne se résume pas à établir des associations entre différents événements sensoriels. Il s'agit également de modifier durablement son comportement en fonction des conséquences de son action. Le conditionnement opérant est une forme d'apprentissage dans lequel l'individu apprend l'association entre l'émission d'un acte moteur et le retour sensoriel qui en résulte. Cette information sensorielle peut être un stimulus renforçant positif (récompense) ou négatif (punition). On distingue ainsi deux grands types de conditionnement opérants capables de modifier l'expression du comportement : 1) Le renforcement positif qui va augmenter un comportement par l'ajout d'un stimulus appétitif. 2) La punition qui va diminuer un comportement par l'ajout d'un stimulus aversif.

Ces procédures ont pour point commun de modifier l'occurrence des comportements renforcés. Il est ainsi établi que le conditionnement opérant appétitif modifie l'expression des comportements motivés et contribue à établir des routines motrices ou encore des comportements compulsifs. Ces motricités se caractérisent par l'expression fréquente et stéréotypée de l'action récompensée. Leur acquisition traduit dans certains cas une altération des processus exécutifs tels que la prise de

décision. C'est le cas notamment dans certains troubles du comportement tels que les troubles obsessionnels compulsifs (Cavedini et al., 2006).

L'exemple le mieux connu de conditionnement opérant est le comportement d'appui sur un levier en boîte de Skinner (Figure 8). Initialement développé chez le pigeon puis largement utilisé chez le rat, l'apprentissage consiste à placer l'animal affamé dans une cage où se trouve un levier dont le mouvement délivre une friandise dans la cage. L'animal naïf, en recherche de nourriture, effectuera éventuellement, par hasard, un appui sur le levier et recevra la nourriture. Au cours du temps, on observe que la fréquence avec laquelle l'animal appuie sur le levier augmente. Lorsque cette action devient routinière, il est établi que l'animal a appris l'association entre l'action et l'obtention de la récompense alimentaire. Notons qu'après l'obtention de récompenses à haute valeur appétitive, tels que certains aliments, des drogues addictives ou des stimulations électriques des systèmes de récompenses, le comportement appris peut être répété à haute fréquence et de façon stéréotypée. Ce comportement perdure même si il ne permet plus d'obtenir de récompense. Devenu automatique et inefficace, il peut persévérer au détriment d'autres actions ; il a acquis un caractère compulsif.

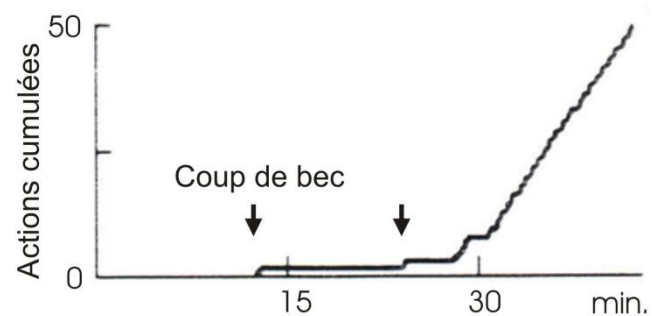


Figure 8. Conditionnement opérant.

Le conditionnement opérant par boîte de Skinner induit une augmentation de la fréquence et de la régularité des émissions d'un acte récompensé. Ici, une action aléatoire dirigée d'un pigeon, un coup de bec sur un levier, induit l'obtention contingente de nourriture, en conséquent la fréquence et la régularité des actions émises en vue d'obtenir cette récompense sont augmentées.

Modifié d'après Skinner, 1938.

II.4. Questions scientifiques

L'approche behavioriste, en cantonnant son approche de la mémoire à l'étude des phénomènes observables, a permis de mettre en évidence la propriété essentielle du système nerveux à établir des associations. Il apparaît également que les apprentissages associatifs contribuent à adapter l'expression des comportements motivés. A partir de ces constats issus de la psychologie expérimentale deux questions fondamentales se posent au neurophysiologiste :

- 1) Quels sont les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'encodage de ces associations par le système nerveux ?
- 2) Quels sont les mécanismes qui à l'échelle cellulaire permettent l'adaptation des comportements motivés par des apprentissages ?

Les mécanismes impliqués dans l'encodage des associations par le système nerveux ont été en partie documentés (Hawkins et al., 1983; Antonov et al., 2003; Lorenzetti et al., 2008). Il est établi que la condition nécessaire à l'apprentissage associatif est la relation temporelle existante entre deux événements : stimulus-stimulus dans le conditionnement Pavlovien ou action-stimulus dans le conditionnement opérant. Initialement considérée comme une relation de contiguïté, selon laquelle les deux événements doivent être présents en même temps, l'un précédant légèrement l'autre, elle est aujourd'hui remplacée par une « loi » de contingence (Skinner, 1945). Ce terme, emprunté aux statistiques, décrit en terme probabiliste le degré de liaison entre les deux événements : l'important pour apprendre n'est pas que les deux événements soient nécessairement présents, mais que l'un prédise avec suffisamment de certitude l'arrivée de l'autre. Ces règles d'association supposent que le système nerveux possède un système de détection de la coïncidence de ces événements. Celui-ci a été révélé à l'échelle cellulaire sous la forme d'une modulation activité-dépendante (Figure 9). D'une part, les études menées chez les mollusques et les insectes suggèrent que le US, pour le conditionnement pavlovien, ou la récompense pour le conditionnement opérant, activent des neurones modulateurs qui modifient le fonctionnement cellulaire et/ou les synapses cibles par des cascades moléculaires intracellulaires impliquant différents seconds messagers et protéines kinases (Lechner & Byrne, 1998; Brembs

& Plendl, 2008). D'autre part, le CS pour le conditionnement Pavlovien ou la genèse de l'acte moteur pour le conditionnement opérant, induisent une activité électrique dans les circuits neuronaux concernés. La coïncidence de l'effet modulateur et de l'activité électrique dans un même neurone ou synapse cible modifie et amplifie considérablement les processus métaboliques intracellulaires et la réponse cellulaire (Walters & Byrne, 1983; Murphy & Glanzman, 1996). Un tel mécanisme de détection de coïncidence, source de modification du fonctionnement synaptique et responsable d'apprentissage, avait été présupposé par les réflexions théoriques de Donald Hebb (Hebb, 1949).

Si l'encodage cellulaire des associations est en partie compris, l'étude des mécanismes impliqués dans la transition entre la genèse d'un comportement motivé variable et flexible en un comportement stéréotypé et inflexible est grandement limitée par nos lacunes sur la connaissance des réseaux décisionnels et générateurs des programmes moteurs chez les mammifères. Or, c'est justement cette problématique que j'aborde chez l'aplysie au cours de ce travail de thèse.

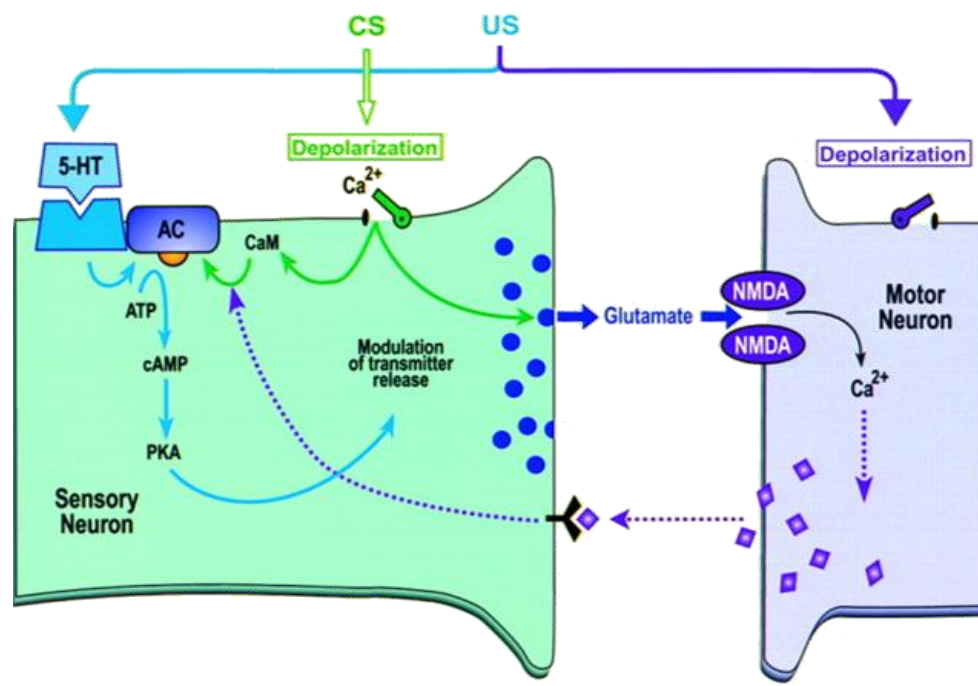


Figure 9. Facilitation associative des synapses sensorimotrices supportant le conditionnement classique chez l'aplysie.

Le CS induit une dépolarisation du neurone sensoriel induisant une entrée de calcium par des canaux calciques dépendants du voltage. Ces flux calciques entrants vont amplifier les cascades dépendantes de l'AMPC activées par le US (via la 5-HT). Les mécanismes sur la face postsynaptique des synapses fournissent un autre exemple de détection de coïncidence entre le CS et le US. La région postsynaptique contient des récepteurs au glutamate de type NMDA. L'activation de ces récepteurs nécessite une libération de glutamate concomitante à une dépolarisation neuronale afin de permettre l'entrée d'un flux de calcium ; le glutamate est fourni par l'activation des neurones sensoriels (CS), et la dépolarisation est induite par le US. Une entrée de calcium par les récepteurs NMDA active vraisemblablement un signal rétrograde qui va avoir pour conséquence d'amplifier encore les cascades présynaptiques impliquant l'AMPC. Il résulte de tous ces mécanismes une modulation de la libération de neurotransmetteur et un renforcement de la force synaptique.

Modifié d'après Lechner & Byrne, 1998.

III. Conditionnement opérant appétitif chez l'aplysie.

Le comportement alimentaire chez l'aplysie, un mollusque marin, présente plusieurs caractéristiques qui en font un modèle de choix pour étudier les bases cellulaires de la transformation, par un apprentissage opérant, d'un comportement motivé en un comportement stéréotypé. 1) Les mouvements exploratoires spontanés de la radula (organe analogue à la langue) sont facilement quantifiables et leur expression flexible peut être modifiée par des apprentissages associatifs (classique et opérant) utilisant des récompenses alimentaires ; 2) Les voies sensorielles activées par ces récompenses alimentaires sont identifiées : il s'agit d'afférences œsophagiennes (En.2), riches en fibres dopaminergiques (Kabotyanski et al., 1998; Brembs, 2002) ; 3) Les neurones responsables de la genèse des mouvements de la radula sont identifiés et constituent un CPG dont l'organisation et les propriétés fonctionnelles ont été analysées.

Au cours de ce dernier chapitre de mon introduction, je décrirai le comportement alimentaire de l'aplysie, la procédure de conditionnement opérant utilisée dans notre étude et enfin, la problématique de mon travail sur l'adaptation du CPG en réponse à cet apprentissage.

III.1. Comportement alimentaire chez l'aplysie

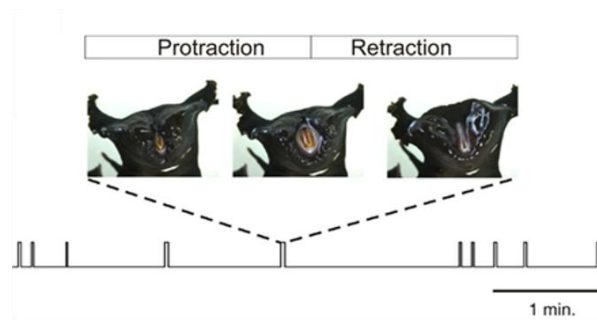
Lorsqu'elle recherche sa nourriture, l'aplysie émet un certain nombre de comportements tels que des mouvements locomoteurs, des ajustements posturaux, des mouvements de la tête et des mouvements buccaux. Ces comportements dirigés vers l'obtention d'aliments appétissants sont variables en termes de régularité d'émission, de durée et d'intensité (Kupferman, 1974). En raison de leur facilité d'observation, les mouvements de la radula ont été les plus étudiés. Un cycle de mouvements de la radula est composé de deux phases successives : une phase de protraction immédiatement suivie d'une phase de rétraction. Lors de ces mouvements, les deux appendices articulés de la radula peuvent se refermer pour saisir l'aliment. En fonction de la période de fermeture, on peut distinguer un comportement d'ingestion et de rejet. Dans un cycle d'ingestion, la fermeture se produit essentiellement pendant la rétraction. Cela permet à l'animal de 'saisir' la nourriture et de l'amener à l'intérieur de la cavité buccale. Lors d'un cycle de rejet, la

fermeture est générée pendant la protraction. Cela expulse un éventuel objet de la cavité buccale. Une caractéristique fondamentale de ce comportement est la grande variabilité et l'imprévisibilité avec laquelle les cycles radulaires se succèdent. Chez l'animal en recherche de nourriture, plusieurs cycles, essentiellement d'ingestion, sont émis de façon erratique, c'est-à-dire à faible fréquence moyenne et à intervalles très irréguliers qui ne sont pas prédits par un quelconque stimulus environnemental (Figure 10A). La présence constante d'un stimulus alimentaire incitatif dans l'environnement de l'animal augmente la fréquence d'émissions des cycles radulaires, mais cette motricité conserve son caractère aléatoire et imprévisible. Cette motricité traduit l'attitude spontanée et incertaine de l'animal naïf qui cherche à localiser et/ou à saisir l'aliment par essai-erreur.

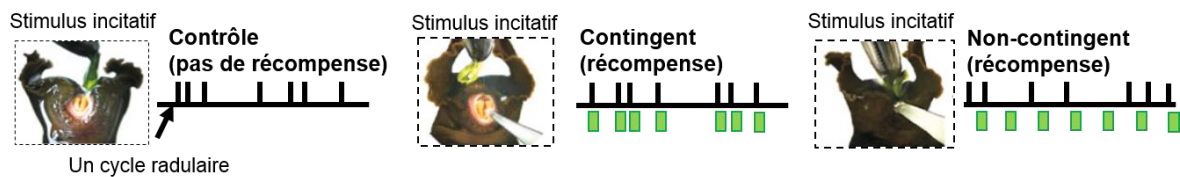
III.2. Conditionnement opérant du comportement alimentaire

Lors d'un conditionnement opérant appétitif, en plus du stimulus incitatif, un stimulus renforçant ou récompense est associé de façon contingente à l'émission spontanée des cycles d'ingestion (Figure 10B). La récompense peut être un stimulus alimentaire introduit dans la cavité buccale ou une stimulation électrique directe des nerfs œsophagiens qui informent les centres nerveux de la présence de l'aliment dans la cavité buccale (Brems et al., 2002; Nargeot et al., 2007). Après une période de répétition de l'association «action-récompense» caractéristique du conditionnement opérant, le comportement de recherche de nourriture, initialement peu fréquent et irrégulier est transformé en une succession très fréquente de cycles radulaires émis à intervalle régulier (Nargeot et al., 2007). Cette modification comportementale dépend de la valeur appétitive de la récompense. Elle ne se développe pas lorsque la récompense constituée de fragments d'algue est remplacée par des fragments de cellulose, un constituant végétal à faible valeur olfactive et gustative. De plus, il a été montré que la motricité conditionnée, fréquente et rythmique, perdure en présence du stimulus incitatif pendant plusieurs heures même lorsque l'animal ne reçoit plus de récompense. Cette action devenue inefficace devient pourtant prévalente sur l'émission d'actes de recherche de nourriture tels que la locomotion ou les oscillations de la tête. En ce sens, la motricité conditionnée ressemble aux motricités compulsives que l'on met en évidence chez les vertébrés (Everitt & Robbins, 2005; Lenoir et al., 2007).

A Cycles spontanés de mouvements radulaires



B Conditionnement opérant

**Figure 10. Conditionnement opérant appétitif.**

(A) Emission irrégulière de cycles radulaires associée au comportement de recherche de nourriture. Chaque barre verticale symbolise un cycle. (B) Afin d'inciter l'émission de cycles de mouvements de la radula pendant la phase d'entraînement, les animaux de chaque groupes (Contrôle, Contingent et Non-contingent) reçoivent un stimulus incitatif constant (ligne horizontale). Dans le groupe Contingent un stimulus appétitif additionnel (rectangles verts) est délivré en association avec chaque mouvement spontané d'ingestion, produisant ainsi l'association contingente « action-récompense » caractéristique du conditionnement opérant. Dans le groupe Non-contingent, ce stimulus récompense est distribué dans la cavité buccale à intervalle de temps régulier et donc sans relation prédictible avec l'ingestion émise à des intervalles temporels irréguliers. Par comparaison avec le groupe précédent, ce groupe permet de montrer l'importance de l'association « action-récompense » dans l'induction des modifications comportementales.

Modifié d'après Nargeot & Simmers, 2012.

L'importance de l'association contingente « action-récompense » dans le développement de la motricité compulsive chez l'aplysie a été testée par la distribution d'une récompense dissociée, non contingente, de l'émission des cycles radulaires. Les animaux soumis au même protocole que précédemment mais qui reçoivent la récompense indépendamment de l'émission des cycles radulaires, expriment une motricité analogue aux animaux naïfs (Nargeot et al., 2007). C'est donc l'association « action-récompense » qui caractérise le conditionnement opérant et non une association de stimuli qui induit les modifications comportementales.

III.3. Réseau générateur des patterns moteurs radulaires

Les corrélats neuronaux du conditionnement opérant décrit ci-dessus peuvent être analysés à l'échelle cellulaire après extraction des ganglions nerveux buccaux contenant les réseaux générateurs du pattern moteur radulaire. Ces ganglions présentent une organisation symétrique dans lequel chaque élément neuronal possède son homologue en au moins un exemplaire dans le ganglion controlatéral. Un neurone est souvent connecté à plusieurs neurones ipsi-latéraux et controlatéraux. Seize paires bilatérales de neurones identifiés sont caractérisées comme étant des membres à part entière du CPG buccal. Ceci inclut des neurones sensoriels, des interneurones, et des motoneurones. L'émission flexible et imprévisible du pattern moteur radulaire (PMR) est le fait d'un petit groupe d'interneurones constitué des neurones B63, B30 et B65. L'activité pacemaker de ces neurones décideurs anticipe et déclenche spontanément chaque PMR (Figure 11; Nargeot & Simmers, 2012). Ces neurones couplés électriquement constituent une sous-unité décisionnelle du CPG qui détermine l'occurrence temporelle des émissions du pattern radulaire. Les deux interneurones bilatéraux B63, couplés électriquement, sont ensemble nécessaires et suffisants pour déclencher le pattern. Leur dépolarisation expérimentale par injection intracellulaire d'un courant dépolarisant déclenche irrémédiablement l'émission du pattern. A l'inverse, leur hyperpolarisation expérimentale suffit à supprimer toute émission du pattern moteur. Les neurones B30 et B65 sont également suffisants pour déclencher l'émission d'un pattern moteur. En revanche, leur hyperpolarisation expérimentale ne suffit pas à supprimer l'expression motrice spontanée. En fait, leur capacité à déclencher l'émission d'un pattern moteur passe par l'activation monosynaptique des neurones

B63 auxquels ils sont couplés électriquement. Ces neurones expriment une plasticité fonctionnelle induite par l'apprentissage opérant (Nargeot et al., 2009). Il s'agit de modifications de leurs propriétés membranaires intrinsèques et synaptiques qui sont corrélées aux modifications motrices et comportementales. Cependant, en dépit de cette corrélation, le lien de causalité entre cette plasticité cellulaire et synaptique et l'expression de la motricité compulsive de la radula n'est pas établi. De même, les mécanismes d'induction de cette plasticité au cours de l'apprentissage n'ont pas été identifiés. Enfin, les mécanismes gouvernant l'activité pacemaker des neurones décideurs qui déterminent l'émission du pattern moteur restent inconnus.

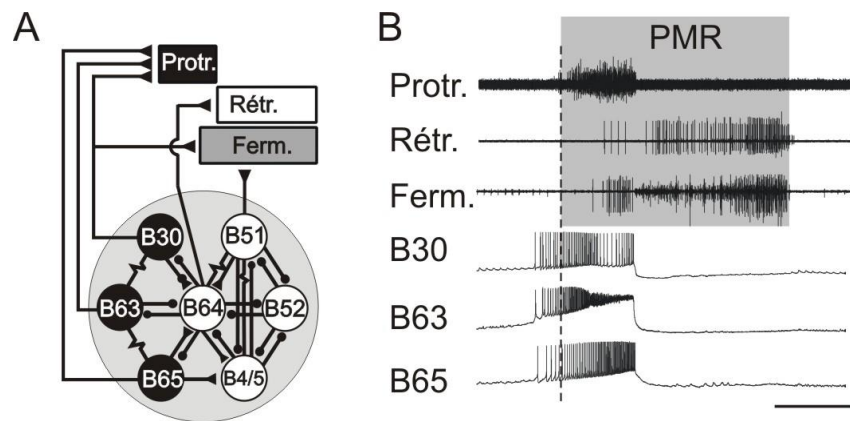


Figure 11. CPG buccal responsable de la genèse des patterns moteurs radulaires.

(A) Diagramme de connexion du CPG buccal. Les petits ronds noirs symbolisent les synapses chimiques inhibitrices, les triangles symbolisent les synapses excitatrices. Les symboles de résistance représentent les synapses électriques. Les rectangles représentent les groupes de motoneurones responsables des activités de protraction, rétraction et fermeture. (B) Pattern moteur radulaire (PMR) enregistré dans une préparation isolée *in vitro* (phases de protraction, rétraction et fermeture enregistrées sur les nerfs moteurs I2 n., n.2,1 et R n.). Le début des bouffées de PA dans les trois neurones décideurs B63/B30/B65 précède le début des PMR (ligne pointillée verticale). La barre d'échelle horizontale représente 5 s, les barres verticales 25 mV.

Problématique

Ce travail de thèse vise à déterminer les mécanismes cellulaires qui sous-tendent la flexibilité du comportement alimentaire chez l'aplysie et sa régulation par un apprentissage opérant appétitif qui conduit à une motricité compulsive. Dans ce cadre d'étude général notre étude visait à répondre à trois questions fondamentales 1) Quels sont les rôles respectifs des plasticités synaptiques et/ou membranaires des neurones décideurs B63/B30/B65 dans l'expression du comportement de type compulsif résultant de l'apprentissage ? 2) Quel modulateur associé au renforcement contingent, induit les plasticités cellulaires et motrices aux niveaux de ces éléments décisionnels du réseau buccal générateur de pattern ? 3) Comment des mécanismes cellulaires endogènes peuvent-ils rendre compte de la variabilité motrice générée par les réseaux générateurs des PMR chez des animaux naïfs (non conditionnés) ?

Dans le chapitre 1, nous avons testé la relation de causalité entre les plasticités membranaires et synaptiques des neurones B63/B30/B65 et l'émission de patterns moteurs fréquents et réguliers. En collaboration avec le groupe d'Astrid Prinz (Université Emory, Atlanta), nous avons implémenté une technique d'interfaçage d'un ordinateur et du réseau biologique pour manipuler la plasticité neuronale sur des préparations d'animaux naïfs ou conditionnés. Les résultats obtenus ont été publiés dans le journal *Current Biology* (Sieling et al., 2014 ; voir annexes).

Nous avons ensuite testé, dans le chapitre 2, si le neurotransmetteur dopamine impliqué dans les processus de récompense chez les vertébrés et les invertébrés était responsable de la plasticité cellulaire et motrice induite par l'apprentissage. Ces travaux ont donné lieu à la publication d'un article dans le journal *Learning & Memory* (Bédécarrats et al., 2013 ; voir annexes).

Enfin, dans le chapitre 3, nous nous sommes intéressés aux mécanismes responsables de l'impulsion variable du pattern radulaire. Pour cela, nous avons analysé les propriétés de pacemaker des neurones B63. Nos données préliminaires suggèrent qu'une interaction complexe entre deux flux calciques, l'un membranaire dépendant du potentiel, l'autre dépendant de stocks intracellulaires joue un rôle fondamental dans la variabilité spontanée de l'activité pacemaker du réseau.

Matériels et Méthodes

I. Animaux

Les expériences ont été menées sur deux espèces d'Aplysies: *Aplysia fasciata* et *Aplysia californica*. Les *Aplysia fasciata* étaient pêchées localement dans le bassin d'Arcachon de Septembre à Novembre. Les *Aplysia californica* ont été importées de l'Université de Miami (Floride) et utilisées lorsque l'approvisionnement en aplysies locales était impossible. Les animaux étaient maintenus dans des aquariums d'eau de mer artificielle oxygénée, thermostatée à environ 15°C et nourris quotidiennement avec des algues fraîches de l'espèce *Ulva lactuca*. Les animaux utilisés lors de la procédure de conditionnement opérant *in vivo* ou de son analogue *in vitro* ont été préalablement privés de nourriture pendant deux jours afin de stimuler leur comportement de recherche de nourriture. Aucune différence interspécifique dans le comportement alimentaire, ni dans les propriétés électrophysiologiques du système nerveux de ces animaux n'a été constatée dans les études précédentes (Nargeot et al., 2007, Nargeot et al., 2009). Les données obtenues sur les deux espèces ont donc pu être traitées ensemble.

II. Conditionnement opérant

Nous avons utilisé une procédure de conditionnement opérant identique à celle précédemment utilisée pour induire un comportement de type compulsif chez l'aplysie (Nargeot et al., 2007). Les animaux étaient assignés aléatoirement dans un groupe Contrôle (naïf), ou Contingent (conditionné). Ces groupes différaient par le protocole de distribution de la récompense appliqué lors de la phase d'entraînement (voir ci-dessous). Chaque animal était placé dans un petit aquarium rempli avec 5 Litres d'eau de mer artificielle oxygénée. Le récipient était placé sur un miroir et mis en contact avec de la glace pour maintenir l'eau à une température proche de 15°C. Une période initiale de 30 minutes permettait à l'animal de s'acclimater à cet environnement. Au cours d'une phase d'entraînement de 30 min, les animaux issus des deux groupes étaient soumis à une stimulation alimentaire incitative constante afin d'orienter les mouvements exploratoires de la tête (Cook & Carew, 1986) vers l'expérimentateur et stimuler l'émission de cycles de mouvements de la radula. Pour cela, un morceau d'algue d'environ 1,5 cm² était maintenu à l'aide de pinces sur la face dorsale des lèvres de l'animal. Un grand soin devait être porté à ce que le

morceau d'algue ne soit pas ingéré. Pendant la phase d'entraînement, les animaux du groupe Contingent recevaient en plus de ce stimulus incitatif, un stimulus à haute valeur appétitive, ou récompense, associée à chaque émission spontanée d'un cycle radulaire d'ingestion. Ce stimulus récompense consistait en une injection intra buccale de 20 μ l de jus d'algue (*Ulva lactuca*) qui était obtenu par macération et filtration de 0,4 g d'algues sèches dans 10 ml d'eau de mer. Le jus d'algue ainsi obtenu était délivré au moyen d'une micropipette calibrée, immédiatement après chaque protraction de la radula et avant la fermeture des lèvres de l'animal. L'association contingente entre un cycle moteur spontané de la radula et l'obtention de jus d'algue reproduisait ainsi l'association action-récompense caractéristique du conditionnement opérant. La durée entre la fin du conditionnement et la fin des expériences consécutives ne devait pas excéder 4h qui est la durée de rétention de l'apprentissage (Nargeot et al., 2007).

III. Préparations nerveuses *in vitro*

Afin d'enregistrer l'activité motrice fictive générée par le réseau buccal d'une part et d'enregistrer les neurones d'intérêt chez des animaux naïfs ou ayant subi un apprentissage d'autre part, il était nécessaire d'isoler les ganglions nerveux buccaux contenant les CPG buccaux. Pour cela, les animaux ont été anesthésiés par une injection hémolympatique de 50 mL d'une solution isotonique de $MgCl_2$ à pH 7,5 [anesthésique en (mM) : 360 $MgCl_2$, 10 HEPES]. La masse buccale était prélevée puis fendue dorsalement et étalée dans une cuve à dissection remplie d'une solution isotonique d'eau de mer artificielle (ASW) à 4°C et à pH 7,5 (voir solutions ioniques). L'ensemble était disséqué afin d'en extraire les ganglions buccaux et les nerfs sensoriels et moteurs qui en émergent. Les ganglions et l'extrémité de chaque nerf ont été ensuite fixés dans une boîte de Pétri sur un support d'élastomère (Sylgard). Les préparations nerveuses baignant dans la solution d'ASW étaient maintenues à 15°C au moyen d'un système de refroidissement à effet Peltier. Le tissu conjonctif engainant les ganglions buccaux étaient ensuite découpé puis retiré afin de permettre l'accès au soma des neurones pour réaliser des enregistrements électrophysiologiques intra-somatiques.

IV. Solutions ioniques

Le milieu ionique standard utilisé dans les expériences est composé d'eau de mer synthétique (« Artificial Sea Water, ASW ») maintenue à un pH = 7,5 et composée de (mM): **ASW**: 450 NaCl, 10 KCl, 30 MgCl₂, 20 MgSO₄, 10 CaCl₂, 10 HEPES.

Dans certaines expériences une solution d'ASW aux concentrations ioniques modifiées et/ou contenant des agents pharmacologiques actifs était perfusée :

Pour tester les relations monosynaptiques entre l'afférence En.2 et les neurones déclencheurs du pattern, des enregistrements de l'activité électrique des neurones ont été réalisés en présence d'une solution enrichie en ions divalents **Hi Div** : 192 NaCl, 10 KCl, 182 MgCl₂, 20 MgSO₄, 30 CaCl₂, 10 HEPES. Une telle solution réduit l'excitabilité cellulaire et ainsi supprime toute activité polysynaptique.

L'étude des propriétés endogènes des neurones B63 requérait que les connexions synaptiques chimiques soient bloquées dans le réseau buccal. Pour cela, les préparations étaient baignées dans une solution d'ASW modifiée, dont la concentration en calcium (Ca) était réduite. Cette solution était additionnée de cobalt (Co) utilisé pour bloquer les canaux calciques voltage-pendants activés par les potentiels d'actions. **Low Ca, Co** : 446 NaCl, 10 KCl, 30 MgCl₂, 20 MgSO₄, 3 CaCl₂, 10 CoCl₂, 10 HEPES.

Une solution modifiée privée de l'ion sodium (Na⁺) remplacé par de la choline permettait de tester l'implication de l'ion Na⁺ dans les propriétés endogènes des neurones déclencheurs du pattern. **Na Free** : 446 C₅H₁₄NO.Cl (Choline), 10 KCl, 30 MgCl₂, 20 MgSO₄, 3 CaCl₂, 10 CoCl₂, 10 HEPES.

De façon analogue, une solution privée de l'ion Ca²⁺ a été utilisée pour tester l'implication des ions Ca²⁺. **Ca Free** : 450 NaCl, 10 KCl, 30 MgCl₂, 20 MgSO₄, 10 CoCl₂, 10 HEPES.

V. Techniques électrophysiologiques

V.1. Enregistrements « en passant » et stimulations extracellulaires

L'utilisation de méthodes d'électrophysiologie extracellulaire répondait à plusieurs nécessités :

-la première était d'enregistrer sur les préparations isolées *in vitro*, l'activité des motoneurones et les patterns moteurs qui commandent chez l'animal « intact » la motricité de la radula. Pour effectuer ces enregistrements, des couples d'électrodes d'acier ont été utilisés. L'électrode d'enregistrement était implantée en contact direct avec le nerf à enregistrer (nerfs de protraction I2 n., rétraction n.2,1 et fermeture de la radula R n. : Figure 12) et l'électrode de référence était implantée à distance des ganglions. Elles étaient isolées l'une de l'autre par un manchon de vaseline autour de l'électrode d'enregistrement. Les signaux enregistrés ont ensuite été amplifiés puis numérisés et analysés sur ordinateur avec le logiciel Spike2 (Cambridge Electronic Design). L'activité de ces trois nerfs permettait d'enregistrer un pattern moteur radulaire similaire à celui décrit *in vivo* chez l'animal lors d'un cycle radulaire (Morton & Chiel, 1993).

-la seconde consistait à stimuler électriquement des entrées sensorielles sur des préparations nerveuses *in vitro* afin d'une part, de reproduire le stimulus incitatif qui favorise l'émission du pattern moteur radulaire et d'autre part, de mimer l'activité sensorielle produite par la récompense alimentaire. Ces stimulations générées par un stimulateur Grass S88 (Astro-Medical/Grass Instruments, Warwick, RI, USA), étaient transmises par des couples d'électrodes en acier, placées au contact des nerfs sensoriels à stimuler, et isolées l'une de l'autre par de la Vaseline. Le stimulus incitatif était mimé *in vitro* par la stimulation tonique des nerfs sensoriels 2,3 (n.2,3) droits et gauches avec des pulses de 0,3 ms à 10 Hz et 8 V. L'obtention de la récompense alimentaire était mimée par la stimulation phasique des branches antérieures des nerfs œsophagiens droits et gauches avec des trains de potentiels composés de pulses de 0,3 ms, à 10 Hz et 8 V pendant 5 s (Brembs et al., 2002).

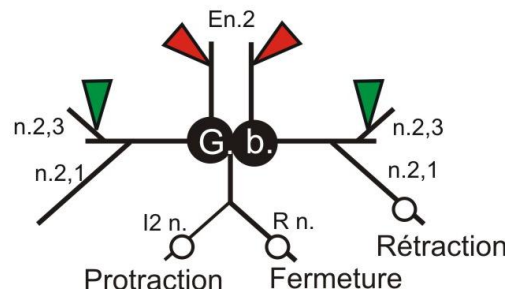


Figure 12. Préparations nerveuses *in vitro*.

Représentation schématique des ganglions buccaux isolés *in vitro*. Les électrodes extracellulaires d'enregistrement représentées par des cercles sont placées sur les nerfs de protraction (l2 n.), de rétraction (n.2,1) et de fermeture (R n.). Les électrodes de stimulation, représentées par des triangles, sont posées sur les nerfs bilatéraux En.2 et n.2,3.

V.2. Enregistrements intracellulaires

L'étude ou la manipulation des propriétés neuronales et synaptiques des neurones déclencheurs du pattern moteur radulaire requiert la réalisation d'enregistrements intracellulaires. Pour cela, des microélectrodes de verre remplies de KCH_3CO_2 (Potassium-acétate) à 2M, et ayant une résistance comprise entre 15 et 30 M Ω , étaient montées sur des micromanipulateurs puis insérées dans le corps cellulaire des neurones. La différence de potentiel entre l'électrode et une masse en argent chlorurée plongée dans le bain était recueillie et amplifiée au moyen d'un Axoclamp-2B (Molecular Devices, Palo Alto, CA).

Les neurones qui ont été enregistrés dans cette étude étaient les interneurones B63, B30 et B65 impliqués dans le processus décisionnaire qui déclenche spontanément l'émission du pattern moteur radulaire. Tous ces neurones ont été identifiés, en plus de leurs propriétés fonctionnelles, par leur relation de phase avec le pattern moteur et par leurs projections synaptiques respectives et spécifiques sur les motoneurones cibles B31/32, B8 et B61/62 ipsi- et controlatéraux. Leurs propriétés membranaires intrinsèques et synaptiques ont été analysées *in vitro* par les protocoles d'électrophysiologie intracellulaire décrits ci-dessous :

V.2.1. Seuil d'excitabilité :

Une première mesure visait à déterminer le seuil d'excitabilité des interneurons décideurs. Pour cela, deux électrodes ont été implantées simultanément dans un même neurone. Une première électrode est utilisée pour maintenir le potentiel membranaire à -70 mV ou -80 mV, grâce à une injection d'un courant continu. Cette même électrode est aussi utilisée pour injecter des pulses brefs (1 s), de courant positif et d'intensité croissante. La seconde électrode enregistrait les variations du potentiel de membrane produites par les injections de courants. Le seuil d'excitabilité a été défini comme l'intensité minimale de courant dépolarisant suffisante pour déclencher au moins un potentiel d'action chez ce neurone.

V.2.2. Propriétés oscillatoires :

Une seconde mesure visait à déterminer la capacité des neurones à exprimer des propriétés oscillatoires intrinsèques. Pour s'assurer que les propriétés membranaires enregistrées étaient intrinsèques au neurone testé et non le résultat d'influences synaptiques provenant du fonctionnement des réseaux buccaux, un courant négatif hyperpolarisant était injecté dans un neurone B63, réduisant ainsi au silence l'activité du CPG. Dans ces conditions, les propriétés oscillatoires des neurones décideurs, caractérisées par la genèse spontanée de bouffées répétées de potentiels d'action, étaient testées par l'injection intracellulaire et continue d'un courant dépolarisant.

V.2.3. Couplage électrique et résistance membranaire :

Pour quantifier le couplage électrique d'une paire neuronale, deux électrodes étaient implantées dans chaque neurone. Une première électrode sert à l'injection de courants, tandis que l'autre électrode enregistre le potentiel membranaire. Chaque neurone est initialement maintenu à un potentiel de repos de -70 mV ou -80 mV par injection d'un courant continu. Un créneau de courant hyperpolarisant additionnel (i), d'intensité -10 nA et d'une durée de 2 s, est alors injecté dans l'un neurone B63 considéré comme présynaptique. La déflexion des potentiels membranaires résultant de cette injection est enregistrée dans le neurone présynaptique (V1) et postsynaptique (V2). L'existence d'un couplage électrique entre ces deux neurones

est mise en évidence par l'hyperpolarisation du neurone postsynaptique en réponse à l'hyperpolarisation provoquée du neurone présynaptique. Un coefficient de couplage qui définit la force du couplage électrique est calculé par le rapport V_2/V_1 . La résistance membranaire d'entrée d'un neurone est déterminée dans les mêmes conditions expérimentales par le rapport V/i .

V.2.4. « Dynamic clamp » :

Une série de manipulations visait à mimer une plasticité des propriétés membranaires et synaptiques des neurones décideurs B63/B30/B65. Une interface neurone/machine, ou « dynamic clamp », a été utilisée pour manipuler en temps réel les conductances d'entrée membranaires, ainsi que les conductances de jonction des synapses électriques. Les conductances artificielles étaient générées en utilisant le logiciel Real-Time eXperiment Interface (RTXI; www.rtxi.org) et une carte d'acquisition de données NI PCI-625 (National Instruments) avec une fréquence d'opération comprise entre 3 et 5 kHz. Une valeur de conductance (G) est fixée par l'expérimentateur et à partir du potentiel neuronal enregistré V_m , un courant I est calculé en temps réel et injecté dans le neurone. Ainsi, pour mimer une augmentation ou une diminution de la conductance d'entrée neuronale, un courant de fuite $I_{leak} = G_{leak} (V_{m1} - E_{leak})$ est généré et injecté en temps réel dans le neurone. Une conductance artificielle positive $G > 0$ augmente la conductance d'entrée neuronale (G_{in}) de façon additive. Inversement, une conductance artificielle négative diminue G_{in} , tant que $|G| < G_{in}$. Le potentiel d'inversion du courant de fuite (E_{leak}) était fixé 3 mV en dessous du potentiel de repos du neurone. En plus de modifier individuellement la conductance neuronale, la procédure de « dynamic clamp » permettait de mimer une modification de couplage électrique dépendante de la conductance de jonction entre deux neurones. Pour cela, le potentiel de deux neurones est enregistré simultanément et un courant synaptique de jonction $I_{junc} = G_{leak} (V_{m1} - V_{m2})$ est généré pour chacun des deux neurones, puis injecté dans les cellules correspondantes.

Les conductances individuelles G_{leak} ou G_{junc} pouvaient être ajoutées seules ou en combinaison dans plusieurs neurones simultanément. L'enregistrement du potentiel de membrane et l'injection du courant généré par le « dynamic clamp » étaient réalisés par deux électrodes distinctes lorsque les expériences étaient menées sur un neurone unique ou deux neurones couplés. En revanche, lors de

certaines expériences impliquant la manipulation de conductances sur plus de deux neurones, une seule électrode implantée dans chaque neurone était utilisée à la fois pour l'enregistrement du potentiel membranaire et pour l'injection simultanée des courants générés par le « dynamic clamp ». Dans ce dernier cas de figure, la résistance des électrodes était compensée avant toute acquisition des données.

Dans certaines expériences, différentes valeurs de G_{leak} ou G_{junc} étaient appliquées simultanément dans une même préparation. Ces conductances étaient appliquées en alternant les valeurs positives et négatives des plus grandes aux plus petites pour distinguer leurs effets graduels d'une éventuelle « fatigue » du système nerveux *in vitro*.

V.3. Visualisation et traitement des données électrophysiologiques

Les signaux électriques intra et extracellulaires étaient visualisés en continu au cours des expériences au moyen d'un oscilloscope (Tektronix 5113). Un ordinateur avec une interface CED (CED 1401, Cambridge Electronic Design, UK) permettait l'acquisition et le traitement des données par le logiciel Spike 2 (Spike V.5.01).

VI. Pharmacologie

Les substances suivantes, provenant toutes de chez Sigma, ont été utilisées dissoutes dans l'ASW : cis-(Z)-Flupenthixol (Flu : 10^{-6}M , $5 \times 10^{-6}\text{M}$, 10^{-5}M , $5 \times 10^{-5}\text{M}$ et 10^{-4}M , antagoniste des récepteurs dopaminergiques de type D1 et D2); acide flufénamique (FFA : 10^{-4}M bloqueur sélectif des canaux CAN chez les vertébrés); tétraéthylammonium (TEA: $5 \times 10^{-2}\text{M}$, bloquant les courants potassiques); acide cyclopianoïque (CPA : $2 \times 10^{-5}\text{M}$, bloqueur de la pompe SERCA responsable du transfert d'ions calcium dans le réticulum endoplasmique). Le CPA et le FFA ont été dilués préalablement dans une solution mère de diméthylsulfoxyde (DMSO). La concentration finale de DMSO représentait 0,1% du volume final d'ASW.

Des injections intracellulaires du chélateur calcique BAPTA : [1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid] ont été réalisées grâce à des injections iontophorétiques dans le soma des neurones. Cette technique permet d'injecter des substances chargées dans une cellule : après empalement du neurone d'intérêt, un courant électrique de même charge que celle de la charge nette de la

molécule est appliqué et par répulsion, la substance est expulsée en dehors de la microélectrode vers l'intérieur du neurone. La concentration de BAPTA était de 200 mM dans le milieu intra-pipette (Murphy & Glanzman, 1996). Des pulses de courant négatif (-2 nA) étaient injectés, à une fréquence de 0,5 Hz pendant 1/2h.

VII. Analyse statistique

Plusieurs mesures de la variabilité de la genèse motrice ainsi que de l'activité de B63 ont été réalisées : 1) Des analyses de coefficient de variation (C.V., défini comme le rapport entre l'écart type et la moyenne) ont ainsi été réalisées pour définir la variabilité des intervalles entre patterns moteurs. Ces mesures étaient réalisées sur 10 intervalles successifs ; 2) Les intervalles entre patterns moteurs radulaires ou entre potentiels d'action des bouffées recueillis sur des neurones individuels étaient comparés sur un même enregistrement au moyen d'une analyse d'autocorrélation. Ces analyses étaient réalisées respectivement sur 100 PMR consécutifs ou sur 2000 PA. Les distributions dans le temps des PMR ou de PA étaient considérées comme rythmiques si les histogrammes d'autocorrélation pouvaient être ajustés significativement avec une courbe sinusoïdale (fonction de Gabor) (Nargeot et al., 2007).

Les effets dépendant de la concentration d'une substance pharmacologique étaient analysés grâce à des courbes doses-réponses. Ces courbes permettant la détermination des paramètres de l'effet pharmacologique de ces substances étaient

réalisées grâce et une fonction de Hill standard :
$$y = y_0 + \frac{a}{1 + \left(\frac{x}{EC_{50}} \right)^b}$$

Les effets cellulaires et moteurs induits par l'addition de conductances artificielles dans les neurones B63/B30/B65 ont été quantifiés, à la fois sur les propriétés de ces neurones et sur la genèse motrice des patterns buccaux. Les corrélations entre les données cellulaires et motrices mesurées et les conductances G_{leak} et G_{junc} ont été représentées par des fonctions de régression linéaires ou non-linéaires. Les relations non-linéaires, telles que les relations entre le coefficient de couplage: (CC) et G_{leak} ou G_{junc} , ont été calculées à partir de l'équation équivalente du circuit électrique entre deux neurones couplés électriquement :

$$CC = \frac{\frac{1}{G_{in} + G_{leak}}}{\frac{1}{G_{nat.} + G_{junc.}} + \frac{1}{G_{in} + G_{leak}}}$$

Dans laquelle G_{in} et G_{nat} sont respectivement les conductances d'entrées et les conductances de jonction naturelles. Les estimations des paramètres et de la significativité des ajustements ont été réalisées grâce au logiciel SigmaPlot (Systat).

La comparaison de deux groupes ou plus de données indépendantes a été réalisée en utilisant les tests bilatéraux de Mann-Whitney (T) et de Kruskal-Wallis (H) respectivement. Les comparaisons entre deux groupes de données dépendantes ont été réalisées avec le test bilatéral de Wilcoxon (W). Pour les comparaisons entre plus de deux groupes de données dépendantes, le test bilatéral de Friedman a été appliqué (χ^2). Les comparaisons post-hoc utilisées étaient les tests à rang multiple de Newman-Keuls (q) pour les analyses multiples et le test de Dunn pour les comparaisons avec un groupe Contrôle correspondant. Des tests non paramétriques ont été utilisés en raison de l'inégalité des variances et/ou de la non-répartition des données selon une loi normale. L'ensemble de ces tests a été réalisé avec le logiciel SigmaStat (Systat). Les différences entre groupes étaient considérées comme significatives pour une valeur de $p < 0,05$.

Le nombre de préparations utilisées (n) pour chaque traitement expérimental est représenté sur les figures correspondantes. Les groupes de données montrent les moyennes $\pm$ SEM et la taille des échantillons individuels.

Résultats

Chapitre 1

Rôles différentiels des plasticités membranaires et synaptiques dans l'expression compulsive du comportement alimentaire.

I. Introduction

Les travaux antérieurs ont analysé et quantifié les corrélats cellulaires de l'apprentissage sur des ganglions buccaux isolés d'animaux Contrôles, Contingents (conditionnés) et Non-contingents. Il a été montré que les préparations nerveuses d'animaux Contrôles, au cours d'une stimulation électrique tonique des nerfs n.2,3 qui mime le stimulus incitatif, génèrent les patterns moteurs radulaires à faible fréquence moyenne et avec des intervalles de temps irréguliers et imprévisibles, comme est exprimé le comportement de recherche de nourriture de ces animaux naïfs (Figure 13A). En revanche, l'activité motrice générée par les préparations issues d'animaux Contingents est beaucoup plus fréquente et remarquablement plus régulière, ce qui rend compte de l'émission compulsive des cycles radulaires des animaux conditionnés (Figure 13B-D). Cette modification de l'activité motrice résulte du conditionnement opérant et de l'association « action-récompense » qui le caractérise, car elle n'est pas exprimée chez les préparations nerveuses issues des animaux Non-contingents (Nargeot et al., 2007). Ainsi, les préparations nerveuses conservent *in vitro* les modifications induites par l'apprentissage *in vivo*. Les corrélats cellulaires de cette plasticité motrice peuvent alors être étudiés par enregistrements intracellulaires de neurones identifiés *in vitro*.

La modification de la genèse des PMR a été associée à une modification de la fréquence et de la régularité des bouffées de potentiels d'action produits par les neurones décideurs B63/B30/B65. Chez les préparations du groupe Contingent, la fréquence et la régularité temporelle avec laquelle les bouffées d'activités électriques sont générées dans ces trois types cellulaires sont considérablement augmentées comparativement aux préparations Contrôles et Non-contingentes (Figure 13B). En

revanche, aucune différence d'activité électrique n'a été observée entre les préparations Contrôles et Non-contingentes (Nargeot et al., 2009).

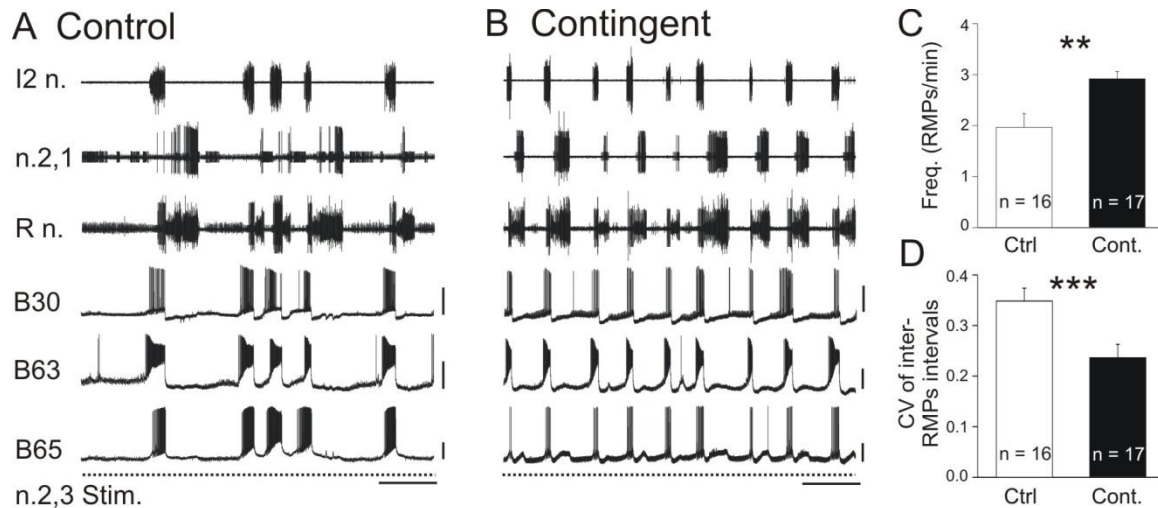


Figure 13. Accélération et augmentation de la régularité de la genèse motrice induite par l'apprentissage et activités associées des neurones B63/B30/B65.

(A-B). PMR répétés et bouffées d'activités dans les neurones B63/B30/B65 dans les préparations du groupe Contrôle (A) et Contingent (B) sous la même stimulation incitative des nerfs n.2,3. La barre d'échelle horizontale représente 30 s. Les barres d'échelles verticales représentent 20 mV. La fréquence des cycles de PMR est augmentée dans le groupe Contingent par rapport au groupe Contrôle (C). Le coefficient de variation (c.v.) des intervalles inter-PMR (D) est quant à lui diminué dans le groupe Contingent par rapport au groupe Contrôle. test bilatéral de Mann-Whitney: $T = 202,5$, $p = 0,013$ (C); $T = 348$, $p = 0,007$ (D). Les groupes de données montrent les moyennes $\pm$ SEM et la taille des échantillons individuels. $**p < 0,025$; $***p < 0,01$.

Des analyses ont déterminé si la plasticité du fonctionnement des neurones B63/B30/B65 du groupe Contingent a une origine membranaire et/ou synaptique. Pour cela, les neurones ont été isolés fonctionnellement de leurs partenaires du réseau. Il a alors été montré qu'individuellement, chaque neurone génère spontanément une oscillation de son potentiel de membrane grâce à ses propriétés intrinsèques (Nargeot et al., 2009). Chez les neurones des préparations Contrôles et Non-contingentes ces oscillations produisent des bouffées de potentiels d'action qui se répètent dans le temps à faible fréquence moyenne et à des intervalles de temps très irréguliers. En revanche, chez les neurones de préparations Contingentes, ces bouffées de PA sont générées à haute fréquence moyenne et à intervalles de temps

très réguliers. L'activité électrique intrinsèque des neurones a donc été modifiée par l'apprentissage. La différence entre le phénotype de décharge, peu fréquent et irrégulier chez les neurones B63/B30/B65 isolés issus de préparations non conditionnées, par rapport au profil de décharge fréquent et rythmique exprimé par ces mêmes neurones issus de préparations conditionnées, rappelle les modifications motrices induites par l'apprentissage.

Les bouffées de potentiels d'action générées par les neurones individuels B63, B30, B65 sont similaires en termes de phénotype. En revanche leur synchronisation lors du fonctionnement du réseau varie d'une préparation à l'autre en fonction de l'apprentissage (Nargeot et al., 2009). Chez les préparations Contrôles et Non-conditionnées, les délais relatifs avec lesquels les neurones déclenchent la bouffée de potentiels d'action varient de façon importante lors de la répétition des PMR. Chez les préparations Contingentes, en revanche, le déclenchement des bouffées de PA chez les trois types cellulaires est beaucoup plus synchrone (Nargeot et al. 2009). Cette synchronisation a été associée à une augmentation des couplages électriques entre ces neurones décideurs. Les coefficients de couplage entre les paires de neurones B63/B30 et B63/B65 qu'elles soient ipsi- ou contralatérales sont nettement plus importants chez les préparations Contingentes comparativement aux préparations Contrôles et Non-contingentes.

Ainsi, il apparaît de l'ensemble de ces résultats initiaux que l'apprentissage modifie (1) les propriétés membranaires intrinsèques des neurones décideurs et (2) leur couplage électrique. A ce stade de l'étude, cependant, il est impossible d'affirmer que ces deux formes de plasticités soient réellement distinctes. En effet, la simple modulation des canaux ioniques membranaires à l'origine de l'activité oscillatoire des neurones peut être responsable de l'augmentation du coefficient de couplage électrique sans que ne soient affectés les canaux de jonction formant les synapses électriques. Inversement, la modulation des canaux de jonction des synapses électriques peut modifier la fréquence et induire une transition d'un mode oscillatoire irrégulier à un mode régulier et coordonné sans modification des canaux membranaires responsables de l'oscillation (Ayali & Harris-Warrick 1999; Varona et al., 2001; Venaille et al., 2005). En d'autres termes, il n'est pas établi que l'apprentissage induit la seule modification des propriétés membranaires, ou la seule

modification des synapses électriques, ou une combinaison des deux. De plus, si ces modifications membranaires et/ou synaptiques existent, il n'est pas établi qu'elles aient un rôle causal dans l'émission de la motricité compulsive émise par les préparations d'animaux conditionnés.

II. Résultats

II.1. Modifications des conductances membranaires et synaptiques induites par l'apprentissage

Dans un premier temps nous avons testé si les modifications de l'activité électrique des neurones B63, B30, B65 sont associées à une modification des canaux ioniques membranaires et extra-synaptiques. Pour cela, nous avons comparé l'excitabilité neuronale et la conductance (ou perméabilité) membranaire de ces neurones chez les préparations Contrôles et Contingentes.

