

# THÈSE

présentée à

**L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1**

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DU VIVANT, GÉOSCIENCES,  
ET SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

par **Eric DUCRET**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR**

SPÉCIALITÉ : NEUROSCIENCES

---

**RÔLES DE LA MODULATION DES COUPLAGES ÉLECTRIQUES DANS LA RECONFIGURATION  
DES RÉSEAUX ADULTES ET AU COURS DE L'ONTOGÈNESE : APPROCHES MOLÉCULAIRE,  
NEUROANATOMIQUE ET ÉLECTROPHYSIOLOGIQUE SUR LES RÉSEAUX DU SYSTÈME  
NERVEUX STOMATOGASTRIQUE DU HOMARD BRETON.**

---

Soutenue le 15 Décembre 2006

Après avis de :

F. Clarac	Rapporteur
H.-J. Pflüger	Rapporteur

Devant la commission formée de :

J.-M. Cabelguen	Professeur	Université Bordeaux 1	Président
F. Clarac	Directeur de Recherche	CNRS, Marseille	Rapporteur
V.S. Fénelon	Professeur	Université Bordeaux 1	Examineur
C. Giaume	Directeur de Recherche	Collège de France, Paris	Examineur
H.-J. Pflüger	Professeur	Freie Universität, Berlin	Rapporteur



## Avant-propos

---

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé dans le Laboratoire de Neurobiologie des Réseaux (CNRS, UMR 5816) de l'Université Bordeaux 1. Je remercie le directeur du LNR, Pierre Meyrand, de m'avoir accueilli lors de mon DEA.

Je voudrais ensuite remercier M. Clarac et M. Pflüger d'avoir consacré du temps à la lecture de ce manuscrit et d'avoir accepté d'en être les rapporteurs. Je tiens également à exprimer ma gratitude à M. Cabelguen et à M. Giaume d'avoir accepté d'examiner ce travail. Je veux également exprimer ma profonde reconnaissance envers l'école doctorale SVGSE, la vice-présidence de Bordeaux 1 et l'UFR de sciences biologiques pour leur disponibilité et leur aide pour que cette soutenance se déroule dans les meilleures conditions possibles.

Je suis tout particulièrement reconnaissant à Valérie Fénelon, ma directrice de thèse, de m'avoir accueilli au sein de l'équipe stomatogastrique du LNR et de m'avoir initié aux mystères de cette préparation et aux joies de sa dissection. Tu as toujours su te montrer patiente et me laisser le temps de la réflexion et ta vision structurée des neurosciences a permis de me canaliser lorsque j'avais tendance à m'éparpiller. Je voulais aussi te remercier pour le temps que tu m'as consacré, notamment lors de la correction de ce manuscrit, et de ton soutien dans les moments difficiles rencontrés au cours de cette thèse. Chef, merci pour tout !

Je voulais aussi remercier Yves pour ses scripts géniaux, ces idées géniales et ces bricolages géniaux. Plus sérieusement, merci de m'avoir dédié du temps aussi bien pour les expériences que pour discuter des résultats et de les avoir enrichis par tes remarques.

Je suis également très reconnaissant envers tous les membres du laboratoire pour leur bonne humeur et leur sympathie. Tout particulièrement, merci à Jean-Paul, Isabelle, Claire, Jacques, Françoise et Alexia d'avoir toujours eu un moment, ne serait-ce que pour discuter autour d'un thé. Je tiens également à remercier Daniel, pour l'immense patience dont il a fait preuve lorsqu'il m'a initié à NeuroLucida, ainsi que Blaise et Pascal. Je voudrais témoigner ma profonde amitié envers les étudiants du laboratoire et tout particulièrement à Morgane, pour sa bonne humeur et son caractère de bretonne, Laurent, pour ses débats naturalistes passionnants (la migration des moules ou la morsure mortelle du boa resteront dans les annales) et Anne-Emilie (l'impression de nos rapports de DEA ayant été mémorable). Merci à William et Philippe de s'être occupés de mes homards et d'avoir préparé mes salles de TP pendant ces quatre années.



En effet, j'ai eu la chance, pendant ma thèse, de participer à des activités d'enseignement en travaux pratiques. Je voulais donc remercier l'équipe de physiologie pour leur accueil chaleureux et tout particulièrement mon tuteur, Jean-Rémi Pape et l'ensemble des moniteurs (Stéphanie, François, Germain, Yves, Emilie), avec lesquels les bons moments n'ont pas manqué.

Je voudrais ensuite remercier ma famille pour leur soutien sans faille et leur confiance en moi. Merci à mes parents de m'avoir toujours encouragé et d'avoir cru en moi, et au reste de la famille (Yves, Mymy, Francine et mes grands-parents) pour avoir simplement été présents.

Je voudrais exprimer ma profonde gratitude envers mes amis en commençant par David\* à qui je dois une amitié indéfectible depuis notre rencontre en DEUG. Merci pour toutes ces soirées mousse au chocolat, nos fabuleuses séances de révision d'examens, les parties acharnées de Street-Fighter et la résolution de mes problèmes de statistique et d'informatique (qui risquent encore d'être nombreux). David ne serait rien sans son Nain dont les multiples personnalités (Aude, Roger, Ce'Nedra...) sont une source de surprises sans cesse renouvelées (tout comme les néologismes). Je profite de ces remerciements pour te pardonner ton manque de goût pour la mousse au chocolat (et oui, tu es mon amie !). Un grand merci à Tep pour son imagination fertile, dont émergent les plaisanteries les plus inattendues, ses imitations et son amour des bonnes choses, ainsi qu'à sa Tepette. Je remercie également Vaea, notamment pour son soutien moral lors de la rédaction de ce manuscrit, Mélissa, Fabien (il va falloir qu'un jour nous sachions pourquoi Sadahige ne peut pas poser de formation), Guillaume (les séances entre cinéphiles furent toujours un grand moment de plaisir), Violaine (avec qui nous avons beaucoup partagé), David (tu as intérêt à bien t'occuper de mes plantes pendant mon absence), Magali (pour ta ponctualité sans pareille) et Céline.

Enfin, je voudrais remercier tout ceux qui ont contribué à rendre cette thèse agréable : Jean-Claude (notre maître philosophe à tous), le Dauphin (pour nous avoir si souvent ramené), Papa et Maman Belin (pour avoir pensé à me nourrir de temps à autre), Mickey Rooney, Makisa Shimi (pour son soutien gastronomique) et tous les membres de l'EDIL.

\* Le Pinpin, quand il s'énerve, cause ainsi : « Mais y connaît pas Pinpin ce mec ! Y va avoir un réveil pénible... J'ai voulu être diplomate à cause de vous tous, éviter qu'le sang coule... Mais maintenant c'est fini... je vais le travailler en férocité... le faire marcher à coups de latte... A ma pogne je veux le voir... Et je vous promets qu'il demandera pardon !... Et au garde-à-vous ! »



# Table des matières

---

<b>Introduction</b>	<b>p 1</b>
<b>Matériel et méthodes</b>	<b>p 8</b>
I- Les préparations utilisées.	p 9
1- Les animaux : adultes et embryons.	p 9
2- Dissection du système nerveux stomatogastrique adulte.	p 9
3- Dissection du système nerveux stomatogastrique embryonnaire.	p 9
II- Techniques électrophysiologiques	p 10
1- Enregistrements et stimulations extracellulaires.	p 10
2- Enregistrements et stimulations intracellulaires.	p 10
3- Identification des neurones.	p 11
4- Détermination de la résistance d'entrée et du coefficient de couplage entre deux neurones.	p 11
5- Visualisation et traitement des données électrophysiologiques.	p 13
III- Pharmacologie et milieux ioniques	p 13
1- Milieux ioniques.	p 13
2- Pharmacologie. p 15	
2.1- Application par périfusion de substances pharmacologiques	p 15
2.2- Application par microéjection sous pression de substances pharmacologiques	p 15
IV- Photo-ablation de neurones.	p 15
V- Techniques morphologiques.	p 16
1- Injection de marqueurs dans des neurones identifiés.	p 16
1.1- Injection par iontophorèse.	p 16
1.2- Injection par pression.	p 16
2- Traitement histologique des préparations.	p 17
2.1- Pour une observation des neurones injectés en microscopie confocale.	p 17
2.2- Pour une visualisation de la neurobiotine.	p 17
3- Traitement immunocytochimique.	p 18
3.1- Pour la détection de l'histamine.	p 18
3.2- Pour la détection de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA).	p 18
4- Acquisition et traitement des images en microscopie confocale.	p 19
5- Quantification du marquage à la neurobiotine.	p 19
6- Reconstruction des neurones.	p 20





VI Hybridation in situ	p 20
VII Traitement des données	p 22

## **Chapitre 1 : Présentation du modèle** **p 23**

I- Introduction.	p 24
II- L'intestin antérieur des crustacés adultes.	p 24
III- Le système nerveux stomatogastrique adulte.	p 26
IV- Présentation des réseaux du STG.	p 27
1- Le réseau pylorique.	p 27
2- Le réseau gastrique.	p 29
3- Autres neurones présents dans le STG.	p 29
V- Modulation de l'activité des réseaux du ganglion stomatogastrique adulte.	p 31
VI- Ontogenèse du système nerveux stomatogastrique	p 33
1- Développement du homard.	p 33
2- Développement des réseaux du SNST.	p 35
3- Développement des afférences modulatrices.	p 35
VII- Conclusion.	p 36

## **Chapitre 2 : Caractérisation des synapses électriques au sein du STG : approches neuroanatomiques, électrophysiologiques et moléculaires** **p 38**

I- Introduction.	p 39
II- Caractérisation des synapses électriques unissant PD aux autres neurones du STG.	p 41
1- Caractérisation du couplage métabolique : diffusion de la neurobiotine.	p 41
1.1- Nombre de neurones couplés à PD.	p 41
1.2- Identification des neurones couplés à la neurobiotine avec PD.	p 43
2- Caractérisation des couplages électriques unissant PD aux neurones du STG par électrophysiologie en courant imposé.	p 46
3- Corrélation entre couplage métabolique et couplage électrique.	p 48
4- Vers un support morphologique des interactions électriques entre PD.	p 52
5- Support moléculaire des synapses électriques entre les neurones PD.	p 56



III- Caractérisation des couplages électriques au sein du STG : corrélation entre l'expression des innexines et la présence de couplages. p 58

- 1- Expression des innexines au sein du STG. p 58
- 2- Les neurones du STG qui expriment l'ARN<sub>m</sub> d'une innexine sont couplés métaboliquement et électriquement. p 60
- 3- Les neurones du STG n'exprimant jamais d'innexine sont-ils métaboliquement et électriquement isolés ? p 62
- 4- Corrélation entre l'expression des innexines et le couplage électrique et métabolique. p 65

IV- Discussion p 67

- 1- Comparaison des différentes techniques d'étude des jonctions gap et de leurs limites. p 69
  - 1.1- La diffusion de sondes. p 69
  - 1.2- La mesure des coefficients de couplage. p 71
  - 1.3- L'hybridation in situ. p 72
  - 1.4- Conclusions et perspectives. p 74
- 2- Rôles des synapses électriques du neurone PD. p 75
- 3- Caractérisation morphologique des synapses électriques entre les neurones PD. p 76

**Chapitre 3 : Modulation des synapses électriques chez l'adulte : effets de l'histamine et de la mise en jeu de neurones histaminergiques impliqués dans la reconfiguration des réseaux p 79**

- I- Introduction. p 80
- II- Caractérisation de l'action des neurones modulateurs PS sur les couplages électriques entre les neurones PD. p 81
- III- L'histamine : médiateur principal des effets de PS sur les couplages électriques des neurones PD. p 87
  - 1- Stimulation de PS lors du blocage des récepteurs histaminergiques. p 87
  - 2- Effets de l'application locale d'histamine sur les neurones PD. p 87
- IV- Les diminutions des coefficients de couplage entre neurones PD sous l'action de l'histamine sont-elles dues à une modulation des synapses électriques ? p 90
  - 1- Action des bloquants des canaux ioniques sur la résistance d'entrée et les coefficients de couplage des neurones PD. p 90
  - 2- Effets d'une application prolongée d'histamine sur le couplage électrique entre les neurones PD.



3- L'histamine agit-elle directement sur les synapses électriques reliant les deux neurones PD ?  
p 97

V- Modulation du couplage métabolique de PD par l'histamine et extension des effets de l'histamine aux interactions gastro-pyloriques. p 97

1- Réduction par l'histamine du couplage métabolique de PD avec ses partenaires. p 97

2- Identification des neurones restant métaboliquement couplés à PD sous histamine. p 100

3- Confirmation électrophysiologique de l'affaiblissement des synapses électriques entre PD et les neurones gastriques sous histamine. p 100

VI- Absence de modulation des couplages électriques par un neuromédiateur péptidergique. p 103

VII- Bases morphologiques de l'interaction entre le système modulateur histaminergique et les neurones PD. p 105

1- Interaction entre le système histaminergique et les neurones PD : vers une colocalisation des synapses histaminergiques et des synapses électriques reliant les deux PD. p 105

2- Description du système histaminergique au sein du SNST adulte. p 107

VIII- Discussion. p 109

1- Les effets de PS sur le neurone PD. p 112

2- Comparaison des effets de l'application de l'histamine et de la mise en jeu des neurones PS sur les neurones PD. p 113

3- Rôle fonctionnel de la modulation des synapses électriques lors de la reconfiguration par PS. p 115

4- Synapses histaminergiques sur le neurone PD. p 116

## **Chapitre 4 : Modulation des synapses électriques lors de la maturation des réseaux de neurones : rôles du GABA dans l'émergence des réseaux adultes du SNST**

**p 119**

I- Introduction. p 120

II- Diminution du couplage des neurones au sein du SNST au cours de l'ontogénèse. p 122

1- Diminution de l'expression des innexines au cours du développement. p 122

2- Diminution du couplage métabolique dans le STG au cours de l'ontogénèse. p 124



<b>III- Rôles du GABA dans la maturation des réseaux du SNST.</b>	<b>p 126</b>
1- Effets de l'application de 3-MPA chez l'adulte.	p 127
1.1- Le 3-MPA appliqué sur les ganglions antérieurs unifie les rythmes adultes.	p 127
1.2- L'expression du rythme unifié sous 3-MPA s'accompagne d'une réduction de l'immunoréactivité GABA au niveau de l'OG et d'une disparition du neuropile GABAergique au niveau du STG.	p 129
1.3- L'application de 3-MPA sur le STG ne modifie ni les activités rythmiques ni l'immunoréactivité GABA dans le SNST.	p 129
1.4- Le rythme unique produit sous 3-MPA résulte d'une reconfiguration des réseaux adultes en un unique réseau moteur.	p 132
2- Le rythme embryonnaire et le rythme adulte unifié sous 3-MPA sont générés par un même réseau fonctionnel.	p 134
3- Modulation des synapses électriques par le GABA.	p 136
3.1- Etendue des couplages électriques en présence et en absence de GABA dans les préparations adultes et embryonnaires.	p 136
3.2- Modulation directe des couplages électriques par le GABA dans les préparations adultes.	p 140
<b>V- Discussion</b>	<b>p 142</b>
1- Rôles d'une diminution des couplages électriques au sein des réseaux neuronaux au cours du développement.	p 142
2- Rôles du GABA dans la modulation des synapses électriques.	p 144
3- La reconfiguration des réseaux de neurones comme mécanisme ontogénétique.	p 147
<b>Discussion générale</b>	<b>p 149</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>p 152</b>





## Index des figures

---

### *Introduction*

**Figure 1 :** Structure des jonctions gap et des connexines. **p 3**

### *Matériel et méthodes*

**Figure 2 :** Méthode d'identification des neurones du STG. **p 12**

**Figure 3 :** Méthode de détermination de la résistance d'entrée et du coefficient de couplage des neurones. **p 14**

### *Chapitre 1*

**Figure 4 :** Le système nerveux stomatogastrique du homard adulte. **p 25**

**Figure 5 :** Le réseau pylorique. **p 28**

**Figure 6 :** Le réseau gastrique. **p 30**

**Figure 7 :** Le neurone PS reconfigure les réseaux pylorique et gastrique en un réseau unique. **p 32**

**Figure 8 :** Le système nerveux stomatogastrique de l'embryon. **p 34**

### *Chapitre 2*

**Figures 9 :** Couplage métabolique d'un neurone PD. **p 42**

**Figure 10 :** Identification des neurones couplés métaboliquement au neurone PD par cartographie et injection de sondes fluorescentes. **p 44**

**Figure 11 :** Identification des neurones électriquement couplés à PD. **p 47**

**Figure 12 :** Coefficients du couplage électrique de PD avec les neurones du STG. **p 49**



- Figure 13 :** Corrélation entre couplage métabolique et couplage électrique d'un neurone PD avec les autres neurones du STG. **p 51**
- Figure 14 :** Identification des zones d'apposition entre deux neurones PD : localisation potentielle des synapses électriques entre PD. **p 53**
- Figure 15 :** Caractérisation des zones d'apposition entre neurones PD. **p 55**
- Figure 16 :** Expression des innexines par les neurones PD. **p 57**
- Figure 17 :** Quantification du nombre de neurones exprimant l'innexine 1 ou l'innexine 2 dans le STG adulte. **p 59**
- Figure 18 :** Identification des neurones exprimant l'innexine 1 ou l'innexine 2. **p 61**
- Figure 19 :** Les neurones exprimant au moins une innexine sont tous couplés métaboliquement et électriquement à un autre neurone du STG. **p 63**
- Figure 20 :** Couplage métabolique des neurones n'exprimant aucune innexine. **p 64**
- Figure 21 :** Les neurones n'exprimant aucune innexine présentent un faible coefficient de couplage électrique avec d'autres neurones du STG. **p 66**
- Figure 22 :** Le pourcentage d'expression de l'innexine 2 prédit l'étendue des couplages métaboliques et la force des couplages électriques. **p 68**

### *Chapitre 3*

- Figure 23 :** La fréquence de la décharge des neurones PS est corrélée au nombre de neurones dye-couplés avec PD. **p 82**
- Figure 24 :** La stimulation électrique de l'*ivn* diminue la résistance d'entrée et le coefficient de couplage des neurones PD. **p 84**
- Figure 25 :** Les effets de PS sur les couplages électriques au sein du STG ne passent pas par un effet via les CoG. **p 86**
- Figure 26 :** Les effets de PS sur les neurones PD sont principalement médiés par l'histamine. **p 88**
- Figure 27 :** L'éjection d'histamine à proximité du STG mime une partie des effets de PS. **p 89**
- Figure 28 :** Les effets de l'histamine sur la résistance d'entrée et sur le coefficient de couplage entre PD ne sont pas abolis par la présence, dans le liquide physiologique, de bloqueurs de conductances. **p 91**



- Figure 29 :** L'histamine  $10^{-3}$  M appliquée dans le bain induit une diminution de résistance d'entrée qui se désensibilise et une diminution non réversible du coefficient de couplage entre les neurones PD. **p 93**
- Figure 30 :** L'histamine diminue les coefficients de couplage de façon concentration-dépendante. **p 95**
- Figure 31 :** Une application d'histamine à  $10^{-4}$  M diminue de façon réversible la résistance d'entrée et le coefficient de couplage entre les neurones PD. **p 96**
- Figure 32 :** L'histamine agit directement sur la synapse électrique unissant les neurones PD. **p 98**
- Figure 33 :** L'histamine diminue le couplage métabolique de PD. **p 99**
- Figure 34 :** PD est dye-couplé avec le second PD et AB sous histamine à  $10^{-3}$  M. **p 101**
- Figure 35 :** L'histamine diminue le coefficient de couplage entre PD et les neurones gastriques DG et LPG. **p 102**
- Figure 36 :** Le peptide F1 n'a pas d'effet significatif sur la résistance d'entrée et le coefficient de couplage des neurones PD. **p 104**
- Figure 37 :** Localisation des synapses histaminergiques sur les neurones PD. **p 106**
- Figure 38 :** Immunoréactivité à l'histamine dans le SNST adulte. **p 108**
- Figure 39 :** Schéma récapitulatif des marquages histaminergiques dans le SNST adulte. **p 110**
- Figure 40 :** L'anticorps dirigé contre l'histamine est spécifique de ce neurotransmetteur. **p 111**

## *Chapitre 4*

- Figure 41 :** Le GABA apparaît dans l'OG et dans le STG après la métamorphose, au moment de la scission de l'unique réseau embryonnaire en trois réseaux adultes. **p 121**
- Figure 42 :** Le nombre de neurones du SNST exprimant les innexines 1 et 2 du homard diminue au cours du développement. **p 123**
- Figure 43 :** L'étendue des couplages électriques diminue au cours du développement. **p 125**
- Figure 44 :** L'application d'un inhibiteur de l'enzyme de synthèse du GABA sur les ganglions antérieurs unifie les rythmes des neurones du STG. **p 128**
- Figure 45 :** L'expression d'un rythme unique par les neurones du STG est associée à la disparition du GABA dans l'OG et le STG. **p 130**



- Figure 46 :** Le 3-MPA appliqué sur le STG ne modifie ni les activités rythmiques ni l'immunoréactivité GABA dans le SNST. **p 131**
- Figure 47 :** Les neurones du STG adulte s'organisent en un unique réseau sous 3-MPA. **p 133**
- Figure 48 :** Chez l'embryon et en présence de 3-MPA chez l'adulte, les neurones du STG s'organisent en un même réseau fonctionnel. **p 135**
- Figure 49 :** Le GABA module l'étendue du couplage métabolique de PD. **p 137**
- Figure 50 :** Le couplage inter et intra-réseau est augmenté lors de l'unification des rythmes chez l'adulte sous 3-MPA. **p 139**
- Figure 51 :** Le GABA diminue la force et l'étendue des couplages électriques chez l'adulte. **p 141**





## Abréviations

---

---

AB : neurone burster antérieur  
AM : neurone antérieur médian  
ARN<sub>m</sub> : acide ribonucléique messenger  
CoG : ganglion commissural  
CPG : générateur de patrons d'activité  
DG : neurone gastrique dorsal  
EMA : eau de mer artificielle  
DIG : digoxigénine  
*dvn* : nerf dorsal ventriculaire  
GM : motoneurone gastrique  
GPR : neurones récepteurs gastropyloriques  
IC : neurone inférieur cardial  
Int1 : interneurone 1  
*ion* : nerf œsophagien inférieur  
IPSP : neurone à potentiels postsynaptiques inhibiteurs  
*ivn* : nerf ventriculaire inférieur  
LG : neurone gastrique latéral  
LP : neurone pylorique latéral  
LPG : neurone gastrique latéral postérieur  
*lvn* : nerf ventriculaire ventral  
MG : neurone gastrique médian  
OG : ganglion œsophagien  
*on* : nerf œsophagien  
PD : neurone dilatateur pylorique  
PPSE : potentiel post-synaptique exciteur  
PS : neurone supresseur du rythme pylorique  
PTX : picrotoxine  
PY : neurone pylorique  
*son* : nerf œsophagien supérieur  
STG : ganglion stomatogastrique  
*stn* : nerf stomatogastrique  
TTX : tétrodotoxine  
VD : neurone ventriculaire dorsal



## *Introduction*

*La seule chose que l'on puisse décider est quoi faire du temps qui nous est imparti.*  
*J. R. R. Tolkien*



Les comportements moteurs rythmiques essentiels à la survie de l'individu, tels que la respiration, la locomotion, la mastication ou la déglutition, sont générés au niveau du système nerveux par des neurones organisés en réseaux appelés « central pattern generators » ou CPG (Wilson, 1961). Selon la théorie des « building blocks » (Getting, 1989), l'activité électrophysiologique de ces réseaux résulte de l'interaction entre les propriétés intrinsèques de leurs neurones constitutifs d'une part et de leurs propriétés synaptiques d'autre part. Les propriétés intrinsèques des neurones regroupent l'ensemble des canaux ioniques responsables du comportement électrophysiologique intrinsèque au neurone comme le rebond postinhibition, la bistabilité ou l'excitation retardée qui sont nécessaires à la mise en place des activités rythmiques dans les réseaux neuronaux. Par propriétés synaptiques, on entend les propriétés des deux principaux modes d'interaction entre les neurones que sont les synapses chimiques et les synapses électriques. Les diverses combinaisons de propriétés intrinsèques et synaptiques permettent aux neurones de présenter un large éventail de types d'activités.

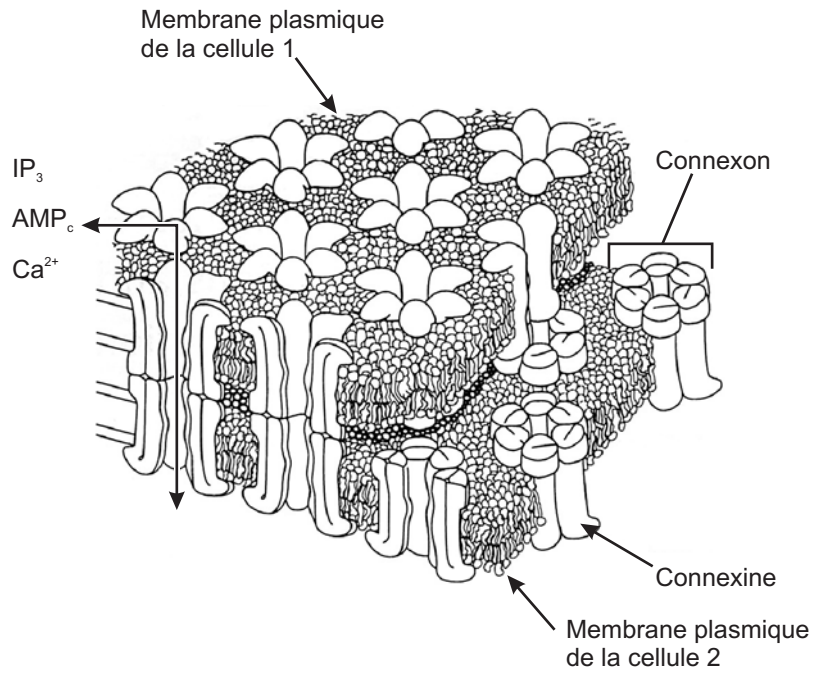
L'activité des réseaux neuronaux n'est pas stéréotypée mais peut être modifiée sous l'action de neuromodulateurs libérés par des éléments de commande (Larimer, 1988) mis en jeu en fonction des besoins de l'organisme, notamment pour s'adapter à son environnement. Les substances neuromodulatrices ainsi libérées vont, en altérant les propriétés intrinsèques et/ou synaptiques d'un ou plusieurs neurones cibles, modifier l'activité du réseau.

Le rôle de la modulation des propriétés intrinsèques des neurones (Bal et al., 1994; Katz and Harris-Warrick, 1989; Marder and Weimann, 1992; Sun and Dale, 1998) ou celui de la modulation des synapses chimiques (Faumont et al., 2005; Johnson and Harris-Warrick, 1990; McDermid et al., 1997) dans la plasticité de ces réseaux a fait l'objet de nombreuses études. A l'inverse, les répercussions fonctionnelles d'une modulation des synapses électriques sur les rythmes produits par les CPG demeurent peu explorées.

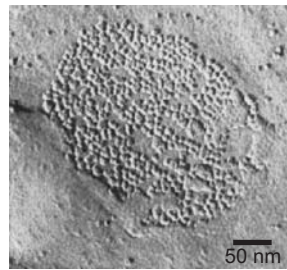
Une synapse électrique permet le passage direct des ions et des petites molécules hydrophiles entre les cytoplasmes de deux cellules couplées (Fig. 1A). Elle permet donc à la fois un couplage électrique (passage de courants portés par les ions) et un couplage métabolique (passage de petites molécules de moins de 900 Da telles que les seconds messagers). Au niveau structural, les synapses électriques sont constituées par la juxtaposition de très nombreux canaux unissant les cytoplasmes de deux cellules (Fig. 1B1 et B2). Au niveau de ces structures, appelées jonctions communicantes ou jonctions gap, les membranes plasmiques des deux cellules se rapprochent l'une de l'autre (Fig. 1B3) pour ne laisser subsister qu'un espace intercellulaire de 2 à 3 nm (Friend and Gilula, 1972; Sloper and Powell, 1978). Chez les vertébrés, les canaux intercellulaires des jonctions communicantes sont formés par des protéines appelées connexines. Les connexines sont codées par une famille de gènes présentant une structure et une topologie commune dont une dizaine est exprimée dans le cerveau (Willecke et al., 2002). Les connexines sont insérées dans la membrane plasmique des cellules par quatre domaines transmembranaires séparant une boucle intracellulaire et deux boucles

**Figure 1 : Structure des jonctions gap et des connexines.** Les jonctions communicantes, ou jonctions gap, sont formées par l'appariement de deux connexons, chacun situé sur la membrane plasmique d'une cellule, permettant la diffusion des petites molécules ( $IP_3$ ,  $AMP_c$ ) et des ions ( $Ca^{2+}$ ) directement entre les cytoplasmes des cellules (A, d'après Makowski et al. 1977). Les jonctions communicantes sont issues du regroupement d'un nombre important de connexons (B1, micrographie obtenue en cryofracture correspondant à la face interne du feuillet de la membrane plasmique situé du côté du milieu intracellulaire, grossie 150 000 fois et B2, micrographie obtenue en cryofracture montrant la face interne du feuillet de la membrane plasmique situé du côté extracellulaire, grossie 105 000 fois) qui vont permettre le rapprochement des membranes plasmiques des deux cellules couplées (mpl 1 et mpl 2) pour ne laisser subsister qu'un espace intercellulaire de 2 à 3 nm (B3, micrographie réalisée au microscope électronique à transmission d'une jonction gap entre hépatocytes grossie 266 000 fois). Les connexines sont des protéines formées de quatre domaines transmembranaires ( $M1$  à  $M4$ ), de deux domaines extracellulaires ( $E1$  et  $E2$ ) ainsi que d'une boucle intracellulaire ( $BI$ ). Les extrémités aminoterminal ( $N_{Ter}$ ) et carboxyterminale ( $C_{Ter}$ ) se trouvent dans le domaine intracellulaire. Notons la présence de trois cystéines sur chaque boucle extracellulaire ( $Cys$ ), très conservées entre les connexines, permettant l'appariement des connexons. Les connexines vont ensuite s'organiser en hexamère au niveau de la membrane plasmique pour former un connexon.

