



**HAL**  
open science

# Contribution d'une activité neuronale pacemaker dans l'expression et l'adaptation d'un comportement motivé chez l'aplysie

Laura Puygrenier

## ► To cite this version:

Laura Puygrenier. Contribution d'une activité neuronale pacemaker dans l'expression et l'adaptation d'un comportement motivé chez l'aplysie. Neurosciences. Université de Bordeaux, 2019. Français. NNT: 2019BORD0433 . tel-02883405

**HAL Id: tel-02883405**

**<https://theses.hal.science/tel-02883405>**

Submitted on 29 Jun 2020

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

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

THÈSE PRÉSENTÉE  
POUR OBTENIR LE GRADE DE  
**DOCTEUR DE**  
**L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la Vie et de la Santé

SPÉCIALITÉ Neurosciences

Par Laura PUYGRENIER

**Contribution d'une activité neuronale pacemaker dans  
l'expression et l'adaptation d'un comportement motivé  
chez l'aplysie**

Sous la direction de : Romuald NARGEOT

Soutenue le 19 décembre 2019

Membres du jury :

Mme FENELON Valérie	Professeur à l'Université de Bordeaux	Président
M. PIERREFICHE Olivier	Professeur à l'Université de Picardie Jules Verne	Rapporteur
M. SANDOZ Jean-Christophe	DR CNRS à Gif-sur-Yvette	Rapporteur
Mme ARMENGAUD Catherine	MCU à l'Université de Toulouse Paul Sabatier	Examineur
M. NARGEOT Romuald	MCU à l'Université de Bordeaux	Directeur de thèse

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury, les docteurs Olivier Pierrefiche et Jean-Christophe Sandoz pour avoir accordé de leur temps à la lecture de cette thèse, le docteur Catherine Armengaud qui a accepté d'examiner ce travail, et enfin, le docteur Valérie Fénélon pour avoir présidé ce jury.

J'aimerais également remercier Jean-René Cazalets, le directeur de l'Institut des Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine, pour son accueil au sein du laboratoire et pour avoir créé un environnement de travail où j'ai pu mener à bien mes travaux.

Mes remerciements vont bien évidemment à mon directeur de thèse, Romuald Nargeot, pour son encadrement et son implication pendant ces trois années de thèse. Je souhaite aussi remercier chaleureusement les membres de l'équipe Organisation et Adaptabilité des Systèmes Moteurs (OASM) : Muriel qui a su être présente dans les moments stressants de cette thèse, John, François, Didier, Denis, Julien, Christophe, Marie-Jeanne et Anne pour leur aide et leur soutien du concours de l'école doctorale jusqu'à la soutenance de ce travail. Merci beaucoup pour vos retours toujours justes lors de mes présentations orales et d'avoir créé un environnement scientifique stimulant au cours des réunions d'équipe. J'aimerais également dire un grand merci à Alexis Bédécarrats, ancien doctorant, et John Castro O'Byrne, qui a été stagiaire dans l'équipe, pour leur contribution expérimentale dans le chapitre 1 des résultats de cette thèse.

Je remercie aussi nos animaliers, Lionel et Anne Fayoux qui se sont occupés avec beaucoup de soins de mes animaux mais aussi le personnel administratif de l'INICIA, Geneviève et Richard, pour leur gentillesse au quotidien et leur aide sans faille.

Je remercie également Pascal Fossat pour avoir accepté que je le suive lors d'enseignements à destination d'étudiants en licence et m'avoir même confié quelques TD et TP à effectuer en autonomie. J'ai énormément appris à vos côtés et cela a été une excellente expérience.

Merci également à Xavier Leinekugel pour la découverte de l'électrophysiologie *in vivo* lors d'un stage de licence, qui m'a donné le goût pour les neurosciences. Merci aussi à Stéphanie Caillé-Garnier de m'avoir initiée au comportement chez la souris pendant un second stage en licence. Enfin, je remercie sincèrement Yoon Cho pour m'avoir fait confiance pendant mes 6 mois de stage de master 2 et même après pour l'écriture de l'article suvorexant.

J'adresse un petit mot à mes 3 collègues de bureau, qui ont su amener de la bonne humeur et avec qui j'ai partagé des bons moments pendant cette thèse. Anne, tu as été une belle rencontre pendant cette thèse et ne t'inquiète pas trop pour la tienne même si l'échéance approche à grands pas ! Merci à Hongmei pour la découverte des plats chinois, c'était délicieux ! Enfin, Zoé, ta joie au quotidien fait de toi une personne agréable et j'ai apprécié que tu sois ma voisine de bureau pendant cette dernière année. Gabriel, tu es venu pour un stage de deux mois en master, finalement tu as passé tout l'été au labo et tu reviens même pour le master 2 malgré les traumatismes que Anne t'a fait subir 😊. Plus sérieusement, je te souhaite une bonne continuation même si je suis sûre que tout se passera bien !

J'aimerais aussi remercier mes amies, Claire, Lisa, Marine et Chloé, sur qui je peux compter et qui m'accompagnent depuis 10 ans maintenant. Malgré des difficultés pour se retrouver ensemble à cause de la distance ou des emplois du temps de chacune, vous avez toujours été là et c'est tout ce qui compte.

A mes parents, qui m'ont apportés toute leur aide et leur soutien depuis mon enfance pour que je puisse évoluer dans le meilleur environnement possible et faire les études que je voulais. J'espère que vous êtes fiers de la personne que je suis aujourd'hui. Merci aussi à mon parrain pour ses nombreux conseils et qui n'a cessé de me soutenir dans mes projets.

Damien, tu as été d'un soutien indéfectible et je ne pourrai jamais assez te remercier de m'avoir accompagnée au quotidien dans cette thèse et surtout d'avoir été là pour m'épauler, croire en moi, et me redonner confiance dans les moments difficiles. Désormais, je suis impatiente de commencer cette nouvelle aventure qui nous attend, à Paris, ensemble.

# **Titre : Contribution d'une activité neuronale pacemaker dans l'expression et l'adaptation d'un comportement motivé chez l'aplysie**

## **Résumé :**

L'expression des comportements motivés, tels qu'alimentaire ou sexuel, dépend en partie du fonctionnement autonome et variable du système nerveux central qui sélectionne et émet des actes moteurs indépendamment de déclencheurs sensoriels. Les stimuli sensoriels, telles que les récompenses, contribuent à adapter ces processus centraux par apprentissages. Cette thèse analyse les mécanismes neuronaux élémentaires qui sont responsables du déclenchement spontané d'un comportement de recherche de nourriture et de son adaptation par un apprentissage, le conditionnement opérant. Les travaux ont été effectués sur l'aplysie, un modèle animal simple dont les réseaux neuronaux responsables de l'émission du pattern moteur buccal sont identifiés. Sur des préparations nerveuses isolées, il est montré qu'une oscillation spontanée du potentiel de membrane d'un neurone décisionnel identifié (B63) sous-tend le déclenchement autonome et variable du pattern moteur. Cette oscillation pacemaker dépend de dynamiques calciques intracellulaires et, est différemment modulée par la sérotonine et la dopamine, deux neurotransmetteurs essentiels dans les processus de motivation et d'apprentissages. Le conditionnement opérant qui régularise et accroît la fréquence des émissions motrices ne modifie pas cette impulsion mais change l'excitabilité et les propriétés membranaires intrinsèques du neurone décisionnel. En conclusion, ces travaux montrent la contribution d'une nouvelle propriété pacemaker, calcium-dépendante, dans un processus décisionnel qui détermine l'émission d'un comportement motivé et sa régulation par apprentissage.

**Mots clés :** comportement motivé ; prise de décision ; apprentissage ; réseau de neurones ; pacemaker ; neuromodulateur ; monoamines

---

Institut des Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine, CNRS, UMR 5287  
Université de Bordeaux  
Bâtiment 2A, 3<sup>ème</sup> étage, Case 22  
146 rue Léo Saignat  
33076 Bordeaux Cedex

# **Title : Contribution of a pacemaker neuronal activity to the expression and adaptation of a motivated behavior in *Aplysia***

## **Abstract :**

The expression of motivated behaviors, such as feeding or sexual acts, depends in part on the autonomous and variable functioning of the central nervous system, which selects and emits motor acts independently of sensory triggers. Sensory stimuli, such as rewards, help to adapt these central processes through learning. This thesis analyses the elementary neuronal mechanisms that are responsible for the spontaneous impulse for food-searching behavior and its adaptation by operant conditioning, a learning paradigm. The work was carried out in *Aplysia*, a simple animal model whose neural networks responsible for the spontaneous emission of the buccal motor pattern are identified. In isolated nervous preparations, it was shown that a spontaneous oscillation of the membrane potential in an identified decision-making neuron (B63) underlay the autonomous and variable emission of this motor pattern. This pacemaker oscillation depended on intracellular calcium dynamics and was differently modulated by serotonin and dopamine, two essential transmitters in the motivation and learning processes. Operant conditioning that regulated the motor pattern and increased the frequency of the motor pattern genesis did not modify this oscillation but changed the excitability and intrinsic membrane properties of the neuron. In conclusion, this work shows the contribution of a new calcium-dependent pacemaker property in a decision-making process that organizes the emission of a motivated behavior and its regulation by learning.

**Keywords :** motivated behavior; decision-making; learning; neural network; pacemaker; neuromodulation; monoamines

## Table des matières

Table des matières des figures.....	4
Liste des abréviations.....	6
<b>Introduction générale</b> .....	<b>8</b>
I. Emission des comportements.....	11
1. Réflexes.....	11
2. Actes rythmiques spontanés.....	11
3. Comportements motivés.....	12
II. Origine neuronale de l'émission des comportements et leur adaptation .....	15
1. Arc réflexe.....	15
2. Réseaux centraux générateurs de patterns .....	16
3. Prise de décision.....	20
III. Adaptation comportementale par les apprentissages .....	24
1. Apprentissages non-associatifs .....	24
2. Apprentissages associatifs .....	24
3. Plasticité neuronale induite par les apprentissages .....	25
IV. Problématique .....	26
V. Modèle d'étude utilisé.....	27
1. Comportement de recherche de nourriture .....	27
2. Adaptation par conditionnement opérant .....	28
3. Réseau neuronal générateur des patterns moteurs radulaires (PMR) .....	28
4. Mécanismes de prise de décision.....	29
5. Plasticité induite par les apprentissages et la dopamine .....	30
6. Rôle des neuromodulateurs dans l'éveil comportemental.....	31
7. Questions scientifiques.....	32
<b>Matériels et méthodes</b> .....	<b>33</b>
I. Animaux.....	34
II. Conditionnement opérant .....	34

III. Préparations nerveuses <i>in vitro</i> .....	35
IV. Techniques d'électrophysiologie <i>in vitro</i> .....	36
1. Electrophysiologie extracellulaire.....	36
2. Electrophysiologie intracellulaire .....	36
V. Analyse spectrale .....	38
VI. Solutions ioniques .....	39
VII. Pharmacologie .....	39
VIII. Analyses statistiques.....	40
<b>Résultats</b> .....	<b>42</b>
Chapitre 1 : Rôle de la dynamique calcique intracellulaire dans la genèse d'une activité neuronale pacemaker .....	43
I. Introduction.....	43
II. Résultats.....	46
1. Oscillation régulière du PM du neurone décisionnel B63 .....	46
2. Caractéristiques de l'oscillation .....	47
3. Contribution des flux cationiques transmembranaires et des stocks calciques intracellulaires .....	49
III. Discussion .....	52
1. Pacemakers neuronaux.....	52
2. Oscillations calciques intracellulaires.....	54
3. Oscillations calciques intercellulaires.....	55
4. De l'oscillation à la prise de décision .....	57
Chapitre 2 : Modulation des propriétés oscillatoires d'un neurone décisionnel.....	59
I. Introduction.....	59
II. Résultats.....	62
1. Effets de la 5-HT et de la DA sur le fonctionnement spontané du CPG .....	62
2. Effets de la 5-HT sur l'impulsion spontanée caractérisée par l'oscillation du PM de B63 .....	63
3. Effets de la DA sur l'oscillation du PM chez le neurone B63.....	65
III. Discussion .....	66
1. Modulation des propriétés pacemakers .....	66

2. Modulation de l'excitabilité neuronale .....	68
3. Signification comportementale de la modulation monoaminergique.....	69
Chapitre 3 : Modulation de l'activité neuronale pacemaker par un apprentissage appétitif .....	71
I. Introduction.....	71
II. Résultats.....	74
1. Effets de l'apprentissage opérant sur les PMR générés spontanément par le neurone décisionnel B63 .....	74
2. Absence de modification de l'oscillation du PM du neurone décisionnel B63.....	75
3. Modification des propriétés membranaires intrinsèques du neurone B63 .....	76
III. Discussion .....	78
1. Modulation de l'activité spontanée par l'apprentissage opérant .....	78
2. Plasticité des propriétés membranaires .....	80
3. Modulation des canaux ioniques .....	81
<b>Discussion générale</b> .....	83
I. Propriétés fonctionnelles des neurones dans un réseau décisionnel .....	83
II. Motivation et vigilance, rôle des substances neuromodulatrices .....	85
III. Stimulations sensorielles et apprentissages associatifs .....	87
IV. Perspectives.....	89
<b>Bibliographie</b> .....	90

# Table des matières des figures

## Introduction générale

Figure 1 : Réflexe sensori-moteur chez le poisson

Figure 2 : Genèse spontanée d'un pattern moteur rythmique

Figure 3 : Oscillation endogène et voltage-dépendante du PM d'un neurone

Figure 4 : Propriétés membranaires intrinsèques et actives des neurones

Figure 5 : Représentation schématique simplifiée des structures neuronales et de leurs connexions qui participent à l'organisation des comportements motivés chez les vertébrés

Figure 6 : Conditionnement classique ou Pavlovien

Figure 7 : Conditionnement opérant ou instrumental

Figure 8 : Plasticité de la transmission synaptique sensori-motrice induite par apprentissage classique chez l'aplysie

Figure 9 : Comportement motivé de recherche de nourriture chez l'aplysie

Figure 10 : Conditionnement opérant du comportement de recherche de nourriture chez l'aplysie

Figure 11 : Réseau neuronal générateur des patterns moteurs radulaires (PMR)

Figure 12 : Corrélats neuronaux *in vitro* du conditionnement opérant chez l'aplysie

Figure 13 : Afférents dopaminergiques et sérotoninergiques aux ganglions buccaux chez l'aplysie

## Matériels et méthodes

Figure 14 : Représentation schématique des ganglions buccaux isolés *in vitro*

## Résultats : Chapitre 1

Figure 15 : Déclenchement d'un potentiel de plateau chez B63 et du PMR

Figure 16 : Emission spontanée et irrégulière des PMR sous-tendue par une oscillation régulière du PM de B63

Figure 17 : Oscillation spontanée du PM de B63 en absence de potentiel de plateau et de PMR associé

Figure 18 : Oscillation non voltage-dépendante du PM de B63

Figure 19 : Oscillation du PM de B63 en condition de blocage des synapses chimiques

Figure 20 : Oscillation non voltage-dépendante en condition de blocage des synapses chimiques

Figure 21 : Comparaison des caractéristiques de l'oscillation du PM de B63 en condition physiologique (ASW) et en condition de blocage des synapses chimiques (Bas  $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ).

Figure 22 : Oscillation synchrone du PM des neurones du réseau buccal en condition de blocage des synapses chimiques

Figure 23 : Contribution du  $Na^+$  et du  $Ca^{2+}$  dans la genèse de l'oscillation

Figure 24 : Contribution des stocks calciques intracellulaires dans la genèse de l'oscillation

Figure 25 : Schéma hypothétique de l'oscillation pacemaker de B63

## **Résultats : Chapitre 2**

Figure 26 : Effets de la 5-HT et de la DA sur l'émission des PMR

Figure 27 : Effets de la 5-HT et de la DA sur l'activité électrique du neurone décisionnel B63

Figure 28 : Quantification des effets de la 5-HT sur B63

Figure 29 : Blocage pharmacologique de l'oscillation du PM de B63

Figure 30 : Effets de la 5-HT sur le neurone B63 isolé *in situ* des synapses chimiques du réseau

Figure 31 : Effets de la DA sur le neurone B63 isolé *in situ* des synapses chimiques du réseau

## **Résultats : Chapitre 3**

Figure 32 : Protocole expérimental de conditionnement opérant et d'analyse de la plasticité fonctionnelle de B63

Figure 33 : Modifications motrices *in vivo* après apprentissage

Figure 34 : Activité spontanée de B63 *in vitro*, après apprentissage

Figure 35 : Oscillation spontanée du PM de B63 après apprentissage et en condition de blocage des synapses chimiques

Figure 36 : Modification de l'excitabilité de B63 après apprentissage

Figure 37 : Modification du potentiel de plateau de B63 après apprentissage

## Liste des abréviations

5-HT : sérotonine

AC : adénylate cyclase

AB : anterior burster

AMPA : acide propionique  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-Methyl-isoxazole

AMPc : adenosine monophosphate cyclique

ASW : Artificial Sea Water ou eau de mer artificielle

ATP : Adenosine Triphosphate

ATV : aire tegmentale ventrale

Ca<sup>2+</sup> : ion calcium

CICR : Calcium-induced Calcium Release

Co<sup>2+</sup> : ion cobalt

CPA : acide cyclopiazonique

CPG : Central Pattern Generator

C-PR : cerebral-pedal regulator neuron

CR : réponse comportementale

CS ou SC : conditioned stimulus ou stimulus conditionnel

C.V. : coefficient de variation

DA : dopamine

DMSO : Diméthylsulfoxyde

E.n : nerf œsophagien

FCCP : carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone

Ferm : fermeture

H<sup>+</sup> : ion hydrogène

I et i : courant

I<sub>A</sub> : courant potassique

I<sub>CAN</sub> : courant cationique non spécifique

I<sub>h</sub> : courant cationique activé par l'hyperpolarisation

I<sub>Nap</sub> : courant sodique persistant

IP<sub>3</sub> : Inositol Triphosphate

IP<sub>3</sub>R : récepteur IP<sub>3</sub>

K<sup>+</sup> : ion potassium

LP : lateral pyloric

LTD : dépression à long terme

LTP : potentialisation à long terme

n. : nerf

Na<sup>+</sup> : ion sodium

NAc : noyau accumbens

NMDA : N-méthyl-D-aspartate

n.s : non significatif

MCC : cellules métacérébrales

MCU : Mitochondrial Uniporter

Min : minute

PA : potentiel d'action

PD : pyloric dilatator

PKA : protéine kinase A

PKC : protéine kinase C

PLC : phospholipase C

PMR : pattern moteur radulaire

Protr : protraction

PY : pyloric

RE : réticulum endoplasmique

Rétr : rétraction

R.n. : nerf radulaire

RyR : récepteur ryanodine

S : seconde

SERCA : Sarc(endo)plasmic reticulum calcium ATPase

SOC : Store Operated Calcium

US ou SI : unconditioned stimulus ou stimulus inconditionnel

## Introduction générale

Un sujet qui préoccupe depuis longtemps les philosophes et les scientifiques est la compréhension des causes qui poussent les animaux, dont l'homme, à agir. Agissons-nous sous des contraintes de l'environnement, sous l'effet d'impulsions internes à l'organisme, ou encore grâce à des interactions complexes entre des sources d'excitation externes et internes ? Comment ces processus de mise en action sont-ils modifiés par les expériences passées ? En d'autres termes, qu'est-ce qui motive l'animal à passer à l'action et comment les apprentissages interviennent-ils pour adapter cette capacité à agir ?

Pour aborder ces questions, les études menées par les comportementalistes et les neurobiologistes se sont essentiellement intéressées à trois formes majeures de comportements dans le règne animal : les réflexes sensori-moteurs, les actions motrices rythmiques et les comportements motivés ou dirigés vers un but.

En raison de leur simplicité et de leur reproductibilité, les actes réflexes et leurs substrats neuronaux ont été étudiés en premier (Sherrington, 1906). Les réflexes sont des actes moteurs dont le déclenchement dépend strictement d'un stimulus sensoriel. Ils présentent une relation ou connexion neuronale entre sensibilité et motricité, qui est qualifiée de relation stimulus-réponse par les comportementalistes et de relation sensori-motrice par les neurobiologistes. Pourtant, il est rapidement apparu que cette simple relation sensori-motrice est insuffisante pour expliquer des comportements plus complexes tels que les comportements rythmiques (Adrian & Buytendijk, 1931). Ces comportements qui peuvent être respiratoire, locomoteur ou encore digestif, impliquent une répétition spontanée d'actes moteurs qui ne nécessite pas l'intervention d'afférences sensorielles. Il est maintenant établi que l'organisation structurelle et fonctionnelle du système nerveux central est suffisante pour déclencher et organiser ces actions rythmiques (Marder & Calabrese, 1996).

Si les réflexes et les actes rythmiques se différencient fondamentalement par leur mode de déclenchement, ils se ressemblent du fait de leur caractère de production stéréotypé et automatique, laissant peu de place à la prise de décision. Pourtant, l'évolution a conduit les animaux à prendre progressivement le contrôle de leurs actes. D'êtres passifs soumis aux stimuli extérieurs et aux contraintes physiologiques, les animaux sont devenus des organismes motivés qui sont capables de choisir les actes à exécuter et de décider du moment de l'expression de ces actions.

Les comportements motivés, tels que les comportements alimentaires, sexuels, agressifs, ou sociaux sont des comportements complexes. Bien qu'étant dirigés vers un but précis, ils se différencient des précédents par leur expression variable dans le temps mais aussi selon le type d'actions motrices émises. De plus, leur expression est fortement gouvernée par des processus décisionnels et des systèmes de récompense/punition qui guident l'animal pour satisfaire un besoin. En psychologie, Freud a défini la motivation à agir comme résultant d'un motif inconscient, c'est-à-dire, que la motivation serait une pulsion interne déclenchée en réponse à des stimulations environnementales. Plus tard, les tenants de la psychologie cognitive ont mis en évidence que la motivation ne relève pas seulement de la réaction de l'organisme à un stimulus mais est un processus conscient et volontaire (Tolman & Honzik, 1930). Vallerand et Thill en 1993 précisent que la motivation est « un construit hypothétique utilisé afin de décrire les forces internes et/ou externes reproduisant le déclenchement, la direction, l'intensité, et la pertinence du comportement (Thill & Vallerand, 1993). D'après cette théorie, la motivation résulte de l'interaction entre des stimuli environnementaux et l'homéostasie, c'est-à-dire les paramètres physiologiques internes à l'organisme. Aujourd'hui, il apparaît plus clairement que les processus homéostatiques résultant de régulations hormonales ne sont pas suffisants pour expliquer la versatilité des comportements motivés. En présence de besoins physiologiques constants (la faim, la soif) l'animal conserve toute la capacité à décider du moment où il agira et, la capacité à sélectionner une stratégie particulière d'actions. Autrement dit, interviennent dans les comportements motivés, des mécanismes neuronaux qui sous-tendent la prise de décision et leur adaptation par des apprentissages.

Par conséquent, les modes de déclenchement des comportements et l'origine de la variabilité exprimée ne peuvent être étudiés sans considérer l'importance de la modulation par les expériences sensorielles passées ou par des apprentissages. De nombreux travaux se sont intéressés à la capacité de modifier durablement le déclenchement des actes réflexes (Thompson & Spencer, 1966 ; Kandel, 2001). En effet, l'étude des modifications des relations sensori-motrices induites par des apprentissages non-associatifs (habituation, sensibilisation) et associatifs (conditionnement Pavlovien) ont abouti à des résultats majeurs concernant les mécanismes de plasticité neuronale. Des modifications du déclenchement des comportements motivés par des apprentissages non-associatifs et associatifs ont également été explorées. C'est le cas d'un apprentissage associatif, le conditionnement opérant, qui induit des adaptations de l'émission et/ou de la sélection des actions motrices motivées à réaliser à la suite d'une distribution de récompenses ou de punitions (Skinner 1938).

Ainsi, cette thèse a pour objectif d'aborder les mécanismes neuronaux qui, au sein d'un réseau de neurones du système nerveux central, contribuent à l'émission d'un comportement motivé (Chapitre 1). De plus, il s'agira de comprendre comment ces mécanismes neuronaux sont modulés par des transmetteurs modulateurs (sérotonine et dopamine) connus pour leur contribution essentielle dans les processus de motivation et d'apprentissages (Chapitre 2). Enfin, nous aborderons la question de leur capacité de modification par un apprentissage associatif appétitif, le conditionnement opérant avec récompense (Chapitre 3).

Dans ce but, je commencerai par décrire les connaissances actuelles portant sur l'expression des trois comportements mentionnés précédemment. Puis, je détaillerai les organisations et propriétés neuronales qui les génèrent. Enfin, les processus d'apprentissages et leurs corrélats cellulaires et moléculaires seront exposés. Cette introduction se terminera par la présentation du modèle animal utilisé dans cette thèse et les questions scientifiques abordées.

## I. Emission des comportements

### 1. Réflexes

Les réflexes sont des actes moteurs simples, automatiques et innés, déclenchés involontairement en réponse à une stimulation sensorielle spécifique. Ces actes moteurs sont des actions stéréotypées dont l'intensité est proportionnelle à celle de la stimulation. Les réflexes ont été les premiers actes moteurs à être détaillés par Sherrington qui s'est plus particulièrement attaché à la description du réflexe d'extension chez le chat décérébré (Sherrington, 1906). Ces observations ont montré qu'une stimulation sensorielle sur le tendon rattaché au quadriceps induit la contraction du muscle et donc son extension. Par la suite, d'autres réflexes ont été mis en évidence aussi bien chez les vertébrés que chez les invertébrés. Chez les poissons, une stimulation auditive comme un choc sur la paroi de l'aquarium entraîne un comportement de fuite caractérisé par une courbure du corps suivie de sa fuite dans la direction opposée à celle du son (Eaton et al., 1977 ; Sillar, 2009 ; Figure 1A). Chez les invertébrés, l'aplysie est capable de réflexe protectif qui consiste au repli de la branchie à la suite d'une stimulation tactile du siphon (Kupfermann & Kandel, 1969 ; Pinsker et al., 1970). Indépendamment du réflexe mis en jeu, tous ces actes moteurs sont la conséquence d'une entrée sensorielle produite par des afférences (tactiles, auditives...) qui va induire une sortie motrice. Dans son livre *The Integrative Action of the Nervous System* (1906), Sherrington émet l'hypothèse que les réflexes sont l'expression unitaire de l'acte moteur et que l'ensemble des mouvements, qu'ils soient simples ou complexes, ne résultent que d'une succession de réflexes. Or les expériences de Brown en 1911 sur moelle épinière isolée de toutes stimulations sensorielles ont mis en évidence la persistance d'activités nerveuses. Cela démontre que des actes moteurs rythmiques, comme la locomotion dans le cas présent, ne sont pas la conséquence d'une succession de réflexes mais nécessitent la participation active du système nerveux central (Brown, 1911).

### 2. Actes rythmiques spontanés

Les activités rythmiques comme la locomotion, la respiration, la mastication ou les mouvements viscéraux, sont des actes moteurs automatiques émis de manière inconsciente. Les expériences de Graham Brown sur un chat décérébré montrent que l'activation en alternance des muscles extenseurs et des muscles fléchisseurs lors de la locomotion est sous le contrôle du système nerveux central. Ces données constituent le point de départ de

l'émergence d'une nouvelle théorie, qui prône un rôle central fondamental dans l'émergence des activités rythmiques et non une succession de réflexes comme l'avait suggéré Sherrington. La première démonstration de ce phénomène a été mise en évidence par Adrian et Buytendijk en 1931. Sur une préparation de tronc cérébral isolé, les auteurs ont montré la persistance d'une activité rythmique similaire à l'activité respiratoire mesurée sur un poisson rouge entier (Adrian & Buytendijk, 1931). A partir de ce constat, de nombreuses expériences sur différents modèles animaux visant à démontrer la continuité des activités rythmiques sur des systèmes nerveux isolés ou des organismes dé-afférentés ont vu le jour. Des activités locomotrices ont pu être enregistrées sur des préparations isolées de criquet (Wilson, 1961) et de lamproie (Cohen & Wallén, 1980 ; Wallén & Williams, 1984). Chez le lapin, l'enregistrement des nerfs innervant les muscles de la mâchoire montrent une activité rythmique qui correspond à l'alternance des mouvements d'ouverture et de fermeture de la cavité buccale (Dellow & Lund, 1971). Mêmes constats pour les mouvements viscéraux comme les battements cardiaques chez la sangsue (Thompson & Stent, 1976) et les contractions gastriques chez le homard (Hartline & Maynard, 1975). Ainsi, ces expériences mettent en lumière que sans stimulation sensorielle, le système nerveux central est nécessaire et suffisant à la genèse de comportements automatiques. Des études ultérieures ont essayé de déterminer précisément le siège de la genèse de telles activités. Par exemple, chez le rat nouveau-né, les deux premiers segments lombaires de la moelle épinière ont été décrits comme étant le lieu de genèse du rythme locomoteur des membres inférieurs (Cazalets et al., 1995). Quant aux membres supérieurs, les générateurs de rythme seraient contenus dans les deux premiers segments cervicaux chez la salamandre (Wheatley et al., 1994). Bien que les afférences sensorielles ne soient pas nécessaires dans l'origine des activités motrices rythmiques, elles possèdent tout de même un rôle dans la modulation. Par exemple, chez le criquet, des sections de nerfs ou l'ablation des ailes induisent des changements en termes de fréquence et d'amplitude de l'activité locomotrice du vol sans modification majeure concernant la genèse du rythme (Wilson, 1961).

### 3. Comportements motivés

L'étude des comportements rythmiques sur les invertébrés et les vertébrés inférieurs a montré, en plus de la participation de stimulations externes, l'implication active du système nerveux central. Or, un troisième type de comportement plus complexe, les comportements motivés, est observé dans le règne animal. Ces comportements, tels que la nutrition, la soif

ou la reproduction, sont fondamentaux. Ils sont produits par une combinaison de stimuli externes et internes à l'organisme et s'expriment par une grande variabilité d'actions motrices même dans un contexte sensoriel constant.

Il a été considéré que l'impulsion interne qui induit l'expression de ces comportements pouvait être un besoin physiologique. Dans cette théorie, ce besoin résulterait d'un déséquilibre de constantes de l'homéostasie, telles que la glycémie, le volume sanguin, la pression plasmatique, et des modifications hormonales (Stricker & Sved, 2000). Par exemple, à la suite d'une hypoglycémie, la ghréline synthétisée par l'estomac entraîne un signal motivationnel qui conduit à la prise alimentaire. Lorsque l'organisme est rassasié, la leptine et l'insuline, qui sont deux hormones de la satiété synthétisées par les tissus adipeux et le pancréas respectivement, contribuent à diminuer la prise alimentaire (Saper et al., 2002). De même, des rats mâles adultes qui ont subi une castration lorsqu'ils étaient pré-pubères, n'expriment pas de comportement sexuel, bien qu'il puisse être rétabli par l'injection d'hormones androgènes (Everitt, 1990). Cependant, la théorie des besoins physiologiques et des régulations homéostasiques est insuffisante pour expliquer l'ensemble des faits expérimentaux (Hardy, 1964). Par exemple, contrairement aux individus pré-pubères, la castration de mâles adultes et le dérèglement hormonal qui en résulte, a peu d'effet sur l'expression de leur comportement sexuel. De plus, Tinbergen (1971) et Lorenz (1969), deux éthologistes allemands, soulignent que des comportements de chasse peuvent être déclenchés spontanément chez l'animal sans besoin apparent (Tinbergen, 1971).

Les stimuli sensoriels externes et la libération de modulateurs chimiques, à l'instar des hormones, peuvent jouer le rôle d'éveil de l'organisme. C'est le cas des signaux olfactifs comme les phéromones sexuelles, qui sont des molécules chimiques émises lors de la période de reproduction et qui peuvent favoriser l'expression du comportement sexuel. Chez les rongeurs, cela peut se caractériser par de l'agressivité chez les mâles et une augmentation de l'attirance des femelles pour les partenaires mâles (Dulac & Torello, 2003). Chez le mollusque marin *Aplysie*, la présence de stimuli alimentaires dans son environnement induit une réaction d'éveil associée à l'expression d'une posture de recherche de nourriture (Kupfermann, 1974). Dans ce cas, des afférences sensorielles chémosensibles ou mécanosensibles activent des neurones centraux sérotoninergiques. La libération de sérotonine (5-HT) par ces neurones module la connectivité synaptique centrale et périphérique provoquant ainsi l'éveil de l'animal (Rosen et al., 1989).

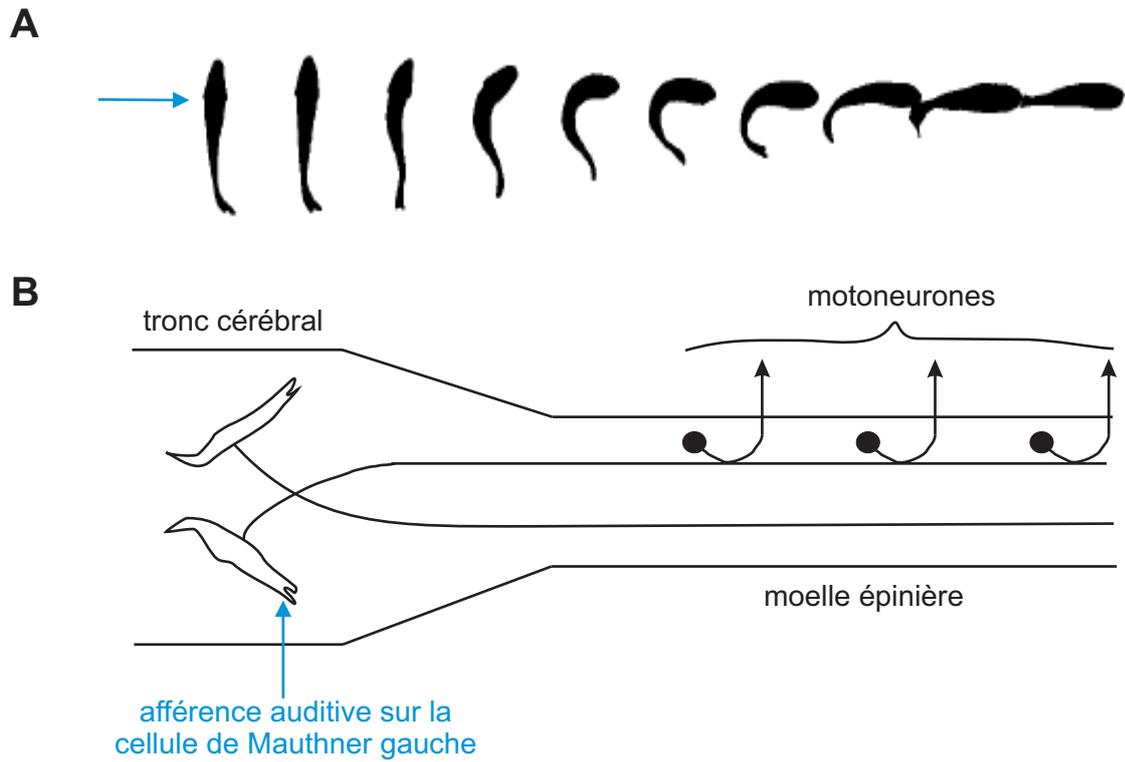
Les processus hormonaux et/ou neuromodulateurs expliquent la phase appétitive et d'éveil dans un comportement motivé, mais ils ne rendent pas compte de la variabilité des stratégies d'actions développées pour atteindre le but souhaité. Ces stratégies peuvent avoir

pour base des processus aléatoires ou d'essais/erreurs, ou encore des processus cognitifs plus ou moins élaborés. Ils résultent de l'interaction entre le fonctionnement du système nerveux central qui les déclenche et des systèmes de récompenses/punitions qui les orientent. Ainsi, ces actes dirigés vers un but qui composent les comportements motivés sont dépendants de mécanismes plus ou moins élaborés de prises de décision et de leur régulation par des apprentissages (Balleine & Dickinson, 1998 ; Balleine et al., 2007).

## II. Origine neuronale de l'émission des comportements et leur adaptation

### 1. Arc réflexe

Le déclenchement involontaire et stéréotypé des actes réflexes repose sur l'activation de circuits neuronaux à la suite d'une stimulation sensorielle : c'est l'arc réflexe. Dans l'exemple du réflexe myotatique qui consiste en l'étirement du quadriceps, une stimulation musculaire est traitée par un neurone sensoriel qui transmet le message nerveux au neurone moteur sur lequel il projette. Ce dernier innerve le muscle et permet alors sa contraction. En parallèle, l'implication d'interneurones va induire l'inhibition des muscles antagonistes. Des arcs réflexes plus complexes peuvent être activés. En effet, l'arc réflexe sur lequel repose le comportement de fuite chez le poisson possède plusieurs relais entre les neurones sensoriels et moteurs (Figure 1B). Les afférences sensorielles (auditives, vestibulaires ou visuelles) sont perçues par des neurones sensoriels qui réalisent une synapse sur les cellules de Mauthner. Celles-ci, au nombre de deux sont localisées dans le tronc cérébral et projettent leur axone dans la moelle épinière en croisant la ligne médiane. Ces deux cellules ne pouvant être actives en même temps, celle du côté du stimulus s'active ce qui induit l'activation des motoneurones controlatéraux et la contraction des muscles du côté opposé à la stimulation aversive. Des contacts synaptiques inhibent la deuxième cellule de Mauthner et, via des interneurones inhibiteurs, les motoneurones ipsilatéraux à la stimulation (Zottoli & Faber, 2000 ; Medan & Preuss, 2014). De même, chez l'aplysie, le circuit neuronal du réflexe protectif, contenu dans le ganglion abdominal, est composé de neurones sensoriels qui innervent le siphon et qui réalisent des connexions avec des motoneurones innervant les muscles de la branchie (Castellucci et al., 1970 ; Byrne et al., 1974, 1978). Cette synapse sensori-motrice possède également des connexions indirectes en passant par un relais d'interneurones excitateurs et inhibiteurs (Hawkins et al., 1981). Ces derniers sont impliqués dans différents aspects neuronaux tels que le stockage mnésique, le recrutement d'autres circuits nécessaires à l'expression d'une sortie motrice correcte et harmonieuse pour l'ensemble de l'organisme, ou encore la conversion de l'intensité des stimulations sensorielles en durée du réflexe déclenché (Cleary et al., 1995). L'ensemble des études portant sur les arcs réflexes démontre que les neurones constitutifs, qui par nature sont inactifs, répondent par des potentiels d'action (PA) seulement à des sollicitations sensorielles. Quels sont donc les mécanismes centraux qui permettent une émission spontanée d'activités rythmiques automatiques ?



**Figure 1 : Réflexe sensori-moteur chez le poisson.**

**A.** Réaction comportementale de fuite induite par un stimulus auditif (flèche).

**B.** Représentation schématique du circuit neuronal impliqué dans la réaction réflexe de fuite. Les signaux sensoriels auditifs activent la cellule de Mauthner dont l'axone et les connexions synaptiques excitent les motoneurones de la moelle épinière controlatérale.

D'après Eaton et al., 2001

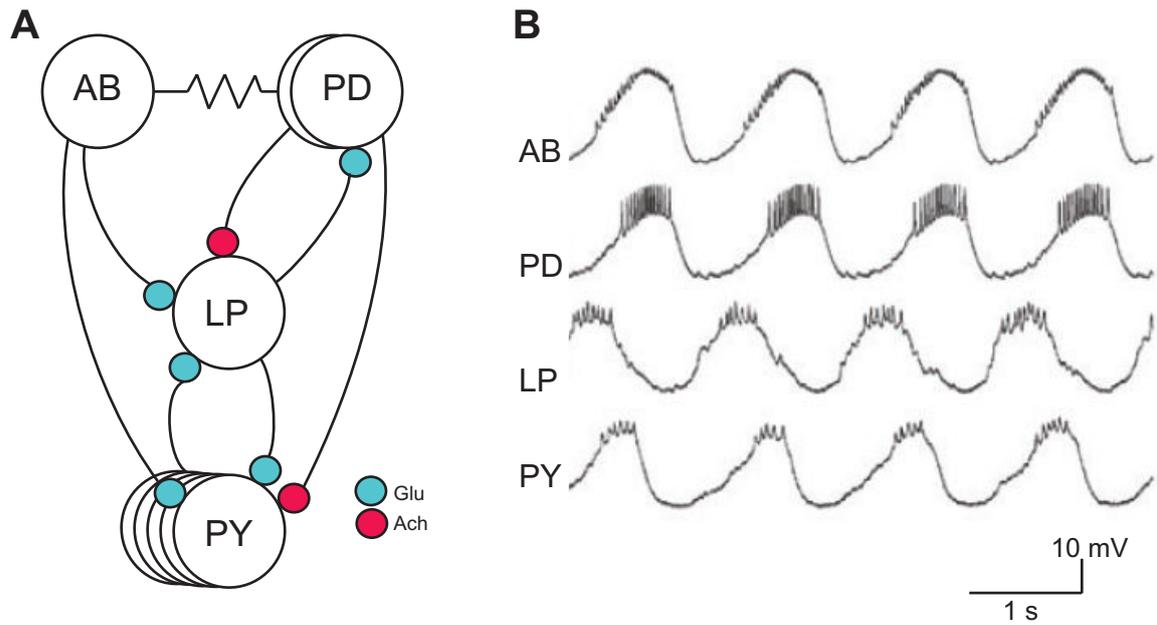
## 2. Réseaux centraux générateurs de patterns moteurs

Contrairement aux actes réflexes, les activités automatiques rythmiques à l'instar de la locomotion ou de la respiration, persistent sur des systèmes nerveux isolés ou coupés de toute afférence sensorielle. Dans ces conditions, aucune sollicitation externe n'est présente suggérant que l'activité est produite par le système nerveux lui-même. Des études d'isolation de certaines parties de la moelle épinière chez les vertébrés ou de séparation de ganglions nerveux chez les invertébrés ont, par exemple, permis de déterminer des régions précises dans lesquelles sont contenues des réseaux neuronaux capables de produire des rythmes : ce sont des centres générateurs de patterns (CPG : Central Pattern Generator). La particularité des CPG est que ces réseaux possèdent une activité électrique spontanée en absence d'afférences sensorielles (Harris-Warrick, 2010 ; Marder & Bucher, 2001 ; Marder et al., 2005; Selverston, 2010). Cette spontanéité est permise par l'interaction des connexions synaptiques entre les neurones constitutifs du CPG et par des propriétés intrinsèques d'un ou plusieurs de ces neurones.

### ➤ Les propriétés synaptiques

La description des réseaux CPG comme expliquée ci-dessus a permis de déterminer les connexions synaptiques constituant le réseau afin d'établir des diagrammes de connexions (Figure 2). Ces derniers sont des schémas des connexions synaptiques entre les différents neurones qui constituent un même réseau. La majorité des CPG est composée de synapses chimiques inhibitrices alors que les synapses chimiques excitatrices sont moins représentées. Cela peut former des inhibitions synaptiques réciproques entre deux neurones appelées des demi-centres (« half-center ») (Sharp et al., 1996). La genèse des activités rythmiques par ce mécanisme synaptique est observée dans le déclenchement de la nage chez le Clione (Satterlie, 1985) et le têtard de Xénope (Marder & Calabrese, 1996). Un réseau neuronal d'inhibitions réciproques est aussi à l'origine des battements cardiaques chez la sangsue médicinale, chez laquelle deux paires bilatérales d'interneurones s'inhibant mutuellement, permettent la genèse de l'activité cardiaque (Marder & Calabrese, 1996 ; Cymbalyuk et al., 2002 ; Kristan et al., 2005).

Outre les synapses chimiques, les réseaux générateurs de patterns moteurs possèdent aussi de nombreuses synapses électriques. Aussi appelées gap junction, elles assurent un échange cytoplasmique entre deux cellules par l'intermédiaire d'un canal, le connexon. Ce dernier est formé par le rapprochement de deux héli-canaux composés de la protéine connexine chez les vertébrés et d'innexines chez les invertébrés (Connors & Long,



**Figure 2 : Genèse spontanée d'un pattern moteur rythmique.**

**A.** Diagramme du réseau pylorique du système nerveux stomatogastrique des crustacés. Les grands ronds représentent les neurones ; le symbole de résistance correspond à une synapse électrique ; les petits ronds colorés représentent les synapses chimiques glutamatergiques (Glu) ou cholinergiques (Ach). AB : anterior burster; PD : pyloric dilator; LP : lateral pyloric; PY : pyloric.

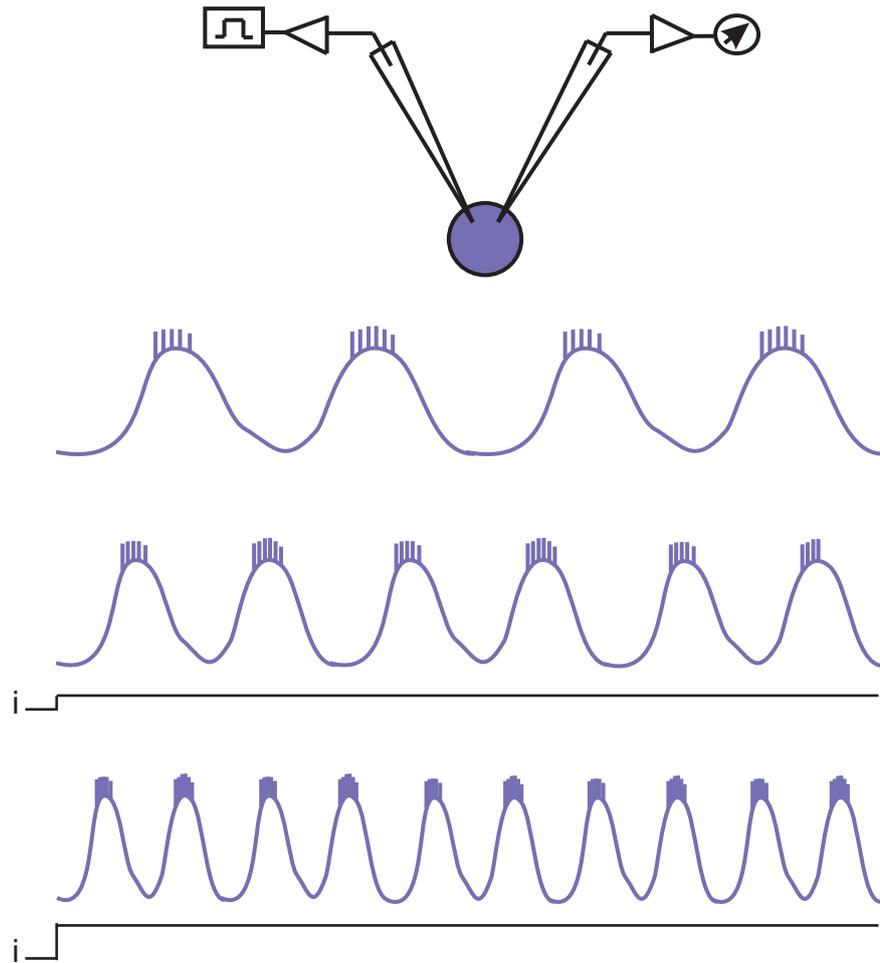
**B.** Enregistrements intracellulaires de l'activité rythmique spontanée des neurones du réseau pylorique.

Modifié d'après Marder & Bucher, 2001

2004). Ce type de canal laisse passer des courants ioniques mais fait également office de couplage métabolique en étant perméable à des molécules de faibles poids moléculaires telles que des seconds messagers. Les synapses électriques sont très impliquées dans la propagation rapide du signal et dans la synchronisation d'activités des neurones (Bennett & Zukin, 2004). En effet, la synchronisation de populations neuronales leur permet de décharger simultanément au sein d'un même réseau. Au cours du développement, cette capacité joue un rôle prédominant dans la mise en place de structures cérébrales comme l'hippocampe ou l'olive inférieure (Peinado et al., 1993). A l'âge adulte, des activités neuronales synchrones persistent dans certaines structures cérébrales comme l'olive inférieure, le locus coeruleus, l'hippocampe, le bulbe olfactif, le striatum ou encore le cervelet (Bennett & Zukin, 2004 ; Connors & Long, 2004 ; Draguhn et al., 1998 ; Leznik & Llinás, 2005 ; Robinson et al., 2017). Cette synchronisation est notamment à l'origine de la genèse des rythmes corticaux  $\beta/\gamma$  impliqués dans les processus attentionnels (Buhl et al., 2003 ; Traub et al., 2001). Enfin, des modèles mathématiques proposent que le couplage de cellules non oscillantes par des synapses électriques peut induire la genèse de rythmes (Loewenstein et al., 2001 ; Manor et al., 1997). En effet, des modélisations informatiques ont montré que le renforcement du couplage électrique entre les neurones du cervelet entraîne la capacité de cette structure à générer des oscillations du potentiel de membrane (PM).

#### ➤ Les propriétés oscillatoires endogènes

Si les activités rythmiques des CPG peuvent être induites par des synapses inhibitrices réciproques (décrites plus haut), d'autres réseaux centraux mettent en jeu des neurones possédant des propriétés membranaires intrinsèques oscillatoires (Figure 3). Certains neurones ont une capacité endogène de pacemaker, c'est-à-dire qu'ils produisent une activité rythmique spontanée, dont l'initiation ne nécessite ni l'intervention d'afférences sensorielles, ni l'activation par des neuromodulateurs. Cette capacité est rendue possible par l'ouverture et la fermeture de canaux ioniques membranaires voltage-dépendants entraînant successivement des flux ioniques dépolarisants et hyperpolarisants, ce qui induit une oscillation rythmique du PM. Parmi les canaux ioniques voltage-dépendants à l'origine d'activités pacemakers, il existe les courants  $I_h$  et  $I_{Nap}$ . Le courant  $I_h$  aussi nommé  $I_f$  dans le cœur ou encore  $I_q$  dans l'hippocampe est un courant cationique ( $Na^+/K^+$ ) activé par l'hyperpolarisation ce qui crée un rebond dépolarisant à chaque repolarisation membranaire. Ce mécanisme pacemaker est responsable de la genèse d'activités rythmiques dans l'hippocampe et les noyaux thalamiques (Maccaferri & McBain, 1996 ; McCormick & Pape, 1990 ; Mercuri et al., 1995). Le courant sodique persistant  $I_{Nap}$  est, quant à lui, impliqué dans



**Figure 3 : Oscillation endogène et voltage-dépendante du PM d'un neurone.**

En haut, protocole de courant imposé : le PM d'un neurone est enregistré par une électrode intracellulaire (à droite) en absence ou en présence d'une injection expérimentale de courant (électrode de gauche).