L'excitabilité neuronale a été mesurée par la quantité minimale de courant nécessaire pour déclencher un PA lors d'une injection brève de courant (1 s) en intracellulaire. Pour le neurone B63 des préparations Contrôles, 5 nA étaient nécessaires pour produire au moins un PA. Pour ce même neurone chez les préparations du groupe Contingent, 3 nA suffisaient à produire la même réponse (Figure 14A). Ainsi, l'apprentissage diminue considérablement le seuil de genèse des PA et donc augmente l'excitabilité du neurone B63. Des résultats similaires ont été obtenus pour les neurones B30 et B65 des préparations issues d'animaux Contrôles et Conditionnés (Figure 14B). Nous avons montré que cette augmentation d'excitabilité neuronale est associée à une diminution de la conductance membranaire de ces mêmes neurones (Figure 14C). La conductance membranaire, considérée comme l'inverse de la résistance d'entrée d'un neurone, est mesurée par le rapport entre le courant électrique injecté dans un neurone et la déflexion du potentiel de membrane qui en résulte. De brefs créneaux (1 s) de courant négatifs (-10 nA) qui ne déclenchent pas les PA ont été utilisés. Pour le neurone B63 des préparations du groupe Contrôle nous avons mesuré une conductance membranaire d'environ 280 nS. Chez les préparations du groupe Contingent cette conductance est

réduite à 210 nS. Des résultats similaires montrant des réductions de conductance membranaire pour les neurones B30 et B65 ont été obtenus (Figure 14C). Ainsi les données indiquent que l'augmentation d'excitabilité cellulaire produite par l'apprentissage est associée à une réduction de la perméabilité de la membrane des neurones. Par conséquent, la plasticité cellulaire est au moins en partie liée à une modulation des canaux permettant les flux ioniques transmembranaires.

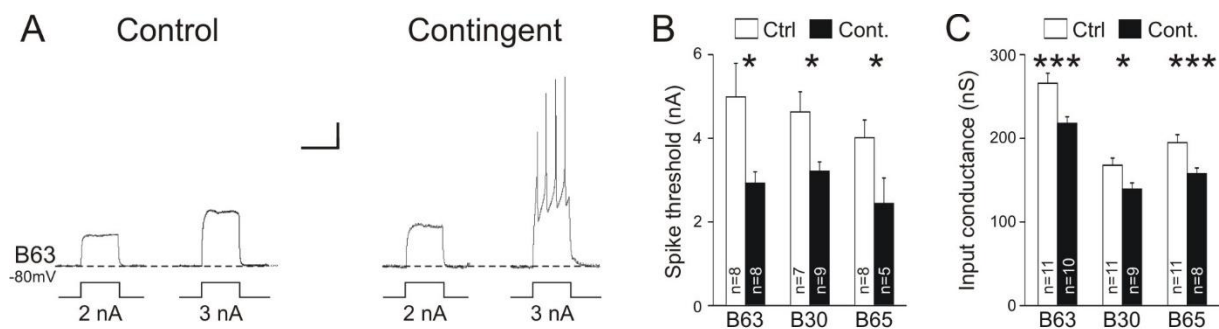


Figure 14. L'apprentissage induit une plasticité membranaire des neurones B63/B30/B65

(A) Seuils de déclenchement des PA d'un neurone B63, déterminé par l'injection de pulses de courants brefs (1 s) d'intensité croissante dans les groupes Contrôle et Contingent. Le seuil est plus petit dans le groupe Contingent que dans le groupe Contrôle. La barre d'échelle horizontale représente 1 s, l'échelle verticale 10 mV. (B et C) Pour chaque type cellulaire, les seuils de déclenchement des PA, (B) ainsi que les conductances d'entrées neuronales (C) sont significativement réduits dans le groupe Contingent par rapport au groupe Contrôle. Test bilatéral de Mann-Whitney: seuil de déclenchement des PA, B63 : $T = 87,5$, $p = 0,038$; B30 : $T = 81$, $p = 0,026$; B65 : $T = 21$, $p = 0,048$; Conductance d'entrée, B63 : $T = 70$, $p = 0,005$; B30 : $T = 67$, $p = 0,04$; B65 : $T = 47$, $p = 0,007$.

De façon concomitante à cette diminution de la perméabilité membranaire, le couplage électrique entre les paires neuronales B63/B65 et B63/B30 est augmenté par l'apprentissage. Cette plasticité de la force synaptique est illustrée Figure 15A (parties non-grisées) par une déflexion postsynaptique du potentiel membranaire de B65 augmentée dans les préparations Contingentes suite à l'injection d'un pulse de courant négatif (-10 nA) dans un neurone B63 présynaptique. Cette augmentation du couplage électrique se traduit par une augmentation du coefficient de couplage entre les paires neuronales B63/B65 et B63/B30 dans les préparations du groupe Contingent par rapport aux mêmes paires neuronales issues de préparations Contrôles (Figure 15B). Il s'agissait ensuite de déterminer si cette augmentation de la force synaptique s'accompagne également d'une modification des synapses

électriques. Pour cela, nous avons testé la perméabilité ou conductance de jonction entre les paires neuronales B63/B30 et B63/B65. Par une approche de « dynamic clamp », la conductance de jonction naturelle ($G_{nat.}$) entre deux neurones a été évaluée par la valeur d'une conductance de jonction ($G_{junc.}$) qu'il faut introduire entre deux neurones pour annuler la conductance naturelle ($G_{nat} = -G_{junc.}$). Dans les préparations des groupes Contrôles et Contingents de la Figure 15A (partie grise), des conductances artificielles de -2 nS et -6 nS, respectivement, sont requises pour annuler le couplage électrique apparent entre les paires neuronales B63/B65. La comparaison de ces valeurs entre les groupes de préparations Contingentes et Contrôles indique que les conductances de jonctions naturelles entre B63/B65 et B63/B30 augmentent significativement après apprentissage (Figure 15C).

Ainsi, en plus de réduire la conductance membranaire des neurones décideurs, le conditionnement opérant augmente les conductances de jonction qui déterminent la force des synapses électriques entre le neurone B63 et le neurone B30 ou B65.

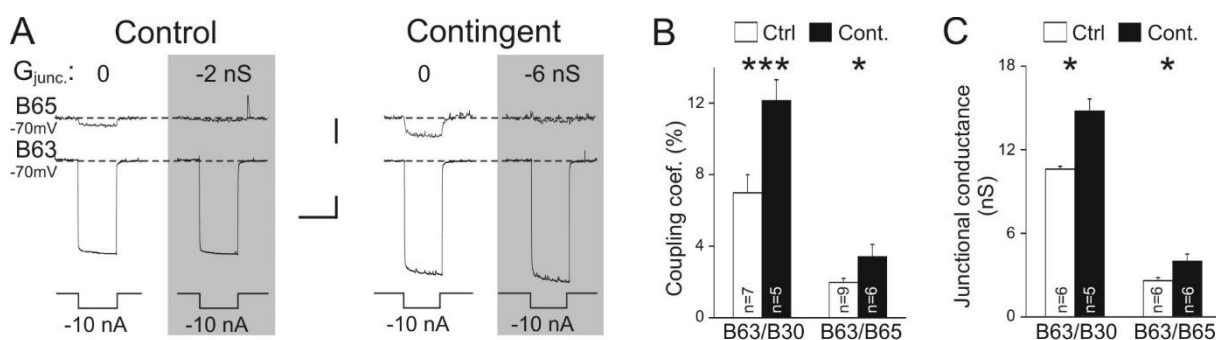


Figure 15. L'apprentissage induit une plasticité des synapses électriques des neurones B63/B30/B65.

(A) Augmentation du couplage électrique, dépendante de l'apprentissage, entre les cellules B63 et B65. L'hyperpolarisation de B65 en réponse à l'injection d'un pulse de courant hyperpolarisant (-10 nA, 10 s) dans un B63 présynaptique révèle une augmentation de la force de couplage électrique dans les préparations du groupe Contingent par rapport aux préparations du groupe Contrôle (zones non grisées). La conductance de jonction naturelle est déterminée dans chaque cas par la valeur de la conductance positive $G_{junc.}$ soustraite par «dynamic clamp» et permettant d'annuler les réponses postsynaptiques de B65 (ici, -2 nS et -6 nS). La barre d'échelle horizontale représente 1 s, les barres verticales 5 mV (B65) ou 10 mV (B63). (B,C) Le coefficient de couplage (B) et la conductance de jonction (C) pour B63/B65 et B63/B30 sont significativement plus élevés dans le groupe Contingent que dans le groupe Contrôle. Test bilatéral de Mann-Whitney: coefficient de couplage, B63/B65: $T = 66$, $p = 0,037$; B63/B30 : $T = 48$, $p = 0,01$; conductances de jonctions, B63/B65: $T = 26$, $p = 0,041$; B65/B30 : $T = 45$, $p = 0,004$. * $p < 0,05$; *** $p < 0,01$.

II.2. L'augmentation d'excitabilité neuronale est responsable de l'accélération de la genèse des patterns moteurs radulaires.

Bien que la nature exacte du courant, (ou des courants) modulés par l'apprentissage opérant ne soit pas déterminée dans cette étude, l'augmentation d'excitabilité associée à une diminution de la conductance d'entrée peut être attribuée à la diminution d'un courant de fuite responsable du maintien du potentiel de repos. Pour tester cette possibilité, nous avons manipulé expérimentalement la conductance de fuite naturelle des neurones individuels B30/B63/B65 au moyen d'une conductance de fuite (G_{leak}) artificielle simulée par dynamic clamp (Figure 16A). Dans toutes les expériences, ajouter ou soustraire une conductance artificielle en parallèle avec la conductance naturelle cause respectivement une augmentation ou une diminution dans la conductance d'entrée des cellules injectées (Figure 17A,B). Ces modifications découlent de la règle d'addition d'une conductance dans un circuit électrique en parallèle. De façon attendue, avec de tels changements de la conductance de fuite, l'excitabilité des neurones (indiquée par une modification du seuil des PA) change linéairement avec la valeur de la conductance artificielle (Figure 16B,C). De même, une conductance d'entrée G_{leak} de -60 nS introduite dans un neurone déclencheur du pattern, décroît significativement la conductance d'entrée et le seuil d'excitabilité. Le coefficient de couplage avec ses partenaires pré-synaptiques est quant à lui augmenté (Figure 16D,17C) (Test de Friedman et test post hoc de Newman-Keuls pour B63: conductance d'entrée $\chi^2 = 40,0$, $p < 0,001$, $q = 5,196$, $p < 0,05$; seuil de déclenchement des PA, $\chi^2 = 38,512$, $p < 0,001$, $q = 5,367$, $p < 0,05$; coefficient de couplage B63/B30, $\chi^2 = 35,612$, $p < 0,001$, $q = 4,648$, $p < 0,05$; coefficient de couplage B63/B65, $\chi^2 = 32$, $p < 0,001$, $q = 5,023$, $p < 0,05$. (Des données similaires sont également observées avec la manipulation par « dynamic clamp » de B30 et B65).

Ainsi ces résultats indiquent qu'une diminution expérimentale de la conductance de fuite des neurones B30/B63/B65 reproduit l'essentiel de la plasticité cellulaire induite par l'apprentissage opérant. En revanche, cette série d'expériences, par définition, ne reproduit pas l'augmentation de conductance synaptique également associée à l'apprentissage.

Nous avons ensuite déterminé l'effet de la modification de la conductance de fuite dans la genèse des PMR. Pour cela, nous avons manipulé G_{leak} des neurones déclencheurs du patterns lors d'un épisode alimentaire fictif généré par des préparations Contrôles sous l'influence de la stimulation tonique des nerfs n.2,3. La diminution concomitante des conductances de fuite dans les trois neurones imposée par «dynamic clamp» cause l'accélération de l'émission des PMR (Figure 16E). Cette augmentation de fréquence persiste pendant toute la durée d'application de la conductance artificielle. En outre, la fréquence des PMR varie de façon proportionnelle avec la valeur de conductance artificielle utilisée (Figure 16F). Ainsi, la réduction de la conductance d'entrée naturelle par une conductance artificielle de -60 nS augmente significativement la fréquence des PMR par rapport à celle exprimée avant la manipulation expérimentale (test de Friedman et test post hoc de Newman Keuls : $\chi^2 = 46,816$, $p < 0,001$ et $G_{\text{leak}} -60 \text{ nS}$ *versus* 0 nS , $q = 6,002$, $p < 0,05$). En revanche, la manipulation de la conductance membranaire des neurones B63/B30/B65 ne reproduit pas l'augmentation de régularité avec laquelle les PMR se succèdent dans le temps telle qu'on l'observe après apprentissage. Ainsi, le coefficient de variation des intervalles inter-PMR n'est pas modifié par des valeurs de G_{leak} artificiel allant de -80 à +80 nS (Figure 16E, G ; test de Friedman: $\chi^2 = 6,019$, $p = 0,645$).

Ainsi, l'ensemble de ces résultats indique qu'une modification de la conductance de fuite des trois types cellulaires induite par l'apprentissage peut-être responsable d'un seul aspect de la plasticité motrice qui est l'augmentation de fréquence d'émissions des PMR.

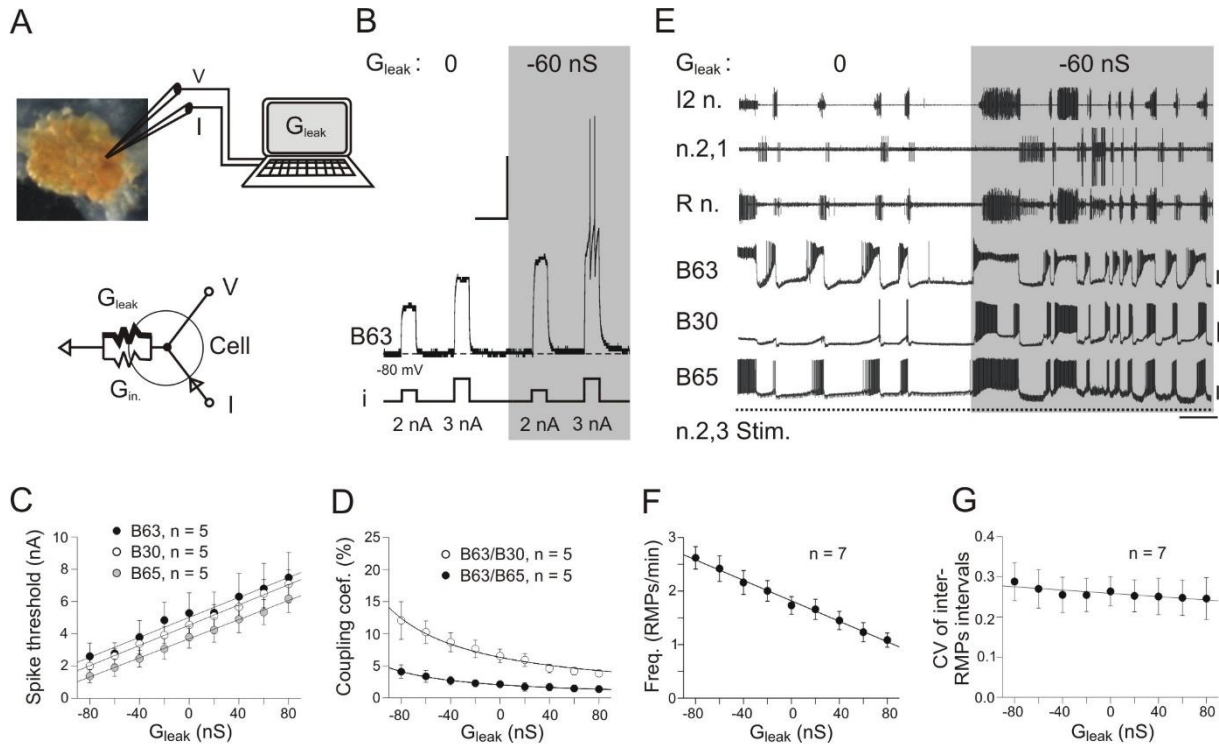


Figure 16. Une augmentation artificielle de l'excitabilité des neurones B63/B30/B65 dans les préparations naïves mime l'augmentation de la fréquence de la genèse des PMR, mais ne réduit pas la variabilité des intervalles inter-PMR.

(A) Protocole expérimental et circuit équivalent décrivant l'addition par «dynamic clamp» d'une conductance de fuite (G_{leak}) en parallèle à la conductance d'entrée d'un neurone. (B) L'introduction d'une conductance de fuite artificielle G_{leak} de -60 nS (zone grise) augmente l'excitabilité d'un neurone cible B63 (indiquée par une diminution du seuil de déclenchement des PA) par rapport à son excitabilité mise en évidence avec la seule conductance de fuite naturelle ($G_{leak} : 0$ nS). La barre d'échelle horizontale représente 2 s, la verticale 20 mV. (C et D) Relations entre G_{leak} et le seuil des PA des neurones B63/B30/B65 (C ; courbes d'ajustement, B63 : $r^2 = 0,977$, $p < 0,0001$; B30 : $r^2 = 0,998$, $p < 0,0001$; B65 : $r^2 = 0,998$, $p < 0,0001$) et relation entre G_{leak} et le coefficient de couplage des paires neuronales B63/B65 et B63/B30 (D; courbes d'ajustement, B63/B65; $r^2 = 0,995$, $p < 0,0001$; B63/B30 : $r^2 = 0,981$, $p < 0,0001$). En (C), G_{leak} était introduite dans les neurones B63, B30, et B65. En (D), G_{leak} était introduite dans B63 et des pulses de courants étaient injectés dans les neurones de B30 ou B65 pour mesurer le coefficient de couplage (Pour le détail de la procédure, voir la Figure 17). (E) Dans une préparation Contrôle, la fréquence des PMR augmente en réponse à une conductance de fuite artificielle de -60 nS introduite simultanément dans les neurones B63/B30/B65 (partie grise). La manipulation de l'excitabilité de ces trois neurones n'induit pas de régularisation des PMR. La barre d'échelle horizontale représente 30 s et les barres verticales 25 mV. (F et G) Quantification des changements en fréquence et en régularité de la genèse des PMR pour différentes valeurs de G_{leak} ajoutées simultanément aux trois neurones.

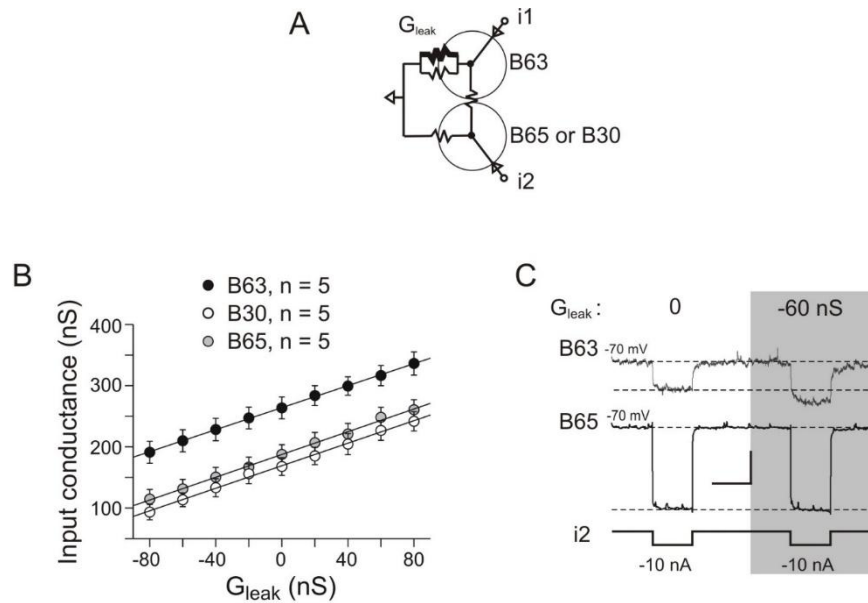


Figure 17. Modification de la conductance d'entrée des neurones B63/B30/B65 et de leur couplage électrique apparent par la manipulation d'une conductance de fuite (G_{leak})

(A) Circuit équivalent de l'addition par «dynamic clamp» d'une conductance de fuite ajoutée à B63. Les grands cercles représentent les neurones; les symboles de résistance représentent les conductances d'entrées naturelles (symboles de résistance horizontaux) et les conductances de jonction synaptiques électriques (symboles verticaux entre deux cellules). Une conductance de fuite artificielle (G_{leak} ; symbole de résistance en gras) était ajoutée à une cellule unitaire (ici, B63). Un pulse de courant i_1 (-10 nA, 2 s) était injecté dans ce neurone pour mesurer sa conductance d'entrée membranaire (voir B). Un pulse de courant i_2 (-10 nA, 2 s) était injecté dans un neurone couplé électriquement (ç.à.d B30 ou B65) afin de tester son coefficient de couplage avec B63 (voir C). (B) La conductance d'entrée variait significativement et de façon proportionnelle (linéaire) à la conductance soustraite ($G_{leak} < 0$) ou additionnée ($G_{leak} > 0$) dans les neurones B63, B30 ou B65 (Friedmann test, $\chi^2 = 40,0$, $p < 0,001$ pour B63 à titre d'exemple représentatif pour les trois cellules). (C) Le coefficient de couplage entre B65 et B63 augmente durant l'addition d'une conductance de fuite G_{leak} de -60 nS dans B63 (panneau gris). La barre d'échelle horizontale représente 2 s, la verticale 2 mV pour B65 et 20 mV pour B63.

II.3. Un renforcement sélectif des synapses électriques régularise de la genèse des PMR.

Pour tester l'effet spécifique d'un changement de la connectivité neuronale entre les neurones décideurs, une conductance de jonction synaptique artificielle (G_{junc}) a été introduite par « dynamic clamp » entre les paires de neurones B63/B65 et B63/B30 des préparations Contrôles (Figure 18A). Comme on s'y attend, l'injection d'une telle conductance positive augmente le couplage électrique entre les paires neuronales (Figure 18B). La relation entre le coefficient de couplage et les valeurs de G_{junc} suit une tendance qui peut être modélisée par l'équation théorique qui relie le coefficient de couplage et la conductance de jonction synaptique (Figure 18C; voir Matériels et Méthodes; B63/B65i $r^2 = 0,999$, $p < 0,0001$; B63/B30i, $r^2 = 0,998$, $p < 0,998$, $p < 0,0001$). Le coefficient de couplage augmente significativement par rapport à sa valeur initiale pour $G_{\text{junc}} \geq +5$ nS (test de Friedman : B63/B30, $\chi^2 = 47,778$, $p < 0,001$; B63/B65, $\chi^2 = 48,000$, $p < 0,001$; test post hoc de Newman-Keuls pour $G_{\text{junc}} = +5$ nS *versus* 0 nS; B63/B30, $q = 3,464$, $p < 0,05$; B63/B65, $q = 3,464$, $p < 0,05$).

Cependant, à l'opposé de la plasticité induite par le conditionnement opérant, une augmentation artificielle de la conductance de jonction augmente, et non décroît, la conductance d'entrée globale d'un neurone cible (Figure 19A,B). En outre, une augmentation de la conductance de jonction tend à diminuer plutôt qu'augmenter, l'excitabilité intrinsèque de la cellule (Figures 18D,19C). Cette dernière tendance n'est toutefois pas significative quand les conductances artificielles sont en dessous de +30 nS (test de Friedman et test post hoc de Newman-Keuls pour $G_{\text{junc}} = 30$ nS *versus* 0 nS : B63/B30, $\chi^2 = 23,945$, $p < 0,002$, $q = 4,661$, $p < 0,05$; B63/B65, $\chi^2 = 7,419$, $p < 0,387$). Pour résumer, ces données indiquent qu'une augmentation sélective de la conductance de jonction synaptique entre les paires cellulaires B63/B30 et B63/B65 reproduit l'augmentation de la force synaptique induite par l'apprentissage, mais ne reproduit pas la plasticité des propriétés membranaires intrinsèques des neurones déclencheurs du pattern.

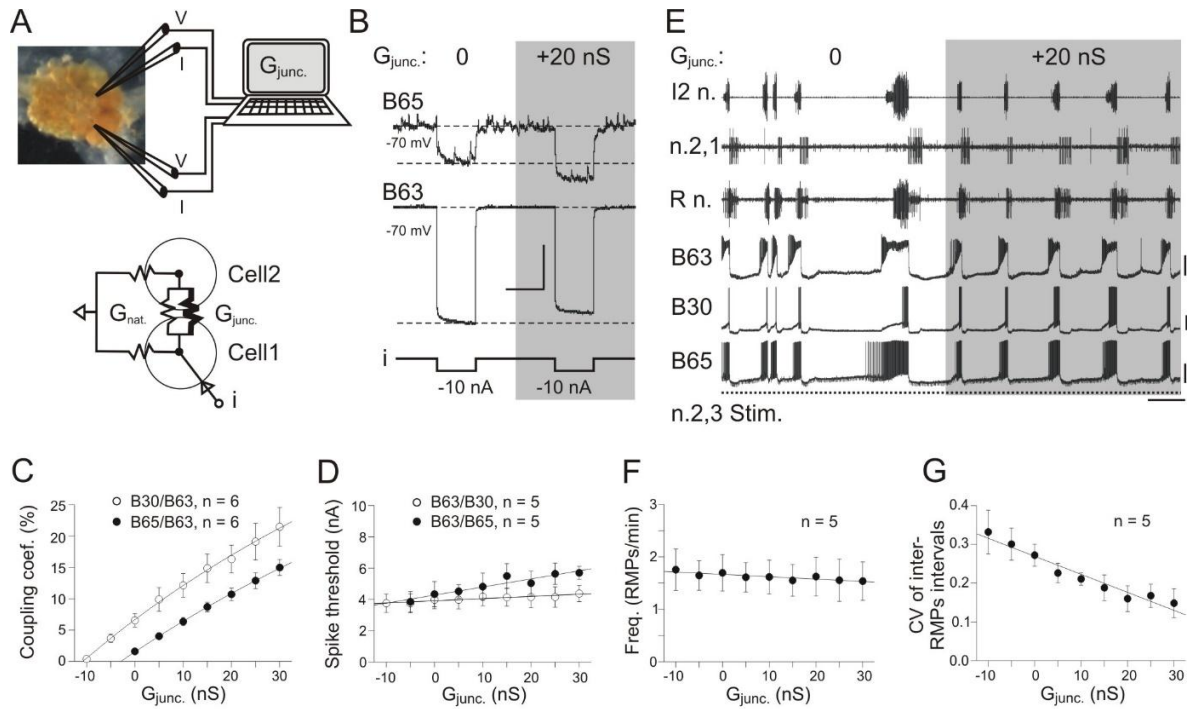


Figure 18. Une augmentation artificielle de la force des synapses électriques entre les neurones B63/B30/B65 dans les préparations naïves mime l'augmentation de la régularité des intervalles inter-PMR, sans modifier la fréquence de la genèse des PMR.

(A) Circuit représentant l'addition par «dynamic clamp» d'une conductance G_{junc} entre une paire de cellules couplées. (B) L'introduction d'une conductance G_{junc} (+20 nS partie grise) augmente le couplage électrique entre une paire neuronale B63/B65, par rapport au couplage électrique résultant de la seule conductance synaptique naturelle (pour G_{junc} : 0 nS). La barre d'échelle horizontale représente 2s ; la verticale 2 mV (B65) ou 20 mV (B63). (C et D) Quantification de l'effet des changements de G_{junc} sur le coefficient de couplage entre les paires B63/B30 et B63/B65. La barre d'échelle horizontale représente 30 s, la barre verticale représente 25 mV. (F et G) Quantification de l'effet de différentes G_{junc} sur la fréquence (F) et le coefficient de variation (G) de la genèse des PMR.

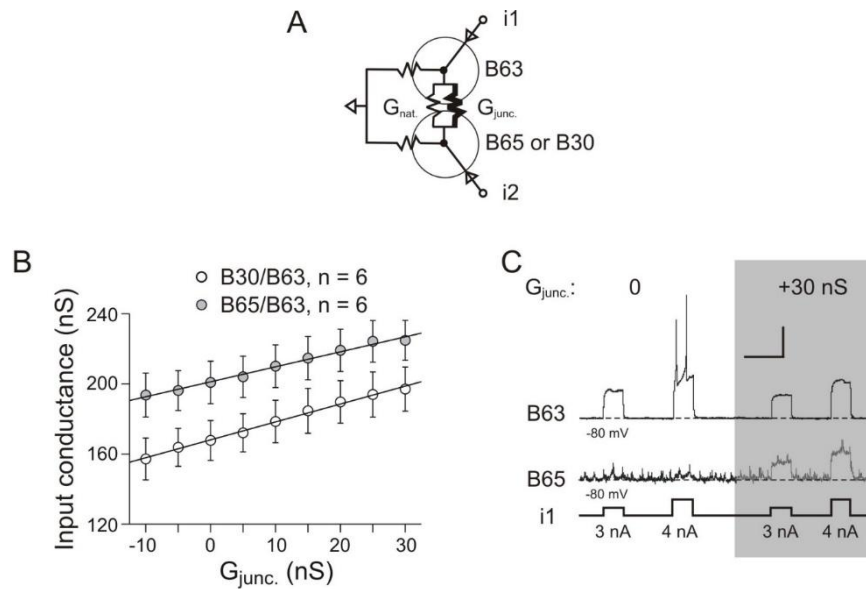


Figure 19. Les conductances simulées de jonction synaptique (G_{junc}) modifient la conductance d'entrée naturelle et l'excitabilité des neurones B63/B30/B65

(A) Circuit électrique représentant l'addition de G_{junc} par «dynamic clamp» aux neurones B63 et B65. (B) La conductance d'entrée de B30 (cercle ouvert) ou B65 (cercle gris), était mesurée par l'injection de pulses de courant dans l'une ou l'autre des cellules (i2 dans A; -10 nA, 2s). Ce paramètre était modifié proportionnellement de façon significative par l'addition ou la soustraction d'une conductance de jonction dans les paires B30/B63 et B65/B63 (Friedman test pour B30/B63: $\chi^2 = 46,587$, $p < 0,001$ et pour B65/B63 $\chi^2 = 41,426$, $p < 0,001$). (C) L'excitabilité de B63 était déterminée par l'injection de pulses dépolarisants d'1 s et d'intensité croissante (i1 en A). La quantité de courant minimale permettant d'atteindre le seuil des PA est réduit par l'addition d'une conductance G_{junc} de +30 nS. La barre d'échelle horizontale représente 2 s, la barre d'échelle verticale représente 2 mV pour B65 et 20 mV pour B63.

L'effet d'un tel changement sélectif du couplage électrique entre les neurones a ensuite été testé sur la genèse des PMR dans des préparations Contrôles. Une conductance artificielle G_{junc} a ainsi été ajoutée aux paires neuronales B63/B30 et B63/B65. Les modifications ainsi imposées à la conductance de jonction synaptique naturelle sont incapables de modifier la fréquence moyenne de la production des PMR (Figure 18E,F; test de Friedman: $\chi^2 = 2,729$, $p = 0,950$). En revanche, la régularité des émissions de PMR, quantifiée par le coefficient de variation des intervalles inter-PMR, augmente fortement et proportionnellement aux valeurs de la conductance G_{junc} (Figure 18E,G ; test de Friedman: $\chi^2 = 32,495$, $p < 0,001$). Une augmentation de conductance de jonction imposée par «dynamic clamp» $\geq +10$ nS est ainsi suffisante pour diminuer significativement le coefficient de variation des intervalles inter-PMR (test post hoc de Newman-Keuls pour $G_{junc} = +10$ *versus* 0 nS, $q = 3,578$, $p < 0,05$).

Ces résultats indiquent qu'un renforcement des synapses électriques entre un neurone B63 et les neurones B30 et B65 est suffisant pour produire un aspect de la plasticité motrice qui est l'augmentation de la régularité des émissions successives des PMR observées après apprentissage.

II.4. Une modification concomitante des propriétés neuronales intrinsèques et de la force des synapses électriques reproduit tous les aspects de la plasticité motrice.

Dans une dernière série d'expériences réalisée sur des préparations d'animaux naïfs, nous avons déterminé si les modifications intrinsèques de l'excitabilité membranaire et de la force synaptique électrique peuvent reproduire conjointement l'ensemble des plasticités cellulaires et motrices induites par le conditionnement opérant. D'après nos données obtenues sur des neurones individuels de préparations naïves et présentées plus tôt dans ce chapitre : une G_{leak} de -60 nS reproduit les modifications membranaires, tandis qu'une G_{junc} de +10 nS reproduit les modifications synaptiques induites par l'apprentissage. Nous avons donc choisi d'utiliser ces conductances pour reproduire simultanément les plasticités membranaire et synaptique obtenues par conditionnement opérant (Figure 20A).

Ainsi, une G_{leak} de -60 nS et une G_{junc} de +10 nS appliquées simultanément aux paires neuronales B63/B30 et B63/B65 diminue de façon significative la conductance d'entrée neuronale du neurone B63 pré-synaptique (Figure 20B). Cette diminution correspond à la somme des conductances introduites (c.à.d. -50 nS). L'excitabilité neuronale est également augmentée (indiqué par la diminution du seuil de déclenchement des PA), de même que le coefficient de couplage entre les paires neuronales B63/B30 et B63/B65 (Figure 20C-E). Ainsi, la combinaison d'une diminution forte de la conductance de fuite et d'une augmentation modeste de la conductance de jonction synaptique est capable de reproduire l'ensemble des plasticités membranaire et synaptique induites par l'apprentissage opérant.

Ces modifications conjointes des conductances membranaires et de jonctions appliquées expérimentalement aux neurones B63/B30/B65 transforme de façon significative la genèse motrice initialement peu fréquente et irrégulière des préparations naïves en une motricité plus fréquente et régulière telle qu'on l'observe chez les préparations conditionnées. Cette transition dans la genèse des PMR est immédiate et réversible (Figure 21A). La fréquence moyenne des PMR augmente significativement pendant l'application des conductances artificielles (Figure 21B). Le C.V. des intervalles inter-PMR décroît, quant à lui, de façon significative par rapport à cette même mesure avant l'application de la procédure de « dynamic clamp » (Figure 21C).

Ces résultats indiquent qu'un changement concomitant des propriétés membranaires et synaptiques des neurones déclencheurs du pattern suffit à reproduire le comportement moteur et l'ensemble des plasticités cellulaires imputables au conditionnement opérant chez des préparations naïves. On peut donc s'attendre à ce qu'inversement les plasticités cellulaires et motrices des préparations conditionnées puissent être annulées par des manipulations des conductances membranaires et synaptiques.

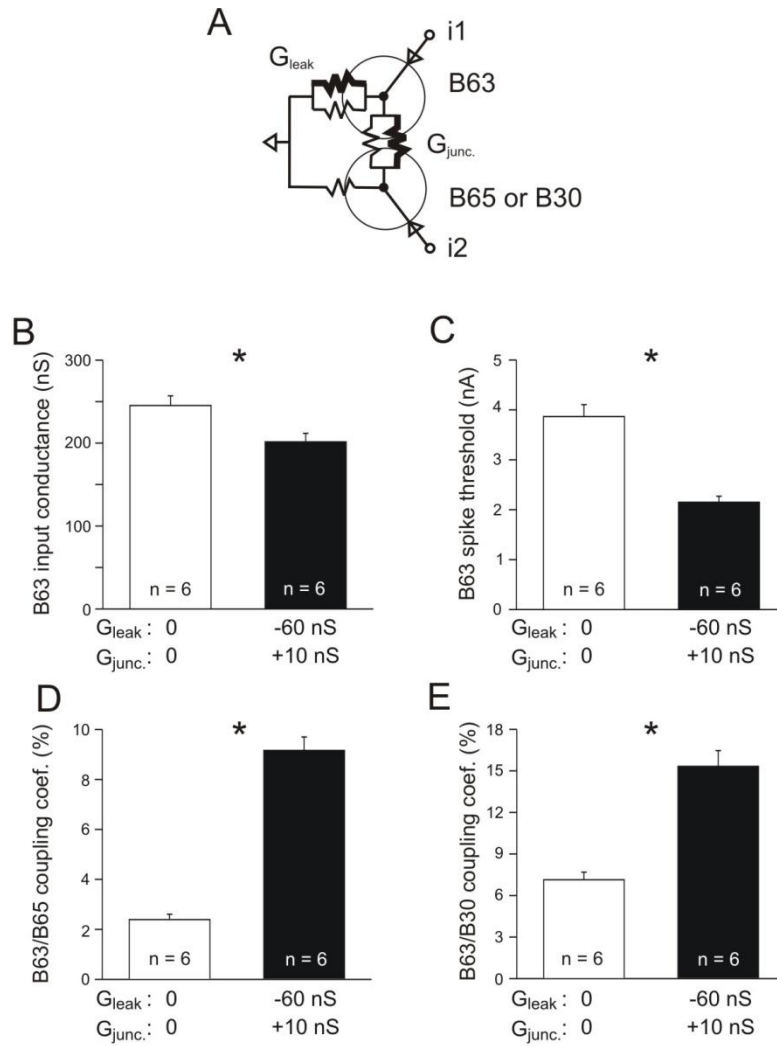


Figure 20. Effets de changements concomitants dans G_{leak} et G_{junc} sur les propriétés cellulaires

(A) Circuit équivalent : la conductance d'entrée et le seuil de déclenchement des PA de B63 étaient testés par l'injection de pulses de courants (i_1). Les coefficients de couplages entre les paires B63/B65 et B63/B30 étaient mesurés avec des pulses de courant injectés respectivement dans B65 et B30 (i_2). (B,C) La conductance d'entrée (B) et le seuil de déclenchement des PA de B63 (C) étaient réduits par l'addition d'une G_{leak} de -60 nS et d'une G_{junc} de +10 nS par comparaison avec les valeurs naturelles seules (G_{leak} , 0 nS; G_{junc} , 0 nS). Test bilatéral de Wilcoxon: $W = -21,000$, $p = 0,031$ et $W = -21,000$, $p = 0,031$, respectivement. (D,E). Le coefficient de couplage entre les paires B63/B65 (D) et B63/B30 (E) augmente avec $G_{leak} = -60 \text{ nS}$ et $G_{junc} = +10 \text{ nS}$ par rapport aux valeurs résultant des seules conductances naturelles (G_{leak} , 0 nS; G_{junc} , 0 nS). Test bilatéral de Wilcoxon: $W = 21,000$, $p = 0,031$ et $W = 21$, $p = 0,031$ respectivement.

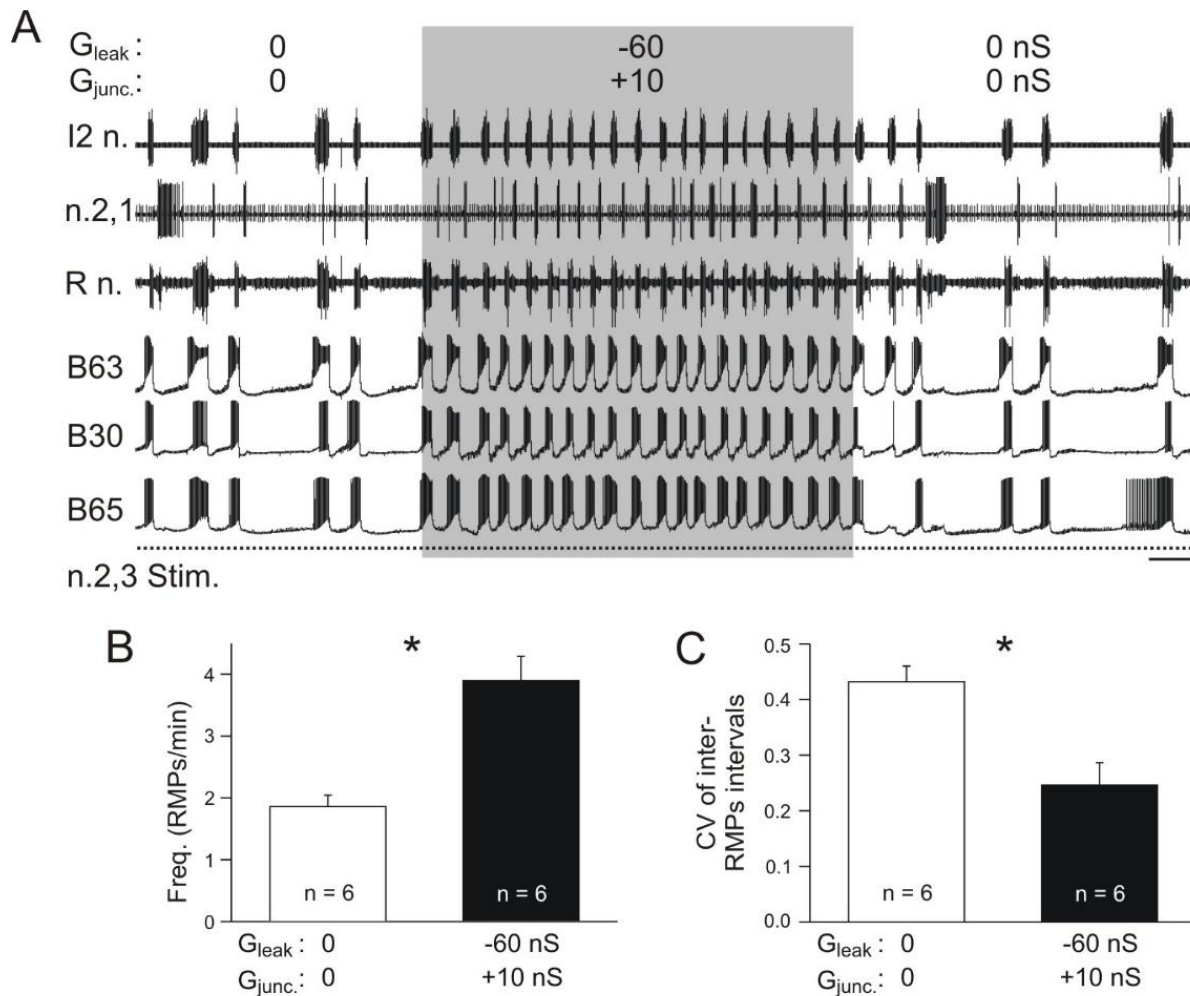


Figure 21. Dans les préparations naïves, une augmentation concomitante de l'excitabilité et de la force des synapses électriques des neurones B63/B30/B65 induit simultanément l'accélération de la genèse des PMR et la régulation de la variabilité inter-PMR.

(A) Effet de l'augmentation artificielle simultanée de l'excitabilité et de la force des synapses électriques des neurones B63/B30/B65 sur les PMR et sur l'activité neuronale initiatrice dans une préparation naïve. La genèse des PMR initialement peu fréquente et irrégulière est transformée en une activité fréquente et régulière par l'introduction simultanée d'une conductance de fuite G_{leak} de -60 nS et d'une conductance de jonction synaptique G_{junc} de +10 nS dans les paires neuronales B63/B30 et B63/B65 (partie grise). Ce changement dans l'activité neuronale est aboli quand l'injection des conductances artificielles cesse (0 nS). La barre d'échelle horizontale représente 30s, les barres verticales représentent 25 mV. (B et C) Comparaison de la fréquence (B) et du coefficient de variation (C) de l'expression des PMR avant (barres blanche) et pendant (barres noires) les changements imposés de G_{leak} et G_{junc} illustrés en (A). Test bilatéral de Wilcoxon: $W = 21,0$, $p = 0,031$ et $W = -21,0$, $p = 0,031$ respectivement. * $p < 0,05$

II.5. Une modification des propriétés membranaires et synaptiques opposée aux effets de l'apprentissage restaure un phénotype d'activité naïf.

Sur des préparations conditionnées qui génèrent une motricité rythmique fréquente et régulière, nous avons montré que l'introduction par « dynamic clamp » d'une conductance membranaire artificielle G_{leak} maintenant positive, +60 nS, diminue l'excitabilité neuronale (Figure 16C) et la fréquence des émissions des PMR mais sans affecter la régularité du rythme (Figure 22A-C).

En revanche, une diminution de la seule force des synapses électriques entre les paires B63/B30 et B63/B65 par une conductance G_{junc} maintenant négative, -10 nS, diminue la régularité du rythme d'émission des PMR, sans modifier la fréquence moyenne des émissions (Figure 22D-F).

Finalement, sur ces préparations conditionnées, une augmentation simultanée de la conductance de fuite ($G_{\text{leak}} = +60$ nS) dans les trois neurones et une diminution coïncidente de la force des couplages électriques ($G_{\text{junc}} = -10$ nS) entre les paires cellulaires B63/B30 et B63/B65, supprime l'ensemble de la plasticité motrice induite par apprentissage (Figure 23A). Cette manipulation expérimentale des propriétés membranaires et synaptiques diminue significativement et simultanément la fréquence et la régularité des émissions des patterns moteurs (Figure 23B,C).

Ces résultats confirment que chez des préparations conditionnées, une manipulation concomitante des propriétés membranaires et synaptiques des neurones déclencheurs du pattern peut restaurer l'activité motrice normalement exprimée par les ganglions issus d'animaux naïfs.

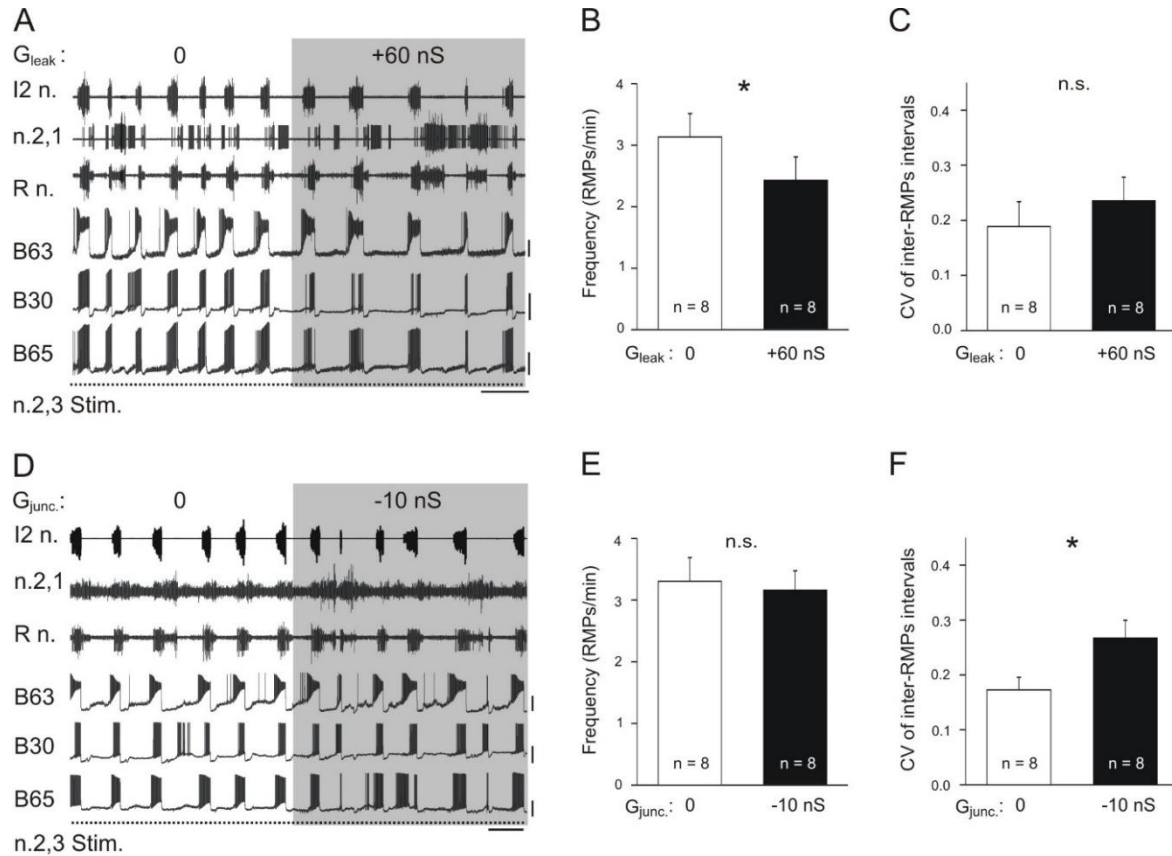


Figure 22. Effets indépendants de G_{leak} ou G_{junc} sur les bouffées d'activité de B63/B30/B65 et sur la genèse des PMR dans les préparations Contingentes.

(A) Une conductance définie par «dynamic clamp» de +60 nS (partie grise) introduite simultanément dans les trois neurones diminue la fréquence, mais pas la régularité des PMR. (B, C) Quantification des changements de fréquence (B) et du coefficient de variation (C) de la genèse des PMR dans les conditions expérimentales présentées en A. Test bilatéral de Wilcoxon: $W = 30$, $p = 0,039$ et $W = 22$, $p = 0,148$, respectivement; n.s. non significatif. (D) Une conductance G_{junc} de -10 nS (partie grise), définie par «dynamic clamp» ajoutée simultanément aux paires neuronales B63/B30 et B63/B65, diminue la régularité des bouffées d'activités de ces neurones ainsi que les intervalles inter-PMR. Leur fréquence en revanche n'est pas modifiée. Les barres d'échelles horizontales et verticales représentent 30 s et 25 mV respectivement. (E, F) Quantification des changements de fréquence (E) et de coefficient de variation (F) des PMR dans les conditions expérimentales illustrées en D. Test bilatéral de Wilcoxon: $W = 8$, $P = 0,578$ et $W = 26$, $P = 0,031$ respectivement; n.s. non significatif.

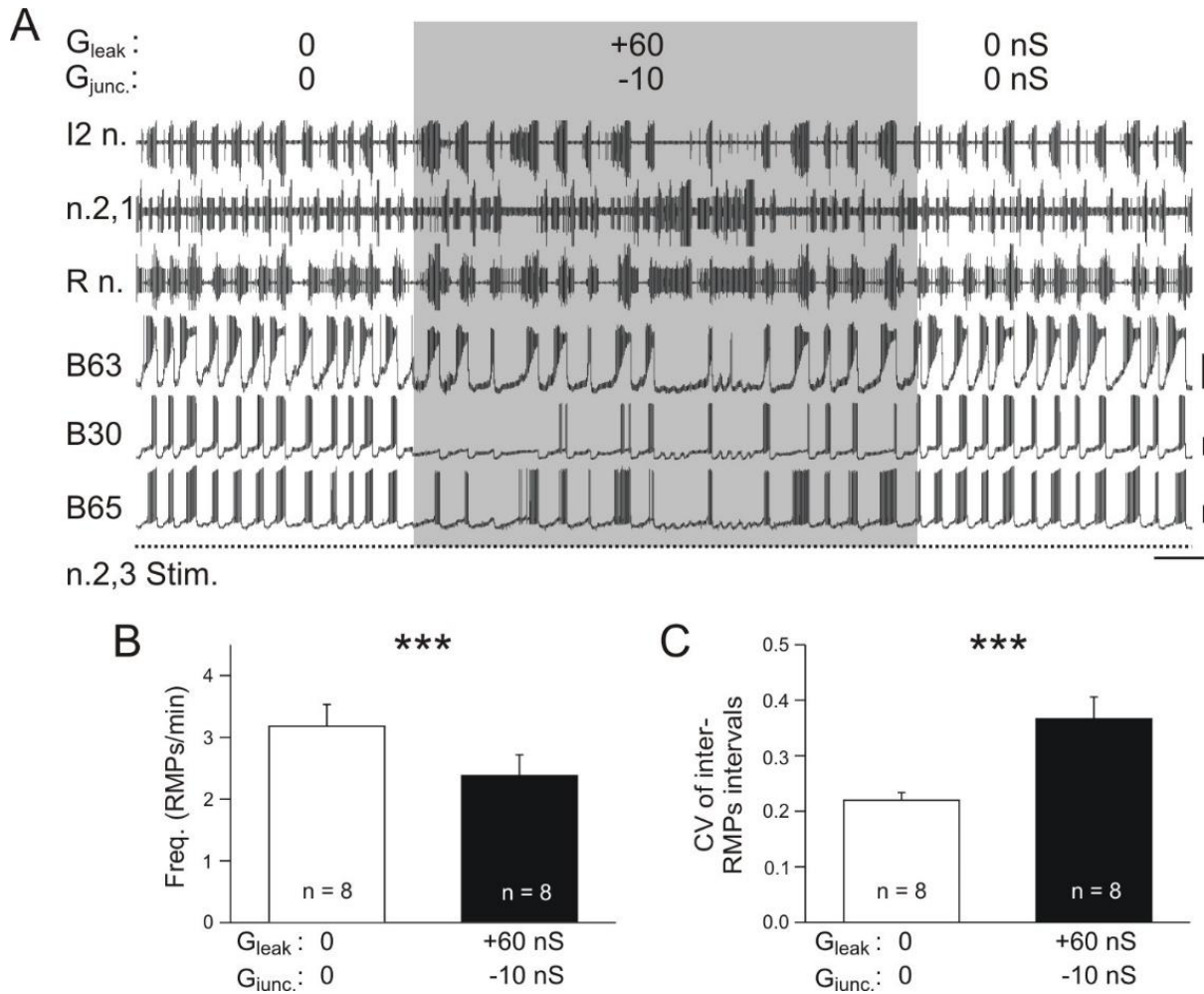


Figure 23. Dans les préparations Contingentes, une diminution concomitante de l'excitabilité et de la force des synapses électriques des neurones B63/B30/B65 induit un retour à un phénotype Contrôle de la genèse motrice.

(A) Effet d'une diminution simultanée de l'excitabilité et de la force des synapses électriques des neurones B63/B30/B65 sur les PMR et activités neuronales sous-jacentes dans une préparation Contingente. (B) La genèse des PMR initialement fréquente et irrégulière est rendue moins fréquente et plus irrégulière par l'introduction simultanée d'une conductance G_{leak} de +60 nS dans les neurones B63/B30/B65 et d'une conductance G_{junc} de -10 nS dans les paires neuronales B63/B30 et B63/B65 (partie grise). Ce changement dans l'activité neuronale est aboli quand l'introduction des conductances artificielles cesse (0 nS). La barre d'échelle horizontale représente 30 s, la verticale 25 mV. (B et C) Comparaison de la fréquence (B) et du coefficient de variation (C) de l'expression des PMR avant (barres blanches) et pendant (barres noires) les changements imposés de G_{leak} et G_{junc} comme illustrés en (A). Test bilatéral de Wilcoxon: $W = -36,0$, $p = 0,008$ et $W = 36,0$, $p = 0,008$, respectivement. *** $p < 0,01$.

III. Discussion

Le caractère erratique et variable du comportement de recherche de nourriture chez l'aplysie provient en partie du fonctionnement autonome du réseau neuronal buccal générateur et organisateur de ce comportement. Ce CPG possède les propriétés nécessaires pour définir la fréquence et la régularité de la production motrice. Cette capacité dépend en particulier de la diversité fonctionnelle des neurones décideurs qui, à travers leurs propriétés membranaires intrinsèques et à travers leur plan de connexion et la force des synapses dans le circuit, sont capables de déclencher de façon irrégulière l'occurrence de chaque PMR (Nargeot et al., 2009). En modulant ces propriétés cellulaires, l'apprentissage opérant appétitif conduit à l'accélération et à la coordination des décharges neuronales dans ce sous-groupe déclencheur des patterns buccaux radulaires. Ceci a pour conséquence directe d'induire l'accélération et la stéréotypie du rythme d'émission des PMR. Nos données indiquent que l'accélération des PMR dépend d'une plasticité de l'excitabilité cellulaire, elle-même dépendante de la réduction d'un courant de fuite par l'apprentissage. La régularité temporelle de l'émission des PMR dépend, quant à elle, de l'augmentation de la force du couplage synaptique entre les neurones déclencheurs du pattern.