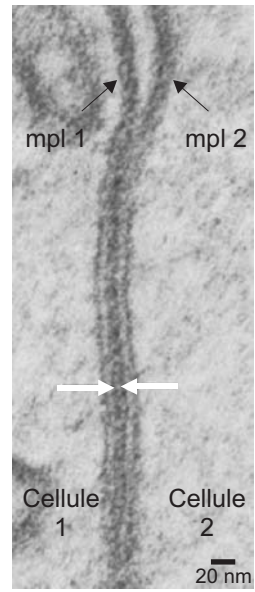
**A**



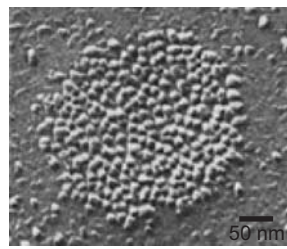
**B1**



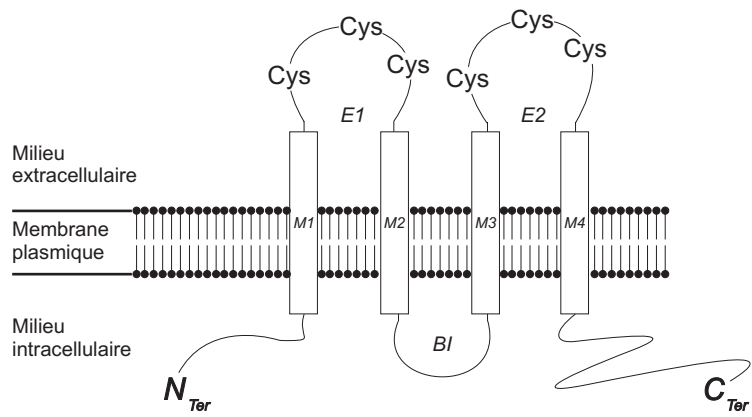
**B3**



**B2**



**C**







extracellulaires (Fig. 1C, Goodenough et al., 1996). Ces protéines s'assemblent en hexamère pour créer un hémicanal, le connexon, capable de s'arrimer à un autre hémicanal présent sur une seconde cellule, notamment grâce à la présence de trois résidus cystéines très conservés sur chaque boucle extracellulaire (Dahl et al., 1991; Dahl et al., 1992).

Les protéines constituant les jonctions gap ont été également caractérisées chez les invertébrés. Il a été montré que les invertébrés n'utilisent pas les connexines, mais plutôt une autre famille de protéines, les innexines (Phelan, 2000; Phelan et al., 1998a). L'analyse de la séquence ADN codant pour ces protéines indique qu'elles ne présentent pas de proximité phylogénétique avec les connexines des vertébrés. En revanche, la structure des innexines, déduite de l'analyse de leur séquence d'ADN, semble très voisine de celle des connexines. En effet, les innexines sont des protéines à 4 domaines transmembranaires, avec deux boucles extracellulaires comportant chacune deux cystéines dont les positions dans la protéine sont très conservées (Phelan, 2000; Phelan et al., 1998a). Il a donc été postulé qu'elles s'organiseraient elles aussi en hexamère pour constituer des hémicanaux homomériques ou hétéromériques. Ces hémicanaux seraient ensuite susceptibles de s'associer pour former des synapses électriques homotypiques ou hétérotypiques. Comme chez les vertébrés, les synapses électriques des invertébrés laissent passer les petites molécules et les courants électriques de façon linéaire ou rectifiante (Dykes et al., 2004; Fan et al., 2005).

Initialement mises en évidence dans les fibres géantes de l'écrevisse et dans le ganglion cardiaque du homard (Furshpan and Potter, 1959; Watanabe, 1958), les synapses électriques ont ensuite été retrouvées chez de nombreuses espèces d'invertébrés et de vertébrés inférieurs (Bennett et al., 1959). Ce n'est que plus tard que ces synapses ont été caractérisées dans le système nerveux des mammifères, avec la mise en évidence anatomique de synapses électriques dans le neocortex (Sloper, 1972) et dans le cortex cérébelleux (Sotelo and Llinas, 1972). Depuis, le développement des techniques électrophysiologiques et microscopiques ont permis de mettre en évidence des couplages électriques dans de très nombreuses structures du système nerveux des mammifères, comme la moelle épinière (Tresch and Kiehn, 2000; Walton and Navarrete, 1991), la rétine (Veruki and Hartveit, 2002), l'hippocampe (MacVicar and Dudek, 1981; MacVicar and Dudek, 1982), l'olive inférieure (Devor and Yarom, 2002; Llinas et al., 1974), le thalamus (Long et al., 2004), les ganglions de la base (Vandecasteele et al., 2005) et le cortex (Galarreta and Hestrin, 1999; Gibson et al., 1999). Les synapses électriques semblent donc constituer un mode de communication extrêmement répandu au sein du système nerveux central.

Par ailleurs ces synapses électriques sont susceptibles de revêtir une importance toute particulière au cours du développement. En effet, il a été démontré que les neurones dans les systèmes nerveux de vertébrés sont très largement couplés à l'état embryonnaire (Arumugam et al., 2005; Connors et al., 1983; Peinado et al., 1993a; Yuste et al., 1992). Au cours de l'ontogenèse, on observe une diminution de l'étendue des couplages électriques (Connors and Long, 2004; Kandler and Katz,



1995), ce qui suggère une importance particulière des synapses électriques dans la mise en place des réseaux de neurones au cours de l'ontogenèse.

La communication synaptique via les synapses électriques présente des particularités qui la différencient de la communication synaptique chimique. En effet, l'action des synapses électriques est continue dans le temps et n'est donc pas limitée à la durée pendant laquelle le neurone présynaptique est dépolarisé. De plus, ces synapses électriques permettent une communication bidirectionnelle entre les éléments pré et postsynaptique. Enfin, à l'inverse des synapses chimiques, les synapses électriques ne présentent pas de délai notable entre les modifications de potentiel du neurone présynaptique et celles du neurone postsynaptique (action quasi-instantanée). Notons cependant que l'existence de phénomènes de voltage dépendance et de rectification peuvent conférer à ces synapses une efficacité accrue à certains moments du cycle d'activité du neurone (phase dépolarisée/phase hyperpolarisée) ainsi que dans une direction privilégiée.

Du fait de ces propriétés particulières, les synapses électriques sont susceptibles de jouer des rôles très variés dans le fonctionnement des réseaux de neurones (Dermietzel, 1998; Dermietzel and Spray, 1993). Il est connu, par exemple, que les synapses électriques peuvent être importantes dans la genèse des oscillations neuronales (Loewenstein et al., 2001; Manor et al., 1997; Tresch and Kiehn, 2000). De plus, elles sont fondamentales pour la synchronisation des populations neuronales (Draguhn et al., 1998; Traub, 1995). Elles participent également à l'ajustement de certains paramètres telles que la fréquence d'oscillations dans les réseaux (Moortgat et al., 2000). Au cours du développement, les synapses électriques semblent être impliquées entre autres dans les phénomènes de mort neuronale (Cusato et al., 2003) mais également dans la mise en place de la connectivité (Curtin et al., 2002; Frank, 1993). Il a par ailleurs été suggéré que les couplages électriques jouent un rôle dans l'organisation en domaines du néocortex (Yuste et al., 1992) et permettent ainsi de définir l'architecture du système nerveux avant l'établissement des synapses chimiques (Kandler and Katz, 1995). Enfin, des études récentes ont permis de suggérer que la diminution des couplages observée au cours de l'ontogenèse pourrait permettre, à partir d'un réseau de neurones, de constituer plusieurs nouveaux réseaux sans mort cellulaire ni neurogenèse tardive (Bem et al., 2002).

De très nombreux travaux ont permis de montrer qu'il existe une modulation des synapses électriques par des neurotransmetteurs ou substances neuromodulatrices (Johnson et al., 1993; McMahon and Brown, 1994; Moss et al., 2005; Shinohara et al., 2000b; Velazquez et al., 1997; Wildering and Janse, 1992). Cependant, la mise en jeu de cette neuromodulation de même que ses conséquences fonctionnelles sur l'activité des réseaux neuronaux demeurent largement inconnues. L'un des objectifs de cette thèse a donc été de caractériser l'existence d'une modulation des synapses électriques et d'étudier ses répercussions sur l'activité des CPG aussi bien chez l'adulte qu'au cours du développement.



Pour atteindre ces objectifs, nous avons utilisé le système nerveux stomatogastrique (SNST) du homard breton. Cette préparation présente un certain nombre de caractéristiques qui la rendent particulièrement adaptée à la réalisation de cette étude. Tout d'abord, le SNST est constitué d'un faible nombre de neurones aisément identifiables d'une préparation à une autre. La taille du soma de ces neurones rend ces derniers facilement accessibles aux techniques électrophysiologiques et anatomiques. Certains neurones du SNST sont connus pour être couplés électriquement et les synapses électriques peuvent être étudiées par des approches moléculaires (deux innexines du homard breton ont été récemment clonées), neuroanatomiques et électrophysiologiques. Le système neuromodulateur du SNST est bien caractérisé, facilement manipulable expérimentalement et son action sur les rythmes produits par les réseaux du SNST a fait l'objet de nombreuses études (Combes et al., 1999a; Dickinson and Nagy, 1983; Meyrand et al., 2000; Meyrand et al., 1991; Meyrand et al., 1994; Nagy and Dickinson, 1983; Nusbaum and Marder, 1989a; Nusbaum and Marder, 1989b). Enfin, ce système présente l'avantage de pouvoir être suivi au cours du développement (Casasnovas, 1996). En effet, le système neuromodulateur ainsi que les neurones du ganglion stomatogastrique (STG) sont établis précocement, ne subissant ni apoptose ni renouvellement au cours du développement (Fenelon et al., 1998; Le Feuvre et al., 2001).

Les éléments sont donc réunis pour mener une étude sur le rôle des synapses électriques dans la plasticité adaptative des réseaux chez l'adulte et au cours de l'ontogenèse. Notre travail s'est donc appuyé sur les connaissances déjà acquises sur le système nerveux stomatogastrique, récapitulées dans le premier chapitre. Afin de pouvoir étudier les effets de la neuromodulation sur les synapses électriques, nous avons, dans le deuxième chapitre, caractérisé les couplages électriques des neurones au sein du STG. Au cours de ce chapitre, nous avons utilisé les différentes techniques permettant d'étudier les jonctions gap (diffusion de sondes, électrophysiologie, détection des ARN<sub>m</sub> par hybridation *in situ*) et avons exploré leurs limites ainsi que les différentes informations qu'elles apportent. Dans le troisième chapitre nous avons étudié les modifications des couplages électriques chez l'adulte lors de l'activation d'une paire de neurones modulateurs connue pour reconfigurer l'activité des réseaux adultes (les neurones PS) et déterminé le neurotransmetteur responsable de cette modulation. La dernière partie de ce travail est consacrée à la mise en évidence du rôle de la modulation des synapses électriques dans la plasticité ontogénétique des réseaux de neurones et, là encore, à identifier le ou les neuromédiateur(s) impliqué(s) dans cette modulation.

Ce travail nous a permis de dégager plusieurs principes concernant les synapses électriques :

- 1) les différentes techniques d'études des jonctions gap sont complémentaires et à partir des résultats obtenus avec l'une d'entre elles, il est possible, dans notre modèle, de prédire certaines caractéristiques issues des autres modes d'étude,
- 2) un faible nombre d'appositions membranaires semble suffisant pour assurer un fort couplage entre deux neurones,



- 3) contre toute attente, l'unification de plusieurs réseaux cibles obtenue par la mise en jeu d'une afférence neuromodulatrice, peut faire intervenir une diminution du couplage électrique entre les neurones les constituant,
- 4) à l'inverse, l'unification de plusieurs réseaux cibles, obtenue par la suppression d'une afférence neuromodulatrice, peut nécessiter une augmentation de la force et de l'étendue des couplages électriques,
- 5) la diminution des couplages électriques observée au cours du développement permet une individualisation des différents réseaux adultes à partir d'un unique réseau embryonnaire,
- 6) les réseaux adultes retiennent la capacité d'exprimer des activités de type embryonnaire et le type d'activité produite par les neurones dépend essentiellement de l'environnement neuromodulateur qui va agir sur la force et l'étendue des couplages électriques.

Une partie des résultats présentés dans ce manuscrit a donné lieu aux publications suivantes :

Articles :

**Ducret E., Alexopoulos H., Le Feuvre Y., Davies J.A., Meyrand P., Bacon J.P. and Fénelon V.S.** : Innexins in the lobster somatogastric nervous system : cloning, phylogenetic analysis, developmental changes and expression within adult identified dye and electrically coupled neurons. *Eur. J. Neurosci.*(2006) 24:3119-3133

**Ducret E., Le Feuvre Y., Meyrand P., Fénelon V.S.** : Removal of GABA within adult modulatory systems alters electrical coupling and allows expression of embryonic-like network. *J. Neurosci.* (sous presse)

Résumés publiés:

**Fénelon V.S., Ducret E. & Le Feuvre Y.** : Blockade of GABA synthesis within modulatory inputs results in the switch from the expression of two adult motor neural networks to a single network. 7<sup>ème</sup> colloque de la Société des Neurosciences, Lille Mai 2005.

**Ducret E., Le Feuvre Y., Meyrand P. & Fénelon V.S.** : Alteration in the extent and strength of electrical synapses between identified neurons due to network reconfiguration. 4<sup>ème</sup> forum des Neurosciences Européennes, Lisbonne Juillet 2004.





## *Matériel et méthodes*

*Pour explorer le champ des possibles, le bricolage est la méthode la plus efficace.*  
*Hubert Reeves*



## I- Les préparations utilisées.

---

### 1- Les animaux : adultes et embryons.

Les expériences ont été réalisées sur le homard européen *Homarus gammarus*, sans distinction de sexe. Les animaux adultes et les femelles grainées ont été achetés dans le commerce (Aiguillon Marée, France), puis maintenus dans des aquariums d'eau de mer artificielle, oxygénée, thermostatée à environ 14 °C. Les embryons sont prélevés directement sur les femelles gravides, et leur stade de développement est déterminé à l'aide de l'index oculaire (Casasnovas and Meyrand, 1995; Helluy and Beltz, 1991; Le Feuvre et al., 2001; Perkins and Wong, 1996). Celui-ci est déterminé en calculant la moyenne de la plus grande largeur et de la plus grande longueur de la tache pigmentée de l'œil embryonnaire, mesurées à l'aide d'un micromètre oculaire. Chaque valeur ainsi obtenue est convertie en pourcentage de développement, allant de 0 % (E0 qui correspond à la fécondation) à 100 % (E100 correspondant au jour de l'éclosion).

### 2- Dissection du système nerveux stomatogastrique adulte.

Afin de prélever le système nerveux stomatogastrique (SNST), l'animal est anesthésié 20 minutes dans de la glace puis le céphalothorax contenant le stomodeum est ouvert dorsalement. Le tube digestif antérieur est prélevé puis fendu ventralement et étalé dans une cuve à dissection remplie de liquide physiologique à 4 °C (voir pharmacologie).

Le SNST est ensuite séparé du reste de l'estomac. Les nerfs moteurs sont prélevés jusqu'aux muscles qu'ils innervent, afin de permettre l'identification ultérieure des motoneurones au sein du STG. Le SNST est alors étalé dans une boîte de Pétri recouverte d'élastomère transparent et électriquement neutre (Sylgard, Dow Corning) au moyen de minuties. Les gaines de tissu conjonctif entourant les différents ganglions du SNST sont ensuite incisées puis retirées au moyen d'un scalpel, afin de permettre l'accès aux somas des neurones pour les enregistrements électrophysiologiques ou une meilleure pénétration des anticorps et des substances pharmacologiques.

### 3- Dissection du système nerveux stomatogastrique embryonnaire.

Les embryons sont d'abord débarrassés de leurs enveloppes protectrices, puis épinglés dans une boîte de pétri tapissée de Sylgard. Les animaux sont ouverts dorsalement, et les ganglions cérébroïdes, le stomodeum et une partie de la chaîne nerveuse ventrale sont séparés du reste de l'embryon. Le stomodeum et la chaîne nerveuse sont alors fendus ventralement, et épinglés dans la



boîte de pétri. L'ensemble des ganglions et des nerfs constituant le SNST sont disséqués et la gaine entourant le STG est enlevée en utilisant des pointes de tungstène affûtées par électrolyse. Toutes ses étapes sont réalisées dans du liquide physiologique maintenu à 13 °C, oxygéné et périodiquement renouvelé.

Quelques expériences ont été réalisées sur des larves. Leur dissection est globalement comparable à celle des embryons.

## II- Techniques électrophysiologiques

---

---

### 1- Enregistrements et stimulations extracellulaires.

L'activité spontanée du SNST adulte peut être enregistrée *in vitro* au niveau des nerfs moteurs au moyen d'électrodes en inox en configuration monopolaire. Une des électrodes est placée dans la boîte de pétri et sert d'électrode de référence, la seconde est placée contre le nerf et isolée grâce à un puits de vaseline et la différence de potentiel entre ces deux électrodes est alors amplifiée 10 000 à 50 000 fois par un amplificateur différentiel (construit par P. CIRET). Ces mêmes électrodes peuvent être utilisées, grâce à un commutateur, pour stimuler les nerfs à l'aide des voies du stimulateur GRASS S88 relié à une boîte d'isolation du stimulus.

Pour stimuler les neurones PS, la difficulté à empaler les corps cellulaires conduit à avoir recours à une stimulation extracellulaire de leurs axones dans l'*ivn*. Pour cela, les électrodes appliquées contre l'*ivn* sont posées de part et d'autre des corps cellulaires des neurones PS. Des trains de stimulation de 10 s sont ensuite appliqués, avec une fréquence de 50 à 100 Hz, chaque créneau ayant une durée de 5 ms et une amplitude de 1 à 4 V. Un grand nombre d'axones sont ainsi stimulés, cependant seuls ceux des neurones PS projettent sur le STG. Ce protocole permet donc une mise en jeu sélective des neurones PS (Cazalets et al., 1990a). Le succès de la stimulation est vérifié par l'apparition de PPSE ainsi que d'un plateau dans les neurones PD, typiques de l'activation des neurones PS.

### 2- Enregistrements et stimulations intracellulaires.

L'activité générée par les SNST adulte et embryonnaire peut également être enregistrée directement au niveau des corps cellulaires des neurones du STG en empalant les somas avec des microélectrodes en verre obtenues à partir de tubes de verre en borosilicate (Clark Electromedical Instruments, paroi fine, 1,2 x 0,94 mm) chauffés et étirés (étireuse à électrodes Sutter P80) puis remplis d'acétate de potassium (KAc 2 M). Ces microélectrodes ont une résistance de 20 à 30 MΩ.



Une masse d'argent chlorurée est placée dans le bain et sert de référence. La différence de potentiel entre l'électrode et la masse est recueillie et éventuellement amplifiée au moyen d'un électromètre (Axoclamp 2B, Axon instruments).

Il est également possible de stimuler directement le soma des neurones par injection de créneaux de courant dépolarisant ou hyperpolarisant par l'intermédiaire des Axoclamps. Les paramètres de stimulation sont ajustés en fonction du protocole réalisé.

Chez l'embryon, des enregistrements intracellulaires au niveau des muscles cibles des motoneurones du STG sont aussi réalisés de façon à identifier les neurones du STG et à enregistrer les activités rythmiques.

### 3- Identification des neurones.

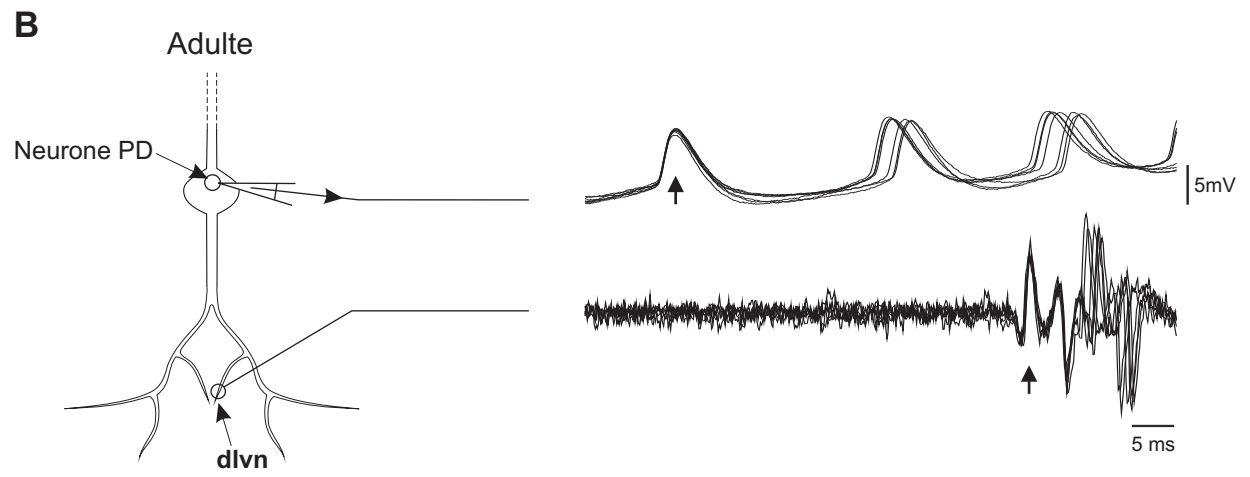
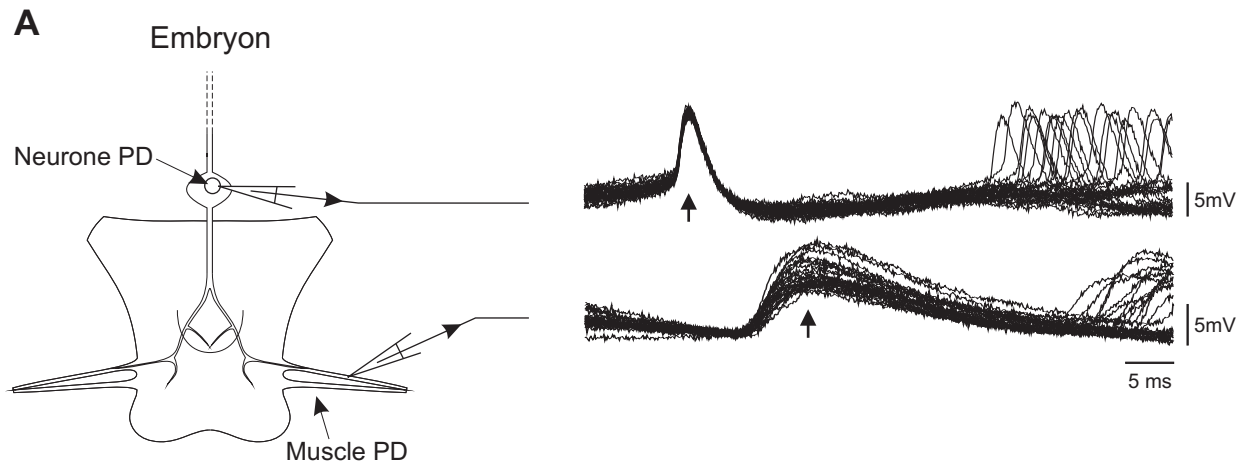
Les motoneurones sont identifiés en corrélant l'activité enregistrée au niveau du soma neuronal et l'activité enregistrée au niveau des muscles pour les embryons ou au niveau des nerfs moteurs innervant ces muscles pour les adultes. Chez l'embryon, chaque potentiel d'action enregistré au niveau du corps cellulaire du neurone est suivi à latence constante par un PPSE dans le muscle cible (Fig. 2A). Chez l'adulte, chaque potentiel d'action somatique est suivi d'un potentiel d'action à latence constante dans le nerf innervant le muscle cible (Fig. 2B). De plus, chez l'adulte, la stimulation du nerf génère un potentiel d'action antidromique enregistré au niveau du soma qui confirme l'identification réalisée. Enfin, chez l'adulte, les interneurones sont identifiés selon leur patron d'activité : l'interneurone AB est identifié par sa phase et son couplage électrique avec les neurones PD, et l'interneurone Int1, par l'inhibition qu'il reçoit du neurone LG.

### 4- Détermination de la résistance d'entrée et du coefficient de couplage entre deux neurones.

A cause de limitations techniques chez l'embryon, ces expériences n'ont été réalisées que chez l'adulte. Deux microélectrodes sont implantées dans un neurone (appelé neurone présynaptique). L'une de ces électrodes sert à injecter du courant, l'autre à mesurer les variations de potentiel dues à cette injection de courant. Le second neurone (neurone postsynaptique) est implanté avec une seule microélectrode permettant de mesurer les variations de potentiel suite à l'injection de courant dans le neurone présynaptique (Fig. 3A). Dix créneaux de 500 ms à une fréquence de 0,5 Hz sont appliqués pour chaque valeur de courant (de -20 à +20 nA tous les 4 nA) et les variations de potentiel sont ensuite mesurées au niveau pré et postsynaptique (Fig. 3B). La pente de la droite représentant la variation de potentiel présynaptique en fonction de la valeur du courant injecté permet de déterminer la valeur de la résistance d'entrée du neurone présynaptique (Fig. 3C1). Seule la partie linéaire de la courbe est prise en compte pour la détermination de la résistance d'entrée.

**Figure 2 : Méthode d'identification des neurones du STG.** Pour identifier les neurones du STG embryonnaire (A), un neurone est empalé et son activité est corrélée avec celle enregistrée intracellulairement dans un muscle qu'il innerve. Dans notre exemple, chaque potentiel d'action enregistré dans le neurone PD entraîne l'apparition d'un PPSE, à latence constante, dans le muscle PD (à droite, les deux enregistrements correspondent à la superposition de 26 traces). Les neurones adultes sont enregistrés grâce à une microélectrode intracellulaire (B) et leur activité est comparée à celle enregistrée en extracellulaire sur les nerfs moteurs. Ainsi, chaque potentiel d'action enregistré dans un neurone PD se retrouve sur le nerf moteur dans lequel projette le neurone considéré (ici, le nerf ventriculaire latéral dorsal ou *dlvn*) avec une latence constante (à droite, superposition de 7 traces).







Pour déterminer le coefficient de couplage entre deux neurones, la courbe représentant la variation de potentiel postsynaptique en fonction de la variation de potentiel présynaptique pour chaque courant injecté est construite (Fig. 3C2). Cette représentation permet de déterminer le coefficient de couplage entre les deux neurones ainsi que le caractère linéaire ou rectifiant de la synapse électrique les unissant (voir chapitre 2, paragraphe II-2).

Sur ces mêmes préparations, une mesure témoin visant à déterminer le couplage entre les électrodes est effectuée. Deux électrodes sont maintenues dans le neurone présynaptique alors que l'électrode postsynaptique n'est plus empalée dans un neurone, mais laissée dans le liquide physiologique à proximité du STG. Des créneaux de courant sont alors appliqués et la courbe représentant la variation du voltage postsynaptique en fonction de la variation de voltage présynaptique est tracée. Nous avons pu observer que le coefficient de couplage entre électrodes est toujours proche de 0.

Lorsque nous avons voulu étudier le décours temporel des modifications de résistance d'entrée et de coefficient de couplage, nous avons réalisé une évaluation de ceux-ci en calculant le rapport de la variation du potentiel présynaptique sur la valeur du courant injecté (pour la résistance d'entrée des neurones) et le rapport de la variation du potentiel postsynaptique sur la variation du potentiel présynaptique (pour le coefficient de couplage).

#### 5- Visualisation et traitement des données électrophysiologiques.

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

### III- Pharmacologie et milieux ioniques

---

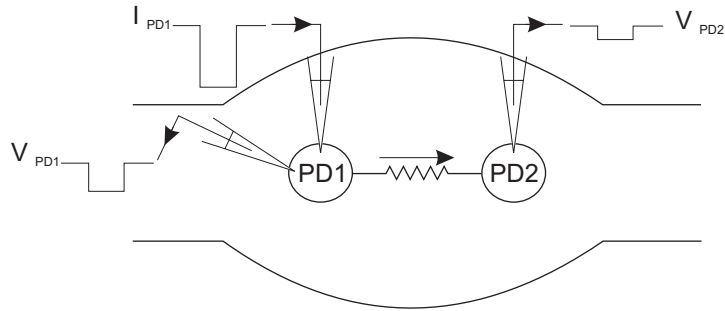
---

#### 1- Milieux ioniques.

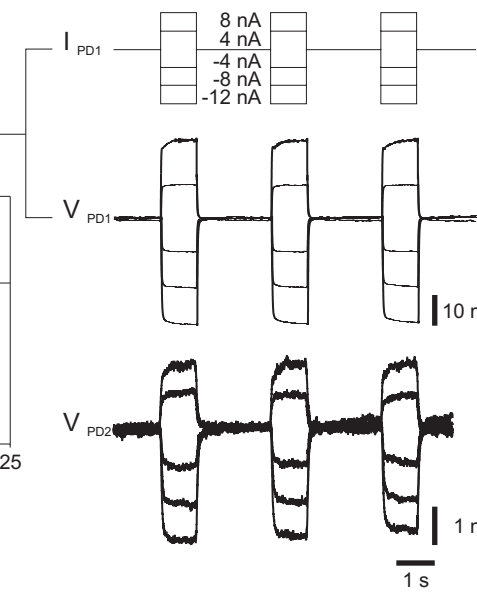
Les expériences ont été réalisées en perfusant un liquide physiologique sur les préparations (NaCl : 479,1 mM ; KCl : 12,7 mM ; MgSO<sub>4</sub> : 10 mM ; CaCl<sub>2</sub>(2H<sub>2</sub>O) : 13,6 mM ; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : 3,9 mM ; HEPES : 5 mM ; pH :7,45). La solution est oxygénée et maintenue à 14 °C au moyen d'un système de refroidissement à effet Pelletier.