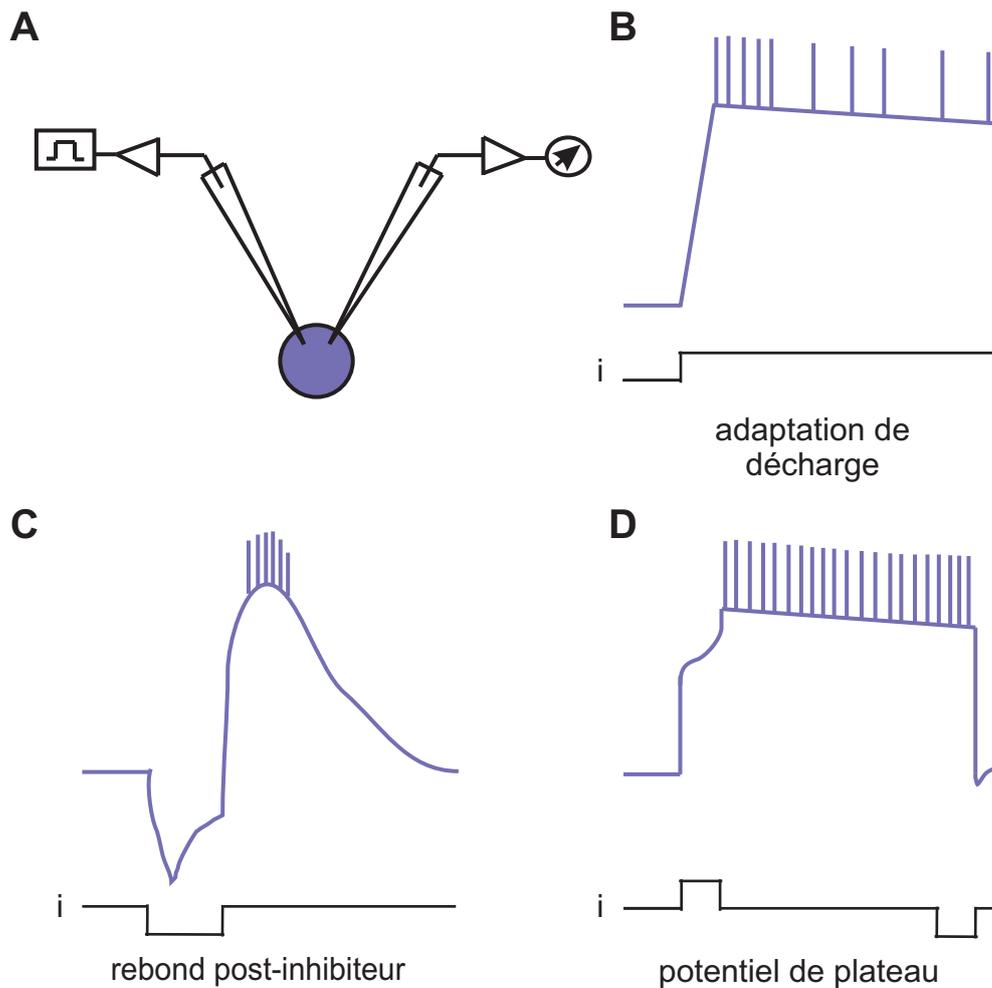
La fréquence d'oscillation spontanée du PM d'un neurone (1ère trace) produite par ses canaux membranaires voltage-dépendants augmente avec la dépolarisation provoquée par une injection de courant (i) continue d'intensité croissante (traces du milieu et du bas).

D'après Marder & Bucher, 2001

la genèse d'activités respiratoires et locomotrices (Del Negro, 2005 ; Tazerart et al., 2008). Des courants cationiques non spécifiques activés par le calcium ( $I_{CAN}$ ) peuvent parfois être impliqués dans la rythmogenèse. Cela a été mis en évidence dans la respiration chez les mammifères (Rubin et al., 2009), dans les neurones L2-L6 chez l'aplysie (Kramer & Zucker, 1985) et dans les neurones pacemakers chez *Helix* (Swandulla & Lux, 1985). Comme leur initiation spontanée, ces événements présentent une terminaison spontanée rendue possible par l'ouverture de canaux potassiques voltage-dépendants ou activés par le calcium ( $I_{KCa}$ ) (el Manira et al., 1994 ; Meech & Standen, 1975 ; Pierrefiche et al., 1995). Cependant, une étude plus récente indique que les courants  $I_{KCa}$  pourraient également être associés à de la rythmogenèse dans les cellules de la glande pituitaire (Tabak et al., 2011). Ces travaux de modélisation en conjugaison avec des expériences de dynamic-clamp indiquent que l'inhibition de ces canaux entraîne l'arrêt de la décharge rythmique des cellules et, l'ajout artificiel de la conductance par dynamic clamp restaure la capacité de genèse de bouffées de PA.

➤ Les autres propriétés membranaires intrinsèques

En plus des propriétés oscillatoires, les neurones peuvent présenter d'autres propriétés membranaires intrinsèques comme l'adaptation de décharge (Figures 4A, B), le rebond post-inhibiteur (Figure 4C), la genèse de potentiels de plateau (Figure 4D). Ces propriétés seules ne sont pas aptes à générer des activités pacemaker, mais, en combinaison avec des mécanismes de rythmogenèse, peuvent jouer des rôles importants. Le rebond post-inhibiteur active des canaux calciques et inactive des canaux potassiques permettant ainsi la dépolarisation du neurone lorsqu'il se retrouve dans une phase d'hyperpolarisation. Cette capacité est notamment retrouvée dans les neurones du Clione dont le rythme est induit par des synapses inhibitrices réciproques. Ainsi, lorsqu'une cellule est inhibée, le rebond post-inhibiteur lui permet « d'échapper » à l'inhibition (Satterlie, 1985). Les potentiels de plateau caractérisent la bistabilité du PM de certains neurones : après une brève injection de courant dépolarisant, la cellule se dépolarise et maintient durablement cet état de dépolarisation même après l'arrêt de l'injection du courant positif (Russell & Hartline, 1978). Des travaux d'électrophysiologie ont mis en évidence l'implication de plusieurs conductances ioniques telles que des courants sodiques activés par le calcium ( $Ca^{2+}$ ) (Angstadt & Choo, 1996 ; Bouhadfane et al, 2013), ou des courants calciques activés par le  $Ca^{2+}$  (Hounsgaard & Kjaerulff, 1992 ; Russo & Hounsgaard, 1996). Dans la plupart des cas, le maintien du potentiel de plateau est permis par l'ouverture de canaux  $I_{CAN}$  (Partridge & Swandulla, 1988).



**Figure 4 : Propriétés membranaires intrinsèques et actives des neurones.**

**A.** Protocole expérimental de courant imposé comme décrit en figure 3.

**B.** Adaptation de décharge des PA : la fréquence des PA diminue en réponse à l'injection d'un courant constant (i).

**C.** Rebond post-inhibiteur : dépolarisation spontanée de la membrane produite à la suite d'une injection de courant hyperpolarisant (i).

**D.** Potentiel de plateau : dépolarisation continue de la membrane suite à l'injection d'un bref courant dépolarisant (i). Ce potentiel de plateau se maintient jusqu'à l'injection d'un courant hyperpolarisant.

Adapté de Marder & Bucher, 2001

Cependant, même si les réseaux générateurs de patterns moteurs produisent des actes moteurs de manière autonomes, ils peuvent être modulés par l'environnement. Cela leur procure une flexibilité permettant l'élaboration de différentes sorties motrices grâce à la neuromodulation.

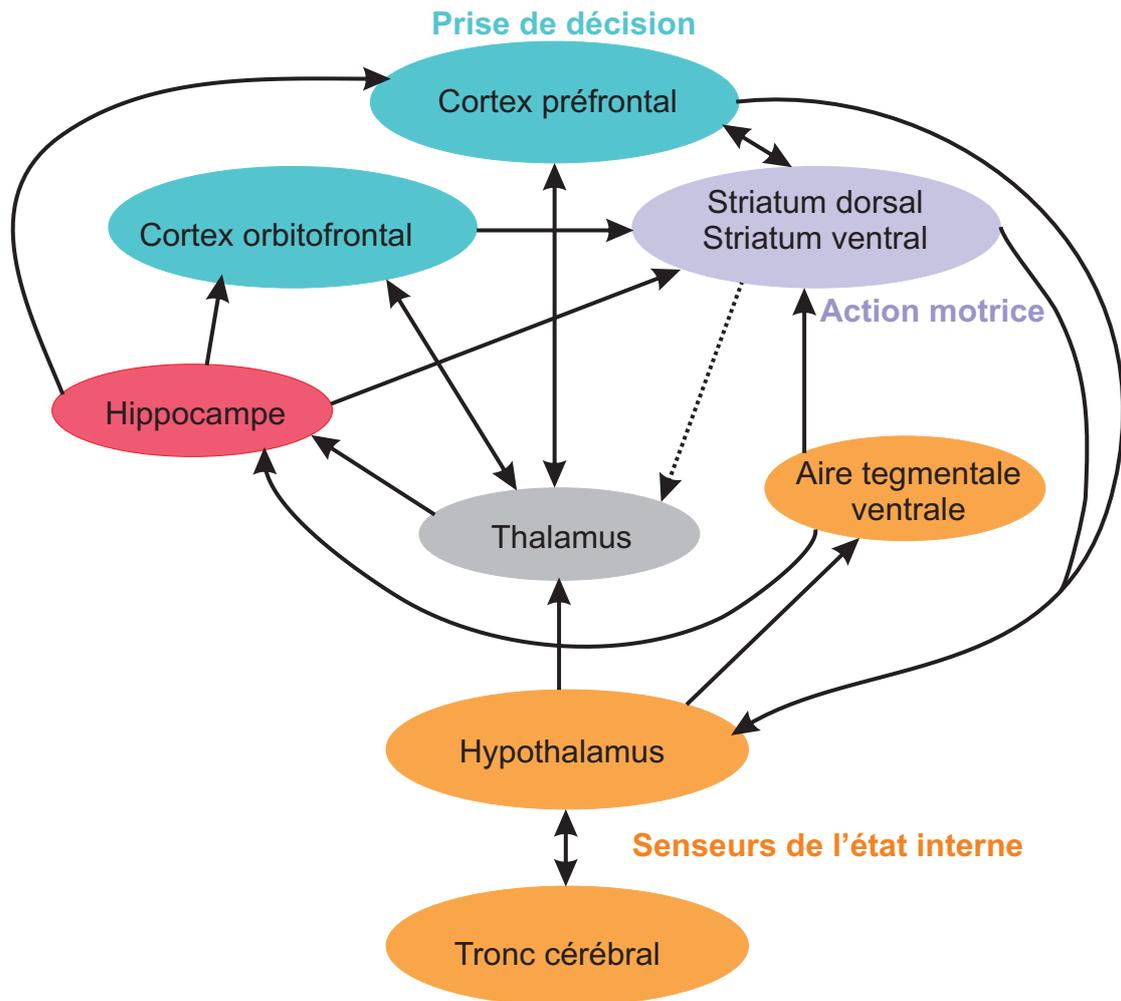
➤ Neuromodulation des CPG

La neuromodulation nécessite l'intervention de molécules comme des bioamines (dopamine : DA, 5-HT, noradrénaline), ou des neuropeptides (protoline, peptide Y, substance P). Ces neuromodulateurs en agissant sur les neurones peuvent avoir des effets distincts en fonction de leur interaction avec des récepteurs couplés aux protéines G pouvant activer différentes cascades intracellulaires. Leur mécanisme d'action permet des modulations de la force des synapses et des canaux ioniques (Bucher & Marder, 2013 ; Katz, 1995). Les sources des molécules neuromodulatrices sont multiples. Elles peuvent dépendre de neurones intrinsèques au circuit CPG ou alors d'interneurones modulateurs ou de cellules sensorielles qui projettent sur le CPG. Chez *Tritonia*, le réseau neuronal responsable de la genèse de la nage contient des neurones sérotoninergiques qui agissent sur la force synaptique au sein de son propre réseau (Katz & Frost, 1995). De la même façon, chez la lamproie, des neurones dopaminergiques présents au sein des CPG locomoteurs modulent la fréquence de la nage (Svensson et al., 2003). Chez le rat, il a été montré que la locomotion est modulée par la projection de fibres descendantes provenant du tronc cérébral, structure qui contient les neurones régulateurs des CPG locomoteurs. Parmi ces fibres, on retrouve des voies noradrénergiques (Sqalli-Houssaini & Cazalets, 2000), dopaminergiques (Barrière et al., 2004) et sérotoninergiques (Cazalets et al., 1992) qui exercent leur action modulatrice sur la fréquence de l'activité locomotrice.

Malgré la capacité des réseaux CPG à induire de la rythmogenèse et à être modulée par diverses molécules, la flexibilité qui en résulte se cantonne à des modifications de la sortie motrice mais ne peut engendrer de la variabilité dans l'émission des actions comme ce qui est observé dans les comportements motivés.

### 3. Prise de décision

En plus de la capacité des afférences sensorielles à déclencher des réflexes, ou des réseaux CPG à générer des motricités rythmiques, le système nerveux central peut « décider » d'émettre des actions sans référence immédiate à une impulsion sensorielle ou à un automatisme rythmique. Dans les comportements motivés, ou dirigés vers un but, les stratégies d'actions sont variables dans leurs occurrences temporelles et dans leurs organisations motrices (Figure 5). Ainsi, les comportements dirigés vers un but sont beaucoup plus riches que ne le laissent prévoir les seules informations sensorielles. En effet, entre les entrées sensorielles et les sorties motrices, il existe des structures nerveuses centrales qui « décident » quand et comment agir en tenant compte des apprentissages passés (Balleine & O'Doherty, 2010 ; de Wit & Dickinson, 2009). De nombreuses structures cérébrales sont impliquées dans la genèse des actes dirigés vers un but (Balleine & O'Doherty, 2010 ; Verschure et al., 2014). Les noyaux du tronc cérébral et de l'hypothalamus où sont situés les centres de la faim et de la soif par exemple, jouent un rôle important dans les réponses aux modifications homéostatiques qui incitent à l'action (Sternson, 2013). De plus, des études lésionnelles, anatomiques et électrophysiologiques ont souligné la participation des réseaux corticostriataux (Balleine, 2005 ; Gillan & Robbins, 2014). Ainsi, une boucle corticostriatale impliquant le cortex préfrontal médian, le striatum dorsomédian, la substance noire réticulaire, le thalamus médiodorsal avec ses projections en retour vers le cortex préfrontal médian, joue un rôle essentiel dans la production des comportements dirigés vers un but. Des lésions du striatum dorsomédian empêchent l'expression de ces comportements flexibles ne laissant subsister que des comportements routiniers, automatiques. La lésion du cortex préfrontal médian prévient l'acquisition de nouveaux comportements dirigés vers un but mais n'empêche pas l'expression de comportements déjà acquis. D'autres structures interviennent également : l'aire tegmentale ventrale (ATV) et ses efférents dopaminergiques vers le striatum dorsomédian joueraient un rôle dans les processus de récompense et des apprentissages ; le cortex orbitofrontal participe au codage de l'identité et de la valeur de la récompense (Ostlund & Balleine, 2007 ; Schoenbaum et al., 2006). Quant au noyau accumbens (NAc), il serait impliqué dans la sélection de l'action selon la valeur de la récompense (Balleine et al., 2007 ; Floresco, 2015 ; Floresco et al., 2018). Ainsi, le processus de prise de décision qui mène à la sélection d'un comportement approprié, repose sur le fonctionnement coordonné et complexe de différentes régions cérébrales. De plus, la contribution de différents neurotransmetteurs et, en particulier les monoamines, est importante. Ces monoamines sont des neurotransmetteurs synthétisés à partir d'acides aminés comprenant, d'une part des catécholamines comme la DA, la



**Figure 5 : Représentation schématique simplifiée des structures neuronales et de leurs connexions qui participent à l'organisation des comportements motivés chez les vertébrés.**

Des variations homéostatiques sont perçues par des structures en orange qui sont des senseurs de l'état interne de l'organisme. Ces informations transitent par un relais thalamique avant d'être envoyées à des aires cérébrales responsables de la prise de décision. L'hippocampe est impliqué dans la représentation spatio-temporelle de l'objectif à atteindre.

Le cortex orbitofrontal code la valeur motivationnelle, le cortex préfrontal participe à la représentation du but en évaluant les contraintes. Le striatum génère l'action motrice : la partie ventrale étant dédiée à la sélection de l'action sur la base de la valeur de l'objectif, la région dorsale est impliquée dans la commande motrice. Les flèches montrent les connexions anatomiques entre les différentes structures, celles en pointillées représentent des connexions indirectes.

noradrénaline, l'octopamine, et d'autre part, une indolamine qui est la 5-HT. Ces transmetteurs chimiques contribuent au contrôle moteur, à l'éveil, et aux apprentissages.

➤ Le système dopaminergique

Chez les mammifères, le système dopaminergique exerce son action essentiellement dans le contrôle moteur, la lactation, la motivation et le codage des récompenses. Ces actions sont permises par quatre voies de projections à travers le système nerveux central (Klein et al., 2019). La voie nigrostriatale est composée des neurones dopaminergiques de la substance noire compacte qui projettent sur le striatum et régulent la motricité et la mémoire procédurale. Ce sont ces neurones qui dégénèrent dans la maladie de Parkinson altérant ainsi l'initiation des mouvements. La voie tubéroinfundibulaire est constituée des projections des neurones dopaminergiques du noyau arqué et du noyau périventriculaire de l'hypothalamus sur la glande pituitaire où la DA va exercer une régulation de la sécrétion de la prolactine impliquée dans la lactation et la reproduction (Peyron et al., 1995). Les neurones dopaminergiques situés dans l'ATV projettent sur le cortex préfrontal, et sur le NAc formant la voie mésocorticale et la voie mésolimbique respectivement. Ces deux voies, connues sous le nom de système mésocorticolimbique sont impliquées dans la récompense et la motivation (Kelley & Berridge, 2002). La DA a été démontrée comme étant un signal de prédiction des récompenses alimentaires, qui va induire une sensation de plaisir et influencer les comportements dirigés vers un but lorsqu'elle est libérée dans le NAc (Schultz, 1998). En effet, des études de microdialyse *in vivo* visant à quantifier la concentration de DA dans le NAc ont montré une augmentation de la concentration de DA pendant la phase de consommation de nourriture (Wilson et al., 1995). La stimulation électrique de cette structure striatale ou son activation par optogénétique mènent à des états motivationnels similaires à ceux induits par l'obtention de récompenses alimentaires (Nieh et al., 2013). Le mécanisme d'action de la DA et ses rôles divers dépendent du type de récepteurs auquel elle se lie. Chez les vertébrés, cinq familles de récepteurs DA divisées en deux catégories ont été caractérisées : les « D1-like » composés des récepteurs D1 et D5, et les « D2-like » qui regroupent les récepteurs D2, D3, D4. Les récepteurs de la famille des « D1-like » sont pour l'essentiel couplés à des protéines Gs qui stimulent l'adénylate cyclase (AC) et la synthèse d'AMPc. Les récepteurs « D2-like » sont essentiellement couplés à des protéines Gi qui inhibent l'AC.

L'implication de la DA dans les processus motivationnels et le codage de la récompense ne se limite pas aux vertébrés. Cette molécule est très conservée au sein du phylum et joue des rôles analogues chez les invertébrés (Brembs, 2002 ; Barron et al.,

2010). Elle est impliquée dans la modulation des apprentissages appétitifs et aversifs chez l'abeille, des apprentissages appétitifs chez les mollusques et également dans les apprentissages olfactifs chez la drosophile (Plaçais et al., 2012 ; Schwaerzel et al., 2003 ; Vergoz et al., 2007).

### ➤ Le système sérotoninergique

Chez les vertébrés, les neurones à 5-HT sont localisés dans les noyaux du raphé qui possèdent des fibres ascendantes vers le cortex et le cerveau antérieur et des fibres descendantes en direction de la moelle épinière (Berger et al., 2009). Les neurones de la partie rostrale des noyaux du raphé sont impliqués dans la thermorégulation, le contrôle de l'appétit, le cycle circadien et le comportement sexuel alors que ceux de la partie caudale modulent la nociception et le tonus musculaire (Lucki, 1998). Par conséquent, des dysfonctionnements du système sérotoninergique induisent des troubles de l'humeur, de l'anxiété ainsi que des troubles alimentaires. La régulation sérotoninergique du comportement de recherche de nourriture a un effet anorexigène par son action sur le noyau ventromédian de l'hypothalamus qui est impliqué dans la satiété (Magalhães et al., 2010). La 5-HT se lie à des récepteurs membranaires spécifiques divisés en 7 familles selon leurs propriétés pharmacologiques et les cascades de signalisation intracellulaire mises en jeu. Les récepteurs 5-HT<sub>1</sub> et 5-HT<sub>5</sub> sont pour l'essentiel couplés à la protéine G<sub>i</sub> et inhibent l'activité de l'AC, alors que les récepteurs 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>6</sub> et 5-HT<sub>7</sub> sont essentiellement couplés positivement à l'AC. Le récepteur 5-HT<sub>2</sub> est couplé positivement à la phospholipase C (PLC) ce qui permet une mobilisation des stocks calciques intracellulaires en induisant une augmentation de la concentration du Ca<sup>2+</sup> cytosolique. Quant au récepteur 5-HT<sub>3</sub>, c'est le seul à être un récepteur ionotropique. Il est non sélectif aux cations en étant perméable au K<sup>+</sup> et au Na<sup>+</sup> ce qui mène à un courant ionique entrant et dépolarisant (Barnes & Sharp, 1999; Bobker & Williams, 1990).

La 5-HT est également un neurotransmetteur essentiel chez les invertébrés dont les insectes et les mollusques. Chez l'abeille, des études montrent une diminution de la prise alimentaire et une augmentation des contractions du tractus digestif après une injection cérébrale de 5-HT (French et al., 2014). Chez la drosophile, des groupes de neurones 5-HT sont impliqués dans la modulation négative de la vigilance en induisant un état de quiescence comportementale caractérisé par l'inhibition de la prise alimentaire et de la

reproduction (Pooryasin & Fiala, 2015). Chez les mollusques, la 5-HT joue un rôle déterminant dans l'éveil comportemental, dans la phase appétitive du comportement alimentaire et dans divers apprentissages sensori-moteurs (Barzilai et al., 1989 ; Brunelli et al., 1976 ; Kandel, 2001 ; Kupfermann, 1974 ; Lee et al., 2009).

### III. Adaptation comportementale par les apprentissages

#### 1. Apprentissages non-associatifs

Les apprentissages non associatifs permettent à l'animal d'apprendre à partir des caractéristiques (intensité, durée, fréquence) d'un stimulus sensoriel. Ces apprentissages sensori-moteurs simples comprennent l'habituation et la sensibilisation (Thompson & Spencer, 1966 ; Carew et al., 1972 ; Pinsky et al., 1973). L'habituation se caractérise par la diminution progressive et durable d'une réponse motrice induite par une stimulation sensorielle faible et répétée. L'animal apprend à ne plus répondre à ce stimulus monotone et non significatif. A l'inverse, la sensibilisation est l'accroissement durable d'une réponse comportementale produite après un stimulus intense ou sa répétition. Dans ce cas, l'animal apprend à réagir de façon adaptée à un puissant stimulus, tel que ceux nociceptifs. Ces deux apprentissages jouent un rôle essentiel dans la modulation de l'intensité des réflexes. Leurs mécanismes neuronaux ont été analysés avec précision chez l'aplysie dans le cas du réflexe de protection de la branchie (Byrne, 1982 ; Castellucci & Kandel, 1976 ; Kandel, 2001 ; Klein & Kandel, 1978). Ces études ont mis en évidence l'importance de la plasticité synaptique et de la modulation de la transmission de l'information nerveuse dans les circuits sensori-moteurs.

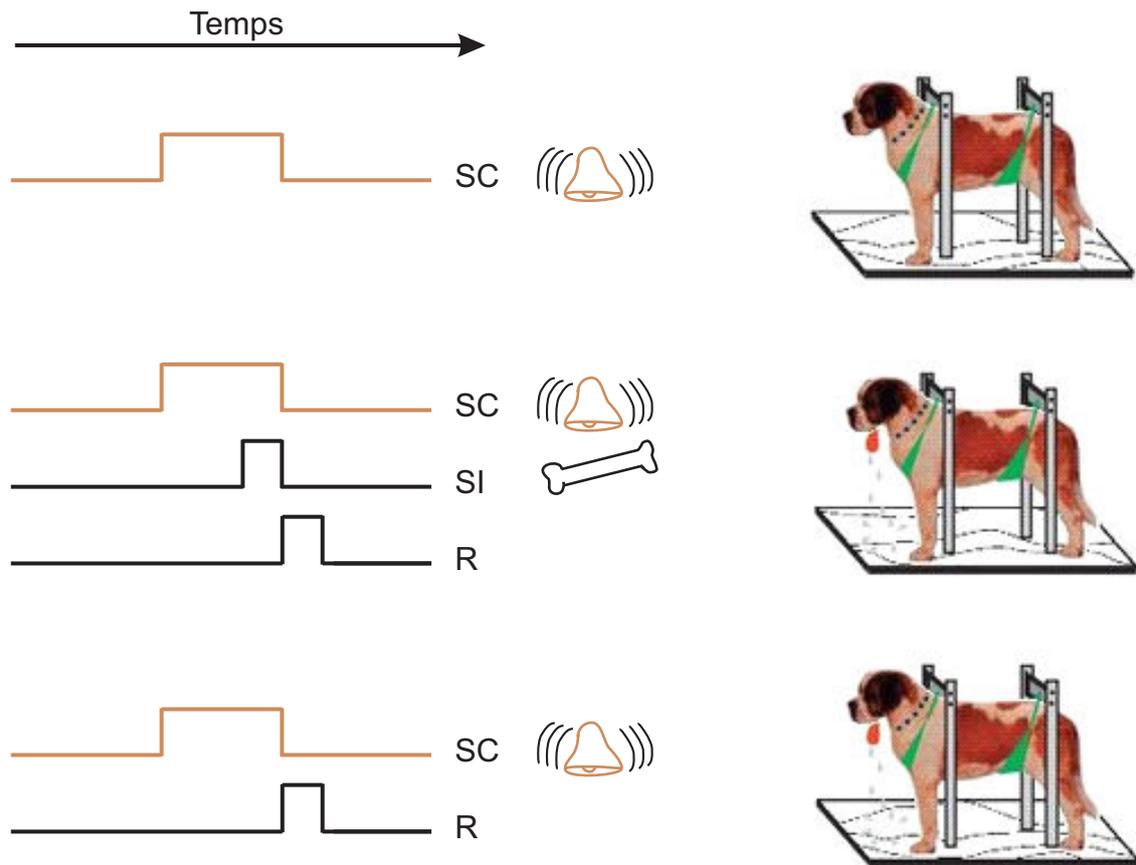
#### 2. Apprentissages associatifs

Dans les apprentissages associatifs, l'animal apprend la relation prédictive entre l'occurrence de deux événements qui peuvent être sensoriels et/ou moteurs. Selon les événements associés, deux formes d'apprentissages simples sont distinguées : d'une part le conditionnement classique, Pavlovien, ou répondant, et d'autre part, le conditionnement instrumental ou opérant. Dans le premier, l'animal apprend la relation prédictive entre deux stimuli : un stimulus conditionnel (SC ou Conditioned Stimulus : CS) qui initialement ne déclenche pas de réponse comportementale et un stimulus inconditionnel, appétitif ou aversif (SI ou Unconditioned Stimulus : US) qui induit une réponse comportementale (CR). Dans le second, l'animal apprend la relation prédictive entre l'exécution d'une action appelée opérant et sa conséquence sensorielle telle qu'une récompense ou une punition.

Le conditionnement classique, mis en évidence pour la première fois par Pavlov en 1898 chez le chien, s'effectue par la présentation répétée et simultanée du SI, un morceau de viande qui induit le réflexe de salivation et du SC, un son qui ne produit normalement pas de réflexe de salivation. Ainsi, l'apprentissage de la prédiction de ces deux stimuli permet au SC seul de répondre à la stimulation en induisant le réflexe de salivation (Figure 6). Même si les actes réflexes sont particulièrement sensibles au conditionnement classique, des comportements motivés peuvent également être modulés. Par exemple, chez l'aplysie, la répétition d'une stimulation tactile des lèvres (SC) suivie de la présentation d'une algue (SI) qui induit des mouvements buccaux rend possible la réponse comportementale alimentaire par la seule présentation du SC (Lechner et al., 2000a). Dans le conditionnement opérant, un état motivationnel est associé à un renforçateur positif ou négatif. Ainsi, l'animal apprend la conséquence de ces actes. Thorndike en 1911 décrit cet apprentissage comme la « loi d'effet » qui est la tendance qu'a l'animal à reproduire un comportement en fonction de ses effets. Effectivement, l'animal associe l'action d'appuyer sur un levier avec la réception d'une récompense alimentaire (Skinner, 1938). Cette association action/conséquence conduit l'animal à reproduire l'action d'appuyer sur le levier. Dans le cas de récompenses à fortes valeurs hédoniques, le comportement conditionné peut devenir compulsif, c'est-à-dire être caractérisé par une émission très fréquente et régulière de l'action motrice. Les modifications engendrées par les apprentissages associatifs, classique ou opérant, sont l'expression comportementale de changements neuronaux (Figure 7).

### 3. Plasticité neuronale induite par les apprentissages

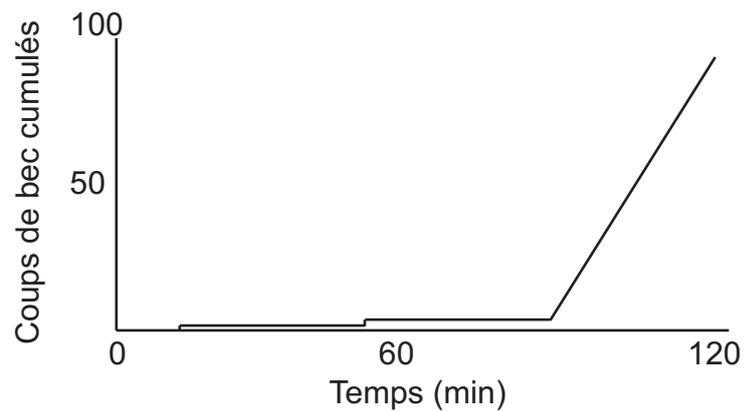
Les corrélats cellulaires et moléculaires des apprentissages ont été étudiés sur des modèles simples, dits réductionnistes. Chez des invertébrés comme l'abeille, la drosophile, *Hermissenda*, l'aplysie ou encore l'écrevisse, il est possible de mettre en œuvre des protocoles permettant d'étudier la modulation d'un comportement par les apprentissages, et la plasticité neuronale qui en résulte (Blackwell, 2006 ; Crow, 1988 ; Giurfa & Sandoz, 2012 ; Krasne, 2002) . Puis, des études réalisées sur l'hippocampe, structure clé de la mémoire, ont mis en évidence des modifications synaptiques, autrement dit des mécanismes de plasticité synaptique, notamment la potentialisation à long-terme, LTP (Bliss & Lømo, 1973). La plasticité synaptique se caractérise par la modulation de la force synaptique qui peut être à court-terme ou à long-terme. Outre la LTP hippocampique, d'autres formes de LTP ou de dépression à long-terme (LTD) ont été montrées dans le cervelet (Ekerot & Kano, 1985 ;



**Figure 6 : Conditionnement classique ou Pavlovien.**

Le réflexe de salivation chez le chien est déclenché par un stimulus inconditionnel (SI) tel que la nourriture. En haut, chez l'animal naïf: un stimulus conditionnel (SC) tel qu'un son de cloche est sans effet sur la salivation. Au milieu : l'apprentissage consiste à associer de façon répétée le SC et SI. En bas: après apprentissage, l'animal produit le réflexe de salivation en réponse au SC seul. L'animal a appris l'association prédictive du son et de la nourriture et anticipe la réaction de salivation (R) à l'évocation du SC seul.

Modifié d'après Squire et al., 2008



### Figure 7 : Conditionnement opérant ou instrumental

Lors de l'exécution de différents comportements spontanés, l'animal naïf peut arriver à appuyer sur un levier (coup de bec) qui déclenche la remise d'une récompense alimentaire. Par la répétition de cette association action/récompense, l'animal apprend progressivement la relation prédictive entre l'acte (opérant) et sa conséquence (récompense). Après apprentissage, l'animal prédisant la récompense émet l'acte beaucoup plus fréquemment et régulièrement (en bas).

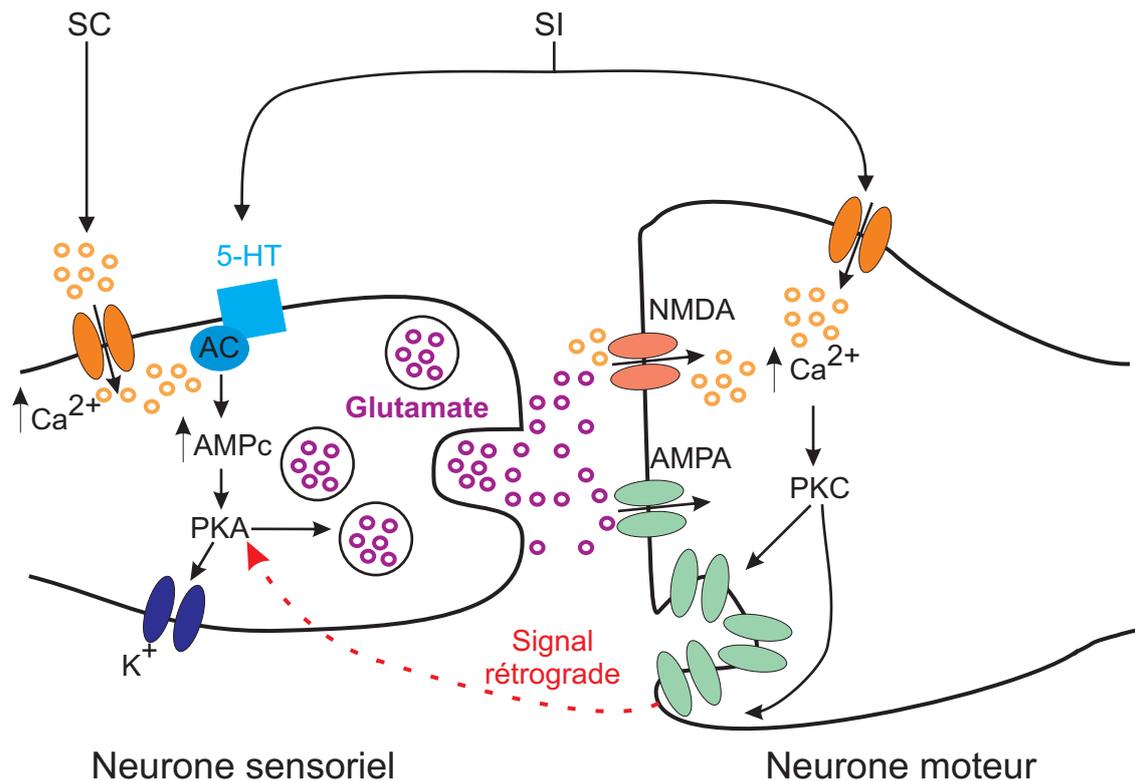
D'après Skinner, 1938

Freeman, 2015 ; Grasselli & Hansel, 2014). Les substrats cellulaires supportant la formation de la mémoire à court-terme et à long-terme ont notamment été étudiés chez l'aplysie dans le cadre des apprentissages non-associatifs et ceux associatifs (Figure 8 ; Kandel, 2001). Les modifications à court-terme résultent de l'activation de cascades de signalisation impliquant la PKA/PKC qui va moduler de manière transitoire des propriétés membranaires comme des canaux ioniques. La translocation de facteurs de transcription au noyau, dans la plasticité à long-terme, permet la synthèse de nouvelles protéines mais aussi des modifications morphologiques (Bailey & Chen, 1983).

#### **IV. Problématique**

Les substrats neuronaux qui permettent la production des réflexes et des comportements rythmiques ont été très largement étudiés. En revanche, ceux à l'origine de l'expression des comportements motivés ou dirigés vers un but et de leurs apprentissages, restent très parcellaires. Les comportements dirigés vers un but ne sont pas déclenchés directement par des impulsions sensorielles comme le sont les réflexes. En effet, leur mode de production repose sur des mécanismes neuronaux centraux et cette caractéristique les rapproche des activités rythmiques. Mais leur expression est variable et fortement modulable par des apprentissages associatifs opérants ce qui les distingue des actes rythmiques qui sont émis de manière stéréotypée et automatique. Pourtant, il est établi que les apprentissages, en particulier ceux appétitifs et nécessitant l'implication de DA, peuvent transformer les comportements motivés en une conduite automatique et stéréotypée.

Ainsi, les questions qui se posent sont les suivantes : quels mécanismes neuronaux permettent l'émission spontanée et variable des comportements motivés ? Quelle est leur relation avec les structures et propriétés neuronales responsables des comportements automatiques ? Comment des transmetteurs neuromodulateurs et des apprentissages modifient-ils ces mécanismes décisionnels pour rigidifier l'expression d'un comportement variable en une conduite routinière ou compulsive ?



**Figure 8 : Plasticité de la transmission synaptique sensori-motrice induite par apprentissage classique chez l'aplysie.**

Lors de l'apprentissage Pavlovien, l'association SC/SI induit des modifications pré- et post-synaptiques de la connexion sensori-motrice dans la voie nerveuse activée par le SC.

Au niveau pré-synaptique, le SC permet une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  qui potentialise le fonctionnement de l'AC, également activée par la libération de 5-HT lors du SI. Cette double activation induit une cascade métabolique impliquant l'AMPc et la PKA qui change l'excitabilité cellulaire et favorise la libération du neurotransmetteur présynaptique (glutamate).

Au niveau post-synaptique, la double activation des récepteurs glutamate (NMDA) par le transmetteur chimique (lors du SC) et la dépolarisation post-synaptique lors du SI induisent des processus métaboliques impliquant le  $\text{Ca}^{2+}$ , la PKC et l'exocytose de récepteurs glutamate (AMPA) qui potentialisent à long-terme l'excitabilité et la réceptivité du motoneurone à l'information présynaptique. Un signal rétrograde pourrait également favoriser le fonctionnement pré-synaptique.

Ce renforcement de l'excitabilité neuronale et des connexions synaptiques dans cette voie sensori-motrice permet d'expliquer la réaction au SC produite après, et non avant, apprentissage.

Adapté de Roberts & Glanzman, 2003

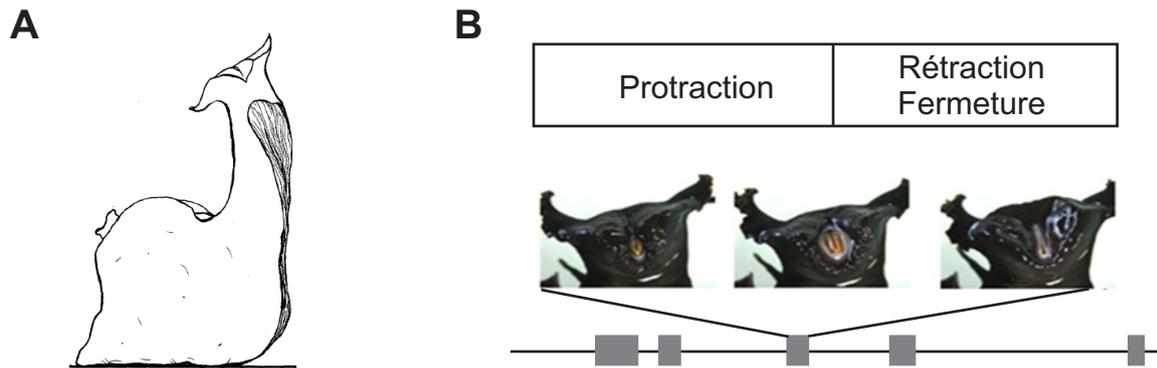
## V. Modèle d'étude utilisé

Dans cette thèse, les mécanismes neuronaux qui sous-tendent l'émission du comportement de recherche de nourriture et son adaptation par apprentissage opérant ont été étudiés chez un mollusque, l'aplysie. Cet animal présente l'avantage d'avoir un comportement motivé, dirigé vers un but, facilement quantifiable, et modifiable par des apprentissages (Kupfermann, 1974 ; Nargeot et al., 2007 ; Lechner et al., 2000 ; Brembs et al., 2002). De plus, des aspects du comportement alimentaire sont gouvernés par des réseaux de neurones qui ont été identifiés et sont accessibles aux analyses cellulaires (Cropper et al., 2004 ; Nargeot & Simmers, 2012). Cela fait donc de l'aplysie un modèle d'étude idéal pour comprendre l'origine neuronale de l'impulsion d'un comportement motivé et de son adaptabilité par apprentissage.

### 1. Comportement de recherche de nourriture

L'aplysie est un animal herbivore dont le comportement alimentaire a été bien décrit (Kupfermann, 1974). Comme tous comportements motivés, il est composé d'une phase appétitive, éventuellement suivie d'une phase de consommation. La phase appétitive est induite par la présence de nourriture à proximité de l'animal et se caractérise par un éveil comportemental et l'expression d'un comportement de recherche de nourriture. Lors de ce comportement, l'animal émet variablement des mouvements de locomotion, des balancements de la tête et des patterns d'actions de la radula, un organe équivalent à la langue (Figure 9A). Lorsque l'animal entre en contact avec la source de nourriture, il engage la phase de consommation. Durant cette deuxième phase, les actes locomoteurs cessent et l'émission des patterns moteurs radulaires augmente. Ces patterns d'actions sont des cycles variables d'ingestion et/ou des rejets (Figure 9B). Chaque cycle est composé d'une protraction (sortie) de la radula immédiatement suivie de la rétraction (entrée) dans la cavité buccale. Lorsque le repliement de la radula, aussi appelé la fermeture, sur l'aliment se produit pendant la rétraction, il permet l'ingestion de cet aliment. Lorsque la fermeture se produit pendant la protraction, elle donne lieu à un rejet.

Un animal privé d'aliment pendant quelques jours peut adopter spontanément, c'est-à-dire en absence de tout stimulus alimentaire, un comportement de recherche de nourriture composé d'émissions de patterns d'actions radulaires. Comme décrits précédemment et



**Figure 9 : Comportement motivé de recherche de nourriture chez l'aplysie**

**A.** Posture caractéristique du comportement de recherche de nourriture. L'animal positionné sur son pied effectue spontanément (en l'absence de stimulus alimentaire) des mouvements de balancement de la tête associés à des mouvements buccaux.  
Adapté de Kupfermann, 1974

**B.** La motricité buccale spontanée est constituée de cycles de mouvements de la radula (organe équivalent à la langue) facilement quantifiables. Un cycle commence par une protraction suivie d'une rétraction de la radula dans la cavité buccale. Lors de la rétraction, la radula se replie en deux pour permettre une éventuelle préhension d'un aliment. Lors d'une séquence de recherche de nourriture, les cycles radulaires (rectangles gris) se répètent de façon variable en termes de durée et d'intervalles de temps inter-cycles.  
Adapté de Nargeot & Simmers, 2012

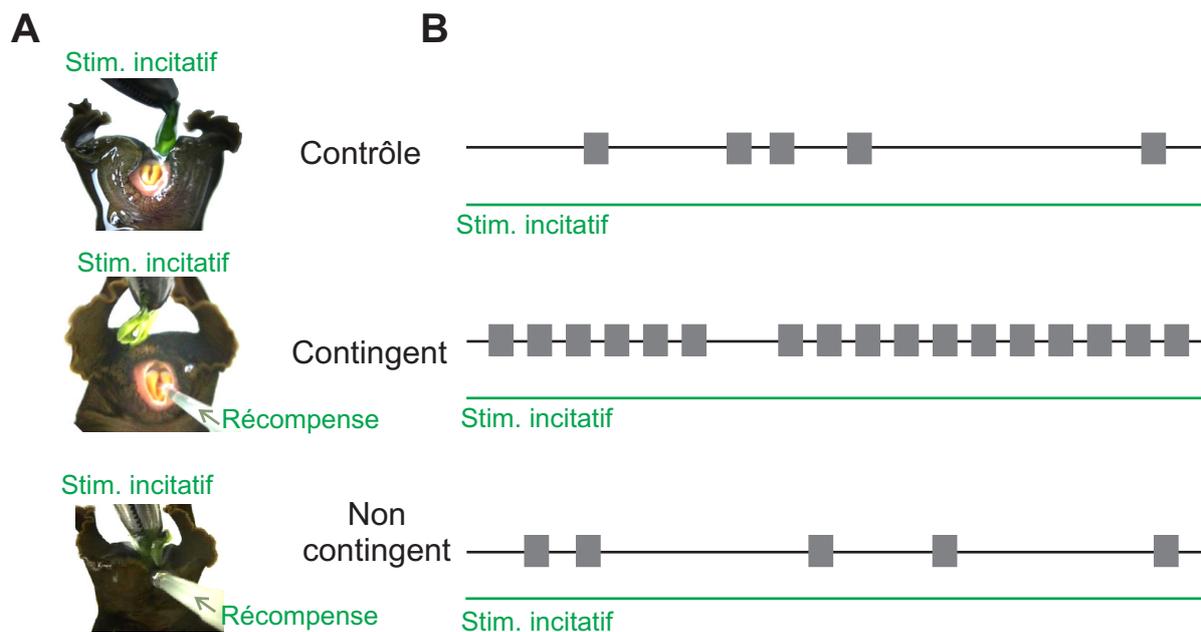
malgré des états interne et externe constants, les cycles radulaires s'expriment de manière spontanée et variable. Cette variabilité se trouve dans l'intervalle d'occurrences des événements dans le temps mais aussi dans les durées des différentes activités motrices.

## 2. Adaptation par conditionnement opérant

La variabilité comportementale avec laquelle l'aplysie émet les cycles ou les patterns d'actions radulaires peut être régulée par des apprentissages appétitifs, dont le conditionnement opérant récompensant (Figure 10A). Le protocole de ce dernier consiste en l'administration d'une récompense palatable (morceau d'algue ou jus d'algue) contingente à l'émission de chaque cycle radulaire. Cette association contingente action/récompense caractéristique du conditionnement opérant, induit la transition d'une motricité radulaire peu fréquente et répétée à intervalles irréguliers chez l'animal naïf, en un comportement automatique, fréquent et rythmique chez l'animal conditionné qui rappelle les comportements compulsifs (Nargeot et al., 2007 ; Figure 10B). Cette transition dépend de la valeur appétitive de la récompense. En effet, l'administration de composants non palatables ne permet pas d'induire cette transition comportementale. Mais elle dépend aussi de l'association action/récompense caractéristique du conditionnement opérant, puisque la distribution d'une récompense de façon périodique, c'est-à-dire non explicitement associée à l'émission des opérants, ne permet pas de l'induire non plus. Dans cet apprentissage appétitif, la récompense active des afférences sensorielles œsophagiennes qui sont monoaminergiques (Brembs et al., 2002). Ainsi, la stimulation électrique de ces entrées sensorielles, lorsqu'elle est associée à l'émission de l'opérant (un cycle radulaire), reproduit l'essentiel des modifications comportementales décrites ci-dessus.

## 3. Réseau neuronal générateur des patterns moteurs radulaires (PMR)

Les PMR d'ingestion et de rejet sont générés par des réseaux de neurones localisés dans les ganglions buccaux (Figure 11A). Grâce à leurs nerfs périphériques, ces ganglions bilatéraux envoient l'information nerveuse vers les muscles de la masse buccale et reçoivent des informations sensorielles venant de la muqueuse buccale et de la muqueuse



**Figure 10 : Conditionnement opérant du comportement de recherche de nourriture chez l'aplysie.**

**A.** Protocole d'apprentissage : Chez trois groupes d'animaux (contrôle, contingent et non contingent) le comportement de recherche de nourriture est incité par un stimulus alimentaire constant (Stim. incitatif). Le groupe témoin produit de façon autonome des cycles radulaires variables sans recevoir de récompense. Le groupe contingent reçoit à chaque émission autonome d'un cycle radulaire (opérant) une récompense alimentaire (jus d'algue intrabuccal) (contingence action/récompense du conditionnement opérant). Le groupe non contingent reçoit la récompense de façon rythmique, indépendamment de l'émission des cycles radulaires.

**B.** Emission des cycles radulaires après apprentissage : Modifications comportementales après apprentissage chez les trois groupes décrits en A. Chez les animaux du groupe contingent (milieu) et en présence du stimulus incitatif, l'émission autonome des cycles radulaires (rectangles gris) se fait de façon fréquente et régulière. Ce comportement compulsif résulte de l'association action/récompense du conditionnement opérant car il n'est pas observé chez les animaux non récompensés (Contrôle, en haut) ou chez les animaux récompensés mais sans association à l'opérant (Non contingent, en bas).

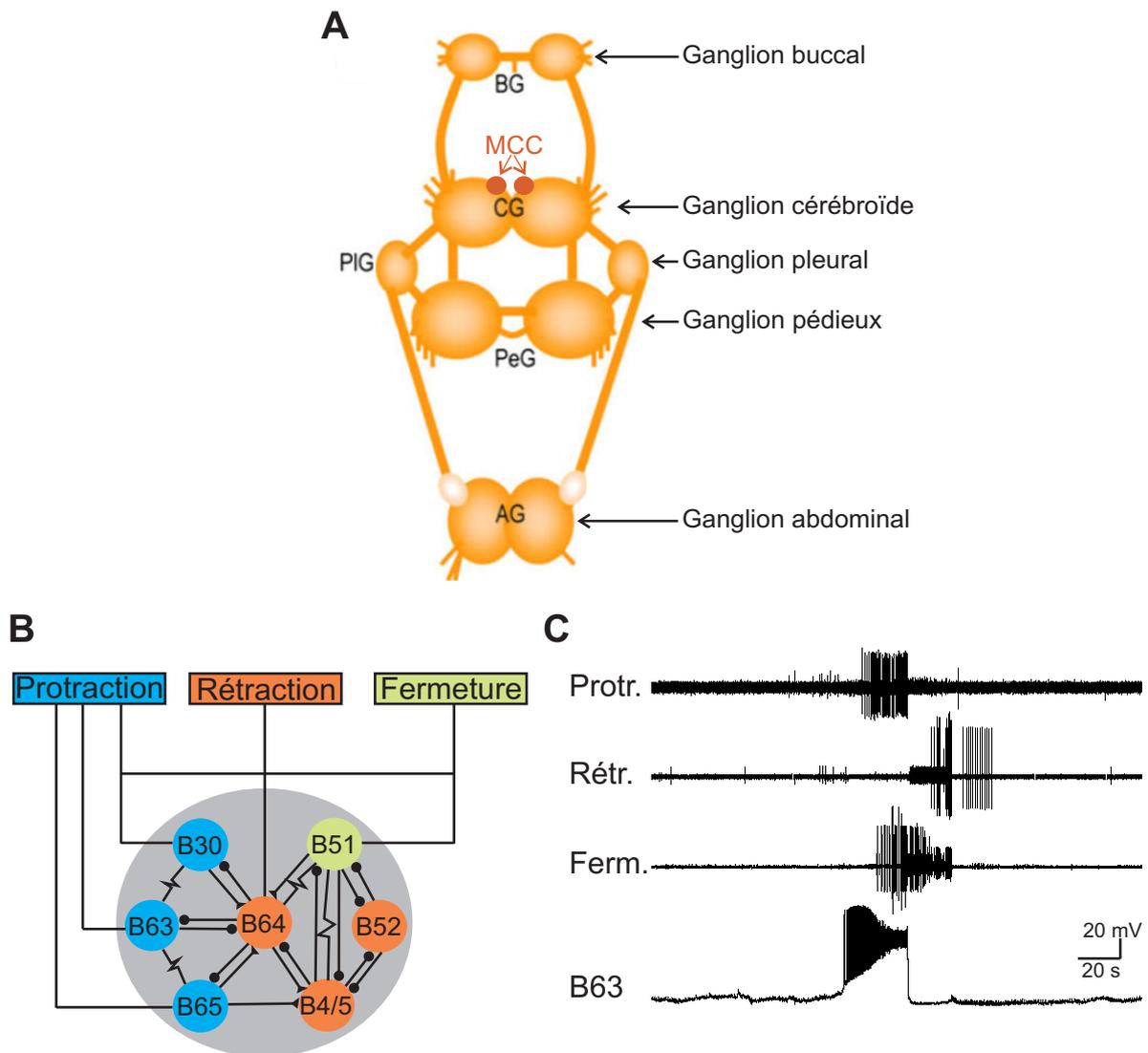
œsophagienne. Ils reçoivent également des informations modulatrices en provenance du ganglion cérébroïde qui constitue un important centre intégratif des modalités sensorielles olfactives.

Les ganglions buccaux sont suffisants pour générer les PMR. En effet, même lorsqu'ils sont isolés *in vitro*, ils continuent de produire spontanément, ou en réponse à des stimuli sensoriels, des PMR similaires à ceux enregistrés chez l'animal se comportant (Figure 11C ; Morton & Chiel, 1994). Cette activité motrice est générée par seize paires (bilatérales) de neurones interconnectés et qui forment le réseau générateur de pattern moteur buccal (Figure 11B ; Nargeot & Simmers, 2012). D'un point de vue fonctionnel, ces neurones peuvent être divisés en deux groupes selon la phase motrice pendant laquelle ils sont actifs. Un groupe générateur de protraction est composé des neurones B20, B30, B31/32, B34, B40, B50, B63, B65. Un groupe générateur de rétraction est composé des neurones B4/5, B51, B64, B70. Parmi tous ces neurones, seul le neurone B63 du générateur de protraction est à la fois nécessaire et suffisant au déclenchement de l'activité du CPG buccal et des PMR. En effet, chez des préparations de ganglions buccaux inactifs, la dépolarisation expérimentale de B63 seul, active le reste du CPG et induit la genèse des PMR. Inversement, sur des préparations actives, une hyperpolarisation expérimentale des B63 seuls, laisse l'ensemble du réseau inactif et bloque la production des PMR.