La genèse spontanée des bouffées de potentiels d'action par les neurones pacemakers ou oscillants dépend de la variété des canaux ioniques membranaires voltage-dépendants (Harris-Warrick 2002, Harris-Warrick 2010). Les courants de fuite K^+ et Na^+ qui régulent l'excitabilité cellulaire peuvent également contribuer à ce processus (Zhao et al., 2010; Lu et al., 2007). Bien que ces courants indépendants du voltage ne soient pas impliqués directement dans le mécanisme de genèse, ils exercent leurs effets indirectement en amenant le potentiel membranaire dans les gammes d'activation des propriétés régénératives des canaux voltage-dépendants (Brocard et al., 2013). Ainsi, il est connu que la modification des conductances de fuites peut avoir pour conséquence de modifier l'émission des bouffées rythmiques de PA par des neurones pacemakers ou oscillants. Cependant, un point intéressant de notre étude est la démonstration que la manipulation d'un courant de fuite avec un potentiel d'inversion proche du potentiel de repos peut modifier la fréquence des

bouffées de PA sans exercer d'influence sur la structure temporelle (régulière ou irrégulière) de l'activité rythmique des neurones.

Chaque neurone du trio B63/B30/B65 joue un rôle critique dans la genèse du pattern moteur responsable du comportement alimentaire. Cependant, seule l'activité de B63 est nécessaire et suffisante pour déclencher les PMR. Les bouffées électriques spontanées des neurones B30 et B65 contribuent malgré tout au déclenchement des patterns et ceci en partie grâce à leurs connexions synaptiques électriques avec B63. Les trois types cellulaires sont présents dans les deux hémiganglions. Ainsi les cellules de chaque type constituent des paires avec leurs homologues controlatéraux. Toutes les synapses électriques ipsi- et contralatérales entre ces six neurones sont modulées par l'apprentissage opérant (Nargeot et al., 2009). Il est admis que les couplages électriques jouent un rôle dans la synchronisation de la décharge des neurones, ainsi que dans la régulation de la durée des bouffées d'activités et dans la régularité des intervalles inter-bouffées entre neurones couplés (Sharp et al., 1992; Susswein et al., 2002). Ainsi nos données confirment cette idée générale que les échanges ioniques à travers les jonctions communicantes peuvent contribuer de façon essentielle à la régularité de l'activité oscillatoire des cellules et par conséquent à la régularité du fonctionnement des réseaux générateurs de patterns moteurs et de leur sortie motrice.

On notera que, dans notre étude, l'augmentation expérimentale de la conductance synaptique imposée par « dynamic clamp » entre seulement trois de ces six neurones décideurs suffit pour induire la régularité des PMR. Cela peut s'expliquer par le fait que les valeurs de la conductance artificielle utilisée sont légèrement supérieures aux valeurs naturelles constatées après apprentissage et pourraient ainsi compenser l'effet des synapses non manipulées. Une autre limitation à notre expérimentation est la localisation anatomique des synapses électriques qui peut être un facteur déterminant l'efficacité de la manipulation des conductances synaptiques. Les neurones ipsilatéraux sont vraisemblablement connectés par des synapses localisées dans le même hémiganglion. Elles permettent ainsi des échanges ioniques proches des corps cellulaires où sont effectuées les manipulations de conductance par le « dynamic clamp ». En revanche, les synapses électriques avec les partenaires controlatéraux sont probablement plus éloignées

des corps cellulaires. En raison de ces différences dans la distance soma-synapse, il est possible que l'injection de courant dans une cellule influence plus efficacement le potentiel membranaire des cellules couplées ipsilatéralement que le potentiel membranaire des cellules couplées controlatéralement (Nargeot et al., 2009). En conséquence et comme cela a été observé précédemment chez le mollusque *Lymnae* (Nikitin et al., 2013), l'injection de courant dans un corps cellulaire, bien que capable de modifier le potentiel intra-somatique, peut n'affecter que partiellement ou peut même échouer à influencer des connexions controlatérales distantes.

Malgré ces limitations potentielles, nos résultats montrent que deux propriétés cellulaires indépendantes, d'une part l'excitabilité membranaire gouvernée par les canaux ioniques non voltage-dépendant, et d'autre part la force des connections synaptiques permise par les conductances de jonctions, sont respectivement responsables de l'élévation de fréquence et de régularité des patterns moteurs. Ces deux aspects, fréquence élevée et régularité caractérisent la motricité compulsive induite par apprentissage. Ainsi, un point fondamental de cette étude est que ces relations de causalité entre des modifications membranaires et synaptiques et la genèse des différents aspects de l'activité motrice, laissent entrevoir la possibilité de réguler séparément ou conjointement deux caractères essentiels d'une motricité compulsive.

Chapitre 2

Implication d'une modulation dopaminergique dans la plasticité comportementale et neuronale induite par apprentissage opérant

I. Introduction

Les résultats présentés dans le chapitre précédent ont montré l'importance de la plasticité des propriétés membranaires et synaptiques des neurones décideurs dans l'expression d'une motricité compulsive induite par apprentissage opérant. Néanmoins l'identité des systèmes neuromodulateurs qui induisent ces plasticités fonctionnelles n'est pas établie.

Il apparaît dans de nombreux modèles d'études que les mécanismes cellulaires impliqués dans le renforcement contingent dépendent de l'action de monoamines impliquées dans les systèmes de récompense (Nargeot et al., 1999c; Brembs, 2002; Wise, 2006; Vergoz et al., 2007). L'apprentissage opérant chez les mammifères est ainsi bloqué par l'infusion d'antagonistes de récepteurs dopaminergiques de type D1 dans le noyau accumbens (Smith-Roe & Kelley, 2000). Les récepteurs à la DA de type D1 sont également nécessaires à la potentialisation des synapses cortico-striatales dans un analogue d'apprentissage par récompense dans lequel l'activation des neurones striataux est appariée à une stimulation (renforcement positif) des neurones de la substance noire (Reynolds et al., 2001). Il est également admis que l'acquisition et l'expression de motricités stéréotypées dépend de l'action modulatrice des systèmes dopaminergiques activés par les récompenses. En effet, des modifications dans la libération centrale de DA induite par des récompenses alimentaires ont été mises en évidence chez des animaux dont le comportement est devenu compulsif (Ito et al., 2002). De plus, une lésion des neurones dopaminergiques ou la manipulation pharmacologique des récepteurs à la DA modifient l'acquisition de tels comportements stéréotypés (Pilla et al., 1999; Belin & Everitt 2008).

Plusieurs études précédentes chez l'aplysie ont fourni des preuves que les informations sensorielles associées aux récompenses alimentaires sont véhiculées par les afférences œsophagiennes En.2 : (1) les stimuli alimentaires à forte valeur appétitive qui contribuent aux processus de renforcement dans différentes formes d'apprentissages classiques et opérants activent de façon transitoire les nerfs œsophagiens (Schwarz & Susswein 1986; Lechner et al., 2000; Brembs et al., 2002); (2) de tels apprentissages associatifs sont altérés par la lésion de ces voies afférentes (Lechner et al., 2000); (3) dans les analogues *in vitro* de ces apprentissages associatifs la stimulation phasique des afférences En.2 mime les effets modulateurs des récompenses sur l'activité des réseaux buccaux et reproduit les plasticités cellulaires spécifiques résultant de ces apprentissages (Nargeot et al., 1999 a,b; Brembs et al., 2002, 2004; Reyes et al., 2005; Mozzachiodi et al., 2008). Par ailleurs, de nombreuses données indiquent que l'action des récompenses sur le système nerveux central dépend de l'action de la dopamine potentiellement libérée par les fibres En.2. En effet, plusieurs données suggèrent fortement que les terminaisons des nerfs œsophagiens libèrent ce neurotransmetteur : (1) des analyses d'histofluorescence montrent que des fibres constitutives de ces nerfs bilatéraux sont riches en dopamine (Kabotyanski et al., 1998). De plus l'afférence En.2 est immunoréactive pour la tyrosine hydroxylase qui est une enzyme impliquée dans la biosynthèse de la DA (Martinez-Rubio et al., 2009); (2) l'action monosynaptique des afférences œsophagiennes, sur certains neurones identifiés appartenant au réseau du CPG buccal, est bloquée *in vitro* par l'application de méthylergonovine, un alcaloïde agissant comme un antagoniste dopaminergique chez les mollusques (Nargeot et al., 1999c). En outre, l'application transitoire de DA sur ces neurones en culture reproduit certaines plasticités des propriétés membranaires induites *in situ* par les stimulations œsophagiennes (Brembs et al., 2002; Lorenzetti et al., 2008).

Toujours chez l'aplysie, les amines peuvent modifier les propriétés intrinsèques de neurones appartenant au CPG buccal : en particulier, l'excitabilité, les propriétés de plateau et de rebond post-inhibiteur ainsi que les propriétés oscillatoires supportant la décharge en bouffées répétées de PA (Lewis et al., 1984; Nargeot et al., 1999a,b; Kabotyanski et al., 2000; Brembs et al., 2002; Serrano &

Miller 2006). En outre ces actions modulatrices dépendent des types cellulaires et du mode d'exposition continue ou intermittent des amines. Par exemple, une application tonique de DA décroît l'excitabilité des neurones B4/5, B34, B64 du réseau buccal (Kabotyanski et al., 2000), augmente l'amplitude des rebonds post-inhibiteurs dans B8 (Kabotyanski et al., 2000) et augmente les propriétés de décharge en bouffée de PA et de plateau de B67 (Serrano & Miller 2006; Serrano et al., 2007). Par ailleurs, la libération phasique de DA induite par le renforcement contingent du conditionnement opérant *in vivo* ou par la stimulation contingente *in vitro* des fibres dopaminergiques d'En.2 augmente à la fois l'excitabilité et les propriétés de plateau du neurone B51 (Nargeot et al., 1999a; Brembs et al., 2002; Lorenzetti et al., 2008). Cependant, en dépit de ces connaissances, il n'était pas établi que le neurotransmetteur DA, libéré par les fibres d'En.2, soit directement responsable de la plasticité cellulaire des neurones B63/B30/B65 déclencheurs du pattern ni du renforcement de leur couplage électrique.

Pour tester cette hypothèse, nous avons développé un analogue *in vitro* du conditionnement opérant utilisant la stimulation électrique de l'afférence dopaminergique En.2 pour reproduire l'association « action-récompense » caractéristique du conditionnement opérant. Dans ce travail sur des ganglions buccaux isolés qui contiennent le réseau générateur des patterns moteurs radulaires, nous montrons que la stimulation d'En.2 associée à l'émission de PMR induit une motricité fréquente et rythmique. L'absence d'association ou l'utilisation d'un antagoniste dopaminergique (Flupenthixol), empêchent l'induction de cette modification motrice. De plus, nous avons montré que cette stimulation associative de la voie dopaminergique induit des modifications de l'excitabilité et des couplages électriques des neurones décideurs B63, B30 et B65 analogues aux plasticités observées après apprentissage *in vivo*. Ces résultats suggèrent qu'une modulation dopaminergique des propriétés membranaires et synaptiques du réseau buccal contribue à l'émergence d'un comportement alimentaire de type compulsif tel qu'il est induit par l'apprentissage opérant appétitif.

II. Résultats

II.1. Connectivité monosynaptique dopaminergique de l'afférence En.2 sur les neurones déclencheurs du pattern.

Lors d'une première étape, nous avons caractérisé la relation synaptique entre les afférences sensorielles En.2 et les neurones B63 et B65/B30 du CPG buccal. Pour cela, nous avons stimulé électriquement ce nerf sur nos préparations isolées *in vitro*. Simultanément, les patterns moteurs et les activités électriques intracellulaires des neurones B63/B30/B65 ont été enregistrés. En condition Contrôle, dans de l'ASW, nous avons réalisé une stimulation d'En.2 (8V, pulses de 0,3 ms, à 10Hz pendant 5s) qui correspond approximativement en fréquence et durée à l'activité nerveuse induite dans ce nerf par une récompense alimentaire (Brembs et al., 2002). Cette stimulation électrique évoque une dépolarisation rapide et prolongée des trois types de neurones qui est associée à l'activation du CPG et à la genèse de 1 à 3 patterns de mouvements fictifs de la radula (Figure 24A; voir également Bédécarrats et al., 2013, Figure supplémentaire 1A en Annexes).

Pour tester si cette excitation du réseau résulte de connexions monosynaptiques entre En.2 et les neurones déclencheurs du pattern, la même expérience a ensuite été réalisée dans une solution d'ASW enrichie en ions divalents (Hi Div). Ce milieu ionique est connu pour diminuer l'excitabilité neuronale et pour bloquer les voies polysynaptiques dans le système nerveux de l'aplysie (Byrne et al., 1978). Ces cellules, en raison de la diminution de leur excitabilité en Hi Div, n'émettent plus de potentiels d'action et ne génèrent plus de PMR (Figure 24B). Ce blocage peut être supprimé en réexposant les ganglions buccaux à des conditions ioniques Contrôles (Figure 24C). Dans ces conditions d'enregistrement, la stimulation de l'afférence En.2 est toujours capable d'induire une dépolarisation rapide (amplitude maximale comprise entre 5 et 8 mV) et prolongée (plusieurs dizaines de secondes) des neurones B63/B30/B65 (Figure 24B; voir également Bédécarrats et al., 2013, Figure supplémentaire 1B en Annexes).

Ces résultats indiquent qu'au moins une partie des axones d'En.2 produit des connexions excitatrices monosynaptiques avec les neurones B63/B30/B65 tandis

que des voies polysynaptiques sont responsables des émissions successives de patterns moteurs.

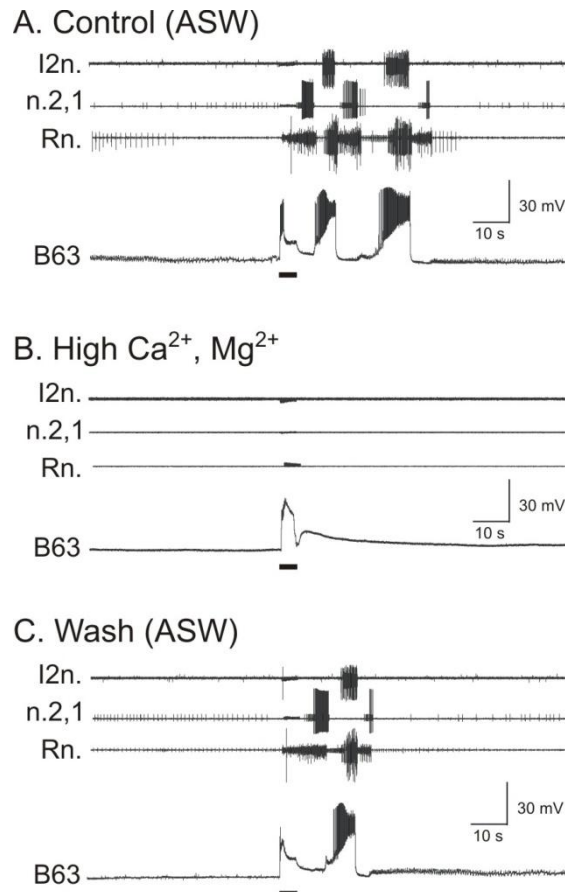


Figure 24. Influence monosynaptique des nerfs sensoriels œsophagiens sur les neurones B63.

(A) En condition Contrôle (ASW), un train de stimulations électriques (10 Hz, 5 s [barre horizontale]) appliqué sur En.2 induit une dépolarisation du potentiel intracellulaire de B63 (enregistrement intracellulaire du bas) supportant sa décharge en bouffées répétées de PA. L'activité de B63 est associée à la genèse de PMR (tracés extracellulaires du dessus). (B) La même préparation qu'en A est maintenant baignée dans une solution ionique enrichie en ions divalents Ca^{2+} et Mg^{2+} (Hi Div) réduisant l'excitabilité neuronale et bloquant ainsi la transmission polysynaptique. Une stimulation des nerfs En.2 identique à celle précédemment réalisée en ASW, induit de nouveau une dépolarisation de B63, mais n'induit plus de bouffées répétées de PA associées à une genèse de PMR. (C) Suite à un rinçage de la solution d'ASW enrichie en ions divalents par une solution Contrôle d'ASW, l'effet cellulaire et moteur de la stimulation d'En.2 est restauré.

Des études histochimiques indiquent que les afférences En.2 contiennent de la DA ainsi que l'enzyme responsable de la biosynthèse de ce neurotransmetteur, la tyrosine hydroxylase. (Kabotyanski et al., 1998; Martinez-Rubio et al., 2009). En outre, les antagonistes des récepteurs dopaminergiques bloquent les effets postsynaptiques induits par les stimulations électriques des afférences En.2 (Nargeot et al., 1999c; Reyes et al., 2005). Pour ces raisons, nous avons cherché à déterminer si les réponses monosynaptiques dépolarisantes des neurones B63/B30/B65, induites par la stimulation d'En.2, dépendent de l'activation de récepteurs dopaminergiques. Pour cela, nous avons enregistré les réponses monosynaptiques des neurones B63/B30/B65 en Hi Div contenant un antagoniste dopaminergique. Cet antagoniste, le Flupenthixol, bloque les récepteurs dopaminergiques de type D1 chez l'aplysie (Barbas et al., 2006). En présence de Flupenthixol, l'amplitude des réponses dépolarisantes monosynaptiques des neurones B63/B30/B65 est réduite voire abolie (Figure 25A,B; voir également Bédécarrats et al., 2013, Figure supplémentaire 1C en Annexes). Cet effet inhibiteur est partiellement éliminé après rinçage avec du Hi Div sans drogue (Figure 25C). En outre, comme indiqué dans la relation dose-inhibition de la réponse de B63 l'amplitude de la réponse décroît à mesure que la concentration d'antagoniste augmente (Figure 25D). La concentration inhibitrice médiane, ou IC₅₀ est d'environ 10⁻⁵M. En outre, 10⁻⁴M de l'antagoniste sont nécessaires pour abolir complètement la réponse de B63. Ces valeurs sont similaires à celles précédemment reportées comme bloquant les récepteurs de type D1 clonés chez l'aplysie (Barbas et al., 2006) ainsi que chez les insectes (Mustard et al., 2005).

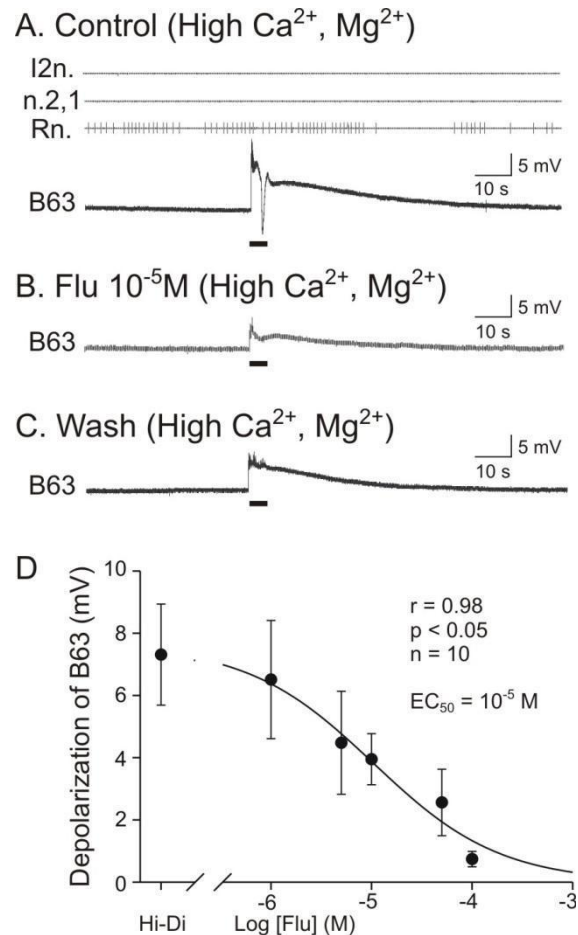


Figure 25. Le blocage pharmacologique des récepteurs dopaminergiques supprime la dépolarisation de B63 évoquée monosynaptiquement par En.2.

(A-C) La dépolarisation résultant de l'effet monosynaptique de la stimulation d'En.2 (10 Hz, 5 s) enregistrée dans une solution enrichie en ions divalents (A) est réduite par l'ajout de 10^{-5}M de Flupentixol (B). Une récupération de la réponse neuronale monosynaptique de B63 est mise en évidence après l'élimination du Flupentixol par un rinçage effectué avec la solution enrichie en ions divalents (Hi Div). (D) Relation dose-inhibition de l'effet du Flupentixol sur la dépolarisation de B63 induite par la stimulation d'En.2 (10 Hz, 5 s). La médiane de l'amplitude des réponses monosynaptiques dépolarisantes est atteinte par une dose (IC_{50}) de l'antagoniste dopaminergique de 10^{-5}M ; ces réponses sont totalement bloquées avec une concentration de 10^{-4}M d'antagoniste.

Nous avons ensuite testé les conséquences de l'application de Flupenthixol sur les propriétés fonctionnelles du CPG. Lors d'une stimulation tonique des nerfs n.2,3 (2Hz, 8V) qui mime *in vitro* l'effet du stimulus incitatif *in vivo*, nous avons montré que la genèse des patterns moteurs radulaires tend à augmenter avec la concentration en antagoniste (Figure 26A-C). La courbe dose-excitation de l'effet du Flupenthixol sur la fréquence des patterns moteurs indique une concentration excitatrice médiane, ou EC50, d'environ 10^{-5} M (Figure 26D). Cependant, cet effet facilitateur du Flupenthixol n'est statistiquement significatif que pour des concentrations supérieures à 10^{-5} M. ($\chi^2 = 12,646$, $p < 0,025$; $5 \cdot 10^{-5}$ M Flupenthixol vs. ASW, $Q = 3,5$, $p < 0,05$; pour toutes les autres concentrations: Flupenthixol vs. ASW, $Q \leq 2,1$). Ainsi, à des concentrations de Flupenthixol inférieures ou égales à 10^{-5} M, il est possible de bloquer efficacement les synapses dopaminergiques monosynaptiques de l'afférence œsophagienne sur le CPG, sans altérer les propriétés fonctionnelles propres à ce réseau ou la capacité des afférences n.2,3 à exciter ce réseau. Nous avons mis à profit cette situation pour analyser le rôle de l'afférence dopaminergique œsophagienne dans l'induction de la plasticité cellulaire et motrice observée après conditionnement opérant.

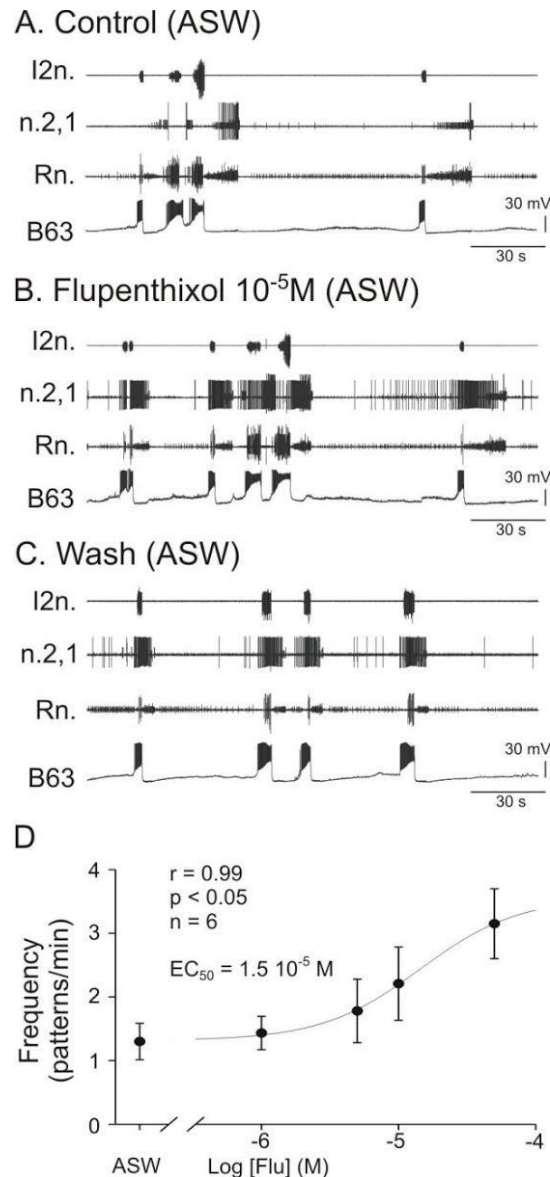


Figure 26. Le Flupenthixol ne bloque pas la genèse motrice incitée par la stimulation incitative des nerfs 2,3.

(A) Enregistrements simultanés des nerfs moteurs radulaires (traces du dessus) et du potentiel d'un neurone B63 (trace du bas) réalisés pendant la stimulation bilatérale des nerfs n.2,3 en ASW. (B) En présence de Flupenthixol (10^{-5} M) la fréquence des émissions motrices incitées par la stimulation des n.2,3 subit une légère augmentation. (C) La même préparation après retour à une condition Contrôle. (D) Courbe dose-excitation de l'effet du Flupenthixol sur la fréquence des patterns moteurs incités par la stimulation n.2,3. L' EC_{50} est atteinte à 10^{-5} M.

II.2. Une libération contingente de dopamine induit une plasticité d'expression du pattern moteur radulaire.

Pour analyser l'implication de la dopamine dans l'induction des modifications motrice et cellulaire, nous avons reproduit sur les ganglions buccaux *in vitro* l'équivalent de l'apprentissage opérant. Dans cet analogue du conditionnement, la stimulation tonique des nerfs 2,3 bilatéraux (n.2,3; 2Hz, 8V) est utilisée pour reproduire l'effet du stimulus incitatif *in vivo*. La stimulation phasique des nerfs œsophagiens bilatéraux (En.2; 10Hz, 8V, 5s) est utilisée pour mimer *in vitro* l'activation de ces afférences dopaminergiques par l'obtention de la récompense alimentaire. Trois groupes de ganglions buccaux ont été constitués ; tous sont soumis à la stimulation tonique des afférences n.2,3. En plus de ce stimulus, dans un premier groupe Contingent, la stimulation électrique d'En.2 est déclenchée à chaque émission d'un PMR (lors de la phase de rétraction), reproduisant ainsi l'association contingente « action-récompense » qui caractérise l'apprentissage opérant. L'importance de cette association est mise en évidence par comparaison avec un second groupe, Non-contingent, chez lequel la même stimulation d'En.2 a été produite en même nombre mais de façon rythmique et donc indépendamment de l'activité motrice. Dans un troisième groupe, la stimulation contingente d'En.2 a été réalisée en présence de l'inhibiteur des récepteurs dopaminergiques (Flupenthixol) à une concentration de 10^{-5} M pour tester l'implication des récepteurs dopaminergiques dans l'induction des modifications motrices et cellulaires.

Les expériences ont été divisées en quatre périodes : pendant une phase de Pré-test de 30 minutes, l'activité motrice générée par les préparations isolées a été enregistrée et a servi à s'assurer que les trois groupes de préparations étaient dans un état fonctionnel comparable avant la phase de conditionnement (Figure 27A). Lors de la phase de conditionnement qui a suivi, le nerf En.2 était stimulé au cours d'une période 30 minutes en association (groupes Contingents) ou non (groupe Non-contingent) avec l'émission des PMR (Figure 27B). Lors d'une phase test terminale, 45 min après le conditionnement, les activités motrices et cellulaires ont été quantifiées. La durée maximale entre la fin du conditionnement à la fin des tests a été fixée à 4h afin de reproduire les conditions expérimentales utilisées lors de l'analyse de l'apprentissage *in vivo* (Nargeot et al., 2009; Sieling et al., 2014).

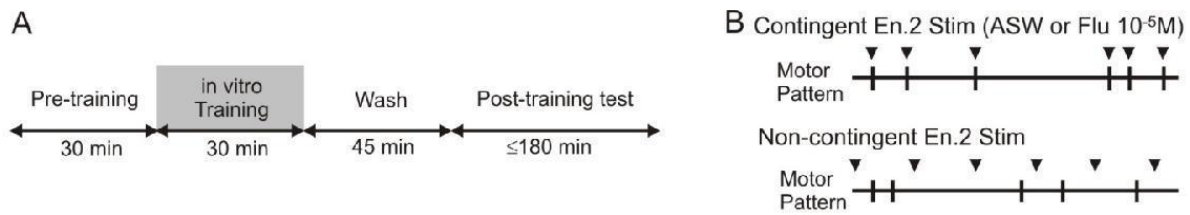


Figure 27. Analogue *in vitro* du conditionnement opérant.

(A) Protocole expérimental de l'apprentissage associatif *in vitro*. Chaque expérience était divisée en quatre périodes successives. Lors d'une phase de pré-entraînement les PMR étaient enregistrés. Les préparations étaient ensuite perfusées avec de l'ASW contenant du Flupenthixol (10^{-5} M) ou de l'ASW seule (B). Un entraînement différent selon les groupes de préparations était ensuite réalisé. Suite à un rinçage avec de l'ASW, les plasticités cellulaires et motrices étaient testées lors d'une phase finale. (B) Pendant la phase d'entraînement, les préparations *in vitro* ont été réparties en trois groupes : dans les groupes contingents (tracés du haut) exposés respectivement à de l'ASW Contrôle pour le groupe Contingent, ou à de l'ASW contenant du Flupenthixol pour le groupe Contingent + Flupenthixol, une stimulation phasique (10 Hz, 5 sec) des nerfs En.2 (têtes de flèches) était associée de façon contingente à chaque émission spontanée d'un PMR (barres verticales). Dans un troisième groupe Non-contingent (trace du bas), un nombre équivalent de stimulation était réalisé, mais cette fois-ci à intervalle de temps constant et donc sans relation prédictible avec l'émission des PMR.

Avant l'entraînement (Pré-test) la fréquence des PMR générés par les ganglions buccaux était similaire dans les trois groupes de préparations (Non-Contingent $0,56 \pm 0,17$ patterns/min; Contingent, $0,92 \pm 0,27$; Contingent + Flupenthixol, $0,93 \pm 0,25$; $H = 0,618$). En revanche, après entraînement (Post-test), cette fréquence (et celle des bouffées de PA de B63) diffère selon les trois groupes ($H = 6,772$, $p < 0,05$) (Figure 28A-D). Elle est significativement plus élevée dans le groupe Contingent que dans le groupe Non-contingent ($q = 3,320$, $p < 0,05$) ou Contingent + Flupenthixol ($q = 4,515$, $P < 0,005$) et est similaire dans ces deux derniers groupes ($q = 0,435$) (Figure 28D).

La stimulation contingente d'En.2 produit également la régularité temporelle d'émissions des PMR et des bouffées de PA de B63. Tandis que les préparations non-contingentes génèrent des PMR à intervalles irréguliers sans relation prédictible d'un pattern à l'autre, les préparations contingentes génèrent des PMR ainsi que des bouffées de PA de B63 se répétant de façon stéréotypée selon un mode rythmique (Figure 28E,F). Encore une fois, cette régularisation de l'activité du CPG buccal dépend de l'activation des récepteurs dopaminergiques, comme l'atteste l'irrégularité

des patterns et de l'activité de B63 dans les préparations du groupe Contingent + Flupenthixol (Figure 28G). Ces observations sont confirmées par la comparaison entre les groupes du coefficient de variation mesuré sur 100 intervalles inter-patterns successifs (Figure 28H).

L'ensemble de ces données indique (1) que la stimulation contingente des fibres afférentes En.2 est suffisante pour reproduire *in vitro* l'accélération et la régularisation durable de la genèse des patterns moteurs radulaires que l'on observe après apprentissage *in vivo* ; (2) que l'induction de ces plasticités motrices et cellulaires dépend de façon critique de l'activation des récepteurs dopaminergiques suite à la stimulation contingente d'En.2. Ainsi ces résultats confortent l'hypothèse selon laquelle l'afférence œsophagienne par la libération de DA joue un rôle essentiel dans le processus de récompense nécessaire à l'apprentissage opérant.

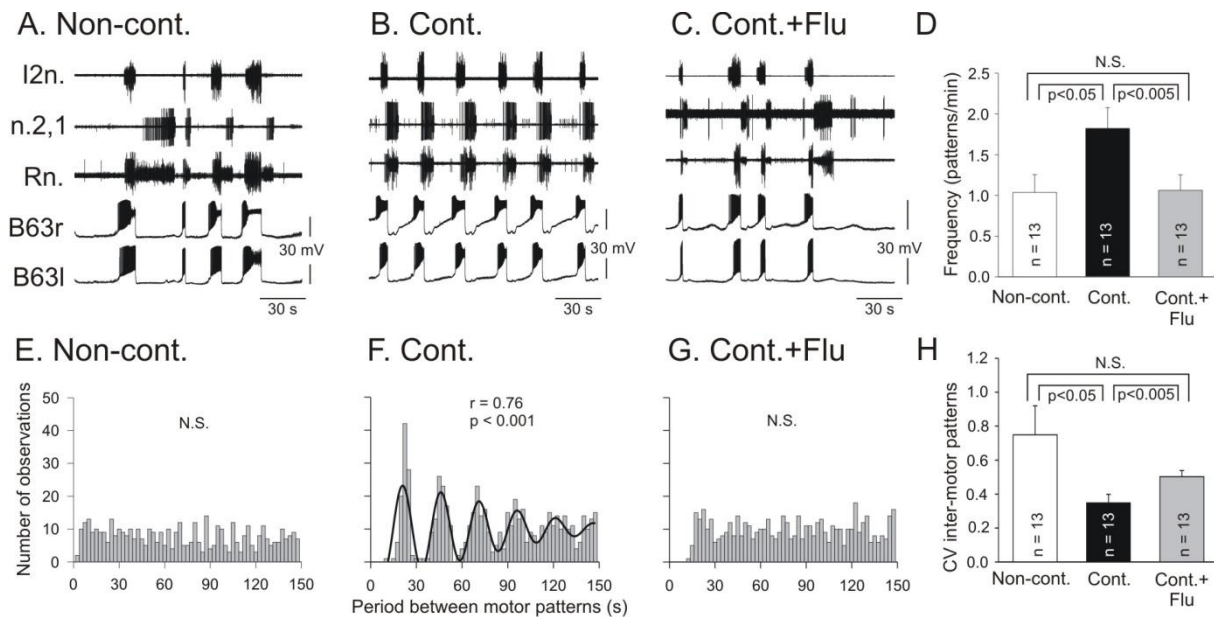


Figure 28. Le blocage des récepteurs dopaminergiques empêche la mise en place d'une plasticité motrice induite par un analogue *in vitro* du conditionnement opérant.

(A-C) Enregistrements représentatifs des émissions de PMR et de l'activité simultanée des neurones B63 pendant la stimulation tonique des nerfs n.2,3 au cours de la phase de test pour les trois groupes ; Non-contingents (Non-cont.) (A), Contingents (Cont.) (B) et Contingents + Flupentixol (Cont. + Flu) (C). Dans le groupe Contingent la fréquence et la régularité des PMR sont augmentées par rapport à la genèse motrice des préparations Cont. + Flu, ou Non-Cont. (D) Comparaison de la fréquence des PMR pendant la phase de tests post-entraînement dans les trois groupes de préparations. La fréquence moyenne des PMR est plus élevée dans le groupe Contingent que dans les groupes Non-cont. et Cont. + Flu. Ces deux derniers groupes ne sont pas significativement différents (E-G). Analyse par autocorrélation de 100 PMR successifs après entraînement *in vitro*. Dans une préparation Contingente (F), les PMR sont exprimés rythmiquement, comme l'indique la significativité de la courbe d'ajustement sinusoïdale. En revanche, les PMR des préparations Non-Cont. et Cont. + Flu (E,G) sont répartis aléatoirement dans le temps. (H) Comparaison des coefficients de variations moyens des intervalles inter-PMR dans les trois groupes. La moyenne des C.V. est significativement moins élevée dans le groupe Cont. que dans les groupes de préparations Non-cont. et Cont. + Flu. Ces deux derniers groupes ne sont pas significativement différents.

II.3. La libération contingente de DA induit une plasticité des propriétés membranaires intrinsèques de B63.

Le conditionnement opérant modifie l'excitabilité et les propriétés oscillatoires des neurones décideurs (Nargeot et al., 2009). Nous avons déterminé si la libération de DA par stimulation contingente de l'afférence En.2 *in vitro* peut induire cette plasticité. L'excitabilité de B63 a été testée par l'injection de brefs (1 s) pulses de courants d'intensité croissante dans une cellule enregistrée et maintenue à un potentiel initial de -70mV. L'excitabilité, ainsi évaluée par le seuil de déclenchement de PA, diffère selon les groupes de préparations ($H = 8,437$, $p < 0,025$) (Figure 29A-C). Le seuil d'excitabilité est significativement plus bas dans le groupe Contingent que dans le groupe Non-contingent ou Contingent + Flupenthixol ($q = 3,965$, $p < 0,01$; $q = 4,011$, $p < 0,025$) (Figure 29D). La différence entre ces deux derniers groupes n'est pas significative ($q = 1,998$). La stimulation contingente de l'afférence contenant des fibres dopaminergiques reproduit l'accroissement d'excitabilité de B63 observé suite au conditionnement opérant.

La stimulation contingente d'En.2 modifie également durablement les propriétés oscillatoires des neurones B63. Pour mettre en évidence ces propriétés intrinsèques, le neurone doit être isolé fonctionnellement de ses partenaires du réseau. Pour cela, le neurone décideur B63 controlatéral qui lui est couplé électriquement est maintenu hyperpolarisé par un courant constant négatif (Figure 30A-C). Dans cette condition, l'activité du CPG buccal ne peut plus être induite, même lorsque le neurone d'intérêt est dépolarisé par l'injection intrasomatique d'un courant continu pour révéler ses propriétés oscillatoires intrinsèques (Nargeot et al., 2009). La fréquence d'émissions des bouffées de PA du neurone B63, ainsi isolé et dépolarisé, est significativement plus élevée dans le groupe Contingent que dans les groupes Non-contingent ($q = 3,403$, $p < 0,05$) ou Contingent + Flupenthixol ($q = 4,303$, $p < 0,005$) (Figure 30D). Ces deux derniers groupes ne sont pas significativement différents ($q = 0,736$, $H = 6,799$, $p < 0,05$). Ainsi l'antagoniste dopaminergique empêche l'augmentation de fréquence des oscillations endogènes de B63 due à la stimulation contingente d'En.2.

La répartition temporelle des bouffées de PA de B63 diffère également entre les trois groupes expérimentaux et ceci de façon dépendante de la modulation

dopaminergique consécutive à l'activation contingente des fibres En.2. Chez les préparations Non-contingentes, les neurones B63 fonctionnellement isolés et constamment dépolarisés expriment une décharge en bouffées avec des intervalles hautement variables (Figure 30A,E). Ces propriétés oscillatoires irrégulières correspondent à l'expression de la motricité générée par les CPG buccaux des préparations Contrôles (voir Figure 28A,E). Au contraire, dans les ganglions Contingents, la décharge de B63 en réponse à un même niveau de courant dépolarisant est générée à intervalles constants (Figure 30B,F). Ici également ces propriétés oscillatoires régulières reflètent la motricité rythmique du réseau buccal des préparations conditionnées (voir Figure 28B,F). Cette régularité de l'activité oscillatoire endogène de B63 est une conséquence spécifique de la libération contingente de DA par l'afférence En.2. En effet, elle est bloquée en présence de Flupenthixol dans groupe Contingent + Flupenthixol, dont l'activité erratique est comparable à celle du groupe Non-contingent (Figure 30C,G). Ces constatations sont confirmées par la comparaison statistique des coefficients de variations des intervalles inter-bouffées entre les trois groupes de préparations ($H = 6,659$, $p < 0,05$; Figure 30H). Les C.V. sont plus petits dans le groupe Contingent que dans les groupes Non-contingent ou Contingent + Flupenthixol ($q = 3,441$, $p < 0,05$; $q = 4,076$, $p < 0,01$) et ne sont pas significativement différents entre ces deux derniers groupes ($q = 1,019$).

Ces résultats indiquent que la libération contingente de DA induite par la stimulation d'En.2 *in vitro*, de manière équivalente à l'apprentissage *in vivo*, est capable de modifier les propriétés membranaires intrinsèques des neurones B63.

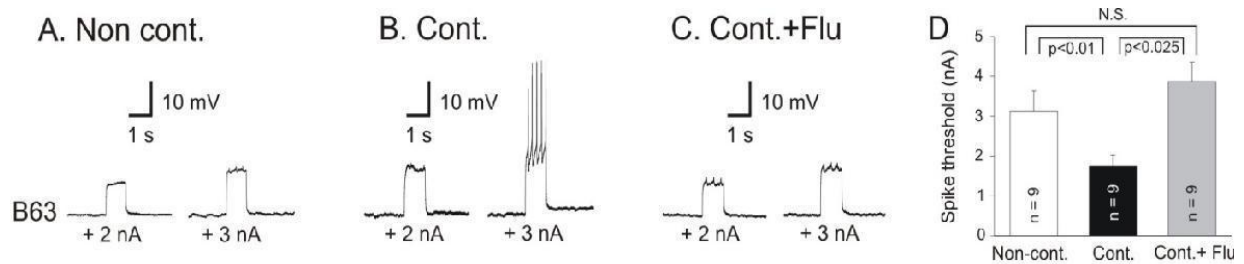


Figure 29. Le Flupenthixol bloque la plasticité des propriétés membranaires induite par le conditionnement opérant *in vitro*.

(A-C) Enregistrements intracellulaires des neurones B63 dans des préparations issues des groupes Non-Contingent (A), Contingent (B) et Contingent + Flupenthixol (C), pendant l'injection de courants dépolarisants d'1s, d'intensité croissante dans des cellules maintenues initialement à un potentiel de -70 mV. Une intensité de courant moindre est requise pour atteindre le seuil de déclenchement des PA dans un neurone B63 d'une préparation Cont., ce qui révèle une augmentation de l'excitabilité cellulaire. (D) Comparaison du seuil de déclenchement des PA de B63 entre les trois groupes. La valeur moyenne du seuil des PA est significativement réduite dans les cellules B63 issues des groupes Cont. par rapport à la valeur moyenne du seuil de déclenchement des PA dans les groupes Non-Cont. et Cont. + Flu. Ces deux derniers groupes ne présentent pas de différence significative pour ce paramètre.

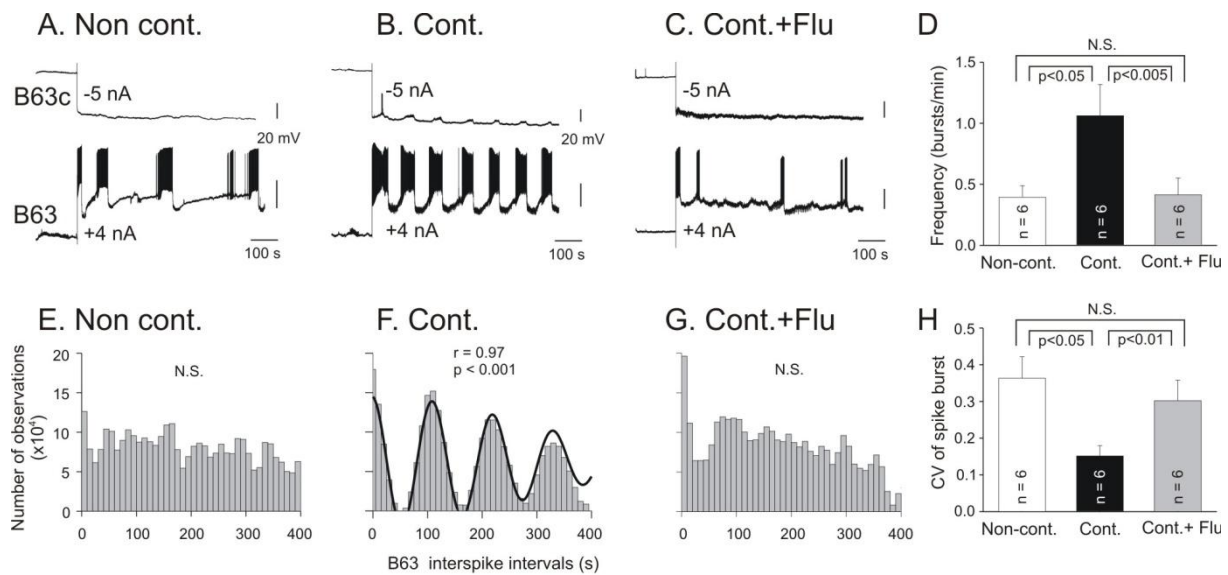


Figure 30. Le blocage des récepteurs dopaminergiques empêche la mise en place de propriétés oscillatoires rythmiques du potentiel de membrane.

(A-C). Mise en évidence des propriétés oscillatoires intrinsèques de B63 issus respectivement d'une préparation Non-contingente (A), Contingente (B), et Contingente + Flupenthixol (C). Dans chaque groupe, les B63 sont isolés fonctionnellement des autres neurones du CPG par l'hyperpolarisation continue du neurone B63 controlatéral (B63c traces du haut). De façon concomitante, les propriétés oscillatoires sont testées par l'injection intracellulaire d'un courant dépolarisant. Les B63 isolés des groupes Non-cont. et Cont. + Flu. génèrent ainsi des bouffées lentes et irrégulières de PA. En revanche, les bouffées de PA émises par un B63 du groupe Contingent sont plus fréquentes et régulières. (D) La fréquence moyenne des bouffées est plus élevée dans le groupe Cont. que dans les groupes Non-Cont. ou Cont. + Flu. Ces deux derniers groupes ne sont pas significativement différents entre eux. (E-G). Analyses par autocorrelations de 2000 PA successifs dans les B63. Dans le groupe Cont., les bouffées de PA d'un B63 isolé sont organisées de façon rythmique, comme l'indique la significativité de la courbe d'ajustement. En revanche, les intervalles temporels sont irréguliers dans les groupes Non-cont et Cont.+ Flu. (H) Comparaison entre les groupes du C.V. des intervalles entre les bouffées de B63. La moyenne des C.V. est significativement moins élevée dans le groupe Cont. que dans les groupes Non-cont. et Cont. + Flu. Ces deux derniers groupes ne sont pas significativement différents.

II.4. Une libération contingente de DA augmente le couplage électrique entre les neurones B63.

L'apprentissage opérant augmente la force des couplages électriques entre les neurones décideurs (Nargeot et al., 2009). Pour déterminer l'implication de la DA libérée par En.2 dans cette plasticité synaptique, le coefficient de couplage des neurones B63 droit et gauche a été comparé dans les trois groupes de préparations *in vitro* (Figure 31A-C). Pour cela, les cellules sont maintenues à un potentiel initial de -70 mV et un bref pulse (2 s) de courant hyperpolarisant (-10 nA) est injecté dans un neurone défini expérimentalement comme présynaptique. Les réponses hyperpolarisantes pré- et post-synaptiques évoquées par l'injection de courant sont mesurées. A partir de ces données, le coefficient de couplage des neurones est calculé par le rapport de la réponse postsynaptique sur la réponse présynaptique. Les résultats montrent que le coefficient de couplage entre paires de neurones B63 diffère selon les groupes de préparations (Figure 31D) ($H = 7,599$, $p < 0,025$). Il est supérieur chez le groupe Contingent comparativement au groupe Non-contingents ou Contingent + Flupenthixol ($q = 3,552$, $p < 0,025$; $q = 3,863$, $p < 0,025$, respectivement). En revanche il n'est pas significativement différent chez ces deux derniers groupes ($q = 2,205$). Des résultats similaires ont été obtenus pour les paires neuronales constituées par B63 et les autres neurones décideurs (voir Bédécarrats et al., 2013, Figure supplémentaire 2 en Annexes).

Ces résultats montrent que (1) la stimulation d'En.2 augmente durablement la force du couplage électrique entre les neurones décideurs lorsqu'elle a été associée à l'émission des patterns moteurs qui reproduit l'association contingente du conditionnement opérant ; (2) que cette plasticité dépend de la libération de DA puisque son induction est bloquée par la présence d'un antagoniste des récepteurs à la DA.

L'augmentation du couplage électrique peut être due indirectement à un changement de la résistance d'entrée des neurones et/ou à une modification spécifique de la résistance de jonction entre les cellules. Nous savons grâce au travail mené dans le chapitre précédent que l'apprentissage module à la fois les conductances (et par conséquent les résistances) membranaires et synaptiques. La procédure expérimentale utilisée permet d'évaluer la résistance membranaire dans

les différentes conditions expérimentales. Cette étude confirme que la résistance membranaire des neurones B63 est significativement différente entre les trois groupes (Figure 31E ; $H = 6,083$, $p < 0,05$). Elle est plus élevée dans le groupe Contingent que dans le groupe Non-contingent ou Contingent + Flupenthixol ($q = 2,891$, $p < 0,05$; $q = 3,48$, $p < 0,05$ respectivement). Elle n'est pas significativement différente entre les groupes Non-contingents et Contingents + Flupenthixol ($q = 2,286$). Ainsi, la stimulation contingente de En.2 et l'activation consécutive de récepteurs à la DA induisent au moins une augmentation de résistance membranaire qui est cohérente avec les modifications des propriétés membranaires décrites précédemment. En revanche, l'état actuel de nos données ne nous permet pas de déterminer l'effet de cette stimulation et de la libération contingente de DA sur la résistance de jonction des neurones. Quoiqu'il en soit, nos résultats montrent que la libération contingente de DA par stimulation des afférences œsophagiennes reproduit la modulation des couplages intercellulaires observée après apprentissage *in vivo*. Cette modulation est due, au moins en partie, à une modulation de la résistance membranaire.

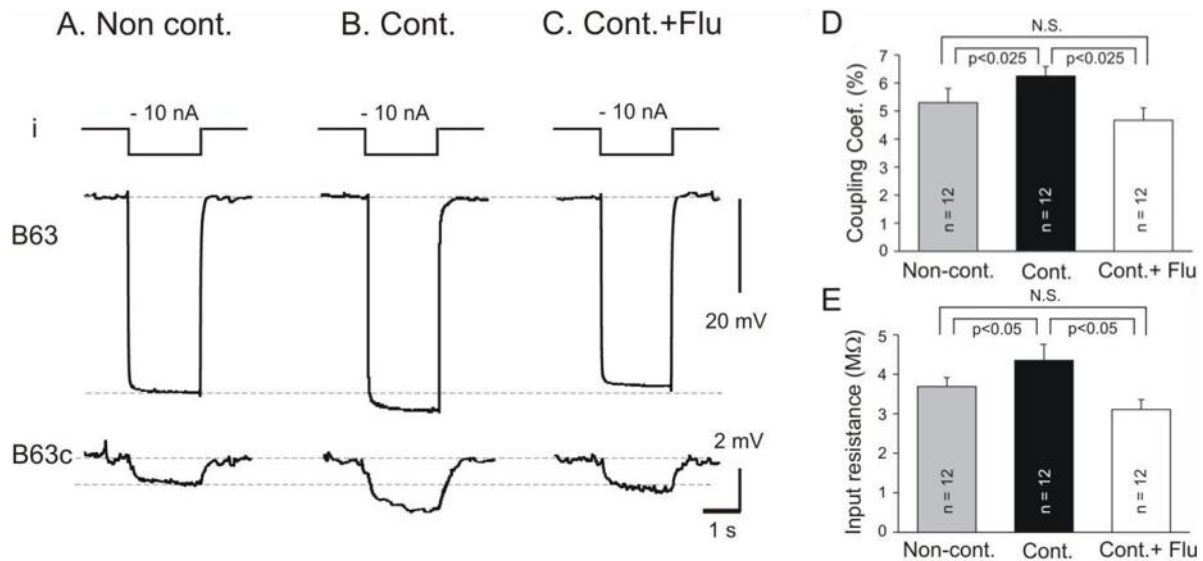


Figure 31. Le Flupenthixol bloque l'augmentation de couplage électrique induite par le conditionnement opérant *in vitro*.

(A-C) Enregistrements simultanés des neurones B63 droits et gauches pendant l'injection d'un pulse constant de courant hyperpolarisant dans une des cellules (-10 nA pendant 2 s, trace de courant du bas). Chaque panneau correspond à un des trois groupes de préparation; Non-contingent (A), Contingent (B) et Contingent + Flupenthixol. L'injection de courant révèle une augmentation concomitante de la résistance d'entrée ainsi que du couplage électrique (traits pointillés du bas) avec la cellule partenaire dans la préparation Cont. par rapport aux préparations Non-cont. ou Cont. + Flu. Dans chaque cas les deux neurones étaient maintenus initialement à un potentiel de membrane de -70 mV (lignes pointillées du haut dans B63 et B63c). (D,E) Comparaisons intergroupes du coefficient de couplage (D) et de la résistance d'entrée (E). Ces deux paramètres sont significativement plus élevés dans le groupe Contingent que dans le groupe Non-contingent ou Contingent + Flupenthixol. Ces deux derniers groupes ne présentent pas de différences significatives.

III. Discussion

Les résultats de cette étude suggèrent le rôle critique joué par la DA comme médiateur de la plasticité cellulaire et motrice résultant de l'apprentissage opérant. Comme nous l'avons rappelé, la récompense alimentaire utilisée dans l'apprentissage *in vivo* active les afférences œsophagiennes qui contiennent un grand nombre d'axones riches en dopamine (Schwartz & Susswein 1986; Lechner et al, 2000; Kabotyansky et al., 1998; Brembs et al, 2002). Grâce à l'utilisation d'un analogue *in vitro* du conditionnement opérant et à l'utilisation d'un antagoniste des récepteurs à la DA, nous mettons en évidence que la stimulation de ces afférences dopaminergiques, qui mime l'activité électrique induite par la récompense, reproduit les caractéristiques essentielles de la plasticité associée au conditionnement opérant. La dopamine apparaît ainsi être essentielle dans le processus de récompense. Ceci est en accord avec la constatation que l'implication de la DA dans les systèmes de récompense nécessaires aux apprentissages associatifs est conservée dans une grande partie du phylum animal, en allant des invertébrés aux vertébrés supérieurs (Wise, 2006; Barron et al., 2010). Ces résultats, cependant, n'excluent pas que de nombreuses autres afférences sensorielles et/ou d'autres neurotransmetteurs puissent également contribuer à induire la plasticité des propriétés cellulaires et motrices lors de l'apprentissage.

Un second résultat important de notre étude est la mise en évidence d'une modulation dopaminergique qui dépend de sa contingence avec l'activité du réseau générateur des patterns moteurs. Ce phénomène n'est pas sans rappeler la modulation activité-dépendante des propriétés membranaires et synaptiques qui a été initialement mise en évidence dans le conditionnement pavlovien du réflexe de retrait de la branchie chez l'aplysie (Hawkins et al., 1983; Walters & Byrne, 1983) et à son analogue dans la potentialisation à long terme de la transmission glutamatergique initialement décrite chez les rongeurs (Cotman & Monaghan, 1988). Dans ces deux phénomènes, l'effet modulateur d'un transmetteur, la sérotonine chez l'aplysie, le glutamate chez le rongeur, est conditionné par l'activité électrique de la cellule ou la synapse cible. Cet effet modulateur est considérablement atténué ou est impossible en l'absence d'activité cellulaire post-synaptique concomitante (Scharfman & Sarvey, 1985). On notera qu'une telle modulation activité-dépendante

impliquant la DA a déjà été décrite sur les neurones buccaux en culture chez l'aplysie (Brembs et al., 2002; Lorenzetti et al., 2008). L'activité électrique du neurone cible est requise pour induire une entrée de calcium dans la cellule qui par voie métabolique amplifie la cascade de seconds messagers (AMPC, PKA) produits par l'activation du récepteur dopaminergique D1.