**Figure 3 : Méthode de détermination de la résistance d'entrée et du coefficient de couplage des neurones.** Un neurone est empalé avec deux microélectrodes (A, PD1, PD présynaptique), l'une permettant d'injecter du courant ( $I_{PD1}$ ) et l'autre permettant d'enregistrer le potentiel de membrane de ce même neurone ( $V_{PD1}$ ). Une seule microélectrode est implantée dans le neurone postsynaptique (PD2, PD postsynaptique) et enregistre le potentiel membranaire de ce neurone ( $V_{PD2}$ ). Des créneaux de courants croissants sont injectés (B) de façon répétée pour une même valeur de courant (10 mesures) et les variations de potentiel correspondantes à ces créneaux sont enregistrées au niveau pré et postsynaptique. La pente de la droite représentant la moyenne des déflexions de voltage du neurone présynaptique en fonction des valeurs du courant injecté leur correspondant (C1) est égale à la résistance d'entrée moyenne du neurone présynaptique. Le coefficient de couplage moyen de PD1 vers PD2 correspond à la pente de la droite représentant les variations du potentiel de PD2 en fonction des déflexions de potentiel enregistrées dans PD1 (C2).

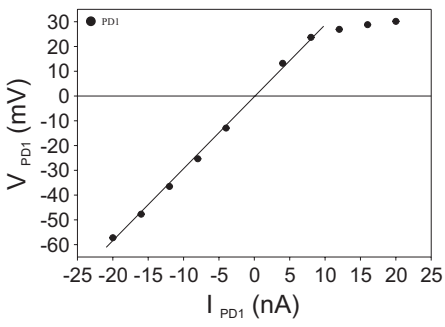
**A**



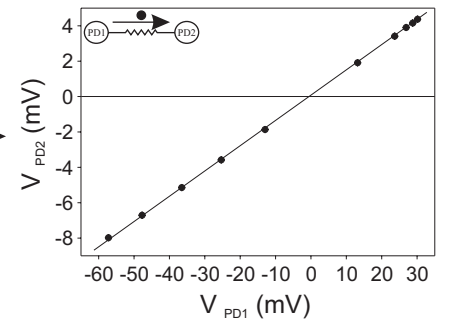
**B**



**C1**



**C2**





Pour mesurer les coefficients de couplage sur des préparations actives, un liquide physiologique modifié a été perfusé (eau de mer artificielle (EMA) : NaCl : 400,9 mM ; KCl : 9,79 mM ; CaCl<sub>2</sub> (2H<sub>2</sub>O) : 10,12 mM ; MgCl<sub>2</sub>(6H<sub>2</sub>O) : 52,63 mM ; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : 27,83 mM ; NaHCO<sub>3</sub> : 2,51 mM ; NaBr(2H<sub>2</sub>O) ; pH = 7,45) de façon à ralentir les rythmes du STG.

## 2- Pharmacologie.

L'application de substances pharmacologiques se fait soit de façon globale par périfusion sur l'ensemble de la préparation soit de façon locale, par périfusion sur une partie spécifique du SNST délimitée par un puits de vaseline étanche ou par microéjection sous pression.

### *2.1- Application par périfusion de substances pharmacologiques*

Les substances suivantes, provenant toutes de chez Sigma, ont été utilisées dissoutes dans du liquide physiologique : tétródotoxine (TTX : 10<sup>-7</sup> M, bloquant les courants sodiques voltage-dépendant rapides, impliqués dans la genèse des potentiels d'action), picrotoxine (PTX : 10<sup>-6</sup> M, bloqueur des récepteurs associés à un canal chlorure et notamment antagoniste glutamatergique chez les crustacés), acide 3-mercapto-propionique (3-MPA : 10<sup>-3</sup> M, inhibiteur de la glutamate décarboxylase et donc de la synthèse du GABA), cimétidine (10<sup>-3</sup> M, antagoniste histaminergique H<sub>2</sub> chez les vertébrés), histamine (10<sup>-3</sup> M), chlorure de césium (CsCl : 5x10<sup>-3</sup> M, bloquant des courants I<sub>h</sub>), tétraéthylammonium (TEA : 2x10<sup>-2</sup> M, bloquant les conductances potassiques), 4-aminopyridine (4-AP: 4x10<sup>-3</sup> M, bloquant des canaux I<sub>A</sub>).

### *2.2- Application par microéjection sous pression de substances pharmacologiques*

Des microéjections d'histamine 10<sup>-3</sup> M ou de GABA 10<sup>-3</sup> M ont été réalisées sur le STG à l'aide d'un picospitzer II (General Valve Corporation 20 psi, 20 ms). La pointe de la pipette d'éjection est positionnée à proximité du site d'enregistrement intracellulaire. Ce mode d'application permet une exposition courte des neurones à la drogue.

## IV- Photo-ablation de neurones.

---

---

La photo-ablation d'un neurone consiste à tuer spécifiquement un neurone identifié par photo-oxydation d'une molécule injectée dans celui-ci sans altérer les autres neurones (Miller and Selverston, 1979). Pour cela, la pointe d'une microélectrode est remplie avec de la 5,6-





carboxyfluorescéine (Sigma) diluée à 5 % dans du KAc 0,1 M, le reste de l'électrode étant remplie avec du KAc 2 M puis le neurone à éliminer est injecté par iontophorèse (500 ms, 0,5 Hz, -10 à -20 nA, voir paragraphe suivant) pendant 30 minutes à 1 heure. Cette molécule a un fort poids moléculaire ( $376 \text{ g.mol}^{-1}$ ) et ne passe donc pas les jonctions de type gap chez les Crustacés. Les préparations sont laissées une heure de façon à permettre à la carboxyfluorescéine de migrer dans la totalité du neuropile du neurone puis la préparation est illuminée avec un éclairage de forte intensité (Leica CLS 150D) provoquant ainsi la photo-oxydation de la fluorescéine et la libération de radicaux libres, létaux pour le neurone. La mort du neurone est vérifié par l'arrêt des activités électrophysiologiques sur le nerf correspondant, et l'augmentation du potentiel de membrane jusqu'à 0 mV.

Par exemple, lorsque nous désirons obtenir une paire de neurones PD isolés, les neurones connus pour être électriquement couplés à ceux-ci (VD et AB) sont d'abord identifiés, puis injectés simultanément à la carboxyfluorescéine. Ces neurones sont ensuite tués par exposition à la lumière de forte intensité.

## V- Techniques morphologiques.

---

### 1- Injection de marqueurs dans des neurones identifiés.

#### *1.1- Injection par iontophorèse.*

Cette technique permet d'injecter des substances chargées dans une cellule : après empallement du neurone d'intérêt, un courant électrique de même charge que celle de la charge nette de la molécule est appliqué et par répulsion, la substance est expulsée en dehors de la microélectrode vers l'intérieur du neurone. Le jaune lucifer (acide 6-Amino-2,3-dihydro-1,3-dioxo-2-hydrazinocarbonylamino-1H-benz[d,e]isoquinoline-5,8-disulfonique,  $457,3 \text{ g.mol}^{-1}$ , Sigma), le dextran-tétraméthylrhodamine ( $3000 \text{ g.mol}^{-1}$ , Molecular Probe), le dextran-fluorescéine ( $3000 \text{ g.mol}^{-1}$ , Molecular Probe) et la neurobiotine (N-(2-aminoethyl) biotinamide hydrochloride ;  $323 \text{ g.mol}^{-1}$  ; Vector Laboratories) ont été injectés de cette manière. Le jaune lucifer est dilué à 5 % dans du chlorure de lithium à 2,5 mM. Ce fluorophore, chargé négativement, est injecté en appliquant des créneaux de courant hyperpolarisant de 500 ms avec une fréquence de 0,5 Hz allant de -10 à -20 nA. Les autres molécules sont toutes diluées à 10 % dans de l'acétate de sodium 2 M. Elles sont chargées positivement et par conséquent sont injectées à l'aide de créneaux de courant positif (+10 à +20 nA, 0,5 Hz, 500 ms).

Pour les fluorophores (jaune lucifer, dextran-fluorescéine, dextran-tétraméthylrhodamine) les injections durent 30 minutes à 1 heure et sont arrêtées lorsque le corps cellulaire apparaît marqué en lumière naturelle. Les préparations sont ensuite laissées 1 heure sur le Pelletier de façon à permettre aux fluorophores de migrer dans la totalité du neuropile des neurones.



En ce qui concerne la neurobiotine, les neurones adultes sont injectés pendant 2 heures, puis les préparations sont laissées 12 heures à 4 °C pour laisser le temps à la neurobiotine d'envahir les neurones couplés au neurone injecté. Le même protocole est réalisé pour les préparations embryonnaires mais avec des temps plus courts. Ainsi, l'injection des neurones embryonnaires ne dure que 20 minutes et le temps laissé à la neurobiotine pour migrer n'est que de 2 à 4 heures. Les temps d'injection sont scrupuleusement respectés de façon à limiter les différences de quantité de neurobiotine injectée entre préparations d'un même stade.

### *1.2- Injection par pression.*

Cette technique permet d'injecter de grandes quantités de fluorophore dans un neurone. Nous y avons eu recours pour coupler l'injection d'un neurone avec des traitements, tels l'hybridation *in situ*, qui provoquent un important photoblanchiment de la sonde fluorescente. Le dextran couplé à la fluorescéine et au tétraméthylrhodamine ont été injectés de la sorte à l'aide d'un picospitzer II (10 psi, 20 ms), jusqu'à l'obtention d'un corps cellulaire fortement coloré en lumière naturelle.

## 2- Traitement histologique des préparations.

### *2.1- Pour une observation des neurones injectés en microscopie confocale.*

Les préparations sont fixées une nuit dans du paraformaldéhyde (PFA, Sigma) dilué à 4% dans une solution de NaCl : 115,5 mM, KCl : 4 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 81 mM et NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 19 mM à pH=7,5.

Le PFA est rincé (5 lavages d'une heure) avec du tampon phosphate salin (PBS, NaCl : 154 mM ; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 80 mM ; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 17,7 mM ; pH = 7,4) puis les préparations sont déshydratées par des bains successifs de 10 minutes dans de l'alcool à 50, 75, 80, 95 et 100 % et éclaircies par un bain de méthylsalicylate (acide 2-hydroxybenzoïque methyl ester, Sigma) jusqu'à décoloration complète. Enfin, les préparations sont montées entre lame et lamelle dans du Permount (Fischer Scientific) pour être ensuite observées au microscope confocal.

### *2.2- Pour une visualisation de la neurobiotine.*

Les préparations sont d'abord fixées 12 heures dans du PFA à 4% puis le PFA est rincé (5 lavages d'une heure) avec du PBS. Ensuite, la neurobiotine est révélée au moyen d'avidine-DCS couplée à du Texas Red ou à de la fluorescéine (Vector Laboratories) diluée au 1/200 dans du tampon phosphate salin auquel est ajouté du Triton X100 à 0,3 % (PBST). Les préparations sont ensuite



rincées (5 lavages d'une heure à 4 °C avec du PBS) puis montées dans du glycérol à 90 % et 10 % NaHCO<sub>3</sub> afin d'être observées.

### 3- Traitement immunocytochimique.

#### *3.1- Pour la détection de l'histamine.*

L'histamine a été mise en évidence par marquage immunocytochimique. Les préparations fraîchement disséquées et dégainées sont fixées 12 heures à 4 °C dans de l'EDAC (N-(3-diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide, hydrochloride, Sigma) dilué à 4 % dans du liquide physiologique. Sur certaines préparations, des neurones ont été injectés par pression avec du dextran tétraméthylrhodamine au moyen d'un picospitzer II puis les STG ainsi traités ont été fixés dans de l'EDAC dilué à 4 % dans du PFA 4 %. Après 5 rinçages d'une heure avec du PBS, les préparations sont incubées 48 heures dans un anticorps anti-histamine polyclonal obtenu chez le lapin (Chemicon), dilué au 1:200 dans du PBST avec 10 % de sérum de chèvre (normal goat serum, NGS). Après avoir rincé l'anticorps primaire (5 lavages d'une heure dans du PBS), les préparations sont incubées avec un anticorps dirigé contre les immunoglobulines de lapin, obtenu chez la chèvre et couplé à de la cyanine-5 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) dilué au 1:100 dans du PBST avec 10 % de NGS. Les préparations sont ensuite rincées au PBS puis montées entre lame et lamelle dans du glycérol.

Des expériences témoins ont été réalisées en omettant d'incuber les préparations avec l'anticorps primaire. De plus, de façon à tester la spécificité de l'anticorps primaire, celui-ci a parfois été pré-incubé avec de l'histamine (10<sup>-3</sup> M) ou de la sérotonine (5-HT, 10<sup>-3</sup> M, Sigma) pendant 12 heures à 4 °C. Ensuite, le mélange de l'anticorps avec le neurotransmetteur a été utilisé pour réaliser le protocole d'immunocytochimie.

#### *3.2- Pour la détection de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA).*

Pour mettre en évidence le GABA, les différents ganglions du SNST sont dégainés puis fixés 2 heures dans du PFA 4%. Après 6 rinçages de 20 minutes avec du PBST, les préparations sont incubées pendant 48 heures avec un anticorps polyclonal dirigé contre le GABA obtenu chez le lapin (Sigma) dilué au 1:200 dans du PBST avec 10 % de NGS. Ensuite, les préparations sont à nouveau rincées 6 fois pendant 20 minutes avec du PBST puis incubées 18 à 24 heures avec un anticorps dirigé contre les immunoglobulines G de lapin obtenu chez la chèvre et couplé avec du FITC ou du Texas Red (Vector Laboratories) dilué au 1:200 dans du PBST. Après avoir été rincées au PBS, les préparations sont montées entre lame et lamelle dans du glycérol.



Des travaux antérieurs ont vérifié la spécificité de l'anticorps par préadsorption sur le SNST du crabe, *Cancer borealis* (Blitz et al., 1999). Nous avons cependant réalisé des contrôles sur un SNST de homard en pré-incubant l'anticorps primaire avec du GABA à une concentration de  $10^{-4}$  M pendant une nuit à 4 °C puis en utilisant ce mélange pour réaliser l'immunocytochimie. Dans ces conditions, aucun marquage n'est observable.

#### 4- Acquisition et traitement des images en microscopie confocale.

Les acquisitions des marquages fluorescents sont réalisées au moyen d'un microscope confocal Olympus BX51 Fluoview 500 équipé d'un laser argon émettant à 488 nm, d'un laser hélium vert émettant à 543 nm et d'un laser hélium rouge émettant à 633 nm. Les préparations adultes injectées à la neurobiotine ainsi que le marquage immunohistochimique anti-GABA et anti-histamine sont observées à l'objectif X10, et les coupes optiques réalisées ont une épaisseur de 2,5 à 5  $\mu\text{m}$ . Les préparations embryonnaires sont observées à l'objectif X20 à immersion dans l'eau (coupe optique de 1  $\mu\text{m}$ ) ou montées dans du glycérol 90 % -  $\text{NaHCO}_3$  10 % puis observées aux objectifs X20 et X40 à immersion à huile (coupes optiques de 1,5 et 0,7  $\mu\text{m}$  respectivement).

Chez l'adulte, pour mettre en évidence les zones de superposition de deux marquages, des acquisitions à l'objectif X40 de 0,5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur sont d'abord réalisées de façon à balayer l'ensemble du ganglion stomatogastrique puis les zones d'intérêt sont observées à l'objectif X60 (coupes optiques de 0,3  $\mu\text{m}$ ).

Le logiciel Fluoview permet d'attribuer une fausse couleur à chaque longueur d'onde d'émission reçue. Ainsi, nous attribuons à l'un des fluorophores une couleur verte et à l'autre, une couleur rouge. Lorsque les deux fluorophores sont colocalisés, la superposition du rouge et du vert donne une couleur jaune. Ainsi, les zones d'apposition de deux neurones correspondent à la colocalisation des deux marquages sur une coupe optique (voir Fig 14A1). De façon à confirmer ces observations, des analyses sont effectuées en mode multiplan (voir Fig 14A2). Ce mode permet d'analyser les séries de coupes optiques sur trois plans de l'espace (X-Y, Y-Z et X-Z). Lorsqu'un marquage jaune est détecté sur ces trois plans, nous considérons cette zone comme une localisation potentielle d'apposition des marquages. Lorsque trois marquages sont réalisés sur une même préparation, les colocalisations sont recherchées pour chaque couple de fluorophores (voir Fig 37B).

#### 5- Quantification du marquage à la neurobiotine.

Les séries de coupes optiques prises au microscope confocal sont converties en niveau de gris et chargées dans le logiciel Scion Image. L'intensité du marquage à la neurobiotine est mesurée sur la





surface de chaque neurone au niveau d'une coupe optique choisie pour permettre de visualiser le diamètre le plus large de ce neurone.

Le bruit de fond est mesuré en trois endroits, environ au milieu du STG, situés sur une coupe optique représentant le plan médian du ganglion. La moyenne de ces trois mesures est ensuite faite et va constituer la valeur du bruit de fond. Cette valeur est ensuite soustraite à la valeur de l'intensité du marquage mesurée pour chaque neurone et seuls les neurones pour lesquels la valeur finale est supérieure à 0 sont considérés comme étant marqués.

#### 6- Reconstruction des neurones.

Les séries de coupes optiques obtenues à l'objectif X40 sont chargées dans le logiciel Neurolucida (V 6.02.2, Microbright field, Inc.). L'espacement entre chaque coupe optique est spécifié ainsi que l'échelle dans le plan X-Y, ce qui permet de respecter les proportions des neurones ainsi que d'avoir des mesures du diamètre et de la longueur de chaque branche. Les neurones sont ensuite dessinés, en n'omettant aucune branche, en partant du corps cellulaire et en suivant l'axone. Chaque bifurcation est reportée, et la branche issue de l'axone est reconstruite. Une fois cette branche terminée, la reconstruction de l'axone est reprise jusqu'à arriver à l'extrémité du STG du côté du nerf ventriculaire dorsal (*dvn*). Les zones d'apposition sont ensuite localisées à l'aide de repères placés sur l'arborisation.

Les reconstructions sont ensuite chargées dans le programme Neuroexplorer (V 4.01.1, Microbright field, Inc.) qui permet l'acquisition de l'ensemble des données concernant la morphologie des neurones, notamment la taille et la longueur de chaque branche ainsi que leur dendrogramme.

Pour classer les neurites, nous avons appliqué une numérotation de Shaft, dans laquelle une branche (l'axone) est assignée d'ordre 1, puis une numérotation centrifuge classique est appliquée.

## VI- Hybridation *in situ*

---

---

Les premiers produits obtenus par PCR lors du clonage de l'innexine 1 et de l'innexine 2 de homard (fragments de 550 à 600 paires de bases) sous-clonés dans le vecteur pCRII-TOPO (Invitrogen) ont été utilisés pour générer des sondes. Après avoir été linéarisés au moyen de l'enzyme de restriction Hind III ou Xho I, les ADN plasmidiens sont purifiés sur gel d'agarose. Les sondes sens sont ensuite synthétisées en utilisant l'ARN polymérase *sp6*, dont le promoteur est devenu accessible grâce à la digestion par Xho I, et les sondes antisens sont synthétisées à partir de l'ADN plasmidien digéré par Hind III qui libère le promoteur de l'ARN polymérase T7. Lors de la synthèse de ces deux



sondes, le kit DIG/Genius (Roche) a été utilisé de façon à ajouter un nucléotide couplé à la digoxygénine (DIG) tous les 20 à 25 nucléotides.

Une partie des sondes a été obtenue par PCR en utilisant un kit (PCR DIG probe synthesis kit, Roche) et des amorces appropriées (CCC CGC TAC CTG TGG AAG et CAG CCA GAA CCA GAT GAA GAT pour l'innexine 1 et ATT CCC CGG TAT CTA TGG AAA et GAA CCA GAA CA GAG GAA AAT pour l'innexine 2).

Les ganglions dégainés sont fixés une nuit à 4 °C dans du PFA 4 % puis rincés au moins 3 fois avec du PBS modifié (NaCl : 137 mM ; KCl : 26,8 mM ; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O : 100 mM ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 17,6 mM ; pH = 7,4). Une digestion à la protéinase K à 20 µg/mL dans du PBT (PBS modifié auquel est ajouté 0,1 % de Tween 20) pendant 1 minute est réalisée, suivie de 5 rinçages de 5 minutes au PBT puis d'une post-fixation au PFA 4 % pendant 15 minutes. Après 5 rinçages de 5 minutes avec du PBT, les préparations sont incubées 1 heure à 55 °C dans une solution d'hybrix (50 % de formamide, citrate de sodium 5X (NaCl : 750 mM ; citrate de sodium, 2H<sub>2</sub>O : 75 mM, pH = 7), 100 µg.mL<sup>-1</sup> d'ARN<sub>t</sub>, 50 µg.mL<sup>-1</sup> d'héparine, 0,1 % de Tween 20), puis 24 heures à 55 °C soit avec la sonde antisens marquée à la digoxygénine (sonde diluée à 0,4 % dans de l'hybrix) soit avec la sonde sens couplée à la digoxygénine pour effectuer les expériences témoins. Les préparations sont rincées 15 minutes à 55 °C dans de l'hybrix, puis 2 fois 15 minutes à 55 °C dans du citrate de sodium 5X puis 3X et enfin 1X mais à température ambiante pour ce dernier lavage. Les sondes non hybridées sont éliminées par une incubation pendant 20 minutes à 37 °C dans une solution tampon de RNase (NaCl : 500 mM ; Tris : 10 mM ; EDTA : 1 mM ; RNase A : 20 µg.mL<sup>-1</sup> ; pH = 8), puis la RNase est rincée au moyen de 2 bains de 10 minutes dans du PBT à température ambiante.

Pour la détection de la digoxygénine, les ganglions sont incubés 1 heure dans du PBT additionné de 5 % de NGS puis 3 heures à température ambiante avec un anticorps anti-digoxygénine couplé à la phosphatase alcaline, dilué au 1/2000 dans du PBT avec 5 % de NGS. Après 12 rinçages de 5 minutes dans du PBT et 5 rinçages de 5 minutes dans la solution finale (Tris-HCl : 100 mM ; NaCl : 100 mM ; MgCl<sub>2</sub> : 50 mM ; levamisole : 2 mM ; 0,1 % Tween 20 ; pH = 9,5), les préparations sont plongées dans la solution de coloration (chlorure de 4-nitrobleu tétrazolium : 0,45 ‰ ; et 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate : 0,035 ‰) pendant 12 heures à 4 °C puis rincées 12 fois au PBT pendant 5 minutes. Les préparations sont ensuite observées soit directement dans la boîte de Pétri au moyen d'une loupe binoculaire couplée à une caméra digitale Nikon Coolpix, soit après montage entre lame et lamelle dans du glycérol 90 % - NaHCO<sub>3</sub> 10 % en utilisant une caméra digitale SPOT RT couplée à un microscope ZEISS Axioskop ou une caméra digitale Nikon DXM 120 montée sur une Nikon Eclipse E600. Ce dernier microscope couplé à un dispositif de détection d'épifluorescence a permis de réaliser les acquisitions de fluorescence et de marquage à la DIG.



## **VII- Traitement des données**

---

Les tests statistiques ont été effectués avec le logiciel Statistica 6. Les Figures ont été réalisées à l'aide des logiciels CorelDraw, Corel Photo-paint version 7 et les graphiques sont réalisés avec le logiciel Sigmaplot 2000. Toutes les valeurs sont données sous forme de moyenne  $\pm$  erreur standard à la moyenne (SEM).



# *Chapitre 1*

## *Présentation du modèle*

*Celui qui ne voit rien d'étrange n'a jamais regardé un homard en face.  
Auguste Villiers de l'Isle-Adam*





## I- Introduction.

---

---

La caractérisation du rôle de la modulation des synapses électriques dans le développement et la plasticité des réseaux neuronaux nécessite d'utiliser un modèle dans lequel les neurones modulateurs ainsi que l'organisation de leurs réseaux cibles sont connus et établis aussi bien chez l'adulte que chez l'embryon. Le présent chapitre s'attachera à démontrer que le système nerveux stomatogastrique qui commande la motricité du tube digestif antérieur chez le homard breton, *Homarus gammarus*, est particulièrement adapté à une telle étude.

Brièvement, dans ce système nerveux, la même population neuronale, constituée d'un faible nombre de neurones identifiables d'une préparation à l'autre, est organisée en un réseau moteur unique durant le développement embryonnaire et pendant les premiers stades larvaires puis se scinde en trois réseaux fonctionnels distincts à la métamorphose (Casasnovas and Meyrand, 1995). Ces réseaux moteurs sont contrôlés, aussi bien chez l'adulte que chez l'embryon, par un même ensemble de neurones modulateurs facilement identifiables qui acquièrent leurs substances neuromodulatrices progressivement au cours du développement (Fenelon et al., 1999; Kilman et al., 1999). Chez l'adulte, ces neurones ont été particulièrement étudiés. Leurs cibles ainsi que leur action sur les propriétés intrinsèques des neurones moteurs ont été particulièrement bien documentées.

## II- L'intestin antérieur des crustacés adultes.

---

---

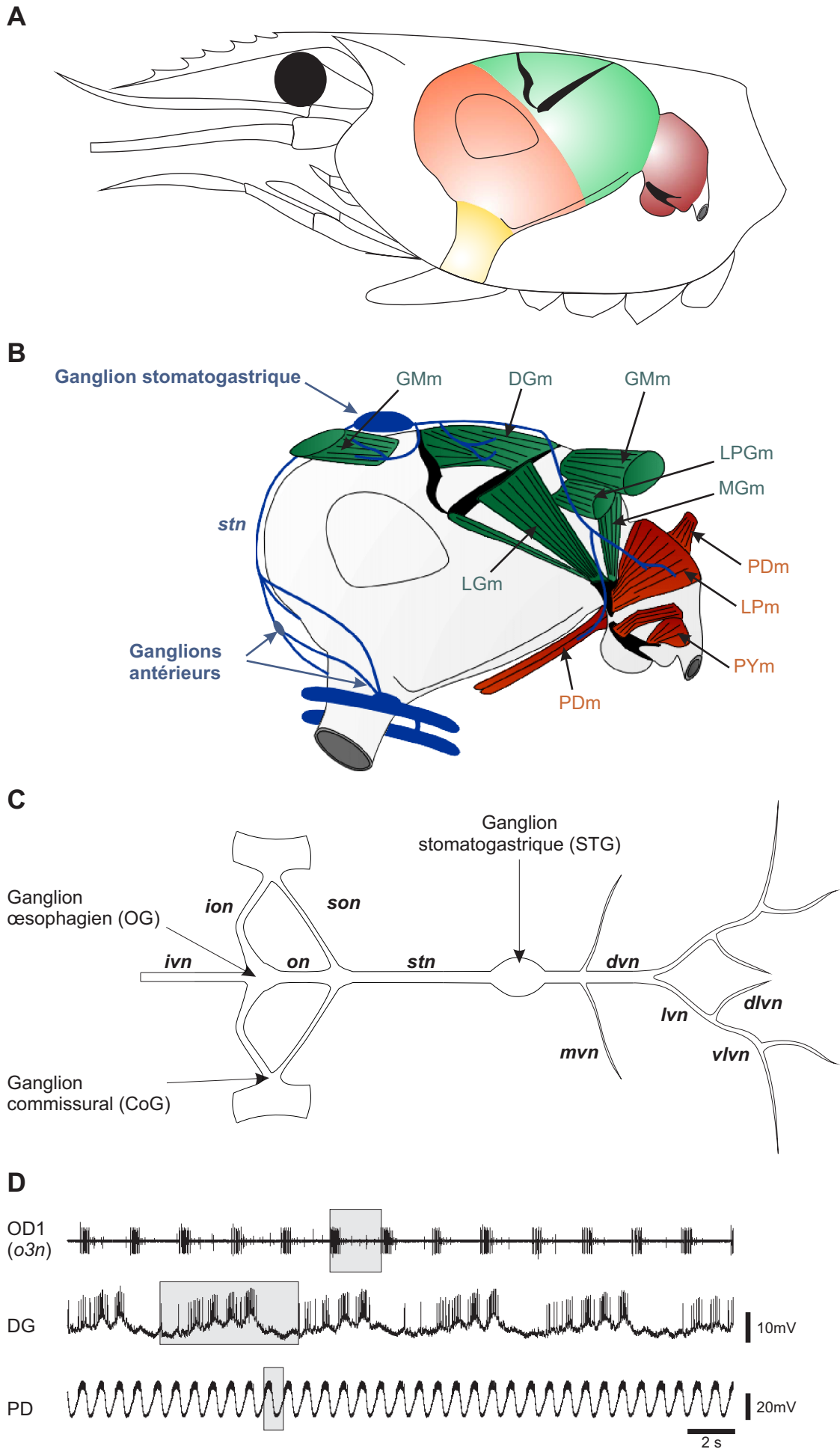
Chez les crustacés décapodes, l'intestin antérieur ou stomodeum est constitué d'un court œsophage qui amène les aliments dans un estomac compartimenté (Fig. 4A). Dans sa partie la plus antérieure appelée sac cardinal, l'estomac sert au stockage des aliments qui sont ensuite broyés par les trois dents chitineuses du moulinet gastrique, une médiane et deux latérales, situé plus postérieurement dans le stomodeum. La dent médiane est animée par des mouvements d'avant (protraction) en arrière (rétraction) et les dents latérales présentent une alternance de mouvements d'ouverture et de fermeture. Les aliments sont enfin filtrés par le pylore avant d'être acheminés dans l'intestin moyen où a lieu l'absorption intestinale. De plus, une valve cardio-pylorique sépare le pylore du moulinet gastrique et une valve cardio-œsophagienne sépare l'œsophage du sac cardinal.

Les mouvements des différentes parties de l'estomac sont assurés par des muscles striés (Fig. 4B) répartis en deux groupes distincts :

- les muscles intrinsèques constricteurs s'insèrent sur deux apodèmes situés sur le stomodeum (voir par exemple DGm et LPm, Fig. 4B),
- les muscles extrinsèques dilatateurs s'insèrent sur un apodème d'un côté et sur l'exosquelette de l'autre (Fig. 4B, GMm et PDm par exemple).