#### 4. Mécanismes de prise de décision

La caractéristique essentielle des mouvements radulaires lors du comportement de recherche de nourriture est leur variabilité spontanée. Cette variabilité s'exprime par l'irrégularité avec laquelle les cycles radulaires se succèdent dans le temps et par la variabilité des durées d'actions produites. Elle trouve son origine en partie dans les propriétés fonctionnelles du réseau buccal et est enregistrée sur les sorties motrices des préparations de ganglions buccaux isolés. Cela signifie que ces ganglions contiennent les mécanismes centraux capables de « décider » spontanément quand sera produit un PMR et de choisir quelle sera son organisation motrice.

Le mécanisme décisionnel qui contribue au choix du pattern moteur a été décrit. Il résulte de la dynamique des propriétés membranaires des neurones B51 qui contribue à une restructuration fonctionnelle du CPG. Lors de l'élaboration d'un PMR, l'inactivité de ces neurones permet l'expression d'un pattern de rejet produit par le reste du réseau. En



**Figure 11 : Réseau neuronal générateur des patterns moteurs radulaires (PMR).**

**A.** Schéma du système nerveux chez l'aplysie. Le réseau de neurones à l'origine de la genèse des PMR est localisé dans les ganglions buccaux. BG : buccal ganglia ; MCC : metacerebral cells ; CG : cerebral ganglia ; PIG : pleural ganglia ; PeG : pedal ganglia ; AG : abdominal ganglia.

Adapté de Moroz et al., 2006.

**B.** Représentation simplifiée du réseau générateur du pattern moteur radulaire. Deux groupes de neurones distincts permettent l'alternance de la protraction et de la rétraction. Les neurones générateurs de la protraction (en bleu) activent après un délai les neurones du générateur de rétraction (rouge et vert) qui en retour inhibent le générateur de protraction. La fermeture est sous le contrôle du neurone de protraction B30 et du neurone de rétraction B51.

**C.** Enregistrement simultané d'un PMR sur les nerfs moteurs de protraction, rétraction et fermeture des ganglions buccaux *in vitro* et intracellulaire de l'activité du neurone B63, seul neurone nécessaire et suffisant à l'activation du réseau buccal et au déclenchement d'un PMR.

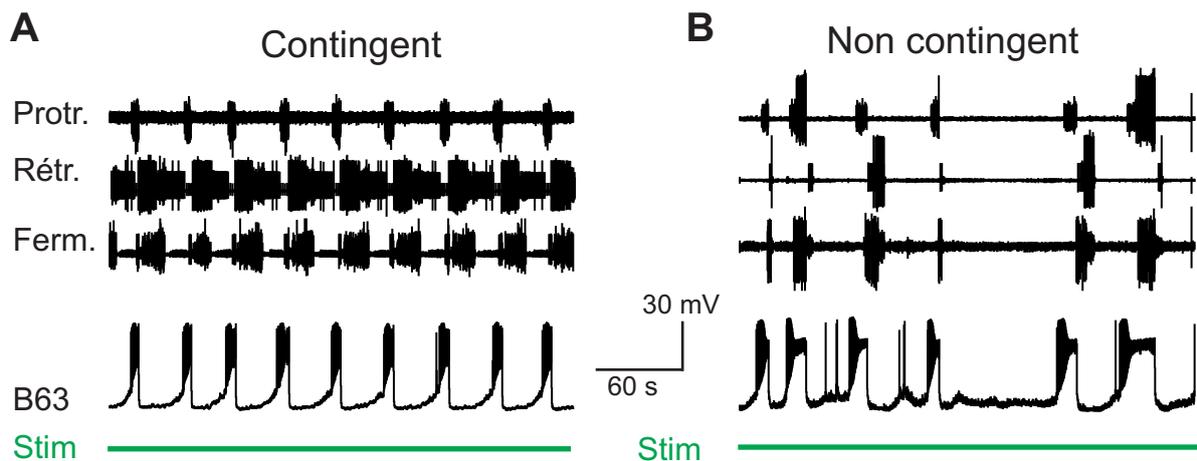
revanche, l'activité de B51 qui résulte de la dynamique de ses propriétés membranaires intrinsèques restructure l'activation d'interneurones et de motoneurones avec pour conséquence la production d'un pattern d'ingestion (Nargeot et al., 1999a, 1999b).

Le mécanisme décisionnel temporel de la production d'un pattern moteur n'est pas établi. Néanmoins, il a été montré qu'un manque de coordination fonctionnelle entre l'activité de B63 et les neurones B30 et B65, tous électriquement couplés à l'intérieur du générateur de protraction, est responsable du déclenchement irrégulier des PMR chez la préparation d'animaux naïfs. Un accroissement de cette coordination par apprentissage ou par des manipulations expérimentales conduit à la production rythmique et régulière de ces PMR (Sieling et al., 2014). Il semble donc que le neurone B63 et ses couplages électriques avec les autres neurones générateurs de protraction ont un rôle important dans la détermination temporelle de l'expression d'un PMR.

## 5. Plasticité induite par les apprentissages et la DA

Le conditionnement opérant appétitif modifie la motricité radulaire par une modulation des mécanismes décisionnels (Figures 12A, B). Cette modulation s'exerce sur (1) les propriétés membranaires de plateau du neurone B51, le rendant plus excitable et plus prompt à être actif avec le reste du réseau buccal (Brembs et al., 2002), et (2) l'excitabilité et la coordination fonctionnelle des neurones B63/B30/B65, en augmentant leur résistance membranaire et la force de leurs synapses électriques (Nargeot et al., 2009).

Les relations causales entre ces plasticités membranaire et synaptique sont la transition d'une motricité naïve, peu fréquente et irrégulière, à une motricité conditionnée, compulsive. Elle ont été analysées sur des préparations de ganglions buccaux isolés (Nargeot et al., 1999a,b ; Sieling et al., 2014). Des manipulations expérimentales des potentiels de plateau de B51 induisent la surexpression du pattern d'ingestion au détriment des patterns de rejet. Ce processus rendrait compte de la hausse des mouvements d'ingestion après apprentissage. Par ailleurs, la manipulation sélective, soit de l'excitabilité membranaire, soit de la force des couplages électriques des neurones B63/B30/B65 a mis en évidence que la plasticité membranaire de ces neurones détermine la hausse de la fréquence d'émission des PMR, alors que la plasticité de leurs synapses électriques détermine la régularité motrice (Sieling et al., 2014). Ces plasticités neuronales nécessitent la libération de DA dans le réseau buccal et son action sur les neurones cités



**Figure 12 : Corrélats neuronaux *in vitro* du conditionnement opérant chez l'aplysie.**

Enregistrements simultanés des PMR et du PM de B63 sur une préparation de ganglions buccaux isolés d'un animal du groupe contingent (**A**) et du groupe non contingent (**B**). Les ganglions de l'animal contingent génèrent les patterns moteurs et les bouffées de PA de B63 à haute fréquence et de manière régulière, comme l'était le comportement chez ces animaux conditionnés. En revanche, les ganglions de l'animal non contingent génèrent les PMR et les bouffées de PA de B63 à basse fréquence et de manière irrégulière comme l'était le comportement de ces animaux non conditionnés. Dans ce protocole *in vitro*, la stimulation électrique tonique (Stim) d'une afférence buccale est utilisée pour mimer le stimulus incitatif utilisé *in vivo* qui était l'algue .

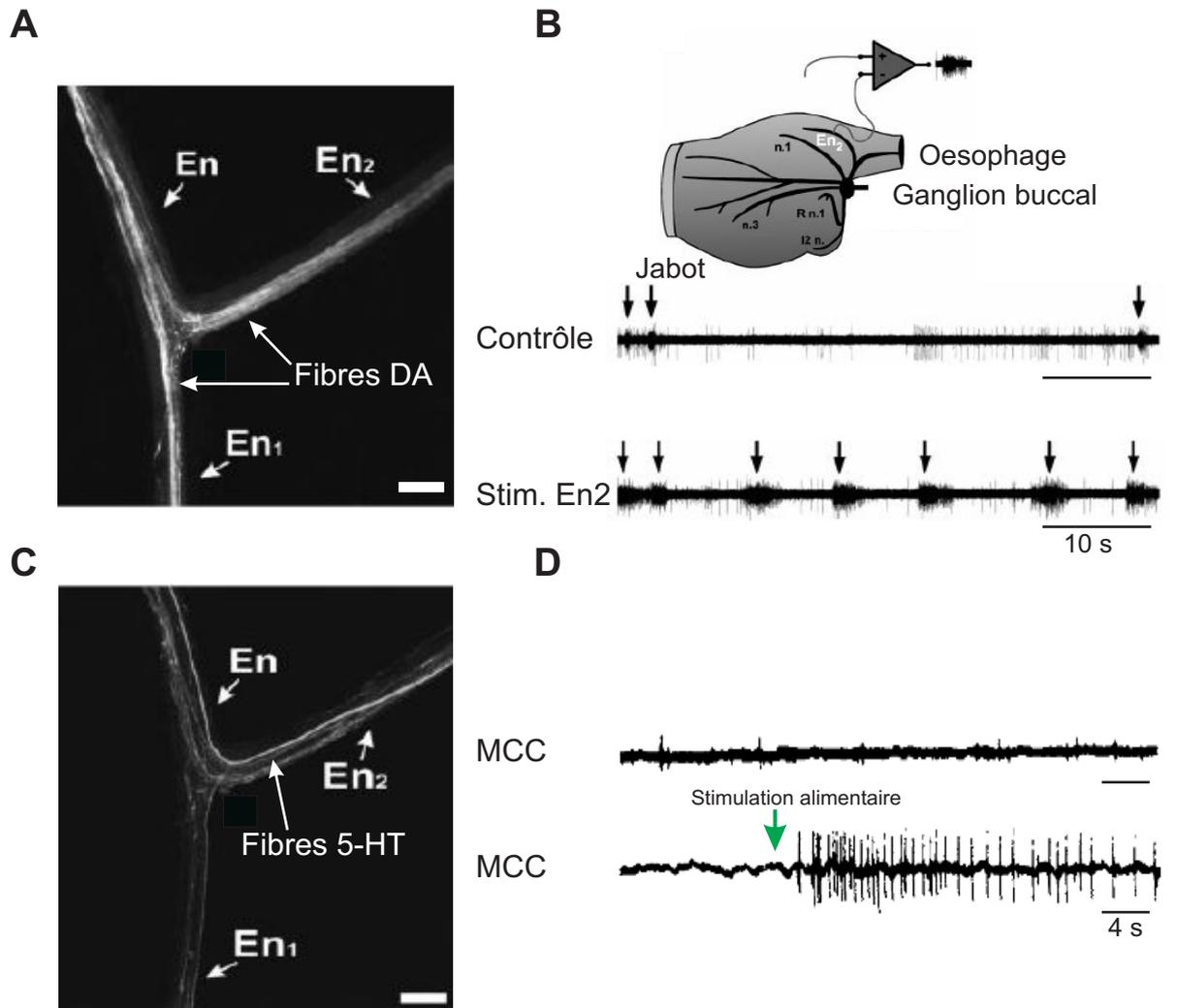
Adapté de Nargeot et al., 2009

précédemment. Leur induction est bloquée en présence d'antagonistes dopaminergiques (Nargeot et al., 1999 ; Bédécarrats et al., 2013). La DA provient des afférences œsophagiennes, riches en fibres monoaminergiques, et qui sont stimulées par les récompenses alimentaires (Figures 13A, B ; Susswein et al., 1986 ; Kabotyanski et al., 1998 ; Brembs et al., 2002 ; Martinez-Rubio et al., 2009).

## 6. Rôle des neuromodulateurs dans l'éveil comportemental

Les mécanismes à l'origine de la phase appétitive du comportement alimentaire et de l'état d'éveil qui en résulte impliquent le ganglion cérébroïde (Figure 11A). Celui-ci reçoit de nombreuses informations sensorielles de la région péri-orale et des rhinophores. Il contient de nombreux interneurons modulateurs qui envoient leurs axones vers les ganglions buccaux et pleuraux par leurs nerfs connectifs respectifs (Figure 13C). La réaction d'éveil est due à l'activation sensorielle de divers interneurons cérébro-buccaux, dont les neurones métacérébraux (MCC, metacerebral cells) sérotoninergiques et l'interneurone C-PR (cerebral-pedal regulator). Des enregistrements continus des MCC montrent qu'ils deviennent actifs avec les stimulations mécaniques produites par le contact avec un aliment (Figure 13D; Kupfermann & Weiss, 1982). Ces cellules modulatrices innervent les muscles buccaux sur lesquels elles exercent une action facilitatrice importante par l'intermédiaire de la 5-HT (Rosen et al., 1989). L'interneurone C-PR est également excité par les stimuli alimentaires. Il possède des connexions poly-synaptiques vers de nombreux neurones qui contrôlent la posture de recherche de nourriture, la genèse des patterns moteurs buccaux et les MCC impliqués dans l'éveil (Teyke et al., 1990). Cet interneurone coordonne différents aspects moteurs du comportement appétitif et produirait un état d'éveil général de l'organisme.

La satiété, en revanche, résulte de l'activation de mécanorécepteurs lors du remplissage du jabot (première poche du tube digestif dans laquelle est stockée la nourriture ingérée). Ces afférences effectuent des connexions synaptiques avec les neurones des ganglions buccaux sur lesquels elles libèrent le neuropeptide Y, neuromodulateur qui produit la transition progressive de l'expression des patterns moteurs d'ingestion vers des patterns de rejet par la modulation de l'activité électrique de neurones du CPG buccal dont le neurone décisionnel B51 (Dickinson et al., 2015 ; Jing et al., 2007 ; Kuslansky et al., 1978).



**Figure 13 : Afférents dopaminergiques et sérotoninergiques aux ganglions buccaux chez l'aplysie.**

**A.** Immunomarquage de la Tyrosine Hydroxylase (enzyme de synthèse de la DA) dans les branches (En.1, En.2) du nerf oesophagien connecté aux ganglions buccaux. Des fibres DA sont présentes dans les deux branches du nerf. Echelle 100  $\mu$ m.  
Adapté de Martinez-Rubio et al., 2009

**B.** Activation des afférents En.2 par une stimulation alimentaire. Positionnement des électrodes sur le nerf En.2 en place sur la masse buccale. Tracé du haut : activité des fibres du nerf pendant les mouvements radulaires spontanés en absence de nourriture. Tracé du bas : même enregistrement lors des mouvements radulaires d'ingestion de nourriture. L'activité du nerf reflète l'activité sensorielle induite par la présence de nourriture .  
Modifié d'après Brembs et al., 2002

**C.** Immunomarquage de la 5-HT dans les branches (En.1, En.2) du nerf oesophagien mettant en évidence, dans la branche En.2, la présence d'axones 5-HT dont celui des neurones cérébroïdes MCC (Figure 11A).  
Adapté de Martinez-Rubio et al., 2009

**D.** Activation tonique des neurones MCC sérotoninergiques par un stimulus alimentaire. Enregistrements extracellulaires des MCC en absence (trace du haut) et en présence de nourriture (trace du bas).  
D'après Kupfermann & Weiss, 1982

## 7. Questions scientifiques

En dépit de l'importance des connaissances comportementales et neurophysiologiques acquises sur la genèse d'un comportement motivé et dirigé vers un but chez l'aplysie, certaines questions fondamentales demeurent : quel mécanisme décisionnel permet le déclenchement spontané des PMR, c'est-à-dire l'émergence spontanée de l'activité du neurone B63, seule nécessaire et suffisante pour « décider » des émissions motrices radulaires ? Ce mécanisme cellulaire décisionnel peut-il être modulé par les monoamines telles que celles qui interviennent dans l'éveil comportemental ou l'apprentissage opérant ? Comment le conditionnement opérant par récompense qui modifie drastiquement l'émission des PMR contribue à modifier le fonctionnement spontané du neurone décisionnel B63 ?

Chacune de ces questions sera abordée successivement dans les trois chapitres qui suivent. Les résultats présentés dans ces chapitres font l'objet de publications en préparation.

# **Matériels et méthodes**

## Matériels et méthodes

### I. Animaux

Les expériences ont été réalisées sur deux espèces d'aplysies : les *Aplysia fasciata*, prélevées dans le bassin d'Arcachon, ont été utilisées de septembre à mars, et les *Aplysia californica*, en provenance de l'Université de Miami, ont été utilisées pendant le reste de l'année. Les animaux, nourris quotidiennement avec des algues vertes (Station biologique de Roscoff, FR), étaient stockés dans des aquariums remplis d'eau de mer artificielle (ASW : Artificial Sea Water) oxygénée et maintenue à une température de 15°C. L'animalerie possédait un cycle nyctéméral de 12h / 12h avec la lumière de 7 h à 19 h afin de préserver le rythme circadien des animaux (Vorster et al., 2014). Lors de l'analyse des données, aucune différence n'a été constatée entre les deux espèces d'animaux. Le comportement alimentaire et les propriétés structurelles et fonctionnelles du système nerveux n'ont pas montré de différence inter-espèces (Nargeot et al., 2007, Nargeot et al., 2009). Ainsi, les résultats obtenus dans cette thèse ont été traités sans distinction d'espèce.

### II. Conditionnement opérant

Les animaux ont été privés de nourriture deux jours avant les expériences afin d'accroître leur motivation face à la présentation d'un stimulus incitatif. De plus, le tube digestif étant complètement vide au bout de 48 h, les animaux étaient tous dans un même état motivationnel. Les animaux ont été aléatoirement divisés en deux groupes : le groupe contingent, dans lequel les animaux ont reçu une récompense alimentaire en association avec les mouvements radulaires, et le groupe non contingent, au sein duquel la récompense a été administrée de manière régulière, c'est-à-dire à intervalle de temps régulier et sans association explicite avec l'émission des mouvements radulaires. Afin de réaliser les apprentissages opérant, les animaux étaient placés seuls dans un bac rempli de 5 litres d'eau de mer oxygénée et maintenue à 15°C. Dans un premier temps, l'aplysie a été laissée en stabulation pendant 20 min afin qu'elle puisse se familiariser avec son nouvel environnement. Ensuite la récompense alimentaire, 20 µL de jus d'algues préparé par

macération de 0.2 g d'algues fraîches dans 10 mL d'eau de mer pendant 20 min, a été administrée soit de manière rythmique (groupe non-contingent) à la fréquence d'un métronome (récompense administrée le même nombre de fois que chez un animal contingent), soit en réponse aux mouvements buccaux d'ingestion afin de reproduire l'association action/récompense caractéristique du conditionnement opérant. Après cette phase de conditionnement, l'eau du bac a été changée et l'effet de l'apprentissage a été testé *in vivo* pendant 10 min. De la même façon que précédemment, l'émission des mouvements buccaux était stimulée par la présentation d'un stimulus incitatif (morceau d'algue) et la fréquence d'émission et leur régularité a été comparée entre les deux groupes d'animaux. La régularité est calculée avec le coefficient de variation (C.V.) qui est défini comme le rapport entre l'écart type et la moyenne. Cela permet de déterminer la variabilité des intervalles entre les patterns moteurs. Afin de pouvoir calculer un intervalle, cela nécessite la présence au minimum de trois événements.

### **III. Préparations nerveuses *in vitro***

Des préparations nerveuses de ganglions buccaux isolés des animaux ont été utilisées. Pour cela, les aplysies étaient anesthésiées avec une injection hémolympatique de 50 mL de  $MgCl_2$  (en mM : 360  $MgCl_2$ , 10 HEPES) à pH 7,5. Une fois l'animal anesthésié, la masse buccale a été extraite afin d'isoler les ganglions buccaux par section des nerfs périphériques. Ces ganglions ont ensuite été épinglés dans une boîte de Pétri dont le fond est recouvert d'un support d'élastomère (Sylgard) et ont été baignés avec une solution physiologique d'ASW (Artificial Sea Water ; composition ionique dans le paragraphe « solutions ioniques »). Le tissu conjonctif qui enveloppe les ganglions et protège les neurones a été retiré à l'aide d'une pince fine et d'un ciseau afin d'accéder aux corps cellulaires des neurones pour les expériences d'électrophysiologie intracellulaire.

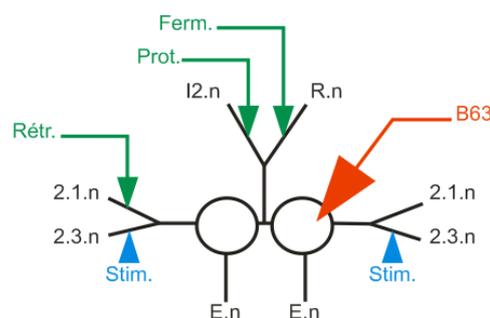
## IV. Techniques d'électrophysiologie *in vitro*

### 1. Electrophysiologie extracellulaire

Cette technique a été utilisée dans le but d'enregistrer les PMR, ou mouvements radulaires fictifs, émis spontanément par les préparations nerveuses. Des couples d'électrodes de métal ont été utilisées. L'une des électrodes est positionnée au contact des nerfs moteurs d'intérêt et est isolée du reste de la préparation par des manchons de Vaseline. L'autre électrode est positionnée à distance de la préparation et sert de référence. Les nerfs enregistrés par cette méthode dite « en passant » sont : le nerf I2 pour la protraction, le nerf 2.1 pour la rétraction et le nerf radulaire pour la fermeture (Figure 14). Des électrodes bipolaires de stimulations extracellulaires ont été positionnées au contact des nerfs sensoriels 2.3 et ont été isolées par un manchon de Vaseline. Les stimulations ont été générées par un stimulateur Grass S88 (Grass Instruments, Warwick, RI).

### 2. Electrophysiologie intracellulaire

Les enregistrements de l'activité neuronale de cellules d'intérêts ont été réalisés avec la technique d'électrodes intracellulaires. Pour cela, des micropipettes de verre, de résistance comprise entre 15 - 30 M $\Omega$ , ont été remplies d'une solution d'Acétate de Potassium de concentration 2 M et positionnées sur des micromanipulateurs (Figure 14). Les enregistrements et stimulations intracellulaires ont été effectués avec des électromètres Axoclamp 2B (Molecular Devices, Palo Alto, CA).



**Figure 14 : Représentation schématique des ganglions buccaux isolés *in vitro*.** Des électrodes extracellulaires représentées par les flèches vertes sont positionnées au contact des nerfs moteurs I2.n (protraction), 2.1.n (rétraction) et R.n ou nerf radulaire (fermeture). Les électrodes de stimulation représentées par les flèches bleues sont positionnées au niveau des nerfs sensoriels 2.3.n. La flèche rouge représente la micropipette utilisée pour les enregistrements intracellulaires.

Le neurone enregistré dans cette étude a été essentiellement le neurone B63, qui est la seule cellule nécessaire et suffisante au déclenchement du pattern moteur buccal (Hurwitz et al., 1997 ; Nargeot et al., 2009). Il a été identifié par sa relation de phase avec la phase de protraction du PMR, son profil de décharge, et par les projections synaptiques chimiques et électriques réalisées sur les motoneurones B31/B32 controlatéraux. Dans l'étude présentée dans le chapitre 1, d'autres cellules du réseau buccal ont été enregistrées : l'interneurone B64 en phase avec la rétraction, le neurone B51 en phase avec la fermeture, enfin les motoneurones B31/B32 (Plummer & Kirk, 1990). Les propriétés membranaires des neurones ont été étudiées avec les protocoles d'électrophysiologie suivants :

➤ Seuil d'excitabilité

Le seuil d'excitabilité d'un neurone a été défini comme l'intensité minimale d'un créneau de courant dépolarisant d'une seconde nécessaire au déclenchement d'un ou de plusieurs PA. Pour cela, le PM de B63 a été maintenu de façon continue à -80 mV et des créneaux de courant positif de pas de 0.1 nA ont été injectés dans le neurone jusqu'à l'apparition de ses PA.

➤ Seuil de déclenchement des potentiels de plateau

Le potentiel de plateau est une propriété membranaire intrinsèque du neurone B63. Il résulte de la capacité du neurone à produire une dépolarisation prolongée (entre -20 mV et -30 mV) en réponse à l'injection intracellulaire d'un bref courant dépolarisant. Afin de déterminer leur seuil de déclenchement, des créneaux de courant dépolarisant d'une durée de 30 s ont été injectés jusqu'à l'apparition de ces potentiels.

Pendant ces expériences d'électrophysiologie extra- et intracellulaire, les signaux ont été amplifiés puis visualisés sur un oscilloscope et un ordinateur grâce à une interface (CED 1401) et le logiciel Spike2 (Cambridge Electronic Design, UK).

## V. Analyse spectrale

L'analyse spectrale du PM des neurones a été réalisée à l'aide du logiciel R (R Core Team, 2014 ; <http://www.R-project.org/>). Deux analyses ont été effectuées : une analyse en transformée de Fourier (FFT) et une analyse en ondelettes. Dans un premier temps, l'analyse FFT a été utilisée pour déterminer une éventuelle fréquence d'oscillation continue de plus forte amplitude (fréquence dominante) dans le décours temporel d'un PM. Cette méthode décompose le signal enregistré en sinusoïdes de différentes fréquences successives et détermine pour chacune son amplitude (ou densité spectrale). La gamme des fréquences d'oscillations qui ont été analysées s'étend de 0,002 à 0,125 Hz correspondant à des périodes de 8 s à 512 s. Les résultats produits sont exprimés sous forme d'un périodigramme qui représente la puissance de chaque oscillation continue dans la gamme de fréquences/périodes étudiées. Les périodigrammes moyens sont calculés par la moyenne période par période des périodigrammes individuels de chaque enregistrement analysé.

Dans un second temps, une analyse en ondelettes des mêmes enregistrements intracellulaires a été réalisée pour confirmer l'existence d'une fréquence dominante et pour reconstruire l'onde sinusoïdale correspondant à cette fréquence. Ce tracé d'ondelette est une succession de cycles sinusoïdaux correspondant à la fréquence choisie et dont l'amplitude (densité spectrale) est recalculée pour chaque cycle. L'analyse en ondelettes a été réalisée à partir du paquet « WaveletComp » (Roesch & Schmidbauer, 2014 ; Computational Wavelet Analysis. R package version 1.0. ; <http://CRAN.R-project.org/package=WaveletComp>).

Dans ces analyses, pour des raisons de vitesse de calcul, les enregistrements intracellulaires ont été échantillonnés à 1 Hz après avoir été lissés par un filtre « Smooth » (Spike 2) à 2 Hz, donc à des fréquences bien supérieures à la gamme fréquentielle étudiée. Avec cette procédure, les variations rapides du PM, telles que les PA (~100-500 Hz) sont supprimés et ne subsistent que les variations lentes (< 2 Hz) qui ont été l'objet de l'étude.

## VI. Solutions ioniques

La solution physiologique « Artificial Sea Water » (ASW) utilisée pour les expériences *in vitro* est composée de (en mM) : 450 NaCl, 10 KCl, 30 MgCl<sub>2</sub>, 20 MgSO<sub>4</sub>, 10 CaCl<sub>2</sub>, 10 HEPES.

La solution « Bas Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> » utilisée pour bloquer les synapses chimiques est une solution d'ASW contenant une faible concentration en Ca<sup>2+</sup> (3 mM) et une forte concentration de Co<sup>2+</sup> (10 mM), un bloqueur non spécifique des canaux calciques. L'osmolarité de cette solution a été compensée par une légère modification de la concentration de NaCl : (en mM) 446 NaCl, 10 KCl, 30 MgCl<sub>2</sub>, 20 MgSO<sub>4</sub>, 3 CaCl<sub>2</sub>, 10 CoCl<sub>2</sub>, 10 HEPES. Le blocage des synapses chimiques est confirmé par la suppression de la synapse chimique entre B63 et B31 controlatéral.

La solution « 0 Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> » est une solution « Bas Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> » dont tout le Ca<sup>2+</sup> est remplacé par du Co<sup>2+</sup> (10 mM) et à laquelle est ajoutée un chélateur calcique, l'Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EGTA), (en mM) : 450 NaCl, 10 KCl, 30 MgCl<sub>2</sub>, 20 MgSO<sub>4</sub>, 0 CaCl<sub>2</sub>, 10 CoCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 0,5 EGTA.

La solution « 0 Na<sup>+</sup>, Co<sup>2+</sup> » est une solution « Bas Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> » dont la totalité du NaCl est remplacé par du chlorure de choline (en mM) : 446 Choline, 10 KCl, 30 MgCl<sub>2</sub>, 20 MgSO<sub>4</sub>, 3 CaCl<sub>2</sub>, 10 CoCl<sub>2</sub>, 10 HEPES.

Toutes ces solutions ont un pH ajusté à 7,5 par ajout d'HCl et sont maintenues à 15°C par un système de refroidissement Peltier. Les perfusions ont été réalisées par une pompe péristaltique au débit de 1 ml/min permettant un renouvellement de la totalité du liquide d'une boîte de Pétri en 5 min.

## VII. Pharmacologie

Les substances pharmacologiques utilisées ont été dissoutes soit dans l'ASW, soit dans la solution de « Bas Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> » et ont été perfusées en continue par une pompe péristaltique (voir ci-dessus). Il s'agit de :

- FCCP : carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (Merck-Sigma-Aldrich) utilisé à 20  $\mu\text{M}$  à partir d'une solution mère de 40 mM dans du Diméthylsulfoxyde (DMSO). Il s'agit d'un protonophore qui en dépolarisant la membrane mitochondriale provoque la sortie du  $\text{Ca}^{2+}$  qui est contenu dans cet organite (Groten et al., 2013 ; Hickey et al., 2010, 2013).
- CPA : Acide cyclopianoïque (Merck-Sigma-Aldrich) à 20  $\mu\text{M}$  à partir d'une solution mère de 50 mM solubilisée avec le DMSO. Il s'agit d'un bloqueur de la pompe ATPase calcique (SERCA) du réticulum endoplasmique (RE) (Hickey et al., 2010, 2013 ; Kachoei et al., 2006 ; Gardam & Magoski, 2009).
- Spiperone hydrochloride (Tocris) à 50  $\mu\text{M}$ . Cette substance est un antagoniste des récepteurs sérotoninergiques. Chez l'aplysie, elle a été décrite comme antagoniste des récepteurs membranaires sérotoninergiques qui produisent leur effet par la voie des PLC et protéines kinases C (PKC) (Barbas et al., 2003 ; Dumitriu et al., 2006)
- 5 Hydroxy-tryptamine (5-HT ; Merck-Sigma-Aldrich) ou Sérotonine a été utilisée à des concentrations de 0,1  $\mu\text{M}$  à 10  $\mu\text{M}$  à partir d'une solution mère (Kabotyanski et al., 2000).
- Dopamine hydrochloride (DA ; Merck-Sigma-Aldrich) a été utilisée à des concentrations de 1 à 10  $\mu\text{M}$ . Elle est préparée immédiatement avant utilisation avec une concentration équimolaire de vitamine C (Vit C) afin d'empêcher son oxydation. La solution DA + Vit C a été conservée en présence de glace et à l'abri de la lumière pendant la perfusion. Des travaux antérieurs ont montré que la présence de Vit C est sans effet sur l'activité électrique des ganglions buccaux d'Aplysies (Kabotyanski et al., 2000).

Les solutions de FCCP et CPA ont été préincubées 40 min avant le début des enregistrements et maintenues en perfusion pendant toute l'expérimentation (Hickey et al., 2010, 2013 ; Groten et al., 2013). Les concentrations finales en DMSO étaient inférieures à 0,1%, connues pour ne pas avoir d'effet sur les propriétés électriques des neurones.

### **VIII. Analyses statistiques**

Les comparaisons de deux groupes de données indépendantes ont été réalisées avec le test de Mann-Whitney. Dans le cas de comparaisons de deux groupes constitués de

données appariées, le test de Wilcoxon a été utilisé. Lorsque plus de deux groupes indépendants sont comparés, le test de Kruskal-Wallis suivi du test *post-hoc* de Dunn ont été utilisés. L'utilisation de ces tests non paramétriques est justifiée par l'impossibilité de confirmer sur des petits échantillons la répartition des données selon la loi normale et/ou de l'existence d'inégalité de variance inter-échantillons. La différence entre les groupes a été considérée comme significative avec une probabilité d'erreur inférieure à 5% ( $p < 0,05$ ). Les tests ont été réalisés à l'aide du logiciel SigmaStat (Systat Software, Inc.).

# Résultats

# Chapitre 1 : Rôle de la dynamique calcique intracellulaire dans la genèse d'une activité neuronale pacemaker

## I. Introduction

Dans les comportements motivés ou dirigés vers un but, les exécutions motrices ne sont pas strictement déterminées par une impulsion sensorielle comme le sont les réflexes mais peuvent être déclenchées ou interrompues sans qu'aucune cause environnementale ou homéostasique n'ait été identifiée. L'expression de ces comportements possède un caractère spontané et variable qui résulte des propriétés fonctionnelles dynamiques du système nerveux central. Toutefois, l'origine cellulaire de ces processus centraux reste mal connue.

La contribution d'activités neuronales spontanées dans la production d'actes moteurs a été largement décrite dans le cas des comportements rythmiques telles que la locomotion, la respiration ou la mastication (Marder & Calabrese, 1996 ; Harris-Warrick, 2002 ; Selverston, 2010). Dans ces exemples, la genèse spontanée des actes moteurs dépend de l'organisation synaptique des CPG et des propriétés membranaires intrinsèques des neurones qui composent ces réseaux (Marder & Calabrese, 1996). Parmi ces propriétés membranaires, celle de pacemaker joue un rôle important dans la genèse des activités spontanées. En effet, elle permet une oscillation régulière du PM des neurones qui donne une impulsion régulière et continue pour l'activité d'un réseau neuronal. Dans ces circuits, l'intervention des synapses chimiques hyperpolarisantes ou dépolarisantes peut également produire des variations du PM nécessaires à l'oscillation spontanée de l'activité électrique des neurones.

La manifestation comportementale des actes motivés et des activités rythmiques n'est pas totalement différente. En plus de la spontanéité dans l'émergence des actes qui est similaire, il est établi que sous l'effet de substances psychoactives ou de stimulations sensorielles et d'apprentissages, des actes initialement motivés ou variables peuvent aboutir à des conduites routinières ou compulsives (Everitt & Robbins, 2016). Celles-ci se caractérisent par la répétition automatique d'actions motrices stéréotypées ressemblant à la production des comportements rythmiques. Par conséquent, il est concevable que les mécanismes neuronaux centraux à l'origine de l'émission des comportements motivés aient une proximité avec ceux des comportements rythmiques.

Le comportement alimentaire chez l'aplysie offre un modèle d'étude unique pour aborder cette question. L'émission de ce comportement dépend à la fois de facteurs centraux et de régulations périphériques (Kupfermann, 1974 ; Cropper et al., 2004 ; Nargeot et Simmers, 2012). Même en l'absence de stimulus alimentaire explicite, l'animal en recherche de nourriture émet spontanément et à des intervalles de temps irréguliers des mouvements répétés de sa radula. Après apprentissage opérant par récompense, ces mouvements radulaires erratiques peuvent devenir réguliers ou rythmiques. Ils sont générés par un réseau de neurones identifié, localisé au sein des ganglions buccaux. Dans ce réseau buccal, les neurones B63 ont été déterminés comme cruciaux dans les processus décisionnels à l'origine du déclenchement ou non des actes moteurs puisqu'ils sont les seuls à être nécessaires et suffisants au déclenchement des PMR (Hurwitz et al., 2008 ; Nargeot & Simmers, 2012 ; Nargeot et al., 2009).

L'activité électrique des neurones B63 est caractérisée par leur capacité à produire des potentiels de plateau (Hurwitz & Susswein, 1996 ; Susswein et al., 2002 ; Nargeot et al., 2009). Ces événements se traduisent par la bistabilité électrique de la membrane neuronale conférant deux états différents : un état de repos lorsque la membrane est hyperpolarisée à des valeurs proches de -60 mV, et un état actif caractérisé par un PM dépolarisé qui se maintient durablement grâce à des flux ioniques au travers de canaux sans ou avec de faibles capacités d'inactivation (Figure 15A). Lors de cet état dépolarisé, l'ouverture de canaux sodiques ou calciques voltage-dépendants produit une bouffée de PA qui perdure aussi longtemps que le potentiel de plateau. Les transitions d'un état à l'autre nécessitent l'activation de canaux ioniques voltage-sensibles. Ainsi, la transition de l'état dépolarisé à celui de repos qui termine le potentiel de plateau peut être déclenchée expérimentalement par une injection intracellulaire d'un bref créneau de courant hyperpolarisant (Russell & Hartline, 1978). Chez B63, le retour spontané à l'état inactif peut résulter de l'effet hyperpolarisant de l'accumulation de  $Ca^{2+}$  intracellulaire lors du plateau produisant l'activation de canaux potassiques  $Ca^{2+}$ -sensibles (Figure 15A). L'arrêt brutal du plateau de B63 est aussi produit prématurément par l'effet hyperpolarisant d'une synapse inhibitrice (Hurwitz & Susswein, 1996). La transition inverse, de l'état de repos à l'état dépolarisé, c'est-à-dire l'initiation du potentiel de plateau peut être produite expérimentalement par l'injection intracellulaire d'un bref créneau de courant dépolarisant (Figure 15A). Cependant, il reste une question non résolue : quel est le mécanisme physiologique à l'origine du déclenchement spontané de ce plateau chez le neurone décisionnel B63 ?

Dans ce premier chapitre, nous avons cherché à déterminer le processus qui permet l'émergence spontanée des plateaux et des bouffées de PA chez le neurone B63. Pour cela l'activité spontanée de ce neurone a été étudiée par des techniques d'électrophysiologie *in*

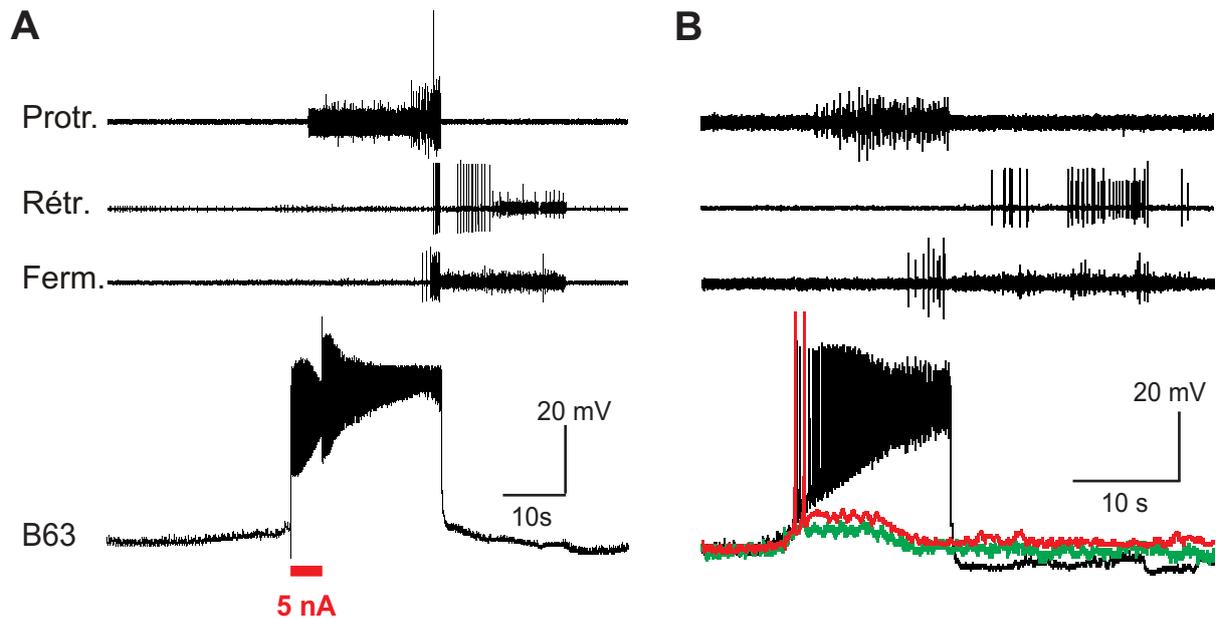
*vitro* extracellulaires et intracellulaires en combinaison avec des approches ioniques et pharmacologiques sur des ganglions buccaux isolés. Nos résultats aboutissent à la mise en évidence d'un nouveau mécanisme pacemaker basé sur une dynamique calcique intracellulaire, non voltage-dépendante, et qui pourrait s'étendre à, et, ou concerner l'ensemble d'un réseau neuronal par l'intermédiaire des synapses électriques.

## II. Résultats

### 1. Oscillation régulière du PM du neurone décisionnel B63

Pour étudier l'origine de la spontanéité de l'activité du neurone B63, son PM ainsi que l'émission des PMR ont été enregistrés sur des préparations de ganglions buccaux *in vitro*. Les enregistrements intracellulaires de B63 montrent que le déclenchement des potentiels de plateau est associé à une brève dépolarisation spontanée du PM (Figures 15A, B). Celle-ci peut être suffisamment ample pour franchir le seuil nécessaire à l'expression du plateau. Dans certains cas, ces dépolarisations spontanées observées montrent une amplitude qui ne leur permet que la production de quelques PA. Dans d'autres cas, leur amplitude ne permet pas de franchir le seuil d'activation des canaux voltages-dépendants (Figure 15B). Ces enregistrements montrent que le potentiel de repos du neurone décisionnel B63 n'est pas stable mais est sujet à des dépolarisations membranaires spontanées. Ces dernières peuvent, dans certains cas, déclencher l'activité de potentiel de plateau de B63 et ainsi l'expression des PMR (Figures 15B, 16A).

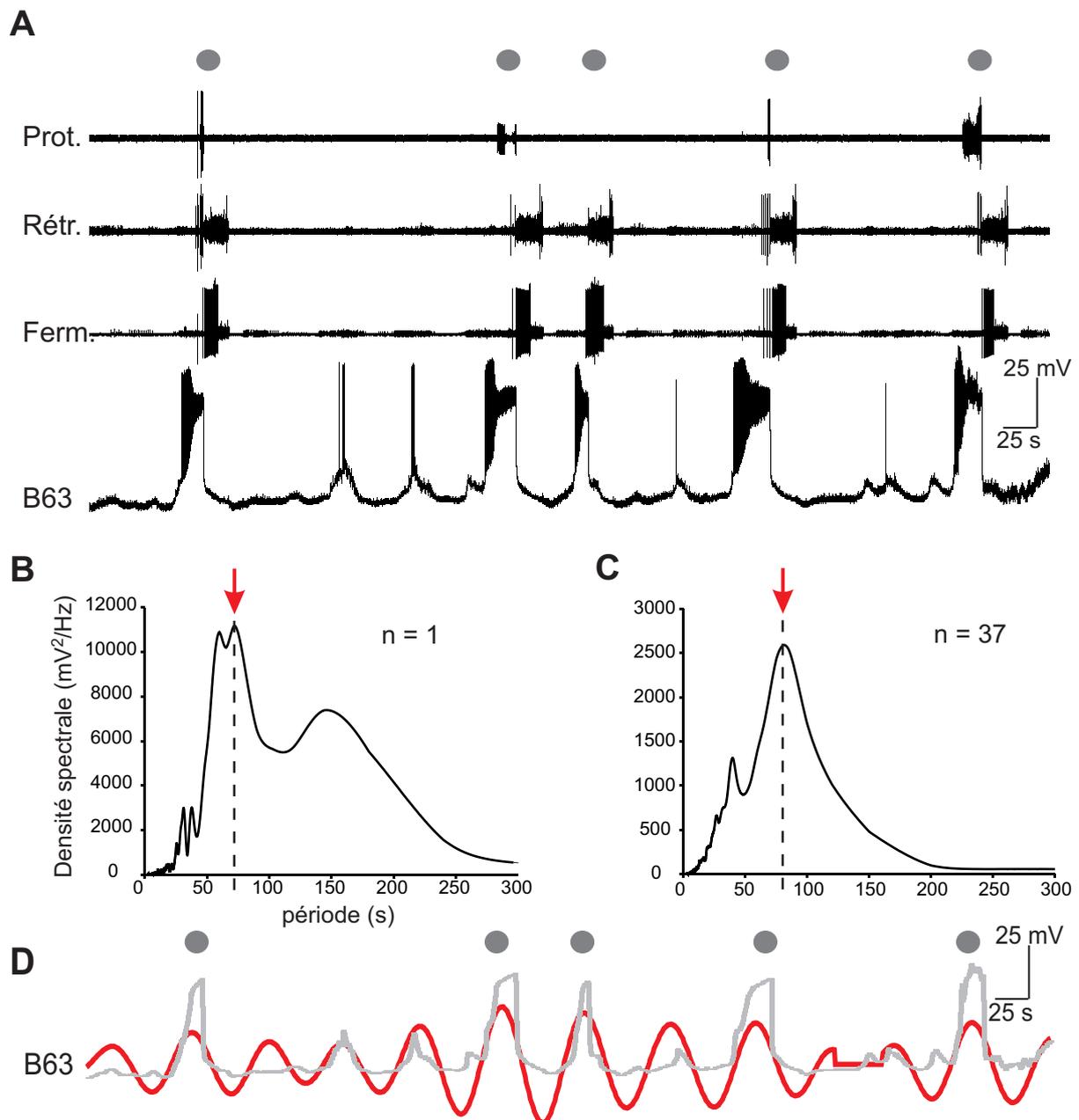
La connaissance actuelle de la spontanéité des activités neuronales est celle des propriétés bioélectriques des neurones pacemakers qui contribuent à générer des dépolarisations rythmiques. Or, chez l'aplysie, il est établi que lors de la recherche de nourriture, les cycles de mouvements buccaux ou de mouvements radulaires se répètent à intervalles de temps irréguliers (Nargeot & Simmers, 2012). L'irrégularité de cette activité motrice est également enregistrée sur les nerfs moteurs des ganglions isolés *in vitro* (Figure 16A). Par conséquent, est-ce que les dépolarisations spontanées de B63 à l'origine du déclenchement des potentiels de plateau s'expriment de façon aléatoire ou répondent-elles à un déterminisme particulier ? Afin de répondre à cette question, le PM du neurone B63 a été soumis à une analyse spectrale. Cette technique consiste à décomposer un signal temporel en une série d'oscillations dans une gamme choisie de fréquences. Pour chaque fréquence, une amplitude ou densité spectrale, est déterminée. Ainsi, l'existence d'un signal périodique peut être révélée par la présence d'une fréquence spécifique ayant une forte amplitude. L'analyse spectrale du PM du neurone B63 sur une période de 15 min a mis en évidence l'existence d'une fréquence dominante, qui correspond à la répétition d'un événement oscillatoire avec une période d'environ 60 s (Figure 16B). Un résultat comparable est obtenu avec l'analyse de 37 préparations nerveuses distinctes (Figure 16C). La reconstruction mathématique de ce signal périodique (ondelette) et sa superposition à la trace filtrée de l'enregistrement électrophysiologique du neurone B63 en Figure 16A met en évidence que le signal périodique correspond aux dépolarisations spontanées sous liminaires et



**Figure 15 : Déclenchement d'un potentiel de plateau chez le neurone B63 et du PMR**

**A.** Déclenchement provoqué : enregistrements simultanés extracellulaire d'un PMR (3 traces supérieures) et intracellulaire de B63 (trace inférieure) lors du déclenchement d'un potentiel de plateau par l'injection intracellulaire d'un bref (5 s) courant positif (+ 5 nA). La dépolarisation provoquée dans B63 se maintient au-delà de l'injection de courant et est surmontée d'une bouffée de PA à l'origine de la genèse du PMR.

**B.** Déclenchement spontané: en absence de stimulation expérimentale, le potentiel de plateau de B63 et le PMR associé sont déclenchés par une dépolarisation spontanée (trace noire). Cette dépolarisation peut avoir une amplitude inférieure au seuil des plateaux, ne produisant alors que des PA isolés sans genèse de PMR (trace rouge), ou sous liminaire et ne déclenche aucune activité (trace verte).



**Figure 16 : Emission spontanée et irrégulière des PMR sous-tendue par une oscillation régulière du PM de B63**

**A.** Spontanément, les PMR (3 traces supérieures) et les potentiels de plateau de B63 associés (trace inférieure) sont générés à intervalles de temps irréguliers (ronds).

**B.** Analyse spectrale du PM de B63 présentée en A. L'existence d'une période dominante (flèche) indique la présence d'une variation périodique et régulière du PM (oscillation) de 60 s de période.

**C.** Analyse spectrale moyenne du PM de B63 chez 37 préparations nerveuses montrant une oscillation de période moyenne de 70 s.

**D.** Superposition de la trace filtrée de B63 présentée en A (trace grise) et de la reconstruction par ondelettes de l'oscillation de 60 s de période détectée en B (trace rouge). La genèse à intervalles de temps irréguliers des potentiels de plateau (ronds) se fait sur la base d'une oscillation régulière du PM de B63.

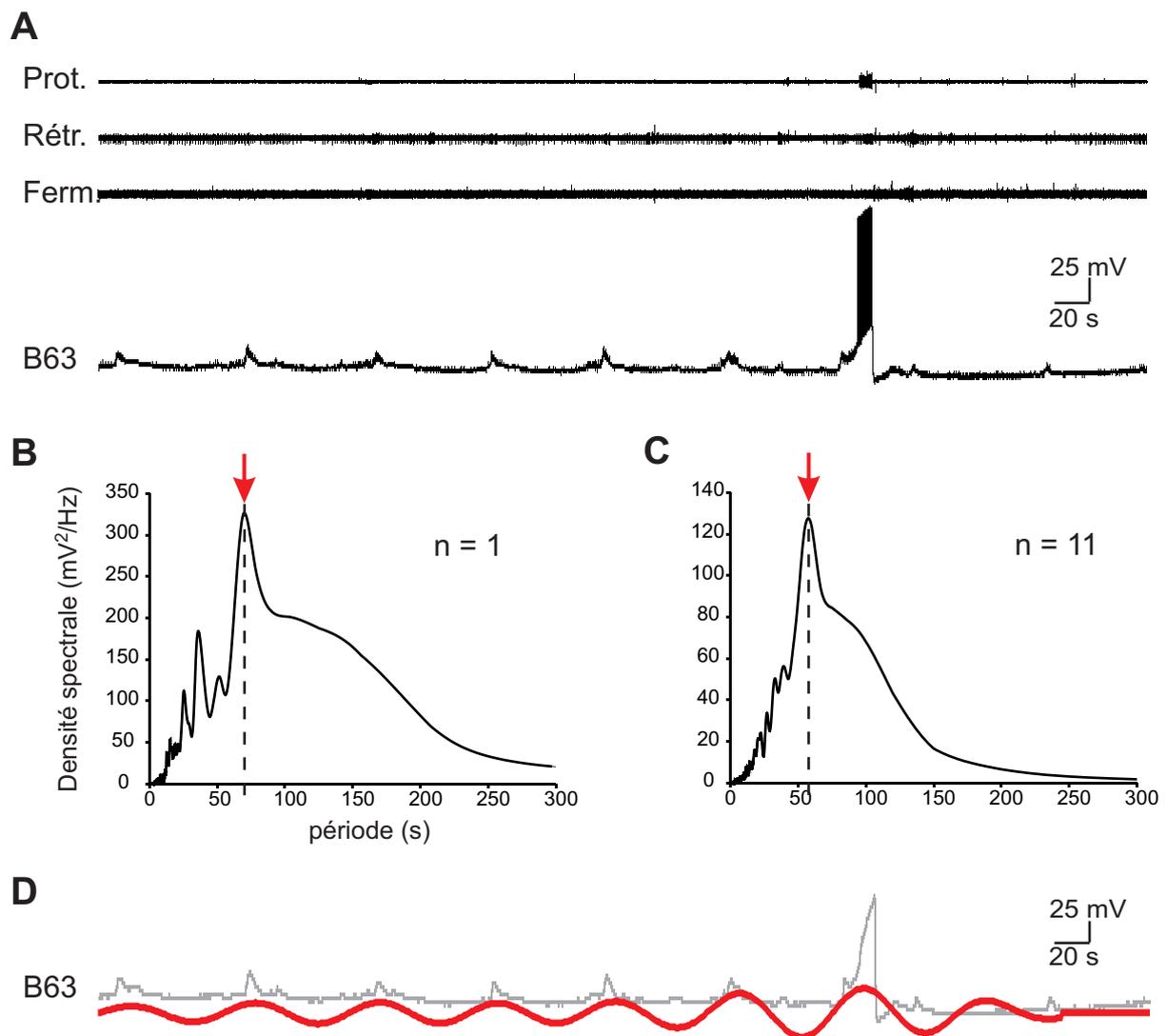
supraliminaire (Figure 16D). Ce résultat montre que la dépolarisation du neurone B63 n'est pas aléatoire mais s'effectue sur la base d'une oscillation périodique d'amplitude variable. Lorsque cette oscillation est supraliminaire, elle déclenche l'expression d'un potentiel de plateau, et en conséquence celle d'un PMR. L'activité motrice radulaire qui s'exprime à intervalles de temps irréguliers a donc pour origine une impulsion rythmique.