Le rôle de la DA dans la modulation des propriétés membranaires intrinsèques des neurones a été décrit dans diverses situations. La DA peut induire un mécanisme oscillatoire endogène dans des neurones initialement silencieux (Kadiri et al., 2011). Elle est également modulatrice de la fréquence d'oscillation de neurones oscillateurs endogènes (Flamm & Harris-Warrick, 1986b). Elle peut augmenter l'excitabilité cellulaire (Brembs et al., 2002). Cette capacité de la signalisation dopaminergique à exercer différents effets cellulaires peut être attribuée (1) à la diversité des récepteurs dopaminergiques (Missale et al., 1998; Mustard et al., 2005); (2) à la variété des différents courants cibles de la modulation (Harris-Warrick & Flamm 1987; Barnes et al., 1994; Schiffman et al., 1995; Surmeier et al., 1995; Kloppenburg et al., 1999; Johnson et al., 2003; Ballo et al., 2010) et finalement (3) à la nature des interactions entre les cascades de seconds messagers qui sous-tendent l'action de ce transmetteur au niveau intracellulaire. On notera que notre étude révèle un nouvel effet de la dopamine sur les propriétés membranaires : la régularisation de la période d'oscillation d'un neurone pacemaker endogène irrégulier. Bien que la capacité de la DA à transformer une activité en bouffées de potentiels d'action irréguliers en une activité rythmique régulière de neurones au sein du CPG buccal (Serrano & Miller 2006) soit connue, nos résultats étendent ces observations à une cellule isolée fonctionnellement du réseau. Il apparaît ainsi que cette capacité régulatrice de la DA dépend au moins en partie de la modulation des propriétés membranaires endogènes du neurone.

En plus de modifier les propriétés membranaires, la DA est également capable de moduler la connectivité entre les neurones (voir Surmeier et al., 2011). Cette modulation concerne les synapses chimiques et électriques aussi bien chez les vertébrés que chez les invertébrés (Lasater & Dowling 1985; Pereda et al., 1992; Johnson et al., 1993; Johnson & Harris-Warrick 1997; Bloomfield & Völgy 2009). Plusieurs études indiquent également que la DA peut être impliquée directement

dans la modulation des jonctions communicantes (Harsayani & Mangel 1992; Johnson et al 1993; Ribelayga et al., 2008; Hu et al., 2010). Ainsi, dans le réseau buccal de l'aplysie il a été montré que l'application exogène de dopamine peut augmenter ou diminuer la force des synapses chimiques (Kabotyanski et al., 2000). Nos résultats étendent cette connaissance en montrant l'implication de la DA dans la modulation de la force du couplage électrique entre neurones. Il reste néanmoins à déterminer si cette action résulte uniquement de son effet modulateur de la résistance d'entrée neuronale, ou si elle met également en jeu une modulation supplémentaire des canaux de jonction formant les synapses électriques. Dans le chapitre précédent, nous avons montré que l'apprentissage opérant *in vivo* module ces jonctions synaptiques et ainsi contribue à l'expression rythmique et régulière de l'activité motrice. Il est donc probable que la DA puisse moduler les synapses électriques entre les neurones décideurs et que ce mécanisme contribue à la genèse de la motrice régulière observée après apprentissage.

Chapitre 3

Mécanismes cellulaires supportant la variabilité des émissions motrices du comportement alimentaire

I. Introduction

Dans les travaux précédents, nous nous sommes attachés à analyser la plasticité neuronale qui transforme l'irrégularité de l'émission d'un comportement naïf en une motricité rythmique, régulière et fréquente, telle qu'on l'observe dans les comportements compulsifs. Ces études nous ont permis de comprendre la genèse d'une motricité rythmique. En revanche, les mécanismes neuronaux élémentaires qui permettent l'émission d'une motricité spontanée et irrégulière restent largement méconnus. La variabilité motrice revêt une importance fondamentale dans la genèse des comportements motivés. Elle traduit l'élaboration de stratégies motrices variées et d'émissions imprévisibles des patterns d'actions qui sont nécessaires à l'exploration de l'environnement. En plus de ce rôle exploratoire, des études récentes chez l'homme indiquent que la variabilité dans l'expression des mouvements émis en vue d'accomplir une tâche motivée est déterminante pour l'apprentissage (Wu et al., 2014).

Les processus qui déterminent la variabilité motrice dépendent en partie des systèmes sensoriels. Cependant, l'organisation et les propriétés dynamiques complexes d'ensembles de neurones centraux sont également fondamentales. Ainsi, des études menées chez les oiseaux indiquent que la variabilité des performances motrices et les apprentissages moteurs sont altérés par l'inactivation d'une structure centrale des ganglions de la base « le noyau magnocellulaire latéral du néostriatum » (Kao et al., 2005; Charlesworth et al., 2012). Cependant, les mécanismes cellulaires élémentaires qui, au sein des réseaux centraux déterminent la variabilité de l'action, restent largement inconnus.

Il est établi que le fonctionnement des réseaux de neurones résulte de l'interaction entre les propriétés neuronales intrinsèques d'une part et les propriétés des connexions synaptiques entre les éléments neuronaux d'autre part (Getting,

1989; Nusbaum & Beenhakker, 2002). Ces propriétés dépendent en partie des caractéristiques fonctionnelles des canaux ioniques membranaires et synaptiques. Des modèles mathématiques qui reproduisent la diversité des canaux ioniques au sein de neurones individuels et la diversité des interactions synaptiques au sein d'un réseau ont montré la capacité de ces ensembles à générer spontanément des activités rythmiques et à reproduire les relations de phases précises entre les différentes activités d'un pattern moteur (Prinz et al., 2004). Cependant, la plupart de ces travaux montrent que la connectivité synaptique au sein des réseaux joue essentiellement un rôle dans la régularité des activités neuronales et motrices rythmiques. Par ailleurs, la modélisation des canaux ioniques membranaires et de leurs paramètres d'activation et d'inactivation, mis en évidence par les études biologiques, ne produit que des activités oscillatoires régulières (Butera et al., 1999a). Pourtant, de nombreux neurones biologiques isolés de leurs partenaires ont des propriétés intrinsèques qui leur permettent de produire spontanément une activité électrique irrégulière (Miller & Selverston, 1982; Bal et al, 1988). Cependant, peu de données permettent de comprendre l'origine de cette irrégularité et sa contribution à l'émission d'un comportement dirigé vers un but.

Dans ce chapitre nous analysons les mécanismes ioniques qui déterminent les propriétés intrinsèques du neurone décideur B63 qui déclenche les PMR à intervalles irréguliers dans les ganglions nerveux d'animaux naïfs. Ce neurone pacemaker exerce son action grâce à des canaux ioniques qui lui permettent de produire des bouffées de PA à intervalles variables et imprévisibles (Nargeot et al., 2009). Notre étude préliminaire utilisant des techniques électrophysiologiques et pharmacologiques décrit pour la première fois les dynamiques ioniques qui sont responsables de l'impulsion électrique spontanée de ce neurone. En raison du caractère préliminaire de l'étude, les mécanismes impliqués dans l'irrégularité de cette impulsion ne seront pas analysés en détail. Néanmoins, sur la base de nos observations, je soulèverai les hypothèses que nous pouvons émettre quant à leur nature.

II. Résultats

II.1. Activité oscillatoire spontanée des neurones B63

Les préparations de ganglions buccaux isolés d'animaux naïfs génèrent spontanément les PMR à intervalles irréguliers et à faible fréquence moyenne (Figure 32A). Pour montrer que cette capacité résulte d'une propriété intrinsèque au neurone B63 plutôt que de l'organisation synaptique du CPG, nous avons bloqué les synapses du réseau. Pour cela, les préparations nerveuses sont perfusées avec une solution ionique (ASW) appauvrie en calcium (Ca^{2+} , 3 mM) et additionnée de cobalt (Co^{2+} , 10 mM). Cet élément chimique a la propriété de bloquer les canaux calciques dépendant du voltage impliqués dans l'exocytose des neurotransmetteurs. Dans cette solution « Low Ca, Co » la sortie motrice générée spontanément par les ganglions buccaux se déstructure et confirme ainsi le blocage synaptique. Les neurones B63, ainsi isolés fonctionnellement des autres éléments du réseau, continuent d'émettre spontanément des bouffées de PA qui varient en terme de durée et d'intervalles de temps inter-bouffées (Figure 32B). Cette activité spontanée, qui n'est plus interrompue par les inhibitions provenant des neurones B64 et B52 du CPG, est associée à des variations spontanées du potentiel de membrane du neurone B63. Ces variations de potentiels peuvent produire de brèves bouffées de PA ou des potentiels de plateau de plusieurs dizaines de secondes. Ce profil d'activité spontanée et variable, produit indépendamment de toute influence synaptique chimique, résulte essentiellement des propriétés membranaires des neurones B63. On notera toutefois que l'on ne s'affranchit pas des connexions synaptiques électriques dans ces conditions expérimentales.

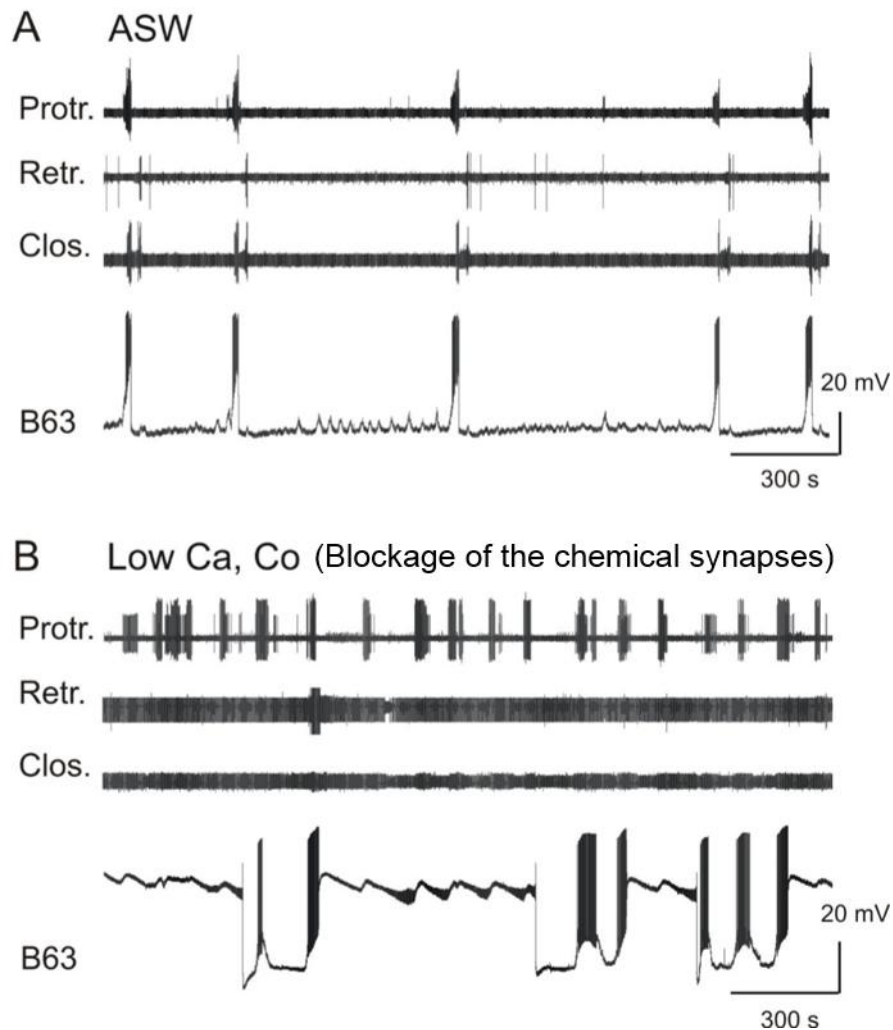


Figure 32. Activité générée par les B63 isolés synaptiquement.

(A) Enregistrement de l'activité intracellulaire spontanée d'un neurone B63 initiateur du pattern (tracé du bas). Des oscillations et des bouffées spontanées de PA sont générées à intervalle de temps irrégulier par ce neurone. (B) L'activité de B63 persiste alors que les synapses chimiques sont bloquées dans le réseau par la perfusion d'un milieu ionique « Low Ca, Co ». Des bouffées de PA sont supportées par des dépolarisations de durées variables et émises à intervalles de temps irréguliers. Les activités toniques et phasiques enregistrées sur les nerfs moteurs ne constituent pas de patterns organisés, ce qui est cohérent avec la perte des relations synaptiques entre les éléments du réseau.

II.2. Potentiel de plateau

Les potentiels de plateau résultent de la bistabilité électrique de la membrane de certains neurones qui sous l'impulsion d'un bref événement dépolarisant ou hyperpolarisant peuvent maintenir durablement et réversiblement un état dépolarisé ou hyperpolarisé (Russell & Hartline, 1978). Pour tester si le comportement électrique des neurones B63 est en partie sous-tendu par de telles propriétés de bistabilité, nous avons tenté de déclencher et d'interrompre expérimentalement les potentiels de plateau par injection intracellulaire de brefs pulses de courants dépolarisants ou hyperpolarisants. Au-delà d'un certain seuil d'intensité (+3 nA), le pulse déclenche une dépolarisation soutenue de B63 qui excède largement la durée du pulse (Figure 33A). Cette dépolarisation est associée à une décharge à haute fréquence de PA dont l'amplitude diminue rapidement, probablement en raison de l'inactivation des canaux voltage-dépendants et de la proximité du potentiel d'inversion du sodium. La dépolarisation de B63 qui persiste plusieurs dizaines de secondes finit par s'interrompre spontanément. Elle peut aussi être interrompue expérimentalement et prématurément par l'injection d'un bref pulse de courant hyperpolarisant (-4 nA) (Figure 33B). Le neurone B63 présente donc une bistabilité de son potentiel de membrane qui est en partie responsable de la décharge prolongée et à haute fréquence de ses potentiels d'action.

Nous avons analysé les flux ioniques impliqués dans le maintien de ce potentiel de plateau. Pour cela, nous avons manipulé les concentrations ioniques de l'ASW. Nous avons comparé les plateaux évoqués par un pulse de courant (+5 nA, 30 s) en condition Contrôle (Low Ca, Co) avec les réponses neuronales produites par ce même pulse dans des solutions contenant le cobalt mais privées soit du sodium (Na^+) soit du Calcium (Figure 34A-C). Dans une solution dans laquelle le Na^+ est remplacé par de la choline (Na free), le pulse de courant n'est plus en mesure de déclencher le potentiel de plateau (Figure 34B,E). La bistabilité du potentiel de B63 dépend donc de façon critique de l'ion retiré de la solution, le Na^+ . Dans une solution contenant du Na^+ mais privée cette fois-ci de l'ion Ca^{2+} , le plateau continue de s'exprimer. Toutefois, son amplitude est diminuée par rapport à la condition Contrôle (Figure 34C,E). Cette différence suggère qu'un flux de Ca^{2+} contribue partiellement au maintien de cette propriété. Or en présence de l'ion Co^{2+} ce flux de Ca^{2+} ne peut

pas être dû à des canaux calciques voltage-dépendants. En revanche, il pourrait être permis par des canaux cationiques non-spécifiques (CAN). Chez l'aplysie, de tels canaux sont sensibles au voltage et sous-tendent les propriétés de plateau de cellules neuroendocriniennes (Wilson et al., 1996). De manière générale, ce canal est bloqué par l'acide flufénamique (FFA 100 μ M). En présence de cet agent pharmacologique, l'injection d'un pulse de courant dans B63 ne déclenche plus de plateau (Figure 34D,E). Ces résultats suggèrent donc que le maintien du potentiel de plateau de B63 dépend d'un flux cationique, majoritairement sodique, qui emprunte des canaux CAN, dont l'ouverture dépend directement ou indirectement du potentiel de membrane.

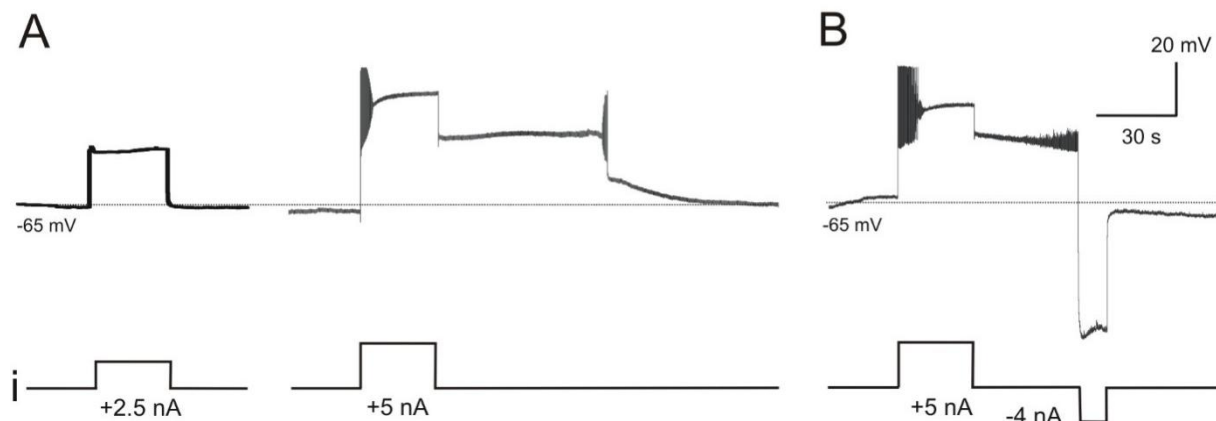


Figure 33. Bistabilité du potentiel de B63

(A) Variations du potentiel de B63, en réponse à l'injection d'un courant dépolarisant de +2,5 nA ou de +5 nA (durée 30 s). Le seuil de déclenchement d'un potentiel de plateau est atteint par un pulse de +5 nA. Le neurone se maintient à un potentiel dépolarisé plusieurs dizaines de seconde après la fin du pulse avant de se repolariser. (B) Le potentiel de plateau déclenché suite à l'injection d'un pulse dépolarisant de +5 nA peut être interrompu prématurément par l'injection d'un bref pulse de courant négatif (10 s, -4 nA). Le potentiel initial de B63 est maintenu à -65 mV lors de tous les enregistrements de plateaux évoqués expérimentalement dans cette étude (Cela vaut également pour les Figures 34 et 35).

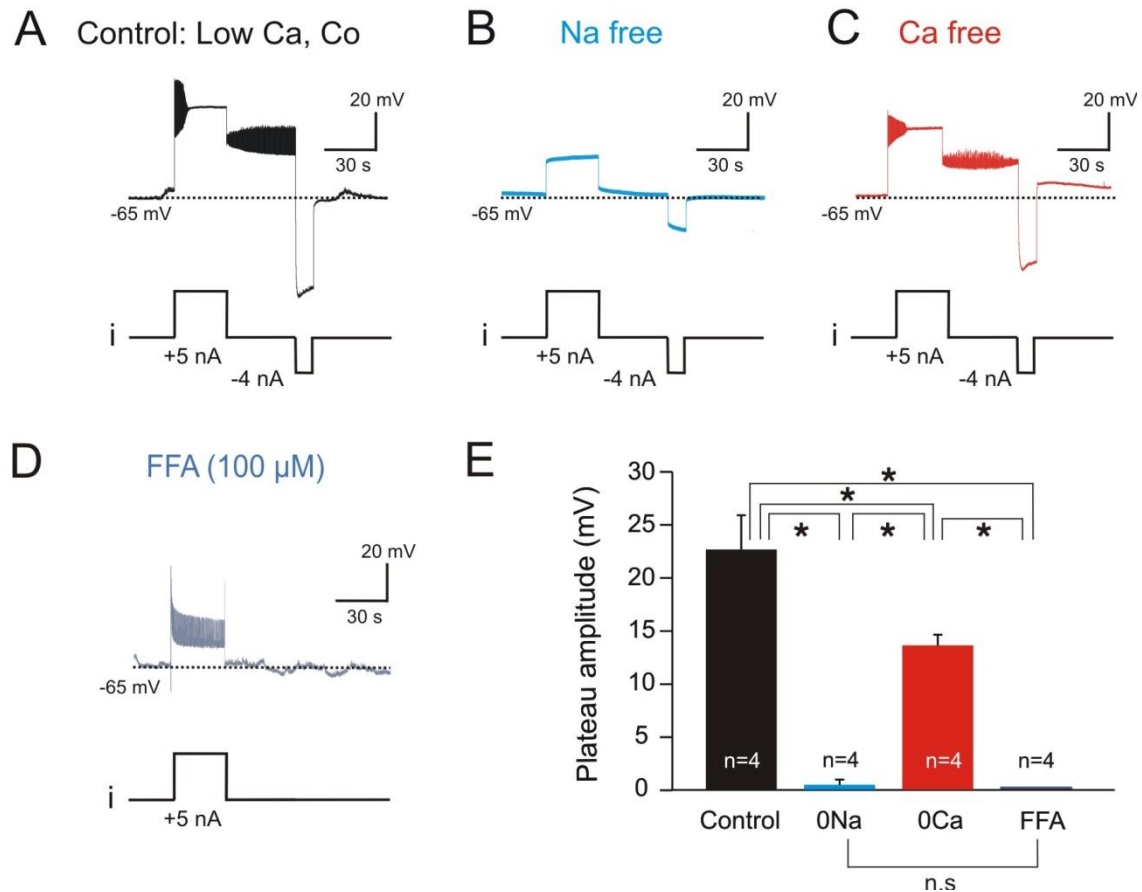


Figure 34. Contribution de flux cationiques entrants au potentiel de plateau

(A) Potentiel de plateau de B63 mis en évidence en condition Contrôle (Low Ca, Co) par l'injection constante d'un pulse de courant positif (30 s, +5 nA). Ce plateau est interrompu par l'injection d'un bref pulse de courant négatif (10 s, -4 nA). (B) Réponse de B63 évoquée par le même protocole d'injection de courant mais enregistrée cette fois-ci dans un milieu ionique Low Ca, Co dépourvu d'ions Na^+ (Na free). Dans ces conditions ioniques B63 ne présente plus de bistabilité de son potentiel membranaire. (C) Réponse de B63 à l'injection de courant dans un milieu privé cette fois-ci de l'ion Ca^{2+} (Ca free). Dans ces conditions ioniques, on met en évidence le maintien d'un potentiel de plateau de B63. (D) Enregistrement d'une réponse de B63 perfusé 40 min avec un milieu Low Ca, Co contenant du FFA à une concentration de 100 μM. La dépolarisation de B63 en réponse à l'injection de +5 nA n'excède pas la durée du pulse, indiquant la perte des propriétés de plateau. (E) Comparaison entre les groupes Contrôles, Na free, Ca free et FFA, de l'amplitude des dépolarisations de B63 enregistrées 10 s après l'injection d'un pulse de courant dépolarisant suffisant pour déclencher un potentiel de plateau en condition Contrôle (+5 nA, 30 s). Les variations de potentiel enregistrées sont significativement différentes entre tous les groupes, sauf entre le groupe Na free et FFA ($H = 13,942$, $p = 0,003$; Contrôle vs Na free, $q = 5,270$, $p < 0,05$; Contrôle vs FFA, $q = 4,411$, $p < 0,05$; Ca free vs Na free, $q = 4,491$, $p < 0,05$; Ca Free vs FFA, $q = 3,606$, $p < 0,05$ Contrôle vs Ca free, $q = 3,266$. * $p < 0,05$; n.s. : non significatif.

II.3. Terminaison du plateau

Les plateaux de B63 déclenchés spontanément ou expérimentalement présentent un mécanisme de terminaison autonome. Ce mécanisme produit à la suite d'une activité neuronale prolongée dépend souvent d'une sortie de potassium (K^+) permise par des canaux modulés/activés par l'action intracellulaire du Ca^{2+} et appelés canaux K_{Ca} (Meech & Standen, 1975; Pierrefiche et al., 1995; Tabak et al., 2011). Pour tester l'implication du K^+ dans la repolarisation spontanée de B63, nous avons appliqué un bloquant des canaux K^+ , le tétra-éthyl-amonium (TEA, 50 mM), dans la solution Contrôle « Low Ca, Co ». En présence de TEA, la durée des plateaux évoqués par un pulse de courant augmente considérablement par rapport au contrôle sans TEA (Figure 35A,B,E). L'implication du Ca^{2+} intracellulaire sur la repolarisation spontanée a été testée par l'injection intrasomatique d'un chélateur du Ca^{2+} , le BAPTA. Les plateaux persistent plus longtemps en présence qu'en absence de BAPTA (Figure 35C,E). De plus, l'absence de Ca^{2+} extracellulaire prévenant l'influx de cet ion dans la cellule, prolonge également de façon significative la durée du plateau (Figure 35D,E). Ainsi, l'ensemble de ces données suggère fortement que la repolarisation spontanée du plateau des neurones B63 implique un courant potassique permis par des canaux K_{Ca} . On notera toutefois que la durée des plateaux enregistrés dans des conditions bloquant le flux de K^+ n'est pas infinie. Cela suggère que d'autres mécanismes non identifiés contribuent au processus de repolarisation.

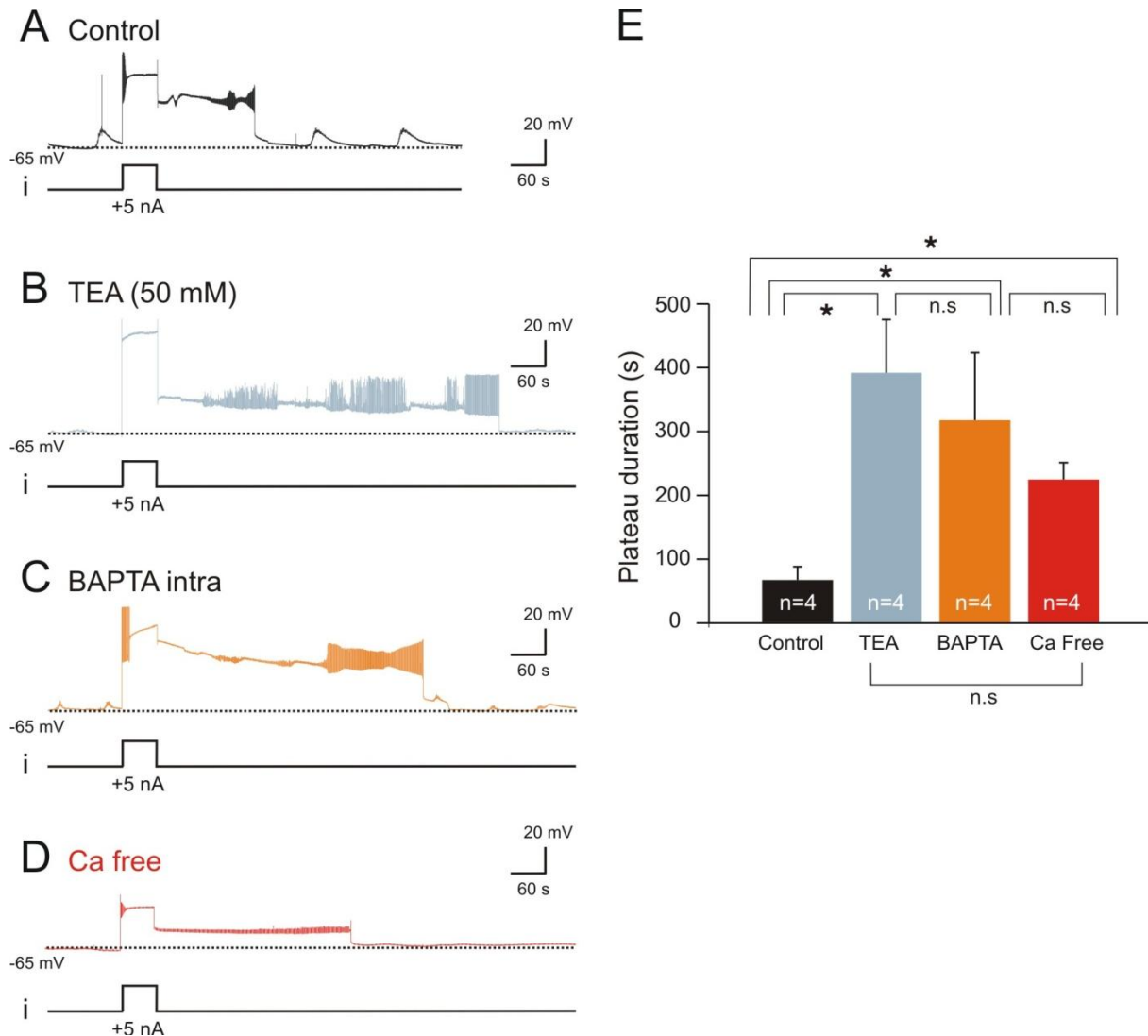


Figure 35. Implication d'un courant potassique activé par le calcium dans la terminaison spontanée du plateau de B63

(A) Plateau de B63 déclenché expérimentalement par un pulse de courant dépolarisant (+5 nA) en condition Contrôle « Low Ca, Co ». (B) Plateau évoqué en présence de TEA (50 mM) dans la solution ionique Low Ca, Co. La terminaison spontanée du plateau intervient après une durée considérablement plus longue qu'en condition Contrôle (A), soit plusieurs centaines de secondes après la terminaison du pulse. (C) Plateau évoqué d'un B63 dont le soma a été injecté préalablement avec du BAPTA. (D) Plateau évoqué de B63 enregistré dans un milieu ionique extracellulaire dépourvu de calcium (Ca Free). (E) Comparaison entre les différents groupes de la durée des plateaux évoqués. Celle-ci est mesurée à partir de la fin du pulse dépolarisant (+5 nA) qui déclenche un plateau. La durée moyenne des plateaux dans le groupe Contrôle diffère des autres conditions expérimentales ($H = 8,934$, $p = 0,030$; Contrôle vs TEA; $q = 4,096$, $P < 0,05$; Contrôle vs BAPTA : $q = 3,744$, $p < 0,05$; Contrôle vs Ca free : $q = 5,307$, $p < 0,05$). La durée moyenne des plateaux mesurés dans les conditions expérimentales TEA, BAPTA et Ca free n'est pas significativement différente. * $p < 0,05$; n.s : non significatif.

II.4. Déclenchement des plateaux : propriétés oscillatoires de B63

Les plateaux de B63 peuvent être déclenchés expérimentalement par un pulse de courant dépolarisant. Cependant, ce mode de déclenchement ne rend pas compte de l'impulsion spontanée de cette propriété. Dans plusieurs modèles de neurones pacemakers, le maintien d'une dépolarisation prolongée succède à une phase dépolarisante initiale, ou pente de pacemaker, résultant de flux cationiques. Dans le cas du neurone B63 isolé, nous avons mis en évidence qu'une oscillation spontanée de son potentiel de membrane supporte la décharge plus ou moins prolongée de PA (Figure 36). Au potentiel de repos, ces phénomènes se traduisent par une dépolarisation progressive du potentiel de membrane, suivie d'une repolarisation lente. Ces phénomènes oscillatoires peuvent-ils être à l'origine du déclenchement spontané des plateaux ?

La superposition des oscillations spontanées du potentiel de membrane et d'un plateau déclenché spontanément à partir du même potentiel de repos révèle que la phase initiale de ces deux phénomènes est très similaire (Figure 36A). Cette observation montre que le déclenchement de cette propriété se fait systématiquement au sommet d'une oscillation supraliminaire. Ce sont donc bien les oscillations spontanées, qui déclenchent les plateaux lorsqu'elles ont une amplitude suffisante. Ces deux événements peuvent être clairement dissociés sur la base de leur régulation par le voltage. Ainsi, la fréquence d'émission des plateaux diminue avec l'hyperpolarisation expérimentale et continue du potentiel de membrane de B63 (Figure 36B,C). À -50 mV on observe une succession de plateaux spontanés émis à des intervalles de temps irréguliers et à fréquence moyenne importante. À -60 mV on enregistre des oscillations du potentiel de membrane pouvant supporter des bouffées brèves (quelques secondes) de PA qui coexistent avec l'émission de plateaux maintenant générés à faible fréquence. Enfin, à -70 mV on ne met plus en évidence que des oscillations du potentiel de membrane. Cette relation entre fréquence des plateaux et hyperpolarisation expérimentale est quantifiée Figure 36C. L'émission spontanée des plateaux dépend du potentiel de membrane de B63. En revanche, lorsque l'on teste la voltage-dépendance de l'émission des oscillations membranaires, on constate que la fréquence d'oscillation est constante quelle que soit l'hyperpolarisation du neurone B63 (Figure 36D,E). Ces

résultats suggèrent que, contrairement aux plateaux, l'oscillation du potentiel de membrane de B63 est sous-tendue par des mécanismes ioniques non dépendants du voltage.

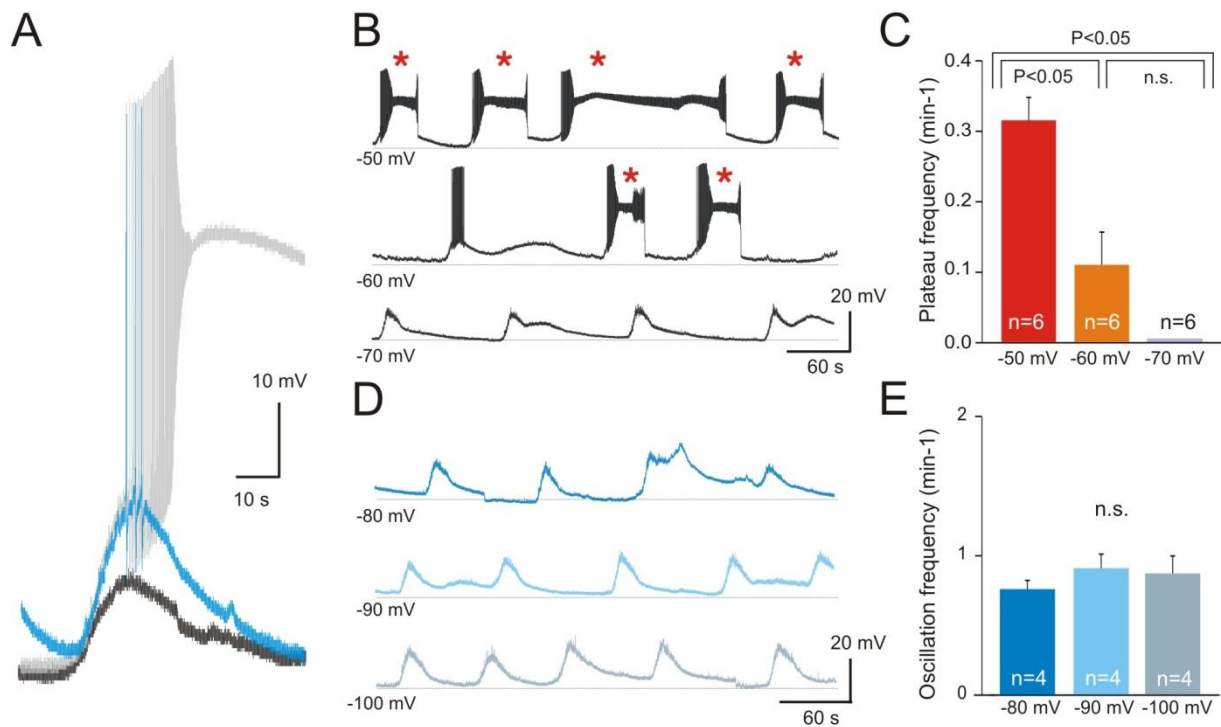


Figure 36. Mise en évidence d'une propriété oscillatoire du potentiel membranaire de B63 distincte des potentiels de plateau

(A) Superposition de la phase initiale d'oscillations spontanées du potentiel membranaire de B63 (gris foncé et bleu) avec la phase initiale d'un plateau spontané (gris clair). Les trois tracés superposés sont issus du même enregistrement de B63 et ont un potentiel initial identique. (B) Enregistrement du potentiel membranaire de B63. Ce dernier est initialement maintenu à -50 mV, puis successivement à -70 mV et -80 mV. Les événements correspondant à des plateaux spontanés de B63 sont annotés par une étoile rouge. (C) Quantification de la fréquence moyenne des plateaux aux différents potentiels testés ($\chi^2 = 11,273$, $p = 0,002$, test post hoc : à partir de -50 mV vs -70 mV, $q = 4,491$, $p < 0,05$; -50 mV vs -60 mV, $q = 4,041$, $p < 0,05$; -60 mV vs -70 mV, $q = 2,309$, non-significatif). (D) Oscillations lentes du potentiel de membrane enregistrées à des potentiels membranaires maintenus successivement à -80 mV, -90 mV et -100 mV. (E) Quantification de la fréquence des oscillations membranaires de B63 aux différents potentiels testés (Test de Friedman, $\chi^2 = 2$, $p = 0,653$).

II.5. Flux ioniques impliqués dans l'oscillation du potentiel de membrane

L'activité oscillatoire des neurones B63 persiste après 20 min de perfusion de solution Contrôle contenant du cobalt « Low Ca, Co » (Figure 37A). En revanche, après la perfusion d'une solution Low Ca, Co dépourvue d'ions Na^+ (remplacés par de la choline) plus aucune oscillation du potentiel de membrane n'est enregistrée (Figure 37B). A l'inverse, un B63 enregistré après 20 minutes de perfusion d'une solution dépourvue de Ca^{2+} présente une activité oscillatoire analogue à celle mise en évidence en condition Contrôle (Figure 37C). Ainsi, ces résultats indiquent que l'oscillation du potentiel de B63 dépend directement d'un influx transmembranaire de Na^+ et non de Ca^{2+} (tout du moins lors des 20 premières minutes de perfusion de la solution ionique, voir ci-dessous).

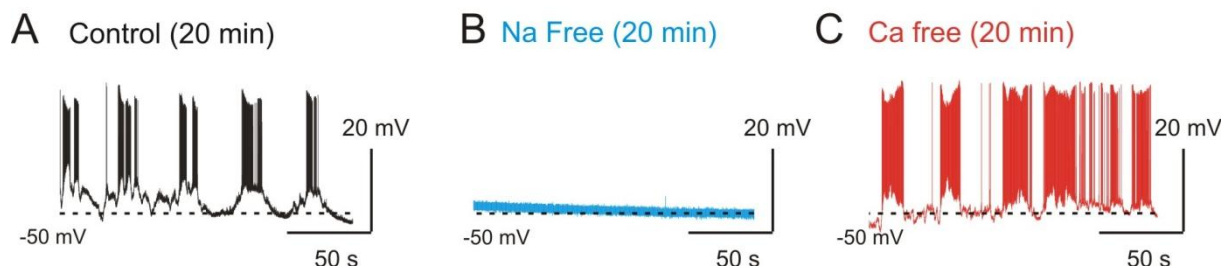


Figure 37. L'oscillation du potentiel dépend strictement du Na^+ extracellulaire, mais pas du Ca^{2+} extracellulaire

(A) Oscillation du potentiel de B63 enregistrée en condition Contrôle et au potentiel de repos (-50 mV) après 20 minutes de perfusion de la solution Low Ca, Co bloquant les synapses chimiques. (B) Un enregistrement réalisé dans une solution privée de l'ion Na^+ (Na free) pendant 20 minutes ne présente plus aucune variation spontanée du potentiel de membrane. (C) Oscillation du potentiel de membrane enregistrée dans un milieu ionique privé d'ions Ca^{2+} (Ca Free) pendant 20 minutes.

II.6. Régulation de l'oscillation par une dynamique calcique intracellulaire

Lorsque les préparations sont totalement privées de Ca^{2+} pendant une période prolongée d'1h, on constate la perte de l'oscillation de B63, (Figure 38A1,A2). Par contre, le potentiel du neurone B63 se maintient à un potentiel invariant et stable correspondant à ce qui est observé entre les phénomènes dépolarisants spontanés (plateaux et oscillations). Le Ca^{2+} semble donc nécessaire à l'oscillation. Cependant sa présence extracellulaire et son influx transmembranaire ne semblent pas être directement impliqués la genèse de cette propriété. Le Ca^{2+} peut-il alors contribuer à une modulation intracellulaire des phénomènes oscillatoires membranaires ? Pour répondre à cette question nous avons comparé les enregistrements du soma de B63 lorsque celui-ci reçoit une injection ou non du chélateur calcique BAPTA (Figure 38B1). En présence de BAPTA, les oscillations membranaires s'atténuent de façon significative (Figure 38B2), ce qui indique un rôle du calcium dans la modulation des canaux perméables au Na^+ responsables de l'oscillation de B63.

Il est largement admis que la régulation calcique de fonctions cellulaires, telles que la modulation de canaux ioniques, dépend d'une concentration spécifique de Ca^{2+} ou d'un pattern particulier du signal calcique (Berridge et al., 2000). Les dynamiques intracellulaires responsables de ces régulations dépendent des sources de Ca^{2+} (membranaires ou intracellulaires), contribuant à l'augmentation de la concentration de Ca^{2+} cytosolique et des mécanismes assurant la diminution de cette concentration.

Au cours d'une dernière série d'expériences nous avons analysé spécifiquement l'implication des stocks calciques intracellulaires dans la dynamique supportant l'oscillation de B63. Nous avons pour cela ajouté au milieu de perfusion « Low Ca, Co » un agent pharmacologique, le CPA (20 μM), qui bloque efficacement l'action des ATPases du réticulum endoplasmique (SERCA) chez l'aplysie et entraîne une déplétion de cette source de calcium intracellulaire (Kachoei et al., 2006). Dans cette condition expérimentale, l'oscillation du potentiel de membrane de B63 est abolie (Figure 38C1,C2). Cette perte dépend exclusivement de l'effet du CPA et non de son solvant le DMSO (0,1%) car l'oscillation du potentiel membranaire persiste lorsque du DMSO seul est ajouté à la solution ionique. Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggère que le Ca^{2+} intracellulaire provenant des stocks calciques est

nécessaire à la genèse des phénomènes oscillatoires. L'entretien de cette dynamique calcique et de l'oscillation de potentiel peut dépendre, comme on l'a vu, d'un apport de calcium extracellulaire.

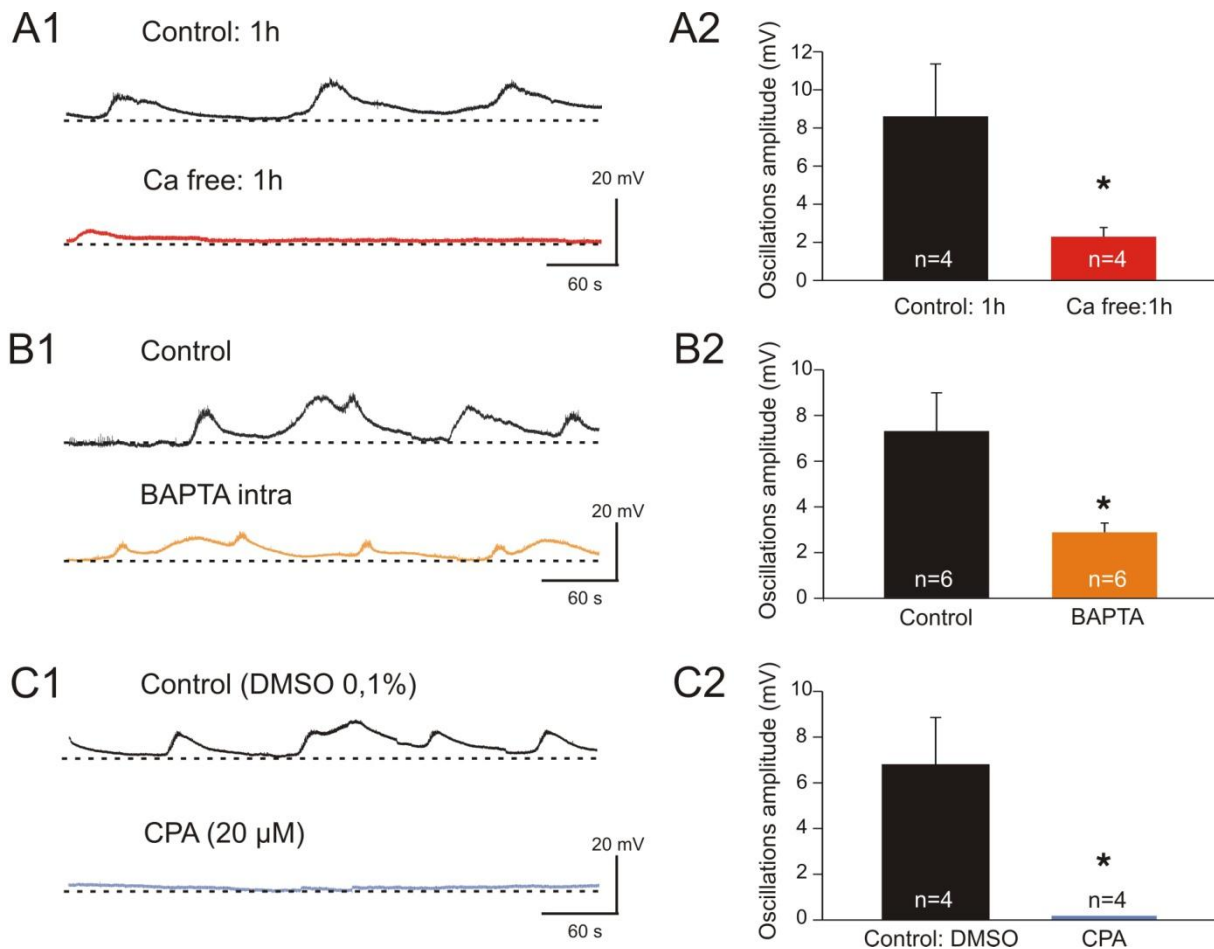


Figure 38. Implication d'une dynamique calcique intracellulaire dans la genèse de l'oscillation membranaire de B63

(A1) Une privation prolongée en Ca^{2+} extracellulaire entraîne une réduction de l'oscillation de B63. Enregistrement intracellulaire de B63 après 1h de perfusion de la solution Contrôle (Low Ca, Co) (tracé du haut) et enregistrement du potentiel de membrane dans la même solution ionique privée pendant 1h d'ions Ca^{2+} (Ca Free) (tracé du bas). (A2) Comparaison de l'amplitude moyenne des oscillations enregistrées dans les deux conditions ($T = 39$, $p = 0,016$). (B1) Enregistrement Contrôle (tracé du haut) et enregistrement d'un B63 préalablement injecté avec du BAPTA (tracé du bas). (B2) Comparaison de l'amplitude moyenne des oscillations enregistrées dans les deux conditions ($T = 53$, $p = 0,026$). (C1) Une déplétion des stocks calciques intracellulaires abolit les oscillations membranaires. Enregistrement Contrôle réalisé en Low Ca, Co en présence du solvant DMSO (0,1%) (tracé du haut) et enregistrement réalisé en présence de CPA (20 μM) dilué dans du DMSO (0,1%). (C2) Comparaison de l'amplitude moyenne des oscillations enregistrées dans les deux conditions ($T = 26$; $p = 0,029$). * $p < 0,05$. Pour tous les enregistrements les B63 sont maintenus à un potentiel initial de -65 mV.

II.7. Comportement variable des propriétés bioélectriques de B63

A partir des résultats précédents il apparaît que l'activité spontanée de neurones B63 dépend de deux phénomènes fondamentaux : la genèse d'une oscillation du potentiel de membrane et la production d'un potentiel de plateau. L'irrégularité temporelle des bouffées de PA peut donc avoir pour origine (1) l'oscillation et sa capacité à déclencher les potentiels de plateau et/ou (2) le potentiel de plateau et sa capacité à s'interrompre spontanément. Sur des neurones B63 isolés des synapses chimiques par la solution Contrôle « Low Ca, Co », nous observons que la durée de plateaux successifs varie de façon considérable, même en absence de modification de la phase de déclenchement des plateaux (Figure 39A,B). Par conséquent, la terminaison des plateaux par le courant K_{Ca} est un processus variable. D'autre part, sur des neurones hyperpolarisés par l'injection d'un courant négatif continu pour empêcher la genèse des plateaux, on observe que l'oscillation du potentiel membranaire varie en amplitude et en fréquence de façon imprévisible (Figure 39C). La genèse de cette oscillation constitue donc une deuxième source d'irrégularité. L'amplitude des oscillations est effectivement variable. En revanche, la variabilité temporelle des oscillations ne rend compte que de façon mineure de l'irrégularité des émissions des plateaux (Figure 39D). Par conséquent, l'essentiel de l'irrégularité avec laquelle les plateaux sont déclenchés semble déterminé par l'amplitude variable des oscillations membranaires de ce neurone.

Ainsi, l'ensemble de ces observations suggère que deux éléments majeurs sous-tendent l'irrégularité de l'activité de B63 : l'amplitude de l'oscillation qui dépend du courant sodique régulé par le calcium intracellulaire et la terminaison des plateaux produite par un courant K^+ qui est, lui aussi, régulé par le calcium intracellulaire. La dynamique du Ca^{2+} intracellulaire pourrait ainsi être le moteur principal de l'irrégularité fonctionnelle des canaux ioniques transmembranaires et par conséquent de l'activité électrique de B63.

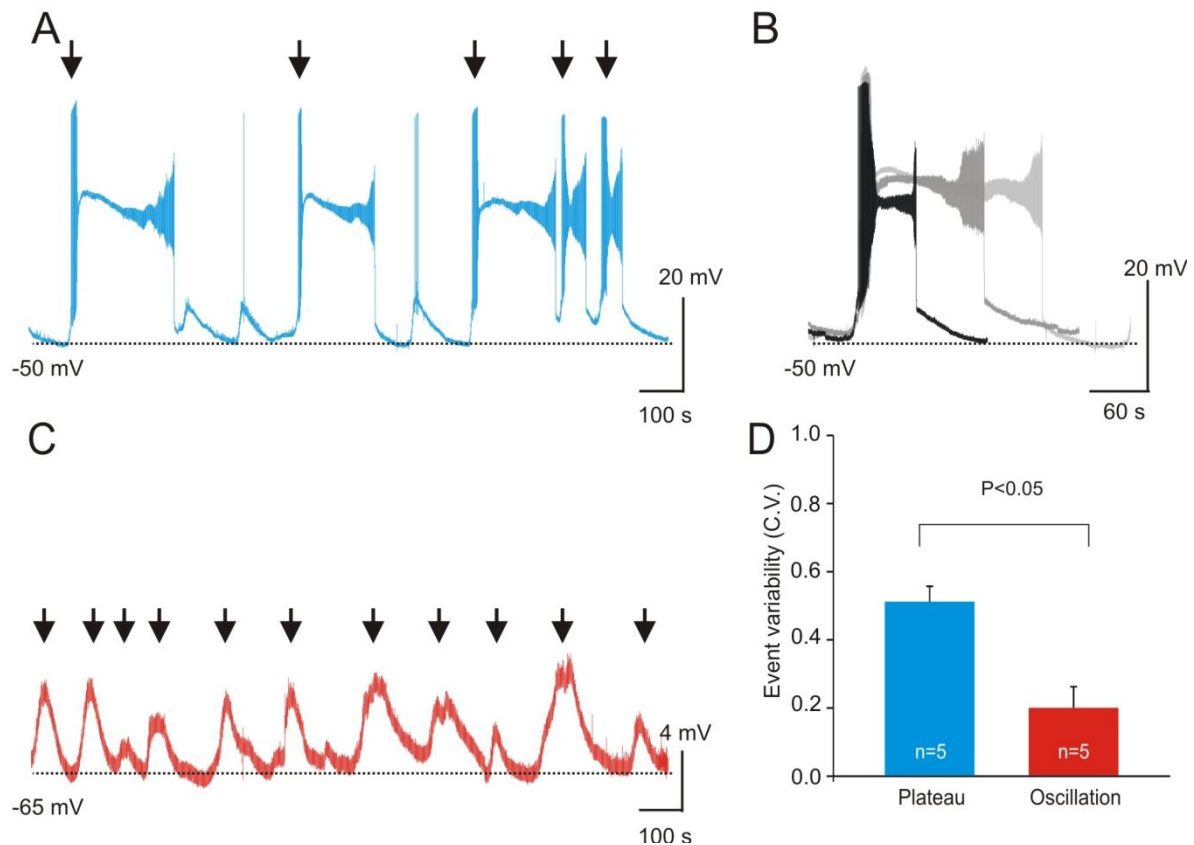


Figure 39. Variabilité temporelle des activités endogènes de B63

(A) Activité spontanée de B63 isolé fonctionnellement. Les flèches indiquent la phase initiale des plateaux spontanés. (B) Superposition de trois plateaux spontanés successifs issus du même enregistrement. Les trois enregistrements ont été réalisés à un potentiel initial identique. (C) Oscillations du potentiel de membrane de B63. Ces oscillations sont enregistrées à un potentiel de membrane maintenu à -65 mV afin d'empêcher la genèse de plateaux spontanés. Les flèches indiquent le sommet des oscillations. Les événements de moins de 1 mV d'amplitude ne sont pas pris en compte dans cette analyse. (D) Comparaison des coefficients de variation des intervalles inter-plateaux et inter-oscillations. Les C.V. moyens sont calculés sur 10 événements successifs. Comparaison entre les groupes ($T = 39$; $p = 0,022$).

III. Discussion

Notre étude avait pour but principal d'analyser les mécanismes cellulaires responsables de l'irrégularité de l'émission des bouffées de PA du neurone B63. Dans cet objectif nous avons commencé par étudier l'origine ionique de l'activité électrique du neurone. Nos résultats indiquent que cette activité dépend de l'interaction entre une oscillation non voltage-dépendante et un potentiel de plateau activé de façon voltage-dépendante. Ces deux phénomènes, oscillation et plateau, sont largement régulés par la dynamique calcique intracellulaire. Dans ce qui suit nous discuterons ce mécanisme de genèse des bouffées de PA et son irrégularité fonctionnelle.

III.1. Courants ioniques responsables de l'activité pacemaker de B63

Plusieurs mécanismes permettant la genèse spontanée de bouffées répétées de PA sont suggérés par la littérature. Ceux-ci dépendent des propriétés fonctionnelles des canaux ioniques transmembranaires qui spontanément dépolarisent, maintiennent plus ou moins durablement une dépolarisation puis repolarisent les neurones. Les mécanismes de dépolarisation peuvent impliquer des canaux Na^+/K^+ qui s'activent par hyperpolarisation (DiFrancesco et al, 1986), des canaux cationiques non-spécifiques (Rubin et al., 2009; Del Negro, 2005) ou encore des canaux sodiques à bas seuil et exprimant une inactivation faible ou absente (Butera et al., 1999a; Tazerart et al., 2008). Le maintien d'un potentiel dépolarisé ou de plateau peut dépendre de canaux calciques voltage-dépendants (Svirskis & Hounsgaard, 1997), de canaux cationiques non spécifiques (CAN) (Bouhadfane et al., 2013; Morisset & Nagy, 1999) ou encore de canaux sodiques permettant un courant Na^+ persistant (Bouhadfane et al., 2013). Enfin, la repolarisation a été associée à des canaux potassiques sensibles au Ca^{2+} intracellulaire dont l'accumulation se produit pendant le plateau ou encore aux pompes ATP-dépendantes qui restaurent les équilibres ioniques du potentiel de repos.