**Figure 4 : Le système nerveux stomatogastrique du homard adulte.** Le stomodeum du homard constitue la partie antérieure du tube digestif et se trouve dans le céphalothorax (A). Il débute par un court œsophage (en jaune) qui amène les aliments jusqu'au sac cardial (en orange). Les aliments sont ensuite broyés par les trois dents chitineuses du moulinet gastrique (en vert) avant d'être filtrés par le pylore (en rouge foncé) et de passer dans l'intestin moyen. La musculature de l'estomac est contrôlée par le système nerveux stomatogastrique (B, en bleu) dont le ganglion stomatogastrique rassemble les motoneurones responsables de la contraction des muscles du moulinet gastrique (en vert) et du pylore (en rouge). Le système nerveux stomatogastrique est constitué de ganglions antérieurs qui rassemblent les deux ganglions commissuraux et le ganglion œsophagien (C). Ceux-ci innervent le ganglion stomatogastrique par un unique nerf, le nerf stomatogastrique. De ce ganglion part le nerf dorsal ventriculaire dont émergent les nerfs moteurs qui vont contacter les muscles du moulinet gastrique et du pylore. Le système nerveux stomatogastrique regroupe trois réseaux moteurs. Le réseau œsophagien contrôle les mouvements des muscles œsophagiens et se caractérise par une période d'activité de 2 à 5 s (D, voir l'activité du motoneurone OD1 enregistré extracellulairement sur le nerf œsophagien 3 ou *o3n*). Les neurones du réseau gastrique innervent les muscles du moulinet gastrique et présentent une activité lente avec une période pouvant aller de 6 à 10 s (voir DG, enregistré par une électrode intracellulaire). Enfin, le réseau pylorique rassemble les neurones responsables de la motricité du pylore. Ces neurones ont une activité rapide avec une période d'environ 1 s (voir l'enregistrement intracellulaire de PD). Les cadres gris soulignent les différentes périodes des trois rythmes.

Abréviations : *dlvn* : nerf ventriculaire latéral dorsal, *dvn* : nerf ventriculaire dorsal, *ion* : nerf œsophagien inférieur, *ivn* : nerf ventriculaire inférieur, *lvn* : nerf ventriculaire latéral, *mvn* : nerf médian ventriculaire, *o3n* : nerf œsophagien 3, *on* : nerf œsophagien, *son* : nerf œsophagien supérieur, *stn* : nerf stomatogastrique, *vlvn* : nerf ventriculaire latéral ventral, DGm : muscle innervé par le motoneurone gastrique dorsal, GMm : muscle innervé par les motoneurones gastriques, LGm : muscle innervé par le motoneurone gastrique latéral, LPm : muscle innervé par le motoneurone pylorique latéral, LPGm : muscle innervé par les motoneurones gastriques latéraux postérieurs, MGm : muscle innervé par le motoneurone gastrique médian, PDM : muscle innervé par les motoneurones pyloriques dorsaux, PYm : muscle innervé par les motoneurones pyloriques, DG : neurone gastrique dorsal, OD1 : neurone dilatateur œsophagien 1, PD : neurone dilatateur pylorique.





Ces muscles se contractent rythmiquement et permettent ainsi l'ingestion des aliments (muscles œsophagiens), leur broyage (muscles gastriques) puis leur filtration (muscles pyloriques). Les motoneurones innervant ces muscles sont organisés en réseaux situés dans des ganglions identifiés reliés par des nerfs, l'ensemble formant le système nerveux stomatogastrique (SNST).

### III- Le système nerveux stomatogastrique adulte.

---

---

Ce système nerveux (Fig. 4C) est composé de trois ganglions antérieurs (le ganglion œsophagien (OG) et les deux ganglions commissuraux (CoG)) situés à proximité de l'œsophage. Les CoG sont reliés à l'OG par les deux nerfs œsophagiens inférieurs (*ion*). De l'OG part le nerf ventriculaire inférieur (*ivn*), contenant les deux neurones modulateurs PS, qui le relie au cerveau. De l'OG est également issu le nerf œsophagien (*on*) qui donne naissance au nerf stomatogastrique et aux deux nerfs œsophagiens supérieurs (*son*), ces derniers rejoignant les CoG. Le nerf stomatogastrique (*stn*) innerve le ganglion stomatogastrique (STG), constituant ainsi son unique nerf afférent. De ce ganglion, part le nerf ventriculaire dorsal qui se divise en deux nerfs ventriculaires latéraux, ces derniers donnant naissance aux différents nerfs moteurs qui vont innerver les muscles du moulinet gastrique et du pylore.

Chaque CoG contient environ 500 neurones (Kilman, 1998) et l'OG en contient 10 à 15 (Spirito, 1975). Parmi ces neurones, une quarantaine sont des neurones modulateurs. Ces ganglions contiennent aussi des motoneurones contrôlant les contractions des muscles de l'œsophage et du sac cardiaal. Les neurones du réseau œsophagien présentent, *in vitro*, une activité rythmique spontanée, constituée de la décharge de motoneurones dilatateurs (Fig. 4D, neurone OD1 enregistré par des électrodes extracellulaires placées sur le nerf *o3n*) suivie d'une activation de motoneurones constricteurs, avec une période pouvant aller de 2 à 5 s.

Le STG est constitué d'environ 35 neurones répartis sur la périphérie du ganglion, le centre du STG est quant à lui occupé par du neuropile, c'est-à-dire par des prolongements neuronaux issus des neurones modulateurs projetant sur le STG ou des neurones du STG eux-mêmes (Cabirol-Pol, 1998). Les neurones du STG, principalement des motoneurones, s'organisent en deux réseaux, le réseau gastrique et pylorique. L'activité de ces deux réseaux conduit les muscles gastriques et pyloriques à se contracter selon une séquence temporelle définie qui se répète rythmiquement. Ainsi, le réseau pylorique qui contrôle les mouvements de la chambre pylorique a une période d'activité de 1 s (Fig. 4D, neurone PD enregistré intracellulairement) et le réseau gastrique, responsable des mouvements des trois dents du moulinet gastrique, présente une période de 6 à 10 s (Fig. 4D, voir le neurone DG enregistré par une électrode intracellulaire). Ces deux activités, ainsi que l'activité œsophagienne, sont obtenues spontanément *in vitro* lorsque l'ensemble du SNST est isolé (Fig. 4D).



Les neurones d'un réseau donné établissent entre eux des synapses chimiques inhibitrices, cholinergiques pour les motoneurones des muscles extrinsèques et glutamatergiques pour les neurones contrôlant les muscles intrinsèques. Certains neurones sont également unis par des synapses électriques. Les neurones constituant les réseaux gastrique et pylorique ont été largement caractérisés et leur connectivité a été décrite, la plupart de ces travaux ayant été réalisés chez *Panulirus interruptus* (Eisen and Marder, 1982; Maynard and Selverston, 1975; Miller and Selverston, 1982a; Miller and Selverston, 1982b; Mulloney and Selverston, 1974a; Mulloney and Selverston, 1974b; Selverston and Moulins, 1987; Selverston and Mulloney, 1974). Le réseau œsophagien est, quant à lui, bien moins connu en termes de connectivité et de mécanismes de genèse du patron d'activité.

#### IV- Présentation des réseaux du STG.

---

---

##### 1- Le réseau pylorique.

Le réseau pylorique est composé de 14 neurones contrôlant l'activité de la chambre pylorique. Deux neurones dilatateurs (PD) permettent l'ouverture du pylore contrairement au neurone pylorique latéral (LP) responsable de la contraction des muscles constricteurs antérieurs et des huit neurones pyloriques (PY) contrôlant les muscles constricteurs postérieurs qui ferment le pylore. Par ailleurs, deux motoneurones, le neurone ventriculaire dorsal (VD) et le neurone inférieur cardiaque (IC), sont responsables de l'ouverture et la fermeture de la valve cardio-pylorique. Ce réseau possède également un interneurone, l'interneurone burster antérieur (AB), dont le rôle est d'envoyer une copie efférente de l'activité du réseau aux centres antérieurs.

Ces neurones établissent entre eux des synapses permettant de générer une activité présentant un patron de décharge organisé. De façon générale, les neurones innervant un même groupe de muscle sont connectés par des synapses électriques, alors que les neurones contrôlant des muscles antagonistes sont reliés par des synapses inhibitrices. La connectivité du réseau pylorique est présentée dans la figure 5A. Notons que l'ensemble des neurones PD et AB, connectés entre eux par des synapses électriques, forme le centre « pacemaker » de ce réseau.

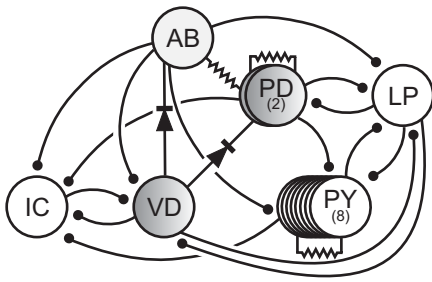
Cette connectivité, associée aux propriétés intrinsèques de ces neurones, permet la genèse d'une activité rythmique caractérisée notamment par des relations de phase entre neurones (Fig. 5B). Ainsi, le neurone LP est le premier à s'activer, suivi des neurones PY pour finir par le groupe PD/AB. Les neurones VD et IC déchargent en antiphase, VD étant actif au même moment que les neurones PY. Le rythme pylorique est donc principalement triphasique (Fig. 5C).

**Figure 5 : Le réseau pylorique.** Le réseau pylorique, qui contrôle les muscles de la chambre pylorique et de la valve cardio-pylorique, est composé de motoneurones commandant des muscles dilatateurs (A, dégradé gris), de motoneurones contrôlant des muscles constricteurs (en blanc) et d'un interneurone (gris clair). La connectivité classiquement admise pour ce réseau chez le homard breton est présentée en A et est issue principalement d'études menées chez *Panulirus*. Les neurones de ce réseau sont unis par des synapses chimiques inhibitrices (—|) et des synapses électriques rectifiantes (—|) ou linéaires (—|). Cette connectivité permet au réseau pylorique de générer une séquence d'activité organisée (B, d'après Faumont, 1999, fréquence moyenne de 30 cycles, la période est normalisée par rapport au début de la décharge de PD, les barres représentent 10 Hz). Le rythme ainsi produit est essentiellement triphasique (activation de LP/IC, puis de PY/VD et enfin de PD/AB). Les enregistrements en C présentent l'activité enregistrée intracellulairement dans les neurones PD, LP et PY de façon simultanée. Ces activités se caractérisent par des dépolarisations spontanées du potentiel de membrane surmontées de potentiels d'action et par une période de 1 à 2s.

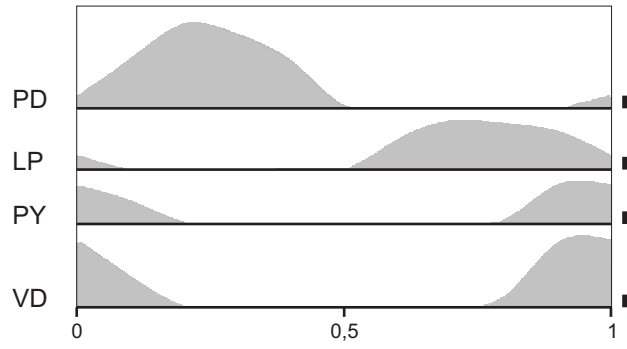
Abréviations : AB : interneurone burster antérieur, IC : neurone inférieur cardial, LP : motoneurone pylorique latéral, PD : motoneurone pylorique dorsal, PY : motoneurone pylorique, VD : motoneurone ventriculaire dorsal.



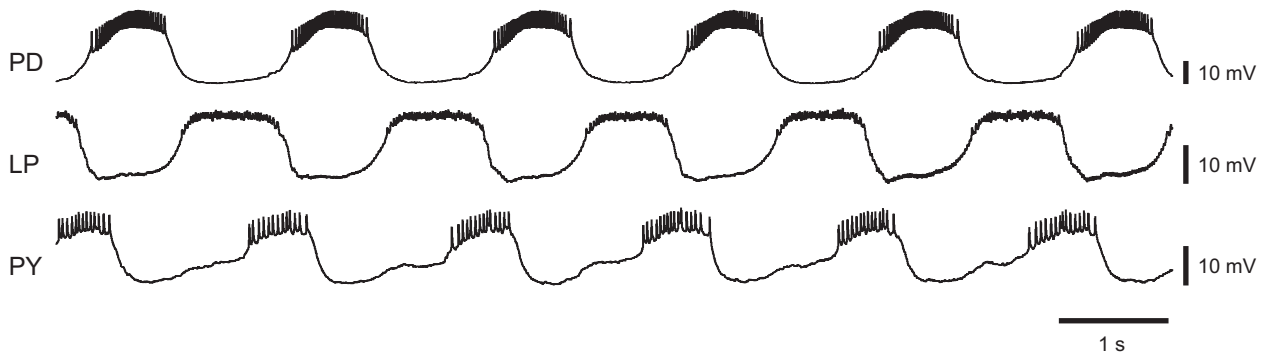
**A**



**B**



**C**





## 2- Le réseau gastrique.

Ce réseau est divisé en deux sous-réseaux : le sous-réseau médian contrôle les mouvements de la dent médiane alors que le sous-réseau latéral est responsable des mouvements des deux dents latérales (Fig. 6A).

Le sous-réseau médian se compose du neurone gastrique dorsal (DG), contrôlant les mouvements de rétraction de la dent médiane et des dix neurones du moulinet gastrique (GM) impliqués dans la protraction de la dent médiane. Le sous-réseau latéral comprend les deux neurones gastriques latéraux postérieurs (LPG) qui permettent l'ouverture des dents médianes alors que le neurone gastrique latéral (LG) et le neurone gastrique médian (MG) contrôlent leur fermeture. Par ailleurs, comme le réseau pylorique, le réseau gastrique possède un interneurone, l'interneurone 1 (Int1), chargé d'envoyer une copie de l'activité du réseau aux centres antérieurs. Les neurones présentant un même rôle fonctionnel étant couplés électriquement, des synapses électriques entre les neurones LPG ont été décrites, comme entre les neurones GM ainsi qu'entre LG et MG. Des synapses unidirectionnelles de LG/MG vers LPG et de DG vers les GM permettent l'alternance de l'activité de ces neurones.

Par ailleurs, des synapses chimiques entre les deux sous-réseaux permettent la coordination des mouvements de dents. Ainsi, l'existence d'une synapse inhibitrice réciproque entre LG/MG et DG permet la mise en place d'une alternance entre les contractions des muscles intrinsèques contrôlées par l'un des deux sous-réseaux avec celle des muscles extrinsèques de l'autre sous-réseau. Par conséquent, l'activité générale du réseau gastrique débute par la décharge des neurones LG et MG, suivis par GM puis ce sont les neurones LPG qui s'activent pour finir par DG qui termine la séquence d'activation des neurones gastriques (Fig. 6B). Int1 du fait de son inhibition réciproque avec LG et MG, est actif pendant toute la phase de silence de ces deux neurones. Un exemple de l'activité électrophysiologique de neurones gastriques enregistrée intracellulairement est présenté en figure 6C.

Notons également que des interactions entre réseau gastrique et réseau pylorique existent, essentiellement supportées par des synapses chimiques (Mulloney, 1977).

## 3- Autres neurones présents dans le STG.

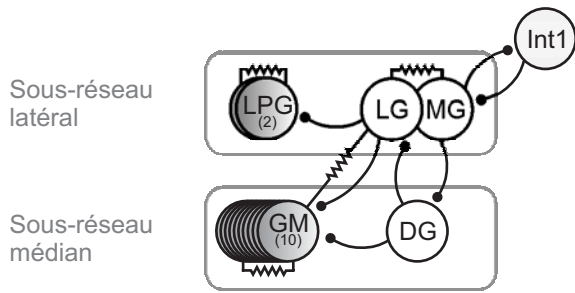
Outre les neurones précédemment cités, dont la fonction est bien définie, il existe d'autres neurones dans le STG qui ne sont pas rattachés au contrôle de l'activité des muscles pyloriques et gastriques.

Ainsi, le neurone médian antérieur (AM) contrôle les mouvements du muscle intrinsèque *c* 7 du sac cardiaal. Chez *Panulirus* et *Penaeus japonicus* son activité est rattachée à celle du neurone DG (Selverston and Moulins, 1987; Tazaki and Tazaki, 2000). Il participe donc à l'activité gastrique dans

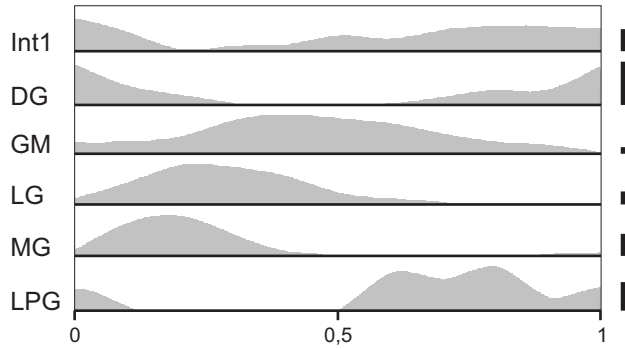
**Figure 6 : Le réseau gastrique.** Ce réseau contrôle la musculature des deux dents latérales et de la dent médiane du moulinet gastrique. Il est formé de motoneurones constricteurs (A, en blanc) et dilatateurs (dégradés gris) et d'un interneurone (gris clair). La connectivité de ce réseau est issue principalement d'études menées chez *Panulirus* mais elles ont été complétées par des travaux réalisés sur *Homarus gammarus* (Combes et al., 1999a; Combes et al., 1999b). Les neurones pyloriques sont essentiellement unis par des synapses chimiques inhibitrices réciproques (—) mais certains sont également reliés par des synapses électriques (====). La séquence d'activités produite par ce réseau consiste en une alternance d'activités entre neurones antagonistes ainsi qu'en une antiphase entre neurones constricteurs d'un sous-réseau avec les neurones dilatateurs de l'autre sous-réseau (B, d'après Faumont, 1999, fréquence moyenne de 30 cycles, la période est normalisée par rapport au début de la décharge de LG, les barres représentent 10 Hz). Par conséquent, le rythme gastrique est essentiellement biphasique et présente une alternance de la décharge des neurones LG/MG/GM avec celles des neurones Int1/DG/LPG. Les enregistrements intracellulaires réalisés au niveau des somas des neurones LPG, DG et GM (C) illustrent le rythme produit spontanément par le réseau gastrique *in vitro*. Nous voyons ici que la période du rythme gastrique est d'environ 10s.

Abréviations : DG : motoneurone gastrique dorsal, GM : motoneurone gastrique, Int 1 : interneurone 1, LG : motoneurone gastrique latéral, LPG : motoneurone gastrique latéral postérieur, MG : motoneurone gastrique médian.

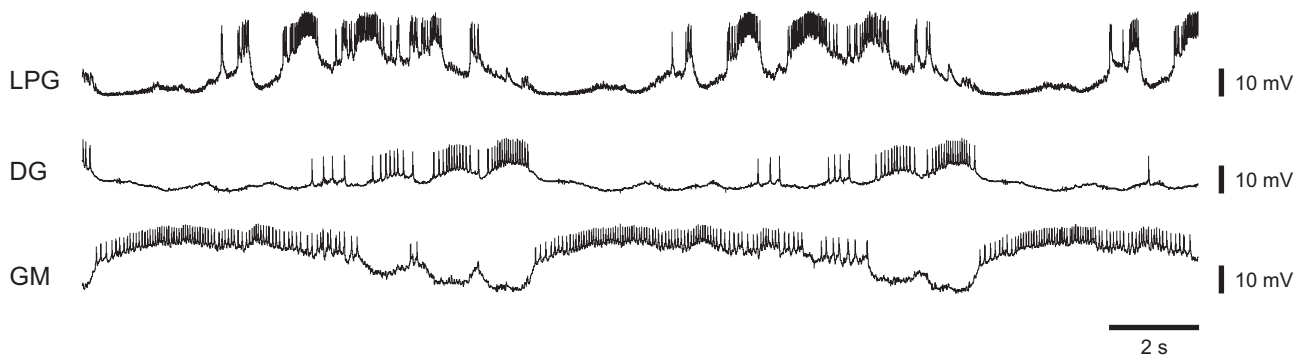
**A**



**B**



**C**





ces deux modèles. Cependant, chez le homard breton, le neurone AM est plutôt relié à l'activité du réseau pylorique *in vitro* avec des bouffées d'activité en phase avec celles de VD. De telles différences peuvent s'expliquer par le fait que le rattachement du neurone AM à un réseau particulier est fortement dépendant des substances neuromodulatrices présentes (Dickinson and Marder, 1989). Il est important de noter que dans notre modèle, ce neurone a été peu étudié.

Les neurones à potentiels postsynaptiques inhibiteurs (IPSP), au nombre de quatre, sont eux rattachés au réseau œsophagien car ils présentent une période d'activité caractéristique de ce réseau (5 s). Cependant, la fonction de ces neurones dans ce réseau est inconnue car leur activité consiste en une série d'hyperpolarisations rythmiques dues à l'arrivée de potentiels postsynaptiques inhibiteurs (PPSI). Ces neurones pourraient moduler l'activité d'autres neurones œsophagiens via des synapses graduelles effectuées par leur axone projetant dans le *stn* vers les ganglions antérieurs.

## V- Modulation de l'activité des réseaux du ganglion stomatogastrique adulte.

---

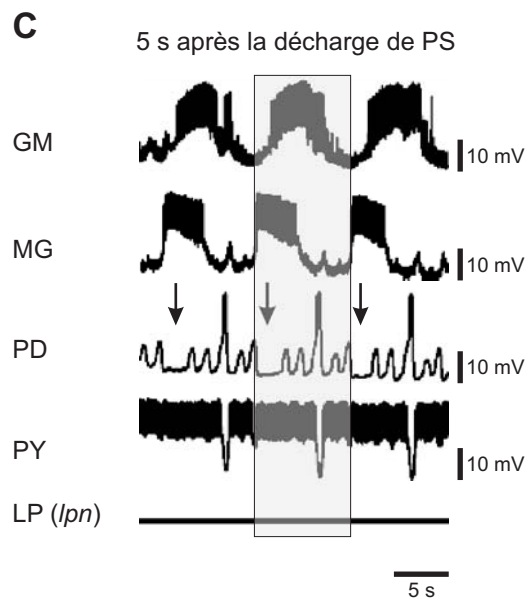
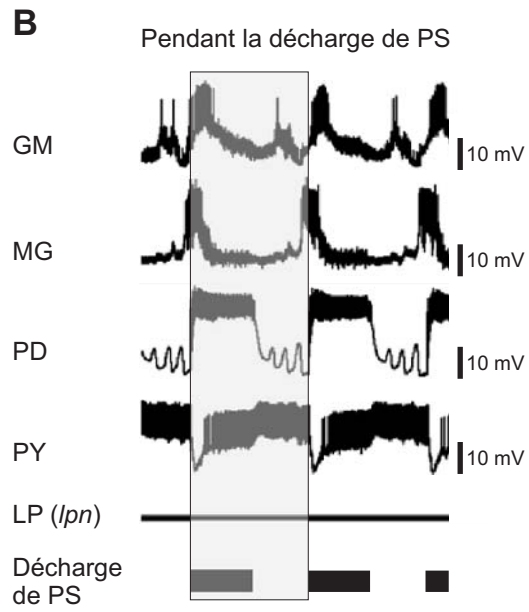
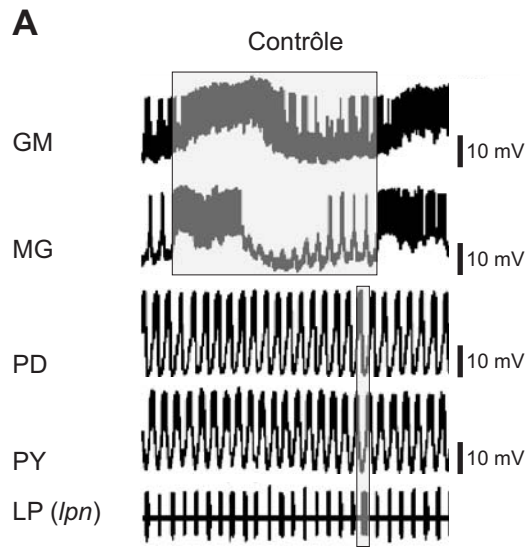
---

L'expression des activités rythmiques des réseaux du STG est conditionnée par la présence de neurotransmetteurs libérés par des terminaisons synaptiques de neurones modulateurs dont les corps cellulaires sont principalement situés dans les ganglions antérieurs. En effet, lorsqu'un blocage du *stn* est réalisé, de façon à empêcher l'arrivée des informations neuromodulatrices sur le STG, l'activité de l'ensemble des réseaux de ce ganglion est abolie (Moulins and Cournil, 1982). Le même résultat est obtenu lorsque l'activité des ganglions antérieurs est spécifiquement inhibée (Faumont, 1999), indiquant la nécessité de la présence d'informations issues de ces neurones pour l'expression des rythmes par les neurones du STG.

Outre cette fonction, la neuromodulation est à l'origine de la flexibilité d'expression des réseaux neuronaux du STG et leur permet d'afficher une large palette d'activités différentes. Par exemple, l'activation rythmique de la paire de neurones modulateurs PS permet la constitution et l'activation d'un nouveau réseau à partir des deux réseaux préexistants avec sa propre période et de nouvelles relations de phase (Fig. 7A et B, Meyrand et al., 1991; Meyrand et al., 1994). Les effets des neurones PS se poursuivent plusieurs secondes après la fin de leur décharge, permettant une reconfiguration à long terme des réseaux (Fig. 7C). Pour cela, certains neurones sont mis sous silence, comme LP (Cazalets et al., 1990a; Cazalets et al., 1990b; Meyrand et al., 1994), alors que d'autres voient leurs propriétés oscillatoires renforcées, ce qui est le cas de la majorité des neurones gastriques. Cette modulation affecte également les propriétés synaptiques des neurones, telles la synapse de MG vers le groupe PD/AB qui est renforcée (Faumont et al., 2005). On notera qu'au-delà des neurones modulateurs antérieurs, ces modifications de l'activité des réseaux peuvent être orchestrées par des neurones sensoriels, principalement le neurone AGR et les neurones GPR. L'action de ces derniers est

**Figure 7 : Le neurone PS reconfigure les réseaux pylorique et gastrique en un réseau unique.** Les réseaux pylorique et gastrique présentent deux activités distinctes (A). Le réseau gastrique a une activité rythmique (représenté par les enregistrements intracellulaires de GM et MG) beaucoup plus lente que celle du réseau pylorique (voir les enregistrements intracellulaires de PD et PY ainsi que l'enregistrement extracellulaire de LP, comparer les cadres gris). Lors de la décharge de PS (B, stimulations extracellulaires de l'*ivn* à une fréquence de 50 Hz pendant 5 s toutes les 9 s) les deux réseaux du STG sont reconfigurés en un réseau unique dont l'activité est calée sur celle de PS (cadre gris). Cette reconfiguration des réseaux gastrique et pylorique se poursuit plusieurs secondes après l'arrêt de PS (C). Ces effets à long terme reposent sur des modifications des propriétés synaptiques des neurones (renforcement, par exemple, de la synapse chimique de MG sur PS, voir flèches) et des propriétés intrinsèques des neurones (les propriétés oscillatoires de LP sont affectées, ce qui explique l'arrêt de son activité, voir *lpn*). Ces enregistrements sont issus de Faumont et al., 2005.







directe sur les réseaux du STG (Katz and Harris-Warrick, 1989; Katz and Harris-Warrick, 1990; Katz and Harris-Warrick, 1991; Kiehn and Harris-Warrick, 1992b) mais passe également, comme pour AGR, par des modifications des entrées synaptiques effectuées par certains neurones modulateurs sur les neurones du STG (Beenhakker et al., 2005; Blitz et al., 2004; Combes et al., 1999b; Norris et al., 1994; Simmers and Moulins, 1988).

Les neurones exerçant une activité modulatrice sur les réseaux moteurs du STG présentent une large variété de neurotransmetteurs avec en général plusieurs cotransmetteurs pour un même neurone (Marder et al., 1995; Meyrand et al., 2000). Par ailleurs, les effets des neurotransmetteurs ont été largement étudiés et les travaux menés ont permis de mettre en évidence leurs effets sur les propriétés intrinsèques des neurones (Bal et al., 1994; Harris-Warrick et al., 1998; Harris-Warrick et al., 1992; Kiehn and Harris-Warrick, 1992a; Kloppenburg et al., 1999; Swensen and Marder, 2000b) ainsi que sur leurs propriétés synaptiques (Johnson and Harris-Warrick, 1990; Johnson et al., 1993; Johnson et al., 1994).

## VI- Ontogenèse du système nerveux stomatogastrique

---

---

### 1- Développement du homard.

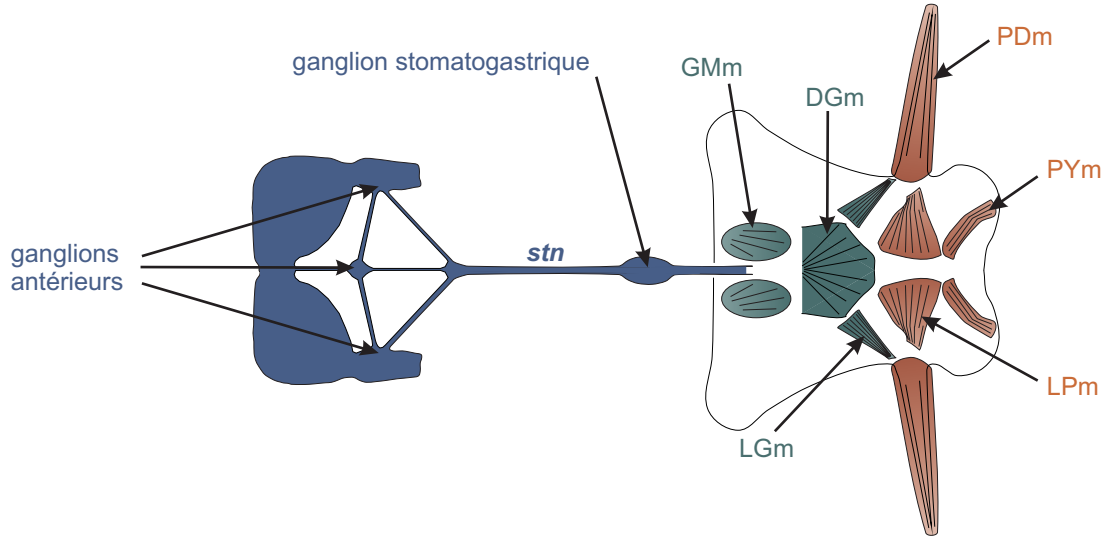
Suite à la fécondation, les embryons se développent *in ovo* pendant environ 10 mois. Durant cette phase, les stades embryonnaires sont définis grâce au développement de la tâche pigmentée de leur œil (voir méthodes). La croissance de l'embryon se fait grâce à des réserves de vitellus situées sur la face ventrale de l'embryon et l'approvisionnement en oxygène est assuré par les mouvements des palettes natatoires de la femelle auxquelles sont accrochés les œufs. Le stomodeum n'assure pas l'alimentation de l'embryon mais il est présent dès 12 % du développement embryonnaire (Casasnovas, 1996). Au début il consiste en une simple invagination de l'ectoderme puis le pylore et le moulinet gastrique, privé de ses trois dents chitineuses, se différencient progressivement mais restent séparés de l'intestin moyen par une fine membrane qui ne disparaît qu'à l'éclosion. Durant tout le début du développement *in ovo*, le sac cardial est absent et il n'apparaît qu'aux derniers stades avant l'éclosion. Il est important de noter que l'ensemble de la musculature de l'estomac est présent très tôt au cours du développement (Fig. 8A).