L'activité rythmique d'un neurone peut résulter d'une contrainte de l'organisation synaptique et fonctionnelle d'un réseau neuronal plutôt que d'une propriété endogène d'un neurone spécifique. Observe-t-on encore cette même oscillation du PM de B63 lorsque ce neurone et le réseau buccal ne sont pas actifs ? Pour répondre à cette question, l'analyse spectrale a été réalisée sur des enregistrements ( $n = 11$ ) parmi ceux analysés précédemment sur des plages de temps sans potentiel de plateau et donc sans l'expression des PMR (Figure 17A). L'analyse spectrale du PM de B63 en absence d'activité du réseau buccal montre à nouveau une oscillation régulière de période d'environ 60 s (Figures 17B-D). Ces dépolarisations membranaires spontanées et répétées du neurone décisionnel ne sont donc pas la conséquence de la production de potentiels de plateau dans B63 ou de l'activité dans le réseau buccal.

## 2. Caractéristiques de l'oscillation

Comme cela a été rappelé plus haut, l'activité oscillatoire des neurones peut avoir pour cause les propriétés voltage-dépendantes des canaux ioniques membranaires du neurone. Dans ce cas, des variations expérimentales de son PM devraient modifier cette oscillation. L'hypothèse d'une sensibilité au voltage de l'oscillation du PM de B63 a été testée par l'injection intracellulaire de courants hyperpolarisants d'intensité constante. Une hyperpolarisation du neurone à des valeurs inférieures ou égales à -80 mV qui ferment la plupart des canaux voltage-dépendants, ne supprime pas l'oscillation du PM (Figure 18A). De plus, à ces potentiels très négatifs, la période d'oscillation des préparations testées ( $53,00 \pm 4,38$  s,  $n = 4$ ) reste similaire à celle enregistrée avant l'hyperpolarisation ( $46,75 \pm 4,59$  s,  $U = 4,00$ ,  $p > 0,05$  ; Figure 18B). Par conséquent, ces résultats indiquent que l'oscillation de B63 n'a pas pour origine un processus sensible au voltage.

Alternativement, l'oscillation du PM pourrait être d'origine chimique ou synaptique. On rappelle que la libération de neurotransmetteurs peut être graduée et non associée à la genèse de PA. Dans l'hypothèse d'une origine pré-synaptique de l'oscillation de B63, les



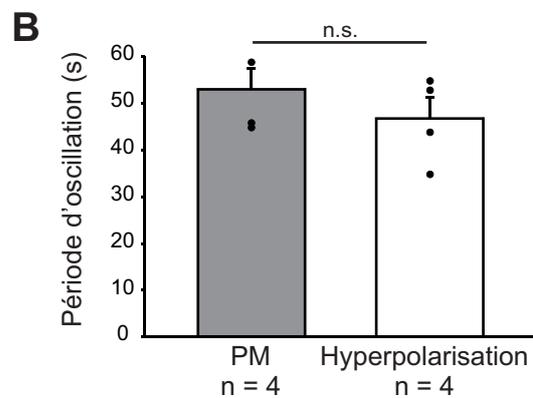
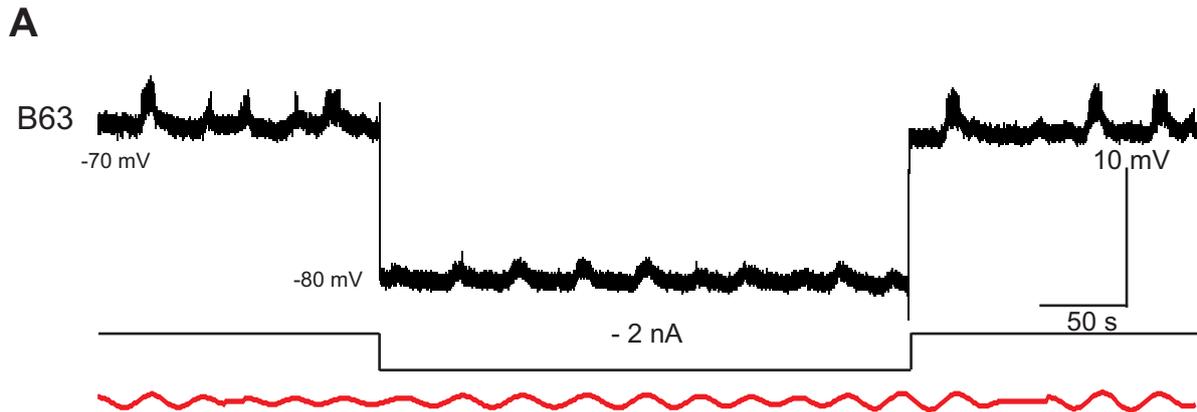
**Figure 17 : Oscillation spontanée du PM de B63 en absence de potentiel de plateau et de PMR associé**

**A.** PM spontané de B63 (trace inférieure) en absence de genèse de PMR.

**B.** Analyse spectrale du PM de B63 décrit en A. Notons la présence d'une période dominante d'environ 60 s de période (flèche).

**C.** Analyse spectrale moyenne de B63 chez 11 préparations nerveuses montrant la présence d'une oscillation dominante de période de 55 s en absence de potentiel de plateau et de PMR.

**D.** Reconstruction par ondelette de l'oscillation de 60 s de période (trace rouge, voir B) superposée à l'enregistrement filtré en A (trace grise).



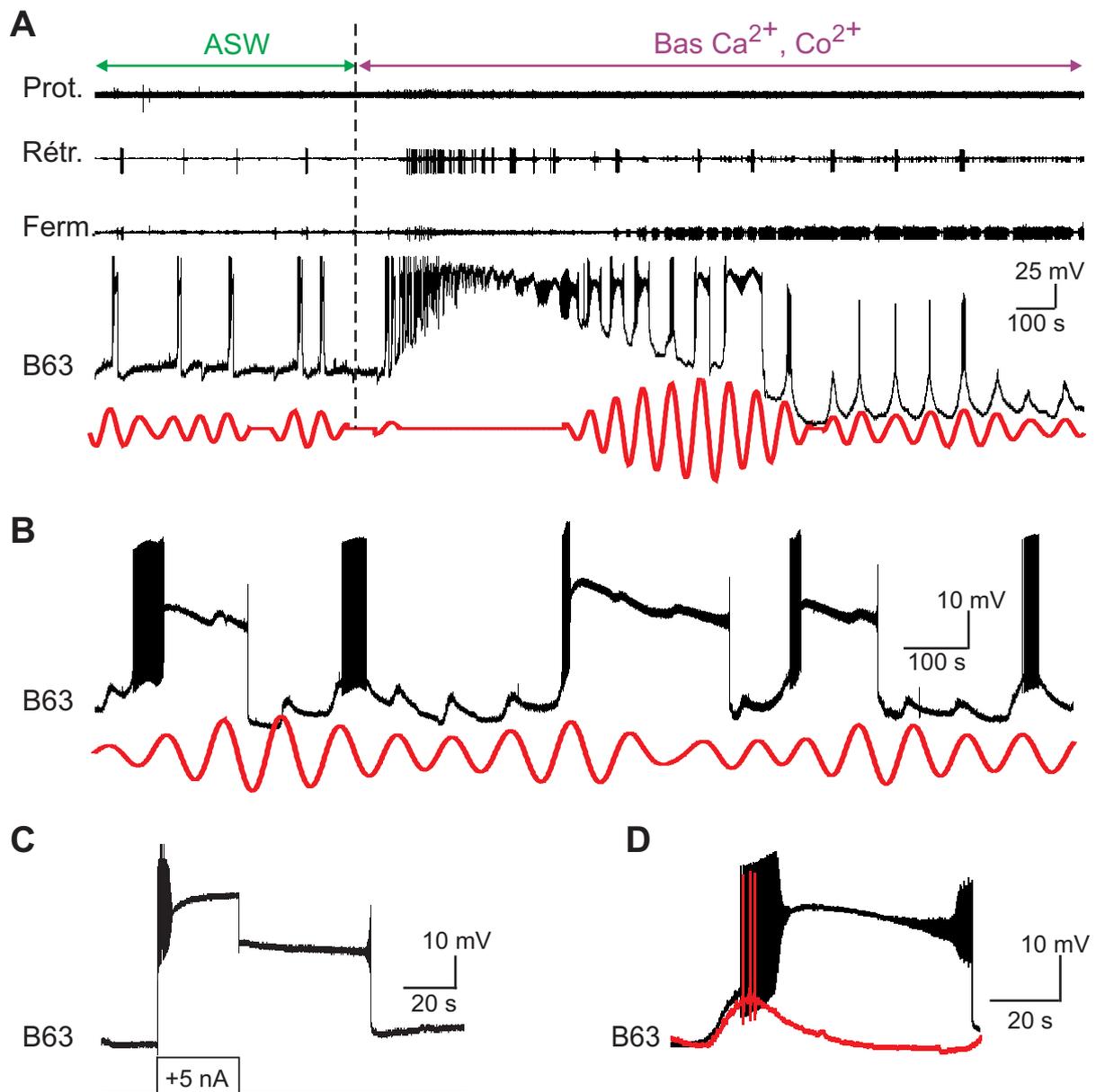
**Figure 18 : Oscillation non voltage-dépendante du PM de B63**

**A.** Enregistrement intracellulaire de l'activité de B63 en absence de potentiel de plateau, avant, pendant et après une hyperpolarisation provoquée par une injection intracellulaire d'un courant (-2 nA). L'hyperpolarisation ne modifie pas sensiblement l'oscillation reconstruite par analyse d'ondelettes (trace rouge).

**B.** Absence de modification (n.s., non significatif) de la période d'oscillation de B63 lorsque son PM initial est maintenu à -70 mV et à -80 mV.

modifications expérimentales du PM de B63 seraient sans effet sur la fréquence d'oscillation. Des expériences de blocage des synapses chimiques des ganglions buccaux ont alors été réalisées. Pour cela, les préparations nerveuses *in vitro* ont été perfusées avec une solution saline appauvrie en  $\text{Ca}^{2+}$  (3 mM au lieu de 10 mM) et contenant du cobalt ( $\text{Co}^{2+}$ ) à 10 mM, un bloqueur non spécifique des canaux calciques. Cette solution « Bas  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  » empêche la libération vésiculaire et donc la libération de transmetteurs chimiques permettant ainsi d'isoler les neurones par blocage des synapses chimiques. Au début de la perfusion, la suppression progressive des synapses chimiques, dont les inhibitrices, s'accompagne de la désorganisation des PMR et d'une dépolarisation membranaire du neurone B63 (Figure 19A). Par la suite, ce neurone isolé *in situ* se repolarise à des valeurs proches des valeurs initiales probablement avec le rééquilibrage des flux ioniques qui est produit par les pompes membranaires. Les enregistrements ont été analysés au-delà de 20 min de perfusion lorsque les synapses sont totalement bloquées et que le PM minimal du neurone est revenu à une valeur stable. Dans ces conditions ioniques, l'analyse spectrale révèle que l'activité électrique de B63 isolé *in situ* se caractérise par une oscillation régulière de son PM, comme observé en ASW (Figures 19A, B). Ce neurone isolé continue de produire à intervalles de temps irréguliers des potentiels de plateau (Figures 19A, B) dont le déclenchement est associé à la dépolarisation membranaire produite par l'oscillation du PM (Figures 19C, D). De plus, l'oscillation enregistrée en solution « Bas  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  », n'est pas voltage-dépendante comme dans la condition contrôle en ASW. En effet, des hyperpolarisations toniques du PM de B63 par injection intracellulaire de courants négatifs ne modifient pas la fréquence d'oscillation du neurone (Figure 20B). Néanmoins, ces hyperpolarisations sont capables d'interrompre le déclenchement voltage-dépendant des potentiels de plateau confirmant ainsi que l'expression des plateaux est bien déclenchée par l'oscillation lorsque celle-ci est supraliminaire (Figure 20A). Par conséquent, ces résultats montrent que d'une part, le phénomène oscillatoire et le mode de production des potentiels de plateau ne sont pas changés par le blocage des synapses chimiques, et, que d'autre part, l'oscillation du PM ne dépend ni de connexions synaptiques chimiques, ni de processus voltage-dépendants.

En outre, certains paramètres différencient l'activité de B63 en condition ionique normale et en condition bloquant les synapses chimiques. Tout d'abord, la période d'oscillation est significativement augmentée (ASW :  $41,64 \pm 3,96$  s,  $n = 11$  ; Bas  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  :  $65,88 \pm 6,97$  s,  $n = 17$  ;  $U = 56,00$ ,  $p = 0,036$  ; Figure 21A). Ensuite, l'amplitude des oscillations quantifiées par la densité spectrale est également significativement augmentée (ASW :  $60,29 \pm 19,91$   $\text{mV}^2/\text{Hz}$ ,  $n = 11$  ; Bas  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  :  $1687,89 \pm 814,86$   $\text{mV}^2/\text{Hz}$ ,  $n = 17$  ;  $U = 21,00$ ,  $p < 0,001$  ; Figure 21B). Enfin, les potentiels de plateau ont une durée significativement plus grande lorsque les synapses chimiques sont bloquées (ASW :  $25,94 \pm$



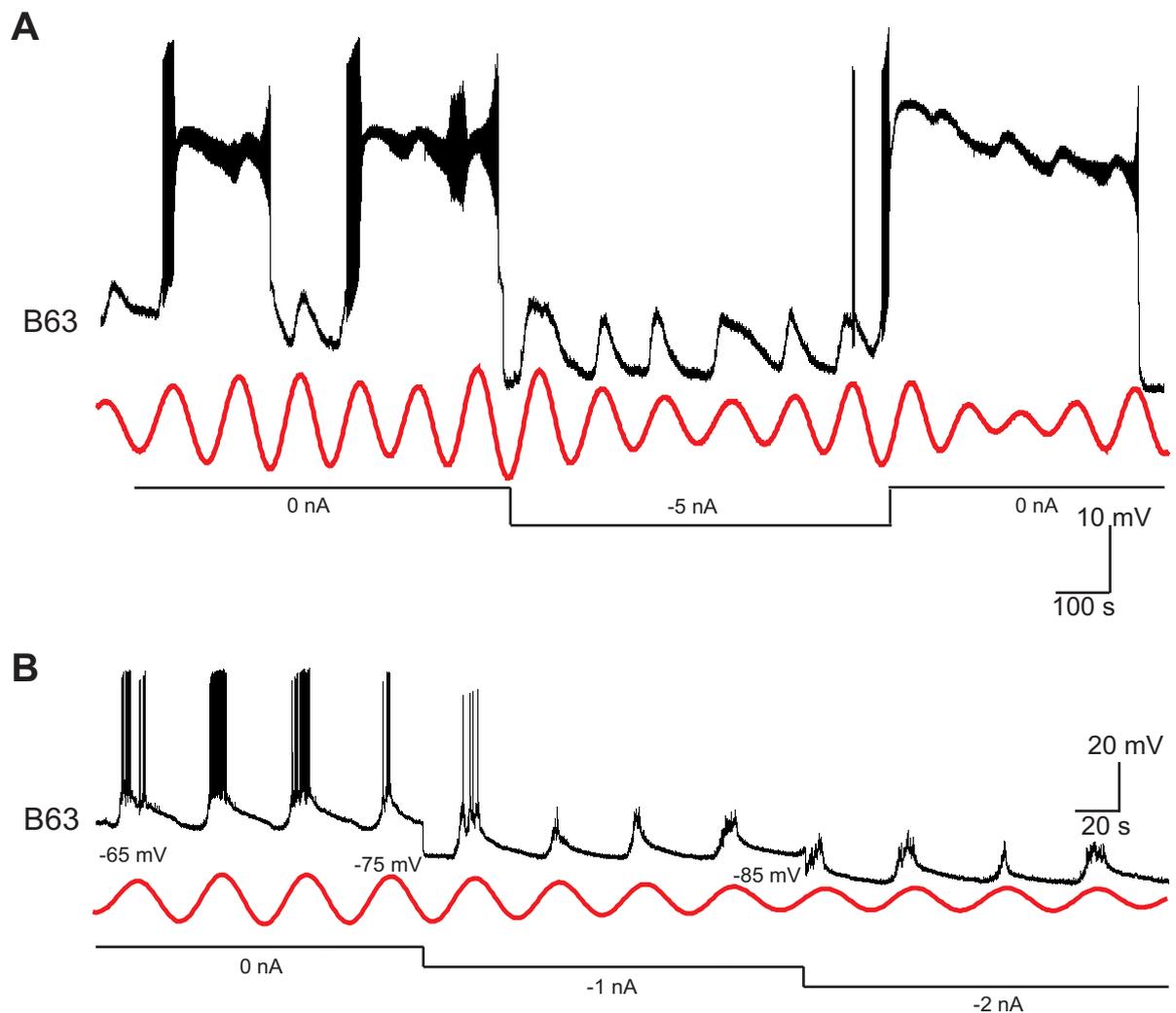
**Figure 19 : Oscillation du PM de B63 en condition de blocage des synapses chimiques.**

**A.** Enregistrements extracellulaire des PMR et intracellulaire de B63 avant (ASW, liquide physiologique) et pendant la perfusion d'une solution (Bas  $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ) qui bloque les synapses chimiques. Notons que l'oscillation enregistrée en condition physiologique persiste après le blocage des synapses chimiques (trace rouge).

**B.** En condition de blocage des synapses chimiques, l'oscillation de B63 (trace rouge, reconstruction d'ondelette) est associée au déclenchement irrégulier des bouffées de PA de B63 et des oscillations sans PA.

**C.** En condition de blocage synaptique, B63 conserve la capacité de produire des potentiels de plateau en réponse à une dépolarisation provoquée par l'injection intracellulaire d'un courant de +5 nA.

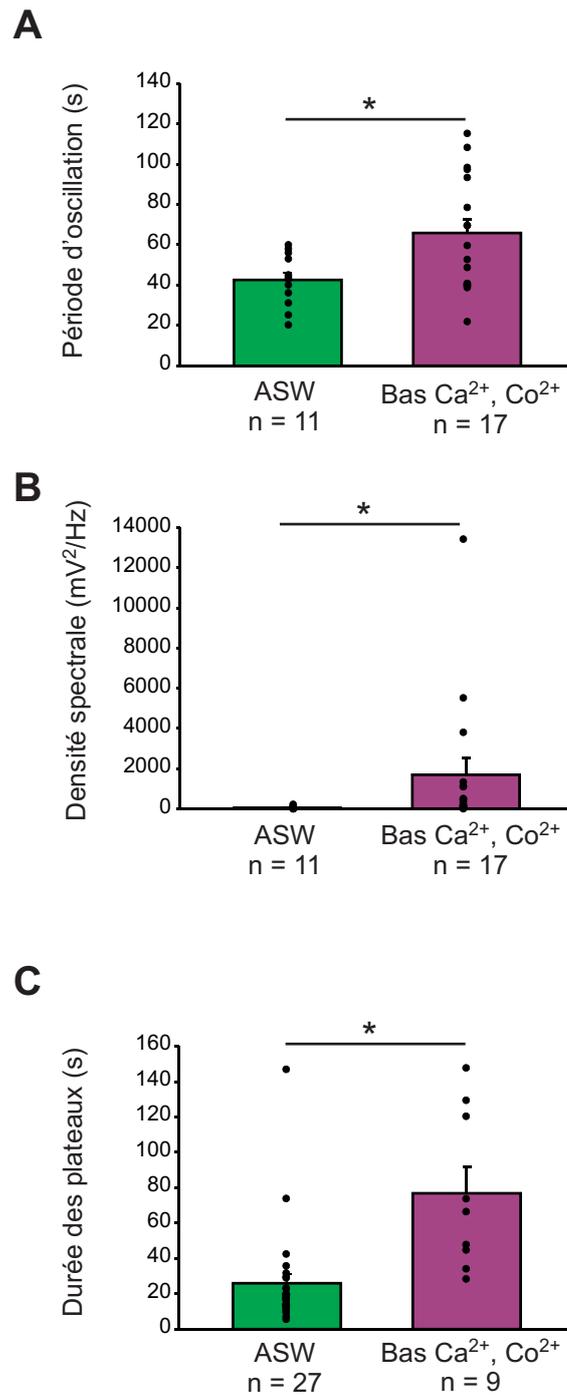
**D.** Superposition de l'enregistrement d'une oscillation spontanée d'amplitude sous le seuil des potentiels de plateau (trace rouge) et d'amplitude supraliminaire (trace noire) montrant la capacité de l'oscillation à déclencher spontanément un potentiel de plateau en condition de blocage synaptique.



**Figure 20 : Oscillation non voltage-dépendante en condition de blocage des synapses chimiques**

**A.** L'expression des potentiels de plateau est bloquée par une hyperpolarisation expérimentale de B63 (-5 nA), sans modification de la période d'oscillation sous jacente (trace rouge, reconstruction d'ondelette).

**B.** Oscillation continue et régulière du PM (trace rouge, reconstruction d'ondelette) au cours d'hyperpolarisations progressives de B63 par l'injection intracellulaire de courants (-1, -2 nA).



**Figure 21 : Comparaison des caractéristiques de l'oscillation du PM de B63 en condition physiologique (ASW) et en condition de blocage des synapses chimiques (Bas  $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ )**

En condition "Bas  $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ", la période d'oscillation (A), la densité spectrale qui est une mesure de l'amplitude d'oscillation (B), et la durée des potentiels de plateau (C) augmentent significativement en comparaison à celles enregistrées en condition physiologique (ASW).

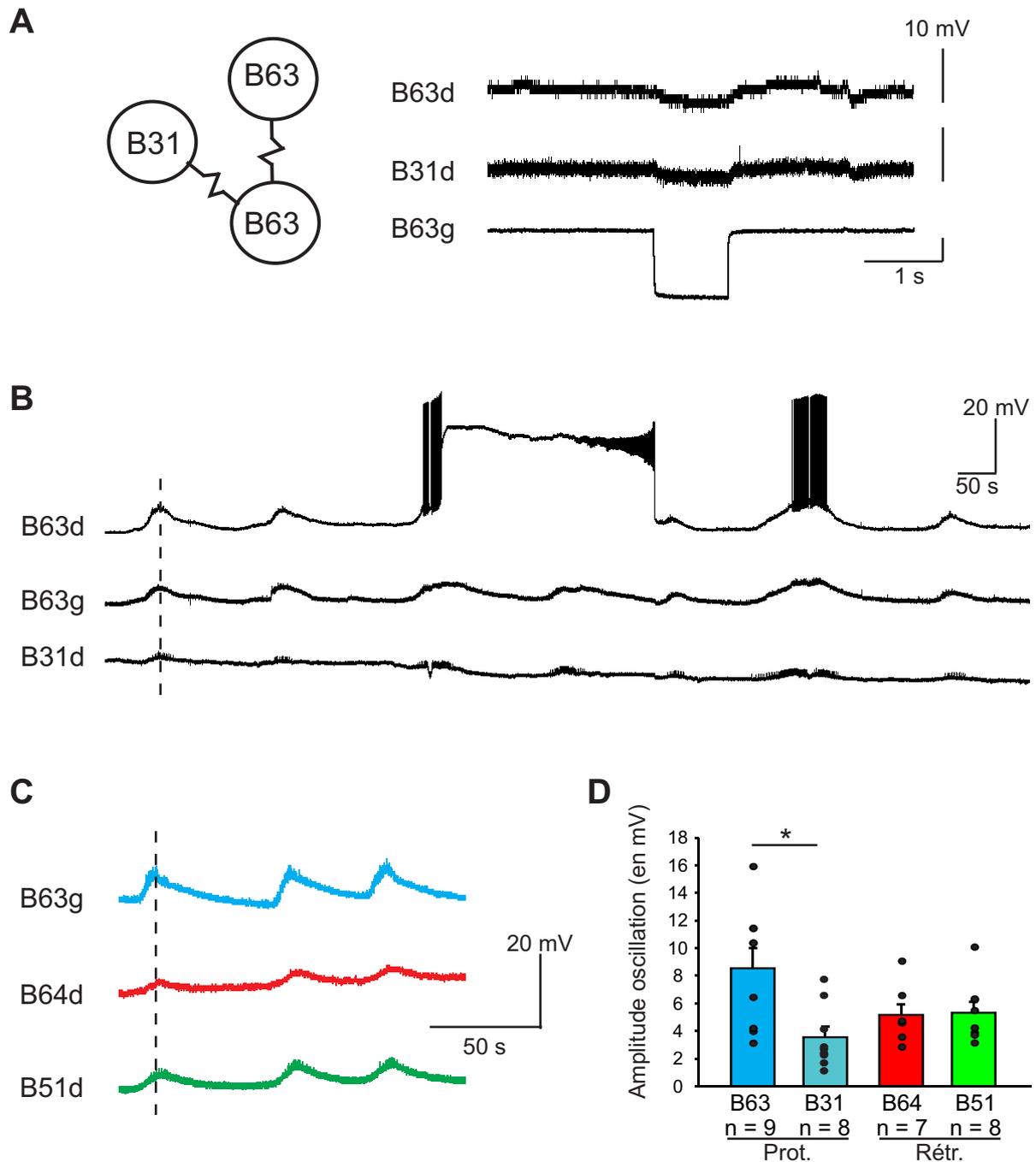
\*,  $p < 0,05$ .

5,33 s, n = 27 ; Bas  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  :  $76,82 \pm 14,81$  s, n = 9, U = 21,00, p < 0,001 ; Figure 21C). En dépit de ces différences liées à la modification de l'environnement ionique et à la suppression des synapses, l'ensemble des observations suggèrent que le neurone décisionnel B63 génère spontanément une oscillation de son PM, de période régulière, et qui ne dépend ni des relations synaptiques chimiques au sein des ganglions buccaux, ni de ses canaux ioniques voltage-sensibles.

Toutefois, les conditions de blocage des synapses chimiques utilisées dans cette étude préservent les synapses électriques du réseau buccal. Des couplages électriques sont notamment présents entre les neurones B63 controlatéraux et leurs motoneurones B31, et subsistent en solution « Bas  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  » (Figure 22A). Des enregistrements intracellulaires simultanés de ces neurones couplés électriquement montrent que l'oscillation enregistrée dans B63 est également exprimée de façon synchrone dans l'ensemble des neurones couplés à B63 (Figure 22B). Plus étonnant, une oscillation du PM synchrone avec celle de B63 est également enregistrée dans des neurones du réseau non connus pour partager des synapses électriques directes avec lui (Figure 22C). L'analyse de la période d'oscillation montre qu'elle est similaire dans tous les neurones mais elle possède une diversité d'amplitude dont la plus forte est celle enregistrée dans le neurone B63 (Figure 22D). Ainsi, il apparaît que l'oscillation est un phénomène qui ne concerne pas uniquement le neurone B63 mais l'essentiel des neurones du réseau générateur des PMR. Cette oscillation globale du CPG pourrait alors résulter soit d'une propagation de l'oscillation de B63 vers ses partenaires dont il partage des couplages électriques directs (B63 controlatéral, B31) ou indirects (B64, B51), soit d'une propriété émergente des réseaux composés de cellules couplées électriquement. Nous ne pouvons pas non plus exclure que l'oscillation concerne un neurone non identifié du ganglion buccal qui réaliserait des synapses électriques avec les neurones identifiés du CPG buccal.

### 3. Contribution des flux cationiques transmembranaires et des stocks calciques intracellulaires

L'oscillation du PM de B63 qu'elle soit d'origine unicellulaire ou produite par les propriétés d'un réseau de neurones couplés électriquement implique nécessairement des flux ioniques transmembranaires qui rendent compte des dépolarisations. Dans les conditions d'isolation *in situ*, en solution « Bas  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  », l'oscillation qui est enregistrée au potentiel de repos persiste à la même fréquence et en continue même lors de



**Figure 22 : Oscillation synchrone du PM des neurones du réseau buccal en condition de blocage des synapses chimiques**

**A.** Couplage électrique de B63 aux neurones B63 contralatéral et B31 ipsilatéral (g, gauche, d, droit) montré par une injection de courant hyperpolarisant dans B63.

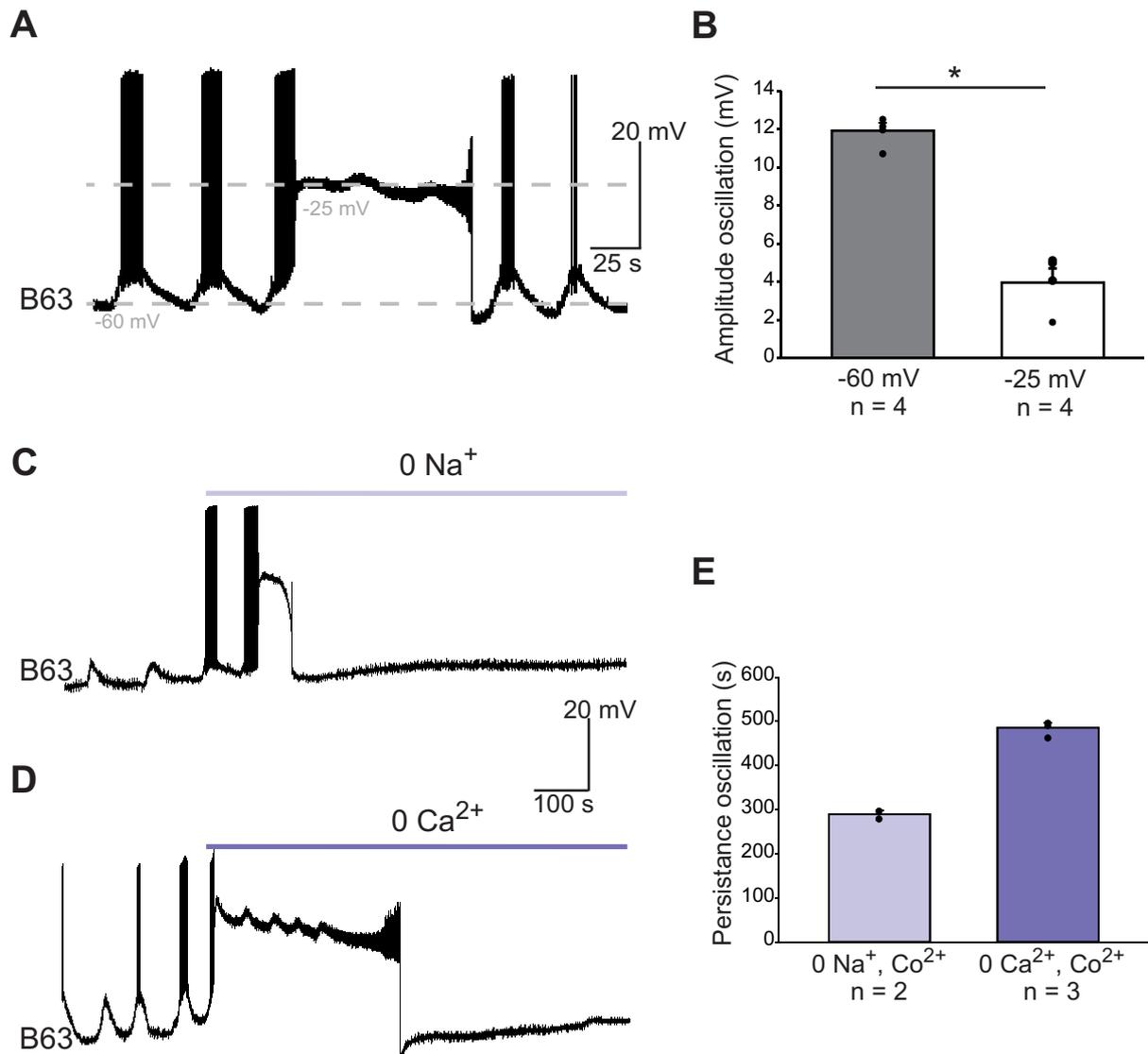
**B.** Oscillation synchrone du PM des neurones électriquement couplés et appartenant au générateur de protraction du PMR.

**C.** Oscillation synchrone du PM de B63 avec les B64 et B51 qui appartiennent au générateur de rétraction du PMR.

**D.** Amplitude moyenne d'oscillation des neurones B63, B31, B64 et B51. \*,  $p < 0,05$ .

l'expression d'un potentiel de plateau (Figure 23A). La comparaison de l'amplitude d'oscillation à -60 mV (proche du potentiel de repos) avec celle à -25 mV (lors d'un potentiel de plateau) montre une diminution significative en partie due au rapprochement du PM au potentiel d'inversion des ions responsables de cette oscillation (-60 mV :  $11,92 \pm 0,41$  mV,  $n = 4$  ; -25 mV :  $3,96 \pm 0,73$  mV,  $n = 4$ ,  $U = 0,00$ ,  $p = 0,029$  ; Figure 23B). Le potentiel d'inversion est donc supérieur à -25 mV ce qui est compatible avec une implication d'influx transmembranaires de  $\text{Na}^+$  et/ou de  $\text{Ca}^{2+}$ . Afin d'analyser la contribution de ces ions, les préparations nerveuses ont été perfusées avec une solution soit dépourvue de  $\text{Na}^+$  (Figure 23C), soit dépourvue de  $\text{Ca}^{2+}$  (Figure 23D). En condition « Bas  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  », l'oscillation persiste sans discontinuer pendant environ 1h30. En revanche lorsque le  $\text{Na}^+$  est totalement supprimé de cette solution, l'oscillation et les potentiels de plateau disparaissent en moins de 5 min (Figure 23E). Par conséquent, la présence des ions  $\text{Na}^+$  est nécessaire à la genèse de l'oscillation et des potentiels de plateau de B63 et semble contribuer par la création d'un flux membranaire sodique dépolarisant. La suppression totale des ions  $\text{Ca}^{2+}$  produit un résultat similaire avec quelques différences fondamentales. D'une part, la suppression du  $\text{Ca}^{2+}$  a peu d'effet sur le potentiel de plateau. D'autre part, la suppression de l'ion  $\text{Ca}^{2+}$  requiert deux fois plus de temps que le  $\text{Na}^+$  pour éliminer l'oscillation (Figure 23E). Cet effet retardé pourrait suggérer une action régulatrice ou de second messenger du  $\text{Ca}^{2+}$  et non un flux transmembranaire. Par exemple, le flux de  $\text{Ca}^{2+}$  pourrait contribuer à entretenir une dynamique calcique intracellulaire qui contrôlerait l'activation  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante de canaux membranaires cationiques ou sodiques responsables de l'oscillation.

La dynamique calcique intracellulaire dépend des flux transmembranaires de cet ion mais aussi de son stockage et relargage par des organites intracellulaires tels que le RE et les mitochondries. Il est établi que la dynamique calcique intracellulaire peut être essentielle à la production d'oscillations du PM (Berridge, 1998). Pour tester la participation d'une telle dynamique impliquant les organites cellulaires dans la genèse de l'oscillation du PM de B63, celle-ci a été étudiée en condition de blocage des synapses chimiques et en présence de substances pharmacologiques qui modifient les flux calciques produits par les mitochondries ou le RE. Trois groupes de préparations ont été utilisés : un groupe « témoin » perfusé en continu avec une solution « Bas  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  » contenant du solvant seul (DMSO 0,1 %,  $n = 5$ ) ; un groupe perfusé en continu avec une solution « Bas  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  » contenant 20  $\mu\text{M}$  de FCCP ( $n = 5$ ), un protonophore qui produit une dépolarisation prolongée de l'organite associée à la libération de son stock de  $\text{Ca}^{2+}$  (Hickey et al., 2010, 2013 ; Groten et al., 2013) ; un groupe ( $n = 3$ ) perfusé également en continu avec une solution « Bas  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  » contenant 20  $\mu\text{M}$  de CPA, un bloqueur de la pompe calcique du RE entraînant sa déplétion en  $\text{Ca}^{2+}$  (Kachoei et al., 2006). Les neurones B63 du groupe témoin génèrent une



**Figure 23 : Contribution du Na<sup>+</sup> et Ca<sup>2+</sup> dans la genèse de l'oscillation**

**A.** La diminution de l'amplitude d'oscillation enregistrée à -25 mV comparativement à celle à -60 mV suggère que la production de l'oscillation dépend d'un courant cationique dont le potentiel d'inversion est supérieur à -25 mV .

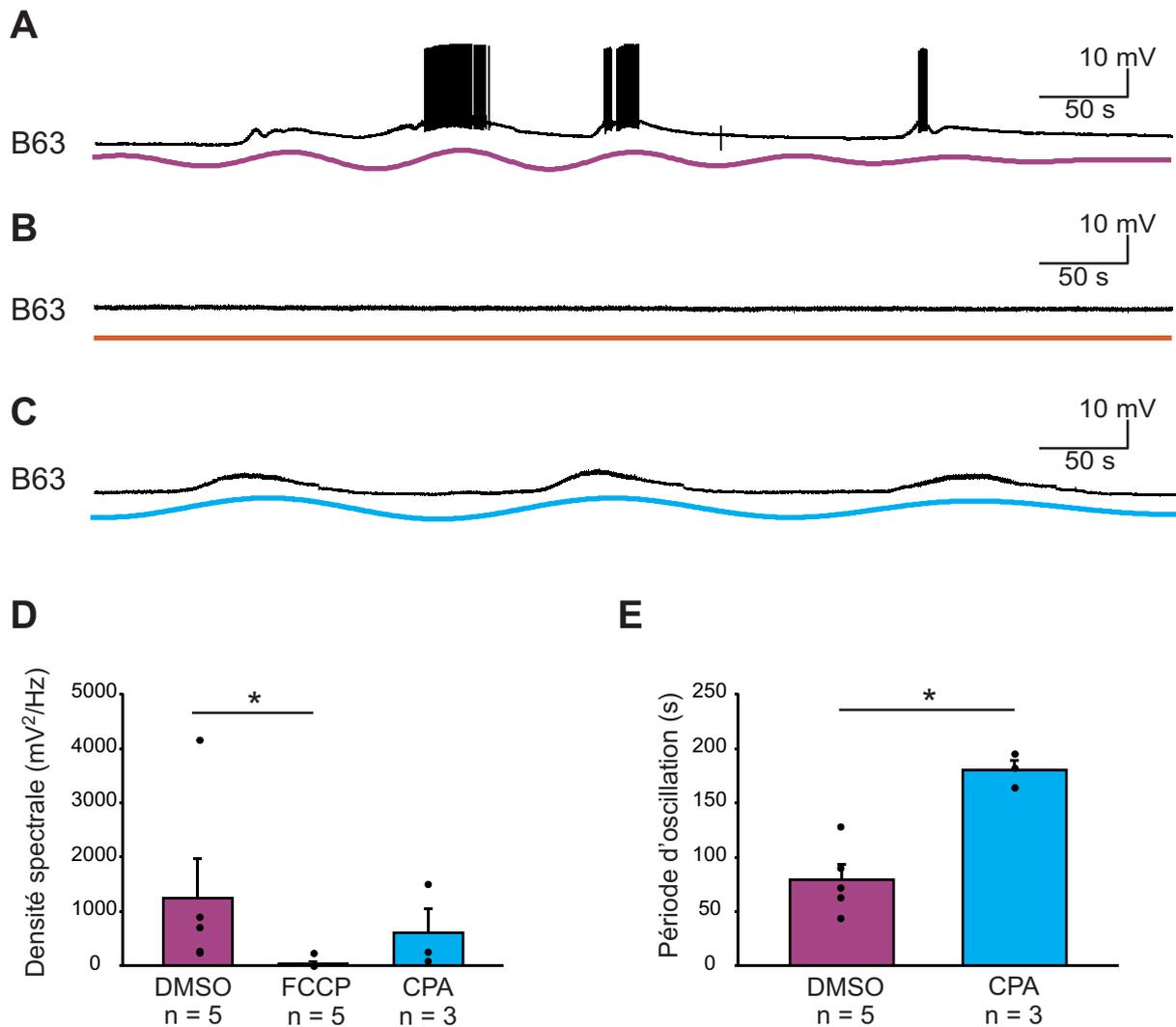
**B.** Quantification de l'amplitude d'oscillation à -60 et -25 mV. \*, p < 0,05.

**C.** Implication des ions Na<sup>+</sup> : la suppression du Na<sup>+</sup> de la solution Bas Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> bloque immédiatement l'oscillation du PM de B63, ce qui indique l'implication d'un flux transmembranaire de Na<sup>+</sup> dans la production de l'oscillation.

**D.** Implication des ions Ca<sup>2+</sup> : la suppression du Ca<sup>2+</sup> de la solution Bas Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> bloque de manière progressive l'oscillation. Cela suggère que le Ca<sup>2+</sup> contribue à l'oscillation mais pas par le seul flux transmembranaire de cet ion.

**E.** Comparaison de la persistance de l'oscillatoire en solution sans Na<sup>+</sup> et sans Ca<sup>2+</sup>.

oscillation de fréquence et d'amplitude similaire à celle décrite précédemment en « Bas  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  » seulement (Figure 24A). En revanche, en présence de FCCP, l'oscillation du PM disparaît complètement (Figure 24B) alors qu'en présence de CPA, l'oscillation persiste mais avec une fréquence modifiée par rapport à la situation témoin (Figure 24C). La comparaison de la densité spectrale entre les trois conditions montre une modification significative en présence de FCCP comparativement à la présence de DMSO seul, mais sans changement entre la condition CPA et la condition DMSO (DMSO :  $1246,53 \pm 732,99 \text{ mV}^2/\text{Hz}$ ,  $n = 5$  ; FCCP :  $18,97 \pm 17,51 \text{ mV}^2/\text{Hz}$ ,  $n = 5$  ; CPA :  $608,33 \pm 444,52 \text{ mV}^2/\text{Hz}$ ,  $n = 3$  ;  $H = 8,70$ ,  $q = 2,76$ ,  $p < 0,05$  ; Figure 24D). En revanche sous CPA, la période d'oscillation est significativement plus élevée comparativement à celle enregistrée en présence de DMSO seul ( $79,4 \pm 14,23 \text{ s}$ ,  $n = 5$ , CPA :  $180,33 \pm 8,99 \text{ s}$ ,  $n = 3$ ,  $U = 0,00$ ,  $p = 0,036$  ; Figure 24E). En raison d'une absence d'oscillation en condition FCCP, la période n'a pu être calculée. Ces résultats indiquent que les organites intracellulaires, par leur rôle dans la régulation calcique intracellulaire contribuent de façon significative à la rythmogenèse du PM du neurone B63.



**Figure 24 : Contribution des stocks calciques intracellulaires dans la genèse de l'oscillation**

**A.** Témoin : enregistrement du PM de B63 dans la solution Bas Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> contenant 0,1 % de DMSO (solvant des drogues utilisées en B et C).

**B.** Enregistrement du PM de B63 en présence de FCCP (20 μM) qui libère le Ca<sup>2+</sup> mitochondrial.

**C.** Enregistrement du PM de B63 en présence de CPA, (20 μM), un inhibiteur de la pompe calcique du RE.

**D.** Comparaison de la densité spectrale (mesure d'amplitude de l'oscillation) dans les 3 conditions décrites ci-dessus. \*, p < 0,05.

**E.** Comparaison de la période d'oscillation en DMSO et CPA (en présence de FCCP, l'oscillation étant inexistante, sa période ne peut pas être déterminée). \*, p < 0,05.

### III. Discussion

Dans cette première partie d'étude, nous avons cherché à déterminer les mécanismes cellulaires à l'origine de l'impulsion spontanée du neurone B63. Nos résultats montrent que l'activité électrique de B63 caractérisée par des variations du PM et l'émission de potentiels de plateau reposent sur une oscillation rythmique du PM de ce neurone. L'émergence de cette oscillation dépend de flux cationiques transmembranaires très majoritairement sodiques. Ces flux transmembranaires seraient dépendants de la dynamique des régulations calciques cytoplasmiques produites par les organites intracellulaires (Figure 25). De manière plus précise, cette étude met en évidence un nouveau mécanisme pacemaker non sensible au voltage, mais dépendant de la dynamique calcique intracellulaire qui concerne une large partie, sinon la totalité d'un réseau neuronal générateur de patterns moteurs. Ce mécanisme cellulaire, à l'origine d'impulsions spontanées, est suffisant pour déclencher l'activité électrique d'un neurone décisionnel qui contribue à l'émission ou non d'un comportement motivé.

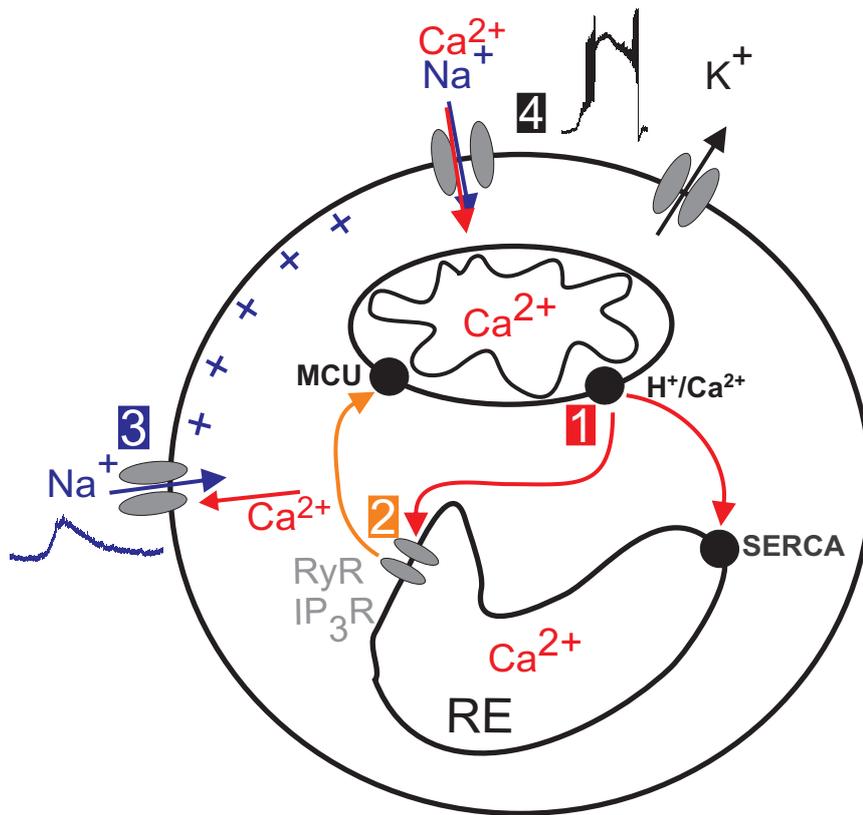
#### 1. Pacemakers neuronaux

Les mécanismes cellulaires responsables d'activités neuronales rythmiques et spontanées résultent des propriétés membranaires intrinsèques des neurones et des relations synaptiques des réseaux (Calabrese & Marder, 1996 ; Selverston et al., 2010). Parmi ces propriétés membranaires, celles de pacemakers, définies comme la capacité d'une membrane cellulaire à se dépolariser spontanément et rythmiquement, jouent un rôle crucial dans l'émergence spontanée des comportements. Dans certains cas, les neurones pacemakers ont été identifiés et leurs propriétés membranaires caractérisées. L'activité rythmique spontanée de la cellule R15 isolée ou non, chez l'Aplysie, a fait l'objet de nombreuses études (Adams & Gage, 1979 ; Adams, 1985 ; Adams & Levitan, 1985 ; Adams & Benson, 1985 ; Canavier et al., 1991). Ces travaux biologiques, appuyés par des modèles mathématiques, ont identifié et analysé la contribution des canaux ioniques et des pompes transmembranaires responsables de la rythmicité. Différents courants ioniques dépolarisants et hyperpolarisants ont été mis en évidence. Les modèles mathématiques montrent que pour générer une activité pacemaker rythmique, seuls les canaux calciques voltage-sensibles et leur inactivation dépendant du  $Ca^{2+}$  intracellulaire sont nécessaires (Canavier et al., 1991). Des résultats similaires ont été obtenus chez les vertébrés. Par exemple, dans les

complexes neuronaux Pré-Bötzinger qui contrôlent l'inspiration rythmique de l'activité respiratoire du tronc cérébral, les propriétés pacemakers des neurones impliquent des canaux voltage-dépendants sous-tendant un courant  $I_{NaP}$  et des canaux activés par le  $Ca^{2+}$  intracellulaire qui produisent un courant dépolarisant  $I_{CAN}$  puis hyperpolarisant  $I_{KCa}$  (Pierrefiche et al., 1995 ; Koshiya et Smith, 1999 ; Chevalier et al., 2016). Dans les réseaux spinaux qui contrôlent la locomotion, on retrouve l'implication de ces mêmes courants associés à des conductances voltages et/ou  $Ca^{2+}$  sensibles (El Manira et al., 1994 ; Darbon et al., 2004 ; Brocard et al., 2013).

L'importance des processus voltage-dépendants dans les activités neuronales pacemakers est démontrée par les modifications de fréquence ou des caractéristiques d'oscillations spontanées qui interviennent en fonction du PM du neurone (Canavier et al., 1991 ; Chevalier et al., 2016). Ainsi, la fréquence d'oscillation augmente avec une dépolarisation tonique du neurone qui active les canaux voltage-sensibles, et diminue ou s'annihile avec une hyperpolarisation membranaire qui inactive ces mêmes canaux voltage-dépendants (Miller & Selverston, 1982 ; Chevalier et al., 2016). Ces activités pacemakers impliquent la plupart du temps l'activation voltage-dépendante de canaux calciques et sont accompagnées d'oscillations calciques intracellulaires qui sont l'image, et non le processus générateur, de l'oscillation électrique (Koshiya et Smith, 1999 ; Darbon et al., 2002). Par conséquent, dans ces types de neurones pacemakers les variations expérimentales du PM, et non celles de la dynamique calcique intracellulaire, induisent des modifications de fréquences d'oscillation.

L'activité électrique de B63 est caractérisée par une oscillation spontanée et régulière de son PM. Cependant, contrairement aux neurones pacemakers décrits précédemment, l'oscillation du PM ne dépend pas de processus voltage-dépendants car les variations expérimentales du PM sont inefficaces pour modifier la fréquence ou les caractéristiques temporelles de l'oscillation. Néanmoins, cette observation n'exclut pas l'existence de canaux voltage-dépendants chez B63, mais leur contribution comme éléments générateurs de l'oscillation enregistrée dans cette étude serait minime. Parmi les mécanismes non voltage-dépendants de production d'une oscillation spontanée du potentiel membranaire, il existe des pompes ioniques transmembranaires telle que la Na/K ATPase (Johnson et al., 1992 ; Darbon et al., 2003 ; Jasinski et al., 2013). Cette pompe électrogène hyperpolarisante produit une oscillation par interruption régulière des neurones dépolarisés et actifs en les ramenant à leur potentiel de repos. Cependant, chez le neurone B63, l'oscillation est observée à des potentiels très négatifs, même inférieurs au potentiel de repos. Par conséquent, si la pompe Na/K ATPase pouvait contribuer à la phase de repolarisation de l'oscillation de B63, elle ne peut pas en expliquer la phase de dépolarisation rythmique.



**Figure 25 : Schéma hypothétique de l'oscillation pacemaker de B63**

Les propriétés pacemaker résultent de la dynamique calcique intracellulaire qui est produite par l'interaction fonctionnelle de deux organites, la mitochondrie (1) et le réticulum (2). Les variations de concentration calcique intracellulaire ont pour conséquence l'activation/fermeture d'un canal transmembranaire sodique, calcium-dépendant (3) qui est à l'origine de la dépolarisation/repolarisation cellulaire (+). Cette dépolarisation peut éventuellement déclencher la production d'un potentiel de plateau (4).