Nos données concernant l'oscillation spontanée de B63 et en particulier la pente initiale de dépolarisation de l'oscillation montrent qu'elle dépend de canaux sodiques activés par le calcium intracellulaire (Figure 40A). Ces canaux ne seraient ni voltage-dépendants (la fréquence d'oscillation ne varie pas avec le potentiel de

membrane; voir Figure 36D,E), ni sensible au FFA. De tels courants cationiques non voltage-dépendants et activés par le calcium sont notamment impliqués dans la dépolarisation lente initiant l'activité pacemaker des neurones L2-L6 chez l'aplysie (Kramer & Zucker, 1985). Ces mêmes courants pourraient être impliqués dans l'oscillation de B63. Le mécanisme de repolarisation de cette oscillation n'a pas été étudié. Néanmoins, on peut penser qu'elle résulte de l'action des pompes électrogènes Na^+/K^+ ATPases ou Ca^{2+} ATPases et des antiports membranaires $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ impliqués dans l'homéostasie ionique de la cellule. Un rôle de la Na^+/K^+ ATPase dans la phase de repolarisation d'activité oscillatoire a été suggéré dans différentes cellules (Jasinski et al., 2013; Angstadt & Friesen, 1991). Une hypothèse alternative impliquerait une régulation par le calcium intracellulaire de l'ouverture et fermeture du canal Na^+ responsable de l'oscillation de B63. Nous avons montré cette sensibilité au Ca^{2+} . La dynamique de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire, régulée en partie par les organites intracellulaires, pourrait déterminer l'alternance ouverture/fermeture du canal Na^+ et ainsi les phases de dépolarisation et d'hyperpolarisation de l'oscillation (Figure 40A).

Concernant la genèse du plateau de B63, nos données suggèrent l'implication d'un courant cationique non-spécifique, perméable au calcium et voltage-dépendant car le déclenchement du plateau dépend d'une dépolarisation membranaire initiale (Figure 40B). De nombreuses données indiquent que les canaux TRP permettant un courant I_{CAN} peuvent être voltage-dépendants et/ou activés par le calcium intracellulaire (Partridge & Swandulla, 1988; Razani-Boroujerdi & Partridge, 1993; Guinamard et al., 2004; Nilius et al., 2005; Lei et al., 2014). Ils contribuent en outre au potentiel de plateau de différents neurones (Morisset & Nagy, 1999; Bouhadfane et al., 2013). Chez l'aplysie des I_{CAN} modulés par le calcium et le voltage ont été caractérisés et contribuent au potentiel de plateau de cellules neuroendocriniennes (Wilson et al., 1996; Wilson et al., 1998; Lupinsky & Magoski, 2006). On notera que la contribution des I_{CAN} aux propriétés de plateau résulte souvent de l'interaction de canaux TRP qui les génèrent avec l'entrée de Ca^{2+} permise par des canaux calciques voltage-dépendants (Lee & Tepper, 2007; Bouhadfane et al., 2013).

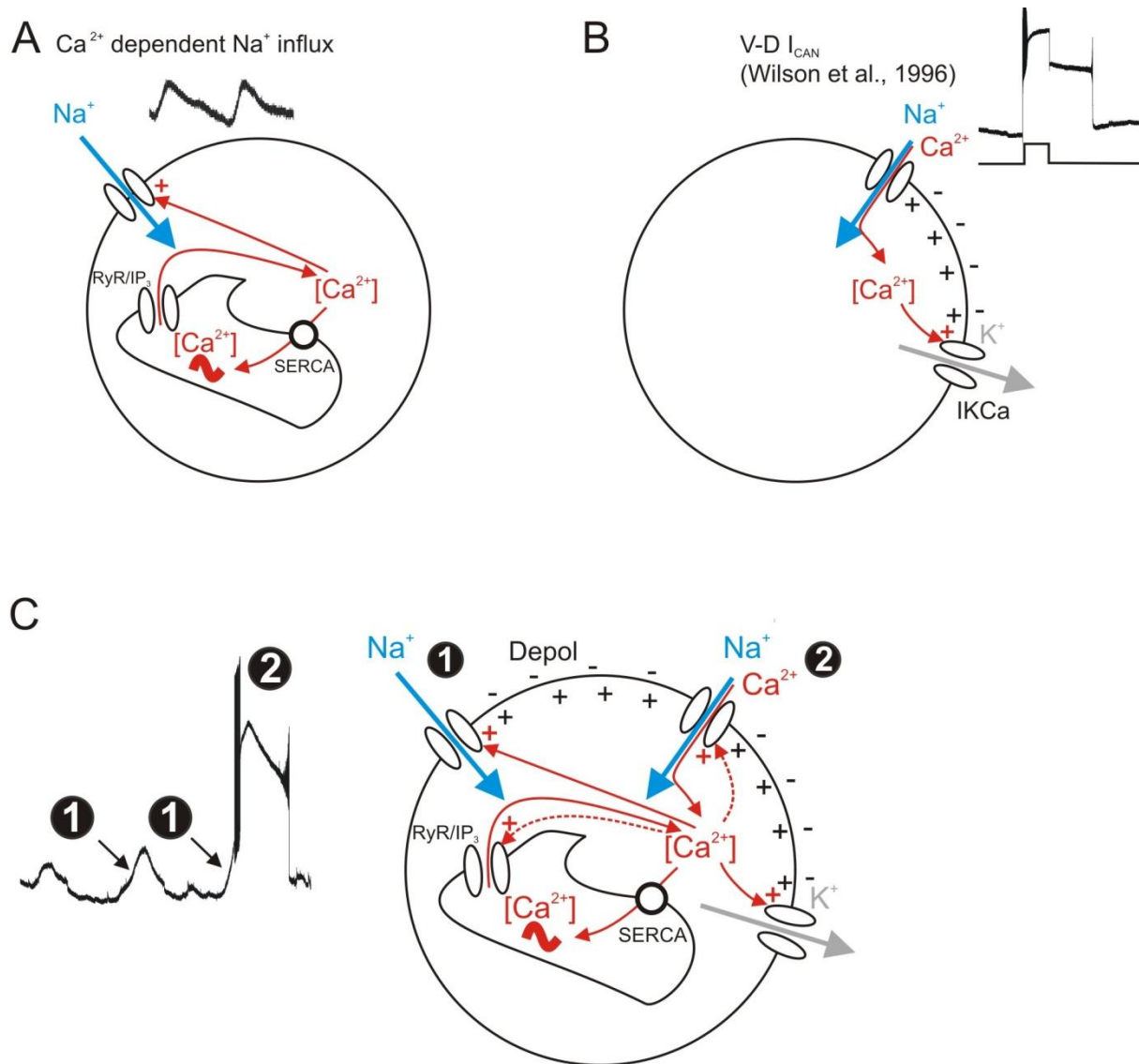


Figure 40. Modèle proposé

(A) Mécanisme de genèse de l'oscillation lente du potentiel de membrane. Une dynamique calcique, dépendante de l'activité des ATPases du réticulum endoplasmique (SERCA), active une entrée de Na^+ responsable de l'oscillation du potentiel de membrane. La libération calcique par les organites peut être supportée par plusieurs mécanismes tels que l'activation de récepteurs sensibles au calcium, comme les récepteurs ryanodines, ou activés par des seconds messagers tels que les récepteurs à l' IP_3 (RyR/ IP_3). (B) Des canaux cationiques perméables au Na^+ et au Ca^{2+} sont activés par dépolarisation membranaire. La repolarisation soudaine du plateau dépend de l'activation voltage- et calcium-dépendante de canaux KCa. (C) Initiation des plateaux spontanés de B63 résultant de l'interaction entre les oscillations modulées par le calcium intracellulaire (1) et les propriétés de plateau (2) dépendantes du voltage. Les flèches pointillées indiquent de probables sites de régulation par le calcium non mis en évidence dans cette étude.

Nos conditions expérimentales utilisant le Co^{2+} ne nous permettent pas de conclure sur l'implication ou non de canaux calciques voltage-dépendants dans le maintien du potentiel de plateau de B63. Nous ne pouvons pas exclure cette hypothèse même si le plateau continue de s'exprimer en présence de Co^{2+} ou en absence de Ca^{2+} . Quoiqu'il en soit, nos résultats montrent que du Ca^{2+} entre dans la cellule au moins par l'intermédiaire de canaux responsable d'un courant I_{CAN} . Cette entrée de Ca^{2+} pourrait, directement ou non, contribuer à la repolarisation du plateau de B63 par l'intermédiaire de canaux potassiques activés par le Ca^{2+} intracellulaire (Figure 40B). D'autres mécanismes, comme le fonctionnement des pompes ATPase, pourraient également contribuer à ce processus de repolarisation.

Ainsi, notre modèle apporte un degré de complexité supplémentaire par rapport aux descriptions classiques de la genèse d'une activité pacemaker : le déclenchement sporadique et variable des bouffées de PA de B63 ne repose pas uniquement sur les canaux membranaires voltage-dépendants, dont les modèles mathématiques montrent la grande régularité fonctionnelle, mais aussi sur une dynamique du Ca^{2+} intracellulaire régulée en partie par les organites intracellulaires (Figure 40C). Cette dynamique calcique semble être le moteur de l'oscillation non voltage-dépendante sur laquelle se greffe le potentiel de plateau.

III.2. Sources possibles de variabilité de l'activité de B63

Notre travail montre qu'une partie essentielle de l'irrégularité de l'impulsion motrice du comportement alimentaire chez l'aplysie est déterminée par les propriétés fonctionnelles intrinsèques du neurone décideur B63. Plus particulièrement, nos résultats tendent à montrer que la dynamique calcique intracellulaire serait largement responsable de cette variabilité fonctionnelle. Nous n'avons pas déterminé la contribution du réseau et donc des interactions synaptiques dans l'irrégularité motrice. Cependant, dans le 1^e chapitre de ce document, nous avons apporté les arguments montrant que le renforcement des synapses, en particulier électriques, a un rôle régulateur plutôt que perturbateur du rythme moteur. Ainsi, il semble que l'irrégularité de la genèse des patterns moteurs trouve son origine dans les propriétés fonctionnelles des neurones individuels plutôt que dans leurs interactions par l'intermédiaire des communications synaptiques à l'échelle du réseau.

On arrive d'ailleurs à une conclusion similaire à partir d'études fonctionnelles d'autres systèmes nerveux d'invertébrés où les rôles respectifs des propriétés membranaires intrinsèques et des synapses peuvent être mis en évidence. Ainsi, le système nerveux stomatogastrique des crustacés contient un réseau « pylorique » qui génère une motricité rythmique, stéréotypée et robuste. Il a été mis en évidence qu'une fois isolés de leurs partenaires synaptiques, les neurones individuels qui exprimaient une activité rythmique régulière dans le réseau, produisent une oscillation de leur potentiel membranaire fortement irrégulière (Miller & Selverston, 1982, Bal et al., 1988). Cette activité endogène irrégulière analysée sur le neurone pylorique latéral a été définie mathématiquement comme chaotique par Allen Selverston et ses collaborateurs (Selverston et al., 2000). L'irrégularité affecte particulièrement la durée des plateaux générés par ce neurone.

Il a été proposé que l'activité électrique chaotique des neurones LP provienne d'une interaction non-linéaire entre deux sources de Ca^{2+} intracellulaires, l'une provenant des flux transmembranaires entrants par des canaux sensibles au voltage et l'autre provenant de dynamiques générées au niveau intracellulaire par les stocks calciques. La modélisation de ces dynamiques calciques qui ont leurs rythmes propres indique que leur interaction génère des variations chaotiques de la concentration calcique intracellulaire. Comme nous l'avons vu, le Ca^{2+} joue un rôle déterminant dans l'ouverture de canaux membranaires potassiques (K_{Ca}) qui permettent la repolarisation cellulaire et l'arrêt du potentiel de plateau. La modulation de ces canaux par les fluctuations de calcium intracellulaire est à l'origine de la variabilité de durée des potentiels de plateau. Ce mécanisme génère l'essentiel de l'irrégularité fonctionnelle des neurones LP (Selverston et al., 2000).

Des interactions entre plusieurs dynamiques calciques intracellulaires existent chez l'aplysie et des mécanismes de signalisation intracellulaire assurant ces dynamiques ont été identifiés (Bezin et al., 2008). Ainsi, il est possible que des mécanismes similaires à ceux décrits ci-dessus contribuent à l'irrégularité fonctionnelle du neurone B63. Une différence toutefois doit être mentionnée : l'irrégularité du neurone B63 ne concerne pas uniquement le processus de terminaison du plateau mais aussi le processus de déclenchement et donc la propriété pacemaker du neurone décideur. Ainsi, notre hypothèse est que la

libération de Ca^{2+} par les stocks intracellulaires supporterait une oscillation plus ou moins régulière de la concentration calcique dans la cellule. Cette variation de calcium serait responsable, par ouverture/fermeture de canaux membranaires sodiques de l'oscillation plus ou moins régulière du potentiel de membrane. Par ailleurs, les flux de Ca^{2+} transmembranaires qui possèdent leur propre dynamique, liée par exemple à la production du potentiel de plateau et à l'activation résultante des canaux CAN, pourraient perturber l'oscillation décrite précédemment. Cette perturbation de la concentration calcique intracellulaire doit entraîner de façon conséquente des irrégularités dans les mécanismes ioniques de déclenchement et d'arrêt du plateau. Ces mécanismes analogues à ceux précédemment décrits pour le neurone LP, ne peuvent qu'entretenir le fonctionnement irrégulier du neurone. Cette hypothèse est corroborée par des travaux de modélisation mathématique et leur implémentation informatique qui ont été réalisés au laboratoire (Castro, 2014). La modélisation de canaux ioniques transmembranaires dont le CAN voltage-dépendant et le K_{Ca} décrits dans ce chapitre permet de générer spontanément une activité rythmique de potentiel de plateau régulier. L'introduction d'une oscillation calcique intracellulaire régulière agissant spécifiquement sur un canal Na^+ transmembranaire additionnel permet de reproduire l'oscillation régulière du potentiel de membranaire de B63. Finalement la combinaison des concentrations calciques d'origine transmembranaire et intracellulaire et leur action commune sur les canaux Na^+ et K_{Ca} permet de générer des bouffées de PA avec une irrégularité proche de celle observée sur les neurones biologiques.

Discussion générale

L'expression flexible des comportements motivés chez les animaux dépend à la fois de mécanismes externes associés à des stimuli et des apprentissages associatifs tels que le conditionnement classique, mais également de processus internes générant la variabilité motrice nécessaire à l'exploration et à l'émission d'actions dirigées vers un but. Ainsi, il était connu que l'apprentissage opérant appétitif régulait l'expression du comportement alimentaire chez l'aplysie et induisait une transition entre un comportement variable à l'occurrence irrégulière et un comportement à l'expression rigide, stéréotypée et accélérée (Nargeot et al., 2007). Les sites cellulaires générateurs des impulsions motrices spontanées de la radula étaient également identifiés dans le réseau buccal de l'animal. Les travaux précédents réalisés par notre équipe démontraient que l'apprentissage modulait de façon plastique les propriétés membranaires de ces neurones décideurs ainsi que les propriétés de leurs synapses électriques (Nargeot et al., 2009). Cependant, ni les mécanismes impliqués dans l'expression stéréotypée du comportement induit par l'apprentissage, ni les mécanismes modulateurs impliqués dans le renforcement contingent de l'impulsion motrice n'étaient connus. Enfin nous ignorions quels étaient les mécanismes ioniques qui déterminaient l'émission spontanée des actes moteurs dirigés vers un but.

Dans ce travail, nous avons analysé la flexibilité du système nerveux induite par le conditionnement opérant à l'échelle des réseaux de neurones centraux impliqués dans des processus de prise de décision. Ainsi nous mettons en évidence les résultats suivants : (1) L'irrégularité du comportement est modulée par l'apprentissage grâce à une modification des synapses électriques dans la sous-unité de neurones du CPG qui décide de l'impulsion de l'acte moteur. L'accélération du comportement est déterminée, quant à elle, par une augmentation de l'excitabilité neuronale dépendant d'une modulation de courants de fuite membranaire de ces mêmes neurones. (2) L'action contingente des stimuli appétitifs requiert l'activation de fibres dopaminergiques œsophagiennes qui induisent une modulation de l'impulsion des patterns moteurs. Ce processus est directement dépendant de l'association de contingence entre l'activité des neurones décideurs et la libération du

neurotransmetteur DA. Ce résultat suggère un rôle conservé, au sein du règne animal, de ce neurotransmetteur dans les apprentissages appétitifs responsables de l'acquisition de motricités fréquentes et régulières. (3) Les processus autonomes et imprévisibles qui déclenchent les actions dirigées vers l'obtention des stimuli-récompenses résultent d'une faible coordination des activités irrégulières produites par différents neurones décideurs au sein du réseau générateur des patterns moteurs. L'activité irrégulière de ces cellules considérées individuellement résulte de l'interaction complexe entre leurs propriétés membranaires intrinsèques et la dynamique de processus métaboliques associée à la régulation du calcium intracellulaire.

Il est connu que dans les CPG qui génèrent de façon automatique une motricité rythmique régulière sans mécanisme de prise de décision, les connexions synaptiques jouent un rôle essentiel, non seulement dans la structuration, ou l'organisation temporelle des patterns moteurs, mais également dans la synchronisation des activités cellulaires qui favorisent la régularité des émissions motrices. Ainsi Selverston et ses collaborateurs ont montré que les activités rythmiques produites par le CPG pylorique des crustacés, bien qu'en grande partie sous-tendues par des neurones dont les propriétés intrinsèques génèrent une activité électrique variable, sont à l'origine d'un comportement rythmique grâce à leurs connexions synaptiques impliquées dans la synchronisation ou l'alternance des décharges électriques neuronales (Elson et al., 1999). En outre, la synchronisation par les synapses, de populations de neurones oscillant à des fréquences différentes est un mécanisme que l'on pense être également déterminant dans la genèse des rythmes respiratoires chez les vertébrés (Butera et al., 1999b). Nos résultats corroborent ces observations et montrent que l'apprentissage par des phénomènes de plasticité synaptique qui accroissent la force des synapses, peut induire une synchronisation des activités neuronales avec comme conséquence la transition d'une motricité variable et imprévisible en une motricité rythmique et régulière. Cela suppose toutefois que la force de la connectivité synaptique initiale chez les animaux naïfs soit suffisamment faible pour « autoriser » l'expression d'activités variables et labiles au niveau des neurones décideurs qui ainsi induiront l'irrégularité et l'imprévisibilité d'un comportement.

Un autre aspect important que nous mettons en évidence dans la genèse d'un comportement exploratoire dirigé vers un but est l'importance des propriétés membranaires intrinsèques des neurones pacemakers et décideurs de l'émission de l'action. La contribution de neurones pacemakers a été montrée dans de nombreux réseaux générateurs de patterns moteurs rythmiques. Lorsque ces neurones ont pu être identifiés, comme dans le cas du système nerveux stomatogastrique des crustacés, il a été montré qu'ils génèrent une activité électrique rythmique et régulière qui entraîne sur son rythme l'ensemble de ses partenaires du réseau (Bal et al., 1988). La description que nous faisons d'un neurone pacemaker à l'activité irrégulière, qui n'a pas toujours la primeur de déclencher l'activité du réseau, apporte un éclairage nouveau sur les propriétés fonctionnelles des réseaux générateurs des patterns moteurs et leur capacité à générer un comportement flexible. A cela s'ajoute que la modulation par l'apprentissage de ces propriétés de pacemakers irréguliers peut contribuer à l'émergence d'un comportement fréquent et stéréotypé. Il est déjà connu que des modifications des propriétés membranaires endogènes peuvent jouer un rôle déterminant dans les processus de conditionnement associatif (Nikitin et al., 2008). La contribution de ces plasticités dans l'expression de comportements renforcés par le conditionnement opérant est aussi établie (Mozzachiodi & Byrne, 2010). Toutefois, la contribution de ces plasticités à un aspect spécifique de l'expression compulsive d'un comportement conditionné n'était pas évidente. Nos travaux montrent notamment qu'une modulation des propriétés membranaires des neurones pacemakers, dans le cas présent par l'intermédiaire des conductances de fuite, contribue de façon importante et sélective à la modification de la fréquence des émissions motrices.

Tout au long de ce manuscrit j'ai évoqué la distinction fondamentale existante entre les mécanismes périphériques de déclenchement des actions et dépendants de stimuli et les processus centraux et autonomes de genèse motrice par le système nerveux central. Notre étude me conduit à proposer une distinction supplémentaire entre d'une part, des processus de décisions dépendants des stimuli environnementaux et d'autre part, des processus dépendants de dynamiques autonomes du système nerveux central.

Ainsi, de nombreuses études menées chez des modèles invertébrés tels que l'écrevisse, la sangsue ou encore les mollusques gastéropodes, mettent en avant le rôle déterminant de mécanismes complexes d'intégration sensorielle et finalement de l'activation de voies de commande dont l'action sur des réseaux neuronaux va déclencher un comportement particulier (Edwards et al., 1999; Misell et al., 1998; Kristan, 2008). Chez l'aplysie des travaux menés par le laboratoire de Klaudiusz Weiss montrent que de telles voies de commandes descendantes issues des ganglions nerveux cérébroïdes reconfigurent le CPG buccal et lui permettent de produire des patterns spécifiques (Wu et al., 2014). De façon complémentaire à ces processus de sélection comportementale déterminés directement ou indirectement par l'environnement, notre étude suggère qu'un mécanisme différent est impliqué dans l'émission des actions dirigées vers un but. En effet, nos données indiquent que l'impulsion de ces actions est déterminée avec une grande autonomie par les dynamiques intrinsèques du CPG buccal. Les expressions variables ou stéréotypées des patterns moteurs découlent ainsi de l'état fonctionnel de ce CPG qui peut être modifié pendant plusieurs heures par l'apprentissage.

Il sera particulièrement intéressant, à l'avenir, d'intégrer ces deux aspects de la prise de décision que sont le déclenchement autonome et la sélection des actes moteurs dépendante des stimuli dans une étude de l'interaction entre ces deux processus. Pour cela, des préparations préservant à la fois le ganglion buccal et le ganglion cérébroïde pourront être utilisées. Une approche possible pour comprendre comment ces dynamiques interagissent sera alors de combiner les approches électrophysiologiques traditionnelles d'enregistrement intra- et extracellulaires avec de nouvelles approches telles que l'imagerie fonctionnelle par résonance magnétique à très haute résolution nous permettant d'imager l'activité des réseaux avec une résolution qui est celle de neurones individuels.

Bibliographie

- Adamantidis AR, Tsai H-C, Boutrel B, Zhang F, Stuber GD, Budygin EA, Touriño C, Bonci A, Deisseroth K, de Lecea L (2011) Optogenetic interrogation of dopaminergic modulation of the multiple phases of reward-seeking behavior. *J Neurosci* 31:10829–10835.
- Alkon DL (1974) Associative training of *Hermisenda*. *J Gen Physiol* 64:70–84.
- Ambroise M, Levi T, Joucla S, Yvert B, Saïghi S (2013) Real-time biomimetic Central Pattern Generators in an FPGA for hybrid experiments. *Front Neurosci* 7:215.
- Angstadt JD, Friesen WO (1991) Synchronized oscillatory activity in leech neurons induced by calcium channel blockers. *J Neurophysiol* 66:1858–1873.
- Antonov I, Antonova I, Kandel ER, Hawkins RD (2003) Activity-dependent presynaptic facilitation and Hebbian LTP are both required and interact during classical conditioning in *aplysia*. *Neuron* 37:135–147.
- Ayali A, Harris-Warrick RM (1999) Monoamine control of the pacemaker kernel and cycle frequency in the lobster pyloric network. *J Neurosci* 19:6712–6722
- Bailey CH, Chen M (1983) Morphological basis of long-term habituation and sensitization in *Aplysia*. *Science* 220:91–93.
- Bal T, Nagy F, Moulins M (1988) The pyloric central pattern generator in crustacea: a set of conditional neuronal oscillators. *J Comp Physiol A* 163:715–727.
- Balleine BW, Delgado MR, Hikosaka O (2007) The role of the dorsal striatum in reward and decision-making. *J Neurosci* 27:8161–8165.
- Balleine BW, O'Doherty JP (2009) Human and rodent homologues in action control: corticostriatal determinants of goal-directed and habitual action. *Neuropsychopharmacology* 35:48–69.
- Ballo AW, Keene JC, Troy PJ, Goeritz ML, Nadim F, Bucher D (2010) Dopamine modulates Ih in a motor axon. *J Neurosci* 30:8425–8434.
- Barbas D, Zappulla JP, Angers S, Bouvier M, Mohamed HA, Byrne JH, Castellucci VF, DesGroseillers L (2006) An *aplysia* dopamine1-like receptor: molecular and functional characterization. *J Neurochem* 96:414–427.
- Barnes S, Syed NI, Bulloch AG, Lukowiak K (1994) Modulation of ionic currents by dopamine in an interneurone of the respiratory central pattern generator of *Lymnaea stagnalis*. *J Exp Biol* 189:37–54.
- Barriere G, Mellen N, Cazalets J-R (2004) Neuromodulation of the locomotor network by dopamine in the isolated spinal cord of newborn rat. *Eur J Neurosci* 19:1325–1335.
- Barron AB, Søvik E, Cornish JL (2010) The roles of dopamine and related compounds in reward-seeking behavior across animal phyla. *Front Behav Neurosci* 4:163.zhou
- Bédécarrats A, Cornet C, Simmers J, Nargeot R (2013) Implication of dopaminergic modulation in operant reward learning and the induction of compulsive-like feeding behavior in *Aplysia*. *Learn Mem* 20:318–327.

- Belin D, Everitt BJ (2008) Cocaine seeking habits depend upon dopamine-dependent serial connectivity linking the ventral with the dorsal striatum. *Neuron* 57:432–441.
- Bell CC, Han VZ, Sugawara Y, Grant K (1997) Synaptic plasticity in a cerebellum-like structure depends on temporal order. *Nature* 387:278–281.
- Bem T, Rinzel J (2004) Short duty cycle destabilizes a half-center oscillator, but gap junctions can restabilize the anti-phase pattern. *J Neurophysiol* 91:693–703.
- Bennett MV, Zukin RS (2004) Electrical coupling and neuronal synchronization in the mammalian brain. *Neuron* 41:495–511.
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:11–21.
- Bezin S, Charpentier G, Lee HC, Baux G, Fossier P, Cancela J-M (2008) Regulation of nuclear Ca^{2+} signaling by translocation of the Ca^{2+} messenger synthesizing enzyme ADP-ribosyl cyclase during neuronal depolarization. *J Biol Chem* 283:27859–27870.
- Blass EM, Epstein AN (1971) A lateral preoptic osmosensitive zone for thirst in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 76:378.
- Bliss TV, Lømo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232:331–356.
- Bloomfield SA, Völgyi B (2009) The diverse functional roles and regulation of neuronal gap junctions in the retina. *Nat Rev Neurosci* 10:495–506.
- Bouhadjane M, Tazerart S, Moqrich A, Vinay L, Brocard F (2013) sodium-mediated plateau potentials in lumbar motoneurons of neonatal rats. *J Neurosci* 33:15626–15641.
- Brembs B (2002) Operant reward learning in Aplysia: neuronal correlates and mechanisms. *Science* 296:1706–1709.
- Brembs B (2004) Extending in vitro conditioning in Aplysia to analyze operant and classical processes in the same preparation. *Learn Mem* 11:412–420.
- Brembs B, Plendl W (2008) Double dissociation of PKC and AC manipulations on operant and classical learning in drosophila. *Curr Biol* 18:1168–1171.
- Brocard F, Shevtsova NA, Bouhadjane M, Tazerart S, Heinemann U, Rybak IA, Vinay L (2013) Activity-dependent changes in extracellular Ca^{2+} and K^{+} reveal pacemakers in the spinal locomotor-related network. *Neuron* 77:1047–1054.
- Brown TG (1911) The intrinsic factors in the act of progression in the mammal. *Proc Roy Soc Lond. B Biol Sci* 84:308–319
- Brown TG (1914) On the nature of the fundamental activity of the nervous centres; together with an analysis of the conditioning of rhythmic activity in progression, and a theory of the evolution of function in the nervous system. *J Physiol* 48:18–46.
- Burke RE, Degtyarenko AM, Simon ES (2001) Patterns of locomotor drive to motoneurons and last-order interneurons: clues to the structure of the CPG. *J Neurophysiol* 86:447–462.
- Butera RJ, Rinzel J, Smith JC (1999a) Models of respiratory rhythm generation in the pre-Bötzinger complex. I. Bursting pacemaker neurons. *J Neurophysiol* 82:382–397.

- Butera RJ, Rinzel J, Smith JC (1999b) Models of respiratory rhythm generation in the pre-Bötzinger complex. II. Populations of coupled pacemaker neurons. *J Neurophysiol* 82:398–415.
- Burke CJ, Huetteroth W, Oswald D, Perisse E, Krashes MJ, Das G, Gohl D, Silies M, Certel S, Waddell S (2012) Layered reward signalling through octopamine and dopamine in *Drosophila*. *Nature*.
- Byrne JH, Castellucci VF, Kandel ER (1978) Contribution of individual mechanoreceptor sensory neurons to defensive gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. *J Neurophysiol* 41:418–431.
- Cajal SRY (1894) The Croonian Lecture: La fine structure des centres nerveux. *Proc R Soc Lond* 55:444–468.
- Carew T, Hawkins R, Kandel E (1983) Differential classical conditioning of a defensive withdrawal reflex in *Aplysia californica*. *Science* 219:397–400.
- Carew TJ, Walters ET, Kandel ER (1981) Classical conditioning in a simple withdrawal reflex in *Aplysia californica*. *J Neurosci* 1:1426–1437.
- Casola L, Lim R, Davis RE, Agranoff BW (1968) Behavioral and biochemical effects of intracranial injection of cytosine arabinoside in goldfish. *Proc Natl Acad Sci* 60:1389.
- Castellucci V, Kandel E (1976) Presynaptic facilitation as a mechanism for behavioral sensitization in *Aplysia*. *Science* 194:1176–1178.
- Castellucci V, Pinsker H, Kupfermann I, Kandel ER (1970) Neuronal mechanisms of habituation and dishabituation of the gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. *Science* 167:1745–1748.
- Castro J (2014) Rapport de Master 1.
- Cavedini P, Gorini A, Bellodi L (2006) Understanding obsessive–compulsive disorder: focus on decision making. *Neuropsychol Rev* 16:3–15.
- Cazalets JR, Sqalli-Houssaini Y, Clarac F (1992) Activation of the central pattern generators for locomotion by serotonin and excitatory amino acids in neonatal rat. *J Physiol* 455:187–204.
- Charlesworth JD, Warren TL, Brainard MS (2012) Covert skill learning in a cortical-basal ganglia circuit. *Nature* 486:251–255.
- Clugnet M-C, LeDoux JE (1990) Synaptic plasticity in fear conditioning circuits: induction of LTP in the lateral nucleus of the amygdala by stimulation of the medial geniculate body. *J Neurosci* 10:2818–2824.
- Cohen AH (1992) The role of heterarchical control in the evolution of central pattern generators. *Brain Behav Evol* 40:112–124.
- Cook DG, Carew TJ (1986) Operant conditioning of head waving in *Aplysia*. *Proc Natl Acad Sci* 83:1120–1124.
- Corbett D, Wise RA (1980) Intracranial self-stimulation in relation to the ascending dopaminergic systems of the midbrain: a moveable electrode mapping study. *Brain Res* 185:1–15.
- Cotman CW, Monaghan DT (1988) Excitatory amino acid neurotransmission: NMDA receptors and Hebb-type synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 11:61–80.
- Cymbalyuk GS, Gaudry Q, Masino MA, Calabrese RL (2002) Bursting in leech heart interneurons: cell-autonomous and network-based mechanisms. *J Neurosci* 22:10580–10592.
- Delcomyn F (1980) Neural basis of rhythmic behavior in animals. *Science* 210:492–498.

- Del Negro CA (2005) sodium and calcium current-mediated pacemaker neurons and respiratory rhythm generation. *J Neurosci* 25:446–453.
- Díaz-Ríos M, Miller MW (2006) Target-specific regulation of synaptic efficacy in the feeding central pattern generator of *Aplysia*: potential substrates for behavioral plasticity? *Biol Bull* 210:215–229.
- Di Chiara G, Bassareo V (2007) Reward system and addiction: what dopamine does and doesn't do. *Curr Opin Pharmacol* 7:69–76.
- DiFrancesco D, Ferroni A, Mazzanti M, Tromba C (1986) Properties of the hyperpolarizing-activated current (if) in cells isolated from the rabbit sino-atrial node. *J Physiol* 377:61–88.
- Ducret E, Le Feuvre Y, Meyrand P, Fenelon VS (2007) Removal of GABA within adult modulatory systems alters electrical coupling and allows expression of an embryonic-like network. *J Neurosci* 27:3626–3638.
- Dudai Y, Jan YN, Byers D, Quinn WG, Benzer S (1976) dunce, a mutant of *Drosophila* deficient in learning *Proc Natl Acad Sci USA* 73:1684–1688.
- Dunbar MJ, Tran MA, Whelan PJ (2010) Endogenous extracellular serotonin modulates the spinal locomotor network of the neonatal mouse. *J Physiol* 588:139–156.
- Edwards DH, Heitler WJ, Krasne FB (1999) Fifty years of a command neuron: the neurobiology of escape behavior in the crayfish. *Trends Neurosci* 22:153–161.
- Elson RC, Huerta R, Abarbanel HD, Rabinovich MI, Selverston AI (1999) Dynamic control of irregular bursting in an identified neuron of an oscillatory circuit. *J Neurophysiol* 82:115–122.
- Everitt BJ, Robbins TW (2005) Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nat Neurosci* 8:1481–1489.
- Flamm RE, Harris-Warrick RM (1986) Aminergic modulation in lobster stomatogastric ganglion. II. target neurons of dopamine, octopamine, and serotonin within the pyloric circuit. *J Neurophysiol* 55:866–881.
- Flexner LB, Flexner JB (1968) Studies on memory: the long survival of peptidyl-puromycin in mouse brain. *Proc Natl Acad Sci* 60:923.
- Gao W-J, Wang Y, Goldman-Rakic PS (2003) Dopamine modulation of perisomatic and peridendritic inhibition in prefrontal cortex. *J Neurosci* 23:1622–1630.
- Getting PA (1989) Emerging principles governing the operation of neural networks. *Annu Rev Neurosci* 12:185–204.
- Ghirardi M, Braha O, Hochner B, Giorgio Montarolo P, Kandel ER, Dale N (1992) Roles of PKA and PKC in facilitation of evoked and spontaneous transmitter release at depressed and nondepressed synapses in *Aplysia* sensory neurons. *Neuron* 9:479–489.
- Giurfa M (2006) Associative learning: the instructive function of biogenic amines. *Curr Biol* 16:892–895.
- Giurfa M, Sandoz J-C (2012) Invertebrate learning and memory: Fifty years of olfactory conditioning of the proboscis extension response in honeybees. *Learn Mem* 19:54–66.
- Grillner S, Wallen P (1985) Central pattern generators for locomotion, with special reference to vertebrates. *Annu Rev Neurosci* 8:233–261.

- Guinamard R, Chatelier A, Demion M, Potreau D, Patri S, Rahmati M, Bois P (2004) Functional characterization of a Ca^{2+} -activated non-selective cation channel in human atrial cardiomyocytes. *J Physiol* 558:75–83.
- Hamon M, Blier P (2013) Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 45:54–63.
- Harris-Warrick RM (2002) Voltage-sensitive ion channels in rhythmic motor systems. *Curr Opin Neurobiol* 12:646–651.
- Harris-Warrick RM (2010) General principles of rhythmogenesis in central pattern networks. *Prog Brain Res* 187:213.
- Harris-Warrick RM, Flamm RE (1987) Multiple mechanisms of bursting in a conditional bursting
- Harsanyi K, Mangel SC (1992) Activation of a D2 receptor increases electrical coupling between retinal horizontal cells by inhibiting dopamine release. *Proc Natl Acad Sci* 89:9220–9224.
- Hawkins RD, Abrams TW, Carew TJ, Kandel ER (1983) A cellular mechanism of classical conditioning in *Aplysia*: activity-dependent amplification of presynaptic facilitation. *Science* 219:400–405.
- Hebb DO (1949) *The organization of behavior: A neuropsychological theory*. (NY : Wiley).
- Heidelberg R, Waxham MN, Byrne JH, Roberts JL (2009) *From molecules to networks: an introduction to cellular and molecular neuroscience*. Academic Press.
- Hooper SL, Moulins M (1989) Switching of a neuron from one network to another by sensory-induced changes in membrane properties. *Science* 244:1587–1589.
- Hooper SL, Moulins M (1990) Cellular and synaptic mechanisms responsible for a long-lasting restructuring of the lobster pyloric network. *J Neurophysiol* 64:1574–1589.
- Horvath TL, Diano S (2004) The floating blueprint of hypothalamic feeding circuits. *Nat Rev Neurosci* 5:662–667.
- Hu EH, Pan F, Völgyi B, Bloomfield SA (2010) Light increases the gap junctional coupling of retinal ganglion cells. *J Physiol* 588:4145–4163.
- Ijspeert AJ, Crespi A, Ryczko D, Cabelguen J-M (2007) From Swimming to Walking with a Salamander Robot Driven by a Spinal Cord Model. *Science* 315:1416–1420.
- Inagaki HK, Ben-Tabou de-Leon S, Wong AM, Jagadish S, Ishimoto H, Barnea G, Kitamoto T, Axel R, Anderson DJ (2012) Visualizing neuromodulation in vivo: TANGO-mapping of dopamine signaling reveals appetite control of sugar sensing. *Cell* 148:583–595.
- Ito R, Dalley JW, Robbins TW, Everitt BJ (2002) Dopamine release in the dorsal striatum during cocaine-seeking behavior under the control of a drug-associated cue. *J Neurosci* 22:6247–6253.
- Jasinski PE, Molkov YI, Shevtsova NA, Smith JC, Rybak IA (2013) Sodium and calcium mechanisms of rhythmic bursting in excitatory neural networks of the pre-Bötzinger complex: a computational modelling study. *Eur J Neurosci* 37:212–230.
- Johnson BR, Harris-Warrick RM (1997) Amine modulation of glutamate responses from pyloric motor neurons in lobster stomatogastric ganglion. *J Neurophysiol* 78:3210–3221.
- Johnson BR, Kloppenburg P, Harris-Warrick RM (2003) Dopamine modulation of calcium currents in pyloric neurons of the lobster stomatogastric ganglion. *J Neurophysiol* 90:631–643.

- Johnson BR, Peck JH, Harris-Warrick RM (1993) Dopamine induces sign reversal at mixed chemical-electrical synapses. *Brain Res* 625:159–164.
- Johnson BR, Peck JH, Harris-Warrick RM (1995) Distributed amine modulation of graded chemical transmission in the pyloric network of the lobster stomatogastric ganglion. *J Neurophysiol* 74:437–452.
- Jordan LM, Liu J, Hedlund PB, Akay T, Pearson KG (2008) Descending command systems for the initiation of locomotion in mammals. *Netw Motion* 57:183–191.
- Kabotyanski EA, Baxter DA, Byrne JH (1998) Identification and characterization of catecholaminergic neuron B65, which initiates and modifies patterned activity in the buccal ganglia of *Aplysia*. *J Neurophysiol* 79:605–621.
- Kabotyanski EA, Baxter DA, Cushman SJ, Byrne JH (2000) Modulation of fictive feeding by dopamine and serotonin in *aplysia*. *J Neurophysiol* 83:374–392.
- Kachoei BA, Knox RJ, Uthusa D, Levy S, Kaczmarek LK, Magoski NS (2006) A store-operated Ca^{2+} influx pathway in the bag cell neurons of *Aplysia*. *J Neurophysiol* 96:2688–2698.
- Kadiri LR, Kwan AC, Webb WW, Harris-Warrick RM (2011) Dopamine-induced oscillations of the pyloric pacemaker neuron rely on release of calcium from intracellular stores. *J Neurophysiol*
- Kandel ER (2001) The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 294:1030–1038.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (2000) *Principles of neural science*. McGraw-Hill New York.
- Kao MH, Doupe AJ, Brainard MS (2005) Contributions of an avian basal ganglia–forebrain circuit to real-time modulation of song. *Nature* 433:638–643.
- Katz PS, Getting PA, Frost WN (1994) Dynamic neuromodulation of synaptic strength intrinsic to a central pattern generator circuit. *Nature* 367:729–731.
- Kloppenborg P, Levini RM, Harris-Warrick RM (1999) Dopamine modulates two potassium currents and inhibits the intrinsic firing properties of an identified motor neuron in a central pattern generator network. *J Neurophysiol* 81:29–38.
- Konorski, J. (1948). *Conditioned reflexes and neuronal organization* (New York: Cambridge University Press).
- Kramer RH, Zucker RS (1985) Calcium-dependent inward current in *Aplysia* bursting pace-maker neurones. *J Physiol* 362:107–130.
- Krasne FB (1969) Excitation and habituation of the crayfish escape reflex: the depolarizing response in lateral giant fibres of the isolated abdomen. *J Exp Biol* 50:29–46.
- Kreitzer AC, Malenka RC (2008) Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron* 60:543–554.
- Kristan WB (2008) Neuronal decision-making circuits. *Curr Biol* 18:928–932.
- Kupfermann I (1974) Feeding behavior in *Aplysia*: a simple system for the study of motivation. *Behav Biol* 10:1–26.
- Kupfermann I, Kandel ER (1969) Neuronal controls of a behavioral response mediated by the abdominal ganglion of *Aplysia*. *Science* 164:847–850.

- Lasater EM, Dowling JE (1985) Dopamine decreases conductance of the electrical junctions between cultured retinal horizontal cells. *Proc Natl Acad Sci* 82:3025–3029.
- Lechner HA, Byrne JH (1998) New perspectives on classical conditioning: a synthesis of Hebbian and non-Hebbian mechanisms. *Neuron* 20:355–358.
- Lechner HA, Baxter DA, Byrne JH (2000) Classical conditioning of feeding in *Aplysia*: II. Neurophysiological correlates. *J Neurosci* 20:3377–3386.
- Lee CR, Tepper JM (2007) A calcium-activated nonselective cation conductance underlies the plateau potential in rat substantia nigra GABAergic neurons. *J Neurosci* 27:6531–6541.
- Lei Y-T, Thuault SJ, Launay P, Margolskee RF, Kandel ER, Siegelbaum SA (2014) Differential contribution of TRPM4 and TRPM5 nonselective cation channels to the slow afterdepolarization in mouse prefrontal cortex neurons. *Front Cell Neurosci* 8:267
- Lenoir M, Serre F, Cantin L, Ahmed SH (2007) Intense sweetness surpasses cocaine reward. *PLoS One* 2:e698.
- Lewis D, Evans G, Wilson W (1984) Dopamine reduces slow outward current and calcium influx in burst-firing neuron R15 of *Aplysia*. *J Neurosci* 4:3014–3020.
- Lillvis JL, Katz PS (2013) Parallel Evolution of Serotonergic Neuromodulation Underlies Independent Evolution of Rhythmic Motor Behavior. *J Neurosci* 33:2709–2717.
- Loewenstein Y, Yarom Y, Sompolinsky H (2001) The generation of oscillations in networks of electrically coupled cells. *Proc Natl Acad Sci* 98:8095–8100.
- Lorenzetti FD, Baxter DA, Byrne JH (2008) Molecular mechanisms underlying a cellular analog of operant reward learning. *Neuron* 59:815–828.
- Lu B, Su Y, Das S, Liu J, Xia J, Ren D (2007) The neuronal channel NALCN contributes resting sodium permeability and is required for normal respiratory rhythm. *Cell* 129:371–383.
- Lupinsky DA, Magoski NS (2006) Ca²⁺-dependent regulation of a non-selective cation channel from *Aplysia* bag cell neurones. *J Physiol* 575:491–506.
- Marder E (2012) Neuromodulation of neuronal circuits: back to the future. *Neuron* 76:1–11.
- Marder E, Bucher D (2001) Central pattern generators and the control of rhythmic movements. *Curr Biol* 11:R986–R996.
- Marder E, Bucher D (2007) Understanding circuit dynamics using the stomatogastric nervous system of Lobsters and Crabs. *Annu Rev Physiol* 69:291–316.
- Martínez-Rubio C, Serrano GE, Miller MW (2009) Localization of biogenic amines in the foregut of *Aplysia californica*: catecholaminergic and serotonergic innervation. *J Comp Neurol* 514:329–342.
- McCrea DA (2001) Spinal circuitry of sensorimotor control of locomotion. *J Physiol* 533:41–50.
- Meech RW, Standen NB (1975) Potassium activation in *Helix aspersa* neurones under voltage clamp: a component mediated by calcium influx. *J Physiol* 249:211–259.
- Menzel R, Erber J (1978) Learning and memory in bees *Sci Am*. 239:80–87.
- Miller R (2008). A theory of the basal ganglia and their disorders. CRC Press: Boca Raton, FL

- Miller, J.P., and Selverston, A.I. (1982). Mechanisms underlying pattern generation in lobster stomatogastric ganglion as determined by selective inactivation of identified neurons. II. Oscillatory properties of pyloric neurons. *J. Neurophysiol.* 48, 1378–1391.
- Mink JW (1996) The basal ganglia: focused selection and inhibition of competing motor programs. *Prog Neurobiol* 50:381–425.
- Misell LM, Shaw BK, Kristan Jr WB (1998) Behavioral hierarchy in the medicinal leech, *Hirudo medicinalis*: feeding as a dominant behavior. *Behav Brain Res* 90:13–21.
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 78:189–225.
- Morisset V, Nagy F (1999) Ionic basis for plateau potentials in deep dorsal horn neurons of the rat spinal cord. *J Neurosci* 19:7309–7316.
- Morton D, Chiel H (1993) In vivo buccal nerve activity that distinguishes ingestion from rejection can be used to predict behavioral transitions in *Aplysia*. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 172:17–32.
- Mozzachiodi R, Byrne JH (2010) More than synaptic plasticity: role of nonsynaptic plasticity in learning and memory. *Trends Neurosci* 33:17–26.
- Mozzachiodi R, Lorenzetti FD, Baxter DA, Byrne JH (2008) Changes in neuronal excitability serve as a mechanism of long-term memory for operant conditioning. *Nat Neurosci* 11:1146–1148.
- Murphy GG, Glanzman DL (1996) Enhancement of sensorimotor connections by conditioning-related stimulation in *Aplysia* depends upon postsynaptic Ca^{2+} . *Proc Natl Acad Sci* 93:9931–9936.
- Mustard JA, Beggs KT, Mercer AR (2005) Molecular biology of the invertebrate dopamine receptors. *Arch Insect Biochem Physiol* 59:103–117.
- Nargeot R, Baxter DA, Byrne JH (1999a) In vitro analog of operant conditioning in *aplysia*. I. Contingent reinforcement modifies the functional dynamics of an identified neuron. *J Neurosci* 19:2247–2260.
- Nargeot R, Baxter DA, Byrne JH (1999b) In vitro analog of operant conditioning in *aplysia*. II. Modifications of the functional dynamics of an identified neuron contribute to motor pattern selection. *J Neurosci* 19:2261–2272.
- Nargeot R, Baxter DA, Patterson GW, Byrne JH (1999c) Dopaminergic synapses mediate neuronal changes in an analogue of operant conditioning. *J Neurophysiol* 81:1983–1987.
- Nargeot R, Le Bon-Jego M, Simmers J (2009) Cellular and network mechanisms of operant learning-induced compulsive behavior in *Aplysia*. *Curr Biol* 19:975–984.
- Nargeot R, Moulins M (1997) Sensory-induced plasticity of motor pattern selection in the lobster stomatogastric nervous system. *Eur J Neurosci* 9:1636–1645.
- Nargeot R, Petrissans C, Simmers J (2007) Behavioral and in vitro correlates of compulsive-like food seeking induced by operant conditioning in *Aplysia*. *J Neurosci* 27:8059–8070.
- Nargeot R, Simmers J (2012) Functional organization and adaptability of a decision-making network in *Aplysia*. *Front Neurosci* 6:113
- Nikitin ES, Balaban PM, Kemenes G (2013) Nonsynaptic plasticity underlies a compartmentalized increase in synaptic efficacy after classical conditioning. *Curr Biol* 23:614–619.

- Nikitin ES, Vavoulis DV, Kemenes I, Marra V, Pirger Z, Michel M, Feng J, O'Shea M, Benjamin PR, Kemenes G (2008) Persistent sodium current is a nonsynaptic substrate for long-term associative memory. *Curr Biol* 18:1221–1226.
- Nilius B, Talavera K, Owsianik G, Prenen J, Droogmans G, Voets T (2005) Gating of TRP channels: a voltage connection? *J Physiol* 567:35–44.
- Nusbaum MP, Beenhakker MP (2002) A small-systems approach to motor pattern generation. *Nature* 417:343–350.
- Olds J, Milner P (1954) Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J Comp Physiol Psychol* 47:419.
- Pape H-C (1996) Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annu Rev Physiol* 58:299–327.
- Partridge L, Swandulla D (1988) Calcium-activated non-specific cation channels. *Trends Neurosci* 11:69–72.
- Pearson KG (2000) Neural adaptation in the generation of rhythmic behavior. *Annu Rev Physiol* 62:723–753.
- Pearson KG, Collins DF (1993) Reversal of the influence of group Ib afferents from plantaris on activity in medial gastrocnemius muscle during locomotor activity. *J Neurophysiol* 70:1009–1017.
- Peck JW, Novin D (1971) Evidence that osmoreceptors mediating drinking in rabbits are in the lateral preoptic area. *J Comp Physiol Psychol* 74:134.
- Pereda A, Triller A, Korn H, Faber DS (1992) Dopamine enhances both electrotonic coupling and chemical excitatory postsynaptic potentials at mixed synapses. *Proc Natl Acad Sci* 89:12088–12092.
- Perisse E, Raymond-Delpech V, Néant I, Matsumoto Y, Leclerc C, Moreau M, Sandoz J-C (2009) Early calcium increase triggers the formation of olfactory long-term memory in honeybees. *BMC Biol* 7:30.
- Pierrefiche O, Champagnat J, Richter DW (1995) Calcium-dependent conductances control neurones involved in termination of inspiration in cats. *Neurosci Lett* 184:101–104.
- Pilla M, Perachon S, Sautel F, Garrido F, Mann A, Wermuth CG, Schwartz J-C, Everitt BJ, Sokoloff P (1999) Selective inhibition of cocaine-seeking behaviour by a partial dopamine D3 receptor agonist. *Nature* 400:371–375.
- Plaçais P-Y, Trannoy S, Isabel G, Aso Y, Siwanowicz I, Belliart-Guérin G, Vernier P, Birman S, Tanimoto H, Preat T (2012) Slow oscillations in two pairs of dopaminergic neurons gate long-term memory formation in *Drosophila*. *Nat Neurosci* 15:592–599.
- Prinz AA, Bucher D, Marder E (2004) Similar network activity from disparate circuit parameters. *Nat Neurosci* 7:1345–1352.
- Quinn WG, Harris WA, Benzer S (1974) Conditioned behavior in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 71:708–712.
- Ransdell JL, Temporal S, West NL, Leyrer ML, Schulz DJ (2013) Characterization of inward currents and channels underlying burst activity in motoneurons of crab cardiac ganglion. *J Neurophysiol* 110:42–54.

- Razani-Boroujerdi S, Partridge LD (1993) Activation and modulation of calcium-activated non-selective cation channels from embryonic chick sensory neurons. *Brain Res* 623:195–200
- Reyes FD, Mozzachiodi R, Baxter DA, Byrne JH (2005) Reinforcement in an in vitro analog of appetitive classical conditioning of feeding behavior in *Aplysia*: blockade by a dopamine antagonist. *Learn Mem* 12:216–220.
- Reynolds JN, Hyland BI, Wickens JR (2001) A cellular mechanism of reward-related learning. *Nature* 413:67–70.
- Ribelayga C, Cao Y, Mangel SC (2008) The circadian clock in the retina controls rod-cone coupling. *neuron* 59:790–801.
- Rubin JE, Hayes JA, Mendenhall JL, Del Negro CA (2009) Calcium-activated nonspecific cation current and synaptic depression promote network-dependent burst oscillations. *Proc Natl Acad Sci* 106:2939–2944.
- Russell DF, Hartline DK (1978) Bursting neural networks: a reexamination. *Science* 200:453–456.
- Saper CB, Chou TC, Elmquist JK (2002) The need to feed. *Neuron* 36:199–211.
- Scharfman HE, Sarvey JM (1985) Postsynaptic firing during repetitive stimulation is required for long-term potentiation in hippocampus. *Brain Res* 331:267–274.
- Schiffmann SN, Lledo P-M, Vincent J-D (1995) Dopamine D1 receptor modulates the voltage-gated sodium current in rat striatal neurones through a protein kinase A. *J Physiol* 483:95–107.
- Schultz W, Apicella P, Ljungberg T, Romo R, Scarnati E (1993) Reward-related activity in the monkey striatum and substantia nigra. *Prog Brain Res* 99:227–235.
- Schwarz M, Susswein AJ (1986) Identification of the neural pathway for reinforcement of feeding when *Aplysia* learn that food is inedible. *J Neurosci* 6:1528–1536.
- Selverston AI, Rabinovich MI, Abarbanel HD, Elson R, Szücs A, Pinto RD, Huerta R, Varona P (2000) Reliable circuits from irregular neurons: a dynamical approach to understanding central pattern generators. *J Physiol Paris* 94:357–374.
- Serrano GE, Martinez-Rubio C, Miller MW (2007) Endogenous motor neuron properties contribute to a program-specific phase of activity in the multifunctional feeding central pattern generator of *Aplysia*. *J Neurophysiol* 98:29–42.
- Serrano GE, Miller MW (2006) Conditional rhythmicity and synchrony in a bilateral pair of bursting motor neurons in *Aplysia*. *J Neurophysiol* 96:2056–2071.
- Sharp AA, Abbott L, Marder E (1992) Artificial electrical synapses in oscillatory networks. *J Neurophysiol* 67:1691–1694.
- Sharp AA, Skinner FK, Marder E (1996) Mechanisms of oscillation in dynamic clamp constructed two-cell half-center circuits. *J Neurophysiol* 76:867–883.
- Sherrington CS. *The integrative action of the nervous system*. New Haven, CT:Yale University Press; 1906.
- Sieling F, Bédécarrats A, Simmers J, Prinz AA, Nargeot R (2014) Differential roles of nonsynaptic and synaptic plasticity in operant reward learning-induced compulsive behavior. *Curr Biol* 24:941–950.
- Skinner BF (1938) *The behavior of organisms: An experimental analysis*.