Une fois le développement embryonnaire terminé, l'éclosion des œufs donne naissance à des larves pélagiques au stade I (L I) caractérisées par des yeux pédonculés, la présence de l'ensemble des appendices céphalothoraciques et d'épines dorsales au niveau de chaque segment abdominal. Après une première mue, les larves vont passer au stade II (L II) et vont présenter des pléopodes puis, suite à une autre mue, au stade III (L III) où elles vont acquérir des uropodes ainsi que les deux dents latérales

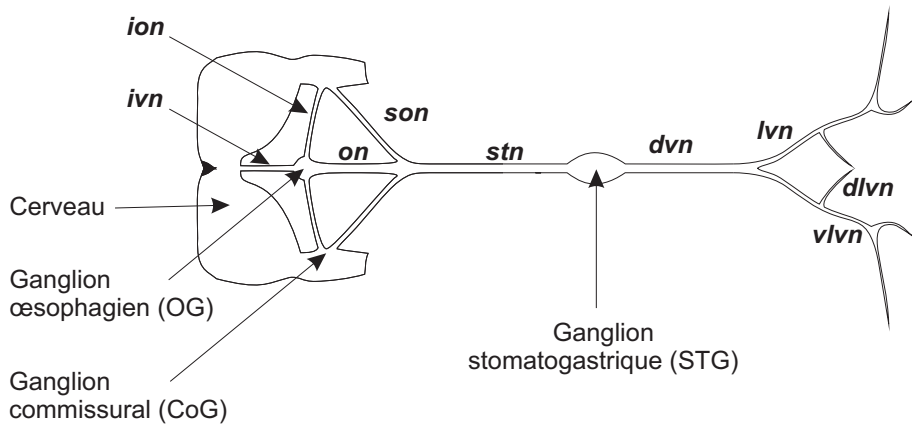
**Figure 8 : Le système nerveux stomatogastrique de l'embryon.** Il est possible de disséquer l'estomac des embryons de homard et d'isoler le système nerveux stomatogastrique (A, en bleu) et une partie de la musculature de l'estomac (en vert pour les muscles du moulinet gastrique, en rouge pour ceux du pylore). Le système nerveux stomatogastrique embryonnaire est très semblable à celui de l'adulte (B, comparer avec figure 4C) avec deux ganglions commissuraux et un ganglion œsophagien reliés par le *stn* au ganglion stomatogastrique qui innerve, via le *dvn*, l'ensemble des muscles de l'estomac. Les neurones du SNST embryonnaire sont spontanément actifs *in vitro*. Lorsque nous enregistrons des muscles innervés par des neurones qui appartiennent, chez l'adulte, aux trois réseaux (œsophagien, gastrique et pylorique), nous constatons qu'ils présentent une activité caractérisée par une période unique (C, cadre gris, comparer avec Fig. 4D). Ainsi, les neurones du STG chez l'embryon sont organisés en un réseau unique contrairement à l'adulte.

Abréviations : *dlvn* : nerf latéral ventriculaire dorsal, *dvn* : nerf ventriculaire dorsal, *ion* : nerf œsophagien inférieur, *ivn* : nerf ventriculaire inférieur, *lvn* : nerf ventriculaire latéral, *on* : nerf œsophagien, *son* : nerf œsophagien supérieur, *stn* : nerf stomatogastrique, *vlvn* : nerf latéral ventriculaire ventral, DGm : muscle du motoneurone gastrique dorsal, GMm : muscle des motoneurones gastriques, LGm : muscle du motoneurone gastrique latéral, LPm : muscle du motoneurone pylorique latéral, PDm : muscles des motoneurones pyloriques dorsaux, PYm : muscle des motoneurones pyloriques.

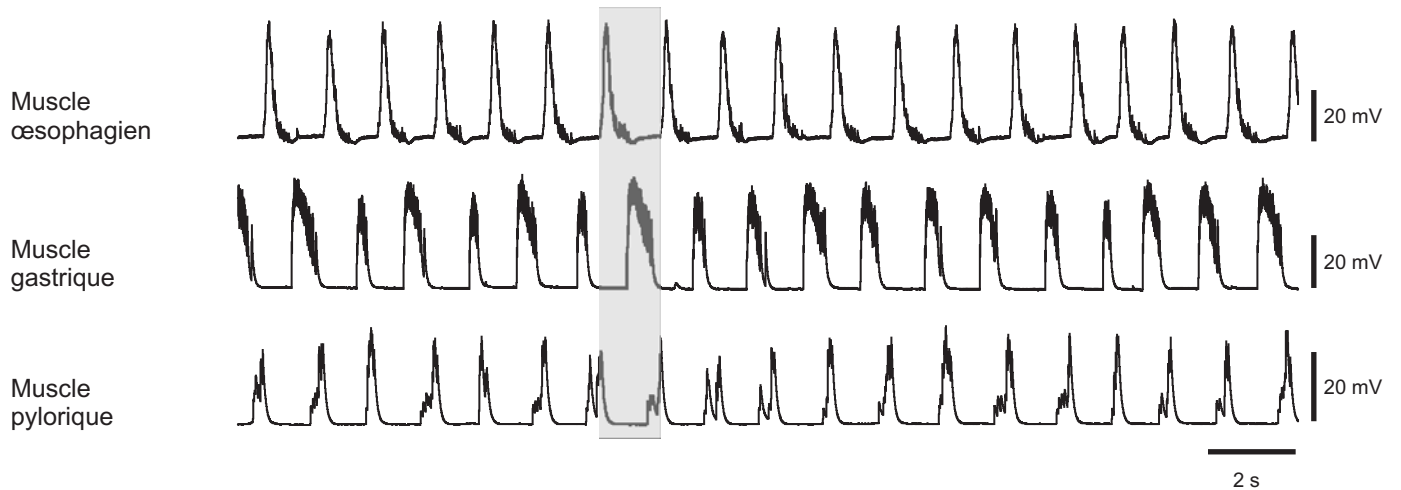
A



B



C





du moulinet gastrique. Chacun de ces stades dure 2 à 3 semaines, ces durées dépendant notamment de la température. Le passage au stade IV (L IV) va donner lieu à une métamorphose, les larves ne différant de l'adulte que par la taille. Ainsi, les individus deviennent benthiques et vont acquérir un telson carré et non plus bifide, les épines dorsales de l'abdomen vont disparaître, les appendices thoraciques biramés vont devenir uniramés et la dent médiane du moulinet gastrique sera formée.

## 2- Développement des réseaux du SNST.

Le SNST est formé très précocement, dès 12 % du développement embryonnaire (Casasnovas and Meyrand, 1995). On reconnaît en effet les deux CoG qui, chez l'embryon, sont fusionnés au cerveau et sont chacun reliés à l'OG par un *ion* et à l'*on* et au *stn* par un *son* (Fig. 8B). L'OG est relié au cerveau par l'*ivn* et au *stn* par l'*on*. Par ailleurs, les divers nerfs moteurs innervant les muscles de l'estomac sont également présents permettant leurs contractions rythmiques.

En effet, les neurones du STG sont présents très tôt au cours du développement et sont actifs. Ainsi, dès 20 % du développement embryonnaire, la population neuronale du STG ne varie plus (Casasnovas and Meyrand, 1995; Fenelon et al., 1998). Les neurones sont spontanément actifs *in vitro*, (Casasnovas and Meyrand, 1995) mais, contrairement à l'adulte, l'ensemble des neurones moteurs du SNST sont réunis en un même réseau et présentent donc tous une même période d'activité (Fig. 8C). Cette organisation en un réseau unique va persister durant tout le développement embryonnaire et la majeure partie du développement larvaire puisque les neurones du STG ne se scinderont en trois réseaux distincts qu'après la métamorphose à partir de laquelle l'estomac aura acquis toutes ces caractéristiques adultes et où l'individu change de milieu de vie (Casasnovas and Meyrand, 1995).

## 3- Développement des afférences modulatrices.

Comme les neurones moteurs, des études ont montré que les neurones modulateurs sont en place très tôt au cours du développement (Le Feuvre et al., 2001). Ainsi, par des migrations rétrogrades à partir des différents nerfs, il a été possible de montrer que les neurones des ganglions antérieurs ainsi que leurs projections sont établis dès 65 % du développement embryonnaire. Par contre, l'acquisition des neuromodulateurs est progressive, les neurotransmetteurs peptidergiques sont en place très précocement alors que les neurotransmetteurs aminergiques apparaissent plus tard et ne sont en général pas exprimés avant l'éclosion (Fenelon et al., 1998; Fenelon et al., 1999; Kilman et al., 1999; Le Feuvre, 2000; Le Feuvre et al., 2001). Il a été proposé que l'expression progressive des neuromédiateurs par les neurones modulateurs est à l'origine de la maturation du réseau embryonnaire en plusieurs réseaux adultes.





Ce système neuromodulateur a, comme chez l'adulte, un rôle dans le maintien des activités des motoneurones embryonnaires puisque la superfusion sur les ganglions antérieurs d'un liquide physiologique dans lequel les ions sodium sont remplacés par des ions choline bloque les contractions rythmiques des muscles de l'estomac (Casasnovas, 1996; Le Feuvre et al., 1999).

Mais ces afférences neuromodulatrices ont également pour rôle, chez l'embryon, d'empêcher l'expression des rythmes adultes. En effet, lorsque les afférences neuromodulatrices sont bloquées et que l'environnement neuromodulateur est convenablement modifié, les neurones du STG embryonnaire se répartissent en deux réseaux différents générant deux rythmes distincts dont les fréquences d'activité sont proches de celles des réseaux adultes (Le Feuvre et al., 1999).

Cependant, beaucoup de points concernant les neurones modulateurs restent inconnus. Tout d'abord, même s'ils sont présents très tôt au cours du développement et si la neuromodulation est nécessaire à la mise en place de l'activité électrophysiologique embryonnaire, rien n'indique que tous les neurones modulateurs sont actifs chez l'embryon, ni que les récepteurs pour les neurotransmetteurs qu'ils expriment sont présents sur leurs neurones cibles. Ensuite, nous ignorons s'ils sont capables d'agir sur l'ensemble des propriétés des neurones (intrinsèques ou synaptiques) ou si au contraire, leur influence se limite à l'une d'entre elles.

## VII- Conclusion.

---

Les données présentées dans ce chapitre soulignent l'intérêt de la préparation de SNST du homard breton pour l'étude des conséquences fonctionnelles de la modulation des synapses électriques.

Outre le fait que la connectivité des neurones moteurs du STG est caractérisée, le système neuromodulateur est connu, ainsi que ces effets. De plus, les neurones du STG adulte sont capables d'exprimer une grande palette d'activité sous l'influence de différents neurotransmetteurs libérés par les afférences modulatrices. La force des synapses électriques étant susceptible d'être modifiée par cette neuromodulation, il est possible que les jonctions gap jouent un rôle dans ces changements d'activité. Nous allons donc pouvoir étudier la modulation des synapses électriques lors de la mise en jeu de neurones modulateurs identifiés et caractériser le rôle joué par cette modulation dans la flexibilité d'expression de ces réseaux.

De plus, la population de neurones moteurs et modulateurs est stable au cours du développement, sans neurogenèse ni apoptose, et l'activité des neurones du STG est très fortement modifiée lors de la métamorphose. Cette maturation des réseaux embryonnaires pourrait être due à l'apparition de substances neuromodulatrices : par exemple, le GABA est absent chez l'embryon dans les neurones GN 1/2 mais ces neurones l'expriment chez l'adulte (Le Feuvre et al., 2001). Ainsi, nous



disposons d'un modèle adéquat pour étudier l'implication de la neuromodulation des synapses électriques dans la mise en place des réseaux adultes.



## *Chapitre 2*

*Caractérisation des synapses électriques au sein du STG :  
approches neuroanatomique, électrophysiologique et moléculaire*

*Il n'est description pareille en difficulté à la description de soi-même.  
Michel de Montaigne*



## I- Introduction.

---

---

Un prérequis nécessaire à l'étude du rôle de la modulation des jonctions gap dans les modifications de l'activité des réseaux neuronaux est de caractériser précisément les synapses électriques du système nerveux considéré. Il est communément admis que les synapses qui unissent les différents neurones du STG sont parfaitement connues, la description de la connectivité de ces neurones ayant fait l'objet de nombreuses études (Eisen and Marder, 1982; Mulloney, 1977; Mulloney and Selverston, 1974a; Mulloney and Selverston, 1974b; Selverston and Mulloney, 1974).

Il faut cependant noter que le principal modèle ayant servi à ces travaux est *Panulirus interruptus*. L'organisation ainsi décrite a été retrouvée par la suite chez d'autres espèces de langouste comme *Panulirus argus* (Hartline and Maynard, 1975) ou le crabe (Harris-Warrick et al., 1992; Weimann et al., 1991). Pour les autres crustacés décapodes, la connectivité des neurones du STG a été extrapolée à partir des données obtenues chez *Panulirus*, la proximité phylogénétique permettant de supposer que l'organisation des réseaux du STG est identique entre ces espèces. En effet, la connectivité de base du réseau pylorique est particulièrement conservée dans l'ensemble des crustacés décapodes (Harris-Warrick et al., 1992) et de ce fait, le patron de décharge de ce réseau est également similaire entre espèces (Harris-Warrick et al., 1992; Tazaki and Tazaki, 1997). Le moulinet gastrique présente davantage de variabilité interspécifique qui s'exprime plus dans les types musculaires innervés par les motoneurones gastriques que dans leur connectivité (Tazaki and Tazaki, 2000). Ainsi est née l'idée d'une grande conservation phylogénétique des réseaux du STG entre les espèces de crustacés décapodes et donc que la connectivité observée dans une espèce se retrouve pour l'essentiel chez les autres crustacés.

Toutefois, quelques études ont mis en évidence que les données concernant l'organisation des réseaux ainsi que le nombre, l'activité et la connectivité des neurones les constituant, obtenues sur une espèce de crustacés, ne sont pas nécessairement extrapolables à une autre espèce. Par exemple, alors que la plupart des langoustes possèdent un seul neurone LP, *Panulirus vulgaris* en présente quatre (Nargeot, 1995). De même, alors que le STG du homard breton comporte dix neurones GM (Combes et al., 1999a), ceux de la langouste et du crabe n'en ont que quatre (Mulloney and Selverston, 1974a; Mulloney and Selverston, 1974b; Selverston and Moulins, 1987). Ainsi, une variation du nombre de neurones appartenant à un même groupe fonctionnel peut exister entre les différentes espèces de crustacés. L'activité d'un neurone donné peut aussi différer d'une espèce à l'autre. Par exemple, le neurone AM, motoneurone innervant un muscle du sac cardial, présente une activité de type pylorique chez le homard, alors qu'elle est liée à l'activité du neurone gastrique DG chez la langouste (Selverston and Moulins, 1987; Selverston and Mulloney, 1974) et chez la crevette (Tazaki and Tazaki, 2000).





Enfin, de manière plus pertinente pour notre étude, *Combes et al.* (1999a) suggèrent que la synapse électrique rectifiante unissant les neurones GM et LPG chez la langouste est absente chez le homard tout comme la synapse inhibitrice de LPG vers LG. Par conséquent, la connectivité au sein des réseaux peut également différer d'une espèce à l'autre. A notre connaissance, seule la connectivité du réseau gastrique a été spécifiquement décrite chez *Homarus gammarus* (Combes, 1993; Combes et al., 1999a). Il nous est donc apparu nécessaire d'entreprendre une caractérisation plus approfondie des synapses électriques présentes au sein du STG adulte du homard breton.

Cette étude s'est révélée pertinente puisqu'elle nous a permis de mettre en évidence des synapses électriques qui, à notre connaissance, n'avaient jamais été décrites, comme par exemple la synapse électrique entre les neurones IPSP, entre AM et VD ou encore entre DG et PD.

Le but de notre étude étant d'explorer l'implication d'une modulation de la force des synapses électriques dans la plasticité d'expression des réseaux aussi bien chez l'adulte qu'au cours du développement, il nous est apparu nécessaire de disposer de deux neurones identiques reliés par une synapse électrique, symétrique, sur laquelle l'effet de différentes substances ou protocoles expérimentaux pourra être testé. En effet, dans le but de mesurer le coefficient de couplage et ses variations lors de l'application de substances modulatrices, il est préférable de s'affranchir des différences de propriétés membranaires qui peuvent exister entre neurones différents, tels LG et MG. Ces éventuelles différences dans la présence et la répartition des canaux ioniques peuvent modifier la mesure du coefficient de couplage, les courants injectés étant susceptibles d'ouvrir des conductances dans le neurone présynaptique absentes dans le neurone postsynaptique et modifier en apparence les propriétés de la synapse électrique. Pour la même raison, il est important que les neuromédiateurs libérés lors de la manipulation des systèmes neuromodulateurs aient les mêmes effets sur les deux partenaires électriquement couplés. En utilisant deux neurones identiques, nous serons en mesure de limiter ces problèmes.

Seuls quatre types neuronaux répondent à ces critères : les huit PY, les dix GM, les deux LPG et les deux PD. Les neurones couplés à de nombreuses autres cellules, comme les GM et PY, ne sont pas de bons candidats car il est difficile de tous les identifier sur une préparation et d'isoler deux de ces neurones de tous leurs partenaires. Parmi les deux types neuronaux restants, les PD semblent les plus adaptés à notre étude car ils font partie du groupe de neurones pacemaker du réseau pylorique et ont donc un rôle central dans la genèse du patron d'activité de ce réseau contrairement aux neurones LPG qui appartiennent au sous-système latéral du réseau gastrique. Ainsi, il est probable que la modulation des synapses électriques établies par PD ait un rôle physiologique plus important et plus facile à mettre en évidence que celle des synapses électriques unissant les LPG. De plus, les muscles innervés par les neurones PD sont enregistrables dans les préparations de SNST embryonnaires contrairement aux neurones LPG, ce qui permet d'identifier les neurones PD à des stades précoces du



développement et donc de suivre l'évolution du couplage électrique de ce neurone au cours de l'ontogenèse.

Nous avons donc, dans un premier temps, caractérisé de manière systématique les couplages électriques de PD avec l'ensemble des neurones du STG en utilisant différents outils communément utilisés pour l'étude des synapses électriques : la diffusion de sonde ou dye-coupling, la mesure du coefficient de couplage par des techniques électrophysiologiques et l'étude par hybridation *in situ* de l'expression des ARN<sub>m</sub> codant pour les protéines formant les jonctions gap chez les crustacés, les innexines. En ce qui concerne la synapse électrique entre les deux neurones PD, nous avons en plus recherché les sites qui pourraient la supporter par une approche neuroanatomique. Enfin, dans un dernier temps, nous avons cherché à étendre cette étude menée sur PD à l'ensemble des neurones du STG en testant l'existence d'une possible corrélation entre l'expression des innexines et la présence de couplage électrique et métabolique.

## II- Caractérisation des synapses électriques unissant PD aux autres neurones du STG.

---

---

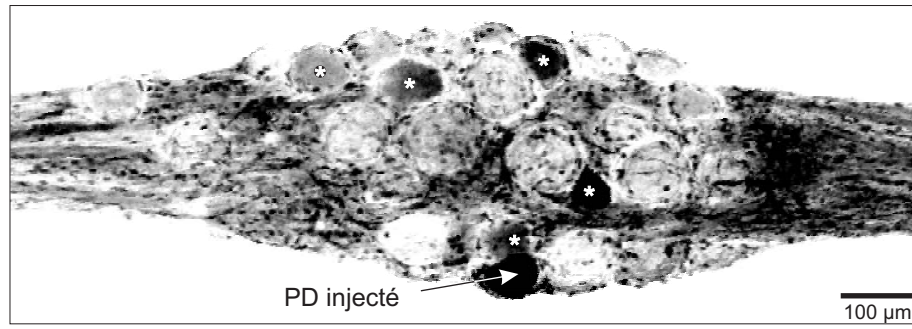
### 1- Caractérisation du couplage métabolique : diffusion de la neurobiotine.

#### *1.1- Nombre de neurones couplés à PD.*

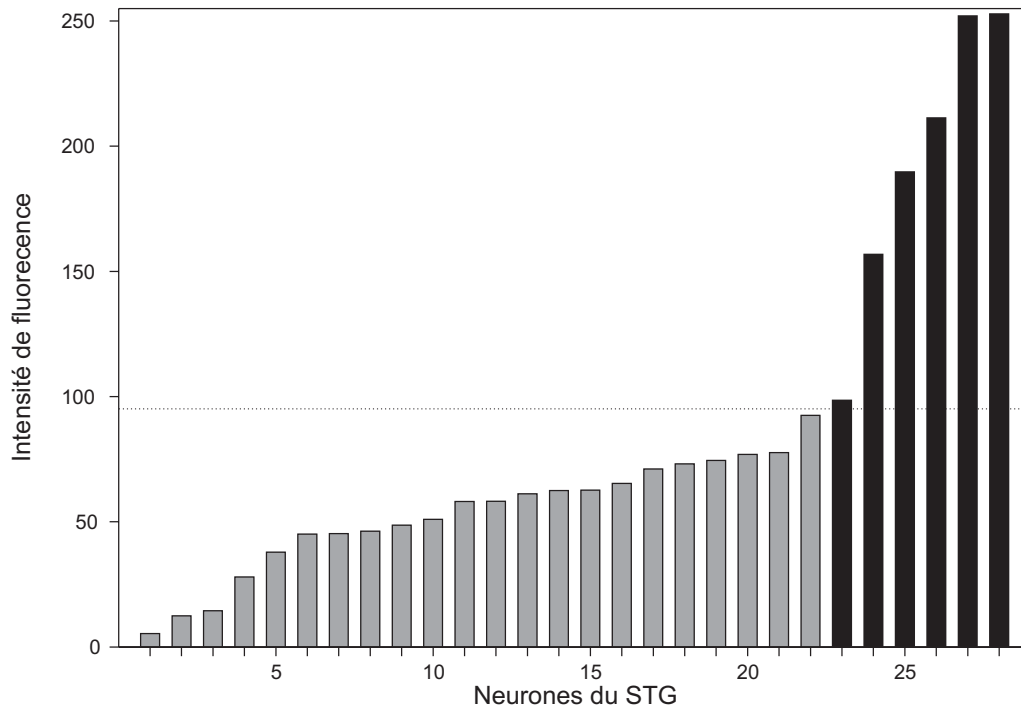
Pour caractériser l'ensemble des neurones couplés au neurone PD, nous avons utilisé, dans un premier temps, la technique de diffusion de sonde à travers les jonctions gap. En effet, la technique du dye-coupling, qui consiste à injecter une molécule de petite taille dans un neurone donné et à visualiser sa diffusion dans les autres cellules du système nerveux considéré, constitue une approche simple et rapide permettant d'évaluer l'étendue des couplages électriques. Nous avons utilisé la neurobiotine, molécule de charge nette positive et de faible poids moléculaire (286 Da), qui a été largement employée dans des travaux explorant l'étendue des couplages électriques aussi bien au sein des systèmes nerveux de vertébrés (Chang et al., 1999; Devor and Yarom, 2002; Hidaka et al., 2004; Peinado et al., 1993a) que d'invertébrés (Antonsen and Edwards, 2003; Fan et al., 2005). La neurobiotine a donc été injectée dans un neurone PD puis révélée avec de l'avidine-DCS couplée à un fluorophore (voir méthodes). La figure 9A illustre le résultat d'une telle expérience. Nous observons plusieurs neurones marqués, dont le PD injecté. Sur cette projection maximale de 67 coupes optiques de 2,5  $\mu\text{m}$  obtenues au microscope confocal, les intensités de marquage des neurones apparaissent très variables d'un corps cellulaire à l'autre. Pour s'affranchir d'une discrimination entre neurones marqués et non marqués uniquement dépendante de l'appréciation de l'expérimentateur, nous avons utilisé un logiciel d'analyse d'images pour quantifier les niveaux de gris dans chaque corps cellulaire

**Figures 9 : Couplage métabolique d'un neurone PD.** Un neurone PD est injecté (A) avec de la neurobiotine, marqueur de faible poids moléculaire connu pour passer les jonctions gap. Le marqueur est ensuite révélé par une incubation des préparations avec de l'avidine-DCS couplée à un fluorophore puis les acquisitions sont effectuées au microscope confocal. En A est présentée la projection maximale d'un STG ainsi traité (67 coupes optiques de 2,5  $\mu\text{m}$  chacune). De manière à quantifier le nombre de neurones dye-couplés à PD, l'intensité du marquage présent dans chaque neurone est mesurée ainsi que l'intensité du bruit de fond grâce au logiciel Scion Image (voir méthodes). L'analyse de la préparation présentée en A est illustrée en B. Les neurones dont l'intensité de marquage est en dessous du niveau du bruit de fond (B, pointillés) sont considérés comme non marqués (B, barres en gris), ceux dont l'intensité est supérieure au bruit sont marqués (B, barres en noir, ces neurones sont indiqués en A par des astérisques). Nous avons pu ainsi mettre en évidence sur 14 préparations différentes de 3 à 10 neurones présentant un couplage métabolique avec PD (C).

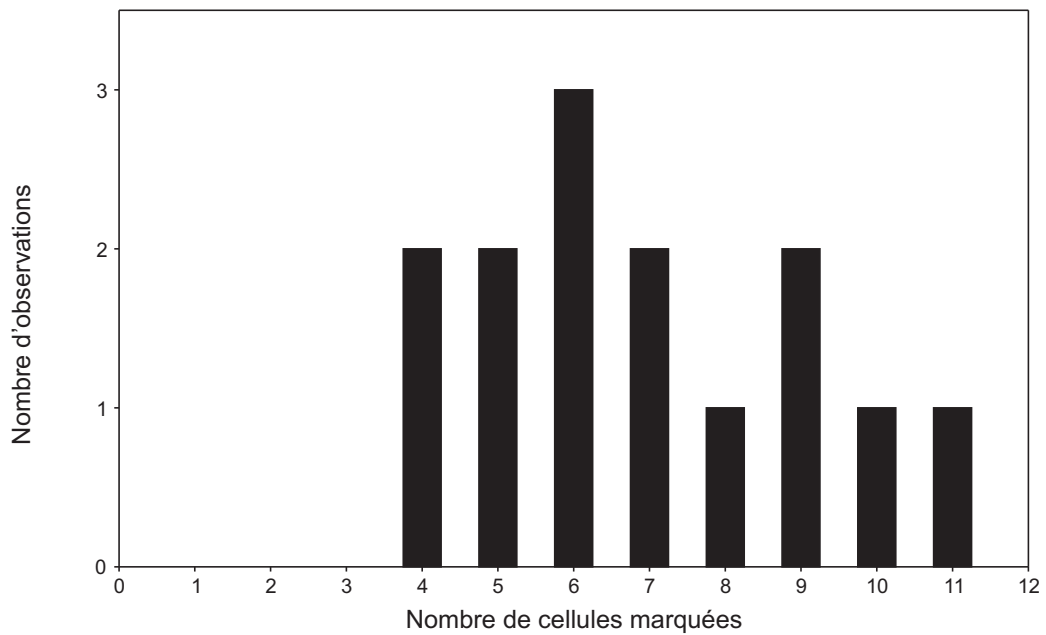
**A**



**B**



**C**





(voir méthodes). Ainsi, l'intensité moyenne de la fluorescence, après conversion en niveaux de gris des séries de coupes optiques, est mesurée pour chaque neurone du STG (Fig. 9B, voir méthodes). L'intensité de fluorescence de trois zones prises au centre du STG est mesurée, la valeur moyenne correspondant au bruit de fond (Fig. 9B, pointillés). Les neurones pour lesquels l'intensité du marquage est inférieure au bruit sont considérés comme non marqués (Fig. 9B en gris) et les neurones qui ont une valeur d'intensité supérieure au bruit sont considérés comme couplés au neurone injecté (Fig. 9B en noir). Dans cet exemple, le neurone PD injecté apparaît couplé à cinq autres neurones (Fig. 9A, astérisques et graphe en Fig. 9B). Cette méthode de quantification a été systématiquement utilisée lorsque nous avons voulu évaluer le nombre de neurones couplés à un neurone d'intérêt par la technique de dye-coupling. Dans la suite de ce manuscrit, la valeur moyenne du bruit de fond a été soustraite pour chaque neurone et seuls les neurones dont l'intensité de fluorescence demeure positive ont été considérés comme marqués.