La mitochondrie libère du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol par des échangeurs  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$  (1) et stocke du  $\text{Ca}^{2+}$  grâce à son unipore calcique (MCU). De même, le RE libère du  $\text{Ca}^{2+}$  par ses récepteurs Ryanodine et ses récepteurs à  $\text{IP}_3$  (RyR/ $\text{IP}_3$ ) et stocke le  $\text{Ca}^{2+}$  grâce à sa pompe calcique ATP-dépendante (SERCA). Un mécanisme de libération de  $\text{Ca}^{2+}$  induit par le  $\text{Ca}^{2+}$  (CICR) impliquant le récepteur RyR et/ou  $\text{IP}_3$  (2) peut permettre de coupler la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  des deux organites provoquant une forte augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. Par conséquent, d'une part, le canal transmembranaire sodique calcium-dépendant est activé et produit la phase dépolarisante de l'oscillation ; d'autre part l'activation des mécanismes de pompage du  $\text{Ca}^{2+}$  par les organites produit la phase repolarisante de l'oscillation. Des couplages énergétiques impliquant la production d'ATP par la mitochondrie et le fonctionnement de la SERCA pourraient également contribuer à la dynamique de la concentration calcique intracellulaire.

## 2. Oscillations calciques intracellulaires

Nos données sont en accord avec l'hypothèse que la dynamique calcique intracellulaire joue un rôle déterminant dans le processus spontané générateur de l'oscillation du PM de B63. En effet, des perturbations du fonctionnement des organites de stockage intracellulaire du  $\text{Ca}^{2+}$ , ou l'élimination du  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire modifient ou suppriment l'oscillation. Dans de nombreuses cellules neuronales, ou non neuronales, aussi bien chez les vertébrés que chez les invertébrés, des oscillations calciques ont déjà été observées. Ces oscillations calciques peuvent avoir pour origine des phénomènes voltage-dépendants, tels que décrits ci-dessus, ou des stimulations mécaniques ou chimiques dans l'environnement extracellulaire (Thorn et al., 1993 ; MacDonald & Rorsman, 2006 ; Lewis et al., 2017). Cependant, dans certains cas, ces oscillations peuvent être spontanées et être observées dans des cellules isolées (Gu et al., 1994 ; Teresawa et al., 1999 ; Kortus et al., 2016). Il est particulièrement intéressant de noter que ces oscillations calciques spontanées ont également été enregistrées dans des cellules non excitables, telles que les chondrocytes des cartilages ce qui disqualifie une possible contribution de canaux membranaires voltage-dépendants (Zhou et al., 2019).

L'origine des oscillations calciques spontanées, non voltage-dépendantes, reste encore aujourd'hui mal connue d'autant que selon les diverses fréquences d'oscillations enregistrées différents mécanismes pourraient être impliqués (Sneyd et al., 2017). Néanmoins, certaines constantes émergent : les oscillations calciques spontanées sont sensibles à la présence du  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire et au bon fonctionnement du RE (Berridge, 1998 ; Wegierski et al., 2018). Il est important de souligner que la membrane de cet organite avec ses protéines, comme la membrane plasmique avec ses canaux voltage-dépendants, peut produire des phénomènes régénératifs nécessaires aux oscillations. Ainsi, une boucle rétroactive positive induit une augmentation de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. Elle implique l'ouverture des récepteurs canaux ryanodine (RyR) et/ou à inositol tri-phosphate ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) du réticulum avec pour conséquence l'activation de canaux membranaires cationiques (« Stores-Operated Channels », SOC) afin de remplir les stocks intracellulaires de  $\text{Ca}^{2+}$ . En retour, l'augmentation de l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique stimule les récepteurs du RE avec pour conséquence une amplification de la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  par le RE : c'est le mécanisme de « Calcium-Induced Calcium Release » (CICR). L'élévation du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique va déclencher une boucle rétroactive négative impliquant son évacuation par l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  membranaire et la recapture de l'ion dans le réticulum grâce à la pompe SERCA. Ces mécanismes de libération/recapture du  $\text{Ca}^{2+}$  conduisent à une oscillation de la concentration calcique intracellulaire. Des données récentes montrent que la mitochondrie par l'extrusion

de son  $\text{Ca}^{2+}$  grâce à un échangeur cationique et par sa recapture via son unipore calcique (MCU) peut également contribuer aux oscillations calciques dans des zones cellulaires fortement concentrées en  $\text{Ca}^{2+}$  (Hajnoczky et al., 1995 ; Kirichok et al., 2004, Takeuchi et al., 2015, Pathak & Trebak, 2018 ). Il est intéressant de noter que des résultats expérimentaux montrent qu'une oscillation calcique spontanée peut également être produite par les échanges calciques et/ou énergétiques, via l'ATP, entre les mitochondries et le RE (Ishii et al., 2006 ; Jackson & Thayer, 2006 ; López-Crisosto et al., 2015).

Chez l'Aplysie, des travaux ont déjà montré qu'un CICR initié par les mitochondries et interagissant avec le RE peut être impliqué dans la dépolarisation de cellules neuroendocrines lors du comportement de ponte (Kachoei et al., 2006, Geiger & Magoski, 2008, Groten et al., 2013). Cependant, ce mécanisme est transitoire et est induit par une brève dépolarisation initiale. Nos travaux montrent pour la première fois que le RE et les mitochondries, par des échanges calciques et/ou énergétiques, contribuent à un processus pacemaker spontané et rythmique dans un réseau générateur de pattern moteur (Figure 25). Dans ce processus, les mitochondries sont nécessaires et suffisantes à la genèse de l'oscillation puisque leur dysfonctionnement empêche toute oscillation. Le RE semble en revanche déterminer la fréquence de l'oscillation. Ces oscillations calciques intracellulaires pourraient se traduire par des oscillations du PM grâce à des canaux cationiques membranaires non voltage-dépendants et sensibles au  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. L'existence de tels canaux ont déjà été identifiés chez l'Aplysie (Kramer & Zucker, 1985).

### 3. Oscillations calciques intercellulaires

Les oscillations calciques ne sont pas seulement des phénomènes locaux. Elles peuvent se propager à l'intérieur d'un neurone le long de son RE, du corps cellulaire à l'axone, mais également d'un neurone à l'autre dans un réseau neuronal sous forme de vagues calciques (Leybaert & Sanderson, 2012). Ce mécanisme a été décrit pour la première fois dans les ovocytes de Xénopes (Parker & Yao, 1991). La propagation intracellulaire implique l'activation en chaîne des récepteurs  $\text{IP}_3$  adjacents le long du RE, les RyR jouant un rôle d'amplification du signal calcique par le mécanisme de CICR (Hernandez-Cruz et al., 1997). La continuité de la vague calcique est donc dépendante de la disponibilité en  $\text{IP}_3$  dans le cytosol et de la distribution géographique des  $\text{IP}_3\text{R}$  à la surface du RE (Ross, 2012). Quant à la propagation intercellulaire, elle implique les connexons qui forment les gap junction, responsables des couplages électriques entre les neurones

(Benninger et al., 2008 ; Leybaert & Sanderson, 2012). Ces canaux permettent des échanges cytoplasmiques entre différentes cellules et sont notamment perméables au  $\text{Ca}^{2+}$  et à l' $\text{IP}_3$ . Il est considéré qu'en raison des processus de tamponnage du  $\text{Ca}^{2+}$  par les protéines intracellulaires, la diffusion de cet ion est limitée en comparaison à celle de l' $\text{IP}_3$ . Ainsi, ce serait essentiellement par une diffusion intercellulaire d' $\text{IP}_3$  et du mécanisme d'activation en chaîne des récepteurs  $\text{IP}_3$  et des RyR décrit ci-dessus que pourrait se faire la propagation des vagues calciques d'une cellule à l'autre. En plus de cette propagation de cytoplasme à cytoplasme, un mécanisme paracrine impliquant la libération extracellulaire d'ATP (par voie vésiculaire ou non) et l'activation des récepteurs membranaires à l'ATP couplés aux protéines G, peut induire une production d' $\text{IP}_3$  intracellulaire dans des cellules adjacentes et ainsi propager une vague calcique (Newman & Zahs, 1997 ; Giaume & Venance, 1998 ; Scemes & Giaume, 2006).

Dans le cas du neurone B63, on notera que l'utilisation de la solution « Bas  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  » pourrait favoriser l'amplitude et/ou la propagation de l'oscillation calcique dans le réseau neuronal buccal. En effet, il est établi que la perméabilité des connexons est d'autant plus grande que la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire est faible (Peracchia, 2004). Cette solution pourrait donc favoriser la perméabilité à l' $\text{IP}_3$  et ainsi rendre compte de l'augmentation d'amplitude et de la propagation de l'oscillation en milieu appauvri en  $\text{Ca}^{2+}$  comparativement au milieu physiologique. Cette perméabilité accrue pourrait expliquer que l'oscillation soit observée entre des neurones qui n'ont pas de couplage électrique direct (tels que B63 et B64) mais qui impliqueraient un ou des neurone(s) intermédiaire(s).

Par ailleurs, nos travaux ne permettent pas de dire si B63 est le neurone générateur de l'oscillation calcique ensuite propagée aux autres neurones, s'il n'est qu'un intermédiaire, ou si cette oscillation est l'émanation collective d'un réseau de neurones couplés. Des travaux de simulation numérique montrent qu'une oscillation électrique d'un PM peut être une propriété émergente d'un réseau de neurones couplés électriquement, sans faire intervenir des processus biochimiques (Sherman & Rinzel, 1992 ; Traub & Bibbig, 2000). Néanmoins, on notera que dans ce dernier cas, les fréquences d'oscillations générées sont bien supérieures à celle observée dans B63, laquelle est compatible avec les processus biochimiques décrits plus haut. En outre, la prévalence de l'amplitude de l'oscillation chez B63 comparativement à ses partenaires dont les dimensions et les résistances membranaires sont équivalentes, laisse supposer que B63, seul neurone nécessaire et suffisant au déclenchement de l'activité du réseau buccal, pourrait être le générateur initial de l'oscillation enregistrée dans le réseau.

#### 4. De l'oscillation à la prise de décision

Une caractéristique de l'expression des cycles radulaires lors du comportement de recherche de nourriture est leur variabilité d'émission dans le temps. Cette variabilité est essentielle pour l'efficacité d'un comportement exploratoire. On peut alors s'étonner que l'activité du neurone décisionnel B63, unique neurone de commande nécessaire et suffisant pour « décider » spontanément des moments de production des cycles de mouvements radulaires, soit gouvernée par une oscillation périodique.

Les travaux présentés dans ce chapitre se sont intéressés à la structure temporelle de l'oscillation du neurone B63, mais pas aux causes de la variation de l'amplitude. Cependant, comme cela est décrit en Figure 16, si la structure temporelle de cette impulsion est régulière, en revanche l'amplitude est extrêmement variable d'un cycle à l'autre. Or, l'amplitude de l'impulsion est déterminante dans le processus de déclenchement voltage-dépendant des potentiels de plateau de B63 et donc des PMR. Donc, le mécanisme décisionnel qui détermine la genèse ou non d'un PMR trouve son origine non pas dans la périodicité de l'impulsion, mais dans ses variations d'amplitude. Bien que nous n'ayons pas étudié ce paramètre dans cette thèse, des travaux antérieurs suggèrent que la force des couplages électriques entre B63 et ses partenaires du réseau générateur du PMR pourrait jouer un rôle crucial dans ces variations. En effet, il a été montré qu'un apprentissage par récompense transforme l'émission temporelle irrégulière des cycles radulaires en une émission rythmique, périodique et régulière (Nargeot et al., 2007 ; voir aussi Chapitre 3) qui se retrouve sur des préparations de ganglions buccaux isolés (Nargeot et al., 2007, 2009). Qui plus est, cette rythmicité acquise après apprentissage résulte d'un accroissement de la force des synapses électriques entre B63 et ses partenaires (Sieling et al., 2014). On peut donc penser que l'émission irrégulière des PMR due à l'activité variable de B63 proviendrait d'une absence de coordination des dépolarisations membranaires individuelles des neurones couplés avec B63. Chaque cellule produit ses propres potentiels de plateau et/ou bouffées de PA grâce à ses propriétés membranaires intrinsèques. A travers les couplages électriques, ces dépolarisations individuelles peuvent se répercuter, cycle par cycle, sur l'amplitude de l'oscillation de B63, qui devient imprévisible et ainsi favorise l'expression d'une motricité variable. Inversement, l'augmentation des couplages électriques entre les neurones par une hausse de la synchronisation des dépolarisations neuronales individuelles pourrait être à l'origine de la réduction de la variabilité d'amplitude des dépolarisations dans B63 et favoriser l'expression d'une motricité rythmique.

Il est particulièrement intéressant de noter l'étroite relation qui se dessine entre l'expression variable d'un comportement motivé, dépendant de processus décisionnels, et

l'expression régulière d'un comportement rythmique, automatique (Nargeot & Simmers, 2012). Ces deux modes de production des comportements (décision/automatisme) pourraient avoir une base cellulaire commune dépendante en partie du fonctionnement spontané et oscillant du système nerveux central. Sur cette base rythmique commune, la distinction entre les deux modes d'émission du comportement pourrait résulter d'une plus ou moins grande liberté des neurones pacemakers individuels à coordonner leur activité électrique entre eux et/ou avec leurs partenaires du réseau générateur des patterns moteurs.

## Chapitre 2 : Modulation des propriétés oscillatoires d'un neurone décisionnel

### I. Introduction

Les transmetteurs monoaminergiques jouent des rôles fondamentaux dans l'expression et l'adaptation des comportements chez les invertébrés et les vertébrés. Ces transmetteurs chimiques du système nerveux central, dont la DA et la 5-HT, sont hautement conservés dans le phylum animal. Ils contribuent à la régulation de fonctions physiologiques essentielles telles que l'éveil, la motivation, les systèmes de récompense/punition, la genèse de l'activité motrice. Ils participent également à la formation de mémoires au cours des apprentissages (Giurfa & Sandoz, 2012 ; Schulz, 1998, 2000 ; Wise, 2013). Ces monoamines sont impliquées dans la production et la modification de divers comportements comme les comportements motivés et les comportements rythmiques ou automatiques. Au niveau cellulaire, ces transmetteurs ont été décrits pour leurs actions sur les propriétés synaptiques, l'excitabilité cellulaire, et les propriétés pacemakers ou oscillatoires des neurones (Lotshaw & Levitan, 1987 ; Lechner et al., 1996 ; Harris-Warrick, 2011). Pour chaque monoamine, la diversité des récepteurs membranaires permet de produire des effets cellulaires et/ou synaptiques qui peuvent être facilitateurs et/ou inhibiteurs.

Les neurones sérotoninergiques sont impliqués dans les processus décisionnels qui gouvernent l'induction de la nage rythmique chez *Tritonia*. Leur activité induit la transition d'un état comportemental inactif à un comportement de fuite formé de flexions répétées du corps de l'animal. La 5-HT et la DA interviennent également dans la modulation des comportements rythmiques tels que la locomotion, la respiration et la mastication (Svensson et al., 2003 ; Barrière et al., 2004 ; Jordan & Slavinska, 2011 ; Sharples et al., 2015). L'action des monoamines, en particulier dans ces comportements rythmiques, implique la modulation des propriétés membranaires endogènes en agissant sur l'excitabilité, les propriétés de plateau et les propriétés de pacemaker. Ainsi, il a été montré que l'action de la 5-HT et/ou de la DA s'exerce sur les canaux voltage-dépendants responsables des courants  $I_h$ ,  $I_{NaP}$ ,  $I_A$ ,  $I_{KCa}$  qui contribuent aux propriétés oscillatoires ou aux propriétés de plateau des neurones (Gasparini & DiFrancesco, 1999 ; Goreleva et al., 2000 ; Placantonakis et al., 2000 ; Liu et al., 2003 ; Tanaka & Chandler, 2006). En fonction des récepteurs membranaires des différents neurones cibles d'un même réseau, une même monoamine peut avoir des effets

différentiels sur leurs propriétés membranaires et sur les canaux ioniques associés (Harris-Warrick et al., 1995 ; Kloppenburg et al., 1999 ; Peck et al., 2001). Alternativement, sur un même neurone, différentes monoamines peuvent avoir des effets opposés ou complémentaires (Harris-Warrick & Flamm, 1987 ; Kabotyanski et al., 2000).

En plus de leur action sur les canaux membranaires, la DA et la 5-HT sont aptes à déclencher ou réguler des oscillations calciques intracellulaires. La 5-HT induit des oscillations calciques par mobilisation des stocks intracellulaires dans les cellules des glandes salivaires chez le diptère (Zimmermann & Walz, 1997) et dans les plaquettes sanguines chez le rat (Nishio et al., 1991). De même, la DA induit des oscillations calciques impliquant les stocks intracellulaires chez le neurone pacemaker du réseau pylorique responsable d'une motricité stomacale rythmique chez le homard (Kadiri et al., 2011). Le rôle régulateur, plutôt qu'inducteur, des monoamines sur les oscillations calciques a également été montré sur différents types cellulaires. La 5-HT régule l'activité pacemaker dépendante d'oscillations calciques spontanées dans les cellules de Cajal à l'origine des mouvements péristaltiques intestinaux (Liu et al., 2011, 2018). Cet effet se fait en couplage avec l'action de la DA qui entretient ces oscillations (Liu et al., 2018). La contribution de la DA dans la régulation d'oscillation calcique a également été mise en évidence dans les cellules  $\beta$  du pancréas et la libération pulsatile et rythmique de l'insuline (Ustione & Piston, 2012).

Chez l'aplysie, des marquages par histo- ou immunofluorescence ont montré la présence de 5-HT et de DA dans le système nerveux central. Les neurones 5-HT sont présents dans les ganglions cérébroïdes, les ganglions pleuraux et les ganglions abdominaux (Kupfermann et al., 1979 ; Wright et al., 1995 ; Marinesco et al., 2004). Bien qu'aucun corps cellulaire 5-HT ne soit observé dans les ganglions buccaux, ceux-ci reçoivent de nombreuses terminaisons synaptiques sérotoninergiques venant du ganglion cérébroïde et de la paroi postérieure de la masse buccale et de l'œsophage (Kupfermann et al., 1979 ; Martinez-Rubio et al., 2009). Des corps cellulaires de neurones dopaminergiques ont été identifiés dans le ganglion buccal (Teyke et al., 1993 ; Kabotyanski et al., 1998). Ce dernier reçoit également des synapses dopaminergiques venant de la paroi postérieure de la masse buccale par l'intermédiaire des nerfs œsophagiens (Martinez-Rubio et al., 2009).

La 5-HT participe à la vigilance chez l'Aplysie. En effet, des dosages hémolymphatiques de la 5-HT circulante mettent en évidence une variation de sa concentration en fonction du cycle veille-sommeil (Levenson et al., 1999). De plus, les neurones 5-HT cérébroïdes qui envoient leur axone dans les ganglions buccaux et sur la masse buccale participent à la phase appétitive du comportement alimentaire. Leur activité augmente en présence de nourriture, puis diminue avec l'état de satiété (Weiss et al., 1978 ;

Rosen et al., 1989 ; Alexeeva et al., 1998). Enfin, la 5-HT est libérée en réaction à un stress produit par l'application de chocs électriques nociceptifs sur le corps de l'animal (Marinesco et al., 2004).

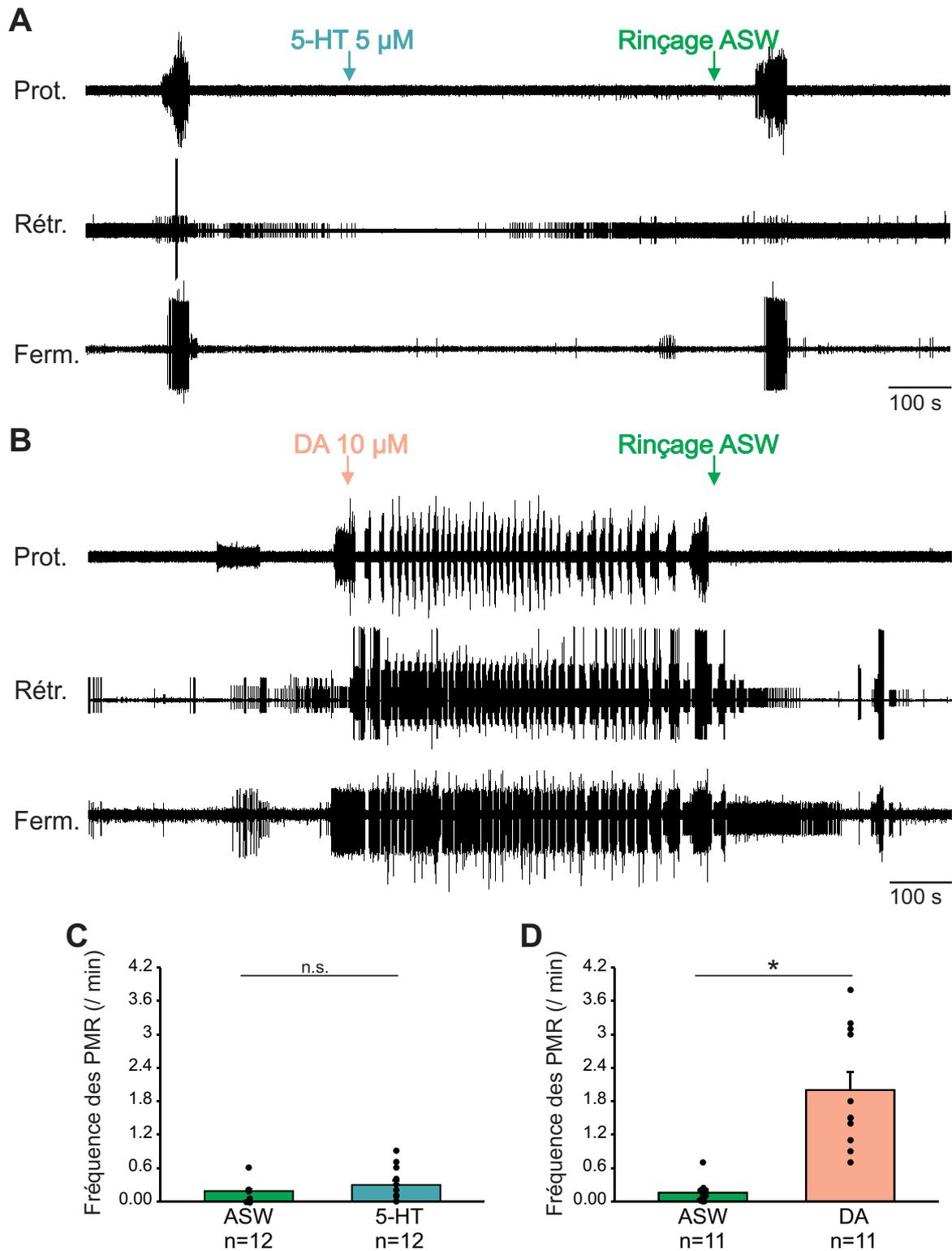
La DA chez l'aplysie est connue pour son implication dans les processus de récompenses, comme chez les vertébrés. Les récompenses alimentaires utilisées dans les apprentissages associatifs activent les afférences œsophagiennes monoaminergiques (Brembs et al., 2002). Inversement, la section de ces afférences prévient les apprentissages par récompense (Schwarz & Susswein, 1986 ; Lechner et al., 2000). Enfin, un conditionnement opérant appétitif peut être reproduit en remplaçant la récompense alimentaire par la stimulation électrique de ces afférences œsophagiennes monoaminergiques (Brembs et al., 2002). Des résultats similaires sont obtenus par stimulation électrique de ces mêmes afférences sur des ganglions buccaux *in vitro*. En revanche, l'induction des modifications motrices par ces analogues *in vitro* de l'apprentissage appétitif est bloquée en présence d'antagonistes dopaminergiques (Nargeot et al., 1999 ; Reyes et al., 2005 ; Bédécarrats et al., 2013). Concernant les afférences dopaminergiques, il a été montré qu'elles effectuent des connexions monosynaptiques avec les neurones décisionnels du réseau buccal dont le neurone pacemaker B63.

Les modifications motrices du comportement de recherche de nourriture induites par les apprentissages appétitifs, ou leurs équivalents *in vitro* produits par la stimulation électrique des afférences monoaminergiques, sont caractérisées par une augmentation de la fréquence et la régularité d'émission des PMR. On peut donc se demander si la 5-HT et/ou la DA peuvent exercer des actions modulatrices sur l'oscillation du PM du neurone décisionnel B63 qui est à l'origine de l'impulsion spontanée de la motricité radulaire. Dans ce chapitre, nous analysons donc l'effet de ces amines sur l'émission des PMR et l'oscillation endogène de B63.

## II. Résultats

### 1. Effets de la 5-HT et de la DA sur le fonctionnement spontané du CPG

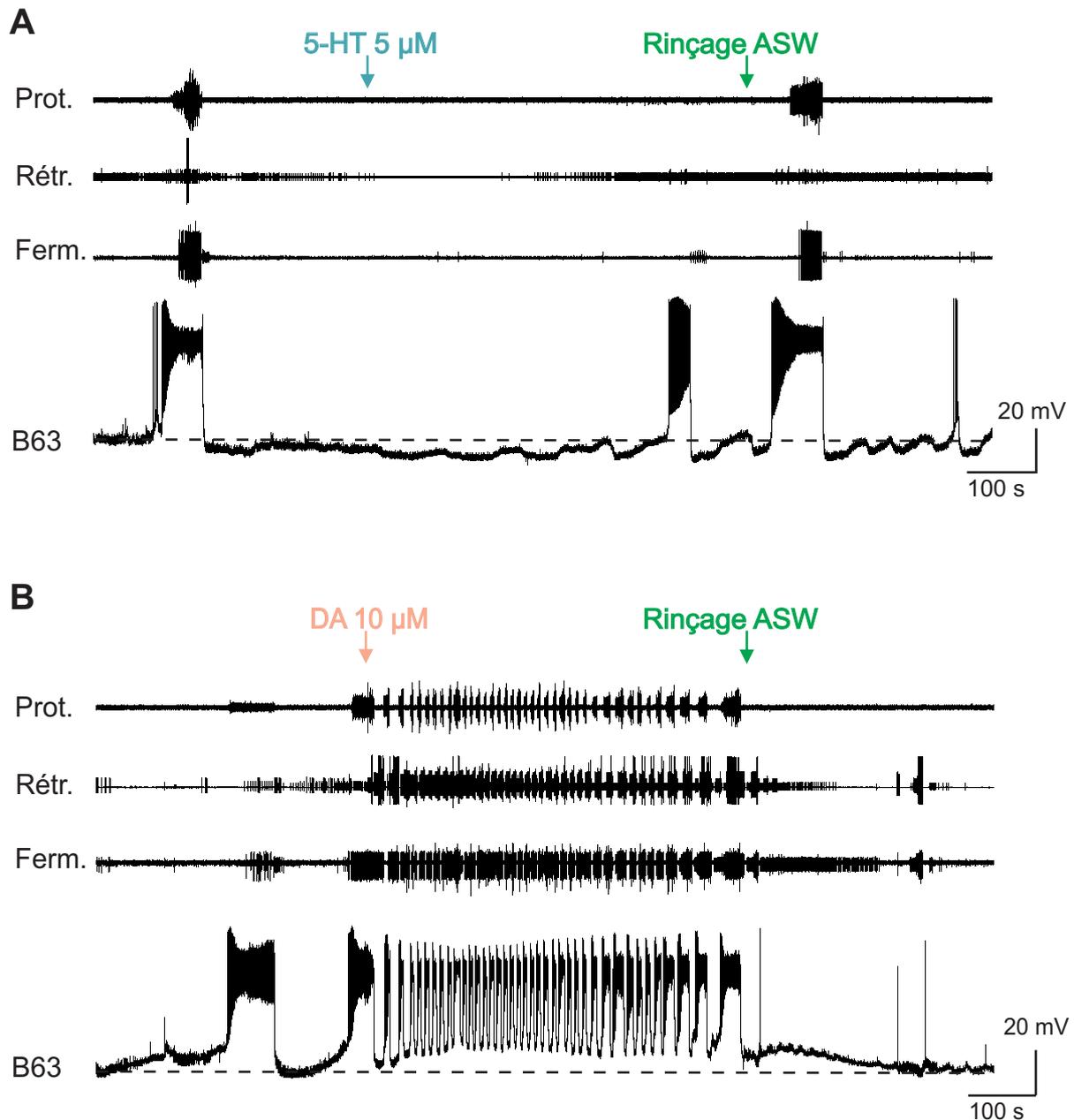
Afin d'étudier les effets de la 5-HT et de la DA sur la genèse des PMR, ces monoamines ont été appliquées sur deux groupes de ganglions buccaux isolés *in vitro* (Figure 26A, B). La fréquence des PMR a été quantifiée pendant 10 min avant l'application des monoamines (condition contrôle ASW) et pendant une période de 10 min lors de leur application (condition 5-HT ou DA dans l'ASW). La présence de 5-HT ne modifie pas la fréquence d'émission des PMR (ASW :  $0,19 \pm 0,042$  / min,  $n = 12$  ; 5-HT :  $0,029 \pm 0,06$  / min,  $n = 12$ ,  $W = 32,00$ ,  $p > 0,05$  ; Figures 26A, C). Cependant elle est significativement augmentée en présence de DA (ASW :  $0,16 \pm 0,084$  / min,  $n = 11$  ; DA :  $1,98 \pm 0,35$  / min,  $n = 11$ ,  $W = 66,00$ ,  $p < 0,001$  ; Figures 26B, D). Ces données indiquent que la DA, mais pas la 5-HT, module de manière excitatrice le fonctionnement du réseau générateur des patterns moteurs. Afin de mieux comprendre l'action de ces modulateurs à l'échelle cellulaire, des enregistrements intracellulaires du neurone décisionnel B63 simultanés à des enregistrements extracellulaires des PMR ont été effectués en condition 5-HT et en condition DA (Figures 27A, B). Dans la condition 5-HT, alors que l'émission des PMR n'est pas modifiée, l'activité du neurone B63 semble toutefois subir des changements. En effet, l'oscillation de son PM s'amplifie considérablement et devient parfois capable de produire des bouffées de PA qui ne sont pas toujours suffisantes pour déclencher des PMR (Figure 27A). Ce phénomène pourrait s'expliquer par une diminution de l'efficacité synaptique de B63, ou d'autres neurones du réseau, sur les motoneurones radulaires. Quant à l'application de la DA, elle produit une forte augmentation de l'activité électrique du neurone B63. Cela se traduit par la production de nombreuses bouffées de PA dont chacune induit la genèse d'un PMR (Figure 27B). La DA a donc un puissant effet excitateur non seulement sur le neurone pacemaker B63 mais aussi sur la production des patterns moteurs. Ainsi, l'ensemble de ces résultats montrent que ces deux monoamines ont une action modulatrice distincte sur l'activité électrique du neurone pacemaker B63 et sur l'émission des patterns moteurs.



**Figure 26 : Effets de la 5-HT et de la DA sur l'émission des PMR**

**A-B.** Enregistrements extracellulaires des PMR en 5-HT (A) et en DA (B).

**C-D.** Comparaison de la fréquence d'émission des PMR avant et pendant la perfusion de 5-HT (C) et de DA (D). La 5-HT ne produit pas de modification significative (n.s.) de l'activité motrice tandis que la DA induit une forte augmentation de cette activité (\* $p < 0,05$ ).



**Figure 27 : Effets de la 5-HT et de la DA sur l'activité électrique du neurone décisionnel B63**

**A.** Enregistrements simultanés des PMR et du PM du neurone B63 au cours d'une application de 5-HT. Ce transmetteur modulateur induit une hyperpolarisation (ligne en pointillée) suivie d'une oscillation du PM qui peut induire des bouffées de PA, mais qui ne se traduisent pas nécessairement par la production de PMR.

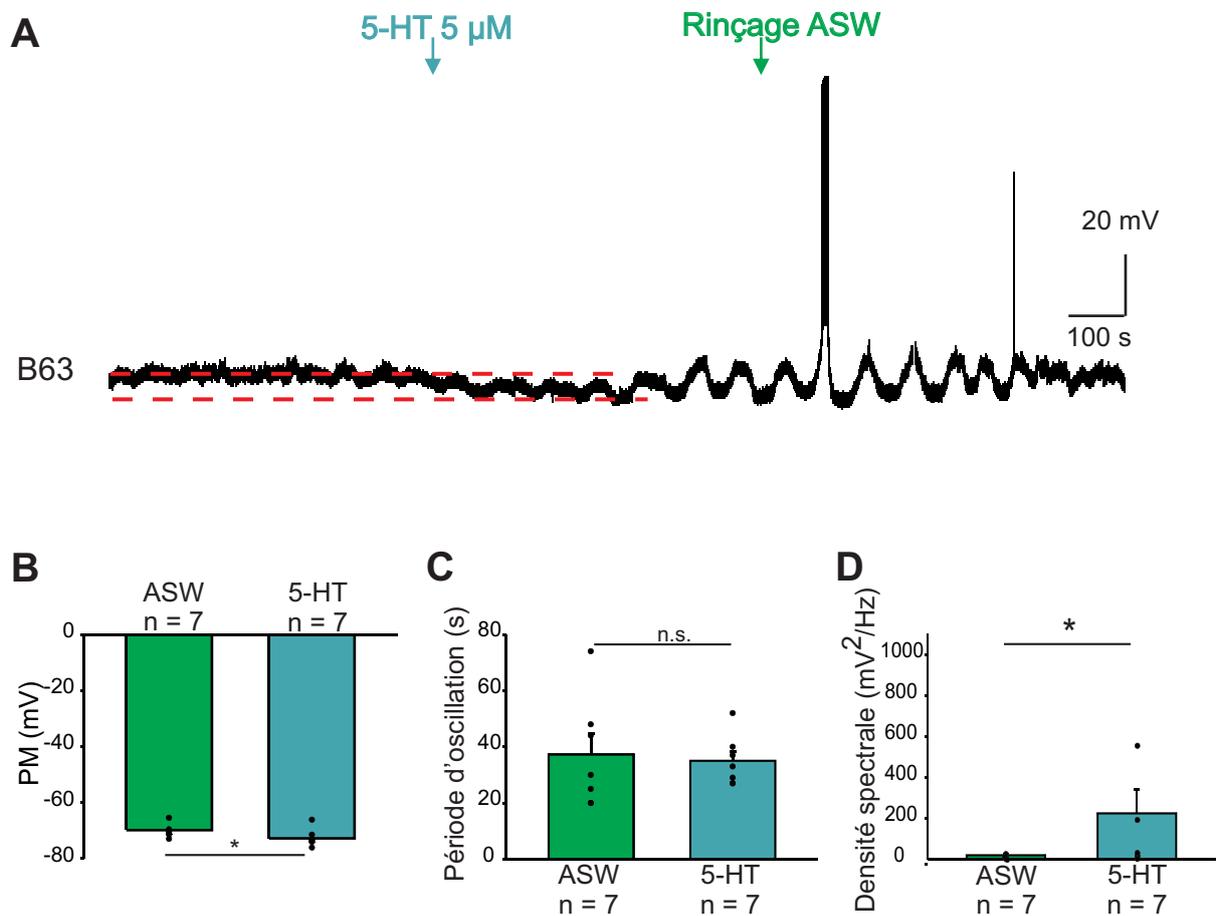
**B.** Enregistrements simultanés des PMR et du PM de B63 en présence de DA. Ce neuromodulateur produit une forte accélération de la fréquence des bouffées de PA de B63 associées à la production de PMR.

## 2. Effets de la 5-HT sur l'impulsion spontanée caractérisée par l'oscillation du PM de B63

Le neurone décisionnel B63 est une cellule pacemaker dont le mécanisme d'impulsion spontanée s'exprime par la production irrégulière de potentiels de plateau. Cela dépend d'une oscillation rythmique de son PM. L'effet de la 5-HT sur l'oscillation du PM de B63 a été enregistré sur des ganglions buccaux isolés et perfusés en solution physiologique (ASW ; Figure 28A). Dans cette condition, les enregistrements intracellulaires de B63 mettent en évidence que la 5-HT modifie le PM du neurone de différentes manières. Dans un premier temps, l'amine induit une hyperpolarisation membranaire, dans un second temps une émergence ou une amplification d'une oscillation du PM.

Ces réponses cellulaires en solution ASW ont été quantifiées et comparées sans/avant perfusion de 5-HT et sous perfusion de 5  $\mu\text{M}$  de 5-HT (Figure 28B). Nos données montrent une hyperpolarisation de la membrane en présence de 5-HT comparativement à avant (ASW :  $-70,54 \pm 1,31$  mV,  $n = 7$  ; 5-HT :  $-74,35 \pm 1,74$  mV,  $n = 7$ ,  $W = 21,00$ ,  $p = 0,031$  ; Figure 28C). Les caractéristiques de l'oscillation du PM (période et amplitude) ont également été examinées par analyse spectrale sur des périodes d'enregistrement de 300 s. Comme dans le chapitre 1, afin de ne considérer dans cette analyse que l'oscillation du PM et non les potentiels de plateau, seuls les enregistrements avec des plages de temps de 300 s sans les potentiels de plateau ont été considérés. La comparaison de la période d'oscillation en ASW avec celle en perfusion de 5-HT n'est pas modifiée (ASW :  $37,29 \pm 7,42$  s,  $n = 7$  ; 5-HT :  $35,00 \pm 3,40$  s,  $n = 7$ ,  $W = -1,00$ ,  $p > 0,05$  ; Figure 28C). En revanche, l'amplitude de cette oscillation est significativement plus élevée après l'application de 5-HT qu'en ASW (ASW :  $20,71 \pm 11,68$  mV<sup>2</sup>/Hz,  $n = 7$  ; 5-HT :  $225,06 \pm 118,22$  mV<sup>2</sup>/Hz,  $n = 7$ ,  $W = 26,00$ ,  $p = 0,031$  ; Figure 28D). Ainsi, ces résultats montrent que la 5-HT produit deux effets distincts sur le PM de B63, une hyperpolarisation et une oscillation du PM. Afin de déterminer si ces deux effets peuvent être dissociés de façon dose-dépendante, le PM de B63 a été enregistré au cours de la perfusion de concentrations de 5-HT allant de 0,1  $\mu\text{M}$  à 10  $\mu\text{M}$  (0,1  $\mu\text{M}$  ; 0,2  $\mu\text{M}$  ; 0,5  $\mu\text{M}$  ; 1  $\mu\text{M}$  ; 2  $\mu\text{M}$  ; 5  $\mu\text{M}$  ; 10  $\mu\text{M}$ ). Aucune de ces 7 concentrations n'a permis de dissocier les deux réponses de B63.

L'aplysie possède plusieurs récepteurs sérotoninergiques et voies de signalisation intracellulaire au travers desquelles la 5-HT peut exercer son action modulatrice. Parmi ces récepteurs, il existe un analogue des récepteurs 5-HT<sub>2</sub>, capable de stimuler l'activité de la PLC et de mobiliser le Ca<sup>2+</sup> intracellulaire (Li et al., 1995 ; Dumitriu et al., 2006). Afin de savoir si la 5-HT agit sur le PM de B63 par l'intermédiaire de ces récepteurs, un antagoniste spécifique, la spipérone (50  $\mu\text{M}$ ), a été appliqué en combinaison avec la 5-HT sur des



**Figure 28 : Quantification des effets de la 5-HT sur B63**

**A.** Enregistrement intracellulaire du PM de B63.

**B.** Quantification de l'hyperpolarisation membranaire sans et avec 5-HT (voir A).

**C.** Quantification par analyse spectrale de la période d'oscillation du PM avant et pendant l'application de 5-HT (n.s., non significatif).

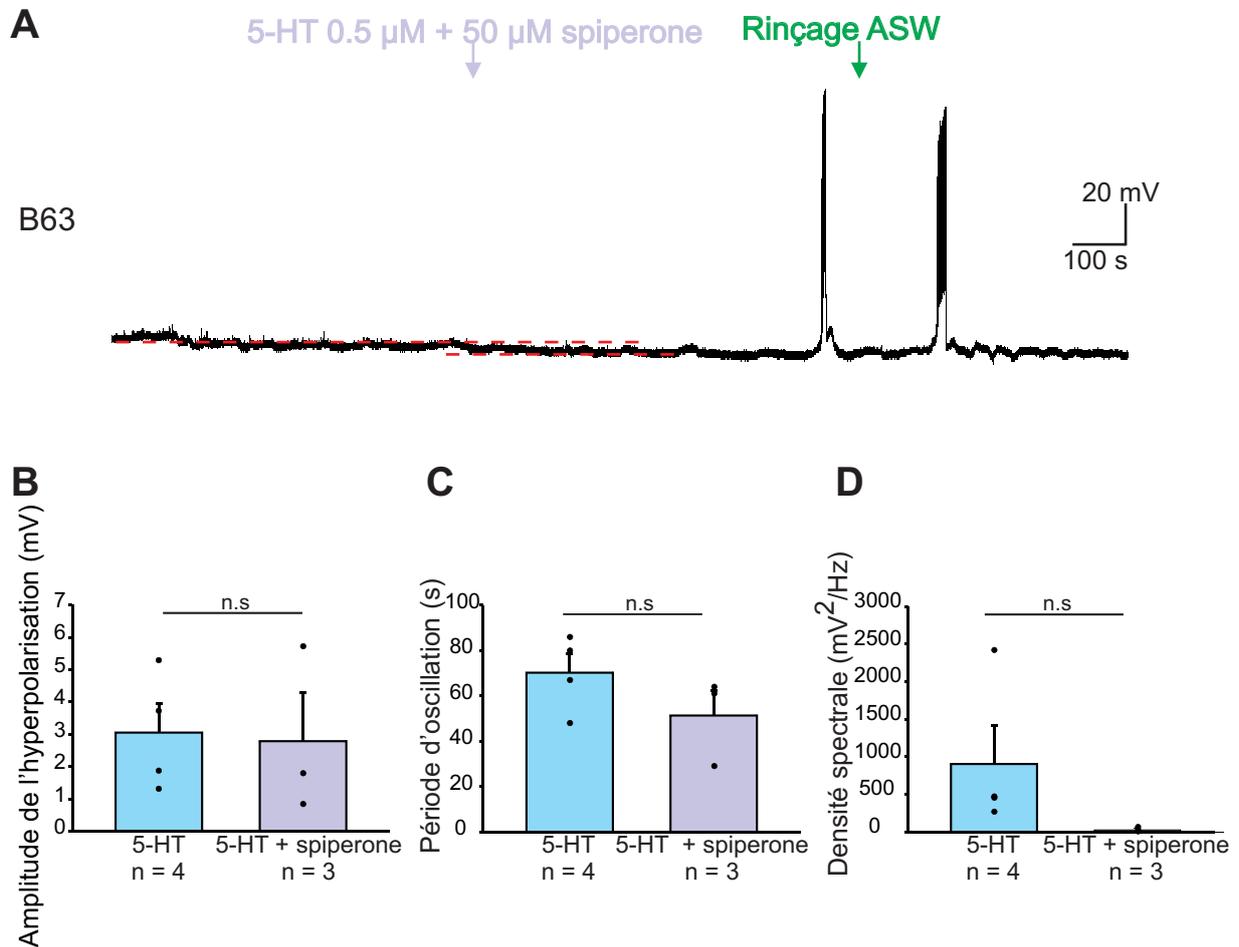
**D.** Comparaison de la densité spectrale (amplitude) de l'oscillation sans et avec la 5-HT. Cette dernière augmente significativement l'amplitude de l'oscillation (\*,  $p < 0,05$ ).

ganglions buccaux isolés en solution physiologique (Figure 29A). Comme précédemment, l'hyperpolarisation du PM, et la période et amplitude de l'oscillation induite par la 5-HT ont été quantifiées en présence et en absence de l'antagoniste.

L'hyperpolarisation du PM ne semble pas être modifiée entre la condition 5-HT et la condition 5-HT + spiperone (5-HT :  $3,05 \pm 0,91$  mV,  $n = 4$  ; 5-HT + spiperone :  $2,79 \pm 1,49$  mV,  $n = 3$ ,  $U = 5,00$ ,  $p > 0,05$  ; Figure 29B). La comparaison de la période d'oscillation sous 5-HT et sous 5-HT + spiperone pourrait suggérer une différence bien que non statistiquement significative (5-HT :  $70,25 \pm 8,41$  s,  $n = 4$  ; 5-HT + spiperone :  $51,33 \pm 11,20$  s,  $n = 3$ ,  $U = 2,00$ ,  $p > 0,05$  ; Figure 29C). De même, l'amplitude de l'oscillation est diminuée en présence de l'antagoniste malgré une différence non significative des mesures (5-HT :  $904,07 \pm 507,09$  mV<sup>2</sup>/Hz,  $n = 4$  ; 5-HT + spiperone :  $26,42 \pm 20,39$  mV<sup>2</sup>/Hz,  $n = 3$ ,  $U = 0,00$ ,  $p > 0,05$  ; Figure 29D). Les petits effectifs utilisés dans ces analyses préliminaires ne permettent pas de conclure de façon tranchée. Notons cependant que les diminutions de période et d'amplitude d'oscillation sont quasi systématiques en présence de l'antagoniste. Si cette tendance se confirmait statistiquement, elle pourrait suggérer que la 5-HT modifie l'oscillation rythmique du PM de B63 par l'intermédiaire des récepteurs 5HT<sub>2</sub> et des voies de signalisation calcique intracellulaire.

Pour déterminer si la modulation induite par la 5-HT concerne les propriétés membranaires endogènes de B63 et/ou résulte d'effets synaptiques provenant du réseau buccal, des ganglions buccaux isolés ont été perfusés en solution "Bas Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>". Dans cette condition de blocage synaptique, l'oscillation endogène du PM de B63 peut être aisément enregistrée (Figure 30A). La perfusion de 5-HT induit à nouveau deux effets : (1) un arrêt de l'oscillation du PM et (2) une reprise de l'oscillation avec le déclenchement de bouffées de PA. On notera que dans le chapitre précédent nous avons montré que dans cette condition appauvrie en Ca<sup>2+</sup> et en absence de 5-HT, l'oscillation du PM de B63 s'atténue avec le temps. La production d'une oscillation supraliminaire après l'application de 5-HT en solution "Bas Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>" n'est donc pas un simple retour à l'état initial, mais bien le résultat d'un effet modulateur de la 5-HT.

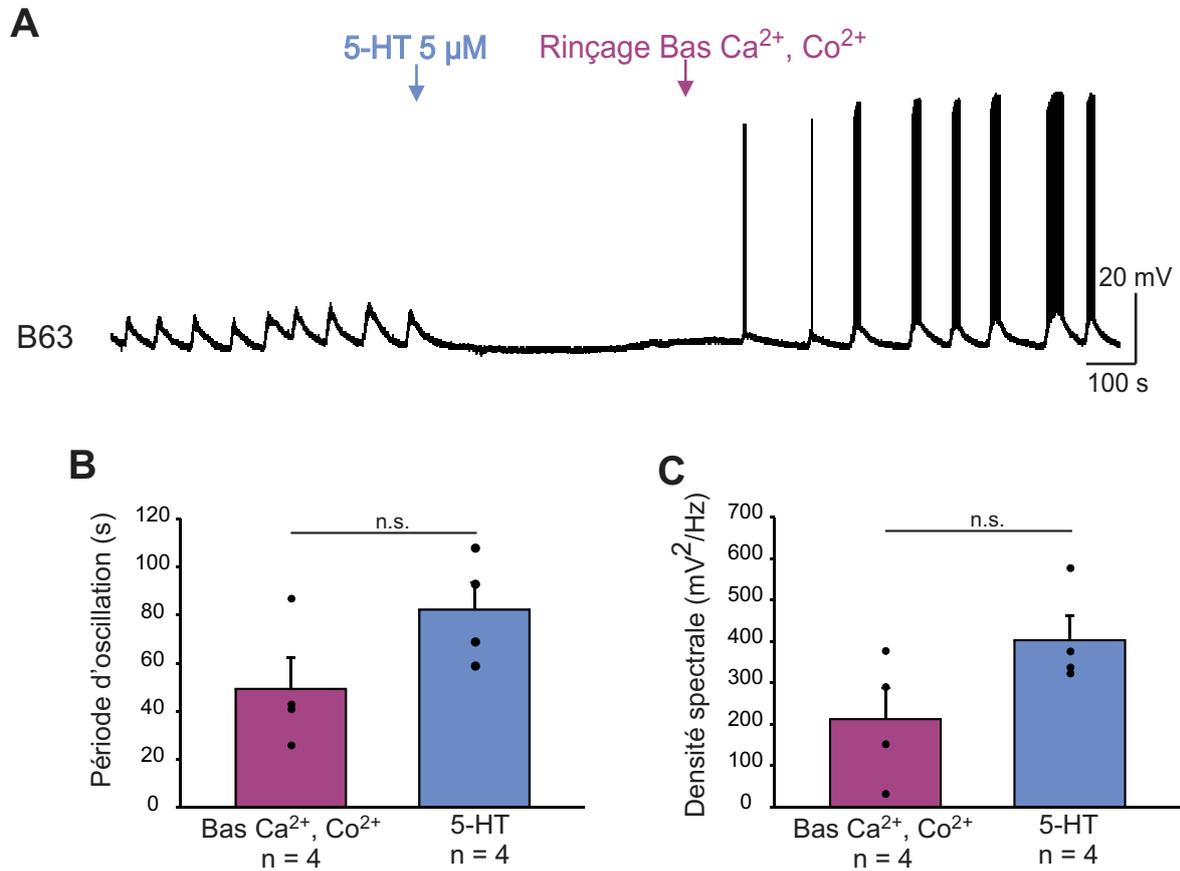
La période d'oscillation et son amplitude ont été quantifiées sur une durée de 300 s avant et pendant le regain d'oscillation sur les B63 isolés *in situ*. La période d'oscillation n'est pas modifiée en présence de 5-HT comparativement à avant (Bas Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> :  $49,25 \pm 13,14$  s,  $n = 4$  ; 5-HT :  $82,25 \pm 11,16$  s,  $n = 4$ ,  $W = 10,00$ ,  $p > 0,05$  ; Figure 30B). De même l'amplitude de l'oscillation n'est pas modifiée de façon significative (Bas Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> :  $212,33 \pm 76,02$  mV<sup>2</sup>/Hz,  $n = 4$  ; 5-HT :  $402,83 \pm 59,04$  mV<sup>2</sup>/Hz,  $n = 4$ ,  $W = 8,00$ ,  $p > 0,05$  ; Figure 30C). Toujours avec les réserves quant à la taille des échantillons utilisés dans les analyses, ces



**Figure 29 : Blocage pharmacologique de l'oscillation du PM de B63.**

**A.** Enregistrement intracellulaire du PM de B63 en présence de 5-HT et de spiperone, un antagoniste des récepteurs 5-HT<sub>2</sub>.

**B-D.** Comparaison des effets de la 5-HT sans et en présence de spiperone. La présence de spiperone ne bloque pas l'hyperpolarisation induite par la 5-HT (B), mais tend à diminuer la période d'oscillation (C) et son amplitude (D). Notons que ces tendances pourtant marquées ne sont pas significatives (n.s.).