- Skinner BF (1945) The operational analysis of psychological terms. *Psychol Rev* 52:270.
- Smith-Roe SL, Kelley AE (2000) Coincident activation of NMDA and dopamine D1 receptors within the nucleus accumbens core is required for appetitive instrumental learning. *J Neurosci* 20:7737–7742.
- Spencer WA, Thompson RF, Neilson DR (1966). Decrement of ventral root electrotonus and intracellularly recorded PSPs produced by iterated cutaneous afferent volleys. *J Neurophysiol* 29:253–274.
- Steinberg EE, Boivin JR, Saunders BT, Witten IB, Deisseroth K, Janak PH (2014) Positive reinforcement mediated by midbrain dopamine neurons requires D1 and D2 receptor activation in the nucleus accumbens. *PLoS ONE* 9:e94771.
- Surmeier DJ, Bargas J, Hemmings Jr HC, Nairn AC, Greengard P (1995) Modulation of calcium currents by a D1 dopaminergic protein kinase/phosphatase cascade in rat neostriatal neurons. *Neuron* 14:385–397.
- Surmeier DJ, Carrillo-Reid L, Bargas J (2011) Dopaminergic modulation of striatal neurons, circuits, and assemblies. *Neuroscience* 198:3–18.
- Susswein AJ, Hurwitz I, Thorne R, Byrne JH, Baxter DA (2002) Mechanisms underlying fictive feeding in *Aplysia*: Coupling between a large neuron with plateau potentials activity and a spiking neuron. *J Neurophysiol* 87:2307–2323.
- Svirskis G, Hounsgaard J (1997) Depolarization-induced facilitation of a plateau-generating current in ventral horn neurons in the turtle spinal cord. *J Neurophysiol* 78:1740–1742.
- Tabak J, Tomaiuolo M, Gonzalez-Iglesias AE, Milesu LS, Bertram R (2011) Fast-activating voltage- and calcium-dependent potassium (BK) conductance promotes bursting in pituitary cells: a dynamic clamp study. *J Neurosci* 31:16855–16863.
- Tazerart S, Vinay L, Brocard F (2008) The persistent sodium current generates pacemaker activities in the central pattern generator for locomotion and regulates the locomotor rhythm. *J Neurosci* 28:8577–8589.
- Thompson RF, McCormick DA, Lavond DG, Clark GA, Kettner RE, Mauk MD (1983) Initial localization of the memory trace for a basic form of associative learning. *Prog Psychobiol Physiol Psychol* 10:167–196.
- Tritsch NX, Sabatini BL (2012) Dopaminergic modulation of synaptic transmission in cortex and striatum. *Neuron* 76:33–50.
- Van Swinderen B, Andretic R (2011) Dopamine in *Drosophila*: setting arousal thresholds in a miniature brain. *Proc R Soc B Biol Sci* 278:906–913.
- Varona P, Torres JJ, Huerta R, Abarbanel HD, Rabinovich MI (2001) Regularization mechanisms of spiking–bursting neurons. *Neural Netw* 14:865–875.
- Venaille A, Varona P, Rabinovich MI (2005) Synchronization and coordination of sequences in two neural ensembles. *Phys Rev* 71:061909.
- Vergoz V, Roussel E, Sandoz J-C, Giurfa M (2007) Aversive learning in honeybees revealed by the olfactory conditioning of the sting extension reflex. *PLoS One* 2:e288.
- Verschure PFMJ, Pennartz CMA, Pezzulo G (2014) The why, what, where, when and how of goal-directed choice: neuronal and computational principles. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 369:20130483–20130483.

- Walters ET, Byrne JH (1983) Associative conditioning of single sensory neurons suggests a cellular mechanism for learning. *Science* 219:405–408.
- Wilson GF, Richardson FC, Fisher TE, Olivera BM, Kaczmarek LK (1996) Identification and characterization of a Ca^{2+} -sensitive nonspecific cation channel underlying prolonged repetitive firing in *Aplysia* neurons. *J Neurosci* 16:3661–3671.
- Wilson GF, Magoski NS, Kaczmarek LK (1998) Modulation of a calcium-sensitive nonspecific cation channel by closely associated protein kinase and phosphatase activities. *Proc Natl Acad Sci* 95:10938–10943.
- Wise RA (2004) Dopamine, learning and motivation. *Nat Rev Neurosci* 5:483–494.
- Wise RA (2006) Role of brain dopamine in food reward and reinforcement. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 361:1149–1158.
- Wise RA (2009) Roles for nigrostriatal—not just mesocorticolimbic—dopamine in reward and addiction. *Trends Neurosci* 32:517–524.
- Wu HG, Miyamoto YR, Castro LNG, Ölveczky BP, Smith MA (2014) Temporal structure of motor variability is dynamically regulated and predicts motor learning ability. *Nat Neurosci* 17:312–321.
- Wu J-S, Wang N, Siniscalchi MJ, Perkins MH, Zheng Y-T, Yu W, Chen S -a., Jia R -n., Gu J-W, Qian Y-Q, Ye Y, Vilim FS, Cropper EC, Weiss KR, Jing J (2014) Complementary interactions between command-like interneurons that function to activate and specify motor programs. *J Neurosci* 34:6510–6521.
- Yao W-D, Gainetdinov RR, Arbuckle MI, Sotnikova TD, Cyr M, Beaulieu J-M, Torres GE, Grant SG, Caron MG (2004) Identification of PSD-95 as a regulator of dopamine-mediated synaptic and behavioral plasticity. *Neuron* 41:625–638.
- Zhao S, Golowasch J, Nadim F (2010) Pacemaker neuron and network oscillations depend on a neuromodulator-regulated linear current. *Front Behav Neurosci* 4:21.
- Zhou C, Rao Y, Rao Y (2008) A subset of octopaminergic neurons are important for *Drosophila* aggression. *Nat Neurosci* 11:1059–106.

Annexes

Differential Roles of Nonsynaptic and Synaptic Plasticity in Operant Reward Learning-Induced Compulsive Behavior

Fred Sieling,^{1,2,3,5} Alexis Bédécarrats,^{1,2,5} John Simmers,^{1,2} Astrid A. Prinz,⁴ and Romuald Nargeot^{1,2,*}

¹Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine (INCIA), Université de Bordeaux, UMR 5287, 33000 Bordeaux, France

²CNRS, INCIA, UMR 5287, 33000 Bordeaux, France

³Wallace H. Coulter Department of Biomedical Engineering, Georgia Institute of Technology and Emory University, Atlanta, GA 30332, USA

⁴Department of Biology, Emory University, Atlanta, GA 30322, USA

Summary

Background: Rewarding stimuli in associative learning can transform the irregularly and infrequently generated motor patterns underlying motivated behaviors into output for accelerated and stereotyped repetitive action. This transition to compulsive behavioral expression is associated with modified synaptic and membrane properties of central neurons, but establishing the causal relationships between cellular plasticity and motor adaptation has remained a challenge.

Results: We found previously that changes in the intrinsic excitability and electrical synapses of identified neurons in *Aplysia*'s central pattern-generating network for feeding are correlated with a switch to compulsive-like motor output expression induced by in vivo operant conditioning. Here, we used specific computer-simulated ionic currents in vitro to selectively replicate or suppress the membrane and synaptic plasticity resulting from this learning. In naive in vitro preparations, such experimental manipulation of neuronal membrane properties alone increased the frequency but not the regularity of feeding motor output found in preparations from operantly trained animals. On the other hand, changes in synaptic strength alone switched the regularity but not the frequency of feeding output from naive to trained states. However, simultaneously imposed changes in both membrane and synaptic properties reproduced both major aspects of the motor plasticity. Conversely, in preparations from trained animals, experimental suppression of the membrane and synaptic plasticity abolished the increase in frequency and regularity of the learned motor output expression.

Conclusions: These data establish direct causality for the contributions of distinct synaptic and nonsynaptic adaptive processes to complementary facets of a compulsive behavior resulting from operant reward learning.

Introduction

Appetitive reward-dependent learning favors the development of stereotyped recurrent actions underlying habitual and compulsive behaviors such as those related to drug addiction and eating disorders [1, 2]. Several forms of neuronal

plasticity, involving both synaptic and nonsynaptic properties and often induced by reward-triggered release of dopamine in central decision-making networks, are thought to contribute to these behavioral changes [3–5]. However, establishing a causal link between the cellular and behavioral levels has remained challenging. Thus, although an increasing amount of data indicates that alterations in neuronal excitability and synaptic strength are conferred by learning [6–8], it remains unclear how and to what extent either form of plasticity is actually responsible for the behavioral outcome. In particular, the relative contributions of operant conditioning-induced changes in identified central nervous circuitry to the transition from an infrequent and variable motivated act to accelerated, compulsive-like recurrences remain poorly understood.

Feeding behavior in the mollusk *Aplysia* is modified by several forms of associative learning, including classical and operant conditioning, which alter the central decision-making processes underlying the selection and initiation of feeding actions [9–11]. In a form of operant conditioning, the contingent association for 30–40 min of a food reward with spontaneous biting movements of the animal's tongue-like radula transforms for several hours the otherwise slow and erratic genesis of buccal movements into an accelerated and stereotyped rhythmic expression that closely resembles other appetitive reward-induced patterns of compulsive behavior [12]. Importantly, neural correlates of these learning-induced changes in *Aplysia*'s feeding-related behavior continue to be expressed by the underlying central pattern-generating (CPG) circuitry of the isolated buccal ganglia, thereby enabling electrophysiological analysis at the level of identified neurons and synaptic connectivity [13]. The behavioral adaptation to operant conditioning is associated with several forms of plasticity, including changes in membrane input conductance, excitability, and the strength of electrical coupling among a decision-making subset of buccal CPG neurons [14]. These cellular and synaptic modifications are similarly evoked in vitro by contingent electrical stimulation of a dopamine input nerve that conveys the rewarding stimulus in vivo and are blocked by dopamine receptor antagonists, thereby indicating a mediating role for dopaminergic modulation [15].

Despite the correlation between cellular/circuit plasticity and operant conditioning-induced changes in *Aplysia*'s food seeking, a causal relationship between the two remains to be established. Here, using the dynamic-clamp technique, in which simulated membrane and synaptic currents are artificially added to or subtracted from neurons [16–18], we examined whether selective changes in single conductances governing cell excitability and electrical coupling are responsible for the associative modification of feeding circuit output and behavior. Specifically, by enhancing or diminishing neuronal excitability and coupling strengths in real time, separately or in combination, in isolated neuronal preparations from both naive and operantly trained animals, we were able to directly test causation and determine the respective contributions of synaptic and nonsynaptic processes by which associative learning leads to the frequent and repetitive expression of a behavior.

⁵Co-first author

*Correspondence: romuald.nargeot@u-bordeaux2.fr



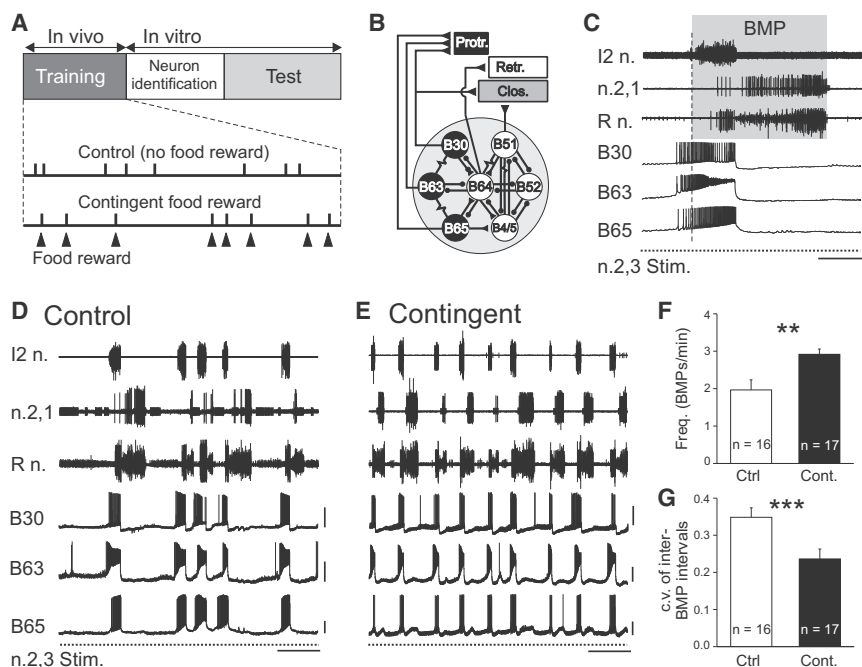


Figure 1. Operant Learning-Induced Acceleration and Regularization of Buccal Motor Pattern Genesis and Underlying Bursting in "Decision-Making" Central Pattern-Generating Neurons

(A) Experimental protocol. During 30 min training, naive (control) and contingently trained (contingent) animals received a continuous uningested food stimulus (horizontal line) to incite radula biting movements (vertical bars). In the contingent group, an additional food reward was delivered (arrowheads) in association with each spontaneous bite. Following buccal ganglia isolation, the neural correlates of biting movements were tested ≤ 4 hr after in vivo training.

(B) Schematic of buccal central pattern generator (CPG; large gray circle) that drives protraction (Protr.), retraction (Retr.), and closure (Clos.) phases of the buccal motor pattern (BMP) for each bite cycle. Crucial network components are the electrically coupled B63/B30/B65 neurons (black circles), whose bursting initiates each BMP (electrical synapse, resistor symbol; chemical inhibition and excitation, filled circles and triangles respectively).

(C) Extracellular recordings of a BMP (protraction, retraction, and closure phases recorded from motor nerves I2 n., n.2,1, and R n.) and associated bursts recorded intracellularly from B63/B30/B65 during tonic stimulation (2 Hz, 8 V)

of sensory nerve 2,3 (n.2,3 Stim.). Burst onset in the three neurons preceded BMP onset (dashed vertical line). Horizontal and vertical scale bars represent 5 s and 25 mV, respectively.

(D–G) Repetitive BMPs and B63/B30/B65 bursting in control (D) and contingent (E) preparations under identical n.2,3 stimulation. Horizontal and vertical scale bars represent 30 s and 20 mV, respectively. BMP cycle frequency (F) and coefficient of variation (c.v.) of inter-BMP intervals (G) were increased and decreased, respectively, in the contingent as compared with the control group. Two-tailed Mann-Whitney test: $T = 202.5$, $p = 0.013$ (F); $T = 348$, $p = 0.007$ (G).

Group data show means $\pm$ SEM and individual sample sizes. $**p < 0.025$; $***p < 0.01$.

Results

Learning-Induced Acceleration and Regularization of Buccal Motor Patterns and Associated Neuronal Plasticity

To examine the causal relationship between changes in cellular properties and the operant learning-induced transition of radula biting movements from an impulsive- to compulsive-like expression, we subjected two groups of animals to different training protocols for 30 min (Figure 1A). In both groups, a continuous, noningested food stimulus was used to incite food-seeking behavior. In a control group, animals were exposed solely to this stimulus, whereas a contingent group additionally received an ingestible food reward that was contingent on each spontaneous radula bite occurrence, so as to reproduce the action/reward association of operant conditioning [12]. The neural plasticity resulting from this appetitive procedure is evident in the radula motor patterns expressed by the buccal ganglia of the two animal groups after isolation in vitro. Here, tonic electrical stimulation of the buccal nerve n.2,3 to mimic the inciting food stimulus applied in vivo [12] elicited repetitive buccal motor patterns (BMPs) recorded from buccal motor nerves (see Figures 1C–1E), with each BMP corresponding to the motor drive for a single radula bite. BMP activation depends critically on a subset of "decision-making" neurons (B30/B63/B65) that are components of the buccal CPG (Figure 1B). Neurons B30 and B65 are electrically coupled to neuron B63, but no direct connection exists between B30 and B65. Spontaneous impulse bursts in this neuronal group are the primary instigators of each movement cycle (Figure 1C) [13]. In isolated preparations from control animals, so-called "fictive" bites and associated burst discharge in the B30/

B63/B65 cells are generated at irregular intervals and relatively infrequently, as typically seen in the exploratory food-seeking behavior of untrained animals (Figure 1D) [12]. In contrast, in vitro preparations from the contingent group spontaneously produced BMPs and underlying B30/B63/B65 cell bursts at a significantly higher rate (Figures 1E and 1F) and with a stereotyped rhythmic organization (Figures 1E and 1G), corresponding to the behavioral changes that occur after contingent training in vivo [12]. We established previously that noncontingently reinforced animals (i.e., animals subjected to food reward delivery uncorrelated with bite occurrences) and their neural correlates of feeding in vitro were no different from untrained controls [12, 14]; therefore, the plasticity observed here must have resulted strictly from the associative effects of training.

The operant conditioning-dependent acceleration and regularization of BMP genesis is accompanied by alterations in the membrane and synaptic properties of the pattern-initiating B30/B63/B65 neurons. Neuronal excitability, as measured by the minimum amount of intrasomatic current injection necessary to reach threshold for impulse firing, similarly increased (i.e., spike threshold decreased) in all three cell types in contingent as compared with control preparations (Figures 2A and 2B). Corresponding with this excitability increase, the input conductance of these neurons decreased with operant conditioning (Figures 2C and 2D). Concomitantly, learning also enhanced the electrical synaptic coupling between B63/B30 and B63/B65 cell pairs, as illustrated in Figure 2D, where the voltage deflection of postjunctional B65 neurons in response to the same (-10 nA) hyperpolarizing current pulse injected into prejunctional B63 partners was stronger in a contingent

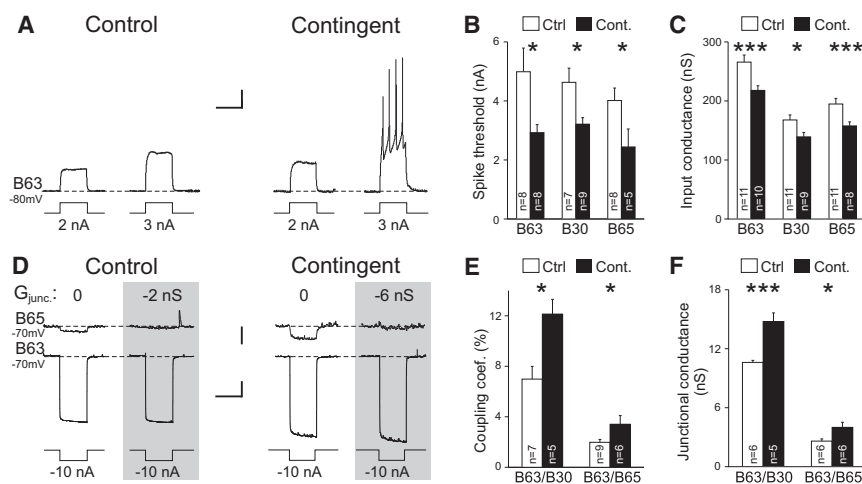


Figure 2. Learning-Induced Increase in B63/B30/B65 Membrane Excitability and Strength of Electrical Coupling

(A–C) Nonsynaptic plasticity.

(A) Spike threshold of a B63 cell, determined by injecting depolarizing current pulses of increasing intensity, was lower in a contingent than in a control preparation. Horizontal and vertical scale bars represent 1 s and 10 mV, respectively.

(B and C) Both spike threshold (B) and input conductance (C) were significantly lower in contingent preparations for each cell type. Two-tailed Mann-Whitney test: spike threshold, B63: $T = 87.5$, $p = 0.038$; B30: $T = 81$, $p = 0.026$; B65: $T = 21$, $p = 0.048$; input conductance, B63: $T = 70$, $p = 0.005$; B30: $T = 67$, $p = 0.04$; B65: $T = 47$, $p = 0.007$.

(D–F) Synaptic plasticity.

(D) Learning-dependent enhancement of electrical coupling between the B63/B65 cells as revealed by the B65 response to hyperpolarizing

current pulse injection (-10 nA) into prejunctional B63 in control and contingent preparations (unshaded panels). The natural junctional conductance in each case was determined by the amount of positive artificial junctional conductance that was subtracted by dynamic clamp to negate (here -2 nS and -6 nS) the B65 response to B63 hyperpolarization (shaded panels). Horizontal and vertical scale bars represent 1 s and 5 mV (B65) or 10 mV (B63), respectively. (E and F) The coupling coefficient (E) and junctional conductance (F) for B63/B65 and B63/B30 were significantly higher in the contingent than in the control groups. Two-tailed Mann-Whitney test: coupling coefficient, B63/B65: $T = 66$, $p = 0.037$; B63/B30: $T = 48$, $p = 0.01$; junctional conductance, B63/B65: $T = 26$, $p = 0.041$; B65/B30: $T = 45$, $p = 0.004$.

Group data show means $\pm$ SEM and individual sample sizes. * $p < 0.05$; *** $p < 0.01$.

than in a control preparation. This connectivity enhancement is further evident from group comparisons of the coupling coefficients (Figure 2E).

This change in electrical coupling could have two origins: a decrease in input conductance that indirectly alters the strength of the neurons' junctional pathway, and/or a direct increase in the junctional conductance itself [19]. To determine whether the latter mechanism, in addition to the observed input conductance decrease (see above), also contributed to the learning-derived increase in neuronal coupling, we used a dynamic-clamp procedure in which an artificial negative junctional conductance (G_{junc}) was introduced to nullify, thereby providing a measure of, the naturally existing conductance. In the control and contingent preparations of Figure 2D (shaded panels), a G_{junc} of -2 nS and -6 nS, respectively, was required to negate functional coupling between the B63/B65 neurons. Similarly, group data comparison indicated that the natural junctional conductance increased significantly in both the B63/B65 and B63/B30 synapses of contingent as compared with control preparations (Figure 2F). Thus, in addition to altering the intrinsic membrane properties of the BMP-initiating neurons, operant conditioning directly modifies the strength of their electrical connections.

Increase in B30/B63/B65 Excitability Increases the Frequency of BMP Genesis

To assess the respective contributions of changes in biophysical properties and electrical synapses to the learning-induced acquisition of accelerated, regularized BMP expression, we introduced artificial conductances by dynamic clamp into the B30/B63/B65 neurons of naive control preparations in which BMP genesis was infrequent and irregular. Although the exact nature of the current (or currents) modulated by operant learning was not investigated, an increase in a neuron's excitability associated with an input conductance decrease is most likely attributable to a decrease in membrane "leak" conductance, the mainly K^+ outward current that contributes to setting neuronal resting membrane potential and excitability

[20]. To test this possibility, we experimentally manipulated the natural leak conductance (G_{leak}) of individual B30/B63/B65 neurons with simulated G_{leak} by dynamic clamp (Figure 3A). In all cases, adding or subtracting artificial G_{leak} in parallel with the natural conductance caused a proportional increase or decrease, respectively, in the injected cell's input conductance (see Figures S1A and S1B available online), as predicted by the rule of G value addition in a parallel electrical circuit. As expected by such changes in G_{leak} , the excitability of the neurons (as indicated by alterations in their spike threshold) also increased or decreased linearly with the artificial conductance's absolute value (Figures 3B and 3C). Finally, as predicted by the theoretical relationship between the coupling coefficient and input conductance of two electrically coupled cells, artificial G_{leak} manipulation of a postjunctional neuron also indirectly affected the coupling with a prejunctional partner (Figure 3D; see also Figure S1C). For example, a dynamic-clamp-defined G_{leak} of -60 nS, which significantly decreased the input conductance and spike threshold of BMP-initiating neurons (see Figures 3B and 3C), additionally caused an increase in the coupling coefficient with the prejunctional cell of each pair (Friedman test and post hoc Newman-Keuls test for B63: input conductance, $\chi^2 = 40.0$, $p < 0.001$, $q = 5.196$, $p < 0.05$; spike threshold, $\chi^2 = 38.512$, $p < 0.001$, $q = 5.367$, $p < 0.05$; coupling coefficient B63/30, $\chi^2 = 35.612$, $p < 0.001$, $q = 4.648$, $p < 0.05$; coupling coefficient B63/B65, $\chi^2 = 32$, $p < 0.001$, $q = 5.023$, $p < 0.05$; similar data were also observed with dynamic-clamp manipulation of B30 and B65). These results therefore indicate that an experimentally imposed decrease in membrane leak conductances of the B30/B63/B65 neurons reproduces much of the cellular plasticity induced by operant conditioning, but not the observed increase in junctional conductances.

To further assess the impact of these biophysical changes on actual BMP genesis, we manipulated the G_{leak} of B30/B63/B65 cells in control preparations during ongoing buccal CPG activity elicited by tonic stimulation of n.2,3. A concurrent dynamic-clamp-imposed reduction of G_{leak} in the three

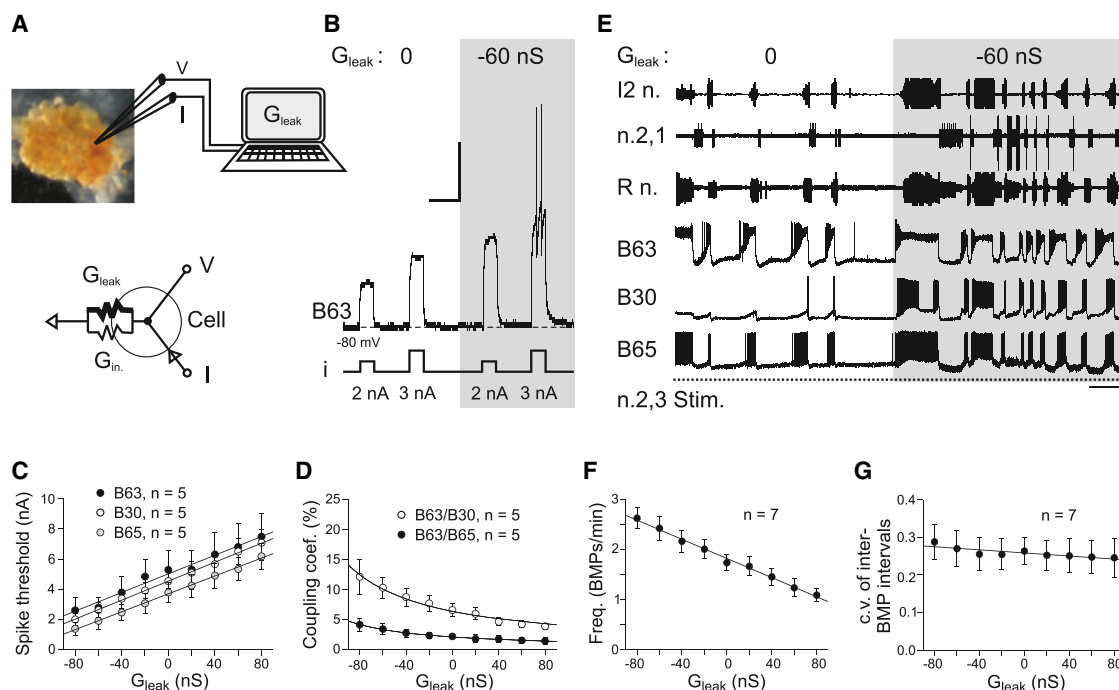


Figure 3. An Artificial Increase in the Excitability of B63/B30/B65 Neurons in Naive Control Preparations Mimics the Learning-Induced Increase in Frequency, but Not the Regularity, of BMP Genesis

(A) Experimental protocol and equivalent electrical circuit for the addition of a dynamic-clamp-defined leak conductance (G_{leak}) to the natural input conductance (G_{in}) of an individual neuron.

(B) Introduction of an artificial G_{leak} of -60 nS (shaded panel) increased the excitability of a target B63 neuron (indicated by a decrease in spike threshold) compared with that arising from the natural leak conductance alone (i.e., G_{leak} : 0 nS). Horizontal and vertical scale bars represent 2 s and 20 mV, respectively.

(C and D) Relationship between G_{leak} and spike threshold of B63/B30/B65 (C; data fitting, B63: $r^2 = 0.977$, $p < 0.0001$; B30: $r^2 = 0.998$, $p < 0.0001$; B65: $r^2 = 0.998$, $p < 0.0001$) and coupling coefficients for the B63/B65 and B63/B30 cell pairs (D; data fitting, B63/B65: $r^2 = 0.995$, $p < 0.0001$; B63/B30: $r^2 = 0.981$, $p < 0.0001$). In (C), G_{leak} was introduced into one of B63, B30, or B65. In (D), G_{leak} was introduced into a B63 and current pulses for measuring coupling coefficients were injected into either postjunctional B30 or B65. (For details, see Figure S1.)

(E) In a control preparation, the frequency, but not the regularity, of spontaneous BMP genesis and associated spike bursts in B63/B30/B65 increased in response to a dynamic-clamp-defined G_{leak} of -60 nS (shaded panel) introduced simultaneously into the three neurons. Horizontal and vertical scale bars represent 30 s and 25 mV, respectively.

(F and G) Quantification of changes in frequency (F), but not irregularity (G), of BMP generation for different values of artificial G_{leak} added simultaneously to the three neurons.

Group data show means $\pm$ SEM and individual sample sizes.

neurons caused an immediate increase in the frequency of BMP expression (Figure 3E). This rate increase, which persisted for the duration of G_{leak} introduction, varied proportionately according to the artificial conductance's sign and value (Figure 3F). Consequently, a reduction of G_{leak} by -60 nS, which reproduced most aspects of the learning-induced cellular plasticity (see above), significantly increased the frequency of BMP expression from that immediately preceding G_{leak} manipulation (Friedman test and post hoc Newman-Keuls test: $\chi^2 = 46.816$, $p < 0.001$ and G_{leak} -60 nS versus 0 nS, $q = 6.002$, $p < 0.05$). In contrast, the imposed reduction in G_{leak} did not replicate the learning-induced switch to stereotyped, regular BMP generation: the coefficient of variation of inter-BMP intervals was not significantly modified by dynamic-clamp G_{leak} ranging from -80 to $+80$ nS (Figure 3G; Friedman test: $\chi^2 = 6.019$, $p = 0.645$). Thus, a change in the leak conductance of the three CPG cell types that drive BMP genesis reproduces important aspects of the cellular and motor plasticity induced by operant learning, but not the motor program's regularization (cf. Figures 1D and 1E).

Selective Strengthening of the Junctional Coupling between B63/B30 and B63/B65 Regularizes BMP Genesis

To test the specific effect of changes in electrical connectivity between the decision neurons on their membrane properties and BMP expression, an artificial junctional conductance ($G_{junc.}$) was introduced via dynamic clamp to these cells in the control preparations. The injection of positive $G_{junc.}$ increased the electrical coupling of a neuron pair as indicated by the increased hyperpolarization of a postjunctional neuron in response to the same-sized negative current pulse (-10 nA) injected into its prejunctional partner (Figures 4A and 4B). The relationship between coupling coefficient and $G_{junc.}$ values fitted that predicted by the theoretical equation linking this coefficient and the conductances of two electrically coupled neurons (Figure 4C; see Experimental Procedures; B63/B65, $r^2 = 0.999$, $p < 0.0001$; B63/B30i, $r^2 = 0.998$, $p < 0.0001$). Specifically, the coupling coefficient increased significantly from its initial value when $G_{junc.}$ reached $\geq +5$ nS (Friedman test: B63/B30, $\chi^2 = 47.778$, $p < 0.001$; B63/B65, $\chi^2 = 48.000$, $p < 0.001$; post hoc Newman-Keuls test for $G_{junc.} = +5$ nS versus 0 nS: B63/B30, $q = 3.464$, $p < 0.05$; B63/B65, $q = 3.464$, $p < 0.05$).

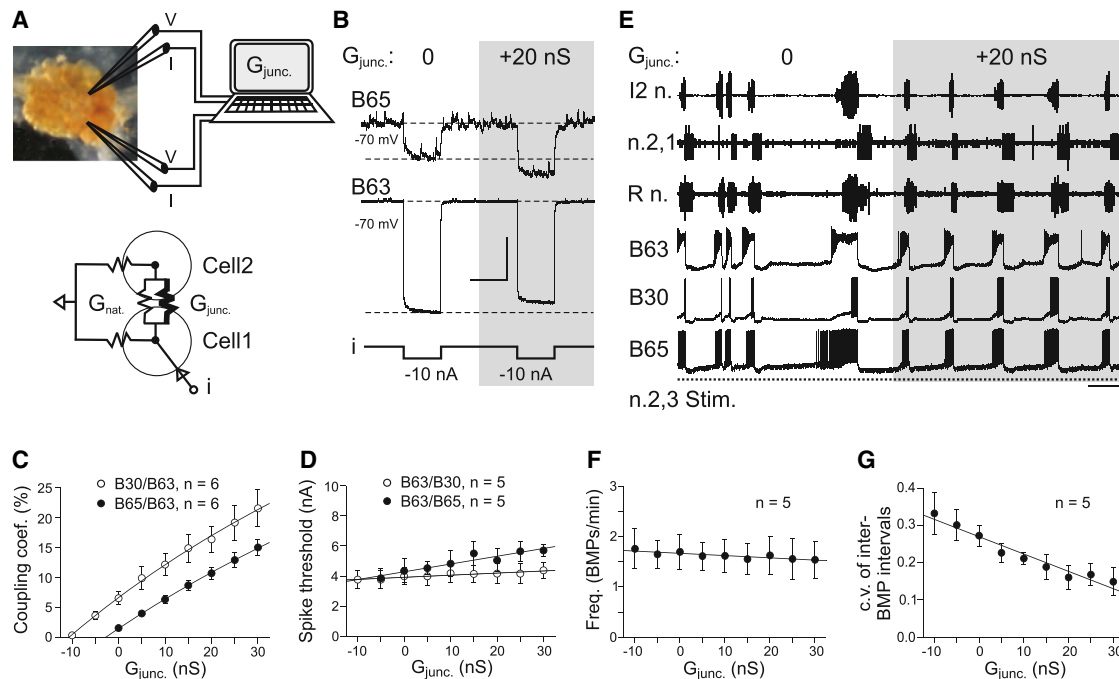


Figure 4. An Artificial Strengthening of the Electrical Synapses among B63/B30/B65 Neurons in Control Preparations Mimics the Learning-Induced Increase in Regularity, but Not the Frequency, of BMP Genesis

(A) Equivalent circuit for the addition of a dynamic-clamp-defined junctional conductance ($G_{\text{junc.}}$) to the natural junctional conductance ($G_{\text{nat.}}$) between a pair of electrically coupled cells.
(B) Introduction of an artificial $G_{\text{junc.}}$ (+20 nS, shaded panel) increased the electrical coupling between a B63/B65 cell pair compared with that arising from the natural conductance alone (i.e., $G_{\text{junc.}}$: 0 nS). Horizontal and vertical scale bars represent 2 s and 2 mV (B65) or 20 mV (B63), respectively.
(C and D) Quantification of the effects of changes in $G_{\text{junc.}}$ on the coupling coefficients of the B65/B63 and B30/B63 cell pairs (C), and on the spike threshold of B63 (D).
(E) The regularity, but not the frequency, of BMP genesis and associated B63/B30/B65 spike bursts increased in response to an artificial $G_{\text{junc.}}$ (+20 nS, shaded panel) introduced simultaneously into the B63/B30 and B63/B65 cell pairs. Horizontal and vertical scale bars represent 30 s and 25 mV, respectively.
(F and G) Quantification of the effects of $G_{\text{junc.}}$ on the frequency (F) and coefficient of variation (G) of BMP generation.
Group data show means $\pm$ SEM and individual sample sizes.

However, in direct contrast to the outcome of operant conditioning, an increase in $G_{\text{junc.}}$ increased, not decreased, the global input conductance of a target neuron (Figures S2A and S2B). Moreover, a $G_{\text{junc.}}$ increase tended to decrease, not increase, the cell's intrinsic excitability (Figure 4D; see also Figure S2C), although this trend was not significant when the artificial conductance was below +30 nS (Friedman test and post hoc Newman-Keuls test for $G_{\text{junc.}}$ = 30 nS versus 0 nS: B63/B30, $\chi^2 = 23.945$, $p < 0.002$, $q = 4.661$, $p < 0.05$; B63/B65, $\chi^2 = 7.419$, $p < 0.387$). These findings therefore indicate that a selective experimental increase in the junctional conductance between the BMP-initiating neurons, which reproduces the learning-induced strengthening of their electrical synapses, does not mimic the plasticity of their intrinsic biophysical behavior.

The effects of such selective changes in electrical coupling on BMP genesis were tested by adding artificial $G_{\text{junc.}}$ simultaneously to both the B63/B30 and B63/B65 cell pairs in control preparations with the buccal CPG activated by tonic n.2,3 stimulation. Dynamic-clamp-imposed alterations in the natural $G_{\text{junc.}}$ were unable to alter the mean frequency of BMP production (Figures 4E and 4F; Friedman test: $\chi^2 = 2.729$, $p = 0.950$). In contrast, the regularity of pattern genesis, as quantified by the coefficient of variation in the durations of successive inter-BMP intervals, increased strongly and proportionately with the amount of positive artificial $G_{\text{junc.}}$ (Figures 4E and 4G; Friedman

test: $\chi^2 = 32.495$, $p < 0.001$). Consequently, a dynamic-clamp-driven increase in junctional conductance of $\geq +10$ nS was sufficient to significantly decrease the coefficient of variation of inter-BMP intervals (post hoc Newman-Keuls test for $G_{\text{junc.}}$ = +10 versus 0 nS, $q = 3.578$, $p < 0.05$). These results thus indicate that a strengthening of the electrical synapses alone between prejunctional B63 and the B30 and B65 neurons is sufficient to replicate the increase in regularity, but not frequency, of BMP expression resulting from learning.

Concomitant Changes in Intrinsic Properties and Electrical Synapses Reproduce All Aspects of the Learning-Induced Plasticity in BMP Genesis

To determine whether alterations in intrinsic membrane excitability and strength of electrical synapses can conjointly reproduce the cellular and motor plasticity induced by operant conditioning, we applied dynamic-clamp-defined $G_{\text{junc.}}$ and G_{leak} simultaneously to the B30/B63/B65 neurons (Figure S3A). Based on our earlier findings for solitary conductance manipulations in control preparations, an artificial G_{leak} of -60 nS that reproduced most of the learning-induced cellular plasticity was applied to each neuron, while a simulated $G_{\text{junc.}}$ of +10 nS, which replicated the learning-dependent strengthening of electrical coupling, was introduced into each of the B63/B30 and B63/B65 cell pairs. This concurrent change in G_{leak} and $G_{\text{junc.}}$ significantly decreased the natural input

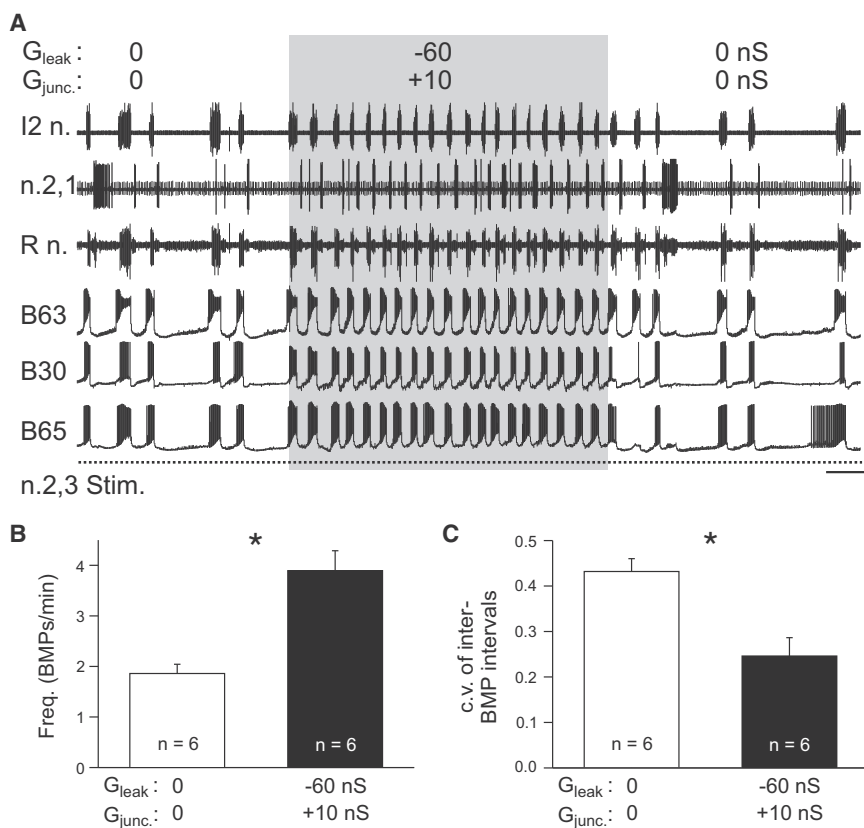


Figure 5. A Concurrent Experimental Increase in B63/B30/B65 Excitability and Strength of Their Electrical Synapses in Control Preparations Induces a Transition to Accelerated and Regularized BMP Genesis

(A) Recurrent BMPs and underlying B63/B30/B65 bursting, which were generated at a low frequency and with irregular interpattern intervals in a control preparation, switched immediately to a rapid and regular expression under the conjoint addition of a dynamic-clamp-defined G_{leak} of -60 nS to the three cell types and a $G_{junc.}$ of $+10 \text{ nS}$ to the B63/B30 and B63/B65 cell pairs (shaded panel). This change in activity was immediately reversed when injection of the artificial conductances ceased (0 nS). Horizontal and vertical scale bars represent 30 s and 25 mV , respectively.

(B and C) Comparisons of the frequency (B) and coefficient of variation (C) of BMP expression before (white bars) and during (black bars) simultaneously imposed changes in G_{leak} and $G_{junc.}$ as illustrated in (A). Two-tailed Wilcoxon test: $W = 21.0$, $p = 0.031$ and $W = -21.0$, $p = 0.031$, respectively.

Group data show means $\pm$ SEM and individual sample sizes. * $p < 0.05$.

conductance of prejunctional B63 by the sum of the introduced conductances (i.e., -50 nS) (Figure S3B; Wilcoxon test: $W = -21.0$, $p = 0.031$). It also significantly increased the cell's membrane excitability (indicated by decreased spike threshold) and increased the coupling coefficients of the B63/B30 and B63/B65 neuron pairs (Figures S3C–S3E; Wilcoxon test: spike threshold, $W = -21.0$, $p = 0.031$; coupling coefficient of either neuron pair, $W = -21.0$, $p = 0.031$). Thus, the combination of a strong decrease in leak conductance and a modest increase in junctional conductance is able to reproduce both the membrane and synaptic plasticities resulting from operant conditioning.

Significantly, in control preparations that otherwise generated relatively infrequent and irregular BMPs under n.2,3 stimulation, a conjoint alteration in G_{leak} and $G_{junc.}$ immediately and reversibly converted the expression of buccal motor output to faster and more regular patterns (Figure 5A). The average frequency of BMP genesis increased significantly (Figure 5B; Wilcoxon test: $W = 21.0$, $p = 0.031$), while the coefficient of variation of the interpattern intervals decreased from that before the dynamic-clamp procedure (Figure 5C; Wilcoxon test: $W = -21.0$, $p = 0.031$). These results indicate that concomitant changes in the membrane and synaptic properties of the BMP-initiating neurons in naive preparations are sufficient to produce modifications in buccal motor output that are identical to those expressed in the CNS of animals previously subjected to operant conditioning.

Opposite Changes in Membrane and Synaptic Properties Reverse the Cellular and Motor Learning

If the above parallel changes in membrane and synaptic properties are causal to the learning-dependent alterations

in buccal CPG operation, then one might expect that this plasticity can be reversed with oppositely directed conductance manipulations. Does an experimental reduction (rather than increase) in B30/B63/B65 excitability and junctional conductance convert stereotyped BMP genesis in contingent preparations to the slower, irregular pattern expression observed in untrained controls? A dynamic-clamp-defined G_{leak} of $+60 \text{ nS}$ alone, which was previously found to diminish BMP-initiating neuron excitability (see Figure 3C), caused a significant decrease in the frequency of spontaneous patterns in contingent preparations, with no significant effect on pattern regularity (Figures S4A–S4C; Wilcoxon test: frequency, $W = 30$, $p = 0.039$; coefficient of variation, $W = 22$, $p = 0.148$). Conversely, in the same preparations, an imposed decrease in the strength of electrical synapses between the B63/B30 and B63/B65 cells via an imposed $G_{junc.}$ of -10 nS , significantly increased the coefficient of variation of inter-BMP intervals, but with no significant effect on pattern frequency (Figures S4D–S4F; Wilcoxon test: frequency, $W = 8$, $p = 0.578$; coefficient of variation, $W = 26$, $p = 0.031$). However, a coincident increase in the leak conductance ($G_{leak} = +60 \text{ nS}$) of the three neurons together with a decrease in coupling strength ($G_{junc.} = -10 \text{ nS}$) between the B63/B30 and B63/B65 cell pairs immediately and reversibly evoked a dual modification in ongoing BMP genesis (Figure 6A): the frequency of patterns decreased significantly, while the coefficient of interval variation increased for the duration of dynamic-clamp manipulation (Figures 6B and 6C; Wilcoxon test: frequency, $W = -36$, $p = 0.008$; coefficient of variation, $W = 36.0$, $p = 0.008$). Thus, in ganglion preparations from operantly conditioned animals, a simultaneous decrease in decision-making neuron excitability and the strength of their electrical synapses can indeed suppress the motor plasticity resulting from learning and restore the activity phenotype expressed by the ganglia of untrained controls.

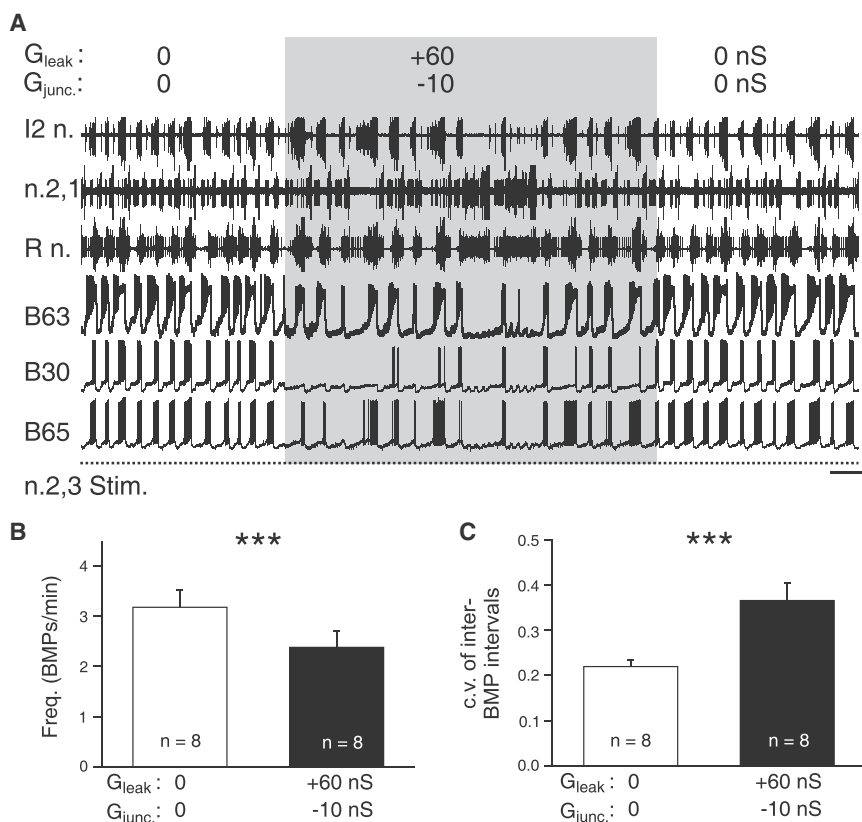


Figure 6. In Contingent Preparations, a Reversal of BMP Genesis to an Untrained Control Phenotype Is Produced by a Concomitant Decrease in B63/B30/B65 Excitability and Electrical Synaptic Strength

(A) Frequent and regular B63/B30/B65 bursting and resultant BMP expression were reversibly transformed to a slower and irregular activity state throughout the introduction of a dynamic-clamp-defined G_{leak} of +60 nS to the three cell types and a $G_{junc.}$ of -10 nS to B63/B30 and B63/B65 cell pairs (shaded panel). Horizontal and vertical scale bars represent 30 s and 25 mV, respectively.

(B and C) Comparisons of the frequency (B) and coefficient of variation (C) of BMP genesis before (white bars) and during (black bars) simultaneously imposed changes in G_{leak} and $G_{junc.}$ as illustrated in (A). Two-tailed Wilcoxon test: $W = -36.0$, $p = 0.008$ and $W = 36.0$, $p = 0.008$, respectively.

Group data show means $\pm$ SEM and individual sample sizes. *** $p < 0.01$.

Taken together, these data provide compelling evidence for a causal relationship between the strength of electrical connectivity among the BMP-initiating neurons and the temporal regularity of buccal CPG output. A separate mechanism involving a change in membrane conductances governing neuron excitability underlies the learning-induced changes in output cycle frequency.

Discussion

The unpredictability and variability in *Aplysia*'s food-seeking behavior derives partly from the autonomous functioning of a CPG network that is inherently capable of specifying the timing and cycle-to-cycle recurrence of motor pattern production. In particular, this capacity depends on the functional diversity of "decision-making" neurons that through their individual intrinsic membrane properties and pattern of synaptic connectivity within the circuit are able to irregularly instigate each motor pattern occurrence [14]. By modulating these cellular properties, reward learning leads to accelerated and coordinated burst discharge in this neuronal subset, which in turn accelerates and regularizes BMP emission. Our present findings, in which individual cellular conductances were selectively manipulated in vitro, indicate that the inherent biophysical membrane and electrical synaptic properties of the B30/B63/B65 neurons are responsible for ensuring the two distinct aspects of this motor plasticity. Alterations in their intrinsic excitability essentially govern the frequency of feeding motor pattern production, while changes in their electrical interconnections regulate the pattern's cycle-to-cycle regularity.

The oscillatory membrane properties of CPG neurons responsible for rhythmic motor pattern genesis in both invertebrates and vertebrates depend on the interplay between

various voltage-dependent conductances [21–23]. K^+ and Na^+ leak conductances which govern intrinsic excitability also influence the bursting activity of endogenous oscillatory neurons [24–27]. Although these voltage-independent conductances are not directly implicated in the actual burst-generating mechanism, they exert their effects indirectly by changing the cell's membrane potential through activation ranges for the regenerative, voltage-dependent conductances. This voltage dependence is typically manifested in an oscillating neuron's response to tonic depolarizing current injection, which alters the overall frequency of ongoing bursting. Such a voltage sensitivity of bursting frequency has been previously reported for the B30/B63/B65 neurons [14]. Therefore, the learning-induced acceleration of bursting in these cells and the resultant rate increase in BMP expression is consistent with a direct effect of a decrease in G_{leak} on the expression of their endogenous oscillatory mechanisms. Significantly, the present data further indicate that a leak current with a reversal potential close to a pattern-initiating cell's resting membrane potential can change the frequency of its oscillatory bursting but has no influence on this activity's regular or irregular temporal structure.

A change in leak conductance not only alters the excitability of individual neurons but also impacts indirectly on their electrical coupling. According to our present results, this latter effect would be expected to modify the regularity of burst-generating oscillations and BMP expression. However, in contrast to the effect of a direct alteration in the junctional conductance between the BMP-initiating neurons, our dynamic-clamp data showed that a G_{leak} decrease alone is unable to regularize otherwise irregular B30/B63/B65 bursting and pattern production. This inability may be a consequence of G_{leak} 's parallel effect on neuronal excitability, an increase that might reinforce the desynchronization of ongoing bursting between cells and override a weaker synchronizing and regularizing effect of an indirect enhancement of electrical coupling. Consistent with this possibility, a G_{leak} decrease in combination with an imposed increase in the junctional

conductance itself produced sufficient coupling to regularize the CPG neuron oscillations and associated BMP production.

Each neuron of the heterogeneous B30/B63/B65 cell group plays a critical role in triggering the motor patterns for radula biting. Although endogenous burst discharge of B63 alone is necessary and sufficient to initiate individual BMPs, spontaneous bursts in the B30 and B65 neurons contribute to the activating process via their electrical connection with B63. Moreover, the three cell types are each represented by a homologous pair located in the bilateral buccal ganglia. All of the ipsi- and contralateral electrical synapses among these six neurons are modulated by operant conditioning [14]. Our experiments revealed that a dynamic-clamp-induced coupling increase between just three of these neurons was sufficient to regularize BMP recurrences, although slightly higher artificial junctional conductances and coupling coefficients than the natural values observed after learning were required. This difference could be explained by the fact that we were manipulating the conductances of only 50% of the effective pattern-initiating cell population and/or by the anatomical location of the electrical synapses themselves. Although this latter aspect was not investigated here, synapses between ipsilateral neurons are likely to be located close to the prejunctional cell body in the neuropil of the ipsilateral ganglion. Synapses with contralateral partners, however, are presumably distant from the soma in the contralateral ganglionic neuropil. Due to these differences in soma-synapse distance, therefore, it is possible that intrasomatic current injections into a given cell are more effective in modifying the membrane potential of ipsilateral coupled neurons than contralateral postjunctional partners [14]. Consequently, as observed in the mollusk *Lymnaea* [28], a current injected into a BMP-initiating cell body that changes its somatic potential may only partially affect or even fail to influence distant, contralateral connections implicated in actual motor learning. Despite this potential limitation, however, our findings are consistent with experimental and theoretical studies illustrating that electrical synapses can promote the synchronization of neuronal firing, regulate discharge durations in bursting neurons, and confer stereotyped network rhythmicity from oscillating cell ensembles [29–36]. Our data support the idea that although not directly involved in the endogenous burst-generating mechanism of individual neurons, the junctional conductances of electrical synapses may play a fundamental role in controlling the regularity of the cells' oscillatory behavior, and thereby of the network to which they belong.

Conclusions

The present study shows that two independent cellular properties within a subcircuit of heterogeneous CPG neurons—non-voltage-dependent membrane conductances that determine excitability and junctional conductances at electrical synapses—are separately responsible for the elevated frequency and stereotypy, respectively, of a contingent-reward-induced transition to compulsive-like repetitive action. Interestingly, recent studies employing optogenetic approaches have begun to dissect specific corticostriatal circuitry in order to decipher the neural mechanisms underlying mammalian compulsive behaviors [37, 38]. The use of dynamic-clamp manipulation to identify the cellular and network substrates and establish causation in the switch from an impulsive to a compulsively repeated act in the simpler *Aplysia* could therefore offer relevant insights into the neuronal basis of experience-related plasticity and the development of compulsive disorders in general.

Experimental Procedures

In Vivo Behavioral Training

Aplysia were randomly assigned to a control (naive) or a contingent (operantly trained) group (see Figure 1A and Supplemental Experimental Procedures). Individuals were placed individually in a small (8 l) transparent aquarium positioned over a mirror and filled with 5 l of fresh, aerated artificial sea water (ASW). After an initial resting period of 30 min, an animal was trained during a further 30 min period, during which it was subjected to a continuous application of a ~ 1.5 cm² piece of seaweed held with forceps to the dorsal side of the lips without allowing this stimulus to be either bitten or ingested. This arousing stimulus was used to set the occasion for food-seeking behavior, particularly involving cyclic radula biting movements. For the contingent group, an additional stimulus, constituting a consumable food reward, consisted of an intrabuccal injection of 20 μ l of filtered seaweed juice obtained from the maceration (20 min) of 0.4 g of dried *Ulva lactuca* in 10 ml of ASW. The contingent-reward training procedure consisted of successive juice deliveries with a calibrated micropipette, which were each strictly timed to the emission of an individual radula bite cycle. This contingent-reward stimulus was introduced into the buccal cavity at the end of the protraction phase of radula movement and pulse ejected from the pipette as the lips closed. Although this training protocol was very similar to that described previously [14], a more recent study using an equivalent operant conditioning procedure in vitro found that 30 min of contingent reinforcement is sufficient to induce the contingent-dependent neuronal plasticity for several hours [15]. Thus, the duration of our in vivo training period was reduced from 40 to 30 min in the present study.