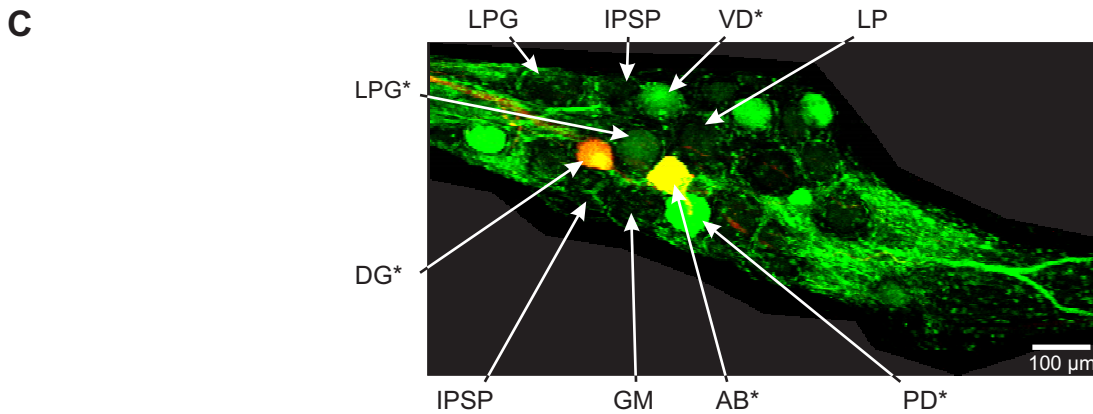
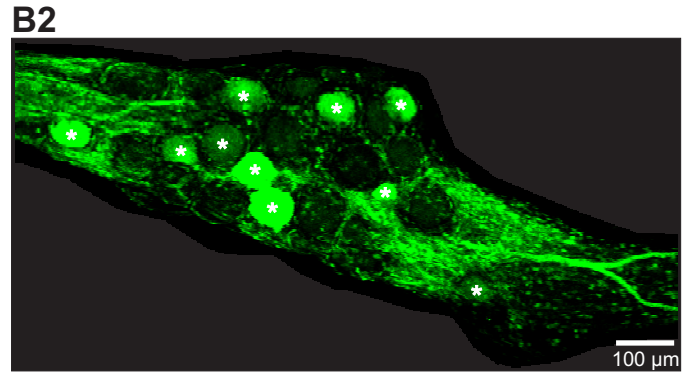
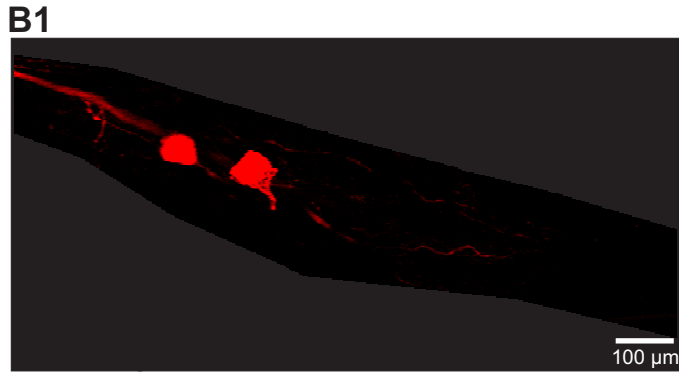
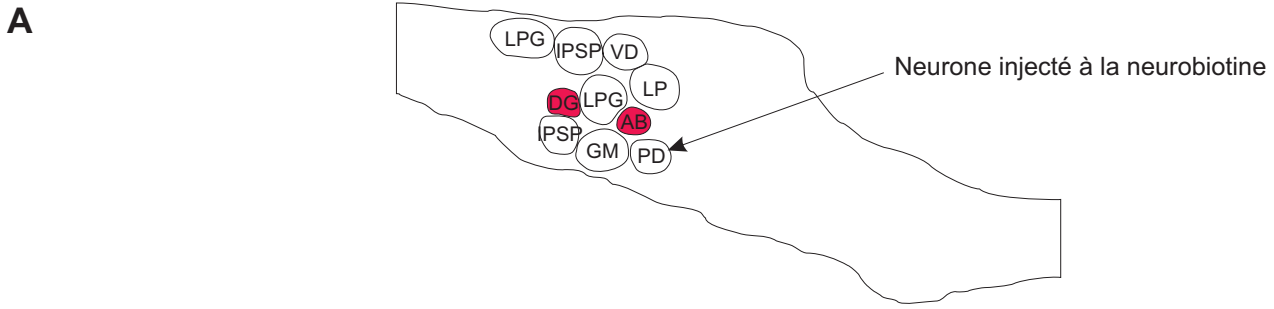
Nous avons injecté un neurone PD à la neurobiotine sur un total de 14 STG et nous avons trouvé, en moyenne, 7 neurones marqués à la neurobiotine ( $6,9 \pm 0,6$ ). Ce nombre est cependant très variable entre les différents STG analysés car nous constatons que le traceur est présent dans 4 à 11 neurones (Fig. 9C). Face à cette variabilité, il est nécessaire de déterminer si, parmi les neurones couplés à PD, certains le sont constamment et de manière reproductible ou si, au contraire, PD établit des jonctions électriques sans préférence pour un type neuronal particulier.

### *1.2- Identification des neurones couplés à la neurobiotine avec PD.*

Pour identifier les neurones couplés à la neurobiotine avec PD, les neurones d'un STG sont d'abord identifiés par électrophysiologie (voir matériel et méthodes) puis leur position et leur nom sont reportés sur une carte (Fig. 10A) qui nous permet de connaître la position relative de chaque neurone par rapport à ses voisins et de les retrouver sur le STG une fois monté entre lame et lamelle. De plus, certains neurones injectés avec du dextran-tétraméthylrhodamine, fluorophore de haut poids moléculaire incapable de passer les synapses électriques, constitueront des points de repère internes au ganglion (Fig. 10A, en rouge). Ensuite, un des deux neurones PD est injecté avec de la neurobiotine, qui est révélée au moyen d'avidine-DCS couplée à la fluorescéine et les préparations sont observées au microscope confocal. La figure B1 montre l'exemple d'un STG où les neurones DG et AB ont été injectés au dextran-tétraméthylrhodamine. Nous pouvons y distinguer les corps cellulaires de ces deux neurones intensément marqués ainsi qu'une partie de leur neuropile, plus faiblement fluorescent. Sur cette même préparation, la neurobiotine a été révélée (Fig. 10B2). Dans cet exemple, après analyse d'image (voir paragraphe précédent), 10 corps cellulaires apparaissent marqués (Fig. 10B2, astérisques). La superposition des deux fluorophores (Fig. 10C) permet de mettre en évidence un double marquage dans les neurones AB et DG, la colocalisation du marquage rouge de la rhodamine et

**Figure 10 : Identification des neurones couplés métaboliquement au neurone PD par cartographie et injection de sondes fluorescentes.** Lors de l'identification des neurones du STG, l'emplacement de chaque cellule est reportée sur une carte du ganglion (A). Parmi ces neurones, certains sont injectés avec une sonde fluorescente de fort poids moléculaire (A, en rouge) et un neurone PD est injecté à la neurobiotine. Le fluorophore de haut poids moléculaire reste localisé dans les neurones dans lesquels il a été injecté (B1), la neurobiotine diffuse dans plusieurs neurones (B2, neurones marqués d'un astérisque). La superposition des deux marquages montre que les deux neurones identifiés par injection de fluorophore sont également marqués à la neurobiotine (C, en jaune) et grâce à la carte du STG, nous pouvons dire que VD, DG ainsi que l'un des neurones LPG sont également dye-couplés avec PD (C). Les images B1, B2 et C sont des projections maximales de 65 images confocales de 2,5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Cette expérience a été renouvelée sur 14 préparations dont les résultats sont présentés en D. Chaque préparation correspond à une colonne. La première ligne indique le nombre total de neurones marqués pour chaque préparation. Les cases noires représentent les neurones identifiés et marqués à la neurobiotine, les cases grises correspondent aux neurones identifiés mais non marqués à la neurobiotine et les cases blanches aux neurones non identifiés. La dernière ligne indique le nombre de neurones marqués à la neurobiotine mais non identifiés. L'ensemble des résultats est récapitulé dans le tableau E où, pour chaque type neuronal, le nombre total de neurones identifiés (n) et l'occurrence du couplage métabolique sont indiqués. Lorsque moins de trois cellules d'un type neuronal ont été identifiés, l'occurrence du couplage métabolique est considérée comme non déterminée (n.d.).





**D**

Nombre total de neurones marqués	11	9	10	7	6	9	8	6	6	4	5	7	4	5
PD injecté	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█
PD	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█
AB		█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█
VD	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█
IC												█	█	█
LP			█	█					█					
PY						█			█					
PY									█					
PY									█					
PY									█					
LPG	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█
LPG	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█
MG														
LG		█	█						█					
DG	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█
Int1									█					
GM		█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█
GM						█			█					
GM									█					
GM									█					
AM				█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█
IPSP	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█
IPSP	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█
Nombre de neurones marqués non identifiés	7	5	5	4	2	3	5	1	1	1	2	6	3	1

**E**

Type neuronal	n	Occurrence du couplage métabolique
PD	9	100 %
AB	7	100 %
VD	10	50 %
IC	4	25 %
LP	3	0 %
PY	9	11,1 %
LPG	18	27,8 %
MG	3	0 %
LG	2	n.d.
DG	7	57,1 %
Int1	0	n.d.
GM	14	14,3 %
AM	4	50 %
IPSP	10	0 %



vert de la fluorescéine produisant une couleur jaune. Ensuite, grâce à la carte du ganglion, il est possible de retrouver l'ensemble des neurones identifiés. Dans notre exemple, nous montrons que le PD injecté est marqué, ainsi que VD, AB, DG et un LPG, alors que l'autre LPG, deux IPSP et un GM ne sont pas métaboliquement couplés avec PD. Il est rare que la totalité des neurones d'un STG soit repérée (20 neurones au maximum ont été identifiés sur une préparation) et, par conséquent, il est fréquent qu'un certain nombre de neurones soit marqué mais que leur identité reste inconnue (5 dans l'exemple de la figure 10C).

Nous avons répété ce protocole sur 14 préparations et nous avons montré que l'autre neurone PD (n=9) ainsi que AB (n=7) sont toujours couplés au PD injecté (Fig. 10D), ces trois neurones étant connus pour établir entre eux des synapses électriques robustes, que l'on peut retrouver dans les différentes espèces de crustacés décapodes. Les neurones DG (n=7), VD (n=10), AM (n=4), LPG (n=18) et IC (n=4) sont occasionnellement couplés. En effet, nous avons pu observer un couplage métabolique dans respectivement 57, 50, 50, 28 et 25 % des cellules identifiées appartenant à ces types neuronaux (Fig. 10E). D'autre part, 14,5 et 11 % des neurones GM (n=14) et PY (n=9) identifiés sont dye-couplés à PD. Enfin, les IPSP (n=10), MG (n=3) et LP (n=3) ne présentent jamais de couplage métabolique avec PD. L'interneurone gastrique Int1 n'a été identifié qu'une seule fois où il apparaît non couplé à PD et LG n'a été trouvé que sur deux préparations et, sur l'une d'elle, il est couplé. Cependant, dans ces deux derniers cas, le nombre d'identifications est trop faible pour pouvoir conclure sur l'existence d'un couplage métabolique avec PD et surtout sur son importance. Dans la suite du manuscrit, nous avons donc considéré que le couplage métabolique de PD avec LG et Int1 est non déterminé (n.d.).

Ainsi, nous avons un certain nombre de neurones toujours couplés à PD, l'autre neurone PD et AB, alors que d'autres neurones sont occasionnellement voire rarement couplés. Cette dernière catégorie de neurones, qui ne sont pas systématiquement marqués, expliquerait la variabilité que nous avons observée dans le nombre de neurones marqués à la neurobiotine lorsque PD est injecté avec ce traceur.

Par ailleurs, toutes les cellules appartenant à un même type neuronal ne sont pas systématiquement couplées au neurone PD. Si on considère les neurones LPG, sur les 9 préparations où les 2 LPG ont été identifiés seules 4 ont montré un marquage et sur ces 4 préparations, seule une a permis de mettre en évidence la neurobiotine dans les deux LPG.

Enfin, cette identification des cellules couplées métaboliquement à PD nous a permis de mettre en évidence l'existence de jonctions gap jamais encore décrites à notre connaissance dans le STG des crustacés. Ainsi, les neurones DG et LPG, membres du réseau gastrique, ainsi que le neurone AM présentent un couplage métabolique avec PD dans de nombreuses préparations.



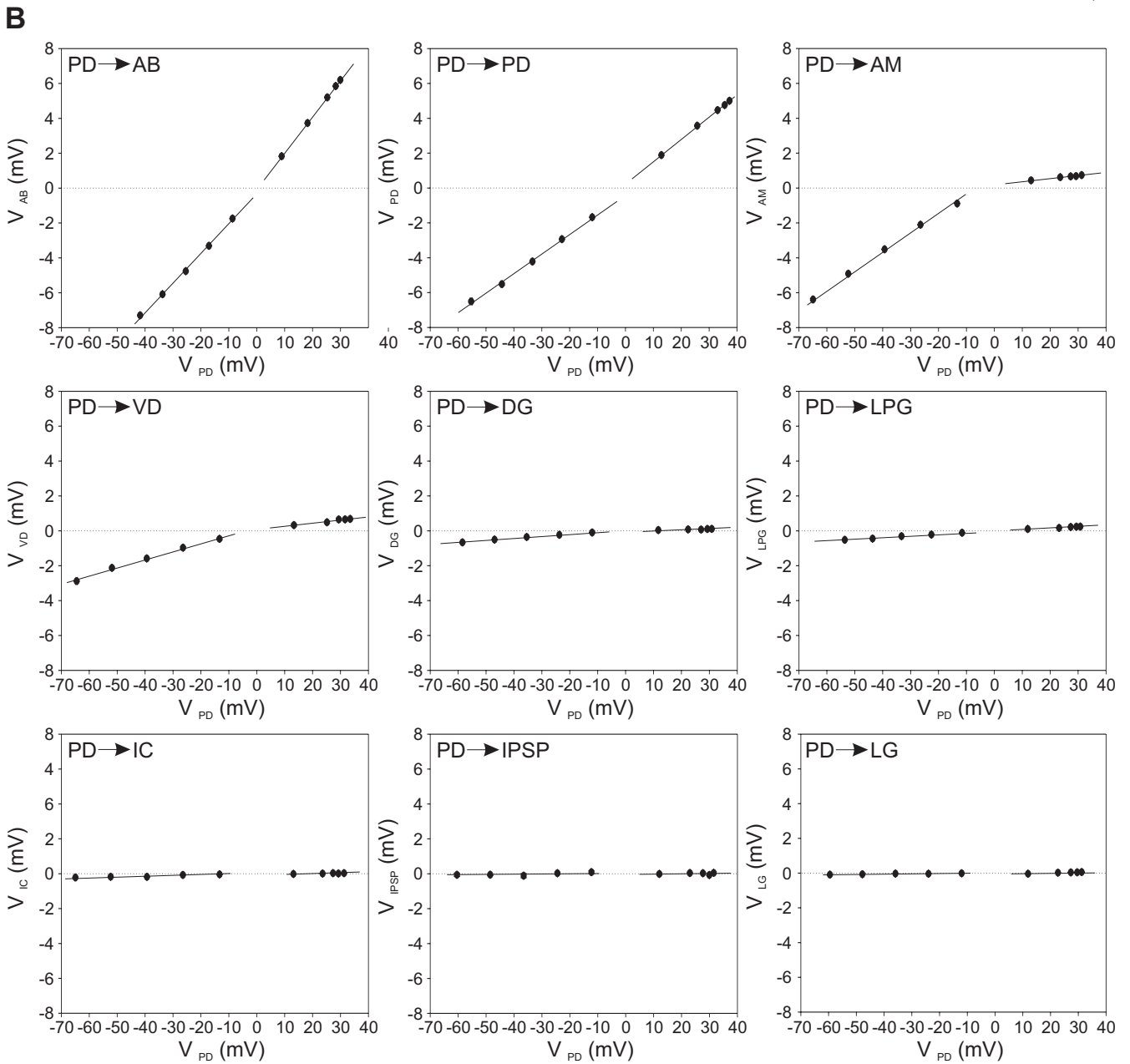
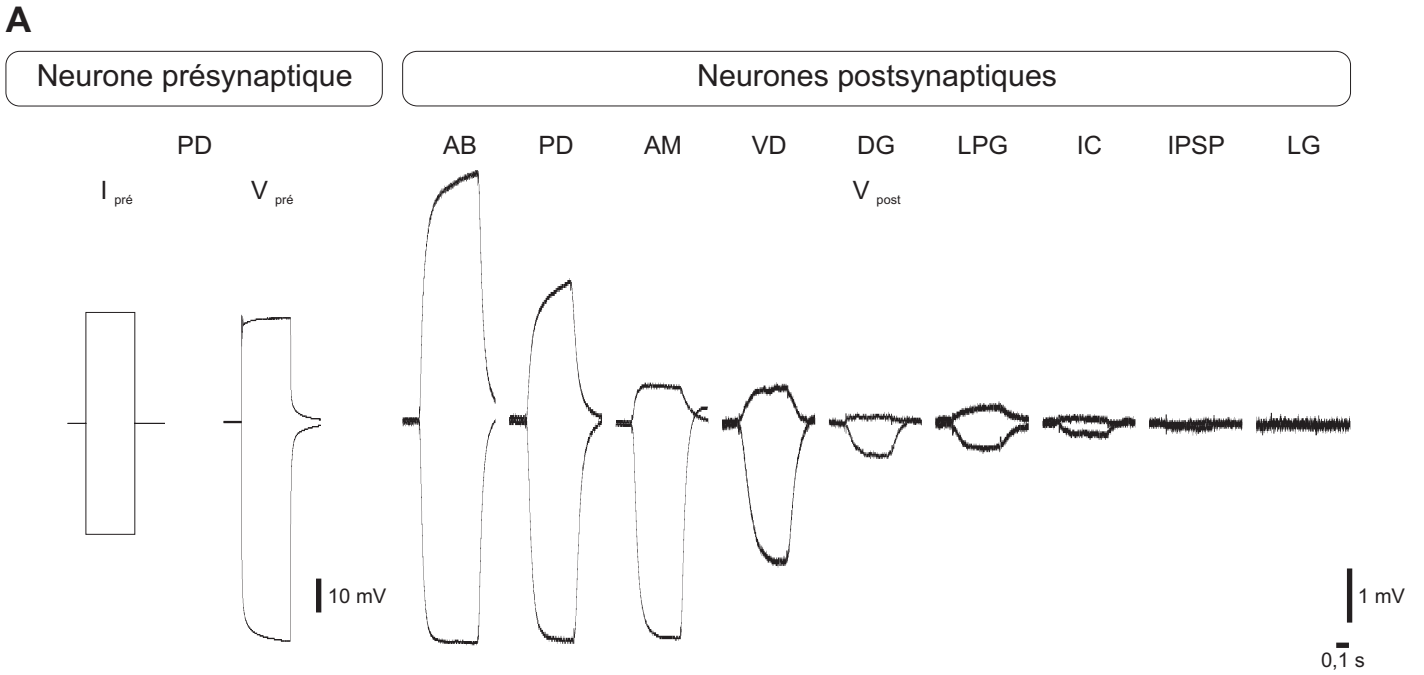
## 2- Caractérisation des couplages électriques unissant PD aux neurones du STG par électrophysiologie en courant imposé.

Après avoir caractérisé le couplage métabolique d'un neurone PD, nous avons réalisé une mesure systématique de ses couplages électriques avec les autres neurones du STG. Ainsi, les neurones d'un STG sont d'abord identifiés au moyen des techniques électrophysiologiques conventionnelles (voir méthodes) et leur position est reportée sur une carte du ganglion. Ensuite, l'un des neurones PD est empalé au moyen de deux électrodes puis du liquide physiologique additionné de TTX  $10^{-7}$  M et de PTX  $10^{-6}$  M est superfusé. Après arrêt des activités à la fois sur les électrodes extra et intracellulaires, les autres neurones du STG sont successivement empalés avec une troisième électrode. Des créneaux de courant sont injectés dans PD, qui constituera donc le neurone présynaptique (Fig. 11A,  $I_{\text{pré}}, \pm 20$  nA), et les variations de potentiel provoquées par ces injections de courant sont simultanément enregistrées dans le neurone présynaptique (Fig. 11A,  $V_{\text{pré}}$ , moyenne de 10 traces) et dans le neurone testé (Fig. 11A,  $V_{\text{post}}$ , moyenne de 10 traces). Pour chaque paire de neurones (123 au total sur 14 STG), la courbe représentant la variation de voltage postsynaptique en fonction de la variation de voltage présynaptique est construite (Fig. 11B). La pente de cette courbe permet de définir le coefficient de couplage entre les deux neurones. La diversité des courbes obtenues conduit à s'interroger sur trois points : la réalité biologique de ces couplages (dans le cas d'une faible pente de la courbe), le caractère rectifiant de ces synapses (valeurs de coefficient de couplage différentes pour les courants négatifs et positifs), la force de ces couplages (qui sera évoquée dans le paragraphe suivant).

Afin de déterminer si les pentes des courbes obtenues dénotent la présence d'un couplage électrique entre les neurones nous avons appliqué une méthode statistique consistant à comparer au moyen d'une ANOVA factorielle les valeurs de coefficient de couplage obtenues pour chaque courant injecté au sein d'une paire de neurones avec le coefficient de couplage des électrodes (voir méthodes) mesuré pour ces mêmes courants. Seules les paires pour lesquelles  $p$  est inférieur à 0,001 pour les courants négatifs et/ou pour les courants positifs ont été retenues puis comptabilisées pour chaque type neuronal. Les types neuronaux pour lesquels il existe une différence significative entre le coefficient de couplage et le couplage des électrodes dans au moins 75 % des paires testées ont été considérés comme électriquement couplés à PD. Les neurones PD, AB, VD, IC, LPG, DG et AM présentent ainsi de manière reproductible un coefficient de couplage significatif avec PD (Fig. 12A, en noir). A l'inverse, les autres neurones ne présentent que très rarement (IPSP, LG, MG, LP, GM, Int1) voire jamais (PY) de coefficient de couplage significatif avec PD. Ils sont donc considérés comme non couplés électriquement à PD (Fig. 12A, en gris).

Parmi les neurones couplés à PD, nous nous sommes attachés à déterminer le caractère linéaire ou rectifiant de la synapse électrique. Certaines synapses, telles que celles reliant PD à AM ou à VD,

**Figure 11 : Identification des neurones électriquement couplés à PD.** Du liquide physiologique additionné de TTX à  $10^{-7}$  M et de PTX à  $10^{-6}$  M est d'abord superfusé sur les préparations, puis un courant de -20 ou +20 nA ( $I_{\text{pré}}$ ) est injecté dans un neurone PD (A, neurone présynaptique), provoquant une variation du potentiel membranaire de ce neurone négative ou positive (A,  $V_{\text{pré}}$ , moyenne de 10 tracés pour les courants négatifs et pour les courants positifs). Les neurones identifiés dans chaque STG sont empalés successivement (A, neurones postsynaptiques) et les variations de leur potentiel membranaire suite à l'injection du courant dans PD sont mesurées (A,  $V_{\text{post}}$ , moyenne de dix tracés pour les courants négatifs et positifs). Les courbes représentant la variation de potentiel dans les différents neurones postsynaptiques en fonction des variations de potentiel du neurone présynaptique (PD) pour les différentes valeurs de courant injecté (B, -20 à +20 nA, 10 créneaux tous les 4 nA) sont ensuite construites. La pente de ces droites correspond au coefficient du couplage électrique du couple de neurones considéré, les courbes dont les pentes pour les courants négatifs et positifs sont différentes correspondent à un couplage rectifiant (voir texte et figure suivante pour la détermination du caractère rectifiant).







présentent manifestement des efficacités très différentes pour les courants positifs et négatifs. En effet la courbe  $\Delta V_{\text{post}}$  en fonction de  $\Delta V_{\text{pré}}$  est constituée de deux segments de droite avec des pentes très distinctes pour les courants négatifs et positifs. Cette observation peut être généralisée à l'ensemble des neurones couplés à PD, bien que les pentes des segments de droites puissent avoir des valeurs très voisines (par exemple PD-PD et PD-AB). Afin d'identifier les synapses montrant une rectification significative, nous avons comparé les coefficients de couplage moyens pour les valeurs de courants positifs à ceux obtenus pour des courants négatifs pour chaque type neuronal (Fig. 12B). Les synapses électriques unissant PD à AM, VD et IC présentent une rectification entrante significative. En effet, les coefficients de couplage entre PD et ces neurones sont plus forts pour les courants négatifs que pour les courants positifs (t-test,  $p < 0,05$ ). A l'inverse les synapses unissant PD à PD, DG et LPG apparaissent linéaires. Enfin, le couplage de PD vers AB présente une faible rectification dans le sens sortant car les valeurs de coefficient de couplage entre ces deux neurones sont plus grandes pour les courants positifs que pour les courants négatifs. Dans la suite du manuscrit, nous utiliserons les valeurs de coefficient de couplage obtenues pour les courants négatifs. En effet, le coefficient de régression des courbes représentant  $\Delta V_{\text{post}}$  en fonction de  $\Delta V_{\text{pré}}$  est meilleur pour les courants négatifs que pour les courants positifs et la valeur des coefficients de couplage pour les courants négatifs est plus représentative de la force de la synapse étant donné la très forte rectification entrante observée pour les synapses PD-AM, PD-VD et PD-IC.

L'ensemble des couplages électriques fonctionnels mis en évidence par cette technique électrophysiologique ainsi que leur caractère linéaire ou rectifiant sont résumés en Figure 12C. Il est à noter que le caractère direct des couplages électriques n'a pas été démontré (voir discussion). Les couplages mis en évidence par diffusion de neurobiotine sont pour la plupart confirmés par cette approche électrophysiologique aussi bien pour les synapses déjà caractérisées (PD-PD, PD-AB, PD-VD) que les synapses nouvellement décrites (PD-AM, PD-DG et PD-LPG). Il apparaît cependant quelques différences dans les neurones couplés métaboliquement et ceux couplés électriquement à PD. Ainsi, le neurone IC est rarement dye-couplé à PD alors qu'il est fréquemment couplé à PD par les techniques électrophysiologiques. A l'inverse, les neurones GM et PY peuvent être occasionnellement dye-couplés alors qu'ils apparaissent non couplés en électrophysiologie.

### 3- Corrélation entre couplage métabolique et couplage électrique.

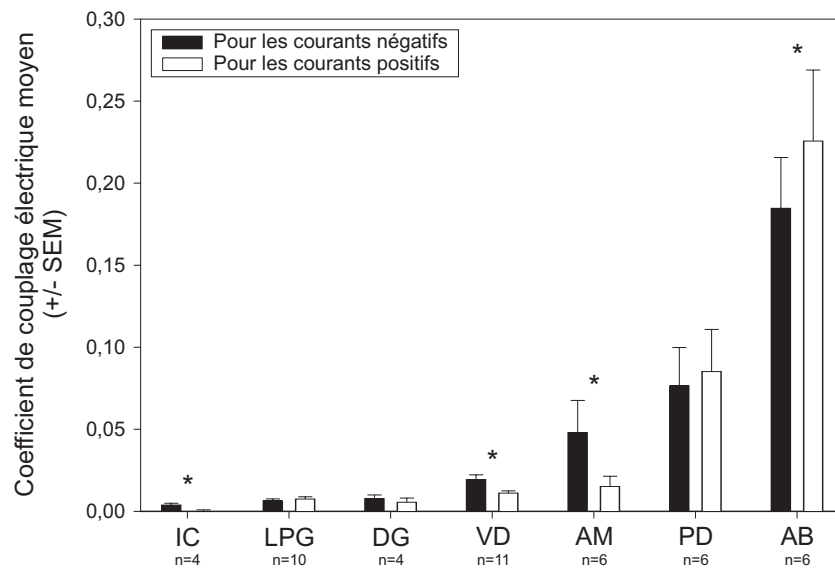
Nous avons alors cherché à associer les résultats obtenus par dye-coupling à ceux obtenus par électrophysiologie. Dans ce but, nous avons mesuré les coefficients de couplage de PD vers chacun de ses partenaires, et comparé la force du coefficient de couplage avec l'occurrence du couplage métabolique. Les neurones ont ainsi été classés par ordre d'occurrence de dye-coupling (Fig. 13A) ou

**Figure 12 : Coefficients du couplage électrique de PD avec les neurones du STG.** De façon à déterminer les neurones couplés à PD, le coefficient de couplage de PD vers les représentants de chaque type neuronal (A, 1<sup>ère</sup> colonne) est comparé avec le couplage des électrodes au moyen d'une ANOVA factorielle. Seules les paires pour lesquelles le coefficient de couplage présente une différence avec le couplage des électrodes avec un  $p < 0,001$  sont retenues (leur nombre est reporté dans la 2<sup>ème</sup> colonne du tableau A). Ce nombre est alors comparé au nombre total de paires testées pour chaque type neuronal (A, 3<sup>ème</sup> colonne) puis le pourcentage de neurones dont le coefficient de couplage avec PD est significativement différent de celui des électrodes est calculé (A, dernière colonne). Seuls les types neuronaux pour lesquels un couplage électrique est observé dans plus de 75 % des cas sont considérés comme électriquement couplés à PD (A, neurones en noir). Ensuite, pour déterminer le caractère linéaire ou rectifiant des couplages électriques, le coefficient de couplage pour les courants négatifs (B, en noir) est comparé à celui obtenu pour les courants positifs (B, en blanc) pour chaque type neuronal. Les astérisques indiquent les neurones pour lesquels ces deux valeurs sont statistiquement différentes (t-test,  $p < 0,05$ ). Le schéma en C représente les couplages fonctionnels du neurone PD. Les synapses électriques linéaires (====) et les synapses rectifiantes laissant passer les courants positifs (→|←) sont indiquées.

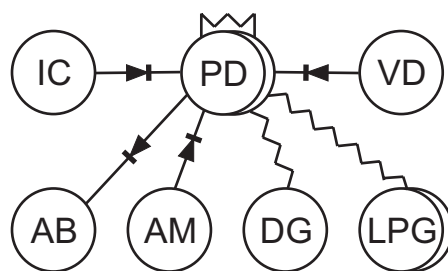
**A**

Type neuronal	Nombre de neurones dont le coefficient de couplage avec PD est statistiquement différent du couplage des électrodes pour $p < 0,001$	n	Pourcentage de neurones couplés significativement à PD
PD	6	6	100 %
AB	6	6	100 %
VD	11	11	100 %
AM	6	6	100 %
DG	4	4	100 %
LPG	9	10	90 %
IC	3	4	75 %
IPSP	3	7	43 %
LG	2	6	33 %
LP	1	4	25 %
Int1	1	5	20 %
MG	1	6	17 %
GM	4	34	13 %
PY	0	15	0 %

**B**



**C**





de coefficient de couplages (Fig. 13B) croissants. Ces deux classements montrent une grande similarité. En effet, les neurones les plus fréquemment marqués à la neurobiotine (AB, PD) sont ceux qui présentent les plus forts coefficients de couplage avec PD. Les neurones marqués dans plus de 25 % des cas (DG, AM, VD, LPG) ont un coefficient de couplage modéré avec PD, tandis que les neurones rarement dye-couplés à PD (IC, GM, PY) ont des coefficients de couplage faibles (IC) ou nuls (GM, PY).