**Figure 30 : Effets de la 5-HT sur le neurone B63 isolé *in situ* des synapses chimiques du réseau.**

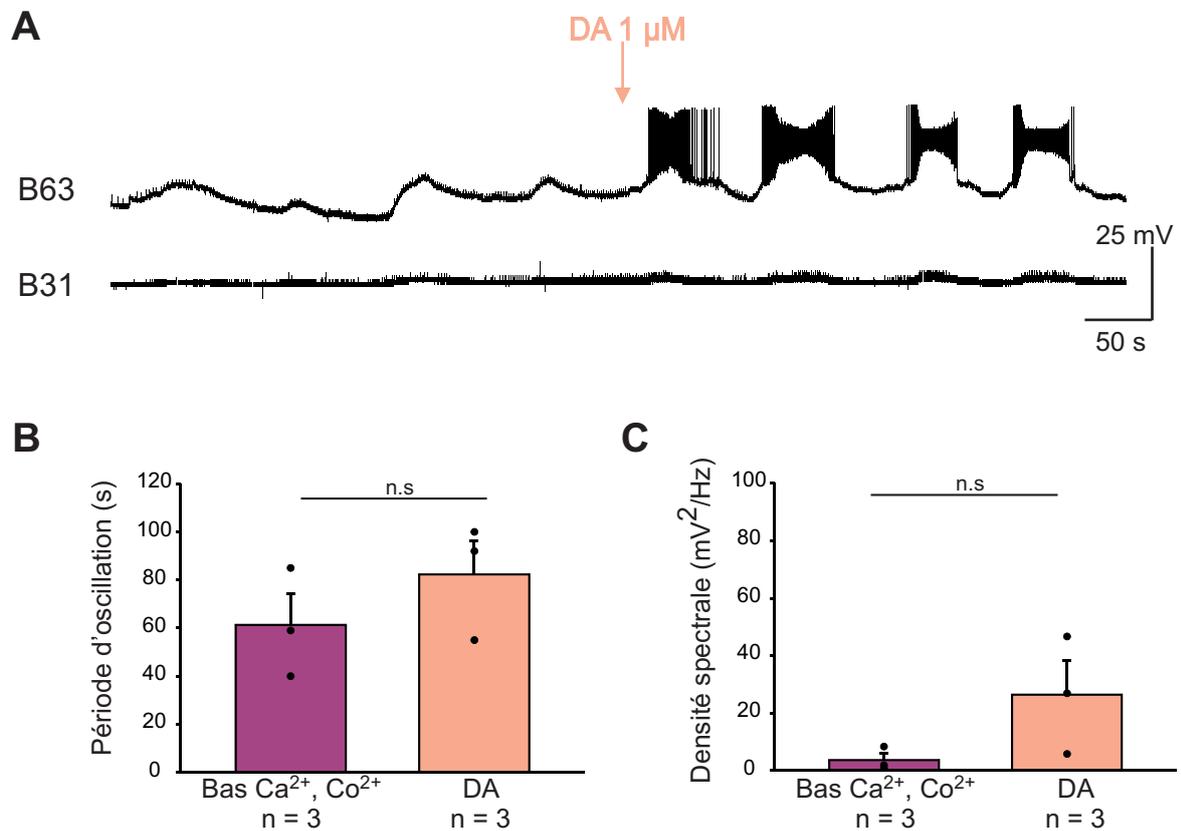
**A.** Enregistrement du PM de B63 en solution "Bas  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ".

**B-C.** Comparaison de la période (B) et de la densité spectrale (C) de l'oscillation du PM de B63 en condition de blocage synaptique, avant et après application de 5-HT. La 5-HT tend à ralentir l'oscillation et à augmenter son amplitude sans être statistiquement significatifs (n.s.).

résultats pourraient suggérer que la 5-HT n'a pas d'effet sur les propriétés oscillatoires endogènes du neurone B63. Ainsi, en condition d'isolement synaptique, nous n'observons pas d'hyperpolarisation du PM et le regain oscillatoire semble plus modéré ou absent qu'en absence de blocage synaptique. En raison de ces différences d'effets de la 5-HT sur B63 en réseau ou isolé, il semblerait que cette monoamine, en plus de l'inactivation initiale des propriétés oscillatoire endogènes de B63, implique une modulation d'activités présynaptiques à ce neurone.

### 3. Effets de la DA sur l'oscillation du PM chez le neurone B63

Pour étudier l'effet de la DA sur les propriétés membranaires endogènes de B63, cette amine a été perfusée, comme pour la 5-HT, sur des ganglions buccaux isolés dans la solution "Bas  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ". Dans cette condition et en présence de 1  $\mu\text{M}$  de DA, l'oscillation rythmique du PM de B63 se couvre de bouffées de PA, voire de potentiels de plateau (Figure 31A). Cela traduit une modulation par la DA de l'amplitude de l'oscillation  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante et/ou d'une modification de l'excitabilité membranaire du neurone B63. Pour distinguer entre ces possibilités, des analyses spectrales de l'oscillation ont été effectuées sur le motoneurone B31, couplé électriquement à B63, qui exprime l'oscillation du PM mais sans générer de PA. Tout en restant prudent dans l'interprétation de ces résultats à partir de petits effectifs, les analyses suggèrent que ni la période d'oscillation (Bas  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  :  $61,33 \pm 13,04$  s,  $n = 3$  ; DA :  $82,33 \pm 13,86$  s,  $n = 3$ ,  $W = 6,00$ ,  $p > 0,05$  ; Figure 31B), ni son amplitude (Bas  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  :  $3,69 \pm 2,33$   $\text{mV}^2/\text{Hz}$ ,  $n = 3$  ; DA :  $26,43 \pm 11,80$   $\text{mV}^2/\text{Hz}$ ,  $n = 3$ ,  $W = 6,00$ ,  $p > 0,05$  ; Figure 31C) ne seraient modifiées par la DA. Dans ce cas, l'expression des bouffées de PA ou des potentiels de plateau au sommet de l'oscillation de B63 pourrait résulter d'une hausse de l'excitabilité membranaire de ce neurone.



**Figure 31 : Effet de la DA sur le neurone B63 isolé *in situ* des synapses chimiques du réseau.**

**A.** Enregistrements intracellulaires simultanés du PM de B63 et B31 en solution "Bas  $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ".

**B-C.** Comparaison de la période (B) et de la densité spectrale (C) de l'oscillation avant et pendant la perfusion de DA. Bien que la DA tend à accroître ces paramètres d'oscillation, ces modifications sont non significatives (n.s.).

### III. Discussion

L'objectif de cette étude était d'analyser la plasticité fonctionnelle du neurone pacemaker de la motricité buccale qui est induite par deux monoamines, la 5-HT et la DA, connues pour réguler le comportement de recherche de nourriture. Nos données, bien que préliminaires en raison des faibles effectifs considérés dans les analyses, suggèrent que ces amines ont des effets distincts sur les capacités oscillatoires du neurone B63 et/ou sur son excitabilité membranaire. Cette modulation par la 5-HT et la DA s'accompagne de conséquences motrices qui suggèrent l'implication de ces monoamines dans des aspects différents du comportement motivé.

#### 1. Modulation des propriétés pacemakers

L'action des monoamines sur les propriétés oscillatoires des neurones a été décrite chez les vertébrés et chez les invertébrés. Selon les types cellulaires, ces transmetteurs modulateurs peuvent favoriser ou au contraire inhiber ces propriétés dynamiques (Kloppenburg et al., 2000 ; Peck et al., 2001 ; Johnson et al., 2003 ; Kadiri et al., 2011 ; Wang et al., 2011). Deux modes d'action non exclusifs ont été décrits. D'une part, les monoamines peuvent agir sur les propriétés des canaux ioniques transmembranaires par l'intermédiaire de voies métaboliques intracellulaires. D'autre part, toujours par l'intermédiaire de voies de seconds messagers, elles peuvent réguler le fonctionnement des organites de stockage du  $Ca^{2+}$  et ainsi modifier les oscillations calciques intracellulaires.

La capacité de la 5-HT à inhiber l'activité oscillatoire d'un neurone pacemaker a été décrite chez le neurone R15 du ganglion abdominal chez l'aplysie. De faibles concentrations de 5-HT appliquées en bain réduisent la fréquence d'oscillation de son PM, tandis que de fortes concentrations bloquent toute oscillation. L'arrêt des oscillations est associé à une hyperpolarisation membranaire causée par une augmentation d'AMPC, l'activation de la PKA et la phosphorylation de canaux  $K^+$  membranaires (Drummond et al., 1980 ; Adams & Levitan, 1982). Toutefois, l'action inhibitrice de l'AMPC ne s'exerce pas seulement sur les propriétés membranaires mais peut cibler des oscillations calciques produites par les organites intracellulaires. C'est le cas pour des cellules non neuronales où les oscillations calciques induites par la stimulation de la voie de l' $IP_3$  peuvent être transitoirement inhibées

par une soudaine élévation de la concentration d'AMPc et l'activation de la PKA (Tertyshnikova & Fein, 1998).

Dans notre étude du neurone B63, comme pour R15, nous avons montré que la 5-HT supprime dans un premier temps l'oscillation endogène du PM en association à une hyperpolarisation membranaire. Cependant, chez B63 il n'y a pas de relation entre l'hyperpolarisation membranaire et l'arrêt de l'oscillation. En effet, une hyperpolarisation expérimentale ne supprime pas son oscillation  $Ca^{2+}$ -dépendante (Figures 18, 20). Contrairement à R15 dont les propriétés pacemakers sont voltage-dépendantes, l'arrêt de l'oscillation chez B63, bien que concomitant à une hyperpolarisation membranaire, relève d'un processus distinct. Dans la mesure où l'oscillation implique l'activation de canaux sodiques  $Ca^{2+}$ -dépendants, il est possible que la 5-HT agisse sur ces canaux. La modulation de canaux CAN par l'AMPc, associée à une modification de l'activité oscillatoire neuronale a en effet été décrite chez *Helix* (Partridge et al., 1990). Aussi, selon cette hypothèse on peut présumer que l'inhibition de l'oscillation de B63 puisse être bloquée par des antagonistes des récepteurs 5-HT couplés positivement à l'AC (5-HT<sub>apAC</sub>) tels que la méthiothepine (Lee et al., 2009). On pourrait également supposer que la 5-HT inhibe l'oscillation du PM par voie métabolique sur les stocks calciques intracellulaires. L'action des transmetteurs chimiques sur ces stocks implique généralement le métabolisme des phospho-inositols. Des récepteurs à la 5-HT mettant en jeu ce métabolisme intracellulaire ont été décrits chez l'aplysie (Li et al., 1995 ; Dumitriu et al., 2006). Cependant, nos résultats suggèrent que l'hyperpolarisation et l'arrêt d'oscillation du PM de B63 ne sont pas bloqués par un antagoniste de ces récepteurs, la spipérone. Par conséquent, il est peu probable que l'inhibition de cette oscillation par la 5-HT passe par une action sur les stocks calciques intracellulaires, mais serait plutôt le résultat d'une modulation des canaux membranaires.

Dans un second temps, après l'hyperpolarisation cellulaire, la 5-HT produit un regain d'oscillation du PM de B63. L'état préliminaire de nos données ne nous permet pas d'établir clairement s'il s'agit d'un effet de réseau (c'est à dire de l'activation rythmique de neurones pré-synaptiques à B63 induit par la 5-HT) et/ou d'un regain du processus oscillatoire endogène du neurone. En effet, ce phénomène observé en absence de blocage synaptique (condition physiologique), semble moins important lorsque la cellule est isolée de ses partenaires (condition "Bas  $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ "). Cette observation est plutôt en faveur d'une influence synaptique. Toutefois, dans la situation pauvre en  $Ca^{2+}$ , le possible regain de l'oscillation  $Ca^{2+}$ -dépendante pourrait être plus difficile à s'exprimer. Quoiqu'il en soit, il est établi que la 5-HT peut induire des oscillations calciques dans des cellules non neuronales et neuronales par l'activation des récepteurs à  $IP_3$  des organites (Nishio et al., 1991; Zimmermann & Walz, 1997). Ainsi, un tel processus pourrait rendre compte du blocage

spécifique du regain d'oscillation chez B63 par la spipérone. Bien qu'étant provisoire, l'ensemble de nos résultats suggère que la 5-HT pourrait agir par deux voies métaboliques différentes (celles de l'AMPc et des phospho-inositols) qui rendraient compte de l'inhibition (voie de l'AMPc) et du regain de l'oscillation (voie des phospho-inositols) du PM de B63.

A l'instar de la 5-HT, des données expérimentales sur des cellules neuronales et non neuronales indiquent que la DA peut favoriser ou inhiber les propriétés oscillatoires des cellules par une action membranaire ou par une action sur les stocks calciques intracellulaires (Johnson et al., 2003 ; Kadiri et al., 2011 ; Ustione & Pistone, 2012). Cependant, comme pour la 5-HT, l'état préliminaire de nos données ne permet pas de confirmer un rôle facilitateur de la DA sur l'oscillation endogène de B63. Ces bioamines augmentent la probabilité que l'oscillation déclenche des bouffées de PA, mais sans que cette oscillation n'apparaisse plus ample ou plus fréquente. Par conséquent, le caractère supraliminaire de l'oscillation en présence de bioamine pourrait simplement résulter d'un changement d'excitabilité neuronale plutôt que d'une amplification de l'oscillation pacemaker.

## 2. Modulation de l'excitabilité neuronale

L'excitabilité cellulaire est définie par la capacité d'une cellule à générer des PA en réponse à une dépolarisation. Cette excitabilité peut être modifiée par de nombreux transmetteurs modulateurs. La DA modifie l'excitabilité neuronale chez les invertébrés et les vertébrés (Barnes et al., 1994 ; Ding & Perkel., 2002 ; Henze et al., 2000). Par exemple, elle augmente le seuil de déclenchement des PA des neurones du paléo striatum chez les oiseaux, ainsi que celui des neurones de l'amygdale basolatérale chez le rat ou des neurones pyramidaux du cortex préfrontal chez le macaque (Ding & Perkel, 2002 ; Kroner et al., 2005 ; Henze et al., 2000). Chez l'aplysie, la capacité de la DA à modifier l'excitabilité des neurones du ganglion buccal a été illustrée par plusieurs études. D'une part, la perfusion de DA exogène sur des ganglions buccaux isolés augmente ou diminue le seuil de production des PA de différents neurones buccaux (Kabotyanski et al., 2000). D'autre part, la stimulation de l'afférence œsophagienne monoaminergique augmente l'excitabilité de B63 et est bloquée par l'application d'antagonistes dopaminergiques (Bédécarrats et al., 2013). Nos résultats suggèrent que l'application exogène de DA favorise la production de PA sur les oscillations spontanées de B63. Des tests d'électrophysiologie devront cependant confirmer que cet effet résulte d'une modification du seuil de production des PA chez ce neurone.

De même, l'action de la 5-HT sur l'excitabilité neuronale a été décrite sur de nombreuses structures nerveuses d'invertébrés et de vertébrés. En particulier, chez l'aplysie, la 5-HT par l'intermédiaire de l'AMPC et l'activation de la PKA supprime des courants  $K^+$  qui régulent l'excitabilité de neurones sensoriels et moteurs de la synapse sensori-motrice du réflexe de retrait de la branchie (Klein et al., 1982 ; Hochner & Kandel, 1992). L'effet d'applications de 5-HT exogène a également été testé sur les neurones des ganglions buccaux (Kabotyanski et al., 2000). Il en ressort que dans un même réseau neuronal, cette amine peut augmenter mais aussi diminuer l'excitabilité membranaire. Ces modifications d'excitabilité pourraient constituer une partie de la réponse du neurone B63 à l'application de 5-HT exogène.

### 3. Signification comportementale de la modulation monoaminergique

La DA accroît la production des PMR chez l'aplysie. Des résultats comparables ont été décrits chez d'autres espèces de mollusques telles que le *Limax* (Wieland & Gelperin, 1983), *Helisoma* (Quinlan et al., 1997 ; Trimble & Barker, 1984) et *Lymnaea* (Kemenes et al., 1997). Chez l'aplysie, la DA exerce son action excitatrice sur le neurone pacemaker B63 décrit dans ce chapitre, mais module aussi l'excitabilité des neurones B51 et B8 qui sont nécessaires à l'expression du pattern d'ingestion (Kabotyanski et al., 2000; Brembs et al., 2002). En revanche, elle diminue l'excitabilité des neurones B4 et B34 nécessaires à la production du pattern de rejet (Kabotyanski et al., 2000). En somme, la DA, par la modulation des propriétés fonctionnelles de nombreuses cibles neuronales du réseau buccal, facilite le processus décisionnel qui déclenche les patterns moteurs (action sur B63) et régule le processus décisionnel qui sélectionne les patterns d'ingestion (action sur B51/B8) au détriment du pattern de rejet (action sur B4/B34). Ces résultats sont corroborés par l'augmentation de la fréquence des cycles d'ingestion de la radula mesurée sur des préparations réduites constituées de têtes isolées et perfusées avec la DA (Kabotyanski et al., 2000). Ils sont également soutenus par les effets du conditionnement opérant du comportement alimentaire qui induit un comportement compulsif d'ingestion dont les effets cellulaires et moteurs sont reproduits par la stimulation d'une afférence monoaminergique et bloqués par des antagonistes dopaminergiques (Brembs et al., 2002; Nargeot & Simmers, 2012). Ainsi, il apparaît globalement que la DA régule les processus décisionnels et l'expression motrice.

La 5-HT a un rôle plus complexe à définir. Bien que cette amine agisse sur de nombreuses cibles cellulaires des ganglions buccaux, elle ne produit pas de modification significative de l'émission des patterns moteurs. Comme observée dans cette étude, son action sur les propriétés pacemakers du neurone B63 est ambivalente. Il en est de même pour son action sur d'autres neurones du réseaux buccal (Kabotyanski et al., 2000). Il est donc difficile de définir son rôle dans l'émission d'actions. En revanche, les conditions d'activation des neurones sérotoninergiques et les variations de concentrations de 5-HT hémolympatique ont été corrélées à des processus d'éveil comportemental ou de cycles circadiens (Kupfermann & Weiss, 1982 ; Levenson et al., 1999). Cette amine serait donc impliquée dans des processus préparatoires à l'action. Dans cette hypothèse, il serait intéressant d'analyser l'effet combiné de la modulation sérotoninergique et dopaminergique. Cette modulation complexe pourrait jouer un rôle important dans les processus motivationnels complexes tels que ceux impliqués dans les apprentissages par récompenses.

# Chapitre 3 : Modulation de l'activité neuronale pacemaker par un apprentissage appétitif

## I. Introduction

L'émission et la sélection d'actions dans les comportements motivés ou dirigés vers un but sont déterminées par la connaissance de la nature et de la valeur des conséquences des actes engagés dans le comportement (Dickinson & Balleine, 1994). Cette connaissance est acquise par des apprentissages, parmi lesquels le conditionnement opérant qui joue un rôle essentiel puisqu'il permet à l'animal d'établir la relation prédictive entre une action et sa conséquence bénéfique ou non. Il consiste en l'association d'un stimulus sensoriel qui peut être perçu comme positif (une récompense) ou négatif (une punition) avec l'émission spontanée d'une action spécifique. La répétition de cette association conduit à une augmentation de la probabilité d'émission de l'action lorsque les animaux sont récompensés, ou une diminution voire même un arrêt de l'expression de l'acte en cas de punition (Skinner, 1938).

Lorsque la relation prédictive entre l'émission motrice et l'obtention d'une récompense est établie, le comportement spontané qui est normalement émis de façon erratique, devient automatique et stéréotypé. Quand des récompenses alimentaires administrées sont particulièrement palatables, le comportement renforcé peut même devenir compulsif, autrement dit caractérisé par une émission automatique, régulière et très fréquente des actions motrices (Wise, 2013 ; Burguière et al., 2015 ; Everitt & Robbins, 2016). Cette transition entre la spontanéité et la variabilité d'émission des actes moteurs vers la production de comportements rythmiques et stéréotypés est permise par le conditionnement opérant. Toutefois, les mécanismes neuronaux à l'origine d'une telle transition comportementale induite par les apprentissages restent mal connus.

Des résultats expérimentaux établis chez les invertébrés et chez les vertébrés indiquent que les transmetteurs modulateurs monoaminergiques joueraient des rôles fondamentaux dans les modifications comportementales induites par les apprentissages récompensants. Chez les vertébrés, les effets comportementaux de la récompense résultent en partie de la libération de DA dans le NAc (Schultz, 1998, 2000 ; Wise, 2013). Effectivement, lors de l'obtention d'une récompense alimentaire, l'activité électrique est accrue dans les neurones dopaminergiques de la voie mésolimbique en direction, entre

autre, de cette structure cérébrale. Par ailleurs, des expériences d'autostimulation montrent que l'effet des récompenses alimentaires peut être mimé par des stimulations électriques ou optogénétiques de la voie mésolimbique (Cole et al., 2018 ; Olds & Milner, 1954). Comme chez les vertébrés, les monoamines comme la DA ou l'octopamine, jouent également des rôles primordiaux dans le processus de récompense dans les apprentissages associatifs chez les insectes et les mollusques (Hawkins & Byrne, 2015 ; Giurfa & Sandoz, 2012 ; Balaban et al., 2016). Par exemple, chez l'aplysie, la section des afférences œsophagiennes monoanimergiques prévient les modifications induites par le conditionnement opérant ou le conditionnement Pavlovien du comportement alimentaire (Schwarz & Susswein, 1986). A l'inverse, leur stimulation électrique reproduit les effets de la récompense alimentaire (Brembs et al., 2002). Enfin, le blocage des récepteurs DA par des antagonistes spécifiques empêche l'induction de la plasticité neuronale par des analogues *in vitro* de ces apprentissages (Nargeot et al., 1999 ; Reyes et al., 2005 ; Bédécarrats et al., 2013).

La 5-HT peut aussi contribuer à l'induction de la plasticité neuronale lors des conditionnements (Ocorr et al., 1985). Dans les apprentissages opérants, elle pourrait participer de manière indirecte via la régulation des états de vigilance. Chez l'aplysie, il a été montré que les apprentissages opérants n'ont pas la même efficacité en période diurne ou nocturne (Lyons et al., 2005 ; Vorster & Born, 2017). Corrélativement, la concentration hémolympatique en 5-HT diffère dans ces deux périodes nyctémérales (Levenson et al., 1999). La 5-HT est également essentielle dans la phase appétitive du comportement de recherche de nourriture (Rosen et al., 1989 ; Weiss et al., 1978 ; Kupfermann & Weiss, 1982). Cet état d'éveil généralisé favorise l'émission des mouvements buccaux qui sont à la base des apprentissages opérants appétitifs ou aversifs.

Comme cela est rappelé en introduction générale (paragraphe III.2) un conditionnement opérant du comportement de recherche de nourriture chez l'aplysie induit la transition d'un comportement variable et peu fréquent, à un comportement rythmique et fréquent. Ces modifications motrices trouvent leur origine dans la plasticité neuronale au sein des réseaux buccaux (Nargeot et al., 2007 ; 2009). Elles sont induites par des afférences sensorielles œsophagiennes qui contiennent des fibres dopaminergiques et sérotoninergiques (Nargeot et al., 1999a ; Brembs et al., 2002 ; Martinez-Rubio et al., 2009 ; Bédécarrats et al., 2013). La plasticité induite concerne en partie les neurones décisionnels du réseau buccal (B63, B30, B65, B51). En effet, l'apprentissage opérant renforce les synapses électriques entre les neurones B63/B30/B65 et modifie leur excitabilité membranaire ainsi que celle du neurone B51 (Brembs et al., 2002 ; Lorenzetti et al., 2006 ; Mozzachiodi et al., 2008 ; Nargeot et al., 2009 ; Mozzachiodi & Byrne, 2010). Ces changements dans les couplages électriques sont à l'origine de la régularisation de

l'émission des patterns moteurs tandis que des modifications d'excitabilité membranaire augmentent la fréquence d'émission des patterns (Nargeot et al., 2009 ; Sieling et al., 2014). En dépit de ces connaissances, l'effet de l'apprentissage opérant appétitif sur l'impulsion spontanée qui détermine l'émission des patterns moteurs reste à être étudié.

L'objectif des travaux présentés dans ce dernier chapitre est d'analyser si, et comment, le conditionnement opérant *in vivo* peut modifier les propriétés pacemaker, Ca<sup>2+</sup>-dépendantes, du neurone décisionnel B63, décrites dans les chapitres précédents. Une telle modification peut-elle favoriser l'émission rythmique et fréquente du pattern moteur radulaire de recherche de nourriture ? Pour répondre à cela, l'oscillation rythmique du PM du neurone B63 a été étudiée et comparée sur des préparations nerveuses isolées d'animaux conditionnés et d'animaux témoins.

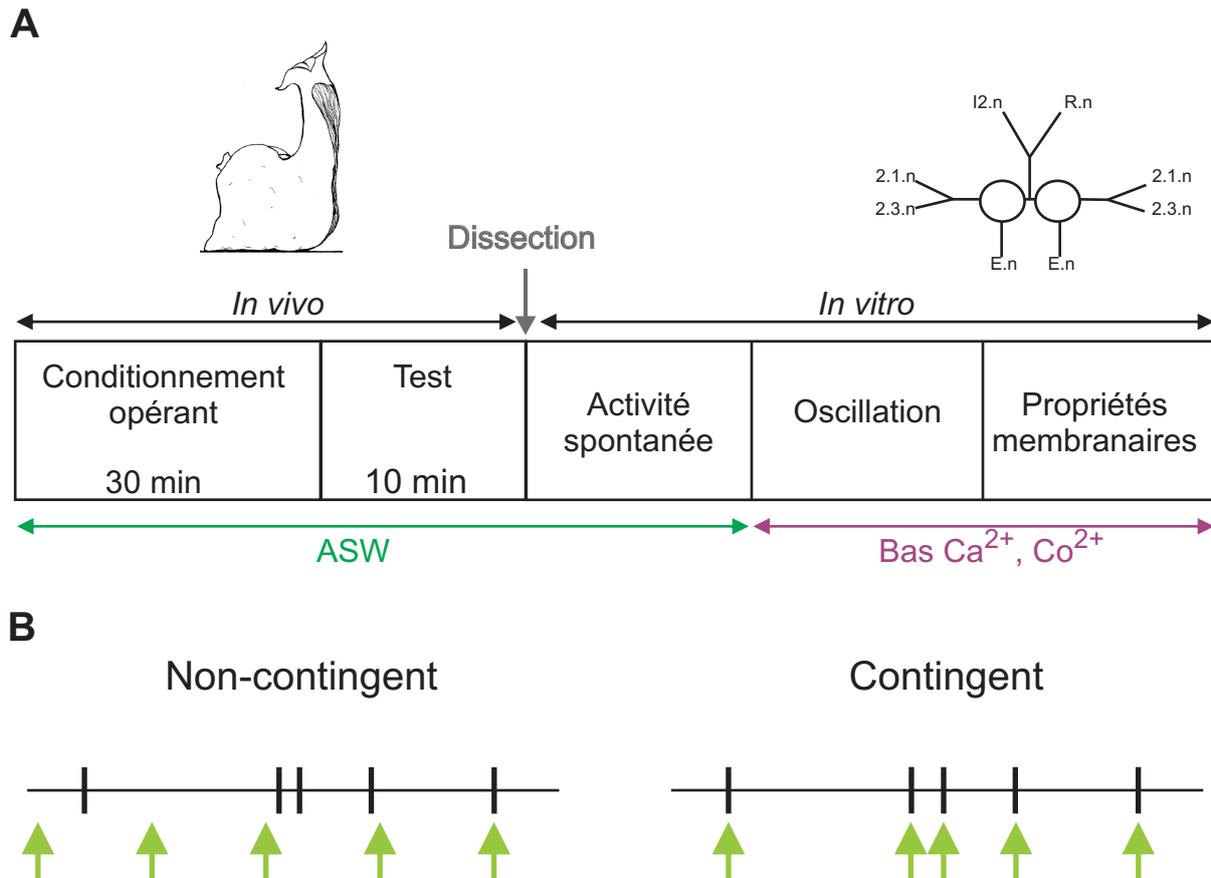
## II. Résultats

### 1. Effets de l'apprentissage opérant sur les PMR générés spontanément par le neurone décisionnel B63

Afin d'étudier les modifications cellulaires induites par l'apprentissage opérant appétitif, les aplysies ont subi un conditionnement de 30 min (Figure 32A). Pour cela les animaux ont été répartis aléatoirement entre deux groupes. Dans le groupe « Contingent » ( $n = 10$ ), chaque animal reçoit une récompense palatable (20  $\mu$ L de jus d'algue) en association avec l'émission d'un cycle radulaire (Figure 32B). Dans le groupe non contingent ( $n = 10$ ), les animaux reçoivent la même récompense, mais cette fois-ci de manière rythmique et donc sans tenir compte du comportement de l'animal (Figure 32B). Ainsi, la comparaison de ces deux groupes met en exergue les modifications motrices et neuronales spécifiquement induites par l'association action/récompense qui caractérise le conditionnement opérant. Dans les deux groupes, la posture de recherche de nourriture nécessaire à l'administration de la récompense et à l'émission des cycles radulaires est incitée par un stimulus alimentaire (un morceau d'algue) maintenu en continu sur les lèvres des animaux. Après cette phase de conditionnement et le changement de l'eau de mer du bac dans lequel les animaux sont conditionnés, les modifications comportementales ont été testées pendant une période de 10 min. Lors de cette phase « test », les animaux ne sont soumis qu'au stimulus incitatif et ne reçoivent plus de récompense. La fréquence et la régularité de l'émission des cycles radulaires sont alors quantifiées et comparées entre les groupes (Figure 33A).

La comparaison de la fréquence d'émission des cycles radulaires montre qu'elle est significativement plus élevée chez les animaux contingent par rapport aux animaux non contingent (contingent :  $5,54 \pm 0,46$  / min ; non contingent :  $2,98 \pm 0,44$  / min ;  $U = 10,5$  ;  $p < 0,05$  ; Figure 33B). La variabilité motrice est quantifiée par le coefficient de variation (C.V.) des intervalles de temps inter-cycles radulaires. Ce coefficient diminue chez les animaux contingent comparativement aux animaux non contingent ce qui signifie que les cycles radulaires se succèdent de manière plus régulière après le conditionnement opérant (contingent :  $0,59 \pm 0,06$  ; non contingent :  $0,96 \pm 0,12$  ;  $U = 12,5$  ;  $p < 0,05$  ; Figure 33C). Ces données montrent que les animaux ont été efficacement conditionnés puisqu'ils expriment les modifications motrices caractéristiques du conditionnement opérant (Nargeot et al., 2007, 2009).

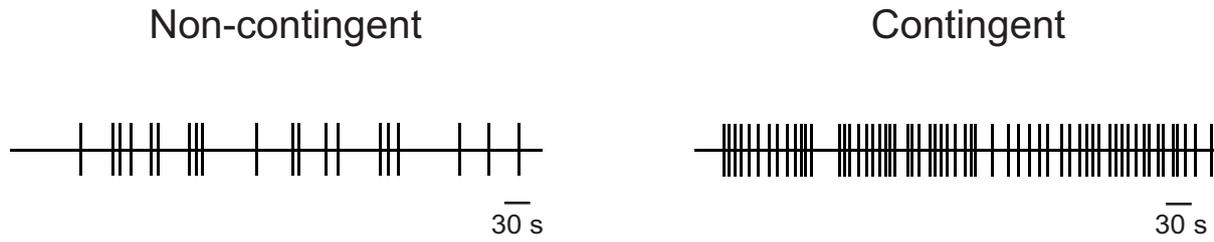
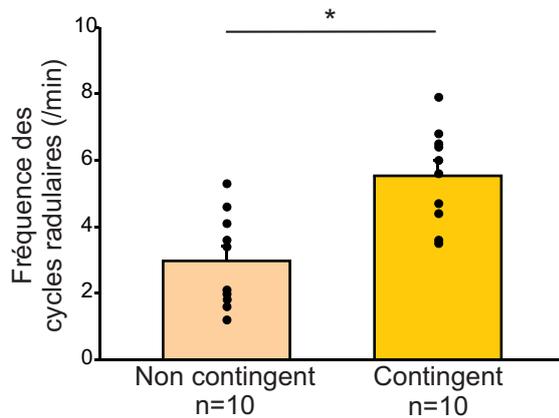
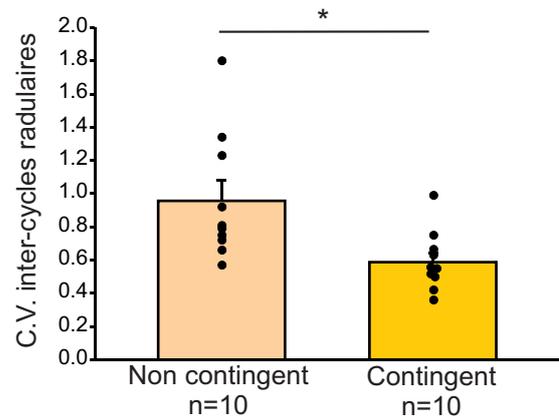
Les modifications comportementales observées peuvent avoir une origine sensorielle puisqu'elles s'expriment en présence de la stimulation incitative, et/ou elles peuvent être



**Figure 32 : Protocole expérimental de conditionnement opérant et d'analyse de la plasticité fonctionnelle de B63.**

**A.** Décours temporel du protocole : après une période de conditionnement opérant et de test comportemental (~5 min après apprentissage), les ganglions buccaux sont extraits des animaux et l'activité électrique spontanée du neurone B63 est enregistrée *in vitro* d'abord en condition physiologique (ASW) puis en condition de blocage synaptique ("Bas  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ "). Dans cette dernière période, l'oscillation puis les propriétés membranaires de B63 ont été analysées.

**B.** Protocole du conditionnement opérant : Deux groupes d'animaux sont utilisés. Dans le groupe contingent les animaux reçoivent la récompense alimentaire (flèche) simultanément à l'émission de chaque cycle radulaire d'ingestion (traits verticaux noirs) afin de reproduire l'association action/récompense caractéristique du conditionnement opérant. L'importance de cette association est testée par comparaison avec un groupe non contingent (contrôle) qui se voit délivrer la récompense dans la cavité buccale de manière rythmique sans tenir compte de l'émission spontanée des cycles radulaires.

**A****B****C**

**Figure 33 : Modifications motrices *in vivo* après apprentissage**

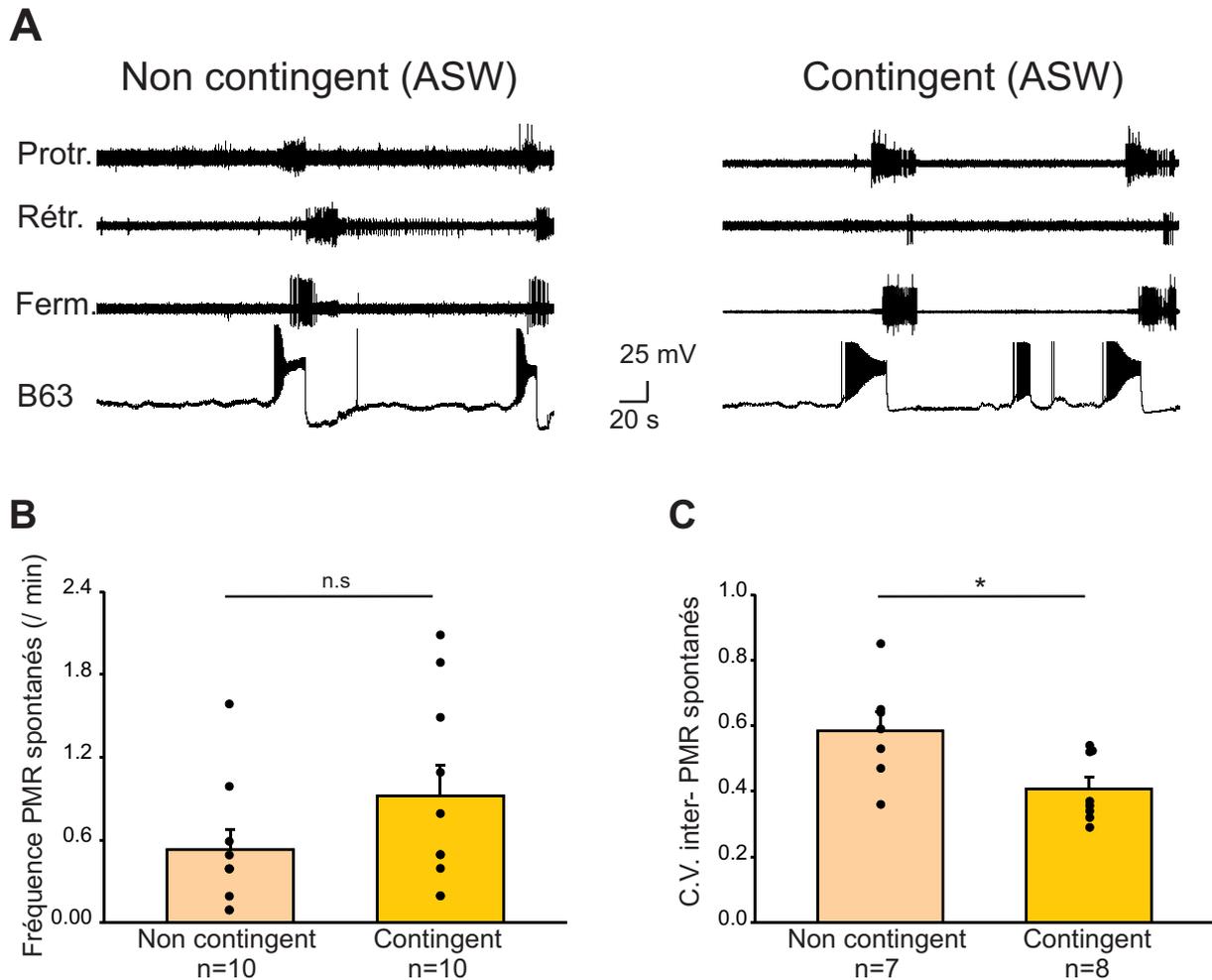
**A.** Période test après apprentissage : exemples d'enregistrements des cycles radulaires (traits verticaux) chez un animal du groupe non contingent (à gauche) et contingent (à droite) en présence d'un stimulus alimentaire incitatif. Après apprentissage opérant, l'animal émet des cycles radulaires de façon plus fréquente et régulière comparativement au témoin (non contingent).

**B-C.** Comparaison inter-groupes de la fréquence (B) et de la régularité (C) de l'émission des cycles radulaires. La régularité est quantifiée par le coefficient de variation (C.V.) de la période inter-cycle radulaire. \*,  $p < 0,05$ .

d'origine centrale et dépendre d'une modulation du processus d'impulsion spontanée organisé par le réseau générateur de programmes moteurs. Pour analyser la part de l'impulsion d'origine centrale dans l'augmentation de la fréquence et de la régularité des cycles radulaires, l'activité spontanée du neurone B63 a été enregistrée et comparée sur des préparations de ganglions buccaux isolés des animaux non contingent et contingent (Figure 34A). Les enregistrements intracellulaires de l'activité du neurone B63 ne montrent pas d'augmentation significative de la fréquence d'émission des PMR (contingent :  $0,9 \pm 0,204$  / min ; non contingent :  $0,50 \pm 0,15$  / min ;  $U = 29$  ;  $p > 0,05$  ; Figure 34B). Cependant, une régularisation de l'émission des PMR est observée chez les préparations contingent (contingent :  $0,41 \pm 0,04$  ; non contingent :  $0,58 \pm 0,06$  ;  $U = 8,5$  ;  $p < 0,05$  ; Figure 34C). Ainsi, l'expression des potentiels de plateau qui déclenchent des PMR n'est pas modifiée. Ce résultat surprenant suggère que la stimulation sensorielle incitative est importante dans l'expression des changements de fréquence et de la régularité de l'émission des cycles radulaires, puisque la stimulation électrique des nerfs sensoriels qui mime l'algue maintenue devant les lèvres de l'animal *in vivo*, permet de retrouver les modifications induites par l'apprentissage à savoir l'augmentation de la fréquence d'émission des PMR et leur régularisation (Nargeot et al., 2009 ; Bédécarrats et al., 2013).

## 2. Absence de modification de l'oscillation du PM du neurone décisionnel B63

L'effet de l'apprentissage sur l'oscillation spontanée du PM du neurone B63 a été analysé sur les mêmes préparations nerveuses que précédemment. Les enregistrements succèdent à ceux décrits ci-dessus (Figure 35A). Seules les préparations pour lesquelles l'enregistrement intracellulaire du PM de B63 a pu être maintenu ont été analysées (contingent,  $n = 9$  ; non contingent,  $n = 9$ ). Pour cette étude, afin d'éliminer l'influence des synapses chimiques, les neurones B63 ont été isolés *in situ* avec la perfusion d'une solution de « Bas  $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  ». Différentes caractéristiques de l'oscillation ont été quantifiées et comparées entre les deux groupes : la fréquence de l'oscillation, l'amplitude de l'oscillation, sa régularité et le nombre d'oscillations supraliminaire (surmontées de PA et réalisant des potentiels de plateau). Pour s'assurer que l'amplitude d'oscillation ne dépende pas du potentiel de repos initial des neurones, celui-ci a été maintenu à - 80 mV par l'injection intracellulaire d'un courant constant chez toutes les préparations et pendant les 10 min de la période d'enregistrement.



**Figure 34 : Activité spontanée de B63 *in vitro*, après apprentissage.**

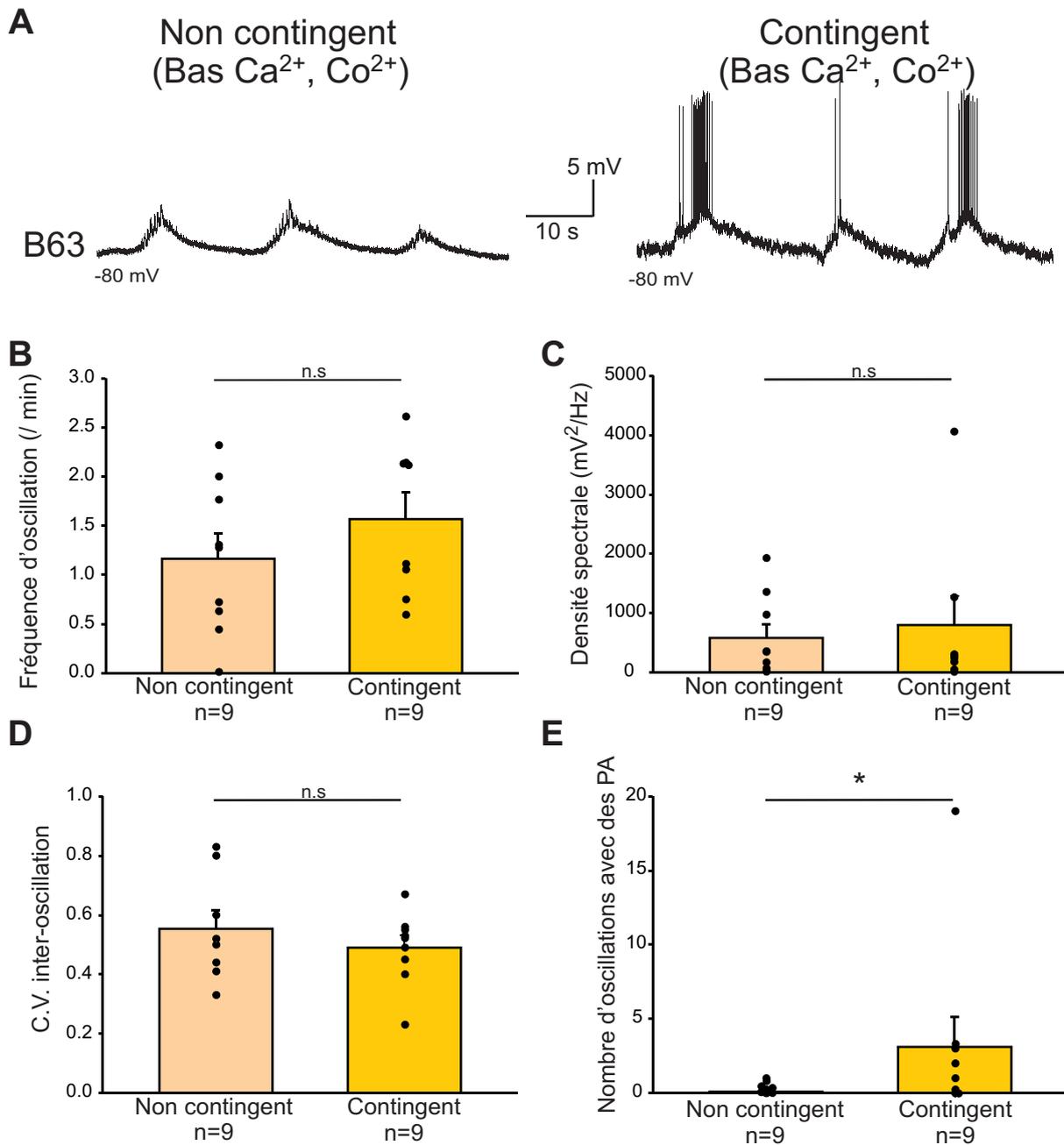
**A.** Exemples d'enregistrements simultanés des PMR (3 traces supérieures) et intracellulaire de B63 (4ème trace) chez des ganglions buccaux isolés d'un animal non contingent et contingent. Cette activité spontanée est enregistrée en absence de tout stimulus incitatif.

**B-C.** Comparaison inter-groupes de la fréquence (B) et de la régularité (C) des émissions spontanées des PMR associés aux bouffées de PA de B63. En absence de stimulus incitatif, la régularité, mais pas la fréquence des PMR, est augmentée après apprentissage. (n.s. non significatif; \*,  $p < 0,05$ ).

La fréquence et l'amplitude d'oscillation ont été quantifiées par l'analyse spectrale du PM des neurones. La fréquence d'oscillation n'est pas modifiée entre le groupe non contingent et le groupe contingent (contingent :  $1,57 \pm 0,27$  / min,  $n = 9$  ; non contingent =  $1,16 \pm 0,26$  / min,  $n = 9$  ;  $U = 25,00$ ,  $p > 0,05$  ; Figure 35B). Même constat pour l'amplitude de l'oscillation qui n'est pas significativement différente entre les groupes (contingent :  $796,62 \pm 486,95$   $mV^2/Hz$ ,  $n = 9$  ; non contingent :  $579,06 \pm 228,4$   $mV^2/Hz$ ,  $n = 9$  ;  $U = 34,00$ ,  $p > 0,05$  ; Figure 35C). La régularité temporelle de l'oscillation pacemaker n'est pas non plus modifiée, puisque le C.V. ne montre pas de différence entre les deux groupes (contingent :  $0,49 \pm 0,04$ ,  $n = 9$  ; non contingent :  $0,55 \pm 0,08$ ,  $n = 9$  ;  $U = 39,00$ ,  $p > 0,05$  ; Figure 35D). Ces résultats montrant une absence de modification dans la période, l'amplitude et la régularité de l'oscillation du PM indiquent que l'apprentissage opérant appétitif n'induit pas de plasticité des propriétés pacemaker du neurone B63. Cependant, la comparaison entre les deux groupes du nombre de dépolarisations au cours de l'oscillation qui déclenche des PA et des potentiels de plateau, met en évidence une augmentation significative de l'activité du neurone B63 chez les préparations contingent comparativement à celles témoin (contingent :  $3,11 \pm 2,03$  ; non contingent :  $0,11 \pm 0,11$  ;  $U = 20,5$ ,  $p < 0,05$  : Figure 35E). Par conséquent, bien que les caractéristiques de l'oscillation spontanée du neurone B63 ne soient pas modifiées par l'apprentissage, ce dernier semble augmenter l'excitabilité membranaire de cette cellule.

### 3. Modification des propriétés membranaires intrinsèques du neurone B63

Afin de préciser la nature des modifications induites par l'apprentissage sur l'excitabilité intrinsèque du neurone B63, les seuils de déclenchement des PA et des potentiels de plateau ont été déterminés sur les préparations non contingent et contingent précédentes. Les enregistrements font suites à ceux décrits dans le paragraphe précédent. Le seuil de déclenchement des PA est déterminé par l'intensité minimale d'un créneau de courant dépolarisant d'une seconde, nécessaire pour déclencher un PA (Figure 36A). Le seuil de déclenchement des potentiels de plateau est quantifié par l'intensité minimale d'un créneau de courant dépolarisant de 30 s qui produit une dépolarisation membranaire prolongée au-delà de l'injection de courant (Figure 37A). Les enregistrements électrophysiologiques montrent que le seuil des PA est significativement plus faible chez des préparations issues d'animaux du groupe contingent par rapport à celles issues d'animaux du groupe non contingent (contingent :  $0,89 \pm 0,17$  nA ; non contingent :  $1,44 \pm 0,15$  nA ;



**Figure 35 : Oscillation spontanée du PM de B63 après apprentissage et en condition de blocage des synapses chimiques.**

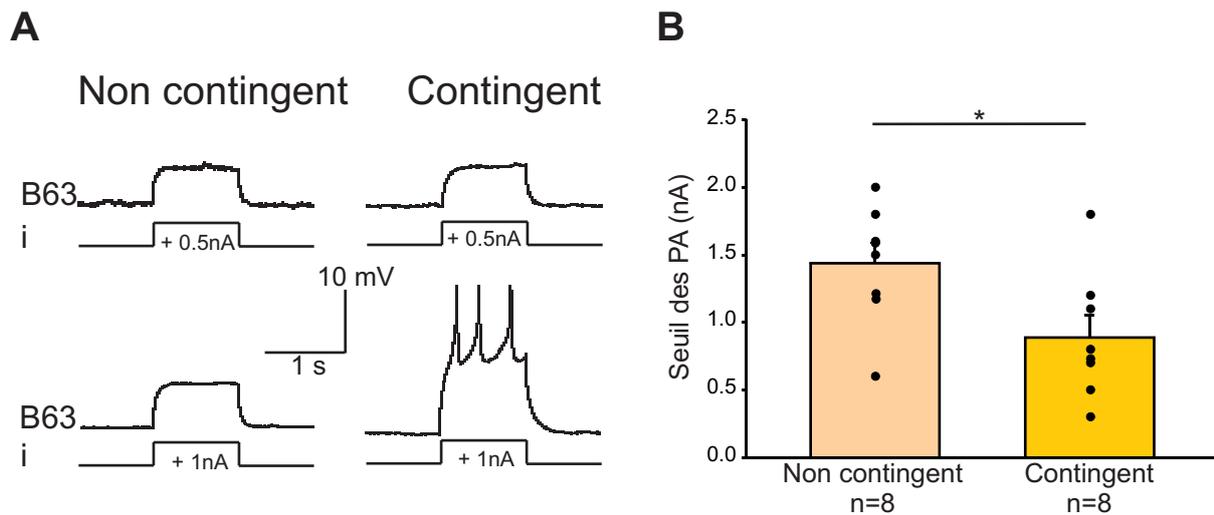
**A.** Exemples d'enregistrements intracellulaires du PM de B63 isolé *in situ* (en solution "Bas  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ") sur des ganglions buccaux d'un animal non contingent (à gauche) et contingent (à droite). Dans tous les cas, le PM minimal de B63 est maintenu à -80 mV par l'injection intracellulaire d'un courant constant empêchant la production spontanée des potentiels de plateau.

**B-C.** Analyse spectrale de la période (B) et de l'amplitude (C) de l'oscillation du PM de B63 entre les deux groupes de préparations (non contingent et contingent). Aucune modification de l'oscillation n'est observée (n.s., non significatif).

**D-E.** Comparaison de la régularité (D) et du nombre d'oscillations supraliminaires (E) du PM de B63 isolé des animaux contingent et non contingent. (n.s., non significatif; \*,  $p < 0,05$ ).

$U = 12,5$  ;  $p < 0,05$  : Figure 36B). En revanche, le seuil de déclenchement des potentiels de plateau reste inchangé entre les deux groupes (contingent :  $1,74 \pm 0,32$  nA ; non contingent :  $1,78 \pm 0,34$  nA ;  $U = 14,5$  ;  $p > 0,05$  ; Figure 37B). Ainsi, il apparaît que l'apprentissage modifie l'excitabilité du neurone décisionnel B63 par une modulation des canaux ioniques impliqués dans la genèse des PA plutôt que ceux responsables de l'émergence des potentiels de plateaux.