In Vitro Electrophysiology

After training, the buccal ganglia were isolated and desheathed. BMPs were recorded with extracellular pin wire electrodes placed on the peripheral nerves I2 (I2 n.), 2,1 (n.2,1), and radula (R n.) to monitor the protraction, retraction, and closure activity, respectively. Intracellular recordings and stimulations of the BMP-initiating neurons B63, B30, and B65 were made with capillary glass electrodes filled with 2 M KCH₃CO₂ (tip resistance 15–30 M Ω) (the bathing medium for in vitro preparations and the criteria used for cell identification are provided in the Supplemental Experimental Procedures). All recorded signals were amplified by Axoclamp-2B electrometers (Molecular Devices), visualized on a Tektronix 5113 oscilloscope, digitized by an analog-to-digital converter (CED 1401, Cambridge Electronic Design), and analyzed with Spike2 software (Cambridge Electronic Design).

Neuronal excitability, input conductance, and electrical coupling between ipsilateral cell pairs were measured intrasomatically by two-electrode current clamp (i.e., four electrodes were used to test the electrical coupling between neuron pairs). Neuronal excitability was quantified as the minimum amount of injected current (1 s pulses by steps of +0.1 nA from 0 nA) necessary to reach the spike threshold of a cell initially held at -80 mV. Input conductance (G_{in}) was calculated as the ratio of the intensity of the injected current pulse (-10 nA, 2 s) over the maximum voltage deflection produced by this pulse in a cell initially held at -70 mV. The electrical coupling between a pair of ipsilateral neurons was defined by the coupling coefficient, which is the ratio of the postjunctional voltage response to a prejunctional voltage change evoked by a 2 s, -10 nA current pulse injected into the prejunctional neuron. This coefficient was calculated with the pre- and postjunctional cells held at an initial resting membrane potential of -70 mV.

Dynamic-Clamp Procedures

Artificial conductances [16–18] were generated using the Real-Time eXperiment Interface (RTXI; <http://www.rtxi.org/>) and a National Instruments NI PCI-625 data acquisition card with update frequency at 3–5 kHz. This frequency was chosen to avoid current oscillation that sometimes occurred at higher rates and to allow current updating by variations in voltage that were faster than single spikes (10–15 ms). Each artificial leak and junctional current (I_{leak} , $I_{junc.}$) injected into a neuron was computed from $I_{leak} = G_{leak}(V_{m1} - E_{leak})$ and $I_{junc.} = G_{junc.}(V_{m1} - V_{m2})$, where G is the user-defined leak or junctional conductance and V_m is the momentary membrane potential of a target cell and its coupled partner. The reversal potential for the leak current (E_{leak}) was arbitrarily fixed to 3 mV below the lowest natural resting membrane potential of the recorded neuron. Any $G > 0$ should be interpreted as an artificial conductance augmenting the natural input conductance of a neuron (G_{in}) additively (i.e., in parallel circuit configuration). Conversely, any $G < 0$ acts to counteract the natural membrane conductance as long as $|G| < G_{in}$ (Figure S1B).

Dynamic clamp was also used to estimate the natural junctional conductance between two neurons. This estimation was obtained from the absolute value of the added artificial G_{junc} , necessary to cancel (i.e., force to zero) the coupling coefficient of a cell pair as defined by the postjunctional neuron response to the intrasomatic injection of a negative current pulse (-10 nA, 2 s) into the prejunctional neuron (Figures 2D and 2F).

When introducing an artificial conductance or a combination of two distinct conductances into a single cell or a pair of electrically coupled neurons, recording of the membrane potential and injection of the dynamic-clamp-generated current (or currents) were achieved using a two-electrode current-clamp technique (see above). When a dynamic-clamp-defined conductance or a combination of conductances was applied simultaneously to three neurons, a single-electrode current-clamp procedure was used. In this procedure, the resistance and capacitance of each electrode were carefully compensated before data acquisition. Although computational methods of compensation have been described for high-resistance electrodes [39, 40], such procedures were not employed in our experiments because preliminary data comparison of our two-electrode and single-electrode setups indicated that the manual compensation was sufficient to effectively remove electrode artifacts. In all cases, the dynamic-clamp-defined value of G_{leak} or G_{junc} was the same for all neurons or pairs of neurons recorded in a given preparation. In experiments where different G_{leak} or G_{junc} values were successively applied in the same preparation to test their gradual effect on cellular properties or motor pattern genesis, and to distinguish these effects from a potential "fatigue" of the *in vitro* preparation, a given artificial conductance was applied by alternating positive and negative values ranging from highest to lowest values.

Data Analysis

In accordance with previous studies of operant conditioning [12, 14], data on the cellular correlates of learning and how dynamic clamp modifies these correlates and corresponding BMP generation were collected from control and contingent *in vitro* preparations that expressed motor patterns at irregular and regular time intervals, respectively. The data were obtained during a 30 min period of tonic n.2,3 stimulation at the end of the posttraining test period, with the analysis of buccal motor activity beginning 10 min after stimulation onset. Repetitive BMPs elicited by this stimulation were considered to be either irregularly or regularly distributed in time if the corresponding autocorrelation histogram of the interpattern intervals could not be fitted or could be fitted, respectively, with statistical significance by a sinusoidal Gabor function.

Individual BMPs were defined by an initial protraction phase composed of action potential discharge in I2 n. at >0.4 Hz for >1 s, followed by retraction and closure motor activity consisting of impulses occurring above baseline levels in n.2,1 and R n., respectively [14]. Incomplete patterns composed of a burst in I2 n. without subsequent changes in n.2,1 or R n. activity were not considered in the analysis. In dynamic-clamp procedures, the mean frequency and the coefficient of variation of BMP emissions were determined from the mean duration and standard error of the time intervals between ten successive onsets of the protraction phase of each motor pattern.

Cellular analyses were performed on one, two, or three cells depending on the successful localization and identification of individuals of the B63/B30/B65 neuron subset. Data obtained on input conductance, excitability, electrical coupling, or motor pattern generation were not discarded when the series of tests was prematurely interrupted by an unexpected loss of an intracellular impalement and the subsequent inability to relocate the cell (or cells). To compare a similar number of data sets in the different experimental protocols, the order of successive tests on neuronal properties was modified depending on the occurrence of the random events described above and independently of the particular experimental group. Cells that expressed an initial resting membrane potential greater than -45 mV and/or an input conductance less than 2.5 M Ω were not used in the analyses.

Correlations between changes in cellular properties or BMP genesis and dynamic-clamp-added G_{leak} or G_{junc} values were fitted by linear or nonlinear regressions. Nonlinear regressions, such as between the coupling coefficient (CC) and G_{leak} or G_{junc} , were computed from the following equation equivalent to the electrical circuit of two electrically coupled neurons (Figure S3A):

$$CC = \frac{1}{\frac{G_{\text{in}} + G_{\text{leak}}}{1} + \frac{1}{G_{\text{nat.}} + G_{\text{junc.}} + G_{\text{in}} + G_{\text{leak}}}}$$

where G_{in} and $G_{\text{nat.}}$ are the natural postjunctional input conductance and the natural junctional conductance, respectively. Estimation of the equation's parameters and the statistical significance of the regression were determined by SigmaPlot software (Systat). Statistical comparisons between two independent data groups were made using the two-tailed Mann-Whitney test (T). Comparisons between two dependent data groups were made using the two-tailed Wilcoxon test (W). Comparisons between three or more dependent data groups were made using the two-tailed Friedman's analysis of variance on ranks (χ^2), whereas post hoc pairwise multiple comparisons were made using the nonparametric Newman-Keuls multiple range test (q). Nonparametric tests were used because of the departure from a normal distribution and/or the heterogeneity of the variances of the sampled data.

Supplemental Information

Supplemental Information includes four figures and Supplemental Experimental Procedures and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.004>.

Author Contributions

F.S. implemented the dynamic-clamp technique and contributed to the design of the experiments and the writing of the manuscript. A.B. performed some experiments and contributed to the writing of the manuscript. J.S. cowrote the manuscript. A.A.P. contributed to the writing of the manuscript. R.N. contributed to the design of the experiments, performed some experiments, and cowrote the manuscript.

Acknowledgments

This research was supported by an NSF Interdisciplinary Graduate Education and Research Program grant (F.S.), a doctoral studentship from the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (A.B.), and BRAIN grants ANR-10-LABX-43 and ANR-10-IDEX-03-02. We thank Lionel Parra-Iglesias for assistance with animal maintenance.

Received: December 20, 2013

Revised: March 5, 2014

Accepted: March 5, 2014

Published: April 3, 2014

References

- Everitt, B.J., and Robbins, T.W. (2005). Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nat. Neurosci.* 8, 1481–1489.
- Balleine, B.W. (2005). Neural bases of food-seeking: affect, arousal and reward in corticostriatal limbic circuits. *Physiol. Behav.* 86, 717–730.
- Calabresi, P., Picconi, B., Tozzi, A., and Di Filippo, M. (2007). Dopamine-mediated regulation of corticostriatal synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 30, 211–219.
- Tritsch, N.X., and Sabatini, B.L. (2012). Dopaminergic modulation of synaptic transmission in cortex and striatum. *Neuron* 76, 33–50.
- Yi, F., Zhang, X.-H., Yang, C.R., and Li, B.-M. (2013). Contribution of dopamine d1/5 receptor modulation of post-spike/burst afterhyperpolarization to enhance neuronal excitability of layer v pyramidal neurons in prepubertal rat prefrontal cortex. *PLoS ONE* 8, e71880.
- Kandel, E.R. (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 294, 1030–1038.
- Martin, S.J., and Morris, R.G. (2002). New life in an old idea: the synaptic plasticity and memory hypothesis revisited. *Hippocampus* 12, 609–636.
- Mozzachioli, R., and Byrne, J.H. (2010). More than synaptic plasticity: role of nonsynaptic plasticity in learning and memory. *Trends Neurosci.* 33, 17–26.
- Brembs, B., Lorenzetti, F.D., Reyes, F.D., Baxter, D.A., and Byrne, J.H. (2002). Operant reward learning in *Aplysia*: neuronal correlates and mechanisms. *Science* 296, 1706–1709.
- Lechner, H.A., Baxter, D.A., and Byrne, J.H. (2000). Classical conditioning of feeding in *Aplysia*: I. Behavioral analysis. *J. Neurosci.* 20, 3369–3376.
- Lorenzetti, F.D., Mozzachioli, R., Baxter, D.A., and Byrne, J.H. (2006). Classical and operant conditioning differentially modify the intrinsic properties of an identified neuron. *Nat. Neurosci.* 9, 17–19.

12. Nargeot, R., Petrisans, C., and Simmers, J. (2007). Behavioral and *in vitro* correlates of compulsive-like food seeking induced by operant conditioning in *Aplysia*. *J. Neurosci.* 27, 8059–8070.
13. Nargeot, R., and Simmers, J. (2012). Functional organization and adaptability of a decision-making network in *aplysia*. *Front. Neurosci.* 6, 113.
14. Nargeot, R., Le Bon-Jego, M., and Simmers, J. (2009). Cellular and network mechanisms of operant learning-induced compulsive behavior in *Aplysia*. *Curr. Biol.* 19, 975–984.
15. Bédécarrats, A., Cornet, C., Simmers, J., and Nargeot, R. (2013). Implication of dopaminergic modulation in operant reward learning and the induction of compulsive-like feeding behavior in *Aplysia*. *Learn. Mem.* 20, 318–327.
16. Sharp, A.A., O'Neil, M.B., Abbott, L.F., and Marder, E. (1993). The dynamic clamp: artificial conductances in biological neurons. *Trends Neurosci.* 16, 389–394.
17. Sharp, A.A., O'Neil, M.B., Abbott, L.F., and Marder, E. (1993). Dynamic clamp: computer-generated conductances in real neurons. *J. Neurophysiol.* 69, 992–995.
18. Prinz, A.A., Abbott, L.F., and Marder, E. (2004). The dynamic clamp comes of age. *Trends Neurosci.* 27, 218–224.
19. Bennett, M.V.L. (1966). Physiology of electrotonic junctions. *Ann. N Y Acad. Sci.* 137, 509–539.
20. Lesage, F. (2003). Pharmacology of neuronal background potassium channels. *Neuropharmacology* 44, 1–7.
21. Harris-Warrick, R.M. (2002). Voltage-sensitive ion channels in rhythmic motor systems. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12, 646–651.
22. Selverston, A.I. (2010). Invertebrate central pattern generator circuits. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 365, 2329–2345.
23. Harris-Warrick, R.M. (2010). General principles of rhythmogenesis in central pattern generator networks. *Prog. Brain Res.* 187, 213–222.
24. Zhao, S., Golowasch, J., and Nadim, F. (2010). Pacemaker neuron and network oscillations depend on a neuromodulator-regulated linear current. *Front. Behav. Neurosci.* 4, 21.
25. Koizumi, H., Smerin, S.E., Yamanishi, T., Moorjani, B.R., Zhang, R., and Smith, J.C. (2010). TASK channels contribute to the K⁺-dominated leak current regulating respiratory rhythm generation *in vitro*. *J. Neurosci.* 30, 4273–4284.
26. Lu, T.Z., and Feng, Z.P. (2012). NALCN: a regulator of pacemaker activity. *Mol. Neurobiol.* 45, 415–423.
27. Lu, B., Su, Y., Das, S., Liu, J., Xia, J., and Ren, D. (2007). The neuronal channel NALCN contributes resting sodium permeability and is required for normal respiratory rhythm. *Cell* 129, 371–383.
28. Nikitin, E.S., Balaban, P.M., and Kemenes, G. (2013). Nonsynaptic plasticity underlies a compartmentalized increase in synaptic efficacy after classical conditioning. *Curr. Biol.* 23, 614–619.
29. Sharp, A.A., Abbott, L.F., and Marder, E. (1992). Artificial electrical synapses in oscillatory networks. *J. Neurophysiol.* 67, 1691–1694.
30. Abbott, L.F., Marder, E., and Hooper, S.L. (1991). Oscillating networks: control of burst duration by electrically coupled neurons. *Neural Comput.* 3, 487–497.
31. Selverston, A.I., Rabinovich, M.I., Abarbanel, H.D.I., Elson, R., Szűcs, A., Pinto, R.D., Huerta, R., and Varona, P. (2000). Reliable circuits from irregular neurons: a dynamical approach to understanding central pattern generators. *J. Physiol. Paris* 94, 357–374.
32. Varona, P., Torres, J.J., Huerta, R., Abarbanel, H.D.I., and Rabinovich, M.I. (2001). Regularization mechanisms of spiking-bursting neurons. *Neural Netw.* 14, 865–875.
33. Leznik, E., and Linás, R. (2005). Role of gap junctions in synchronized neuronal oscillations in the inferior olive. *J. Neurophysiol.* 94, 2447–2456.
34. Soto-Treviño, C., Rabbah, P., Marder, E., and Nadim, F. (2005). Computational model of electrically coupled, intrinsically distinct pacemaker neurons. *J. Neurophysiol.* 94, 590–604.
35. Placantonakis, D.G., Bukovsky, A.A., Aicher, S.A., Kiem, H.P., and Welsh, J.P. (2006). Continuous electrical oscillations emerge from a coupled network: a study of the inferior olive using lentiviral knockdown of connexin36. *J. Neurosci.* 26, 5008–5016.
36. Susswein, A.J., Hurwitz, I., Thorne, R., Byrne, J.H., and Baxter, D.A. (2002). Mechanisms underlying fictive feeding in *aplysia*: coupling between a large neuron with plateau potentials activity and a spiking neuron. *J. Neurophysiol.* 87, 2307–2323.
37. Ahmari, S.E., Spellman, T., Douglass, N.L., Kheirbek, M.A., Simpson, H.B., Deisseroth, K., Gordon, J.A., and Hen, R. (2013). Repeated cortico-striatal stimulation generates persistent OCD-like behavior. *Science* 340, 1234–1239.
38. Burguière, E., Monteiro, P., Feng, G., and Graybiel, A.M. (2013). Optogenetic stimulation of lateral orbitofronto-striatal pathway suppresses compulsive behaviors. *Science* 340, 1243–1246.
39. Brette, R., Piwkowska, Z., Monier, C., Rudolph-Lilith, M., Fournier, J., Levy, M., Frégnac, Y., Bal, T., and Destexhe, A. (2008). High-resolution intracellular recordings using a real-time computational model of the electrode. *Neuron* 59, 379–391.
40. Samu, D., Marra, V., Kemenes, I., Crossley, M., Kemenes, G., Staras, K., and Nowotny, T. (2012). Single electrode dynamic clamp with StpC. *J. Neurosci. Methods* 211, 11–21.

Current Biology, Volume 24

Supplemental Information

**Differential Roles of Nonsynaptic and
Synaptic Plasticity in Operant Reward
Learning-Induced Compulsive Behavior**

Fred Sieling, Alexis Bédécarrats, John Simmers, Astrid A. Prinz, and Romuald Nargeot

Supplemental data

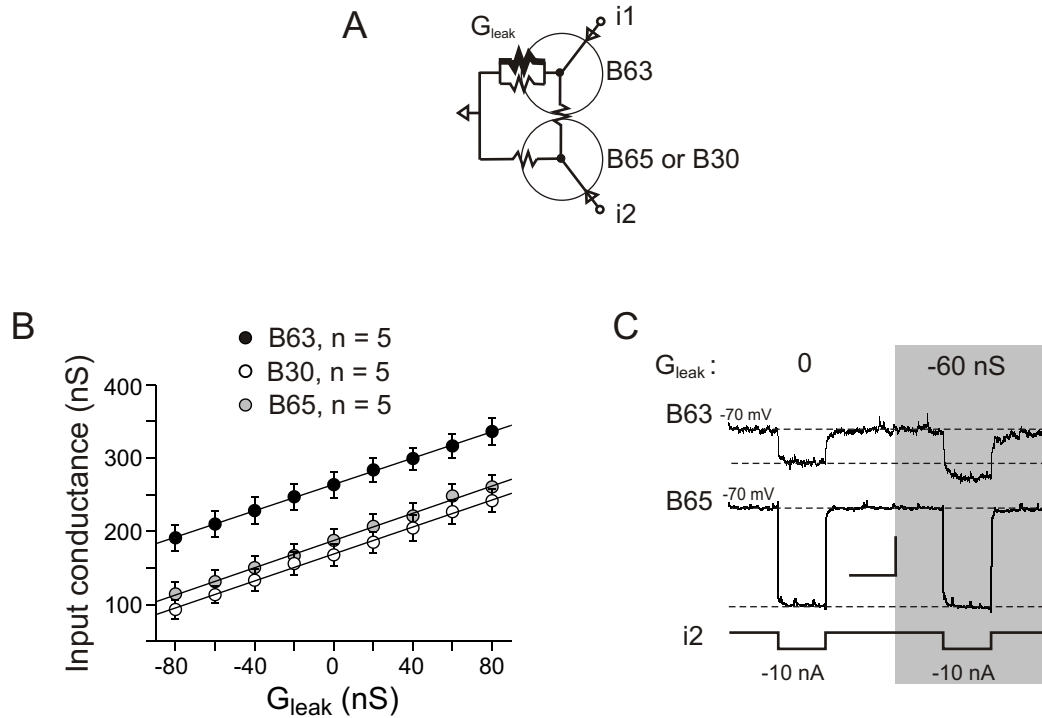


Figure S1, related to Figure 3. Modification in input conductance of the B63/B30/B65 neurons and their observable electrical coupling by dynamic clamp manipulation of leak conductance (G_{leak}).

(A) Equivalent electrical circuit for dynamic clamp-defined G_{leak} added to B63. The large circles represent the neurons; resistance symbols represent the natural input conductance (horizontal resistor symbols) and junctional conductance (vertical symbol between the two cells). An artificial leak conductance (G_{leak} ; bold resistor symbol) was added with dynamic clamp into a single cell (e.g. B63). A current pulse $i1$ (-10 nA, 2s) was injected into this neuron to measure its input conductance (see B). A current pulse $i2$ (-10 nA, 2 s) was injected into an electrically coupled neuron (e.g. either B30 or B65) to test its coupling coefficient with B63 (see C).

(B) The input conductance varied significantly and in linear proportion to the amount of dynamic-clamp subtracted ($G_{leak} < 0$) or added ($G_{leak} > 0$) leak conductance in either B63, B30 or B65 (Friedman test, $\chi^2 = 40.0$, $P < 0.001$ for B63 as representative of the three cells).

(C) The coupling coefficient between B65 and B63 increased during addition of an artificial G_{leak} of -60 nS into B63 (shaded panel). Horizontal/vertical scales: 2 s / B65, 2 mV; B63, 20 mV.

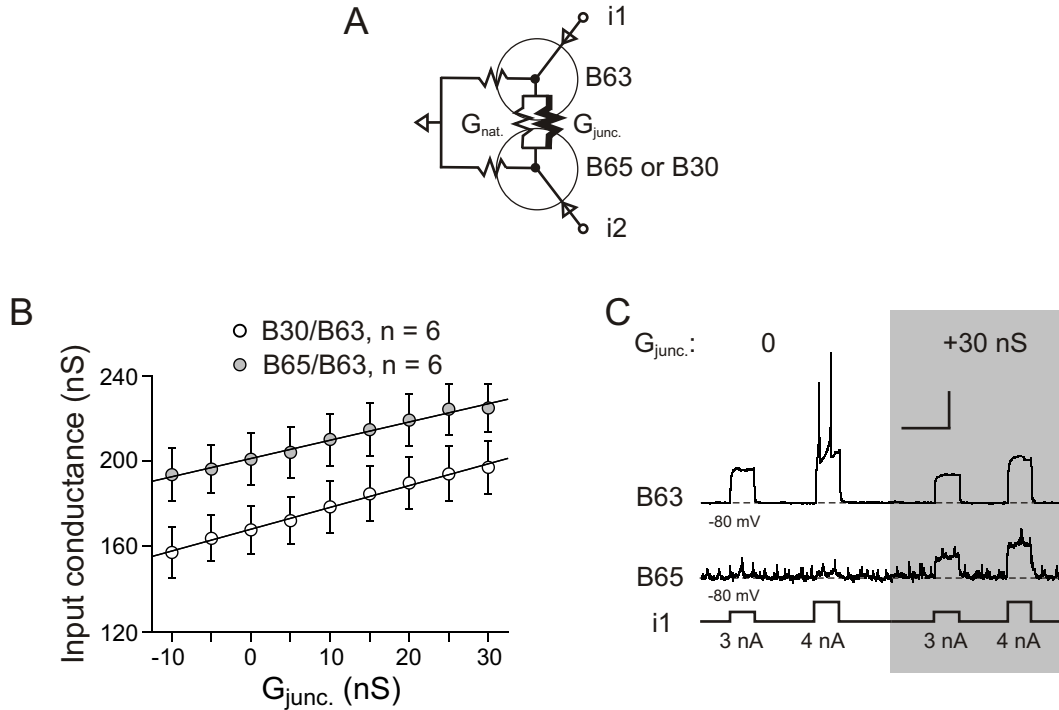


Figure S2, related to Figure 4. Simulated junctional conductance ($G_{\text{junc.}}$) alters the natural input conductance and excitability of the B63/B30/B65 neurons.

(A) Equivalent electrical circuit for a dynamic clamp-added $G_{\text{junc.}}$ to coupled B63 and B65.

(B) The input conductance of B30 (open circles) or B65 (gray circles), which was measured by a hyperpolarizing current pulse injected in either cells (i_2 in A; -10 nA, 2 s), was significantly and proportionately modified by a dynamic clamp-added or -subtracted junctional conductance to the B30/B63 and B65/B63 cell pairs (Friedman test for B30/B63: $\chi^2 = 46.587$, $P < 0.001$ and for B65/B63: $\chi^2 = 41.429$, $P < 0.001$).

(C) The excitability of B63, which was determined by the injection of depolarizing current pulses (1 s) of increasing intensity (i_1 in A) to reach spike threshold, was reduced with a simulated $G_{\text{junc.}}$ of +30 nS. Horizontal/vertical scales: 2 s / B65, 2 mV; B63, 20 mV.

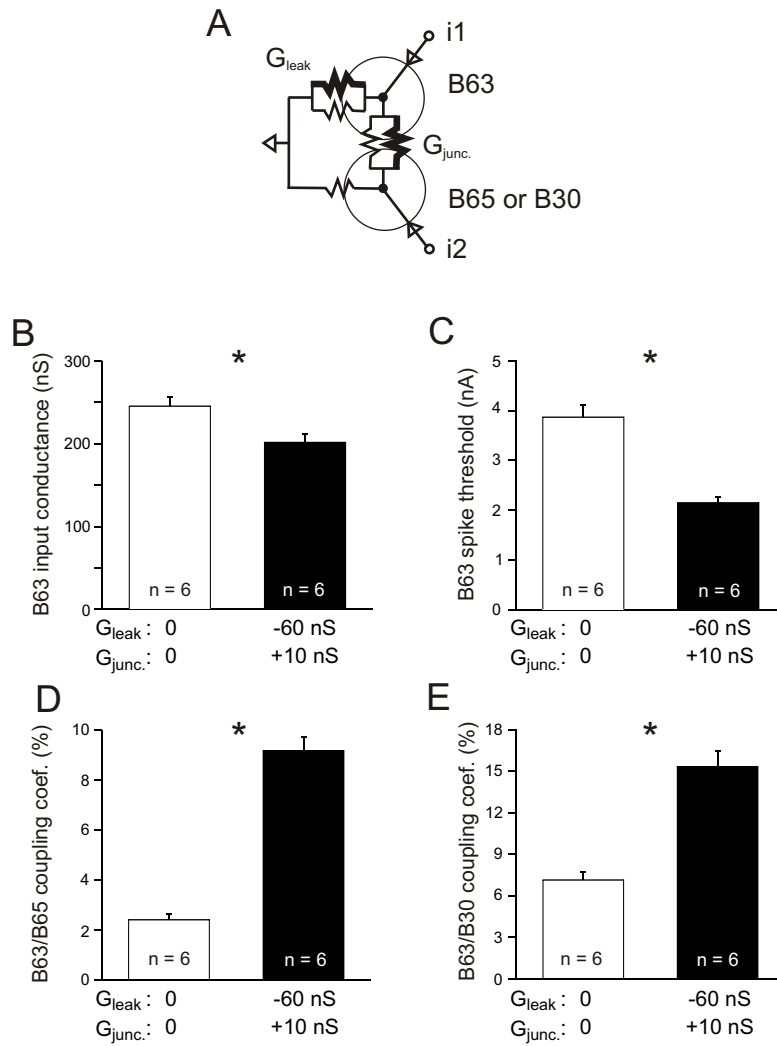


Figure S3, related to Figure 5. Effects of concomitant changes in G_{leak} and $G_{junc.}$ on cellular properties.

(A) Equivalent circuit: the input conductance and spike threshold of B63 were assessed by current pulse injection (i_1). The coupling coefficients between the B63/B65 and B63/B30 cell pairs were measured with current pulses injected in B65 and B30, respectively (i_2).

(B,C) The input conductance (B) and spike threshold of B63 (C) were reduced with an added G_{leak} of -60 nS and $G_{junc.}$ of +10 nS compared to the natural values alone (G_{leak} , 0 nS; $G_{junc.}$, 0 nS). Two-tailed Wilcoxon test: $W = -21.000$, $P = 0.031$ and $W = -21.000$, $P = 0.031$, respectively.

(D,E) The coupling coefficients between the B63/B65 (D) and B63/B30 (E) cell pairs were increased with $G_{leak} = -60$ nS and $G_{junc.} = +10$ nS compared to the coefficient values resulting from the natural conductances alone (G_{leak} , 0 nS; $G_{junc.}$, 0 nS). Two-tailed Wilcoxon test: $W = 21.000$, $P = 0.031$ and $W = 21$, $P = 0.031$, respectively.

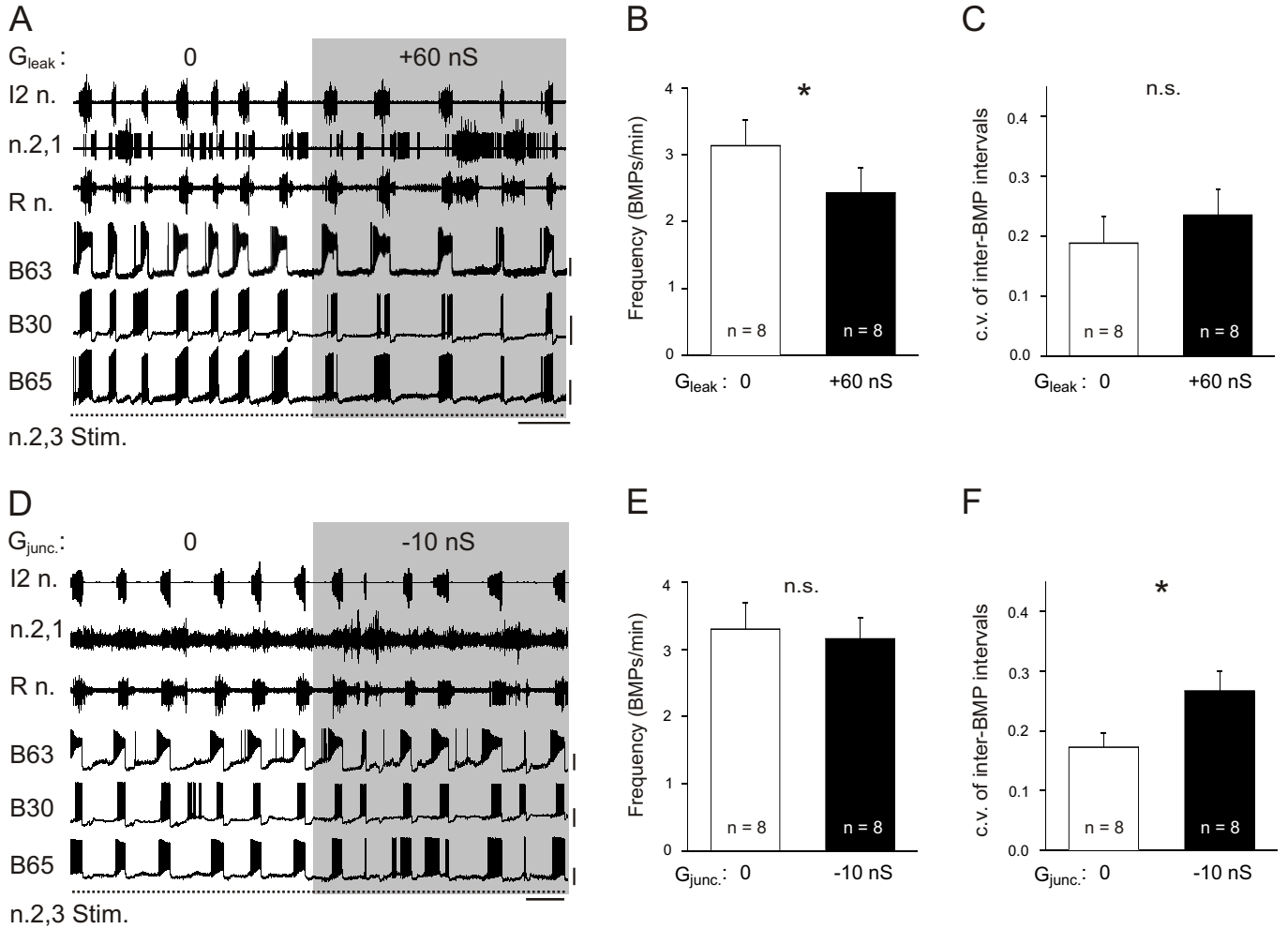


Figure S4, related to Figure 6. Independent effects of G_{leak} or G_{junc} on B63/B30/B65 bursting and BMP genesis in Contingent preparations.

(A) A dynamic clamp-defined G_{leak} of +60 nS (shaded panel) introduced simultaneously into the three neurons, decreased the frequency, but not the regularity, of their spontaneous bursting and resultant BMP expression. Horizontal/vertical scales: 30 s / 25 mV.

(B,C) Quantification of changes in the frequency (B) and coefficient of variation (C) of BMP genesis in the experimental condition illustrated in A. Two-tailed Wilcoxon test: $W = 30$, $P = 0.039$ and $W = 22$, $P = 0.148$, respectively; n.s. not significant.

(D) A dynamic clamp-defined G_{junc} of -10 nS (gray panel) added simultaneously to the B63/B30 and B63/B65 cell pairs, decreased the regularity, but not the frequency, of their bursting and BMP expression. Horizontal/vertical scales: 30 s / 25 mV.

(E,F) Quantification of changes in the frequency (E) and coefficient of variation (F) of BMP genesis in the experimental condition illustrated in D. Two-tailed Wilcoxon test: $W = 8$, $P = 0.578$ and $W = 26$, $P = 0.031$, respectively; n.s. not significant.

Supplemental Experimental Procedures

Animals

Experiments were performed on adult *Aplysia fasciata* and *Aplysia californica* which were caught locally in the Bay of Arcachon (France) or purchased from the University of Miami (FL, USA), respectively, depending on their seasonal availability. All experimental protocols were repeated using both species, and consistent with a previous combined study on these two animals, no inter-species differences in behavioral and electrophysiological findings were found [S1]. The animal housing and feeding conditions were also identical to those described previously [S1,S2]. Animals were food deprived for 2 days before experimentation to help ensure that they were in a similar motivational state for expressing feeding behavior.

In vitro electrophysiology

Animals were anesthetized by hemolymphatic injection of a solution of MgCl_2 (360 mM) buffered with HEPES (10 mM) and adjusted to pH 7.5. The bilateral buccal ganglia were dissected out and placed in a Petri dish under artificial seawater (ASW) composed of (in mM): NaCl, 450; KCl, 10; $\text{MgCl}_2(6\text{H}_2\text{O})$, 30; MgSO_4 , 20; $\text{CaCl}_2(2\text{H}_2\text{O})$, 10; HEPES, 10 with the pH adjusted to 7.5 and maintained at 15°C by a Peltier cooling device.

Monopolar and bipolar electrodes for extracellular recording and stimulation, respectively, were placed against specific peripheral buccal nerves and were insulated from the bath with Vaseline petroleum jelly. A tonic electrical stimulation (8 V, 0.3 ms pulses at 2 Hz) of the two bilateral 2,3 nerves (n.2,3) was generated by a Grass S88 stimulator and delivered through a photo-isolation unit. This stimulation was used as an *in vitro* analogue of the continuous application of an inciting food stimulus *in vivo*. The buccal motor patterns

(BMPs) elicited by this stimulation were recorded on the nerves I2. (I2 n.), 2,1 (n.2,1) and radular (R n.) [S1].

Identification of the BMP-initiating neurons B63, B30 and B65 recorded with intracellular electrodes was based on (1) the ability of an impulse burst in any one cell, elicited by intrasomatic injection of a depolarizing current pulse, to trigger a complete BMP expression; (2) the phase relationship of their bursts with the protraction phase of a given BMP generated either spontaneously or during stimulation of n.2,3; (3) their known synaptic connections with the ispi- and contralateral B31/32, B61/62 and B8 motor neurons [S1].

Supplemental References

- S1. Nargeot, R., Le Bon-Jego M., and Simmers, J. (2009). Cellular and network mechanisms of operant learning-induced compulsive behavior in *Aplysia*. *Curr. Biol.* 19, 975-984.
- S2. Nargeot, R., Petrissans, C., and Simmers, J. (2007). Behavioral and *in vitro* correlates of compulsive-like food-seeking induced by operant conditioning in *Aplysia*. *J. Neurosci.* 27, 8059-8070.



Implication of dopaminergic modulation in operant reward learning and the induction of compulsive-like feeding behavior in *Aplysia*

Alexis Bédécarrats, Charles Cornet, John Simmers, et al.

Learn. Mem. 2013 20: 318-327

Access the most recent version at doi:[10.1101/lm.029140.112](https://doi.org/10.1101/lm.029140.112)

Supplemental Material

<http://learnmem.cshlp.org/content/suppl/2013/05/16/20.6.318.DC1.html>

References

This article cites 73 articles, 36 of which can be accessed free at:
<http://learnmem.cshlp.org/content/20/6/318.full.html#ref-list-1>

Email alerting service

Receive free email alerts when new articles cite this article - sign up in the box at the top right corner of the article or [click here](#)

To subscribe to *Learning & Memory* go to:
<http://learnmem.cshlp.org/subscriptions>

Research

Implication of dopaminergic modulation in operant reward learning and the induction of compulsive-like feeding behavior in *Aplysia*

Alexis Bédécarrats,^{1,2} Charles Cornet,^{1,2} John Simmers,^{1,2} and Romuald Nargeot^{1,2,3}

¹Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine (INICIA), Université de Bordeaux, UMR 5287, F-33000 Bordeaux, France; ²Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR 5287, F-33000 Bordeaux, France

Feeding in *Aplysia* provides an amenable model system for analyzing the neuronal substrates of motivated behavior and its adaptability by associative reward learning and neuromodulation. Among such learning processes, appetitive operant conditioning that leads to a compulsive-like expression of feeding actions is known to be associated with changes in the membrane properties and electrical coupling of essential action-initiating B63 neurons in the buccal central pattern generator (CPG). Moreover, the food-reward signal for this learning is conveyed in the esophageal nerve (En), an input nerve rich in dopamine-containing fibers. Here, to investigate whether dopamine (DA) is involved in this learning-induced plasticity, we used an in vitro analog of operant conditioning in which electrical stimulation of En substituted the contingent reinforcement of biting movements in vivo. Our data indicate that contingent En stimulation does, indeed, replicate the operant learning-induced changes in CPG output and the underlying membrane and synaptic properties of B63. Significantly, moreover, this network and cellular plasticity was blocked when the input nerve was stimulated in the presence of the DA receptor antagonist cis-flupenthixol. These results therefore suggest that En-derived dopaminergic modulation of CPG circuitry contributes to the operant reward-dependent emergence of a compulsive-like expression of *Aplysia*'s feeding behavior.

[Supplemental material is available for this article.]

There is now substantial evidence that rewarding stimuli in associative learning contribute to the transition of irregularly expressed, goal-directed actions into more frequent and regularly repeating compulsive behavior (Rogers and Smit 2000; Everitt and Robbins 2005; Yin and Knowlton 2006; Lenoir et al. 2007; Ashby et al. 2010). Such behavioral plasticity is generally thought to be mediated by the reward-induced activation of dopaminergic modulatory systems that, in turn, cause long-lasting changes in the functional properties of the action decision-making networks (Schultz 1997; Johnson and Kenny 2010; Rogers 2011; Shiflett and Balleine 2011). In support of this prevailing hypothesis, changes in central dopamine (DA) release have been found to be elicited by reward learning responsible for compulsive behavior (Ito et al. 2002), and lesions to DA neurons or the pharmacological manipulation of DA receptors modify the acquisition of such stereotyped behavior (Pilla et al. 1999; Belin and Everitt 2008). Moreover, direct electrical stimulation of dopaminergic centers or the local application of exogenous DA has been found to induce plasticity in the membrane and synaptic properties of neurons controlling decision-making circuit function (Tritsch and Sabatini 2012). However, it remains unclear as to whether and how such DA-induced cellular plasticity in these decision networks is able to mediate the transformation of an otherwise flexible and irregular motor act into a stereotyped, inflexible repetitive action.

A suitable model for addressing this issue is feeding-related behavior in *Aplysia*, which can be modified by food-reward stimuli in different forms of associative learning (Susswein et al. 1986;

Lechner et al. 2000; Baxter and Byrne 2006; Nargeot et al. 2007). In an operant conditioning paradigm, the contingent association of a food reward with each biting movement of the tongue-like radula was previously found to switch the infrequent and erratic occurrences of bite cycles during food-seeking into an accelerated and regular rhythmic expression of this behavior (Nargeot et al. 2007). The central pattern generator (CPG) network that organizes the selection and initiation of the underlying radula motor programs has been previously identified within the buccal ganglia, and the neuronal plasticity associated with this operant learning has begun to be characterized (Nargeot et al. 2009; Nargeot and Simmers 2012). Moreover, an afferent neuronal pathway to the buccal ganglia, the anterior branches of the bilateral esophageal nerves (En.2) that are rich in DA-containing fibers, is already known to convey aspects of the food-reward stimulus for associative learning processes (Schwarz and Susswein 1986; Brembs et al. 2002). However, whether this DA input pathway is also responsible for the neuronal plasticity of the buccal CPG that regulates motor program initiation and underlies the acceleration and stereotyped regularization of pattern occurrences remains to be determined. Therefore, in the present study, by using a reduced buccal ganglia preparation adapted from an earlier in vitro analog of operant conditioning and pharmacological DA receptor blockade, we assessed the nature of En.2's influence on buccal CPG neurons, in particular the bilateral decision-making B63 cells that are essential for triggering the motor pattern for each radula bite cycle. Specifically, we explored whether contingent En.2 electrical stimulation to mimic the reinforcing food signal in vivo is able to modify the CPG motor drive via changes in the oscillatory membrane properties and electrical connections of the pattern-initiating B63 cells, as found in behavioral operant conditioning (Nargeot et al. 2009).

³Corresponding author

E-mail romuald.nargeot@u-bordeaux2.fr

Article is online at <http://www.learnmem.org/cgi/doi/10.1101/lm.029140.112>.

Results

Monosynaptic dopaminergic connectivity of En.2 afferents with radula pattern-initiating neurons

In a first step, the synaptic relationship of En inputs with the B63 neurons and their pattern-initiating partners (B65/B30) of the buccal CPG network was assessed by stimulating En.2 in isolated buccal ganglia (B.g.) while simultaneously recording these cells and monitoring radula motor output with peripheral nerve recordings (Fig. 1A). In control artificial sea water (ASW), when the CPG was otherwise quiescent, an En.2 stimulation (8 V, 0.3-msec pulses at 10 Hz for 5 sec) at approximately the frequency and duration of spontaneous nerve activity observed during actual feeding (Brembs et al. 2002) elicited a rapid-onset, long-lasting depolarization in all three types of pattern-initiating neuron (Fig. 1B; Supplemental Fig. 1A). The concurrent depolarization and resultant burst firing was associated with an activation of the buccal CPG, which produced 1–3 cycles of fictive radula movement

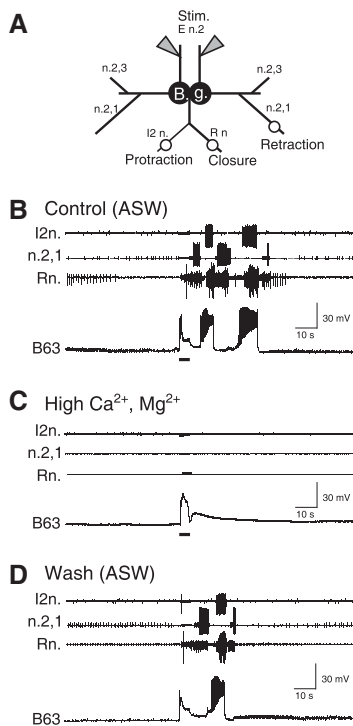


Figure 1. Monosynaptic influence of esophageal nerve inputs on the B63 neurons. (A) Schematic representation of the in vitro buccal ganglia (B.g.) preparation showing the positions of stimulating electrodes (triangles) on the bilateral esophageal nerves (En.2) and extracellular recording electrodes (open circles) placed on the radula protraction (I2n.), retraction (n.2,1), and closure motor nerves (Rn.). Note that in subsequent experiments, a continuous inciting stimulus for buccal CPG activity was provided by monotonic, low-frequency electrical stimulation of the bilateral n.2,3 sensory nerves (Nargeot et al. 1997). (B) In control artificial sea water (ASW) an electrical train stimulation (10 Hz, 5 s [horizontal bar]) of En.2 elicited a depolarization in an intracellularly recorded B63 cell (lower trace) and subsequent repetitive bursts of action potentials associated with radula motor pattern generation (upper extracellular traces). (C) Same preparation as in B, but under divalent ion enriched ASW to reduce neuronal excitability and block polysynaptic pathways. The same En.2 stimulation (horizontal bar) still caused a B63 depolarization (presumably via monosynaptic connectivity), but neither cyclic B63 bursting nor radula motor pattern generation occurred. (D) Recovery of En.2 stimulation-induced B63 bursting and radula pattern generation after washout with control ASW.

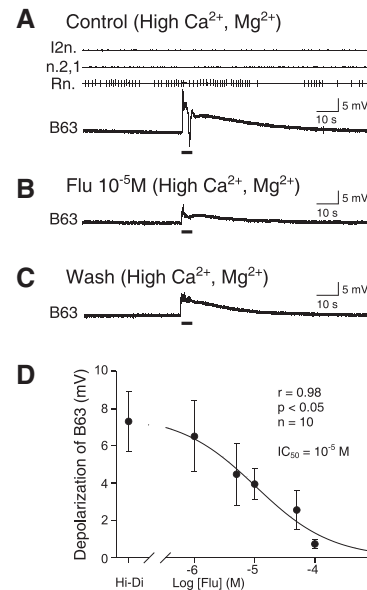


Figure 2. Dopamine receptor blockade suppresses the En.2-derived B63 depolarization. (A–C) The slow monosynaptic depolarization of B63 resulting from En.2 stimulation (10 Hz, 5 sec) in high divalent ion ASW (A) was reduced in the additional presence of 10^{-5} M flupenthixol (B). Recovery toward a control response occurred after washout by high divalent saline alone (C). (D) Dose–inhibition relationship of flupenthixol's effects on the B63 depolarization induced by En.2 stimulation (10 Hz, 5 sec). Half maximal depolarization (IC_{50}) was attained by the DA antagonist at 10^{-5} M, while the monosynaptic response was completely abolished at $>10^{-4}$ M.

recorded in the motor nerves. To test whether this En.2-induced excitation was mediated by monosynaptic influences from input fibers and/or resulted from polysynaptic connectivity, the same experiment was conducted in ASW containing elevated divalent ion concentrations, which is known to decrease excitability and block polysynaptic pathways in the *Aplysia* nervous system (Byrne et al. 1978). Under this saline condition, the same electrical stimulation of En.2 was still able to elicit a fast onset and sustained (lasting several tens of seconds) 5–8-mV depolarization of the B63/B65/B30 neurons (Fig. 1C; Supplemental Fig. 1B), but these cells no longer fired action potentials and radula motor patterns ceased to occur. This blockade of CPG activation was reversed by reexposing the B.g. to control ASW (Fig. 1D). These results therefore indicated that at least some of the En.2 influences are mediated by direct excitatory connections with the pattern-initiating neurons, whereas polysynaptic pathways appear to be responsible for the actual triggering of motor pattern genesis.

Histochemical studies have previously shown that En.2 afferent fibers contain DA and its synthesizing enzyme, tyrosine hydroxylase (Kabotyanski et al. 1998; Martinez-Rubio et al. 2009). Moreover, antagonists of dopamine receptors were found to block the postsynaptic effects of electrically stimulating En.2 (Nargeot et al. 1999c; Reyes et al. 2005). We therefore determined whether the monosynaptic and sustained depolarizing responses of the B63/B65/B30 neurons to En.2 stimulation are suppressed by flupenthixol, a DA antagonist that in *Aplysia* has been found to act through the selective blockade of D1-like receptors (Barbas et al. 2006). In the presence of flupenthixol added to high divalent ASW, the amplitudes of the pattern-initiating cell depolarizations evoked by En.2 stimulation were strongly reduced or abolished (Fig. 2A,B; Supplemental Fig. 1C), but were reversed after washout with saline in which the antagonist was absent (Fig. 2C).

Moreover, as seen in the corresponding dose-inhibition relationship for B63 (Fig. 2D), the amplitude reduction increased with increasing antagonist concentrations, with the effective concentration required to decrease the control response by one-half (IC₅₀) being $\sim 10^{-5}$ M, a value similar to that previously reported to block cloned D1-like receptors in *Aplysia* (Barbas et al. 2006) and insects (Mustard et al. 2005).

The attenuating effect of flupenthixol was specific to the depolarizing responses to brief En.2 stimulation since radula motor pattern genesis induced by tonic stimulation (2 Hz, 8 V) of the sensory n.2,3 nerve (Nargeot et al. 1997) was not prevented by antagonist exposure (Fig. 3A–C). Rather, with increasing flupenthixol concentrations, the frequency of buccal motor patterns elicited by n.2,3 stimulation progressively increased, with the dose–excitation relationship of the antagonist’s influence on pattern expression indicating an EC₅₀ value of $\sim 10^{-5}$ M (Fig. 3D). However, this facilitating effect was statistically significant only for concentrations $> 10^{-5}$ M ($\chi^2 = 12.646$, $P < 0.025$; 5.10^{-5} M flupenthixol vs. ASW, $Q = 3.5$, $P < 0.05$; for all other concentrations of flupenthixol vs. ASW, $Q \leq 2.1$).

Together, these results indicated that afferent processes in En.2, in contrast to the n.2,3 sensory pathway, make direct dopaminergic connections with the pattern-initiating B63/B65/B30 neurons, producing their long-lasting depolarization and a trig-

gering of radula motor pattern expression that is mediated by an accompanying polysynaptic pathway.

Contingent-dependent DA release mediates plasticity in radula motor pattern genesis

We next explored whether a contingent electrical stimulation of the dopaminergic En.2 pathway in isolated B.g. preparations is able to replicate the input nerve’s food reward-induced activation in vivo and thereby increase the frequency and regularity of radula motor pattern generation as found after behavioral operant conditioning (Nargeot et al. 2009). For this, in vitro preparations were assigned to one of three groups—Non-contingent, Contingent, and Contingent + Flupenthixol—that were subjected to pre-training, training, and post-training experimental protocols (Fig. 4A). In the first 10 min of the pre-training period, spontaneous cycles of radula motor output were recorded to ensure that all preparations were in a similar initial functional state. During the subsequent 30-min training period, a tonic (2 Hz, 8 V) inciting stimulation of n.2,3 was used to elicit radula motor pattern genesis while the bilateral En.2 nerves were briefly stimulated either in strict association with each motor pattern emission, at the end of the protraction phase (Contingent group), or in a regularly repeating sequence that was uncorrelated with the timing of motor pattern occurrences (Non-contingent group) (Fig. 4B). For the latter, the same number of En.2 stimuli was delivered as during the corresponding training periods for Contingent preparations. The training protocols were conducted either in control saline for the Contingent and Non-contingent groups, or in the presence of ASW containing flupenthixol for the Contingent + Flupenthixol group. The DA antagonist was used at 10^{-5} M (i.e., its IC₅₀; see Fig. 2D) in order to significantly reduce the monosynaptic dopaminergic influence of En.2 stimulation on the pattern-initiating neurons, but without significantly modifying the frequency of radula motor pattern emissions compared to those of the Contingent group. The mean number of contingent En.2 stimuli delivered in the Contingent + Flupenthixol group training was not significantly different from that applied during the Contingent group training (25.8 ± 10.8 and 21.4 ± 11.1 , respectively, $U = 200.5$, $P = 0.209$). After the training period, all preparations were bathed for 45 min in control ASW (without flupenthixol) and then in the ultimate post-training test period recordings were made to determine any changes both in n.2,3-induced motor pattern expression and in the cellular properties of the two B63 neurons. Any data collected in this post-training test period that exceeded the 4-h retention period of operant learning in vivo (Nargeot et al. 2007) were excluded from subsequent analysis.

Before training (Pre-test) the frequency of motor patterns generated by isolated B.g. was similar in the three groups of preparation (Non-contingent, 0.56 ± 0.17 patterns/min; Contingent, 0.92 ± 0.27 ; Contingent + Flupenthixol, 0.93 ± 0.25 ; $H = 0.618$). In contrast, after training (Post-test), the frequency of output patterns and B63 burst occurrences were different between the three groups ($H = 6.772$, $P < 0.05$) (Fig. 4C–F), with the rate of motor patterns in the contingent group being significantly higher than those in either the Non-contingent ($q = 3.320$, $P < 0.05$) or Contingent + Flupenthixol groups ($q = 4.515$, $P < 0.005$). This finding therefore indicated that the contingent stimulation of En.2 was sufficient to produce a long-lasting modification in the frequency of radula motor pattern genesis and associated B63 bursting, which was similar to that produced by the contingent action/reward association of behavioral operant conditioning (Fig. 4C,D; see Nargeot et al. 2007, 2009). Moreover, this plasticity depended specifically on DA release because the same protocol of contingent En.2 stimulation in the presence of flupenthixol

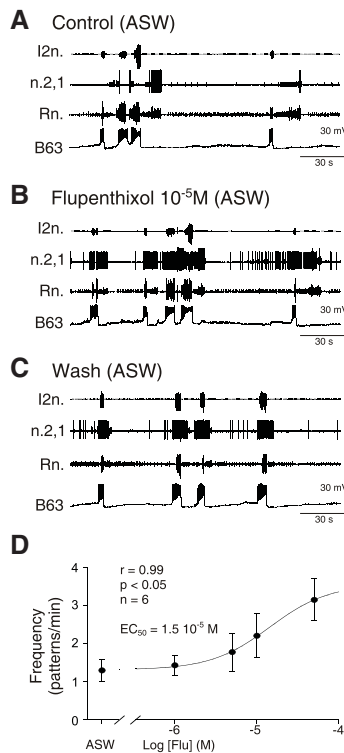


Figure 3. Flupenthixol does not prevent n.2,3-elicited motor pattern genesis. (A) Simultaneous extracellular recordings of radula motor nerves (upper traces) and an intrasomatic recording of a B63 neuron during radula motor activity elicited by tonic (2 Hz, 8 V) stimulation of bilateral n.2,3 in ASW. (B) The additional presence of flupenthixol did not impair, but rather slightly increased, the frequency of radula motor patterns elicited by inciting n.2,3 stimulation in the same preparation as in A. (C) Same preparation after return to control saline conditions. (D) Dose–excitation curve of flupenthixol’s effect on the frequency of n.2,3-elicited radula motor patterns. The antagonist’s half maximal effect (EC₅₀) on the pattern frequency was attained at $\sim 10^{-5}$ M.