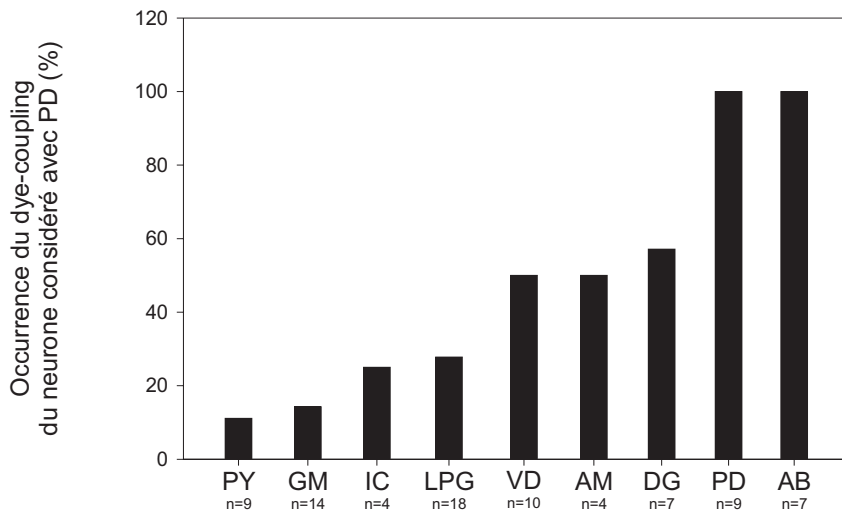
Nous avons trouvé une corrélation positive statistiquement significative ( $p < 0,01$ ) entre l'occurrence de marquage à la neurobiotine pour un type neuronal donné et la force des couplages entre PD et ce même type cellulaire (Fig. 13C), c'est-à-dire que plus un type neuronal est fréquemment couplé avec PD à la neurobiotine, plus le coefficient de couplage entre ces deux neurones est grand. Le couplage métabolique prédit très fortement le coefficient de couplage ( $r^2 = 0,85$ ), ce qui suggère qu'un coefficient de couplage fort est le prérequis à un passage efficace de la neurobiotine indépendamment du caractère rectifiant ou non de la synapse considérée. Ainsi, l'approche par diffusion de sonde est complémentaire de la mesure des coefficients de couplage et permet, de façon fiable, de prédire l'intensité du couplage électrique entre deux neurones.

En outre, ces résultats suggèrent que la neurobiotine diffuse avec la même efficacité au travers des synapses électriques rectifiantes qu'à travers les synapses électriques linéaires. Or, des travaux réalisés sur la sangsue (Fan et al., 2005) et l'écrevisse (Antonsen and Edwards, 2003) montrent que la diffusion de la neurobiotine dépend du sens de la rectification de la synapse électrique unissant deux neurones et donc qu'elle ne passe pas de manière symétrique à travers cette synapse. Ainsi, la neurobiotine ne diffuse que dans le sens conduisant les courants positifs. En revanche, nos résultats montrent que la neurobiotine est capable, dans le SNST de homard, de traverser une synapse rectifiante dans le sens qui laisse passer les courants négatifs (voir l'occurrence de dye-coupling de AM, VD et DG). La technique de dye-coupling ne nous permet pas, dans ce système, de déterminer le caractère rectifiant ou linéaire d'une synapse électrique.

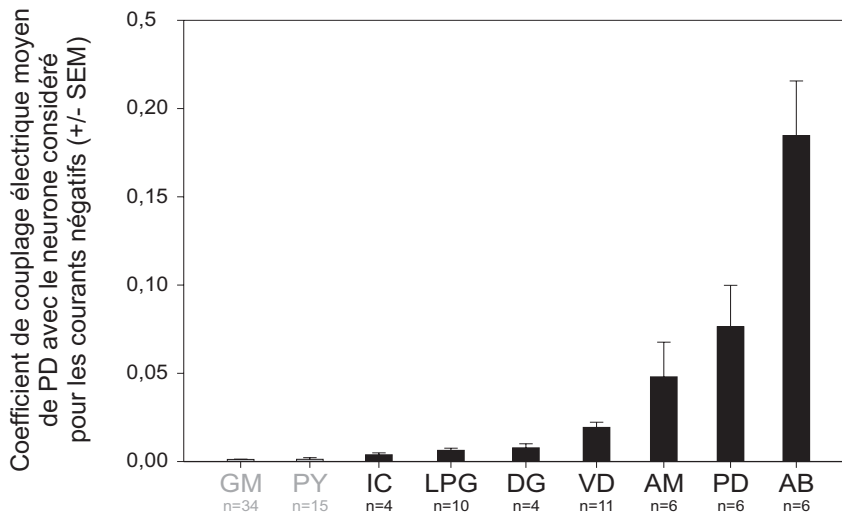
Après avoir établi la façon dont les molécules de petites tailles et les ions diffusent de PD vers les autres neurones du STG à travers les synapses électriques, il est important de considérer l'aspect morphologique des jonctions gap. En effet, le nombre et la localisation de ces synapses sont capables d'influencer de façon importante l'intensité du couplage entre deux neurones. En fonction de sa localisation, une synapse électrique sera capable d'influencer un neurone soit de façon très locale, soit dans son ensemble. Par ailleurs, il serait intéressant de déterminer si un fort coefficient de couplage entre deux neurones nécessite la présence de nombreux sites de localisation des jonctions gap. De façon à comprendre l'importance relative de ces deux paramètres ainsi que la façon dont ils interagissent, il est d'abord nécessaire de connaître précisément le nombre et la localisation des jonctions gap entre deux neurones dont le couplage est connu et d'établir la base morphologique de ces synapses électriques.

**Figure 13 : Corrélation entre couplage métabolique et couplage électrique d'un neurone PD avec les autres neurones du STG.** L'occurrence du couplage métabolique des neurones du STG avec PD (A, neurones classés par occurrence de couplage métabolique croissante) présente de fortes similitudes avec le coefficient de couplage de PD vers les autres neurones du STG pour les courants négatifs (B, neurones classés par coefficient de couplage croissant). En effet, les neurones les plus fréquemment dye-couplés sont généralement ceux qui ont les plus forts coefficients de couplage avec PD. Le nombre total de neurones utilisés pour ces analyses est indiqué sous le nom de chaque neurone en A et B, les neurones en gris correspondent aux neurones ne présentant pas de couplage électrique significatif avec PD. Pour confirmer cette observation, une recherche de corrélation entre l'occurrence du couplage métabolique et le coefficient de couplage pour les courants négatifs a été effectuée (C), révélant ainsi une forte corrélation positive entre ces deux paramètres ( $p < 0,001$ ,  $r^2 = 0,85$ ).

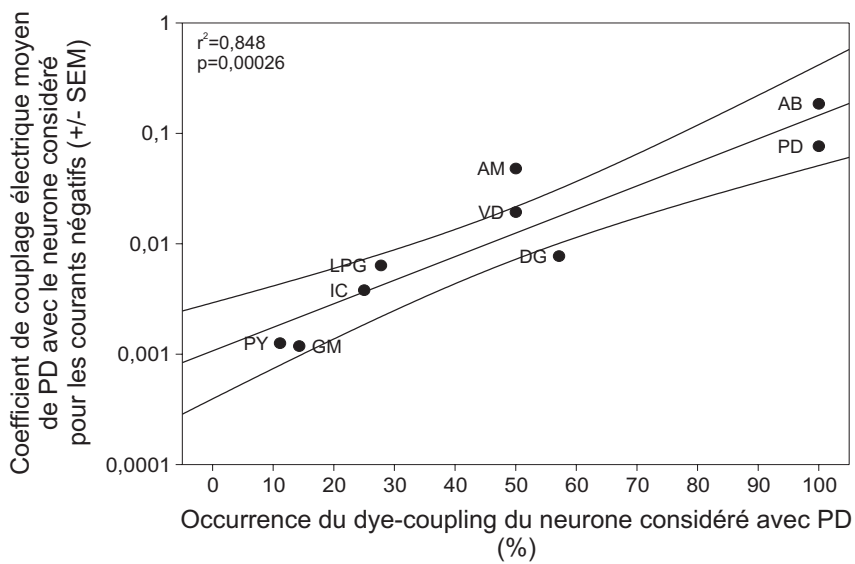
**A**



**B**



**C**







#### 4- Vers un support morphologique des interactions électriques entre PD.

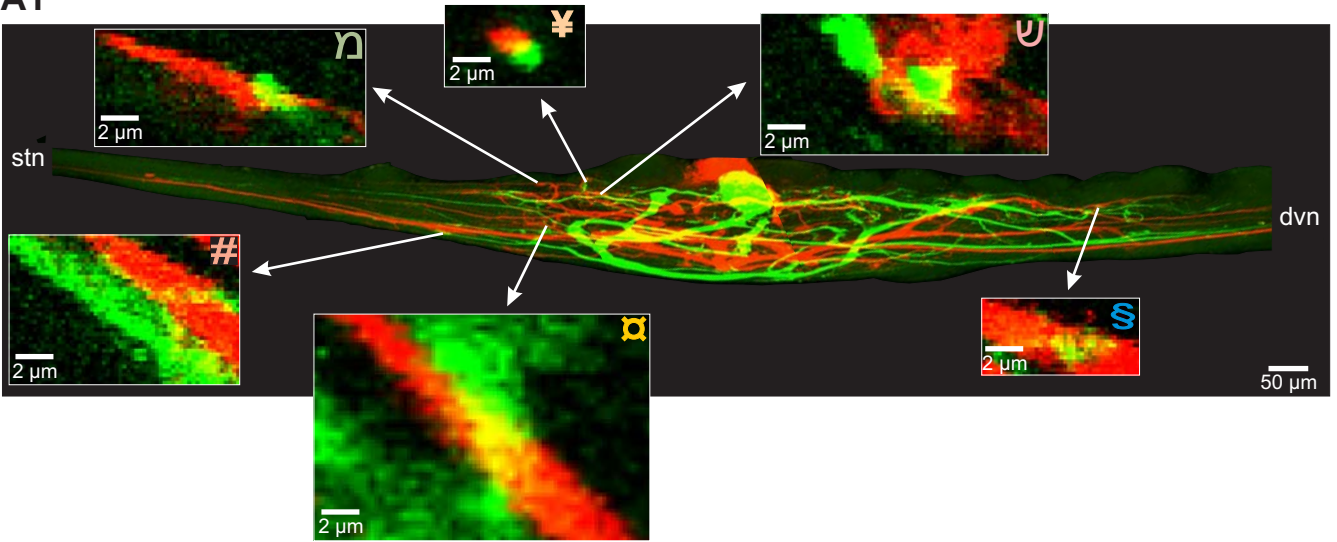
Nous avons choisi de considérer le second neurone PD comme neurone postsynaptique car les deux neurones PD sont fortement couplés en électrophysiologie, et toujours couplés à la neurobiotine. De plus, ce sont deux neurones homologues, à la morphologie semblable (Cabirol-Pol, 1998), ce qui permet de comparer la localisation des synapses électriques dans l'arborisation de deux neurones identiques dans la même préparation. Enfin, aucune synapse chimique ne relie les deux neurones PD, donc toute apposition existant entre les prolongements de ces deux neurones ne pourra que supporter une jonction gap potentielle.

Pour réaliser cette étude, nous avons visualisé en microscopie confocale les zones d'apposition entre deux PD. Pour cela, un PD est injecté au dextran-fluorescéine ou au jaune lucifer et l'autre avec du dextran-rhodamine. Les préparations sont montées entre lame et lamelle après fixation, déshydratation et éclaircissement, pour être observées au microscope confocal. Des acquisitions de l'ensemble du STG sont réalisées à l'objectif X40 (Fig. 14A1), les coupes optiques ayant une épaisseur de 0,5  $\mu\text{m}$ . Chaque coupe optique est alors observée pour rechercher les zones où les deux fluorophores sont présents sur les mêmes pixels (qui apparaissent donc en jaune).

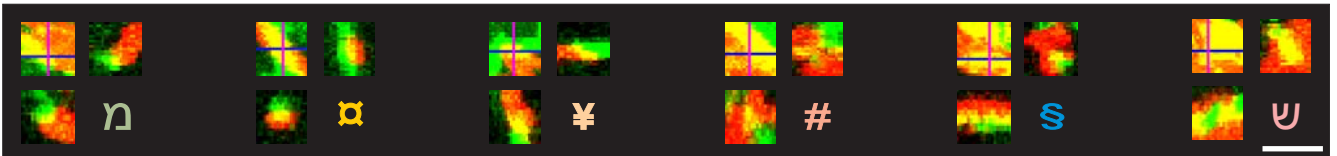
Cette étude systématique réalisée sur 3 préparations a montré une moyenne de 31 appositions membranaires entre les deux neurones PD ( $31,3 \pm 5,9$ ), le nombre d'appositions étant très variable d'une préparation à l'autre (20 à 40 zones de colocalisation). En première analyse, ces zones ne semblent pas localisées de façon préférentielle dans le STG. En effet, 9 zones d'apposition se trouvent en moyenne du côté du *stn* (7 à 11 dans la zone allant du *stn* au corps cellulaire du PD le plus antérieur), 9 au niveau des corps cellulaires des deux PD (4 à 14 dans la zone comprise entre les corps cellulaires des deux PD) et 13 du côté du *dvn* (6 à 17 dans la zone allant du corps cellulaire du PD le plus postérieur au *dvn*). Néanmoins, l'épaisseur des coupes optiques réalisées est très largement supérieure à l'espacement des membranes au niveau des synapses électriques (de 2 à 3 nm). De façon à augmenter la résolution en profondeur, nous avons observé à l'objectif X60 chaque zone d'apposition détectée à l'objectif X40. Nous avons ainsi réalisé des coupes optiques de 0,3  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Chaque série est, comme précédemment, regardée coupe par coupe et les zones montrant encore une superposition des marquages à la fluorescéine et à la rhodamine sont retenues (Fig. 14A1, encarts, chaque zone d'apposition étant représentée par un symbole de couleur). De façon à confirmer ces observations, chaque série montrant des zones d'apposition (Fig. 14A2, encarts en haut à gauche) est observée sur les deux autres plans à l'aide du logiciel Fluoview (Fig. 14A2), c'est-à-dire que le logiciel réalise des coupes optiques fictives dans les plans Y-Z (Fig. 14A2, en haut à droite) et X-Z (Fig. 14A2, en bas à gauche). Seules les séries présentant un marquage jaune sur les trois plans sont

**Figure 14 : Identification des zones d'apposition entre deux neurones PD : localisation potentielle des synapses électriques entre PD.** Un neurone PD est injecté au jaune lucifer (A1, en vert), l'autre au dextran-rhodamine (A1, en rouge). Des acquisitions au microscope confocal à l'objectif X40 sont ensuite effectuées sur l'ensemble du STG (A1, 5 projections maximales de 133 coupes optiques de 0,5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur mises bout à bout). Les zones pour lesquelles les deux marquages se superposent (en jaune) sur une seule coupe optique sont ensuite observées à l'objectif X60 (encarts, une coupe optique de 0,3  $\mu\text{m}$ ). Chaque zone est identifiée au moyen d'un marqueur puis observée en multiplans (A2, la barre représente 5  $\mu\text{m}$ ). La série de coupes optiques réalisées à l'objectif X60 (en haut à gauche) est observée dans le plan X/Z (trait bleu) et dans le plan Y/Z (trait mauve). Sur chacun de ces plans, une zone de colocalisation des deux marquages est recherchée (en bas à gauche et en haut à droite respectivement). Les zones qui satisfont à ces critères sont considérées comme des zones pouvant potentiellement supporter des synapses électriques. Pour cette paire de neurones PD, elles sont au nombre de 6. Les neurones sont ensuite reconstruits au moyen du logiciel NeuroLucida (B1 pour le PD injecté au jaune lucifer et B2 pour celui injecté au dextran-rhodamine). Les corps cellulaires sont représentés par des cercles de couleur et correspondent au début de l'arbre neuritique, l'axone est représenté par un trait horizontal de même couleur que le soma. Les traits horizontaux sont proportionnels à la longueur de chaque branche et les flèches indiquent la position de chaque zone d'apposition au sein de l'arbre dendritique. Une première analyse de ces reconstructions semble ne pas indiquer de localisation préférentielle des zones d'apposition.

A1

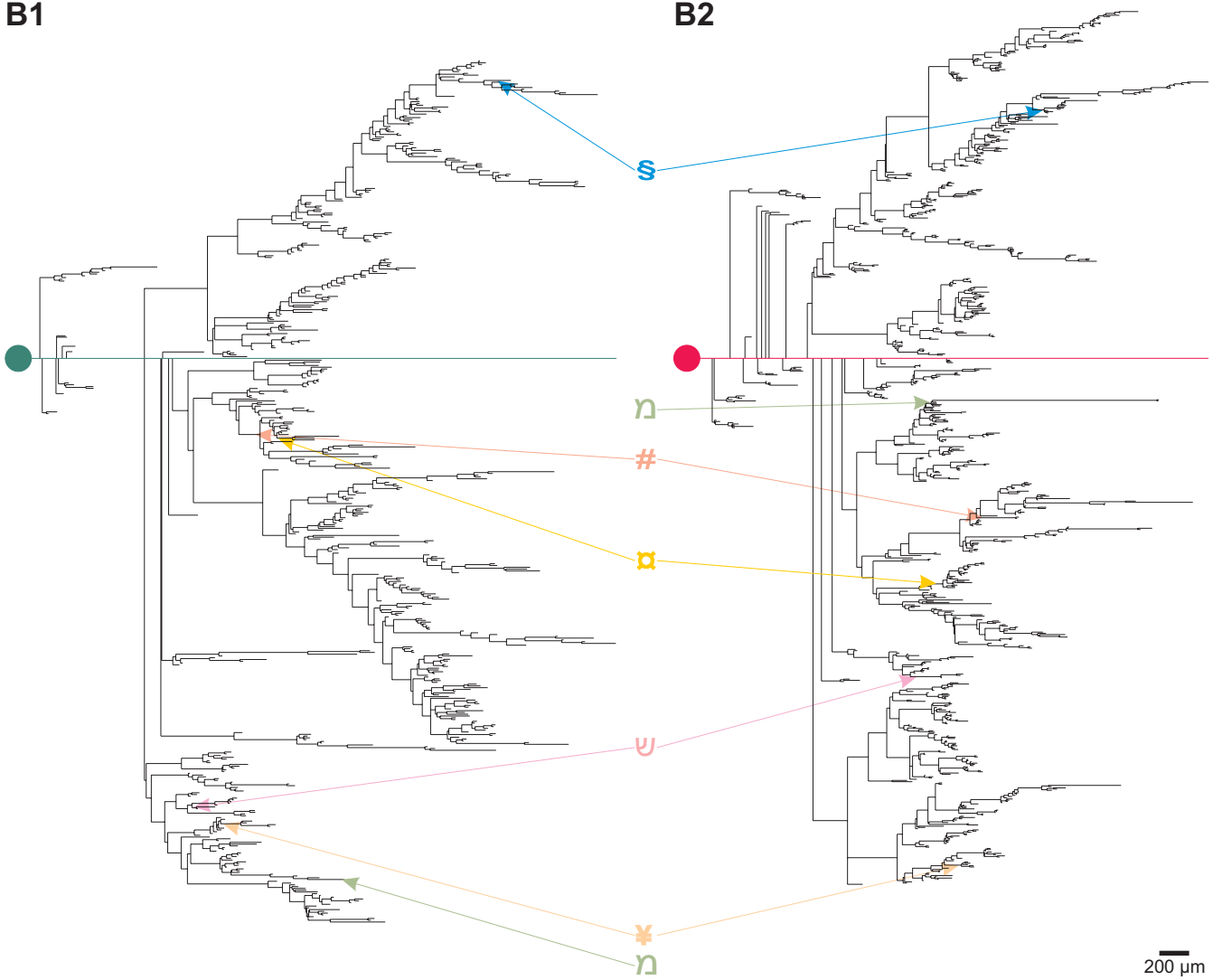


A2



B1

B2



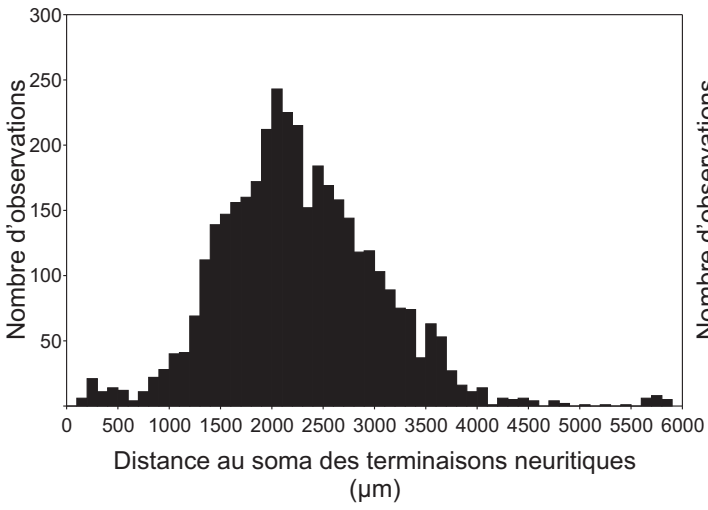


retenues comme étant des zones d'apposition membranaire potentielle des deux neurones. Sur l'exemple donné dans la figure 14A, nous constatons que seules 6 zones d'apposition demeurent après ces analyses alors que 20 avaient été détectées au X40. Sur l'ensemble des préparations, nous avons noté la présence de 5 à 7 zones d'apposition ( $6 \pm 0,6$ ). Là encore, nous n'avons pas pu mettre en évidence de localisation préférentielle de ces appositions au sein du STG, puisque 2 à 5 zones de colocalisation se trouvent du côté du *stn* (4 en moyenne), 0 à 1 au niveau des corps cellulaires et 1 à 3 sont situées du côté du *dvn* (2 en moyenne). Cependant, cette première analyse sur la localisation des appositions dépend de la position des corps cellulaires des neurones PD qui est très variable au sein du STG (Cabirol-Pol, 1998). Ainsi, les zones que nous avons définies sont variables d'une préparation à l'autre. Il est donc plus pertinent de regarder la position des zones d'apposition au sein de l'arbre dendritique des neurones PD. Pour cela, les deux neurones PD de chacune des 3 préparations réalisées ont été reconstruits en 3 dimensions à l'aide du logiciel NeuroLucida. Les dendrogrammes issus des reconstructions des PD présentés dans la figure 14A1 sont visibles en B1 (pour le neurone injecté à la fluorescéine) et B2 (pour le neurone injecté à la rhodamine). Sur ces dendrogrammes, les corps cellulaires sont représentés par un rond vert (B1) et rouge (B2) et les axones par des traits horizontaux de la couleur des somas. Les traits horizontaux correspondent aux neurites et sont proportionnels à la longueur de chaque branche, alors que les traits verticaux ne sont là que pour étaler l'arbre dendritique de façon à le rendre plus lisible. Après reconstruction, il est possible de placer des repères correspondant à chacune des zones d'apposition observées (indiquées par des flèches). Nous constatons que les zones pouvant potentiellement supporter une synapse électrique ne se trouvent jamais sur les axones. De plus, sur chacune des 3 préparations, au moins deux marqueurs sont toujours localisés dans une même partie de l'arborisation d'un PD (symboles jaune et rose Fig. 14B1 et B2).

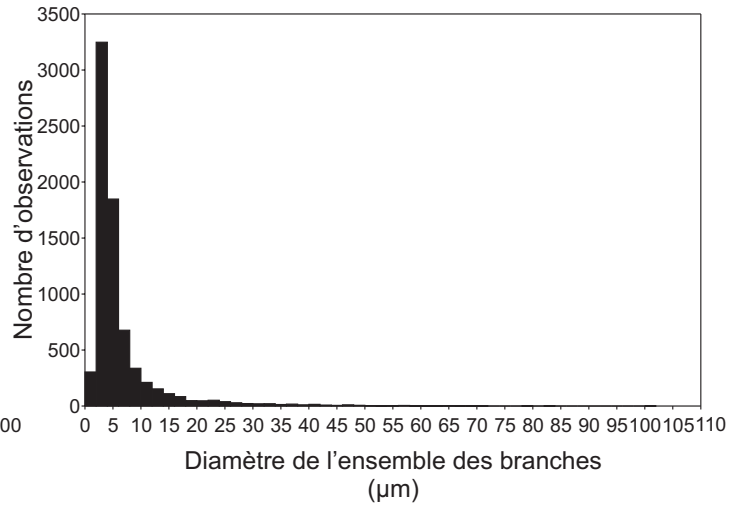
Au-delà de ces premières observations, nous avons cherché à déterminer si les zones d'apposition se trouvent sur un ordre de branche défini. Nous avons pour cela adopté le mode de numérotation de Shaft, dans lequel une branche est assignée d'ordre 1 (l'axone des neurones dans notre cas), puis une numérotation centrifuge classique est appliquée (Uemura, 1985). L'ordre moyen des branches supportant des zones d'apposition est de 13 ( $12,8 \pm 1$ ), ces ordres s'étageant de 2 à 31, ce qui suggère que les zones d'apposition ne sont pas localisées sur un ordre de branche bien établi. Plus que l'ordre des branches la distance de ces appositions par rapport à l'axone ou au corps cellulaire semble importante pour l'influence que peuvent avoir les synapses électriques sur l'activité électrophysiologique des neurones. Pour cela, les distances des terminaisons de l'ensemble des branches des six neurones PD reconstruits par rapport aux corps cellulaires (Fig. 15A1) ont été comparées aux distances séparant les zones d'appositions des somas (Fig. 15A2). Les appositions se trouvent à une distance moyenne de  $1956 \pm 89 \mu\text{m}$  du corps cellulaire, mais là encore une grande variabilité est observable car la distance séparant les appositions des corps cellulaires varie de 852 à 3137  $\mu\text{m}$ . Ces appositions ne sont donc pas situées à une distance préférentielle des somas. De la

**Figure 15 : Caractérisation des zones d'apposition entre neurones PD.** Sur l'ensemble des préparations réalisées (n=6, pour un total de 18 appositions) la distance des appositions par rapport au soma (A2) a été comparée à la distance séparant les terminaisons des branches neuritiques du corps cellulaire (A1). Par ailleurs, le diamètre des branches supportant les appositions (B2) a été comparé au diamètre de l'ensemble des neurites (B1). Nous remarquons que, dans les deux cas, les branches supportant les appositions ne se distinguent pas de l'ensemble des branches constituant les neurones : les appositions ne sont pas à une distance particulière du soma et les branches les supportant ne présentent pas de diamètre particulier.

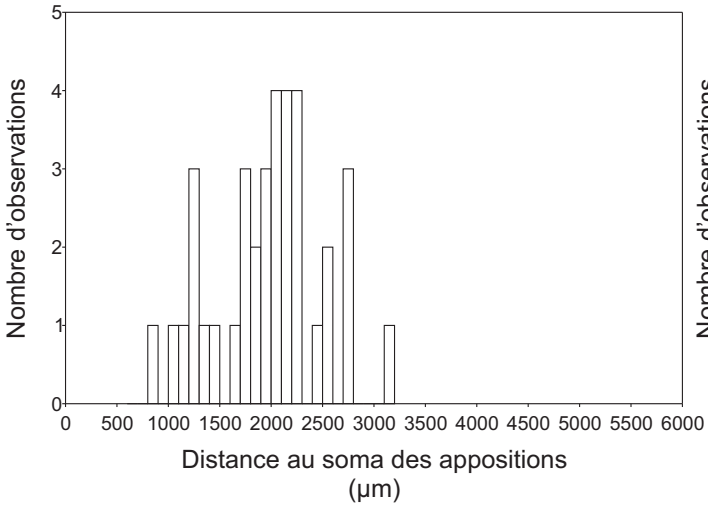
**A1**



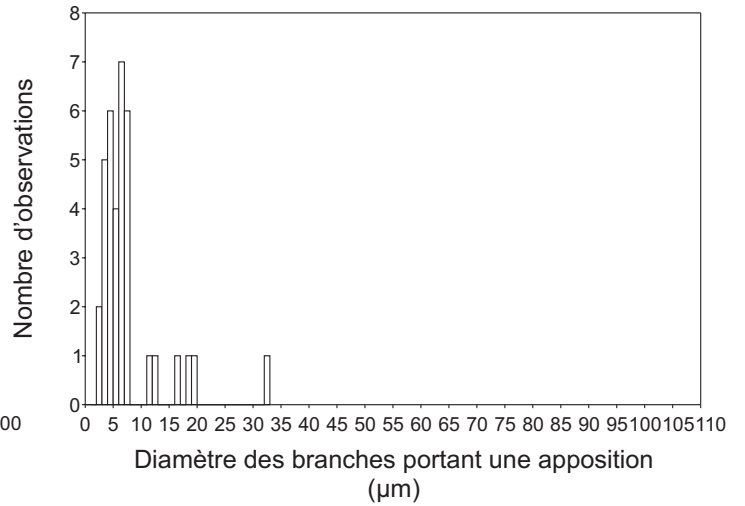
**B1**



**A2**



**B2**







même façon, la distance des appositions par rapport à l'axone ne semble pas être très conservée puisqu'elle varie de 211 à 2380  $\mu\text{m}$ . Les diamètres des branches supportant les appositions (Fig. 15B2) sont en moyenne de  $8 \pm 1 \mu\text{m}$  et présentent une répartition similaire à celle de l'ensemble des branches des neurones (Fig. 15B1) dont le diamètre moyen est de 6  $\mu\text{m}$ .

Nous n'avons donc pas pu mettre en évidence de localisation préférentielle des zones d'apposition entre les neurones PD, aussi bien dans le STG qu'au sein de l'arborisation de ces neurones. Cependant, nous avons toujours trouvé un faible nombre d'appositions, qui semble donc suffisant pour assurer un couplage fort entre ces neurones, aussi bien d'un point de vue métabolique qu'électrique. Après avoir caractérisé par une approche électrophysiologique et neuroanatomique (diffusion de sonde et localisation des appositions) la synapse électrique unissant les deux PD, nous avons vérifié que les neurones PD expriment les ARN<sub>m</sub> codant pour les protéines constitutives des jonctions gap chez les invertébrés.