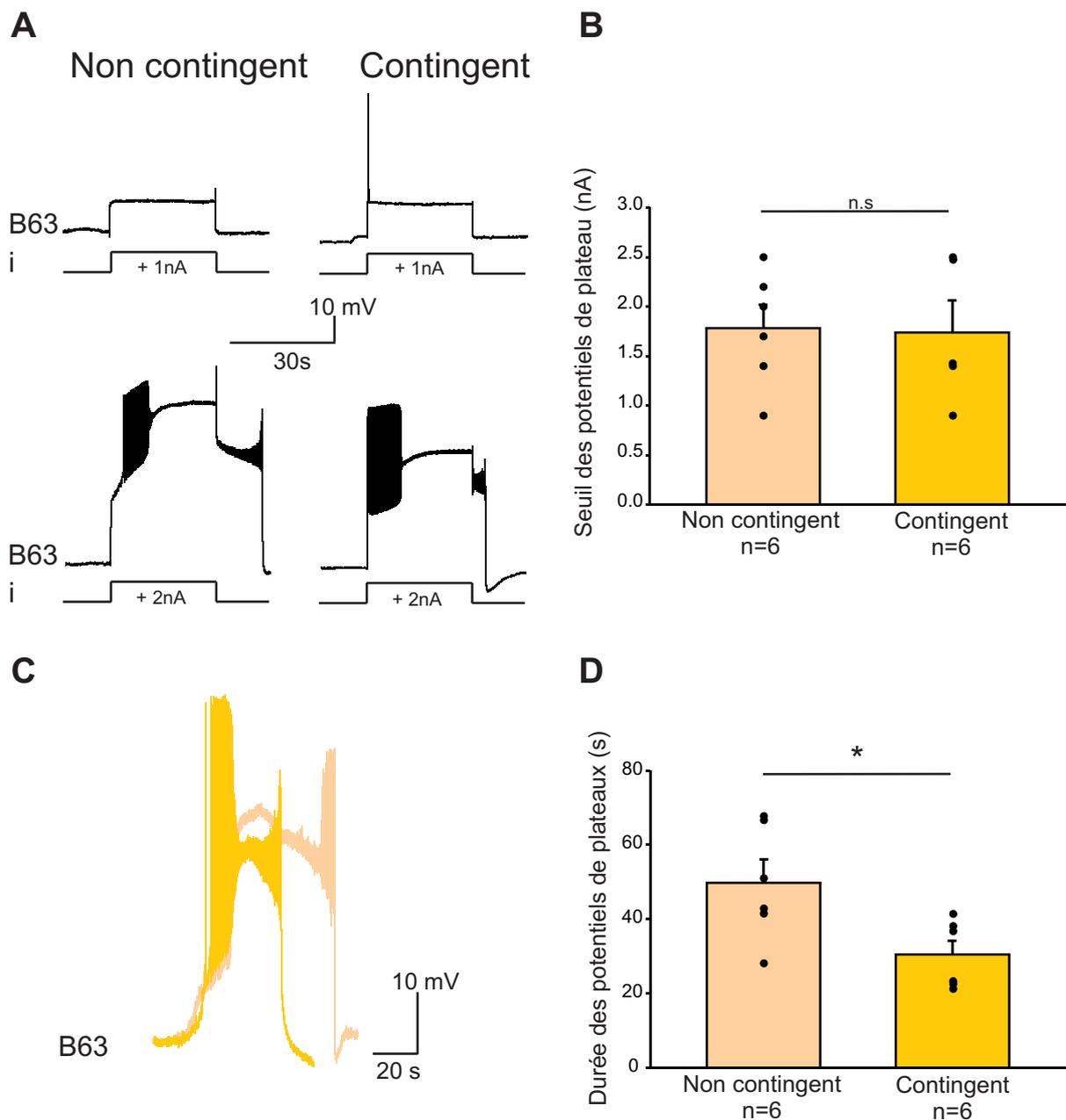
De plus, les enregistrements de B63 mettent en évidence que la durée des potentiels de plateau qui sont émis de manière spontanée est modifiée par l'apprentissage (Figure 37C). Celle-ci est significativement plus brève chez les préparations d'animaux conditionnés par rapport aux préparations témoin (contingent :  $30,43 \pm 3,75$  s ; non contingent :  $49,74 \pm 6,40$  s ;  $U = 3,00$  ;  $p < 0,05$  ; Figure 37D). Par conséquent, si l'apprentissage opérant n'induit pas de modification dans le déclenchement des potentiels de plateau, il module les canaux ioniques impliqués dans le maintien et/ou la terminaison du potentiel de plateau.



**Figure 36 : Modification de l'excitabilité de B63 après apprentissage.**

**A.** Analyse du seuil de genèse des PA de B63 en courant imposé : B63 est isolé *in situ* de ses partenaires du réseau dans un ganglion buccal d'un animal non contingent (à gauche) et contingent (à droite). Le PM initial de B63 est maintenu à -80 mV dans tous les cas. L'injection intracellulaire d'un pulse de courant positif d'1 s (i) et d'intensité croissante (0,5 nA en haut; 1 nA en bas) montre qu'une intensité moindre de courant déclenche les PA de la préparation contingente comparativement à la non contingente. Cela suggère que l'apprentissage augmente l'excitabilité de B63.

**B.** Quantification de l'augmentation d'excitabilité (réduction du seuil de production des PA) de B63 du groupe contingent par rapport au groupe non contingent (\*,  $p < 0,05$ ).



**Figure 37 : Modification du potentiel de plateau de B63 après apprentissage.**

**A.** Analyse du seuil de genèse des potentiels de plateau en courant imposé : la même quantité de courant (i) est nécessaire pour déclencher les potentiels de plateau de B63 isolés *in situ* dans un ganglion buccal du groupe contingent et non contingent. Dans tous les cas, le PM de B63 est initialement maintenu à -80 mV par injection d'un courant constant.

**B.** Comparaison inter-groupes (non contingent , contingent) du seuil de déclenchement des potentiels de plateau (n.s. ; non significatif).

**C-D.** Comparaison de la durée des potentiels de plateau spontanés du groupe non contingent (C, trace beige) et du groupe contingent (C, trace jaune). L'apprentissage réduit significativement la durée des plateaux (D). \*,  $p < 0,05$ .

### III. Discussion

L'objectif de cette étude était de déterminer si un conditionnement opérant qui induit la transition d'une motricité variable à une motricité régulière s'accompagne de modifications des propriétés oscillatoires et pacemaker d'un neurone décisionnel, essentielles à l'émission des patterns radulaires. Nos résultats montrent que l'apprentissage opérant ne modifie pas les propriétés oscillatoires du neurone décisionnel B63, mais augmente son excitabilité et réduit la durée de ses potentiels de plateau et des bouffées de PA associées.

#### 1. Modulation de l'activité spontanée par l'apprentissage opérant

L'apprentissage opérant repose sur l'association d'un stimulus sensoriel à l'exécution d'une action ce qui laisse le choix à l'animal d'orienter ses actes en fonction de leurs conséquences. L'animal est donc acteur de son apprentissage en opérant sur l'environnement. Cette capacité dépend de processus motivationnels et de prise de décision qui ne sont pas déclenchés de façon soudaine et immuable par des stimulations sensorielles, mais repose sur des processus autonomes ou spontanés générés par le système nerveux central. Les analyses de la plasticité cellulaire induite par le conditionnement opérant ont déjà montré qu'elles concernent les processus moteurs ou pré-moteurs responsables de la genèse de l'activité motrice plutôt que les processus d'intégration sensorielle. Chez les vertébrés, le conditionnement opérant du réflexe myotatique trouve son origine dans la plasticité des propriétés fonctionnelles des motoneurones et interneurones spinaux (Wolpaw, 1997). Chez les insectes, des conditionnements opérants du positionnement d'une patte ou de l'orientation dans un simulateur de vol ont été associés à des modifications des motoneurones et concernent respectivement leur activité pacemaker ou biochimique (Woollacott & Hoyle, 1977 ; Hoyle, 1979 ; Colomb & Brembs, 2016). Chez les mollusques, le conditionnement opérant de la respiration pulmonaire, un comportement motivé chez la Lymnée, est associé à la plasticité des interneurones du réseau générateur du pattern moteur respiratoire (Spencer et al., 1999 ; McComb et al., 2005 ; Braun & Lukowiak, 2011). Enfin, chez l'aplysie, la plasticité neuronale qui résulte du conditionnement opérant du comportement de recherche de nourriture est associée à des modifications fonctionnelles des interneurones du réseau générateur du pattern moteur radulaire. Dans ce réseau, elle concerne en partie les neurones décisionnels qui déterminent l'émission ou non du pattern moteur et qui

sélectionnent le type de pattern à émettre (Nargeot & Simmers, 2012). Le neurone B63 par son activité oscillatoire spontanée et pacemaker contribue au mécanisme permettant l'expression ou non d'un pattern moteur. Cependant, le présent travail montre que le conditionnement opérant qui modifie la genèse des patterns moteurs n'est pas associé à une modification de fréquence ou d'amplitude de cette impulsion rythmique.

Chez l'aplysie se comportant, les émissions spontanées des cycles radulaires se produisent peu fréquemment. Aussi, dans le protocole de conditionnement opérant du comportement de recherche de nourriture, les actions radulaires sont incitées par un stimulus appétitif constant. Celui-ci ne déclenche pas les patterns buccaux mais induit un état motivationnel permissif à leur émission autonome. Ce même stimulus est utilisé après l'apprentissage pour révéler les modifications comportementales (Nargeot et al., 2007, 2009). En revanche, sur les préparations de ganglions buccaux isolés d'animaux conditionnés, aucune stimulation sensorielle n'a été utilisée dans cette étude. Dans cette situation, nos résultats ne montrent pas de modification de la fréquence de l'émission spontanée des patterns moteurs, bien qu'une régularisation de leur émission soit observée. Pourtant sur les travaux antérieurs effectués sur des ganglions buccaux isolés d'animaux conditionnés et en présence d'une stimulation électrique tonique d'un nerf sensoriel buccal qui mime la stimulation incitative, les modifications motrices s'expriment telles qu'on les observe *in vivo* (Nargeot et al., 2009 ; Nargeot & Simmers, 2011, 2012 ; Bédécarrats et al., 2013 ; Sieling et al., 2014). Par conséquent, ces résultats suggèrent que les afférences sensorielles incitatives, plutôt que l'oscillation spontanée du neurone B63, contribuent à l'expression de la plasticité motrice et neuronale induite par conditionnement opérant. Cependant, si l'entrée sensorielle contribue à l'expression des modifications motrices, elle n'intervient pas dans le processus d'apprentissage opérant. En effet, la stimulation incitative tonique est utilisée de façon similaire dans le protocole d'association action/récompense (contingence du conditionnement opérant) et dans celui du témoin non contingent. Or après apprentissage, le comportement moteur de ces deux groupes d'animaux est différent (en fréquence et en régularité). Par conséquent, la stimulation sensorielle incitative seule ou en combinaison avec la récompense n'est pas suffisante pour induire la plasticité neuronale et motrice, mais permet d'exprimer de manière comportementale cette plasticité dépendante de la contingence action/récompense.

## 2. Plasticité des propriétés membranaires

L'oscillation spontanée du PM du neurone B63 n'est pas modifiée par l'apprentissage opérant. En revanche, son excitabilité et l'expression de ses potentiels de plateau le sont. Il est établi qu'en plus de la plasticité synaptique, la plasticité des propriétés membranaires des neurones constitue une trace mnésique des apprentissages (Martin & Morris, 2002 ; Mozzachiodi & Byrne, 2010 ; Zhang & Linden, 2003 ; Lisman et al., 2018). D'ailleurs, chez les vertébrés, des conditionnements Pavlovien ont été associés à des modifications de l'excitabilité des neurones pyramidaux corticaux ou hippocampiques (Brons & Woody, 1980 ; Disterhoft et al., 1986 ; Saar & Barkai, 2003). Chez les invertébrés, la première démonstration de changement d'excitabilité neuronale a été reportée dans un conditionnement Pavlovien du comportement phototaxique chez le mollusque *Hermisenda*. Dans ce cas, elle concerne les cellules sensorielles photoréceptrices (Alkon, 1980 ; Crow & Alkon, 1980). Par la suite, chez ce même animal des modifications d'excitabilité membranaire ont été décrites dans les voies interneuronales impliquées dans les réflexes phototaxiques (Crow, 1985b). Des modifications d'excitabilité interneuronale induites par conditionnement Pavlovien ont été décrites également chez *Helix* (Gainutdinov et al., 1998). Ces changements de l'excitabilité neuronale sont aussi induits par des apprentissages opérants et par des apprentissages non associatifs comme la sensibilisation (Woollacott & Hoyle, 1977 ; Antonov et al., 2001 ; Nargeot et al., 2009). Dans tous ces exemples, la plasticité concerne la capacité des neurones à générer des PA en réponse à une dépolarisation le plus souvent d'origine synaptique et parfois d'origine spontanée. En ce sens, nos données obtenues sur B63 confirment la modification d'excitabilité membranaire induite par le conditionnement opérant et qui a déjà été décrite dans les neurones B63/B30/B65 (Sieling et al., 2014). Cependant, cette étude étend ces résultats en montrant que cette hausse de l'excitabilité est également enregistrée sur une cellule isolée de ses partenaires synaptiques, ce qui renforce l'implication de ses propriétés endogènes.

Un résultat nouveau est que l'apprentissage opérant modifie également les propriétés membranaires régénératives du neurone B63 qui lui permettent de produire des potentiels de plateau. Des résultats expérimentaux ont préalablement montré que le conditionnement opérant chez l'aplysie modifie des capacités de déclenchement des potentiels de plateau du neurone décisionnel B51 (Brembs et al., 2002 ; Mozzachiodi et al., 2008). Ici, nos résultats montrent que la plasticité ne concerne pas le seuil de déclenchement de B63 comme chez B51 mais plutôt le mécanisme de la terminaison spontanée des potentiels de plateau. Un tel processus pourrait contribuer à la transition de l'émission irrégulière des PMR des préparations naïves à une émission régulière après apprentissage. En effet, l'oscillation du

PM est un phénomène rythmique sur lequel se greffent les plateaux de durées variables. Or, une régularisation de la durée des plateaux, en particulier en réduisant leur durée pourrait contribuer à synchroniser les bouffées de PA de B63, et donc la production des PMR associés, avec l'oscillation du PM. Cette hypothèse est soutenue par des données expérimentales chez le homard. Chez cet animal, les neurones du réseau générateur du pattern moteur pylorique, isolés de leurs partenaires synaptiques, produisent des potentiels de plateau de durée irrégulière (Elson et al., 1999 ; Selverston et al., 2000). Des méthodes électrophysiologiques couplées à des modélisations informatiques ont mis en évidence que l'arrêt des potentiels de plateau par l'injection d'un courant hyperpolarisant rythmique est suffisant pour induire la transition de l'activité irrégulière à régulière. Autrement dit, contrairement à ce que l'on pourrait penser, les paramètres de l'irrégularité ou de la régularité ne proviennent pas du mode de déclenchement des potentiels de plateau mais de leur terminaison. Nos résultats vont dans ce sens et suggèrent que l'apprentissage opérant, par son action sur la terminaison prématurée des potentiels de plateau, pourrait participer à la régularisation de l'activité de B63 après apprentissage.

### 3. Modulation des canaux ioniques

Quels sont les canaux ioniques membranaires cibles de l'apprentissage opérant qui rendent compte de l'augmentation de l'excitabilité cellulaire de B63 et de la diminution de la durée de ses potentiels de plateau ?

Les modifications d'excitabilité cellulaire induites par des apprentissages sont souvent associées à la modulation de canaux potassiques. En effet, une diminution des courants potassiques voltage-dépendants favorise l'excitabilité neuronale (Klein et al., 1982 ; Alkon et al., 1985 ; Sanchez-Andres & Alkon, 1991 ; Scholz & Byrne, 1987). Les courants de fuite, qui sont impliqués dans le maintien du PM peuvent aussi être responsables de modifications de l'excitabilité des neurones (Zhao et al., 2010 ; Lu et al., 2016 ; Whitaker et al., 2017). Ce deuxième mécanisme pourrait être impliqué dans l'apprentissage opérant appétitif chez l'aplysie. En effet, il a été montré que la diminution artificielle par la technique de dynamic-clamp d'un courant de fuite potassique accroît l'excitabilité de B63 (Sieling et al., 2014). Inversement, chez des préparations d'animaux conditionnés, l'augmentation expérimentale des courants de fuite potassique réduit l'excitabilité de B63 et la ramène à son état naïf. Il est probable que dans nos conditions de synapses chimiques bloquées, la hausse de l'excitabilité neuronale de B63 observée après apprentissage relève d'un

mécanisme équivalent de modulation des propriétés membranaires passives qui concerne les courants de fuite potassique du neurone.

En plus des propriétés membranaires passives, l'apprentissage module les propriétés intrinsèques et dynamiques de plateau du neurone B63. Le seuil de déclenchement des potentiels de plateau n'est pas différent entre les animaux non contingent et les animaux contingent. Cela signifie que les mécanismes de production de ces événements qui sont classiquement décrits comme résultants de l'ouverture de canaux CAN, voltage-dépendants ou non, ou/et de canaux  $\text{Na}^+$  persistants, ne sont pas modifiés par le conditionnement opérant (Russo & Hounsgaard, 1996 ; Hung & Magoski, 2007 ; Bouhadfane et al., 2013). Si le déclenchement des plateaux n'est pas modifié, en revanche, leur terminaison l'est. Dans nos conditions de blocage synaptique, la repolarisation du plateau de B63 ne peut pas résulter d'une influence synaptique inhibitrice, ce qui suggère un mécanisme endogène. De nombreux travaux expérimentaux indiquent que la terminaison spontanée des potentiels de plateau résulte de l'influx de  $\text{K}^+$  avec l'activation de canaux  $\text{K}_{\text{Ca}}$  (Meech & Standen, 1975 ; El Manira et al., 1994 ; Pierrefiche et al., 1995 ; Tabak et al., 2011). Ces canaux potassiques sont activés par l'accumulation de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire lors de la dépolarisation que constitue le plateau. Ils sont une cible des phénomènes modulateurs induits par de nombreux protocoles d'apprentissages et de formation de mémoires (voir Adelman et al., 2012). La réduction de ces courants potassiques est impliquée dans la facilitation de l'apprentissage opérant appétitif chez le rat ou encore d'apprentissages hippocampo-dépendants comme la navigation spatiale ou la reconnaissance d'objets (Saar et al., 1998 ; Messier et al., 1991 ; Stackman et al., 2002). Elle contribue à des augmentations d'excitabilité cellulaire. A l'inverse, leur potentialisation par apprentissage peut réduire l'excitabilité neuronale (Le Ray et al., 2004). Bien que nous n'ayons pas directement testé les effets de l'apprentissage opérant sur les propriétés des canaux  $\text{K}_{\text{Ca}}$  chez B63, on peut supposer la modulation de tels canaux chez les animaux conditionnés qui rendrait compte de la terminaison précoce des potentiels de plateau. Cela pourrait se faire par une modification de leur sensibilité au voltage et/ou au  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire, ou encore par un effet indirect produit par une modulation des canaux calciques (associée à une réduction de l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$ ) lors du potentiel de plateau.

## Discussion générale

Les mécanismes neuronaux à l'origine du déclenchement et de l'expression des réflexes sensori-moteurs, et des comportements rythmiques automatiques ont été largement étudiés. En revanche, la dynamique neuronale à l'origine de l'émergence des comportements motivés et dirigés vers un but n'est que peu connue. Ces comportements complexes et fondamentaux, tels que les comportements alimentaires, sexuels, ou sociaux, s'expriment de façon variable. Ils traduisent la part d'autonomie de l'individu vis-à-vis des automatismes organiques et des contraintes environnementales. L'expression de ces comportements dépend d'un élément essentiel, la prise de décision, qui implique de choisir d'agir ou non et de choisir une stratégie d'action. Cette capacité organisée par le système nerveux central est régulée par deux facteurs : les stimuli sensoriels et leur mise en jeu dans les apprentissages et, les régulations hormonales ou neuromodulatrices associées à une éventuelle contribution au maintien de constantes homéostasiques.

L'aplysie est un modèle animal idéal pour l'analyse des mécanismes neuronaux élémentaires sous-tendant la genèse et la régulation d'un comportement dirigé vers un but. D'une part, les réseaux neuronaux à l'origine du comportement de recherche et de prise de nourriture sont en partie identifiés. D'autre part, l'influence de divers apprentissages et substances neuromodulatrices sur ces comportements ont été décrits. Dans cette thèse, nous allons plus loin dans cette analyse en caractérisant les mécanismes neuronaux élémentaires qui permettent l'émission autonome ou spontanée des actions motrices du comportement alimentaire et leur régulation par des substances neuromodulatrices et un apprentissage par récompense.

### I. Propriétés fonctionnelles des neurones dans un réseau décisionnel

Un résultat important est la mise en évidence que l'émission spontanée de patterns moteurs buccaux de recherche de nourriture pourrait impliquer l'activité d'un neurone pacemaker rythmique au sein des réseaux décisionnels buccaux. Il a été préalablement décrit que ce réseau, chez l'aplysie, partage une partie des caractéristiques organisationnelles et fonctionnelles des réseaux générateurs de patterns moteurs

rythmiques et automatiques (Nargeot & Simmers, 2012). En effet, son fonctionnement, ainsi que la genèse des patterns radulaires, dépendent de l'organisation synaptique et des propriétés membranaires régénératives des neurones. Parmi ces propriétés membranaires endogènes, sont classiquement décrites les propriétés de plateau et les rebonds post-inhibiteurs (Susswein et al., 2002 ; Baxter & Byrne, 1991 ; Kirk & Plummer, 1991 ; Evans & Cropper, 1998). Nos données confirment que le seul neurone nécessaire et suffisant au fonctionnement du réseau buccal est une cellule pacemaker qui produit une impulsion rythmique. En ce sens, cela rapproche le fonctionnement de ce circuit neuronal des réseaux générateurs de patterns rythmiques comme le réseau pylorique responsable de la motricité stomacale des crustacés. Ce dernier est gouverné par un neurone pacemaker ("Anterior Burster", AB) essentiel à l'expression rythmique du pattern pylorique (Miller & Selverston, 1982). En outre, quelques données chez les vertébrés ont mis en avant la présence de neurones pacemaker dans des structures cérébrales qui participent à l'émission du comportement alimentaire. C'est le cas dans le noyau arqué de l'hypothalamus et dans l'hypothalamus latéral, où des neurones peptidergiques montrent des caractéristiques de cellules oscillantes (Eggermann et al., 2003 ; Van den Top et al., 2004). Ces neurones activés par le jeun et inactivés par des signaux de satiété interviendraient dans la libération de peptides conduisant à la prise alimentaire. Nos résultats corroborent ceux obtenus chez les vertébrés, mais vont également plus loin en montrant la relation de causalité directe entre l'activité neuronale pacemaker et l'émission des patterns moteurs lors du comportement de recherche de nourriture.

Si des neurones pacemakers sont essentiels à l'expression des comportements motivés et des comportements rythmiques automatiques, on peut se demander ce qui différencie fondamentalement les propriétés fonctionnelles des réseaux sous-tendant chacun de ces comportements. Notre étude apporte une réponse en montrant que le processus d'oscillation diffère entre ces deux comportements. En effet, les neurones pacemakers, tels que R15 ou AB, génèrent une activité rythmique immuable à partir des propriétés voltage-dépendantes de leurs canaux membranaires. Dans ce cas, chaque dépolarisation produite par l'oscillation déclenche une bouffée de PA qui irrémédiablement initie une activité motrice ou sécrétrice. Dans l'exemple du neurone pacemaker B63, l'oscillation résulte d'un autre mécanisme qui met en jeu une dynamique calcique intracellulaire. Celle-ci produit une oscillation moins régulière et moins ample car elle n'est qu'occasionnellement supraliminaire. Par conséquent, chaque dépolarisation membranaire produite par l'oscillation calcique intracellulaire ne déclenche pas nécessairement une activité neuronale ou motrice, possiblement, en raison de multiples sources de  $Ca^{2+}$  participant à ce mécanisme et/ou de leur interaction et de leur diffusion au sein d'un réseau neuronal couplé électriquement. Il

semble donc qu'on puisse distinguer deux mécanismes de spontanéité neuronale ou motrice: l'un automatique en lien avec la prédominance des propriétés membranaires voltage-dépendantes et qui serait impliqué dans l'expression des comportements rythmiques, l'autre erratique en lien avec la dynamique calcique intracellulaire et qui serait impliqué dans l'impulsion des comportements variables.

## **II. Motivation et vigilance, rôle des substances neuromodulatrices**

L'expression des comportements dirigés vers un but nécessite un niveau de vigilance suffisant de la part de l'organisme. Cet éveil ou cette motivation de l'animal, est en lien avec les stimulations sensorielles ou humorales, et neuromodulatrices. Par exemple, dans l'hypothalamus latéral des vertébrés des neurones orexines sensibles au glucose ou à la leptine sont capables d'intégrer des signaux humoraux provoqués par des déséquilibres homéostasiques, et de propager par leurs projections dans l'ensemble du cerveau et de la moelle épinière, un signal d'éveil qui stimule les structures décisionnelles (cortex préfrontal, ATV) et locomotrices (Adamantidis & De Lecea, 2008). Des transmetteurs modulateurs comme les monoamines, la 5-HT et la DA, ont également un rôle d'éveil et de modulation des comportements dirigés vers un but (Hernardi et al., 2008 ; Monti, 2008 ; Ueno et al., 2012). Ces deux neuromodulateurs peuvent agir de façon spécifique ou en interaction. Ainsi, l'augmentation de la 5-HT dans le NAc, structure cérébrale participant au codage de la récompense et de la motivation, induit une hausse de la DA dans cette même région, par des actions facilitatrices de la vigilance et de l'activité motrice (Sasaki-Adams & Kelley, 2001).

Chez les invertébrés, les facteurs humoraux comme la concentration hémolympatique de glucose ou celle des peptides insuliniques n'ont pas d'effet d'éveil ou de régulateur du comportement alimentaire (Horn et al., 1998). En revanche, les systèmes sérotoninergiques et dopaminergiques restent essentiels. En effet, la concentration hémolympatique de 5-HT varie avec les phases d'activité et d'inactivité du cycle nyctéméral (Levenson et al., 1999). De plus, les stimuli sensoriels alimentaires présents dans l'environnement extérieur de l'animal produisent l'activation tonique de neurones sérotoninergiques qui sont responsables de l'excitation comportementale constituant la phase appétitive ou préparatoire du comportement alimentaire (Kupfermann & Weiss, 1982 ; Jing et al., 2009 ; Han et al., 2010; Schwarz et al., 1990). Quant à la DA, elle joue

essentiellement un rôle phasique dans la production et la récompense des actions motrices. D'une part, des interneurons dopaminergiques (B20/B65) qui sont des éléments intrinsèques du réseau générateur des PMR, sont activés au cours des cycles radulaires (Teyke et al., 1993 ; Kabotyanski et al., 1998). D'autre part, l'ingestion d'aliments (dont les récompenses alimentaires) produit une activation phasique des afférences dopaminergiques du réseau buccal (Brembs et al., 2002).

Le deuxième point important de nos résultats, malgré le caractère préliminaire des données obtenues, a été de montrer que les neuromodulateurs monoaminergiques impliqués dans l'éveil et la motivation comportementale chez l'aplysie ont une action directe sur les propriétés membranaires d'excitabilité et/ou sur les propriétés pacemakers du neurone décisionnel B63. Cependant, la signification de la modulation induite par la 5-HT, d'abord inhibitrice puis oscillatoire, sans induire d'activité motrice, nécessite d'être clarifiée par d'autres expériences. En effet, nos résultats n'excluent pas que les modifications induites par la 5-HT puissent résulter d'un effet de réseau plutôt que de la modulation de la dynamique calcique intracellulaire à l'origine du déclenchement des actes moteurs. Cependant, la dualité entre les effets inhibiteurs et excitateurs se retrouve aussi au niveau comportemental : la période de repos de l'animal est associée à de fortes concentrations de 5-HT hémolymphatique, ce qui suppose un rôle inhibiteur de la 5-HT. En revanche, l'activation tonique et transitoire des neurones sérotoninergiques par les stimuli appétitifs qui sont excitateurs, s'accompagne d'émissions d'actions motrices (Kupfermann et al., 1979 ; Kupfermann & Weiss, 1982). Notre mode d'application de la 5-HT exogène (en bain) sur le ganglion buccal pourrait être plus probablement compatible avec une influence durable comparable à celle produite par la 5-HT circulante dans le cycle circadien du fait d'une modulation d'un grand nombre de neurones à la fois. Ainsi, on peut se demander si les effets de la 5-HT décrits dans nos travaux sur le neurone pacemaker B63 ne traduiraient pas la mise en veille du système nerveux (inhibition de l'activité pacemaker), suivie de la genèse d'une oscillation sans signification motrice pouvant correspondre à un état de sommeil. Bien que les substrats neuronaux de tels mécanismes restent largement méconnus, des états comportementaux similaires à un cycle veille/sommeil et leur influence sur les capacités d'apprentissages ont été rapportés chez l'aplysie (Lyons et al., 2005 ; Vorster et al., 2014 ; Krishnan et al., 2016, 2016 ; Vorster & Born, 2017).

### III. Stimulations sensorielles et apprentissages associatifs

L'émission des comportements dirigés vers un but est régulée par la connaissance des conséquences des actes effectués. Ainsi, un aspect de la motivation comportementale dépend de la capacité de l'animal à atteindre un objectif voulu et à éviter des situations non désirées (LeDoux, 2012). Ce processus organise le comportement exploratoire de l'animal et l'oriente selon l'activation d'afférences sensorielles et les apprentissages vers un comportement habituel ou routinier, ou éventuellement compulsif.

Deux grands apprentissages associatifs interviennent dans la régulation des comportements dirigés vers un but : le conditionnement Pavlovien et le conditionnement opérant. Ces deux apprentissages structurent aussi le comportement alimentaire chez l'aplysie (Lechner et al., 2000a, b ; Brembs et al., 2002). Ils se distinguent par leur protocole d'association et les relations prédictives développées par l'animal. Le conditionnement Pavlovien consiste en l'association contingente de deux stimuli. L'arrivée de l'un permet à l'animal de prédire l'arrivée de l'autre. Dans le conditionnement opérant, l'association contingente concerne l'exécution d'une action et d'un stimulus qui est la conséquence de cette action. L'animal en exécutant l'action (opérant) prédit sa conséquence. En dépit de cette différence de paradigmes, de nombreux points communs sont partagés par ces deux apprentissages (Rescorla & Solomon, 1967 ; Nargeot & Bédécarrats, 2017). Dans les deux cas, un stimulus antécédent est utilisé. Il est explicite dans le cas du conditionnement Pavlovien, c'est le stimulus conditionnel, et, est implicite dans le conditionnement opérant, puisqu'il résulte d'un état motivationnel (par exemple la faim). Les deux apprentissages mettent en jeu un système de récompense pouvant être activé soit par le stimulus inconditionnel dans la contingence Pavlovienne, soit par les conséquences motrices dans la contingence opérante. Enfin, les deux apprentissages impliquent un processus moteur qui est répondant pour l'apprentissage Pavlovien, et opérant dans le second apprentissage. Ces similitudes entre les apprentissages associatifs ont conduit certains auteurs à considérer qu'il n'existe qu'une manière d'apprendre. Elle consisterait à renforcer grâce au système de récompense la relation entre un stimulus anticipateur et la production d'une action (relation stimulus-réponse). D'autres auteurs notent cependant, que les comportements répondants (déclenchés par un stimulus selon une réaction réflexe) et opérants (déclenchés par un processus motivationnel) ne dépendent pas des mêmes processus neuronaux. Aussi, l'identification des processus centraux d'organisation et de déclenchement d'actions motivées, et leur modification par les apprentissages permettraient d'éclaircir cette opposition conceptuelle.

Les études chez les invertébrés, qui permettent des analyses cellulaires détaillées, ont montré l'importance de la plasticité de l'intégration sensori-motrice dans le conditionnement Pavlovien. Celle-ci passe par des modifications des synapses et de l'excitabilité membranaire impliquées dans l'intégration sensori-motrice et facilitant la circulation de l'information sensorielle (stimulus conditionnel) vers les circuits moteurs (Carew et al., 1981 ; Hawkins et al., 1983 ; Antonov et al., 2003 ; Sandoz et al., 2000 ; Crow & Alkon, 1980 ; Kemenes et al., 1997). En revanche, les études de conditionnements opérants chez les invertébrés ont mis en évidence une plasticité neuronale qui concerne, non pas la relation stimulus-réponse, mais les processus centraux qui organisent seuls la genèse des patterns moteurs. Ainsi, le conditionnement opérant a été associé à la plasticité des réseaux décisionnels et générateurs des patterns moteurs et des propriétés neuronales dynamiques ou régénératives de ces réseaux (Hoyle, 1979, 1980 ; Lukowiak et al., 1996 ; Nargeot et al., 2009).

Pour aller plus loin dans cette analyse, nous avons étudié si le conditionnement opérant du comportement de recherche de nourriture chez l'aplysie pouvait modifier le processus décisionnel spontané à l'origine de l'émission des mouvements radulaires (l'opérant). Les résultats obtenus n'ont pas montré de modifications de l'oscillation pacemaker du PM du neurone B63. Néanmoins, des changements liés à la contingence propre au conditionnement opérant ont confirmé la plasticité des propriétés membranaires passives et régénératives de ce neurone qui pourrait être induite par la DA libérée avec l'activation des afférences œsophagiennes monoaminergiques lors de l'obtention de récompense. De plus, la DA a déjà montré sa capacité à modifier l'excitabilité de B63 (Brembs et al., 2002 ; Bédécarrats et al., 2013).

Ainsi ces travaux confirment que les propriétés membranaires au sein d'un réseau décisionnel sont modifiées par l'apprentissage opérant. Cependant, cette plasticité ne semble pas affecter le processus d'impulsion spontanée. Les modifications motrices après l'apprentissage, bien qu'induites dans le réseau décisionnel, requièrent un stimulus incitatif ou anticipateur pour s'exprimer. Ce résultat ne permet pas de confirmer l'hypothèse d'une manière unique d'apprendre par conditionnements associatifs, mais elle ne permet pas non plus d'appuyer l'hypothèse alternative.

## IV. Perspectives

Les travaux présentés dans ce manuscrit contribuent à décrire les processus neuronaux élémentaires à l'origine de l'émission et de la régulation d'un comportement dirigé vers un but. Les questions à approfondir sont celles de l'origine de la transformation d'une impulsion pacemaker rythmique en émissions variables de patterns moteurs. Les variations spontanées d'amplitude de l'oscillation associées à l'émission erratique des patterns moteurs sont-elles une propriété inhérente à la dynamique calcique intracellulaire ou une propriété émergente du réseau neuronal ? Par ailleurs, les mécanismes de la modulation sérotoninergique et leur implication dans l'éveil, la motivation, ou l'interaction avec le processus de récompense et la DA restent à être précisés au niveau neuronal. Dans la même mesure, la contribution des afférences sensorielles incitatives dans les capacités d'apprentissage opérant devra être précisée. Ces stimulations toniques qui motivent l'animal à la recherche de nourriture entrent-elles dans le processus d'apprentissage opérant ? Et si oui, de quelle manière ? Via une participation à l'association action/récompense, ou n'interviennent-elles pas ? Une autre possibilité pourrait être un rôle révélateur des modifications qui résultent de cette contingence. La réponse à ces questions permettrait une description des mécanismes neuronaux essentiels à la genèse des comportements motivés et dirigés vers un but, et de leur apprentissage, pouvant être partagés des espèces les plus simples aux plus complexes.

## Bibliographie

- Adamantidis, A., & De Lecea, L. (2008). Physiological arousal: a role for hypothalamic systems. *Cellular and molecular life sciences*, 65(10), 1475-1488.
- Adams, W. B. (1985). Slow depolarizing and hyperpolarizing currents which mediate bursting in Aplysia neurone R15. *The Journal of physiology*, 360(1), 51-68.
- Adams, W. B., & Benson, J. A. (1985). The generation and modulation of endogenous rhythmicity in the Aplysia bursting pacemaker neurone R15. *Progress in biophysics and molecular biology*, 46(1), 1-49.
- Adams, D. J., & Gage, P. W. (1979). Characteristics of sodium and calcium conductance changes produced by membrane depolarization in an Aplysia neurone. *The Journal of physiology*, 289(1), 143-161.
- Adams, W. B., & Levitan, I. B. (1982). Intracellular injection of protein kinase inhibitor blocks the serotonin-induced increase in K<sup>+</sup> conductance in Aplysia neuron R15. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(12), 3877-3880.
- Adams, W. B., & Levitan, I. B. (1985). Voltage and ion dependences of the slow currents which mediate bursting in Aplysia neurone R15. *The Journal of physiology*, 360(1), 69-93.
- Adelman, J. P., Maylie, J., & Sah, P. (2012). Small-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels: form and function. *Annual review of physiology*, 74, 245-269.
- Adrian, E. D., & Buytendijk, F. J. J. (1931). Potential changes in the isolated brain stem of the goldfish. *The Journal of Physiology*, 71(2), 121-135.
- Alexeeva, V., Borovikov, D., Miller, M. W., Rosen, S. C., & Cropper, E. C. (1998). Effect of a serotonergic extrinsic modulatory neuron (MCC) on radula mechanoafferent function in Aplysia. *Journal of neurophysiology*, 80(4), 1609-1622.
- Alkon, D. L. (1980). Membrane depolarization accumulates during acquisition of an associative behavioral change. *Science*, 210(4476), 1375-1376.
- Alkon, D. L., Sakakibara, M., Forman, R., Harrigan, J., Lederhendler, I., & Farley, J. (1985). Reduction of two voltage-dependent K<sup>+</sup> currents mediates retention of a learned association. *Behavioral and neural biology*, 44(2), 278-300.
- Angstadt, J. D., & Choo, J. J. (1996). Sodium-dependent plateau potentials in cultured Retzius cells of the medicinal leech. *Journal of Neurophysiology*, 76(3), 1491-1502.
- Antonov, I., Antonova, I., Kandel, E. R., & Hawkins, R. D. (2001). The contribution of activity-dependent synaptic plasticity to classical conditioning in Aplysia. *Journal of Neuroscience*, 21(16), 6413-6422.
- Antonov, I., Antonova, I., Kandel, E. R., & Hawkins, R. D. (2003). Activity-dependent presynaptic facilitation and hebbian LTP are both required and interact during classical conditioning in Aplysia. *Neuron*, 37(1), 135-147.

- Bailey, C. H., & Chen, M. (1983). Morphological basis of long-term habituation and sensitization in *Aplysia*. *Science*, *220*(4592), 91-93.
- Balaban, P. M., Vinarskaya, A. K., Zuzina, A. B., Ierusalimsky, V. N., & Malyshev, A. Y. (2016). Impairment of the serotonergic neurons underlying reinforcement elicits extinction of the repeatedly reactivated context memory. *Scientific reports*, *6*, 36933.
- Balleine, B. W. (2005). Neural bases of food-seeking: Affect, arousal and reward in corticostriatolimbic circuits. *Physiology & Behavior*, *86*(5), 717-730.
- Balleine, B. W., Delgado, M. R., & Hikosaka, O. (2007). The Role of the Dorsal Striatum in Reward and Decision-Making. *Journal of Neuroscience*, *27*(31), 8161-8165.
- Balleine, B. W., & Dickinson, A. (1998). Goal-directed instrumental action: Contingency and incentive learning and their cortical substrates. *Neuropharmacology*, *37*(4-5), 407-419.
- Balleine, B. W., & O'Doherty, J. P. (2010). Human and Rodent Homologies in Action Control: Corticostriatal Determinants of Goal-Directed and Habitual Action. *Neuropsychopharmacology*, *35*(1), 48-69.
- Barbas, D., DesGroseillers, L., Castellucci, V. F., Carew, T. J., & Marinesco, S. (2003). Multiple serotonergic mechanisms contributing to sensitization in *aplysia*: evidence of diverse serotonin receptor subtypes. *Learning & Memory*, *10*(5), 373-386.
- Barnes, N. M., & Sharp, T. (1999). A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*, *38*(8), 1083-1152.
- Barnes, S., Syed, N. I., Bulloch, A. G., & Lukowiak, K. (1994). Modulation of ionic currents by dopamine in an interneurone of the respiratory central pattern generator of *Lymnaea stagnalis*. *Journal of experimental biology*, *189*(1), 37-54.
- Barrière, G., Mellen, N., & Cazalets, J.-R. (2004). Neuromodulation of the locomotor network by dopamine in the isolated spinal cord of newborn rat. *European Journal of Neuroscience*, *19*(5), 1325-1335.
- Barron, A. B., Søvik, E., & Cornish, J. L. (2010). The roles of dopamine and related compounds in reward-seeking behavior across animal phyla. *Frontiers in behavioral neuroscience*, *4*, 163.
- Barzilai, A., Kennedy, T. E., Sweatt, J. D., & Kandel, E. R. (1989). 5-HT modulates protein synthesis and the expression of specific proteins during long-term facilitation in *aplysia* sensory neurons. *Neuron*, *2*(6), 1577-1586.
- Baxter, D. A., & Byrne, J. H. (1991). Ionic conductance mechanisms contributing to the electrophysiological properties of neurons. *Current opinion in neurobiology*, *1*(1), 105-112.
- 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*. *Learning & Memory*, *20*(6), 318-327.
- Bennett, M. V. L., & Zukin, R. S. (2004). Electrical Coupling and Neuronal Synchronization in the Mammalian Brain. *Neuron*, *41*(4), 495-511.

- Benninger, R. K., Zhang, M., Head, W. S., Satin, L. S., & Piston, D. W. (2008). Gap junction coupling and calcium waves in the pancreatic islet. *Biophysical journal*, *95*(11), 5048-5061.
- Berger, M., Gray, J. A., & Roth, B. L. (2009). The Expanded Biology of Serotonin. *Annual Review of Medicine*, *60*(1), 355-366.
- Berridge, M. J. (1998). Neuronal calcium signaling. *Neuron*, *21*(1), 13-26.
- Blackwell, K. T. (2006). Subcellular, cellular, and circuit mechanisms underlying classical conditioning in *Hermissenda crassicornis*. *The Anatomical Record Part B: The New Anatomist*, *289B*(1), 25-37.
- Bliss, T. V. P., & Lømo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of Physiology*, *232*(2), 331-356.
- Bobker, D. H., & Williams, J. T. (1990). Ion conductances affected by 5-HT receptor subtypes in mammalian neurons. *TINS* *13*(5), 169 - 173.
- Bouhadfane, M., Tazerart, S., Moqrich, A., Vinay, L., & Brocard, F. (2013). Sodium-Mediated Plateau Potentials in Lumbar Motoneurons of Neonatal Rats. *The Journal of Neuroscience*, *33*(39), 15626-15641.
- Braun, M. H., & Lukowiak, K. (2011). Intermediate and long-term memory are different at the neuronal level in *Lymnaea stagnalis* (L.). *Neurobiology of learning and memory*, *96*(2), 403-416.
- Brembs, B. (2002). Operant Reward Learning in *Aplysia*: Neuronal Correlates and Mechanisms. *Science*, *296*(5573), 1706-1709.
- Brocard, F., Shevtsova, N. A., Bouhadfane, M., Tazerart, S., Heinemann, U., Rybak, I. A., & Vinay, L. (2013). Activity-dependent changes in extracellular Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> reveal pacemakers in the spinal locomotor-related network. *Neuron*, *77*(6), 1047-1054.
- Brons, J. F., & Woody, C. D. (1980). Long-term changes in excitability of cortical neurons after Pavlovian conditioning and extinction. *Journal of Neurophysiology*, *44*(3), 605-615.
- Brown, T. G. (1911). The Intrinsic Factors in the Act of Progression in the Mammal. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *84*(572), 308-319.
- Brunelli, M., Castellucci, V., & Kandel, E. R. (1976). Synaptic facilitation and behavioral sensitization in *Aplysia*: possible role of serotonin and cyclic AMP. *Science*, *194*(4270), 1178-1181.
- Bucher, D., & Marder, E. (2013). SnapShot: Neuromodulation. *Cell*, *155*(2), 482-482.e1.
- Buhl, D. L., Harris, K. D., Hormuzdi, S. G., Monyer, H., & Buzsáki, G. (2003). Selective Impairment of Hippocampal Gamma Oscillations in Connexin-36 Knock-Out Mouse *In Vivo*. *The Journal of Neuroscience*, *23*(3), 1013-1018.

- Burguiere, E., Monteiro, P., Mallet, L., Feng, G., & Graybiel, A. M. (2015). Striatal circuits, habits, and implications for obsessive–compulsive disorder. *Current opinion in neurobiology*, 30, 59-65.
- Byrne, J. H. (1982). Analysis of synaptic depression contributing to habituation of gill-withdrawal reflex in *Aplysia californica*. *Journal of Neurophysiology*, 48(2), 431-438.
- Byrne, J., Castellucci, V., & Kandel, E. R. (1974). Receptive fields and response properties of mechanoreceptor neurons innervating siphon skin and mantle shelf in *Aplysia*. *Journal of Neurophysiology*, 37(5), 1041-1064.
- Byrne, J. H., Castellucci, V. F., & Kandel, E. R. (1978). Contribution of individual mechanoreceptor sensory neurons to defensive gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. *Journal of Neurophysiology*, 41(2), 418-431.
- Canavier, C. C., Clark, J. W., & Byrne, J. H. (1991). Simulation of the bursting activity of neuron R15 in *Aplysia*: role of ionic currents, calcium balance, and modulatory transmitters. *Journal of Neurophysiology*, 66(6), 2107-2124.
- Carew, T. J., Pinsker, H. M., & Kandel, E. R. (1972). Long-term habituation of a defensive withdrawal reflex in *Aplysia*. *Science*, 175(4020), 451-454.
- Carew, T. J., Walters, E. T., & Kandel, E. R. (1981). Classical conditioning in a simple withdrawal reflex in *Aplysia californica*. *Journal of Neuroscience*, 1(12), 1426-1437.
- Castellucci, V., Pinsker, H., Kupfermann, I., & Kandel, E. R. (1970). Neuronal mechanisms of habituation and dishabituation of the gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. *Science*, 167(3926), 1745-1748.
- Castellucci, V., & Kandel, E. (1976). Presynaptic facilitation as a mechanism for behavioral sensitization in *Aplysia*. *Science*, 194(4270), 1176-1178.
- Cazalets, J., Borde, M., & Clarac, F. (1995). Localization and organization of the central pattern generator for hindlimb locomotion in newborn rat. *The Journal of Neuroscience*, 15(7), 4943-4951.
- Cazalets, J. R., Sqalli-Houssaini, Y., & Clarac, F. (1992). Activation of the central pattern generators for locomotion by serotonin and excitatory amino acids in neonatal rat. *The Journal of Physiology*, 455(1), 187-204.
- Chevalier, M., Toporikova, N., Simmers, J., & Thoby-Brisson, M. (2016). Development of pacemaker properties and rhythmogenic mechanisms in the mouse embryonic respiratory network. *Elife*, 5, e16125.
- Cleary, L. J., Byrne, J. H., & Frost, W. N. (1995). Role of interneurons in defensive withdrawal reflexes in *Aplysia*. *Learning and Memory*, 2, 133-151.
- Cohen, A. H., & Wallén, P. (1980). The neuronal correlate of locomotion in fish: Fictive swimming induced in an in vitro preparation of the lamprey spinal cord. *Experimental Brain Research*, 41(1).
- Cole, S. L., Robinson, M. J. F., & Berridge, K. C. (2018). Optogenetic self-stimulation in the nucleus accumbens: D1 reward versus D2 ambivalence. *PloS One*, 13(11), e0207694.

- Colomb, J., & Brembs, B. (2016). PKC in motorneurons underlies self-learning, a form of motor learning in *Drosophila*. *PeerJ*, 4, e1971.
- Connors, B. W., & Long, M. A. (2004). Electrical synapses in the mammalian brain. *Annu. Rev. Neurosci.*, 27, 393-418.
- Cropper, E. C., Evans, C. G., Hurwitz, I., Jing, J., Proekt, A., Romero, A., & Rosen, S. C. (2004). Feeding Neural Networks in the Mollusc *Aplysia*. *Neurosignals*, 13(1-2), 70-86.
- Crow, T. (1985). Conditioned modification of phototactic behavior in *Hermissenda*. II. Differential adaptation of B photoreceptors. *Journal of Neuroscience*, 5(1), 215-223.
- Crow, T. (1988). Cellular and molecular analysis of associative learning and memory in *Hermissenda*. *Trends in Neurosciences*, 11(4), 136-142.
- Crow, T. J., & Alkon, D. L. (1980). Associative behavioral modification in *Hermissenda*: cellular correlates. *Science*, 209(4454), 412-414.
- Cymbalyuk, G. S., Gaudry, Q., Masino, M. A., & Calabrese, R. L. (2002). Bursting in Leech Heart Interneurons: Cell-Autonomous and Network-Based Mechanisms. *The Journal of Neuroscience*, 22(24), 10580-10592.
- Darbon, P., Pignier, C., Niggli, E., & Streit, J. (2002). Involvement of calcium in rhythmic activity induced by disinhibition in cultured spinal cord networks. *Journal of neurophysiology*, 88(3), 1461-1468.
- Darbon, P., Tscherter, A., Yvon, C., & Streit, J. (2003). Role of the electrogenic Na/K pump in disinhibition-induced bursting in cultured spinal networks. *Journal of neurophysiology*, 90(5), 3119-3129.
- Darbon, P., Yvon, C., Legrand, J. C., & Streit, J. (2004). INaP underlies intrinsic spiking and rhythm generation in networks of cultured rat spinal cord neurons. *European Journal of Neuroscience*, 20(4), 976-988.
- Dellow, P. G., & Lund, J. P. (1971). Evidence for central timing of rhythmical mastication. *The Journal of Physiology*, 215(1), 1-13.
- Del Negro, C. A. (2005). Sodium and Calcium Current-Mediated Pacemaker Neurons and Respiratory Rhythm Generation. *Journal of Neuroscience*, 25(2), 446-453.
- de Wit, S., & Dickinson, A. (2009). Associative theories of goal-directed behaviour: a case for animal-human translational models. *Psychological Research PRPF*, 73(4), 463-476.
- Dickinson, A., & Balleine, B. (1994). Motivational control of goal-directed action. *Animal Learning & Behavior*, 22(1), 1-18.
- Dickinson, K. J., Wainwright, M. L., & Mozzachiodi, R. (2015). Change in excitability of a putative decision-making neuron in *Aplysia* serves as a mechanism in the decision not to feed following food satiation. *Behavioural Brain Research*, 281, 131-136.
- Ding, L., & Perkel, D. J. (2002). Dopamine modulates excitability of spiny neurons in the avian basal ganglia. *Journal of Neuroscience*, 22(12), 5210-5218.

- Disterhoft, J. F., Coulter, D. A., & Alkon, D. L. (1986). Conditioning-specific membrane changes of rabbit hippocampal neurons measured in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *83*(8), 2733-2737.
- Draguhn, A., Traub, R. D., Schmitz, D., & Jefferys, J. G. R. (1998). Electrical coupling underlies high-frequency oscillations in the hippocampus in vitro. *Nature*, *394*(6689), 189
- Drummond, A. H., Benson, J. A., & Levitan, I. B. (1980). Serotonin-induced hyperpolarization of an identified Aplysia neuron is mediated by cyclic AMP. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *77*(8), 5013-5017.
- Dulac, C., & Torello, A. T. (2003). Molecular detection of pheromone signals in mammals: From genes to behaviour. *Nature Reviews Neuroscience*, *4*(7), 551-562.
- Dumitriu, B., Cohen, J. E., Wan, Q., Negroiu, A. M., & Abrams, T. W. (2006). Serotonin receptor antagonists discriminate between PKA and PKC-mediated plasticity in Aplysia sensory neurons. *Journal of neurophysiology*, *95*(4), 2713-2720.
- Eaton, R. C., Bombardieri, R. A., & Meyer, D. L. (1977). The Mauthner-initiated startle response in teleost fish. *Journal of Experimental Biology*, *66*(1), 65-81.
- Eaton, R. C., Lee, R. K. K., & Foreman, M. B. (2001). The Mauthner cell and other identified neurons of the brainstem escape network of fish. *Progress in neurobiology*, *63*(4), 467-485.
- Eggermann, E., Bayer, L., Serafin, M., Saint-Mleux, B., Bernheim, L., Machard, D., Jones, B. E., & Mühlethaler, M. (2003). The wake-promoting hypocretin–orexin neurons are in an intrinsic state of membrane depolarization. *Journal of Neuroscience*, *23*(5), 1557-1562.
- Ekerot, C. F., & Kano, M. (1985). Long-term depression of parallel fibre synapses following stimulation of climbing fibres. *Brain research*, *342*(2), 357-360.
- el Manira, A., Tegner, J., & Grillner, S. (1994). Calcium-dependent potassium channels play a critical role for burst termination in the locomotor network in lamprey. *Journal of Neurophysiology*, *72*(4), 1852-1861.
- Elson, R. C., Huerta, R., Abarbanel, H. D., Rabinovich, M. I., & Selverston, A. I. (1999). Dynamic control of irregular bursting in an identified neuron of an oscillatory circuit. *Journal of Neurophysiology*, *82*(1), 115-122.
- Evans, C. G., & Cropper, E. C. (1998). Proprioceptive Input to Feeding Motor Programs in Aplysia. *Journal of Neuroscience*, *18*(19), 8016-8031.
- Everitt, B. J. (1990). Sexual motivation: A neural and behavioural analysis of the mechanisms underlying appetitive and copulatory responses of male rats. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *14*(2), 217-232.
- Everitt, B. J., & Robbins, T. W. (2016). Drug addiction: updating actions to habits to compulsions ten years on. *Annual review of psychology*, *67*, 23-50.
- Floresco, S. B. (2015). The Nucleus Accumbens : An Interface Between Cognition, Emotion, and Action. *Annual Review of Psychology*, *66*(1), 25-52.