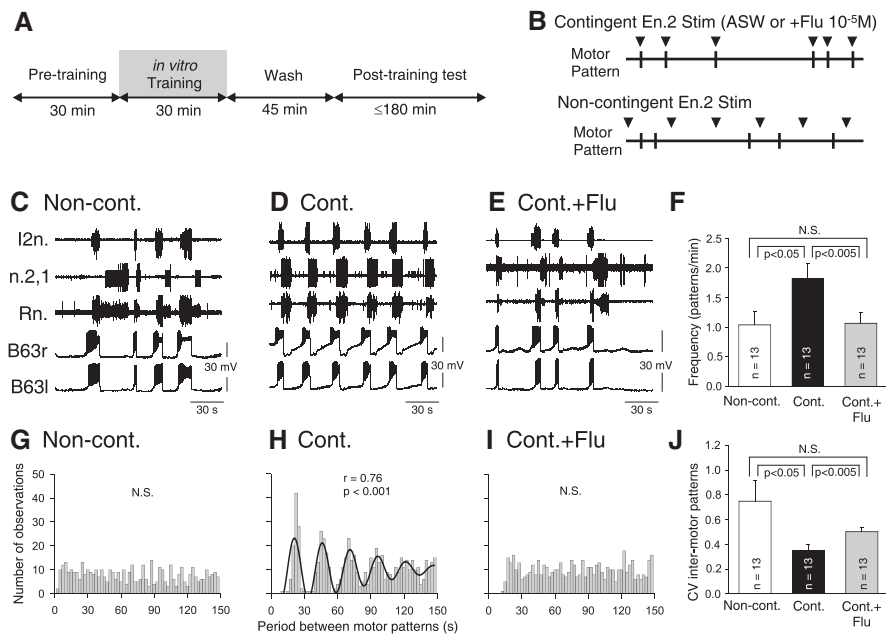


Figure 4. Dopamine receptor blockade prevents radula motor output plasticity in an in vitro analog of operant conditioning. (A) Experimental protocol for associative learning in vitro. Each experiment consisted of four successive periods: a pre-training phase in which radula motor patterns were recorded for 10 min before the preparation was superfused for a further 20 min with either ASW alone or with ASW containing 10^{-5} M flupentixol; a training phase which differed according to the experimental groups (cf. B); after training, preparations were washed for 45 min in control ASW (i.e., without flupentixol) before the properties of n.2,3-elicited radula motor output and associated bursting in the bilateral B63 neurons were tested. (B) In the training protocol, three groups of isolated B.g. preparations were used: in two Contingent groups (upper trace) exposed either to control ASW (Contingent) or to ASW containing 10^{-5} M flupentixol (Contingent + Flupentixol), a phasic stimulation (10 Hz, 5 sec) of bilateral En.2 (arrowheads) was associated with each spontaneous emission of a radula motor pattern (vertical bars). In a third (Non-contingent) group (lower trace), En.2 stimulations (arrowheads) were applied at constant intervals and with the same number as for Contingent preparations, but independently of pattern occurrences (vertical bars). (C–E) Recordings of radula motor output and B63 activity elicited by tonic n.2,3 stimulation during the test period of three representative Non-contingent (Non-cont.) (C), Contingent (Cont.) (D), and Contingent + Flupentixol (Cont. + Flu) (E) preparations. The frequency and regularity of radula motor patterns were increased in a B.g. after contingent En.2 stimulation in control ASW (Cont.) as compared to those in ganglia subjected to contingent stimulation in ASW + Flupentixol (Cont. + Flu) or to non-contingent (Non-cont.) stimulation. (F) Comparison of the rate of pattern occurrences during the post-training test period in the three groups of preparations. The contingent-dependent increase in motor pattern frequency (cf. Cont. with Non-cont.) was blocked by Flupentixol (Cont. + Flu). (G–I) Autocorrelation analyses of 100 successive radula motor patterns after in vitro training. In a Contingent B.g., the buccal motor patterns were rhythmically expressed as indicated by the significant data fit by a Gabor function (bold line). In contrast, in a contingently trained B.g. in the presence of flupentixol and in a non-contingent preparation, radula patterns were randomly generated (histograms not significantly fitted by a Gabor function). (J) Comparison of mean coefficients of variation (CV) of inter-pattern intervals of the three preparation groups. The significantly lower mean CV in the contingent group indicated an increase in the regularity of motor pattern occurrences compared to those in the other two groups.

(10^{-5} M) no longer caused an increase in motor pattern rate (Fig. 4E,F), which remained similar to that of non-contingent controls ($q = 0.435$).

In addition to inducing a cycle frequency increase, the contingent stimulation of En.2 reproduced the regularization of pattern occurrences and B63 bursting previously found after in vivo operant conditioning (Nargeot et al. 2007). Whereas non-contingent B.g. generated motor patterns at highly irregular and unpredictable intervals (Fig. 4C,G), contingent preparations typically produced stereotyped, rhythmically repeating patterns and B63 bursting (Fig. 4D,H). Again, this regularization of buccal CPG activity was dependent on DA receptor activation since in preparations exposed to flupentixol, the contingent stimulation of En.2 no longer led to stable rhythmic pattern expression and bursting, but rather, this motor activity remained irregularly

expressed as in non-contingent controls (Fig. 4E,I). This DA-dependent regularization of buccal CPG output was further confirmed by comparing the coefficients of variation (CV) of 100 successive inter-pattern intervals in the three groups of preparations (Fig. 4J). The CVs were significantly different among the three groups ($H = 6.406$, $P < 0.05$), being significantly lower (indicating higher regularity) compared to both the Contingent + Flupentixol and Non-contingent groups ($q = 4.17$, $P < 0.005$; $q = 0.333$, $P < 0.05$, respectively). The latter two groups were not significantly different ($q = 0.798$).

Taken together, therefore, these data indicated that a contingent stimulation of En.2 input fibers in vitro is sufficient to induce both the long-lasting acceleration and regularization of radula motor pattern generation found in vivo after appetitive operant conditioning. Furthermore, the induction of this motor plasticity appears to be critically dependent on En.2 afferent dopamine release and monosynaptic DA receptor activation.

Contingent-dependent DA release induces plasticity in B63 membrane properties

Since the increased rate and regularization of buccal pattern genesis and B63 bursting after in vivo operant conditioning is accompanied by specific alterations in the excitability and oscillatory properties of the pattern-initiating neurons (Nargeot et al. 2009), we assessed whether the contingent stimulation of En.2 in vitro was able to produce equivalent bioelectrical changes in these cells. The excitability of B63, which was defined as the amount of depolarizing current necessary to attain impulse threshold, was tested by injecting brief (1-sec) current pulses of increasing intensity into a recorded cell from a holding membrane potential of -70 mV. B63 excitability

was found to differ according to the training history of preparations ($H = 8.437$, $P < 0.025$) (Fig. 5A–C), with the spike threshold being significantly lower in B63s of the Contingent group than in either Non-contingent or Contingent + Flupentixol ganglia ($q = 3.965$, $P < 0.01$; $q = 4.011$, $P < 0.025$) (Fig. 5D). No significant difference was evident between the latter two groups ($q = 1.998$). Thus, the contingent stimulation of esophageal dopaminergic fibers was able to induce a similar increase in B63 excitability as that found after behavioral operant learning.

We next examined the ability of the contingent En.2 activation to evoke long-lasting modifications in the oscillatory properties of the B63 neurons by injecting steady depolarizing current (+4 nA) into a B63 cell while its contralateral partner was held silent by continuous hyperpolarization (Fig. 5E–G). Under this latter condition, activity of the buccal CPG is prevented and thus the

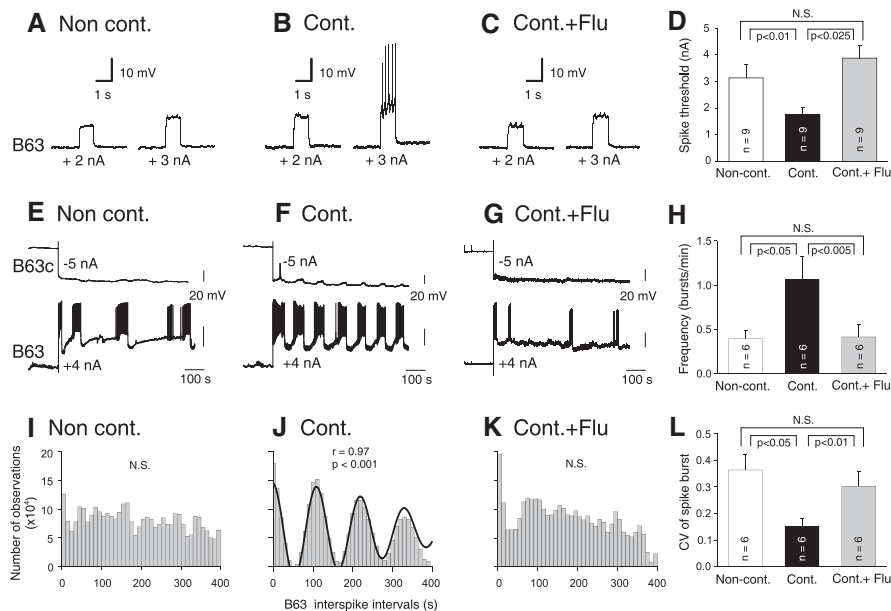


Figure 5. Flupenthiol blocks the plasticity in B63 membrane properties induced by in vitro operant conditioning. (A–C) Intracellular recordings of B63 neurons in Non-contingent (A), Contingent (B), and Contingent + Flupenthiol (C) B.g. during 1-sec depolarizing current injections of increasing intensity into cells initially held at -70 mV. Less current was required to reach spike threshold in the B63 cell of the Cont. preparation, indicating an increased excitability. (D) Group comparisons of B63 spike thresholds. The mean threshold value was significantly lower in Cont. B.g. than in either Non-cont. or Cont. + Flu. ganglia. The latter two groups were not significantly different. (E–G) Oscillatory bursting properties of functionally isolated B63 neurons (lower traces in each case) in response to constant depolarizing current (+4 nA) injection while the contralateral B63 cell (B63c, upper traces) was simultaneously held hyperpolarized (-5 nA) to prevent activation of the buccal CPG. Isolated B63 cells in the Non-cont. (E) and Cont. + Flu. (G) preparations generated slow, irregularly repeating spike bursts when continuously depolarized, whereas in the Cont. B.g. (F), depolarized-induced B63 bursts occurred at a higher frequency and with regular interburst intervals. (H) Group comparison of burst rates in functionally isolated B63 neurons. The frequency of B63 bursting increased significantly in the Cont. group as compared to the Non-cont. or Cont. + Flu. groups, which themselves were not significantly different. (I–K) Autocorrelation analyses of 2000 successive action potentials in functionally isolated B63 neurons. Impulses were randomly distributed in time in the Non-cont. (I) and Cont. + Flu. B.g. (K), as indicated by the flat histograms not significantly fitted by a Gabor function, but were organized in rhythmic bursts in a Cont. preparation (J) as indicated by a significant Gabor function fit (bold line). (L) Group comparison of the coefficients of variation (CV) of inter-burst intervals in functionally isolated B63 neurons. The mean CV was significantly lower in the Cont. group than in Non-cont. and Cont. + Flu. preparations. The latter two groups were not significantly different.

expression of cyclic bursting in the depolarized B63 cell is consistent with a current-induced activation of an underlying endogenous oscillatory mechanism (Nargeot et al. 2009). In accordance with their increased excitability seen above, the frequency of impulse bursts in such functionally isolated B63 neurons was significantly higher in the Contingent than in either the Non-contingent ($q = 3.403$, $P < 0.05$) or Contingent + Flupenthiol groups ($q = 4.303$, $P < 0.005$). Again the latter two groups were not significantly different ($q = 0.736$, $H = 6.799$, $P < 0.05$) (Fig. 5E–H), indicating that the antagonist prevented the associative rate increase.

The temporal distribution of B63 burst occurrences also differed among the three experimental groups in a manner consistent with En.2-derived dopaminergic neuromodulation. In non-contingent B.g., functionally isolated and continuously depolarized B63 neurons expressed bursting at highly irregular intervals (Fig. 5E,I) in correspondence with typical CPG network output of such control preparations (see Fig. 4C,G). In contrast, in contingent ganglia, B63 bursting in response to the same depolarizing current level was generated rhythmically with constant inter-burst intervals (Fig. 5F,J), as seen with the radula output

patterns of the functionally intact buccal network (see Fig. 4D,H). Moreover, the regularization of endogenous B63 bursting was a specific consequence of En.2 DA release since the stimulus-induced plasticity was impaired in the presence of Flupenthiol and depolarization-activated bursting occurred indiscriminately as in non-contingent preparations (Fig. 5G,K). This En.2 DA-dependent regularization of the B63 oscillatory mechanism was further evident in statistical comparisons of the coefficients of variation in interburst intervals, which varied significantly between three groups of preparation ($H = 6.659$, $P < 0.05$; Fig. 5L). The CVs were lower in contingent ganglia than in either the Non-contingent or Contingent + Flupenthiol groups ($q = 3.441$, $P < 0.05$; $q = 4.076$, $P < 0.01$), whereas the latter two groups were not significantly different ($q = 1.019$).

These findings thus indicated that contingent DA release elicited by En.2 stimulation in vitro is able to selectively modify the biophysical properties of the pattern-initiating B63 neurons in an equivalent manner to the cellular changes found previously with in vivo operant conditioning.

Contingent-dependent DA release increases electrical coupling between the pattern-initiating neurons

In addition to changing the intrinsic properties of the B63/B65/B30 neurons, operant learning also increases the strength of their electrical coupling (Nargeot et al. 2009). To determine the involvement of En.2-mediated DA release in this synaptic plasticity, the coupling coefficients of the left and right B63 neurons were compared in the three groups of preparation.

With both neurons of a recorded pair initially held at a membrane potential of -70 mV, the injection of a brief (2-sec) hyperpolarizing current pulse (-10 nA) into a pre-junctional B63 was typically found to evoke a greater hyperpolarizing deflection in the contralateral (post-junctional) B63 of contingent preparations than in that of non-contingent preparations (Fig. 6A,B lower traces). In contrast, in the presence of flupenthiol, the post-junctional B63 response to contingent En.2 stimulation remained similar to that observed in non-contingent preparations (Fig. 6A,C lower traces), again indicating that the associative increase was mediated by DA. This DA-dependent coupling increase is further evident in the summary data of Figure 6D, where B63–B63 coupling coefficients were significantly higher in contingent B.g. than in either the non-contingent or contingent + flupenthiol ganglia ($q = 3.552$, $P < 0.025$; $q = 3.863$, $P < 0.025$, respectively), which themselves were not significantly different ($q = 2.205$, $H = 7.599$, $P < 0.025$). A similar increase in electrical coupling resulting from contingent En.2 stimulation, which was blocked by flupenthiol, was also found

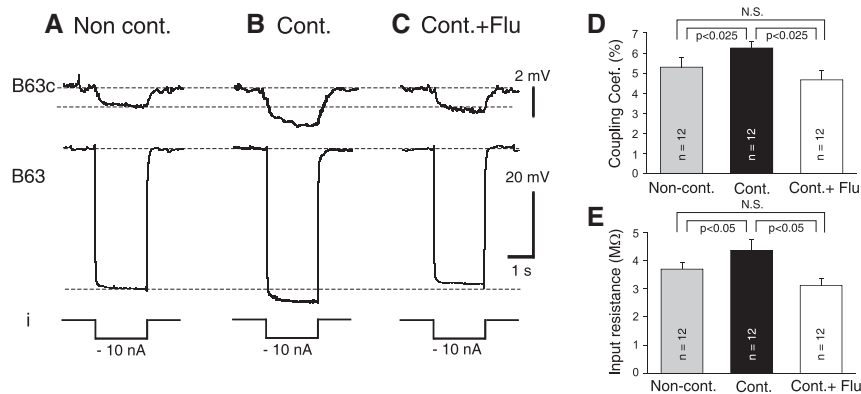


Figure 6. Flupenthixol blocks the increase in B63–B63 electrical coupling induced by in vitro operant conditioning. (A–C) Simultaneous recordings of the left and right B63 neurons during constant hyperpolarizing current pulse injection (–10 nA for 2 sec, lower trace) in one of the cell pair (B63 trace) in different Non-contingent (A), Contingent (B), and Contingent + Flupenthixol (C) preparations. The current injection revealed a concomitant increase in membrane input resistance and electrical coupling with the contralateral partner (lower dashed lines in the B63 and B63c recordings, respectively) in the Cont. B.g. compared to either the Non-cont. or Cont. + Flu. preparations. Note that in each case the two neurons were initially held at –70 mV (upper dashed lines in B63 and B63c). (D, E) Group comparisons of B63 coupling coefficient (D) and input resistance (E). Both parameters were significantly higher in the Contingent group than in either the Non-contingent or Contingent + Flupenthixol groups. The latter two groups were not significantly different.

between ipsilateral pattern-initiating cells, such as B63 and B30 (Supplemental Fig. 2).

This enhancement of electrical coupling could be due indirectly to a change in the input resistance (R_i) of these neurons and/or to a specific alteration in the junctional resistance of their connecting pathways (Bennett 1977). Although our data do not allow us to distinguish between these two possibilities, the experimental procedure used for coupling measurements under the different training conditions did reveal associated changes in membrane R_i (Fig. 6A–C, upper traces). As confirmed in the group data of Figure 6E, R_i was significantly different in B63 neurons from the three groups of preparation ($H = 6.083$, $P < 0.05$) (Fig. 6E), being higher in the Contingent group than in either the Non-contingent or Contingent + Flupenthixol preparations ($q = 2.891$, $P < 0.05$; $q = 3.48$, $P < 0.05$, respectively). Here again, the Non-contingent and Contingent + Flupenthixol groups were not significantly different ($q = 2.286$). Thus, the contingent stimulation of En.2 and resulting DA receptor activation increased B63 R_i , which was likely to account, at least in part, for the apparent enhancement in electrical coupling between these essential pattern-initiating neurons.

Discussion

Using an in vitro analog of operant conditioning of feeding behavior in *Aplysia*, we report that a contingent electrical stimulation of bilateral esophageal nerve branches is able to reproduce major features of the neuronal plasticity associated with the induction of compulsive-like food seeking that results from operant reward learning in vivo (Nargeot et al. 2007, 2009). Specifically, direct En.2 stimulation increased both the frequency and regularity of radula motor pattern expression and produced a long-lasting modulation of the membrane properties and electrical coupling of neurons that are essential for pattern genesis. Importantly, moreover, the induction of these network and cellular changes was blocked by an *Aplysia* D1-like receptor antagonist, flupenthixol, thereby indicating a fundamental role for dopamine in mediating the operant plasticity (Barbas et al. 2006).

Several earlier studies have provided substantial evidence that esophageal input nerve fibers mediate food-reward processes in *Aplysia*: (1) food stimuli that contributed to the reinforcing process in different forms of both operant and classical conditioning were found to elicit transient esophageal nerve activity (Schwarz and Susswein 1986; Lechner et al. 2000; Brembs et al. 2002); (2) such appetitive associative learning was impaired by lesions to these afferent pathways; (3) in vitro analogs of this associative-learning phasic En.2 electrical stimulation to mimic food signals conveyed in vivo was found to reproduce various facets of the motor circuit- and/or cell-wide plasticity resulting from learning (Nargeot et al. 1999a,b; Brembs et al. 2002, 2004; Reyes et al. 2005; Mozzachiodi et al. 2008). In addition, there is considerable data indicating that the esophageal nerve terminals release DA: (1) histofluorescence analyses showed these bilateral nerves to be rich in DA-containing fibers and En.2 was also found to be immunoreactive to tyrosine hydroxylase (Kabotyanski et al. 1998; Martínez-Rubio et al. 2009); (2) in vitro exposure to a DA antagonist, methylergonovine, blocked the monosynaptic actions of esophageal inputs on identified neurons (e.g., B51; see below) of the buccal CPG circuit (Nargeot et al. 1999c) and transient iontophoretic application of DA to such neurons in culture reproduced their membrane responses to esophageal nerve stimulation in situ (Brembs et al. 2002; Lorenzetti et al. 2008).

The pivotal contribution of DA to a rewarding function in associative learning has become increasingly evident in both invertebrates and vertebrates (Schultz 1997; Brembs et al. 2002; Everitt and Robbins 2005; Reyes et al. 2005; Kemeses et al. 2011; Burke et al. 2012). Our present findings corroborate this general principle by indicating that buccal motor network and cellular plasticity, which is blocked by flupenthixol, is specifically induced by the contingent stimulation of En.2 with motor pattern expression to reproduce the reward/action association of operant learning. Although our data point strongly to a mediating role for DA in the contingent reinforcement process, further experiments are required to determine whether stimulation of En.2, which accesses the wider buccal CPG network, might also lead to indirect cellular and circuit changes *via* non-dopaminergic transmitter release. Moreover, DA can contribute to the autonomous process of motor pattern genesis. Such an additional effect of DA was indicated by the observation that high doses of flupenthixol increased spontaneous buccal motor pattern genesis and CPG responsiveness to tonic stimulation of the peripheral nerve 2,3. Whether this apparent inhibitory influence of DA on buccal CPG function also contributes to the operant learning-induced changes remains unknown. Nevertheless, it is noteworthy that this latter plasticity was selectively blocked by exposure to low doses of flupenthixol during the training period, impairing the rewarding effect of esophageal nerve stimulation but without affecting the autonomous process of motor pattern generation. Therefore, without excluding the possibility of an additional DA-dependent modulation of buccal network operation, our data provide strong evidence that at least the neuronal plasticity arising from the rewarding effects of contingent En.2 stimulation is mediated by DA.

Operant conditioning of *Aplysia* feeding was previously found to modify the animal's decision-making capability for the autonomous selection and initiation of radula feeding-related actions, leading to a long-lasting increase in the frequency and regularity of ingestive (biting) movement occurrences (Nargeot and Simmers 2012). In the present study, the *in vitro* analog of this operant conditioning used to explore the role of contingent-dependent DA release in the reinforcement pathway was similar to that initially developed to analyze the contribution of rewarding esophageal nerve input to selecting the type of radula motor pattern produced (Nargeot et al. 1997; Mozzachiodi et al. 2008). In this analog of learning the contingent stimulation of En.2 (10 Hz, 6 sec, 8–9 V), which was delivered at the end of the retraction phase of each spontaneous ingestive pattern, was found to selectively favor the continued expression of the rewarded pattern. Moreover, this plasticity was associated with a DA-dependent enhancement of plateauing properties in buccal network neuron B51, which, in turn, during the retraction phase of pattern genesis modifies the decision process for the type of radula output expressed, biasing motor pattern selection toward ingestive (i.e., biting) rather than egestive pattern genesis (Nargeot et al. 1999a,b,c; Brembs et al. 2002; Mozzachiodi et al. 2008). Although an increased rate of radula pattern genesis was also observed in this analog of operant conditioning, the underlying cellular mechanisms and the ability of contingent En.2 stimulation and DA release to transform motor pattern production from sporadic to stereotyped rhythmogenesis, as addressed in the present study, had not been previously investigated. In the present study, the decision process for when (buccal pattern initiation) rather than how (pattern selection) to act was examined. The *in vitro* experiments were therefore designed so that bilateral En.2 stimulation (10 Hz, 5 sec, 8 V) was delivered after the initiation of each motor pattern, i.e., after each protraction phase and activity in B63, to reproduce the *in vivo* concomitancy of delivery of reward at the end of protraction (Brembs et al. 2002; Nargeot et al. 2007). This paradigm does not allow correlating the En.2 stimulation with expression of the ingestion pattern alone, since the nature of the pattern can only be identified once the pattern has fully terminated (i.e., by the amount of overlap of closure activity with the retraction phase [(Nargeot et al. 1997)]). Thus, the paradigm of *in vitro* En.2 stimulation reproduced only one aspect of *in vivo* operant learning—the contingency of the reward with the autonomous process of radula motor pattern initiation—but it was unable to reproduce the strict contingency with the process of ingestive pattern selection. The autonomous initiation of ingestive and egestive patterns is accomplished predominantly by the same CPG neurons (e.g., B63 [Nargeot et al. 2012]). Consequently, the *in vitro* stimulation paradigm reinforces the expression of both patterns, reproducing the expected association between the rewarding stimulus and spontaneous bursting in these CPG cells, but potentially resulting in more frequent action/reward associations than with the ingestion-specific paradigm used *in vivo*. Nevertheless, the *in vitro* and *in vivo* paradigms both led to more frequent and regular motor pattern occurrences, suggesting an equivalent underlying plasticity involving the same pattern-initiating neurons. Our results indicate that the contingent activation of En.2 modifies motor pattern genesis in association with a DA-mediated increase in excitability, regularization of oscillatory properties, and enhancement in the electrical coupling of the buccal neurons B63. Thus, the contingent-dependent release of DA from the afferent pathway *in vitro* does, indeed, replicate the network and cellular plasticity previously found associated with the learning-induced expression of compulsive-like food-seeking behavior *in vivo* (Nargeot et al. 2009).

It is well known that endogenous DA release or exogenous DA application can modulate neuronal membrane properties. In

Aplysia, the amine has been found to modify the excitability, bursting, and plateau-generating properties, and post-inhibitory rebound and oscillatory properties of neurons belonging to the buccal CPG network (Lewis et al. 1984; Nargeot et al. 1999a,b; Kabotyanski et al. 2000; Brembs et al. 2002; Serrano and Miller 2006). Moreover, these modulatory actions vary according to the target cell type and whether exposure to the amine is continuous or intermittent. For example, tonic DA application decreases the excitability of buccal circuit neurons B4/5, B34, B64 (Kabotyanski et al. 2000), enhances post-inhibitory rebound in B8 (Kabotyanski et al. 2000), and increases the bursting and plateauing properties of B67 (Serrano and Miller 2006; Serrano et al. 2007). Alternatively, phasic DA release induced by contingent reward reinforcement *in vivo* or contingent En.2 stimulation *in vitro* augments both the intrinsic excitability and plateauing capability of neuron B51 (Nargeot et al. 1999a; Brembs et al. 2002; Lorenzetti et al. 2008). Here, we report evidence that a similar contingently evoked DA release from En.2 fiber terminals in isolated B.g. increases the excitability and stabilizes the intrinsic oscillatory properties of the buccal pattern-initiating B63 neurons, and, as a result, is able to reproduce essential features of the cellular plasticity resulting from behavioral associative learning (Nargeot et al. 2009). DA has been previously found capable of activating endogenous oscillatory mechanisms in previously silent neurons or increasing the frequency of ongoing oscillatory activity (Flamm and Harris-Warrick 1986b; Kadiri et al. 2011). Our data extend these findings by showing that the amine can also regularize the otherwise erratic expression of neuronal oscillatory activity, thereby leading to stereotyped rhythmic bursting (see also Serrano and Miller 2006). The ability of DA to exert differential cell-specific effects on intrinsic membrane properties is attributable to several factors, including variability in DA receptor function (see Missale et al. 1998; Mustard et al. 2005) as well as differences in both the arrays of modulated conductances (Harris-Warrick and Flamm 1987; Lledo et al. 1992; Barnes et al. 1994; Schiffmann et al. 1995; Surmeier et al. 1995; Kloppenburg et al. 1999; Johnson et al. 2003; Ballo et al. 2010) and the nature of, and interactions between, the underlying second messenger cascades (Lorenzetti et al. 2008). Consequently, the amine can dynamically specify functional network variants according to specific behavioral demands (Flamm et al. 1986a,b; Nargeot et al. 1999b).

In addition to altering intrinsic membrane properties, DA is also known to modulate neuronal connectivity (see Surmeier et al. 2011), including chemical and electrical synapses in vertebrates and invertebrates (Lasater and Dowling 1985; Pereda et al. 1992; Johnson et al. 1993; Johnson and Harris-Warrick 1997; Kumar and Faber 1999; Kabotyanski et al. 2000; see also Bloomfield and Völgyi 2009). In *Aplysia*'s buccal network, tonic application of exogenous DA is capable of increasing or decreasing the strength of chemical synapses depending on the connected cell pair (Kabotyanski et al. 2000). Here, we provide evidence that a phasic (contingent) release of endogenous DA from esophageal nerve terminals enhances the strength of the electrical coupling within and between the bilateral B63 neurons and their pattern-initiating cell partners in an equivalent manner to their coupling plasticity resulting from behavioral operant learning (Nargeot et al. 2009). However, it remains to be determined whether this modulation resides solely with an overall increase in the input resistance of non-junctional membrane in these neurons, as indicated by our current data, or additionally involves a direct DA-mediated increase in their junctional resistance, as found elsewhere for gap-junctional coupling (Yang et al. 1990; Harsanyi and Mangel 1992; Johnson et al. 1993; Ribelayga et al. 2008; Hu et al. 2010). In other central pattern-generating networks, dopaminergic modulation of network electrical coupling can modify the

frequency of motor pattern genesis or switch neuronal activity from irregular to regular and coordinated rhythmic bursting (Ayali and Harris-Warrick 1999; Varona et al. 2001; Venaille et al. 2005). In *Aplysia*, the DA-dependent increase in electrical coupling among the buccal pattern-initiating neurons is similarly associated with changes in the frequency and regularity of their bursting activity and radula motor pattern expression. However, whether these long-lasting changes are causally linked to the coupling increase or that the latter is a secondary consequence of the DA-mediated alterations in cellular properties remains to be established.

Materials and Methods

Animals

Experiments were performed on adult *Aplysia californica* (80% of animals) and *Aplysia fasciata* (20%), depending on seasonal availability, and were purchased from the University of Miami (FL) or caught locally in the Bay of Arcachon (France), respectively. All experimental protocols were repeated using both species and, consistent with a previous combined study on these two animals, no interspecies differences in electrophysiological findings were obtained (Katzoff et al. 2002; Nargeot et al. 2009). However, for consistency among the figures in this report, all illustrated electrical recordings were obtained from *A. californica*. The animal housing and feeding conditions were identical to those described previously (e.g., Nargeot et al. 2007).

Saline and pharmacology

Animals were first anesthetized with a hemolymphatic injection of a solution of MgCl_2 (360 mM) buffered with HEPES (10 mM) and adjusted to pH 7.5. The bilateral buccal ganglia (B.g.) were dissected out and placed in a Petri dish under artificial sea water (ASW) composed of (mM): NaCl 450, KCl 10, MgCl_2 (6H₂O) 30, MgSO_4 20, CaCl_2 (2H₂O) 10, HEPES 10, with the pH adjusted to 7.5 and maintained at 15°C by a Peltier cooling device. A high divalent bathing solution, which was used to reduce neuronal excitability, was composed of ASW containing (mM) CaCl_2 30 and MgCl_2 182, with the osmolarity of the solution being adjusted by an appropriate reduction in NaCl. Solutions of cis-(Z)-flupenthixol dihydrochloride (flupenthixol, Sigma-Aldrich) were prepared in control or high divalent ASW before each experiment. Flupenthixol is reportedly a mixed D1/D2 dopamine receptor antagonist in vertebrates and has been found to impair D1-like receptor function in various invertebrates, including mollusks (Gotzes et al. 1994; Blenau et al. 1998; Soyka and De Vry 2000; Kiss et al. 2003; Sanyal et al. 2004; Barbas et al. 2006; Ohta et al. 2009). The experimenter was not aware either of the presence or the concentration of flupenthixol in the solutions used.

Electrophysiology

Extracellular recordings and stimulations were made using wire pin electrodes insulated from the bath by petroleum jelly (Vaseline). Bipolar electrodes were used for tonic stimulation (8 V, 0.3-msec pulses at 2 Hz) of the bilateral 2,3 nerves (n.2,3) and phasic stimulation (8 V, 0.3-msec pulses at 10 Hz in 5-sec trains) of the anterior branches of the bilateral esophageal nerves (En.2 [Nargeot et al. 2007]) using a Grass S88 stimulator (Astro-Medical/Grass Instruments). In all experimental groups, measurements of neuronal activity started 10 min after the onset of inciting stimulation of the n.2,3 (Nargeot et al. 1997). In the contingent stimulus paradigm, stimulation of En.2 started at the end of the protraction phase of each radula motor pattern cycle.

Intracellular recordings of identified cells were made with capillary glass electrodes filled with 2 M KCH_3CO_2 (tip resistance 20–30 M Ω). Individual cells were identified according to their known synaptic connections and the phase positions of their action potential bursts within each radula motor pattern (see Nargeot et al. 2009). Cell excitability, input resistance, and electri-

cal coupling were measured with two intrasomatic electrodes per neuron, one for injecting current and the other for recording the resultant pre- and post-junctional voltage deflections. Measurements of these properties were made with cells held at an initial resting membrane potential of -70 mV. Input resistance was calculated from the maximal membrane potential deflection evoked by -10 -nA injected current. Neuronal excitability was measured as the minimum amount of depolarizing current (1-sec pulses by steps of $+0.5$ nA from 0 nA) necessary to elicit an action potential. Electrical coupling between a cell pair was quantified by their coupling coefficient defined as the ratio of the post-junctional voltage response to a pre-junctional voltage change elicited by a 2-sec, -10 -nA pulse in the pre-junctional neuron. The oscillatory membrane properties of B63 neurons were tested by the intracellular injection of sustained depolarizing current ($+4$ nA) with the cell at its resting membrane potential. The latter was not significantly different among the three experimental groups of preparations (Non-contingent, -66.1 ± 3.5 mV; Contingent, -68.8 ± 2.9 mV; Contingent + Flupenthixol, -65.0 ± 4.9 mV; $H = 0.561$).

Data analysis

Autocorrelation histograms of radula motor pattern genesis or of impulse bursts in individual neurons were made from 100 consecutive patterns or 2000 action potentials, respectively. Successive motor patterns or spike bursts were considered to be rhythmically distributed in time when the corresponding autocorrelation histogram could be fitted, with statistical significance, by a sinusoidal Gabor function (Nargeot et al. 2007). Data in dose–response curves were fitted by a standard Hill equation:

$$y = y_0 + \frac{a}{1 + \left(\frac{x}{\text{EC}_{50}}\right)^b}.$$

In all cases, calculation of the equation's parameters and the statistical significance of fits were performed using SigmaPlot software (SystatCA). Comparisons of two and more than two independent data groups were made using the Mann–Whitney Rank Sum Test (U) and Kruskal–Wallis test (H), respectively. Comparisons between more than two dependent data groups were made using the Friedman repeated measures ANOVA on ranks (χ^2). Post-hoc pair-wise multiple comparisons and multiple comparisons vs. the corresponding control group were made using the Newman–Keuls multiple range test (q) and Dunn's test (Q), respectively. Differences were considered to be statistically significant when $P < 0.05$. The numbers of preparations (n) used in each experimental treatment are provided in the group data analyses of the corresponding figures.

Acknowledgments

A.B. was supported by a doctoral studentship from the French Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (Université Bordeaux 1). We thank Lionel Parra-Iglesias for assistance with animal maintenance.

References

- Ashby FG, Turner BO, Horvitz JC. 2010. Cortical and basal ganglia contributions to habit learning and automaticity. *Trends Cogn Sci* **14**: 208–215.
- Ayali A, Harris-Warrick RM. 1999. Monoamine control of the pacemaker kernel and cycle frequency in the lobster pyloric network. *J Neurosci* **19**: 6712–6722.
- Ballo AW, Keene JC, Troy PJ, Goeritz ML, Nadim F, Bucher D. 2010. Dopamine modulates I_h in a motor axon. *J Neurosci* **30**: 8425–8434.
- Barbas D, Zappulla JP, Angers S, Bouvier M, Mohamed HA, Byrne JH, Castellucci VF, DesGroseillers L. 2006. An *Aplysia* dopamine1-like receptor: Molecular and functional characterization. *J Neurochem* **96**: 414–427.

- Barnes S, Syed NI, Bulloch AG, Lukowiak K. 1994. Modulation of ionic currents by dopamine in an interneuron of the respiratory central pattern generator of *Lymnaea stagnalis*. *J Exp Biol* **189**: 37–54.
- Baxter DA, Byrne JH. 2006. Feeding behavior of *Aplysia*: A model system for comparing cellular mechanisms of classical and operant conditioning. *Learn Mem* **13**: 669–680.
- Belin D, Everitt BJ. 2008. Cocaine seeking habits depend upon dopamine-dependent serial connectivity linking the ventral with the dorsal striatum. *Neuron* **57**: 432–441.
- Bennett MVL. 1977. Electrical transmission: A functional analysis and comparison to chemical transmission. In *Cellular biology of neurons. Handbook of physiology, the nervous system* (ed. Kandel ER), pp. 357–416. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.
- Blenau W, Erber J, Baumann A. 1998. Characterization of a dopamine D1 receptor from *Apis mellifera*: Cloning, functional expression, pharmacology, and mRNA localization in the brain. *J Neurochem* **70**: 15–23.
- Bloomfield SA, Völgyi B. 2009. The diverse functional roles and regulation of neuronal gap junctions in the retina. *Nat Rev Neurosci* **10**: 495–506.
- Brembs B, Lorenzetti FD, Reyes FD, Baxter DA, Byrne JH. 2002. Operant reward learning in *Aplysia*: Neuronal correlates and mechanisms. *Science* **296**: 1706–1709.
- Brembs B, Baxter DA, Byrne JH. 2004. Extending in vitro conditioning in *Aplysia* to analyze operant and classical processes in the same preparation. *Learn Mem* **11**: 412–420.
- Burke CJ, Huetteroth W, Oswald D, Perisse E, Krashes MJ, Das G, Gohl D, Silies M, Certel S, Waddell S. 2012. Layered reward signalling through octopamine and dopamine in *Drosophila*. *Nature* **492**: 433–437.
- Byrne JH, Castellucci FD, Kandel ER. 1978. Contribution of individual mechanoreceptor sensory neurons to defensive gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. *J Neurophysiol* **4**: 418–431.
- Everitt BJ, Robbins TW. 2005. Neural systems of reinforcement for drug addiction: From actions to habits to compulsion. *Nat Neurosci* **8**: 1481–1489.
- Flamm RE, Harris-Warrick RM. 1986a. Aminergic modulation in lobster stomatogastric ganglion. I. Effects on motor pattern and activity of neurons within the pyloric circuit. *J Neurophysiol* **55**: 847–865.
- Flamm RE, Harris-Warrick RM. 1986b. Aminergic modulation in lobster stomatogastric ganglion. II. Target neurons of dopamine, octopamine, and serotonin within the pyloric circuit. *J Neurophysiol* **55**: 866–881.
- Gotzes F, Balfanz S, Baumann A. 1994. Primary structure and functional characterization of a *Drosophila* dopamine receptor with high homology to human D1/5 receptors. *Receptors Channels* **2**: 131–141.
- Harris-Warrick RM, Flamm RE. 1987. Multiple mechanisms of bursting in a conditional bursting neuron. *J Neurosci* **7**: 2113–2128.
- Harsanyi K, Mangel SC. 1992. Activation of a D2 receptor increases electrical coupling between retinal horizontal cells by inhibiting dopamine release. *Proc Natl Acad Sci* **89**: 9220–9224.
- Hu EH, Pan F, Völgyi B, Bloomfield SA. 2010. Light increases the gap junctional coupling of retinal ganglion cells. *J Physiol* **588**: 4145–4163.
- Ito R, Dalley JW, Robbins TW, Everitt BJ. 2002. Dopamine release in the dorsal striatum during cocaine-seeking behavior under the control of a drug-associated cue. *J Neurosci* **22**: 6247–6253.
- Johnson BR, Harris-Warrick RM. 1997. Amine modulation of glutamate responses from pyloric motor neurons in lobster stomatogastric ganglion. *J Neurophysiol* **78**: 3210–3221.
- Johnson PM, Kenny PJ. 2010. Dopamine D2 receptors in addiction-like reward dysfunction and compulsive eating in obese rats. *Nat Neurosci* **13**: 635–641.
- Johnson BR, Peck JH, Harris-Warrick RM. 1993. Amine modulation of electrical coupling in the pyloric network of the lobster stomatogastric ganglion. *J Comp Physiol A* **172**: 715–732.
- Johnson BR, Kloppenburg P, Harris-Warrick RM. 2003. Dopamine modulation of calcium currents in pyloric neurons of the lobster stomatogastric ganglion. *J Neurophysiol* **90**: 631–643.
- Kabotyanski EA, Baxter DA, Byrne JH. 1998. Identification and characterization of catecholaminergic neuron B65, which initiates and modifies patterned activity in the buccal ganglia of *Aplysia*. *J Neurophysiol* **79**: 605–621.
- Kabotyanski EA, Baxter DA, Cushman SJ, Byrne JH. 2000. Modulation of fictive feeding by dopamine and serotonin in *Aplysia*. *J Neurophysiol* **83**: 374–392.
- Kadiri LR, Kwan AC, Webb WW, Harris-Warrick RM. 2011. Dopamine-induced oscillations of the pyloric pacemaker neuron rely on release of calcium from intracellular stores. *J Neurophysiol* **106**: 1288–1298.
- Katzoff A, Ben-Gedalya T, Susswein AJ. 2002. Nitric oxide is necessary for multiple memory processes after learning that a food is inedible in *Aplysia*. *J Neurosci* **22**: 9581–9594.
- Kemenes I, O'Shea M, Benjamin PR. 2011. Different circuit and monoamine mechanisms consolidate long-term memory in aversive and reward classical conditioning. *Eur J Neurosci* **33**: 143–152.
- Kiss T, Hiripi L, Papp N, Elekes K. 2003. Dopamine and serotonin receptors mediating contractions of the snail, *Helix pomatia*, salivary duct. *Neurosci* **117**: 775–790.
- Kloppenburger P, Levini RM, Harris-Warrick RM. 1999. Dopamine modulates two potassium currents and inhibits the intrinsic firing properties of an identified motor neuron in a central pattern generator network. *J Neurophysiol* **81**: 29–38.
- Kumar SS, Faber DS. 1999. Plasticity of first-order sensory synapses: Interactions between homosynaptic long-term potentiation and heterosynaptically evoked dopaminergic potentiation. *J Neurosci* **19**: 1620–1635.
- Lasater EM, Dowling JE. 1985. Dopamine decreases conductance of the electrical junctions between cultured retinal horizontal cells. *Proc Natl Acad Sci* **82**: 3025–3029.
- Lechner HA, Baxter DA, Byrne JH. 2000. Classical conditioning of feeding in *Aplysia*: I. Behavioral Analysis. *J Neurosci* **20**: 3369–3376.
- Lenoir M, Serre F, Cantin L, Ahmed SH. 2007. Intense sweetness surpasses cocaine reward. *PLoS One* **2**: e698.
- Lewis DV, Evans GB, Wilson WA. 1984. Dopamine reduces slow outward current and calcium influx in burst-firing neuron R15 of *Aplysia*. *J Neurosci* **4**: 3014–3020.
- Lledo PM, Homburger V, Bockaert J, Vincent JD. 1992. Differential G protein-mediated coupling of D2 dopamine receptors to K⁺ and Ca²⁺ currents in rat anterior pituitary cells. *Neuron* **8**: 455–463.
- Lorenzetti FD, Baxter DA, Byrne JH. 2008. Molecular mechanisms underlying a cellular analog of operant reward learning. *Neuron* **59**: 815–828.
- Martínez-Rubio C, Serrano GE, Miller MW. 2009. Localization of biogenic amines in the foregut of *Aplysia californica*: Catecholaminergic and serotonergic innervation. *J Comp Neurol* **514**: 329–342.
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jabbler M, Caron MG. 1998. Dopamine receptors: From structure to function. *Physiol Rev* **78**: 189–225.
- Mozzachioli R, Lorenzetti FD, Baxter DA, Byrne JH. 2008. Changes in neuronal excitability serve as a mechanism of long-term memory for operant conditioning. *Nat Neurosci* **11**: 1146–1148.
- Mustard J, Beggs KT, Mercer AR. 2005. Molecular biology of the invertebrate dopamine receptors. *Arch Insect Biochem Physiol* **59**: 103–117.
- Nargeot R, Simmers J. 2012. Functional organization and adaptability of a decision-making network in *Aplysia*. *Front Neurosci* **6**: 113.
- Nargeot R, Baxter DA, Byrne JH. 1997. Contingent-dependent enhancement of rhythmic motor patterns: An in vitro analog of operant conditioning. *J Neurosci* **17**: 8093–8105.
- Nargeot R, Baxter DA, Byrne JH. 1999a. In vitro analog of operant conditioning in *Aplysia*. I. Contingent reinforcement modifies the functional dynamics of an identified neuron. *J Neurosci* **19**: 2247–2260.
- Nargeot R, Baxter DA, Byrne JH. 1999b. In vitro analogue of operant conditioning in *Aplysia*. II. Modifications of the functional dynamics of an identified neuron contribute to motor pattern selection. *J Neurosci* **19**: 2261–2272.
- Nargeot R, Baxter DA, Patterson GW, Byrne JH. 1999c. Dopaminergic synapses mediate neuronal changes in an analogue of operant conditioning. *J Neurophysiol* **81**: 1983–1987.
- Nargeot R, Petrisans C, Simmers J. 2007. Behavioral and in vitro correlates of compulsive-like food-seeking induced by operant conditioning in *Aplysia*. *J Neurosci* **27**: 8059–8070.
- Nargeot R, Le Bon-Jego M, Simmers J. 2009. Cellular and network mechanisms of operant learning-induced compulsive behaviour in *Aplysia*. *Curr Biol* **19**: 975–984.
- Ohta H, Tsuchihara K, Mitsumasa K, Yaginuma T, Ozoe Y, Asaoka K. 2009. Comparative pharmacology of two D1-like dopamine receptors cloned from the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol* **39**: 342–347.
- Pereda A, Triller A, Korn H, Faber DS. 1992. Dopamine enhances both electrotonic coupling and chemical excitatory postsynaptic potentials at mixed synapses. *Proc Natl Acad Sci* **89**: 12088–12092.
- Pilla M, Perachon S, Sautel F, Garrido F, Mann A, Wermuth CG, Schwartz JC, Everitt BJ, Sokoloff P. 1999. Selective inhibition of cocaine-seeking behaviour by a partial dopamine D3 receptor agonist. *Nature* **400**: 371–375.
- Reyes FD, Mozzachioli R, Baxter DA, Byrne JH. 2005. Reinforcement in an in vitro analog of appetitive classical conditioning of feeding behavior in *Aplysia*: Blockade by a dopamine antagonist. *Learn Mem* **12**: 216–220.
- Ribelayga C, Cao Y, Mangel SC. 2008. The circadian clock in the retina controls rod–cone coupling. *Neuron* **59**: 790–801.
- Rogers RD. 2011. The roles of dopamine and serotonin in decision making: Evidence from pharmacological experiments in humans. *Neuropsychopharmacology* **36**: 114–132.

- Rogers PJ, Smit HJ. 2000. Food craving and food "addiction": A critical review of the evidence from a biopsychological perspective. *Pharmacol Biochem Behav* **66**: 3–14.
- Sanyal S, Wintle RF, Kindt KS, Nuttley WM, Arvan R, Fitzmaurice P, Bigras E, Merz DC, Hébert TE, van der Kooy D, et al. 2004. Dopamine modulates the plasticity of mechanosensory responses in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J* **23**: 473–482.
- Schiffmann SN, Lledo PM, Vincent JD. 1995. Dopamine D1 receptor modulates the voltage-gated sodium current in rat striatal neurons through a protein kinase A. *J Physiol (Lond)* **483**: 95–107.
- Schultz W. 1997. Dopamine neurons and their role in reward mechanisms. *Curr Opin Neurobiol* **7**: 191–197.
- Schwarz M, Susswein AJ. 1986. Identification of the neural pathway for reinforcement of feeding when *Aplysia* learn that food is inedible. *J Neurosci* **6**: 1528–1536.
- Serrano GE, Miller MW. 2006. Conditional rhythmicity and synchrony in a bilateral pair of bursting motor neurons in *Aplysia*. *J Neurophysiol* **96**: 2056–2071.
- Serrano GE, Martínez-Rubio C, Miller MW. 2007. Endogenous motor neuron properties contribute to a program-specific phase of activity in the multifunctional feeding central pattern generator of *Aplysia*. *J Neurophysiol* **98**: 29–42.
- Shiflett MW, Balleine BW. 2011. Molecular substrates of action control in cortico-striatal circuits. *Prog Neurobiol* **95**: 1–13.
- Soyka M, De Vry J. 2000. Flupenthixol as a potential pharmacotreatment of alcohol and cocaine abuse/dependence. *Eur Neuropsychopharmacol* **10**: 325–332.
- Surmeier DJ, Bargas J, Hemmings HC, Nairn AC, Greengard P. 1995. Modulation of calcium currents by a D1 dopaminergic protein kinase/phosphatase cascade in rat neostriatal neurons. *Neuron* **14**: 385–397.
- Surmeier DJ, Carrillo-Reid L, Bargas J. 2011. Dopaminergic modulation of striatal neurons, circuits, and assemblies. *Neuroscience* **198**: 3–18.
- Susswein AJ, Schwarz M, Feldman E. 1986. Learned changes of feeding behavior in *Aplysia* in response to edible and inedible foods. *J Neurosci* **6**: 1513–1527.
- Tritsch NX, Sabatini BL. 2012. Dopaminergic modulation of synaptic transmission in cortex and striatum. *Neuron* **76**: 33–50.
- Varona P, Torres JJ, Huerta R, Abarbanel HDI, Rabinovich MI. 2001. Regularization mechanisms of spiking-bursting neurons. *Neural Netw* **14**: 865–875.
- Venaille A, Varona P, Rabinovich MI. 2005. Synchronization and coordination of sequences in two neural ensembles. *Phys Rev E* **71**: 061909.
- Yang XD, Korn H, Faber DS. 1990. Long-term potentiation of electrotonic coupling at mixed synapses. *Nature* **348**: 542–545.
- Yin HH, Knowlton BJ. 2006. The role of the basal ganglia in habit formation. *Nat Rev Neurosci* **7**: 464–476.

Received October 26, 2012; accepted in revised form April 4, 2013.

Implication of dopaminergic modulation in operant reward learning and the induction of compulsive-like feeding behavior in *Aplysia*.

Alexis Bédécarrats, Charles Cornet, John Simmers and Romuald Nargeot

Univ. Bordeaux, INCIA, UMR 5287, F-33000 Bordeaux, France
CNRS, INCIA, UMR 5287, F-33000 Bordeaux, France.

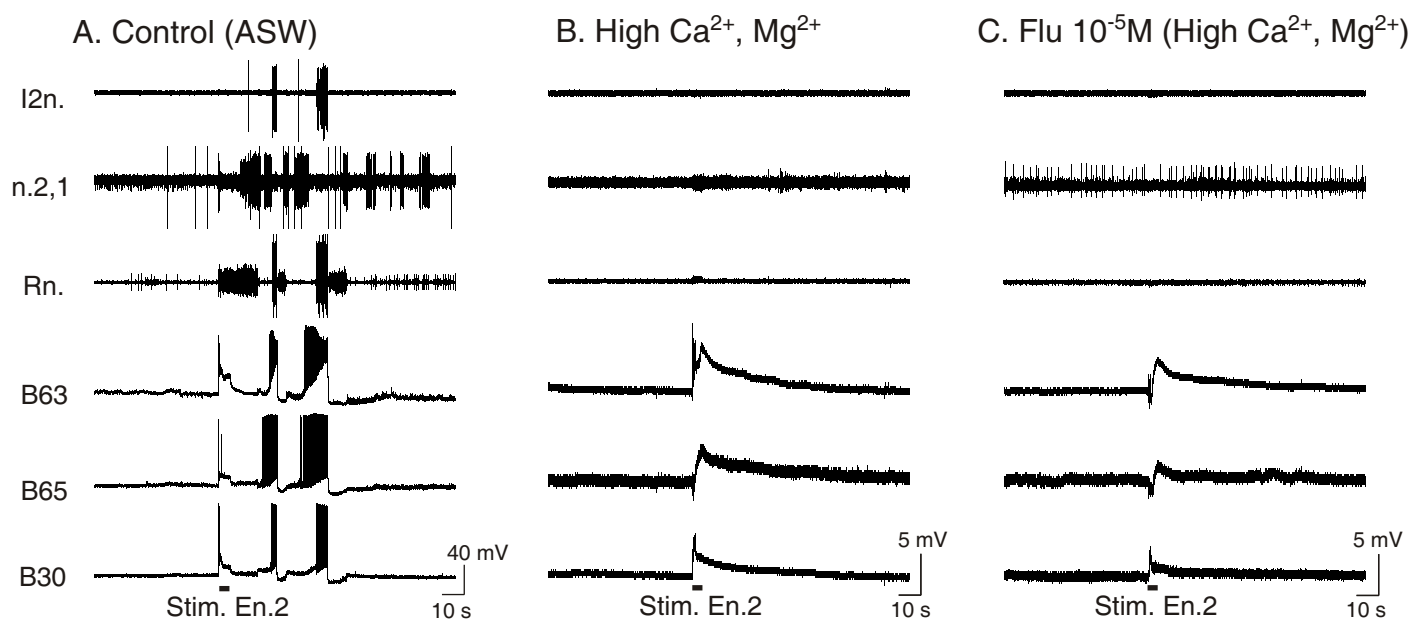
Supplemental Figure 1. Blockade of En.2-derived monosynaptic activation of B63, B65 and B30 pattern-initiating neurons by Flupenthixol.

(A) In control saline, a single train stimulation (horizontal bar; 10 Hz, 5 s) of En.2 evoked a depolarization of the B63, B65 and B30 cells (lower intracellular traces) which in turn led to repetitive impulse bursts associated with radula motor pattern emissions (upper extracellular traces).

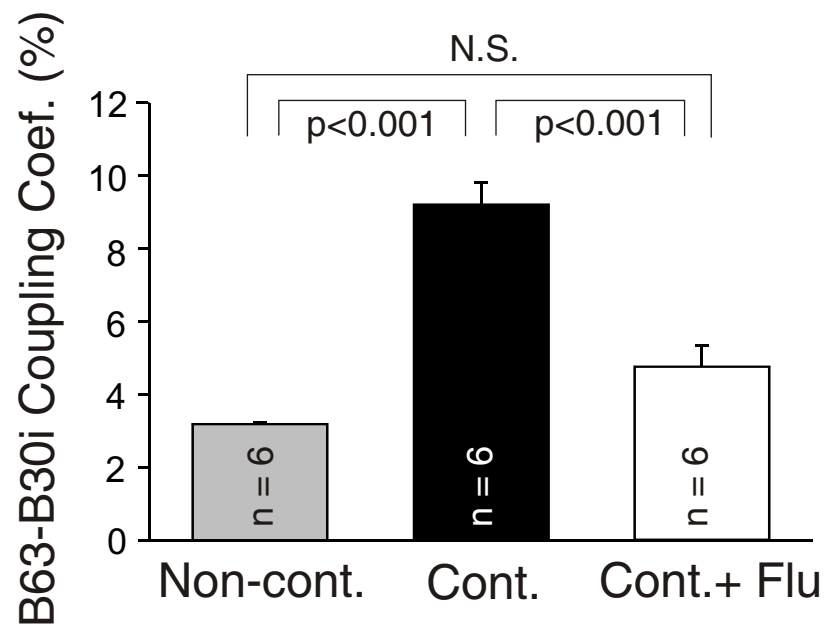
(B-C) In elevated divalent ion ASW, the monosynaptic depolarization of all three cells in response to En.2 stimulation (10 Hz, 5 s) (B) was reduced by the additional presence of Flupenthixol (C).

Supplemental Figure 2. Flupenthixol blocks the increase in B63-B30 electrical coupling induced by *in vitro* operant conditioning.

Group comparisons of mean coupling coefficients between a B63 and an ipsilateral B30 neuron (B30i). The coupling coefficient was significantly higher in the Contingent group as compared to the Non-contingent ($q = 5.047$; $p < 0.001$) and Contingent+Flupenthixol groups ($q = 4.756$; $p < 0.001$). The Non-contingent and Contingent+Flupenthixol B.g. groups were not significantly different ($q = 2.717$).



Supplemental Figure 1



Supplemental Figure 2