- Floresco, S. B., Montes, D. R., Tse, M. M. T., & van Holstein, M. (2018). Differential Contributions of Nucleus Accumbens Subregions to Cue-Guided Risk/Reward Decision Making and Implementation of Conditional Rules. *The Journal of Neuroscience*, *38*(8), 1901-1914.
- Freeman, J. H. (2015). Cerebellar learning mechanisms. *Brain Research*, *1621*, 260-269.
- French, A. S., Simcock, K. L., Rolke, D., Gartside, S. E., Blenau, W., & Wright, G. A. (2014). The role of serotonin in feeding and gut contractions in the honeybee. *Journal of Insect Physiology*, *61*, 8-15.
- Gainutdinov, K. L., Chekmarev, L. J., & Gainutdinova, T. H. (1998). Excitability increase in withdrawal interneurons after conditioning in snail. *Neuroreport*, *9*(3), 517-520.
- Gardam, K. E., Geiger, J. E., Hickey, C. M., Hung, A. Y., & Magoski, N. S. (2008). Flufenamic acid affects multiple currents and causes intracellular  $Ca^{2+}$  release in *Aplysia* bag cell neurons. *Journal of neurophysiology*, *100*(1), 38-49.
- Gasparini, S., & DiFrancesco, D. (1999). Action of serotonin on the hyperpolarization-activated cation current (I<sub>h</sub>) in rat CA1 hippocampal neurons. *European Journal of Neuroscience*, *11*(9), 3093-3100.
- Geiger, J. E., & Magoski, N. S. (2008).  $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$  release in *Aplysia* bag cell neurons requires interaction between mitochondrial and endoplasmic reticulum stores. *Journal of neurophysiology*, *100*(1), 24-37.
- Giaume, C., & Venance, L. (1998). Intercellular calcium signaling and gap junctional communication in astrocytes. *Glia*, *24*(1), 50-64.
- Gillan, C. M., & Robbins, T. W. (2014). Goal-directed learning and obsessive-compulsive disorder. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *369*(1655), 20130475.
- Giurfa, M., & Sandoz, J.-C. (2012). Invertebrate learning and memory : Fifty years of olfactory conditioning of the proboscis extension response in honeybees. *Learning & Memory*, *19*(2), 54-66.
- Gorelova, N. A., & Yang, C. R. (2000). Dopamine D1/D5 receptor activation modulates a persistent sodium current in rat prefrontal cortical neurons in vitro. *Journal of Neurophysiology*, *84*(1), 75-87.
- Grasselli, G., & Hansel, C. (2014). Cerebellar long-term potentiation: cellular mechanisms and role in learning. In *International review of neurobiology*. *117*, 39-51.
- Groten, C. J., Rebane, J. T., Blohm, G., & Magoski, N. S. (2013). Separate  $Ca^{2+}$  Sources Are Buffered by Distinct  $Ca^{2+}$  Handling Systems in *Aplysia* Neuroendocrine Cells. *Journal of Neuroscience*, *33*(15), 6476-6491.
- Gu, X., Olson, E. C., & Spitzer, N. C. (1994). Spontaneous neuronal calcium spikes and waves during early differentiation. *Journal of Neuroscience*, *14*(11), 6325-6335.
- Hajnóczky, G., Robb-Gaspers, L. D., Seitz, M. B., & Thomas, A. P. (1995). Decoding of cytosolic calcium oscillations in the mitochondria. *Cell*, *82*(3), 415-424.

- Han, J., Janes, T., & Lukowiak, K. (2010). The role of serotonin in the enhancement of long-term memory resulting from predator detection in *Lymnaea*. *Journal of Experimental Biology*, 213(21), 3603-3614.
- Hardy, K. R. (1964). An appetitional theory of sexual motivation. *Psychological Review*, 71(1), 1.
- Harris-Warrick, R. M. (2002). Voltage-sensitive ion channels in rhythmic motor systems. *Current opinion in neurobiology*, 12(6), 646-651.
- Harris-Warrick, R. M. (2010). General Principles of Rhythmogenesis in Central Pattern Generator Networks. In *Progress in Brain Research*. 187, 213-222
- Harris-Warrick, R. M. (2011). Neuromodulation and flexibility in central pattern generator networks. *Current opinion in neurobiology*, 21(5), 685-692.
- Harris-Warrick, R. M., Coniglio, L. M., Levini, R. M., Gueron, S., & Guckenheimer, J. (1995). Dopamine modulation of two subthreshold currents produces phase shifts in activity of an identified motoneuron. *Journal of neurophysiology*, 74(4), 1404-1420.
- Harris-Warrick, R. M., & Flamm, R. E. (1987). Multiple mechanisms of bursting in a conditional bursting neuron. *Journal of Neuroscience*, 7(7), 2113-2128.
- Hartline, D. K., & Maynard, D. M. (1975). Motor patterns in the stomatogastric ganglion of the lobster *Panulirus argus*. *Journal of Experimental Biology*, 62(2), 405-420.
- Hawkins, R. D., Abrams, T. W., Carew, T. J., & Kandel, E. R. (1983). A cellular mechanism of classical conditioning in *Aplysia*: activity-dependent amplification of presynaptic facilitation. *Science*, 219(4583), 400-405.
- Hawkins, R. D., & Byrne, J. H. (2015). Associative learning in invertebrates. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(5), a021709.
- Hawkins, R. D., Castellucci, V. F., & Kandel, E. R. (1981). Interneurons involved in mediation and modulation of gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. I. Identification and characterization. *Journal of Neurophysiology*, 45(2), 304-314.
- Henze, D. A., González-Burgos, G. R., Urban, N. N., Lewis, D. A., & Barrionuevo, G. (2000). Dopamine increases excitability of pyramidal neurons in primate prefrontal cortex. *Journal of neurophysiology*, 84(6), 2799-2809.
- Hernádi, L., Kárpáti, L., Győri, J., Vehovszky, Á., & Hiripi, L. (2008). Humoral serotonin and dopamine modulate the feeding in the snail, *Helix pomatia*. *Acta Biologica Hungarica*, 59(Supplement 2), 39-46.
- Hernández-Cruz, A., Escobar, A. L., & Jiménez, N. (1997).  $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$  release phenomena in mammalian sympathetic neurons are critically dependent on the rate of rise of trigger  $Ca^{2+}$ . *The Journal of general physiology*, 109(2), 147-167.
- Hickey, C. M., Geiger, J. E., Groten, C. J., & Magoski, N. S. (2010). Mitochondrial  $Ca^{2+}$  Activates a Cation Current in *Aplysia* Bag Cell Neurons. *Journal of Neurophysiology*, 103(3), 1543-1556.

- Hickey, C. M., Groten, C. J., Sham, L., Carter, C. J., & Magoski, N. S. (2013). Voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  influx and mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  initiate secretion from Aplysia neuroendocrine cells. *Neuroscience*, 250, 755-772.
- Hochner, B., & Kandel, E. R. (1992). Modulation of a transient  $\text{K}^+$  current in the pleural sensory neurons of Aplysia by serotonin and cAMP: implications for spike broadening. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(23), 11476-11480.
- Horn, C. C., Koester, J., & Kupfermann, I. (1998). Evidence that hemolymph glucose in Aplysia californica is regulated but does not affect feeding behavior. *Behavioral neuroscience*, 112(5), 1258.
- Hounsgaard, J., & Kjaerulff, O. (1992).  $\text{Ca}^{2+}$ -Mediated Plateau Potentials in a Subpopulation of Interneurons in the Ventral Horn of the Turtle Spinal Cord. *European Journal of Neuroscience*, 4(2), 183-188.
- Hoyle, G. (1979). Mechanisms of simple motor learning. *Trends in Neurosciences*, 2, 153-155.
- Hoyle, G. (1980). Learning using natural reinforcements in insect preparations that permit cellular neuronal analysis. *Journal of neurobiology*, 11(4), 323-354.
- Hung, A. Y., & Magoski, N. S. (2007). Activity-dependent initiation of a prolonged depolarization in Aplysia bag cell neurons: role for a cation channel. *Journal of Neurophysiology*, 97(3), 2465-2479.
- Hurwitz, I., Kupfermann, I., & Susswein, A. J. (1997). Different roles of neurons B63 and B34 that are active during the protraction phase of buccal motor programs in Aplysia californica. *Journal of Neurophysiology*, 78(3), 1305-1319.
- Hurwitz, I., Ophir, A., Korngreen, A., Koester, J., & Susswein, A. J. (2008). Currents contributing to decision making in neurons B31/B32 of Aplysia. *Journal of neurophysiology*, 99(2), 814-830.
- Hurwitz, I., & Susswein, A. J. (1996). B64, a newly identified central pattern generator element producing a phase switch from protraction to retraction in buccal motor programs of Aplysia californica. *Journal of Neurophysiology*, 75(4), 1327-1344.
- Ishii, K., Hirose, K., & Iino, M. (2006).  $\text{Ca}^{2+}$  shuttling between endoplasmic reticulum and mitochondria underlying  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations. *EMBO reports*, 7(4), 390-396.
- Jackson, J. G., & Thayer, S. A. (2006). Mitochondrial modulation of  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$ -release in rat sensory neurons. *Journal of neurophysiology*, 96(3), 1093-1104.
- Jasinski, P. E., Molkov, Y. I., Shevtsova, N. A., Smith, J. C., & Rybak, I. A. (2013). Sodium and calcium mechanisms of rhythmic bursting in excitatory neural networks of the pre-Bötzinger complex: a computational modelling study. *European Journal of Neuroscience*, 37(2), 212-230.
- Jing, J., Gillette, R., & Weiss, K. R. (2009). Evolving concepts of arousal: insights from simple model systems. *Reviews in the neurosciences*, 20(5-6), 405-428.

- Jing, J., Vilim, F. S., Horn, C. C., Alexeeva, V., Hatcher, N. G., Sasaki, K., Yashina, I. Zhurov, I. Kupfermann, Y. Sweedler, J. V and Weiss, K. R. (2007). From Hunger to Satiety : Reconfiguration of a Feeding Network by Aplysia Neuropeptide Y. *Journal of Neuroscience*, 27(13), 3490-3502.
- Johnson, B. R., Kloppenburg, P., & Harris-Warrick, R. M. (2003). Dopamine modulation of calcium currents in pyloric neurons of the lobster stomatogastric ganglion. *Journal of neurophysiology*, 90(2), 631-643.
- Johnson, B. R., Peck, J. H., & Harris-Warrick, R. M. (1993). Amine modulation of electrical coupling in the pyloric network of the lobster stomatogastric ganglion. *Journal of Comparative Physiology A*, 172(6), 715-732.
- Johnson, S. W., Seutin, V., & North, R. A. (1992). Burst firing in dopamine neurons induced by N-methyl-D-aspartate: role of electrogenic sodium pump. *Science*, 258(5082), 665-667.
- Jordan, L. M., & Sławińska, U. (2011). Modulation of rhythmic movement: control of coordination. In *Progress in brain research*. 188, 181-195.
- Kabotyanski, E. A., Baxter, D. A., & Byrne, J. H. (1998). Identification and characterization of catecholaminergic neuron B65, which initiates and modifies patterned activity in the buccal ganglia of Aplysia. *Journal of Neurophysiology*, 79(2), 605-621.
- Kabotyanski, E. A., Baxter, D. A., Cushman, S. J., & Byrne, J. H. (2000). Modulation of Fictive Feeding by Dopamine and Serotonin in Aplysia. *Journal of Neurophysiology*, 83(1), 374-392.
- Kachoei, B. A., Knox, R. J., Uthuzza, D., Levy, S., Kaczmarek, L. K., & Magoski, N. S. (2006). A store-operated Ca<sup>2+</sup> influx pathway in the bag cell neurons of Aplysia. *Journal of neurophysiology*, 96(5), 2688-2698.
- Kadiri, L. R., Kwan, A. C., Webb, W. W., & Harris-Warrick, R. M. (2011). Dopamine-induced oscillations of the pyloric pacemaker neuron rely on release of calcium from intracellular stores. *Journal of neurophysiology*, 106(3), 1288-1298.
- Kandel, E. R. (2001). The Molecular Biology of Memory Storage : A Dialogue Between Genes and Synapses. *Science*, 294(5544), 1030-1038.
- Katz, P. S., & Frost, W. N. (1995). Intrinsic neuromodulation in the Tritonia swim CPG : Serotonin mediates both neuromodulation and neurotransmission by the dorsal swim interneurons. *Journal of Neurophysiology*, 74(6), 2281-2294.
- Katz, Paul S. (1995). Intrinsic and extrinsic neuromodulation of motor circuits. *Current Opinion in Neurobiology*, 5(6), 799-808.
- Kelley, A. E., & Berridge, K. C. (2002). The Neuroscience of Natural Rewards : Relevance to Addictive Drugs. *The Journal of Neuroscience*, 22(9), 3306-3311.
- Kemenes, G., Staras, K., & Benjamin, P. R. (1997). In vitro appetitive classical conditioning of the feeding response in the pond snail Lymnaea stagnalis. *Journal of Neurophysiology*, 78(5), 2351-2362.

- Kirichok, Y., Krapivinsky, G., & Clapham, D. E. (2004). The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature*, *427*(6972), 360.
- Klein, M. O., Battagello, D. S., Cardoso, A. R., Hauser, D. N., Bittencourt, J. C., & Correa, R. G. (2019). Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *39*(1), 31-59.
- Klein, M., Camardo, J., & Kandel, E. R. (1982). Serotonin modulates a specific potassium current in the sensory neurons that show presynaptic facilitation in *Aplysia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *79*(18), 5713-5717.
- Klein, M., & Kandel, E. R. (1978). Presynaptic modulation of voltage-dependent  $Ca^{2+}$  current: Mechanism for behavioral sensitization in *Aplysia californica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *75*(7), 3512-3516.
- Kloppenborg, P., Ferns, D., & Mercer, A. R. (1999). Serotonin enhances central olfactory neuron responses to female sex pheromone in the male sphinx moth *Manduca sexta*. *Journal of Neuroscience*, *19*(19), 8172-8181.
- Kloppenborg, P., Zipfel, W. R., Webb, W. W., & Harris-Warrick, R. M. (2000). Highly Localized  $Ca^{2+}$  Accumulation Revealed by Multiphoton Microscopy in an Identified Motoneuron and Its Modulation by Dopamine. *The Journal of Neuroscience*, *20*(7), 2523-2533.
- Kortus, S., Srinivasan, C., Forostyak, O., Ueta, Y., Sykova, E., Chvatal, A., Zapotocki, M., Verkhatsky, A., & Dayanithi, G. (2016). Physiology of spontaneous  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations in the isolated vasopressin and oxytocin neurones of the rat supraoptic nucleus. *Cell calcium*, *59*(6), 280-288.
- Koshiya, N., & Smith, J. C. (1999). Neuronal pacemaker for breathing visualized in vitro. *Nature*, *400*(6742), 360.
- Kramer, R. H., & Zucker, R. S. (1985). Calcium-dependent inward current in *Aplysia* bursting pacemaker neurones. *The Journal of Physiology*, *362*(1), 107-130.
- Krasne, F. B. (2002). Modulation of the Crayfish Escape Reflex-Physiology and Neuroethology. *Integrative and Comparative Biology*, *42*(4), 705-715.
- Krishnan, H. C., Gandour, C. E., Ramos, J. L., Wrinkle, M. C., Sanchez-Pacheco, J. J., & Lyons, L. C. (2016). Acute sleep deprivation blocks short-and long-term operant memory in *Aplysia*. *Sleep*, *39*(12), 2161-2171.
- Krishnan, H. C., Noakes, E. J., & Lyons, L. C. (2016). Chronic sleep deprivation differentially affects short and long-term operant memory in *Aplysia*. *Neurobiology of learning and memory*, *134*, 349-359.
- Kristan, W. B., Calabrese, R. L., & Friesen, W. O. (2005). Neuronal control of leech behavior. *Progress in Neurobiology*, *76*(5), 279-327.
- Kröner, S., Rosenkranz, J. A., Grace, A. A., & Barrionuevo, G. (2005). Dopamine modulates excitability of basolateral amygdala neurons in vitro. *Journal of neurophysiology*, *93*(3), 1598-1610.

- Kupfermann, I. (1974). Feeding behavior in *Aplysia*: A simple system for the study of motivation. *Behavioral Biology*, *10*(1), 1-26.
- Kupfermann, I., Cohen, J. L., Mandelbaum, D. E., Schonberg, M., Susswein, A. J., & Weiss, K. R. (1979). Functional role of serotonergic neuromodulation in *Aplysia*. In *Federation Proceedings*. *38*(7), 2095-2102.
- Kupfermann, I., & Kandel, E. R. (1969). Neuronal controls of a behavioral response mediated by the abdominal ganglion of *Aplysia*. *Science*, *164*(3881), 847-850.
- Kupfermann, I., & Weiss, K. R. (1982). Activity of an identified serotonergic neuron in free moving *Aplysia* correlates with behavioral arousal. *Brain Research*, *241*(2), 334-337.
- Kuslansky, B., Weiss, K. R., & Kupfermann, I. (1978). A neural pathway mediating satiation of feeding behavior in *Aplysia*. *Behavioral Biology*, *23*(2), 230-237.
- Lechner, H. A., Baxter, D. A., & Byrne, J. H. (2000). Classical conditioning of feeding in *Aplysia*: I. Behavioral analysis. *Journal of Neuroscience*, *20*(9), 3369-3376.
- Lechner, H. A., Baxter, D. A., & Byrne, J. H. (2000). Classical conditioning of feeding in *Aplysia*: II. Neurophysiological correlates. *Journal of Neuroscience*, *20*(9), 3377-3386.
- Lechner, H. A., Baxter, D. A., Clark, J. W., & Byrne, J. H. (1996). Bistability and its regulation by serotonin in the endogenously bursting neuron R15 in *Aplysia*. *Journal of neurophysiology*, *75*(2), 957-962.
- LeDoux, J. (2012). Rethinking the emotional brain. *Neuron*, *73*(4), 653-676.
- Lee, Y.-S., Choi, S.-L., Lee, S.-H., Kim, H., Park, H., Lee, N., Lee, S.-H., Chae, Y.-S., Jang, D.-J., Kandel, E. R., & Kaang, B.-K. (2009). Identification of a serotonin receptor coupled to adenylyl cyclase involved in learning-related heterosynaptic facilitation in *Aplysia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(34), 14634-14639.
- Le Ray, D., Fernández De Sevilla, D., Belén Porto, A., Fuenzalida, M., & Buno, W. (2004). Heterosynaptic metaplastic regulation of synaptic efficacy in CA1 pyramidal neurons of rat hippocampus. *Hippocampus*, *14*(8), 1011-1025.
- Levenson, J., Byrne, J. H., & Eskin, A. (1999). Levels of serotonin in the hemolymph of *Aplysia* are modulated by light/dark cycles and sensitization training. *Journal of Neuroscience*, *19*(18), 8094-8103.
- Lewis, K. J., Frikha-Benayed, D., Louie, J., Stephen, S., Spray, D. C., Thi, M. M., Seref-Ferlengez, Z., Majeska, R. J., Weinbaum, S., & Schaffler, M. B. (2017). Osteocyte calcium signals encode strain magnitude and loading frequency in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(44), 11775-11780.
- Leybaert, L., & Sanderson, M. J. (2012). Intercellular Ca<sup>2+</sup> waves: mechanisms and function. *Physiological reviews*, *92*(3), 1359-1392.
- Leznik, E., & Llinás, R. (2005). Role of Gap Junctions in Synchronized Neuronal Oscillations in the Inferior Olive. *Journal of Neurophysiology*, *94*(4), 2447-2456.

- Li, X. C., Giot, J. F., Kuhl, D., Hen, R., & Kandel, E. R. (1995). Cloning and characterization of two related serotonergic receptors from the brain and the reproductive system of *Aplysia* that activate phospholipase C. *Journal of Neuroscience*, *15*(11), 7585-7591.
- Lisman, J., Cooper, K., Sehgal, M., & Silva, A. J. (2018). Memory formation depends on both synapse-specific modifications of synaptic strength and cell-specific increases in excitability. *Nature neuroscience*, *21*(3), 309-314.
- Liu, Z., Bunney, E. B., Appel, S. B., & Brodie, M. S. (2003). Serotonin reduces the hyperpolarization-activated current (I<sub>h</sub>) in ventral tegmental area dopamine neurons: involvement of 5-HT<sub>2</sub> receptors and protein kinase C. *Journal of neurophysiology*, *90*(5), 3201-3212.
- Liu, H. N., Hirata, H., Okuno, Y., Okabe, M., & Furukawa, K. (2018). Dopamine and Serotonin Receptors Cooperatively Modulate Pacemaker Activity of Intestinal Cells of *Cajal*. *The Chinese journal of physiology*, *61*(5), 302-312.
- Liu, H. N., Ohya, S., Nishizawa, Y., Sawamura, K., Iino, S., Syed, M. M., Goto, K., Imaizumi, Y., & Nakayama, S. (2011). Serotonin augments gut pacemaker activity via 5-HT<sub>3</sub> receptors. *PLoS One*, *6*(9), e24928.
- Loewenstein, Y., Yarom, Y., & Sompolinsky, H. (2001). The generation of oscillations in networks of electrically coupled cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(14), 8095-8100.
- López-Crisosto, C., Bravo-Sagua, R., Rodríguez-Peña, M., Mera, C., Castro, P. F., Quest, A. F., Rothermel, B. A., Cifuentes, M., & Lavandero, S. (2015). ER-to-mitochondria miscommunication and metabolic diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, *1852*(10), 2096-2105.
- Lorenzetti, F. D., Mozzachiodi, R., Baxter, D. A., & Byrne, J. H. (2006). Classical and operant conditioning differentially modify the intrinsic properties of an identified neuron. *Nature neuroscience*, *9*(1), 17.
- Lotshaw, D. P., & Levitan, I. B. (1987). Serotonin and forskolin increase an inwardly rectifying potassium conductance in cultured identified *Aplysia* neurons. *Journal of neurophysiology*, *58*(5), 909-921.
- Lu, T. Z., Kostelecki, W., Sun, C. L. F., Dong, N., Pérez Velázquez, J. L., & Feng, Z. P. (2016). High sensitivity of spontaneous spike frequency to sodium leak current in a *Lymnaea* pacemaker neuron. *European Journal of Neuroscience*, *44*(12), 3011-3022.
- Lucki, I. (1998). The spectrum of behaviors influenced by serotonin. *Biological Psychiatry*, *44*(3), 151-162.
- Lukowiak, K., Ringseis, E., Spencer, G., Wildering, W., & Syed, N. (1996). Operant conditioning of aerial respiratory behaviour in *Lymnaea stagnalis*. *Journal of Experimental Biology*, *199*(3), 683-691.
- Lyons, L. C., Rawashdeh, O., Katzoff, A., Susswein, A. J., & Eskin, A. (2005). Circadian modulation of complex learning in diurnal and nocturnal *Aplysia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(35), 12589-12594.

- Maccaferri, G., & McBain, C. J. (1996). The hyperpolarization-activated current (I<sub>h</sub>) and its contribution to pacemaker activity in rat CA1 hippocampal stratum oriens-alveus interneurons. *The Journal of Physiology*, 497(1), 119-130.
- MacDonald, P. E., & Rorsman, P. (2006). Oscillations, intercellular coupling, and insulin secretion in pancreatic  $\beta$  cells. *PLoS biology*, 4(2), e49.
- Magalhães, C. P., de Freitas, M. F. L., Nogueira, M. I., Campina, R. C. de F., Takase, L. F., de Souza, S. L., & de Castro, R. M. (2010). Modulatory role of serotonin on feeding behavior. *Nutritional Neuroscience*, 13(6), 246-255.
- Manor, Y., Rinzel, J., Segev, I., & Yarom, Y. (1997). Low-Amplitude Oscillations in the Inferior Olive: A Model Based on Electrical Coupling of Neurons With Heterogeneous Channel Densities. *Journal of Neurophysiology*, 77(5), 2736-2752.
- Marder, E., & Bucher, D. (2001). Central pattern generators and the control of rhythmic movements. *Current Biology*, 11(23), R986-R996.
- Marder, E., Bucher, D., Schulz, D. J., & Taylor, A. L. (2005). Invertebrate Central Pattern Generation Moves along. *Current Biology*, 15(17), R685-R699.
- Marder, E., & Calabrese, R. L. (1996). Principles of rhythmic motor pattern generation. *Physiological Reviews*, 76(3), 687-717.
- Marinesco, S., Kolkman, K. E., & Carew, T. J. (2004). Serotonergic modulation in Aplysia. I. Distributed serotonergic network persistently activated by sensitizing stimuli. *Journal of neurophysiology*, 92(4), 2468-2486.
- Martin, S. J., & Morris, R. G. M. (2002). New life in an old idea: the synaptic plasticity and memory hypothesis revisited. *Hippocampus*, 12(5), 609-636.
- Martínez-Rubio, C., Serrano, G. E., & Miller, M. W. (2009). Localization of biogenic amines in the foregut of Aplysia californica: catecholaminergic and serotonergic innervation. *Journal of Comparative Neurology*, 514(4), 329-342.
- McComb, C., Rosenegger, D., Varshney, N., Kwok, H. Y., & Lukowiak, K. (2005). Operant conditioning of an in vitro CNS-pneumostome preparation of Lymnaea. *Neurobiology of learning and memory*, 84(1), 9-24.
- McCormick, D. A., & Pape, H. C. (1990). Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurones. *The Journal of Physiology*, 431(1), 291-318.
- Medan, V., & Preuss, T. (2014). The Mauthner-cell circuit of fish as a model system for startle plasticity. *Journal of Physiology-Paris*, 108(2-3), 129-140.
- Meech, R. W., & Standen, N. B. (1975). Potassium activation in Helix aspersa neurones under voltage clamp: A component mediated by calcium influx. *The Journal of Physiology*, 249(2), 211-259.
- Mercuri, N. B., Bonci, A., Calabresi, P., Stefani, A., & Bernardi, G. (1995). Properties of the Hyperpolarization-activated Cation Current I<sub>h</sub> in Rat Midbrain Dopaminergic Neurons. *European Journal of Neuroscience*, 7(3), 462-469.

- Messier, C., Mourre, C., Bontempi, B., Sif, J., Lazdunski, M., & Destrade, C. (1991). Effect of apamin, a toxin that inhibits Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels, on learning and memory processes. *Brain research*, 551(1-2), 322-326.
- Miller, J. P., & 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. *Journal of neurophysiology*, 48(6), 1378-1391.
- Monti, J. M., & Jantos, H. (2008). The roles of dopamine and serotonin, and of their receptors, in regulating sleep and waking. *Progress in brain research*, 172, 625-646.
- Moroz, L. L., Edwards, J. R., Puthanveetil, S. V., Kohn, A. B., Ha, T., Heyland, A., Knudsen, B., Sahni, A., Yu, F., Liu, L., Jezzini, S., Lovell, P., Iannuccilli, W., Chen, M., Nguyen, T., Sheng, H., Shaw, R., Kalachikov, S., Panchin, Y. V., Farmerie, W., Russo, J. J., Ju, J., & Kandel, E. R. (2006). Neuronal transcriptome of *Aplysia*: neuronal compartments and circuitry. *Cell*, 127(7), 1453-1467.
- Morton, D. W., & Chiel, H. J. (1994). Neural architectures for adaptive behavior. *Trends in Neurosciences*, 17(10), 413-420.
- Mozzachiodi, R., & Byrne, J. H. (2010). More than synaptic plasticity: role of nonsynaptic plasticity in learning and memory. *Trends in neurosciences*, 33(1), 17-26.
- Mozzachiodi, R., Lorenzetti, F. D., Baxter, D. A., & Byrne, J. H. (2008). Changes in neuronal excitability serve as a mechanism of long-term memory for operant conditioning. *Nature neuroscience*, 11(10), 1146.
- Nargeot, R., Baxter, D. A., & Byrne, J. H. (1999a). *In Vitro* Analog of Operant Conditioning in *Aplysia*. I. Contingent Reinforcement Modifies the Functional Dynamics of an Identified Neuron. *The Journal of Neuroscience*, 19(6), 2247-2260.
- Nargeot, R., Baxter, D. A., & Byrne, J. H. (1999b). *In Vitro* Analog of Operant Conditioning in *Aplysia*. II. Modifications of the Functional Dynamics of an Identified Neuron Contribute to Motor Pattern Selection. *The Journal of Neuroscience*, 19(6), 2261-2272.
- Nargeot, R., Baxter, D. A., Patterson, G. W., & Byrne, J. H. (1999). Dopaminergic synapses mediate neuronal changes in an analogue of operant conditioning. *Journal of Neurophysiology*, 81(4), 1983-1987.
- Nargeot, R., & Bédécarrats, A., (2017). Associative learning in invertebrate. The Oxford Handbook of Invertebrate Neurobiology. Oxford University Press.
- Nargeot, R., Le Bon-Jego, M., & Simmers, J. (2009). Cellular and network mechanisms of operant learning-induced compulsive behavior in *Aplysia*. *Current Biology*, 19(12), 975-984.
- Nargeot, R., Petrisans, C., & Simmers, J. (2007). Behavioral and in vitro correlates of compulsive-like food seeking induced by operant conditioning in *Aplysia*. *Journal of Neuroscience*, 27(30), 8059-8070.

- Nargeot, R., & Simmers, J. (2011). Neural mechanisms of operant conditioning and learning-induced behavioral plasticity in *Aplysia*. *Cellular and molecular life Sciences*, 68:803-816.
- Nargeot, R., & Simmers, J. (2012). Functional Organization and Adaptability of a Decision-Making Network in *Aplysia*. *Frontiers in Neuroscience*, 6.
- Newman, E. A., & Zahs, K. R. (1997). Calcium waves in retinal glial cells. *Science*, 275(5301), 844-847.
- Nieh, E. H., Kim, S.-Y., Namburi, P., & Tye, K. M. (2013). Optogenetic dissection of neural circuits underlying emotional valence and motivated behaviors. *Brain Research*, 1511, 73-92.
- Nishio, H., Ikegami, Y., & Segawa, T. (1991). Fluorescence digital image analysis of serotonin-induced calcium oscillations in single blood platelets. *Cell Calcium*, 12(2-3), 177-184.
- Ocorr, K. A., Walters, E. T., & Byrne, J. H. (1985). Associative conditioning analog selectively increases cAMP levels of tail sensory neurons in *Aplysia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(8), 2548-2552.
- Olds, J., & Milner, P. (1954). Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 47(6), 419-427.
- Ostlund, S. B., & Balleine, B. W. (2007). The Contribution of Orbitofrontal Cortex to Action Selection. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1121(1), 174-192.
- Parker, I., & Yao, Y. (1991). Regenerative release of calcium from functionally discrete subcellular stores by inositol trisphosphate. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 246(1317), 269-274.
- Partridge, L. D., & Swandulla, D. (1988). Calcium-activated non-specific cation channels. *Trends in neurosciences*, 11(2), 69-72.
- Partridge, L. D., Swandulla, D., & Müller, T. H. (1990). Modulation of calcium-activated non-specific cation currents by cyclic AMP-dependent phosphorylation in neurones of *Helix*. *The Journal of Physiology*, 429(1), 131-145.
- Pathak, T., & Trebak, M. (2018). Mitochondrial  $Ca^{2+}$  signaling. *Pharmacology & therapeutics*, 192, 112-123.
- Peck, J. H., Nakanishi, S. T., Yapple, R., & Harris-Warrick, R. M. (2001). Amine modulation of the transient potassium current in identified cells of the lobster stomatogastric ganglion. *Journal of neurophysiology*, 86(6), 2957-2965.
- Peinado, A., Yuste, R., & Katz, L. C. (1993). Extensive dye coupling between rat neocortical neurons during the period of circuit formation. *Neuron*, 10(1), 103-114.
- Peracchia, C. (2004). Chemical gating of gap junction channels: roles of calcium, pH and calmodulin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1662(1-2), 61-80.

- Peyron, C., Luppi, P. H., & Kitahama, K. (1995). Origin of the dopaminergic. *Neuroreport*, *6*, 2527-2531.
- Pierrefiche, O., Champagnat, J., & Richter, D. W. (1995). Calcium-dependent conductances control neurones involved in termination of inspiration in cats. *Neuroscience Letters*, *184*(2), 101-104.
- Pinsker, H. M., Hening, W. A., Carew, T. J., & Kandel, E. R. (1973). Long-term sensitization of a defensive withdrawal reflex in *Aplysia*. *Science*, *182*(4116), 1039-1042.
- Pinsker, H., Kupfermann, I., Castellucci, V., & Kandel, E. (1970). Habituation and dishabituation of the GM-withdrawal reflex in *Aplysia*. *Science*, *167*(3926), 1740-1742.
- Plaçais, P.-Y., Trannoy, S., Isabel, G., Aso, Y., Siwanowicz, I., Belliard-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*. *Nature Neuroscience*, *15*(4), 592-599.
- Placantonakis, D. G., Schwarz, C., & Welsh, J. P. (2000). Serotonin suppresses subthreshold and suprathreshold oscillatory activity of rat inferior olivary neurones in vitro. *The Journal of Physiology*, *524*(3), 833-851.
- Plummer, M. R., & Kirk, M. D. (1990). Premotor neurons B51 and B52 in the buccal ganglia of *Aplysia californica*: Synaptic connections, effects on ongoing motor rhythms, and peptide modulation. *Journal of Neurophysiology*, *63*(3), 539-558.
- Pooryasin, A., & Fiala, A. (2015). Identified Serotonin-Releasing Neurons Induce Behavioral Quiescence and Suppress Mating in *Drosophila*. *Journal of Neuroscience*, *35*(37), 12792-12812.
- Quinlan, E. M., Arnett, B. C., & Murphy, A. D. (1997). Feeding stimulants activate an identified dopaminergic interneuron that induces the feeding motor program in *Helisoma*. *Journal of neurophysiology*, *78*(2), 812-824.
- Rescorla, R. A., & Solomon, R. L. (1967). Two-process learning theory: Relationships between Pavlovian conditioning and instrumental learning. *Psychological review*, *74*(3), 151.
- Reyes, F. D., Mozzachiodi, R., Baxter, D. A., & Byrne, J. H. (2005). Reinforcement in an in vitro analog of appetitive classical conditioning of feeding behavior in *Aplysia*: blockade by a dopamine antagonist. *Learning & Memory*, *12*(3), 216-220.
- Roberts, A. C., & Glanzman, D. L. (2003). Learning in *Aplysia*: looking at synaptic plasticity from both sides. *Trends in neurosciences*, *26*(12), 662-670.
- Robinson, J. C., Chapman, C. A., & Courtemanche, R. (2017). Gap Junction Modulation of Low-Frequency Oscillations in the Cerebellar Granule Cell Layer. *The Cerebellum*, *16*(4), 802-811.
- Rosen, S., Weiss, K., Goldstein, R., & Kupfermann, I. (1989). The role of a modulatory neuron in feeding and satiation in *Aplysia*: Effects of lesioning of the serotonergic metacerebral cells. *The Journal of Neuroscience*, *9*(5), 1562-1578.

- Ross, W. N. (2012). Understanding calcium waves and sparks in central neurons. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(3), 157.
- Rubin, J. E., Hayes, J. A., Mendenhall, J. L., & Del Negro, C. A. (2009). Calcium-activated nonspecific cation current and synaptic depression promote network-dependent burst oscillations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(8), 2939-2944.
- Russell DF, Hartline DK (1978) Bursting neural networks: a reexamination. *Science* 200:453–456
- Russo, R. E., & Hounsgaard, J. (1996). Plateau-generating neurones in the dorsal horn in an in vitro preparation of the turtle spinal cord. *The Journal of Physiology*, 493(1), 39-54.
- Saar, D., & Barkai, E. (2003). Long-term modifications in intrinsic neuronal properties and rule learning in rats. *European Journal of Neuroscience*, 17(12), 2727-2734.
- Saar, D., Grossman, Y., & Barkai, E. (1998). Reduced after-hyperpolarization in rat piriform cortex pyramidal neurons is associated with increased learning capability during operant conditioning. *European Journal of Neuroscience*, 10(4), 1518-1523.
- Sanchez-Andres, J. V., & Alkon, D. L. (1991). Voltage-clamp analysis of the effects of classical conditioning on the hippocampus. *Journal of neurophysiology*, 65(4), 796-807.
- Sandoz, J. C., Laloi, D., Odoux, J. F., & Pham-Delègue, M. H. (2000). Olfactory information transfer in the honeybee: compared efficiency of classical conditioning and early exposure. *Animal Behaviour*, 59(5), 1025-1034.
- Saper, C. B., Chou, T. C., & Elmquist, J. K. (2002). The need to feed: homeostatic and hedonic control of eating. *Neuron*, 36(2), 199-211.
- Sasaki-Adams, D. M., & Kelley, A. E. (2001). Serotonin-dopamine interactions in the control of conditioned reinforcement and motor behavior. *Neuropsychopharmacology*, 25(3), 440.
- Satterlie, R. A. (1985). Reciprocal Inhibition and Postinhibitory Rebound Produce Reverberation in a Locomotor Pattern Generator. *Science*, 229(4711), 402-404.
- Scemes, E., & Giaume, C. (2006). Astrocyte calcium waves: what they are and what they do. *Glia*, 54(7), 716-725.
- Schoenbaum, G., Roesch, M. R., & Stalnaker, T. A. (2006). Orbitofrontal cortex, decision-making and drug addiction. *Trends in Neurosciences*, 29(2), 116-124.
- Scholz, K. P., & Byrne, J. H. (1987). Long-term sensitization in Aplysia: biophysical correlates in tail sensory neurons. *Science*, 235(4789), 685-687.
- Schultz, W. (1998). Predictive Reward Signal of Dopamine Neurons. *Journal of Neurophysiology*, 80(1), 1-27.
- Schultz, W. (2000). Multiple reward signals in the brain. *Nature reviews neuroscience*, 1(3), 199.

- Schwaerzel, M., Monastirioti, M., Scholz, H., Friggi-Grelin, F., Birman, S., & Heisenberg, M. (2003). Dopamine and Octopamine Differentiate between Aversive and Appetitive Olfactory Memories in *Drosophila*. *The Journal of Neuroscience*, 23(33), 10495-10502.
- Schwarz, M., & Susswein, A. J. (1986). Identification of the neural pathway for reinforcement of feeding when *Aplysia* learn that food is inedible. *Journal of Neuroscience*, 6(5), 1528-1536.
- Schwartz, D. H., Hernandez, L., & Hoebel, B. G. (1990). Serotonin release in lateral and medial hypothalamus during feeding and its anticipation. *Brain research bulletin*, 25(6), 797-802.
- Selverston, A. I. (2010). Invertebrate central pattern generator circuits. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1551), 2329-2345.
- Selverston, A. I., Rabinovich, M. I., Abarbanel, H. D., Elson, R., Szücs, A., Pinto, R. D., Huerta, R., & Varona, P. (2000). Reliable circuits from irregular neurons: a dynamical approach to understanding central pattern generators. *Journal of Physiology-Paris*, 94(5-6), 357-374.
- Sharples, S. A., Humphreys, J. M., Jensen, A. M., Dhoopar, S., Delaloye, N., Clemens, S., & Whelan, P. J. (2015). Dopaminergic modulation of locomotor network activity in the neonatal mouse spinal cord. *Journal of neurophysiology*, 113(7), 2500-2510.
- Sharp, A. A., Skinner, F. K., & Marder, E. (1996). Mechanisms of oscillation in dynamic clamp constructed two-cell half-center circuits. *Journal of Neurophysiology*, 76(2), 867-883.
- Sherman, A., & Rinzel, J. (1992). Rhythmogenic effects of weak electrotonic coupling in neuronal models. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(6), 2471-2474.
- Sherrington CS. The integrative action of the nervous system. New Haven, CT:Yale University Press; 1906.
- Sieling, F., Bédécarrats, A., Simmers, J., Prinz, A. A., & Nargeot, R. (2014). Differential Roles of Nonsynaptic and Synaptic Plasticity in Operant Reward Learning-Induced Compulsive Behavior. *Current Biology*, 24(9), 941-950.
- Sillar, K. T. (2009). Mauthner cells. *Current Biology*, 19(9), R353-R355.
- Skinner BF (1938) The behavior of organisms: An experimental analysis.
- Sneyd, J., Han, J. M., Wang, L., Chen, J., Yang, X., Tanimura, A., Sanderson, M. J., Kirk, V., & Yule, D. I. (2017). On the dynamical structure of calcium oscillations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(7), 1456-1461.
- Spencer, G. E., Syed, N. I., & Lukowiak, K. (1999). Neural changes after operant conditioning of the aerial respiratory behavior in *Lymnaea stagnalis*. *Journal of Neuroscience*, 19(5), 1836-1843.

- Sqalli-Houssaini, Y., & Cazalets, J.-R. (2000). Noradrenergic control of locomotor networks in the in vitro spinal cord of the neonatal rat. *Brain Research*, 852(1), 100-109.
- Squire, L., Bloom, F., Spitzer, N., Squire, L., Berg, D., du Lac, S., & Ghosh, A. (2008). *Fundamental Neuroscience*. Fundamental Neuroscience Series.
- Stackman, R. W., Hammond, R. S., Linardatos, E., Gerlach, A., Maylie, J., Adelman, J. P., & Tzounopoulos, T. (2002). Small conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels modulate synaptic plasticity and memory encoding. *Journal of Neuroscience*, 22(23), 10163-10171.
- Sternson, S. M. (2013). Hypothalamic Survival Circuits : Blueprints for Purposive Behaviors. *Neuron*, 77(5), 810-824.
- Stricker, E. M., & Sved, A. F. (2000). Thirst. *Nutrition*, 16(10), 821-826.
- Susswein, A. J., Hurwitz, I., Thorne, R., Byrne, J. H., & Baxter, D. A. (2002). Mechanisms underlying fictive feeding in Aplysia: Coupling between a large neuron with plateau potentials activity and a spiking neuron. *Journal of Neurophysiology*, 87(5), 2307-2323.
- Susswein, A. J., Schwarz, M., & Feldman, E. (1986). Learned changes of feeding behavior in Aplysia in response to edible and inedible foods. *Journal of Neuroscience*, 6(5), 1513-1527.
- Svensson, E., Woolley, J., Wikström, M., & Grillner, S. (2003). Endogenous dopaminergic modulation of the lamprey spinal locomotor network. *Brain Research*, 970(1-2), 1-8.
- Swandulla, D., & Lux, H. D. (1985). Activation of a nonspecific cation conductance by intracellular  $Ca^{2+}$  elevation in bursting pacemaker neurons of *Helix pomatia*. *Journal of Neurophysiology*, 54(6), 1430-1443.
- Tabak, J., Tomaiuolo, M., Gonzalez-Iglesias, A. E., Milescu, L. S., & Bertram, R. (2011). Fast-Activating Voltage- and Calcium-Dependent Potassium (BK) Conductance Promotes Bursting in Pituitary Cells: A Dynamic Clamp Study. *Journal of Neuroscience*, 31(46), 16855-16863.
- Takeuchi, A., Kim, B., & Matsuoka, S. (2015). The destiny of  $Ca^{2+}$  released by mitochondria. *The Journal of Physiological Sciences*, 65(1), 11-24.
- Tanaka, S., & Chandler, S. H. (2006). Serotonergic modulation of persistent sodium currents and membrane excitability via cyclic AMP-protein kinase A cascade in mesencephalic V neurons. *Journal of neuroscience research*, 83(7), 1362-1372.
- 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. *Journal of Neuroscience*, 28(34), 8577-8589.
- Terasawa, E. I., Schanhofer, W. K., Keen, K. L., & Luchansky, L. (1999). Intracellular  $Ca^{2+}$  oscillations in luteinizing hormone-releasing hormone neurons derived from the embryonic olfactory placode of the rhesus monkey. *Journal of Neuroscience*, 19(14), 5898-5909.

- Tertyshnikova, S., & Fein, A. (1998). Inhibition of inositol 1, 4, 5-trisphosphate-induced  $\text{Ca}^{2+}$  release by cAMP-dependent protein kinase in a living cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(4), 1613-1617.
- Teyke, T., Rosen, S. C., Weiss, K. R., & Kupfermann, I. (1993). Dopaminergic neuron B20 generates rhythmic neuronal activity in the feeding motor circuitry of *Aplysia*. *Brain research*, *630*(1-2), 226-237.
- Teyke, T., Weiss, K., & Kupfermann, I. (1990). An identified neuron (CPR) evokes neuronal responses reflecting food arousal in *Aplysia*. *Science*, *247*(4938), 85-87.
- Thill, E., & Vallerand, R. J. (1993). *Introduction à la psychologie de la motivation*. [Laval, Québec]: Éditions Études vivantes.
- Thompson, R. F., & Spencer, W. A. (1966). Habituation: a model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior. *Psychological review*, *73*(1), 16.
- Thompson, W. J., & Stent, G. S. (1976). Neuronal control of heartbeat in the medicinal leech. *Journal of comparative physiology*, *111*(3), 281-307.
- Thorn, P., Lawrie, A. M., Smith, P. M., Gallacher, D. V., & Petersen, O. H. (1993).  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations in pancreatic acinar cells: spatiotemporal relationships and functional implications. *Cell calcium*, *14*(10), 746-757.
- Tinbergen, N. (1951). The study of instinct.
- Tolman, E. C., & Honzik, C. H. (1930). Degrees of hunger, reward and non-reward, and maze learning in rats. *University of California Publications in Psychology*.
- Traub, R. D., & Bibbig, A. (2000). A model of high-frequency ripples in the hippocampus based on synaptic coupling plus axon-axon gap junctions between pyramidal neurons. *Journal of Neuroscience*, *20*(6), 2086-2093.
- Traub, R. D., Kopell, N., Bibbig, A., Buhl, E. H., LeBeau, F. E. N., & Whittington, M. A. (2001). Gap Junctions between Interneuron Dendrites Can Enhance Synchrony of Gamma Oscillations in Distributed Networks. *The Journal of Neuroscience*, *21*(23), 9478-9486.
- Trimble, D. L., & Barker, D. L. (1984). Activation by dopamine of patterned motor output from the buccal ganglia of *Helisoma trivolvis*. *Journal of neurobiology*, *15*(1), 37-48.
- Ueno, T., Tomita, J., Tanimoto, H., Endo, K., Ito, K., Kume, S., & Kume, K. (2012). Identification of a dopamine pathway that regulates sleep and arousal in *Drosophila*. *Nature neuroscience*, *15*(11), 1516.
- Ustione, A., & Piston, D. W. (2012). Dopamine synthesis and D3 receptor activation in pancreatic  $\beta$ -cells regulates insulin secretion and intracellular  $[\text{Ca}^{2+}]$  oscillations. *Molecular endocrinology*, *26*(11), 1928-1940.
- van den Top, M., Lee, K., Whyment, A. D., Blanks, A. M., & Spanswick, D. (2004). Orexigen-sensitive NPY/AgRP pacemaker neurons in the hypothalamic arcuate nucleus. *Nature neuroscience*, *7*(5), 493.

- 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(3), e288.
- Verschure, P. F. M. J., Pennartz, C. M. A., & Pezzulo, G. (2014). The why, what, where, when and how of goal-directed choice: Neuronal and computational principles. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1655), 20130483.
- Vorster, A. P., & Born, J. (2017). Sleep supports inhibitory operant conditioning memory in *Aplysia*. *Learning & Memory*, 24(6), 252-256.
- Vorster, A. P., Krishnan, H. C., Cirelli, C., & Lyons, L. C. (2014). Characterization of sleep in *Aplysia californica*. *Sleep*, 37(9), 1453-1463.
- Wallén, P., & Williams, T. L. (1984). Fictive locomotion in the lamprey spinal cord in vitro compared with swimming in the intact and spinal animal. *The Journal of Physiology*, 347(1), 225-239.
- Wang, D., Grillner, S., & Wallén, P. (2011). 5-HT and dopamine modulates CaV1.3 calcium channels involved in postinhibitory rebound in the spinal network for locomotion in lamprey. *Journal of Neurophysiology*, 105(3), 1212-1224.
- Wegierski, T., & Kuznicki, J. (2018). Neuronal calcium signaling via store-operated channels in health and disease. *Cell Calcium*, 74, 102-111.
- Weiss, K. R., Cohen, J. L., & Kupfermann, I. (1978). Modulatory control of buccal musculature by a serotonergic neuron (metacerebral cell) in *Aplysia*. *Journal of Neurophysiology*, 41(1), 181-203.
- Wheatley, M., Jovanovic, K., Stein, R. B., & Lawson, V. (1994). The activity of interneurons during locomotion in the in vitro necturus spinal cord. *Journal of Neurophysiology*, 71(6), 2025-2032.
- Wieland, S. J., & Gelperin, A. (1983). Dopamine elicits feeding motor program in *Limax maximus*. *Journal of Neuroscience*, 3(9), 1735-1745.
- Wilson, D. M. (1961). The central nervous control of flight in a locust. *Journal of Experimental Biology*, 38(2), 471-490.
- Wilson, C., Nomikos, G., Collu, M., & Fibiger, H. (1995). Dopaminergic correlates of motivated behavior: Importance of drive. *The Journal of Neuroscience*, 15(7), 5169-5178.
- Wise, R. A. (2013). Dual roles of dopamine in food and drug seeking: the drive-reward paradox. *Biological Psychiatry*, 73(9), 819-826.
- Whitaker, L. R., Warren, B. L., Venniro, M., Harte, T. C., McPherson, K. B., Beidel, J., Bossert, J. M., Shaham, Y., Bonci, A., & Hope, B. T. (2017). Bidirectional modulation of intrinsic excitability in rat prelimbic cortex neuronal ensembles and non-ensembles after operant learning. *Journal of neuroscience*, 37(36), 8845-8856.

- Woollacott, M., & Hoyle, G. (1977). Neural events underlying learning in insects: changes in pacemaker. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 195(1120), 395-415.
- Wolpaw, J. R. (1997). The complex structure of a simple memory. *Trends in neurosciences*, 20(12), 588-594.
- Wright, W. G., Jones, K., Sharp, P., & Maynard, B. (1995). Widespread anatomical projections of the serotonergic modulatory neuron, CB1, in *Aplysia*. *Invertebrate Neuroscience*, 1(2), 173-183.
- Zhang, W., & Linden, D. J. (2003). The other side of the engram: experience-driven changes in neuronal intrinsic excitability. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(11), 885.
- Zhao, S., Golowasch, J. P., & Nadim, F. (2010). Pacemaker neuron and network oscillations depend on a neuromodulator-regulated linear current. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 4, 21.
- Zhou, Y., Lv, M., Li, T., Zhang, T., Duncan, R., Wang, L., & Lu, X. L. (2019). Spontaneous calcium signaling of cartilage cells: from spatiotemporal features to biophysical modeling. *The FASEB Journal*, 33(4), 4675-4687.
- Zimmerman, B., & Walz, B. (1997). Serotonin-induced intercellular calcium waves in salivary glands of the blowfly *Calliphora erythrocephala*. *The Journal of Physiology*, 500(1), 17-28
- Zottoli, S. J., & Faber, D. S. (2000). Review: The Mauthner Cell: What Has it Taught us? *The Neuroscientist*, 6(1), 26-38.