#### 5- Support moléculaire des synapses électriques entre les neurones PD.

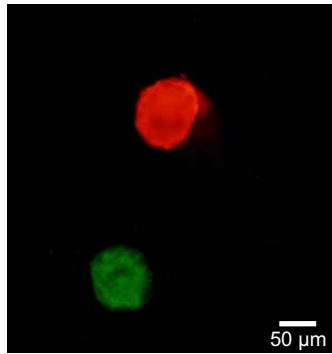
Les innexines sont une famille de protéines spécifiques des invertébrés, dont plusieurs gènes ont été clonés chez différentes espèces (*Drosophila* (Curtin et al., 1999; Landesman et al., 1999; Phelan et al., 1998a), *Caenorhabditis* (Barnes and Hekimi, 1997; Starich et al., 1996), *Hirudo* (Dykes et al., 2004), *Clione* (Panchin et al., 2000)). Il a été possible, par expression hétérologue dans des ovocytes de Xénope (Phelan et al., 1998b), de montrer que les protéines codées par ces gènes peuvent former des jonctions de type gap capables de laisser passer des courants électriques avec des caractéristiques proches de celles des synapses électriques formées par les connexines de vertébrés, comme la rectification (Dykes et al., 2004). Récemment, 2 gènes codant pour des innexines chez *Homarus gammarus* (*Hg-inx 1* et *Hg-inx 2*) ont été clonés au laboratoire. Nous avons donc cherché à déterminer si les neurones PD expriment ces innexines. Pour cela, les neurones PD sont d'abord identifiés puis injectés par pression avec du dextran-fluorescéine ou du dextran-rhodamine (Fig. 16A1 et A2), pour permettre de repérer les corps cellulaires de ces deux neurones par microscopie à épifluorescence. Sur ces mêmes préparations, un protocole d'hybridation *in situ* est ensuite réalisé (voir méthodes) soit pour détecter les ARN<sub>m</sub> de l'innexine 1 soit pour détecter ceux de l'innexine 2 par utilisation de sondes complémentaires couplées à la digoxygénine (DIG). Les micrographies réalisées après ce traitement mettent en évidence, au niveau de la zone du STG contenant les corps cellulaires de PD, des cellules présentant un marquage dense autour du noyau (Fig. 16B1 et B2).

La superposition des deux types d'image (fluorescence et après révélation de la DIG) permet de montrer que les neurones PD expriment l'ARN<sub>m</sub> de l'innexine 1 (Fig. 16C1) et celui de l'innexine 2 (Fig. 16C2). Ainsi, les neurones PD sont capables d'exprimer les deux innexines connues chez le homard.

**Figure 16 : Expression des innexines par les neurones PD.** Les neurones PD sont identifiés par injection de dextran couplé à la fluorescéine (en vert) ou à la rhodamine (en rouge) (A1 et A2, micrographies réalisées au microscope à épifluorescence). Sur ces mêmes préparations, un protocole d'hybridation *in situ* est réalisé en utilisant la sonde antisens *Hg-inx 1* (micrographie B1) ou la sonde antisens *Hg-inx 2* (micrographie B2). Deux neurones sont marqués pour l'innexine 1 et un seul pour l'innexine 2 (têtes de flèche blanches). La superposition des micrographies A1 et B1 d'une part (C1) et A2 et B2 d'autre part (C2) permet de mettre en évidence l'existence d'ARN<sub>m</sub> pour l'innexine 1 et 2 dans les neurones PD.

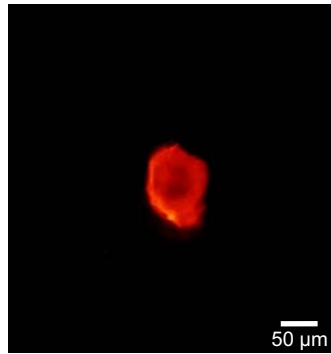
Hg-*inx1*

A1

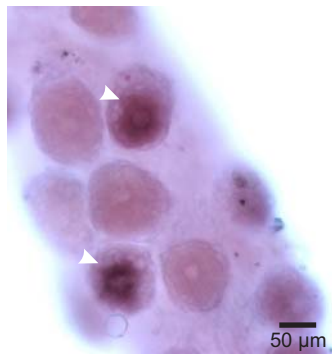


Hg-*inx2*

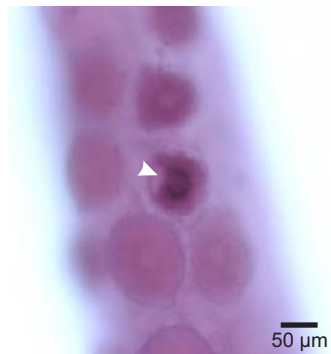
A2



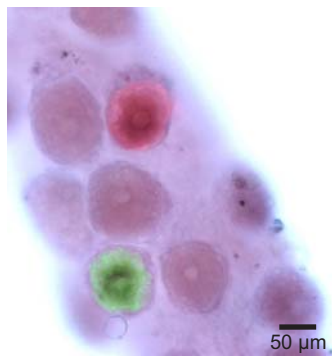
B1



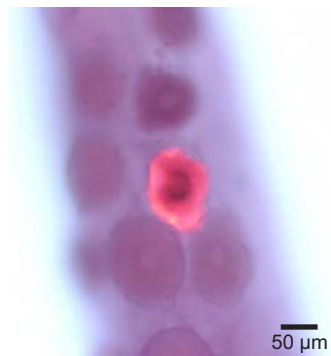
B2



C1



C2





Cette approche par hybridation *in situ* permet donc de visualiser sur un STG, l'ensemble des neurones exprimant un type de transcrite d'innexine et donc l'ensemble des neurones susceptibles d'être électriquement couplés. Cette méthode nous est donc apparue pertinente pour caractériser rapidement les couplages électriques au sein du STG.

### III- Caractérisation des couplages électriques au sein du STG : corrélation entre l'expression des innexines et la présence de couplages.

---

---

#### 1- Expression des innexines au sein du STG.

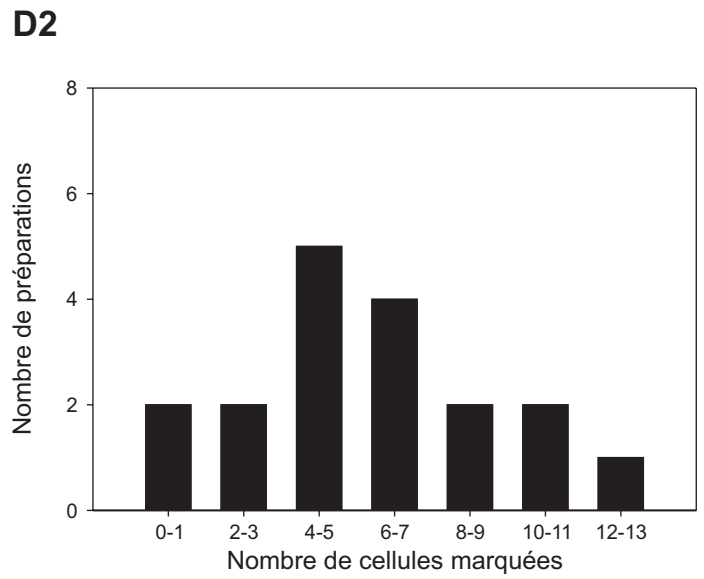
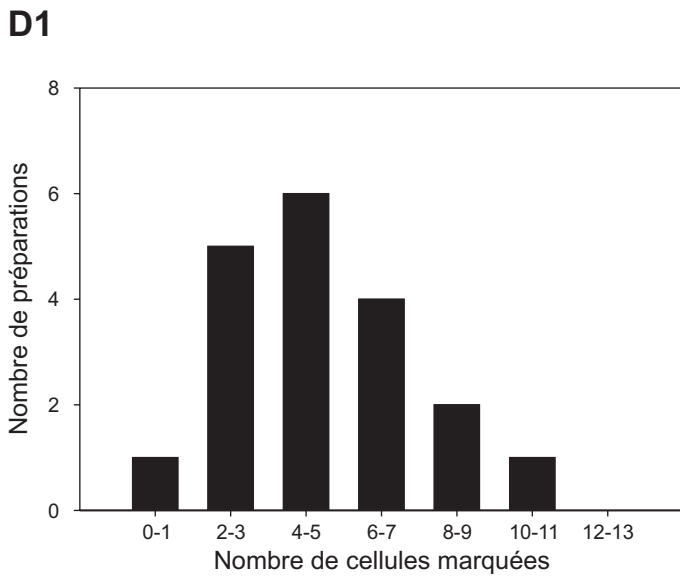
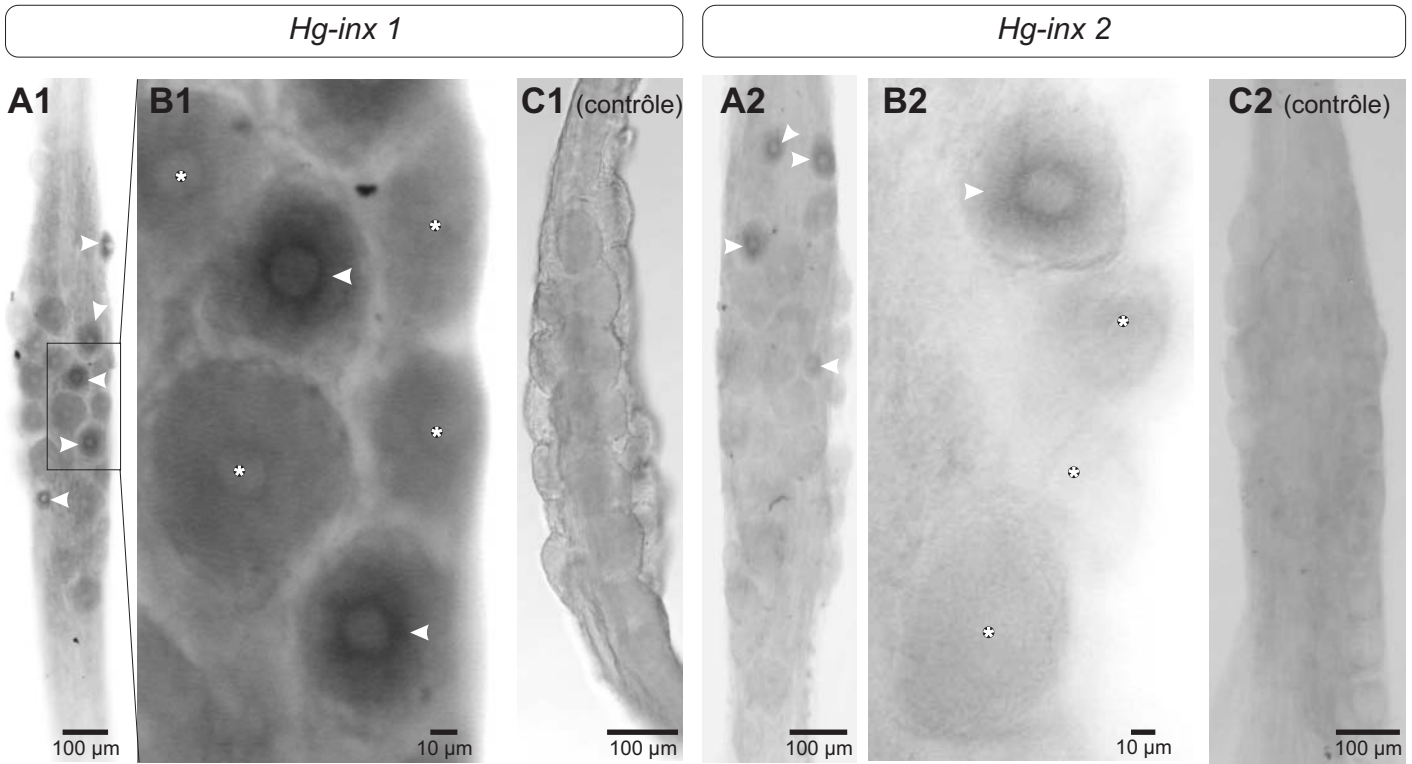
Après hybridation de la sonde antisens *Hg-inx 1*, les micrographies obtenues montrent que seuls quelques neurones expriment le gène *Hg-inx 1* (Fig. 17A1, têtes de flèche). Par exemple, sur cette préparation, 5 neurones présentent un marquage dense autour du noyau bien visible au fort grossissement (Fig. 17B1). Lorsque l'hybridation *in situ* est réalisée avec la sonde sens *Hg-inx 1*, aucun neurone ne présente de marquage dense autour du noyau (Fig. 17C1). Ceci confirme la spécificité de notre sonde pour l'ARN<sub>m</sub> de l'innexine 1. Sur les 19 STG traités avec la sonde antisens *Hg-inx 1*, nous avons trouvé en général 3 à 7 neurones exprimant l'ARN<sub>m</sub> de l'innexine 1, ce nombre pouvant varier de 0 à 11 (Fig. 17D1).

Nous avons ensuite réalisé les mêmes expériences avec la sonde antisens *Hg-inx 2* et nous avons retrouvé un marquage dense autour du noyau de seulement certains neurones (Fig. 17A2, têtes de flèche). Ce marquage est particulièrement visible au fort grossissement (Fig. 17B2). Par exemple, sur la préparation présentée en A2, seuls quatre neurones sont marqués. Les expériences témoins effectuées avec la sonde sens révèlent que les STG ainsi traités (Fig. 17C3) ne présentent aucun marquage en forme d'anneau autour des noyaux. Ce marquage est donc bien spécifique des neurones exprimant les transcrits pour l'innexine 2. Sur un total de 19 STG traités avec la sonde antisens *Hg-inx 2*, un faible nombre de neurones expriment ce gène puisqu'en général 4 à 7 cellules seulement expriment l'ARN<sub>m</sub> pour l'innexine 2, ce nombre pouvant varier de 0 à 12 (Fig. 17D2).

Nous avons ensuite identifié les neurones exprimant les transcrits des innexines en réalisant des protocoles d'hybridation *in situ* sur des STG sur lesquels les neurones avaient été préalablement cartographiés et certains visualisés par injection de dextran couplé à des fluorophores (voir Fig. 10 pour le principe de l'identification).

Nous avons utilisé 8 STG pour effectuer les hybridations *in situ* pour détecter les transcrits de l'innexine 1 et 7 pour visualiser ceux de l'innexine 2. L'ensemble des résultats de ces expériences est détaillé dans les figures 18A1 et A2 et résumé en figure 18B. Nous constatons que l'ARN<sub>m</sub> de

**Figure 17 : Quantification du nombre de neurones exprimant l'innexine 1 ou l'innexine 2 dans le STG adulte.** Un protocole d'hybridation *in situ* est réalisé avec la sonde antisens *Hg-inx 1* (A1) ou *Hg-inx 2* (A2) sur des STG adultes. Les micrographies obtenues après révélation de la digoxigénine montrent des neurones fortement marqués (têtes de flèches blanches). A plus fort grossissement (B1 et B2 respectivement), les neurones marqués pour l'innexine 1 ou l'innexine 2 présentent une couronne de marquage dense autour du noyau (têtes de flèches blanches), les autres neurones de la préparation n'étant pas marqués (astérisques). Ce marquage dense autour des noyaux des neurones du STG est spécifique de la sonde antisens car un tel marquage n'est jamais retrouvé lorsque l'hybridation est réalisée avec la sonde sens pour *Hg-inx 1* (C1) ou pour *Hg-inx 2* (C2). L'analyse du nombre de neurones exprimant l'innexine 1 ou 2 (D1 et D2) montre un faible nombre de neurones exprimant ces gènes (de 0 à 11 neurones et de 0 à 12 neurones respectivement).







l'innexine 2 est exprimé par une plus grande variété de neurones que celui de l'innexine 1. En effet, seuls PD, AB, VD, LG, DG, Int1 et IPSP expriment l'ARN<sub>m</sub> de l'innexine 1 alors que la sonde *Hg-inx 2* marque PD, AB, VD, PY, LPG, MG, DG, GM et IPSP. Nous constatons que les représentants d'un type de neurone donné n'expriment pas systématiquement les ARN<sub>m</sub> d'une innexine. En effet, nous avons toujours une préparation pour laquelle au moins une cellule d'un type neuronal donné n'est pas marquée. Le neurone AB échappe à cette règle pour l'ARN<sub>m</sub> de l'innexine 2 mais il n'a été identifié que trois fois. Notons également que la plupart des neurones du STG qui expriment des transcrits de l'innexine 1 expriment aussi des ARN<sub>m</sub> de l'innexine 2. LG et Int1 ne sont marqués qu'avec la sonde *Hg-inx 1*, mais ils n'ont pas été identifiés ou une seule fois dans les STG qui ont servi aux hybridations *in situ* avec la sonde *Hg-inx 2*. Par ailleurs, un nombre non négligeable de cellules sont marquées mais ne sont pas identifiées, ce qui signifie que nous sous-estimons le nombre de cellules exprimant les ARN<sub>m</sub> des innexines pour les différents types neuronaux. Ceci est particulièrement vrai pour GM et PY pour lesquels le nombre de cellules est important au sein d'un STG et dont il est rare d'identifier l'ensemble de la population.

Nous montrons que les neurones PD (n=13), AB (n=13), VD (n=6), IPSP (n=11) et DG (n=3) expriment l'ARN<sub>m</sub> de l'innexine 1 dans plus de 67 % des cellules identifiées (Fig. 18B). Le neurone LG exprime l'ARN<sub>m</sub> de l'innexine 1 plus rarement (33 %, n=3). Enfin, les neurones LP, IC, LPG et GM n'expriment jamais de transcrits pour l'innexine 1. Le pourcentage d'expression de l'innexine 1 n'a pas été déterminé pour les neurones MG et Int1, ces neurones n'ayant été identifiés qu'une fois au cours de ces expériences. Cependant, la seule préparation dans laquelle Int1 a été identifié montre que ce neurone exprime des ARN<sub>m</sub> pour l'innexine 1.

Nous avons trouvé que les neurones PD (n=12), AB (n=3), VD (n=5) et IPSP (n=4) expriment l'ARN<sub>m</sub> de l'innexine 2 dans plus de 80 % des neurones identifiés (Fig. 18B). Les neurones LPG (n=11), GM (n=25) et PY (n=10) expriment plus rarement l'ARN<sub>m</sub> de l'innexine 2 (dans 20 à 45 % des neurones identifiés). Enfin, les neurones LP et IC n'expriment jamais de transcrits de l'innexine 2. Le pourcentage d'expression n'a pas été déterminé pour MG, LG, DG et Int1 car ils ont été identifiés dans un nombre trop faible de préparations. MG et DG sont cependant capables d'exprimer des transcrits pour l'innexine 2 car ils apparaissent tous deux marqués à la DIG dans une préparation.

Nos résultats montrent que l'ensemble des neurones du STG (à part AM que nous n'avons jamais identifié) exprime au moins une innexine, à l'exception des neurones LP et IC.

## 2- Les neurones du STG qui expriment l'ARN<sub>m</sub> d'une innexine sont couplés métaboliquement et électriquement.

Au vu de nos résultats, nous avons voulu confirmer que les neurones du STG exprimant au moins une innexine sont des neurones qui sont métaboliquement et électriquement couplés à d'autres

**Figure 18 : Identification des neurones exprimant l'innexine 1 ou l'innexine 2.** Les neurones de chaque STG sont identifiés par injection de fluorophores de fort poids moléculaire et par cartographie (voir Fig. 10). Ensuite une hybridation *in situ* est réalisée avec la sonde antisens pour *Hg-inx 1* ou *Hg-inx 2*. L'ensemble des résultats obtenus est présenté dans les tableaux A1 et A2 respectivement. Chaque colonne correspond à un STG, les cases noires représentent les neurones identifiés et exprimant l'innexine considérée, les cases grises correspondent aux neurones identifiés n'exprimant pas l'innexine considérée et les cases blanches aux neurones non identifiés. Le nombre de neurones marqués et non identifiés est indiqué dans la dernière ligne. L'occurrence d'expression des innexines 1 et 2 est récapitulée dans le tableau B. Pour chaque type neuronal, le nombre de neurones identifiés lors les hybridations *in situ* réalisées pour chaque innexine est indiqué. Le pourcentage d'expression de l'innexine 1 est donné dans la moitié gauche, celui de l'innexine 2 dans la moitié droite. Notons que seuls les neurones LP et IC n'expriment aucune innexine. L'abréviation n.d. correspond aux neurones pour lesquels l'occurrence d'expression n'a pas été déterminée à cause d'un nombre d'identification trop faible ( $n \leq 2$ ).





neurones du STG. Pour cela, nous avons injecté à la neurobiotine des cellules d'un type neuronal donné exprimant une innexine puis révélé la neurobiotine. Ces expériences ont été réalisées sur 36 STG. Les projections maximales de la figure 19 montrent que, lorsque chacun des neurones exprimant au moins une innexine est injecté avec de la neurobiotine (tête de flèche blanche), nous retrouvons du marquage dans au moins un autre neurone du STG (astérisques). Donc ces neurones présentent tous un couplage métabolique. Nous avons, par ailleurs, montré que chacun de ces neurones est électriquement couplé à au moins un autre neurone du STG. Les tracés électrophysiologiques de la figure 19 illustrent un exemple pour chaque type neuronal. Nous montrons que le potentiel de membrane des neurones exprimant au moins une innexine varie (Fig. 19, moyenne de dix traces) lorsqu'un créneau de courant de -20 nA (I) est injecté dans un neurone présynaptique particulier. Notons qu'au cours de ces expériences, nous avons mesuré les coefficients de couplage de paires de neurones (non encore déterminés dans le présent manuscrit) et qui ont été utilisés dans le paragraphe 4. Les neurones du STG exprimant au moins une innexine sont donc tous électriquement couplés à au moins un autre neurone du STG.

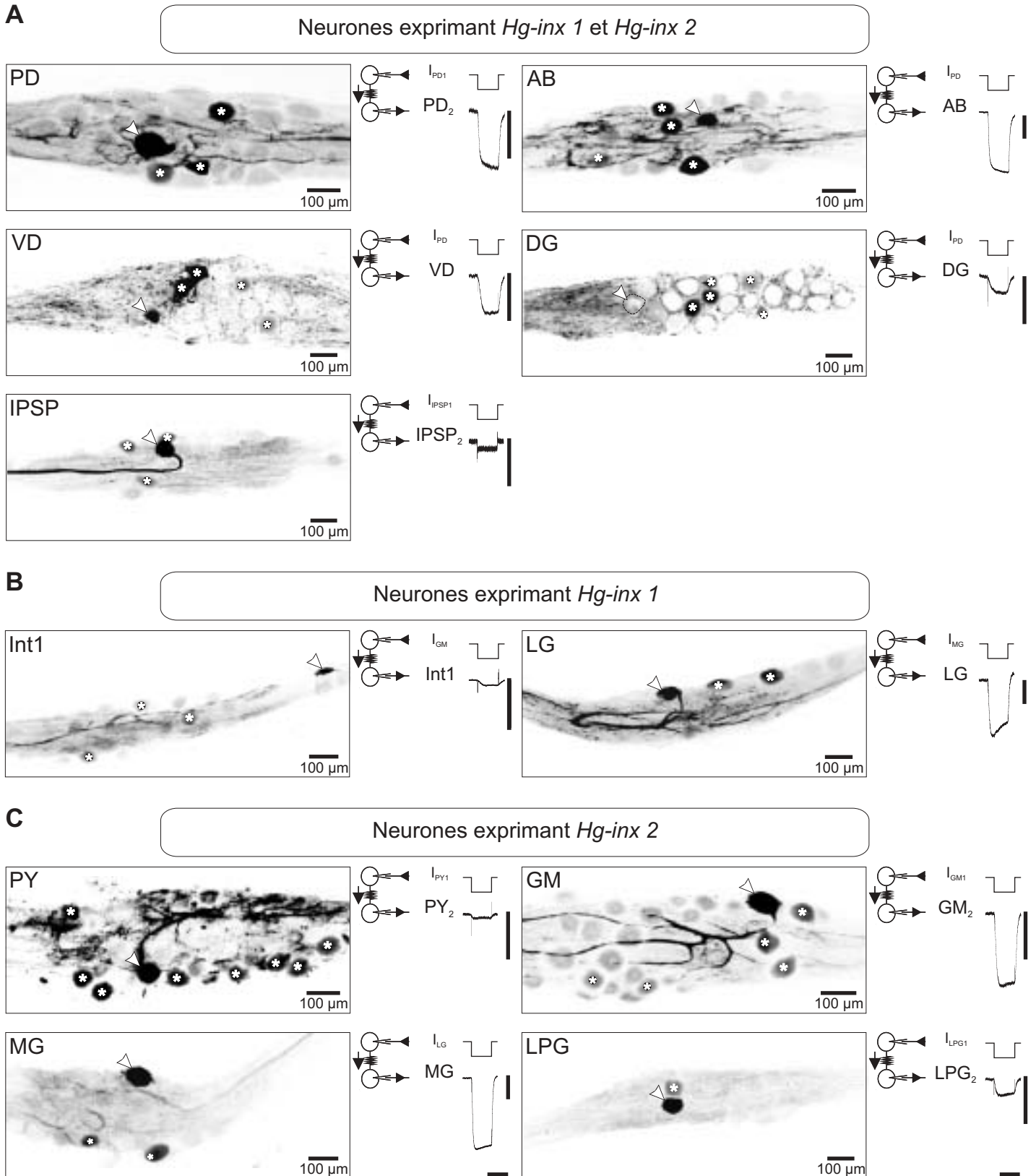
### 3- Les neurones du STG n'exprimant jamais d'innexine sont-ils métaboliquement et électriquement isolés ?

Dans un premier temps, nous avons montré que, quand de la neurobiotine est injectée dans LP (n=4) ou dans IC (n=2), aucun autre neurone n'est marqué dans le STG, la neurobiotine restant confinée dans le neurone dans lequel elle a été injectée (Fig. 20A1 et B1 respectivement). Ces deux neurones apparaissent donc comme métaboliquement isolés selon notre critère de détermination du dye-coupling.

Cependant, il a été reporté chez *Panulirus interruptus* (Harris-Warrick et al., 1992; Johnson et al., 1993) que PD et IC sont électriquement couplés. De plus, chez la plupart des crustacés décapodes, LP et PY sont unis par une synapse électrique (Tazaki and Tazaki, 1997). Nous avons donc cherché à savoir si la neurobiotine pouvait diffuser de PY vers LP et de PD vers IC. Pour cela, sur quatre préparations nous avons identifié LP (par injection de dextran-fluorescéine ou carte) et injecté un neurone PY avec de la neurobiotine. Sur ces quatre préparations, une seule a montré un neurone LP marqué (Fig. 20A2). On notera que le marquage de LP est faible. En effet, l'analyse de l'intensité de fluorescence réalisée pour les marquages à la neurobiotine révèle que sur les 7 neurones marqués sur cette préparation, LP est le sixième neurone par ordre d'intensité décroissante. Sur les trois autres préparations, même si 9 à 12 neurones ont été marqués à la neurobiotine, LP reste toujours dépourvu de traceur (Fig. 20A3).

De même, sur quatre préparations, nous avons identifié IC (par injection de dextran-fluorescéine ou carte) et injecté un PD à la neurobiotine. Une seule préparation a montré un marquage

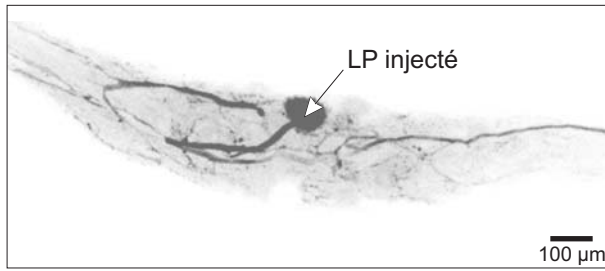
**Figure 19 : Les neurones exprimant au moins une innexine sont tous couplés métaboliquement et électriquement à un autre neurone du STG.** Lorsque les neurones qui expriment *Hg-inx 1* et *Hg-inx 2* sont injectés à la neurobiotine (A, têtes de flèches, les micrographies sont des projections maximales de 60 à 70 images confocales de 2,5  $\mu\text{m}$  chacune, sauf pour DG où il ne s'agit que d'une seule coupe optique.), d'autres neurones apparaissent marqués (astérisques). Le même résultat est observé lorsqu'un neurone n'exprimant que l'innexine 1 ou que l'innexine 2 est injecté avec la neurobiotine (B et C respectivement). De plus, ces mêmes neurones sont couplés électriquement car leur potentiel de membrane varie (à droite des projections maximales, moyenne de 10 traces, la barre verticale représente 2 mV, la barre horizontale représente 500 ms) lorsque du courant est injecté dans un neurone présynaptique précis (I, -20 nA). Les nombres en indice après PD, PY, IPSP, LPG et GM indiquent que l'injection de courant et la mesure de variation du voltage ont été réalisées dans deux neurones différents appartenant à un même groupe. Notons que lorsque le neurone DG est injecté à la neurobiotine, son corps cellulaire n'est en général pas marqué après révélation avec l'avidine-DCS (soma représenté par des pointillés).



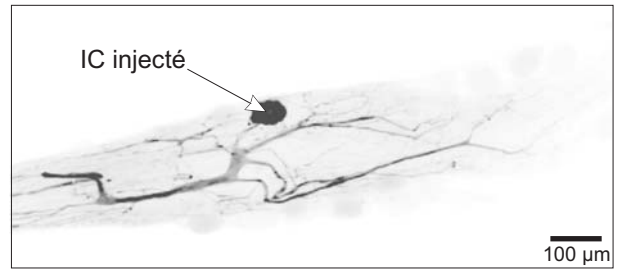
**Figure 20 : Couplage métabolique des neurones n'exprimant aucune innexine.** Lorsque les neurones LP et IC, qui n'expriment aucune des deux innexines, sont injectés à la neurobiotine, aucun autre neurone du STG n'est marqué (A1 et B1 respectivement, projections maximales de 46 et 37 coupes optiques de 3  $\mu\text{m}$ ). Sur 4 préparations dans lesquelles un neurone PY a été injecté à la neurobiotine et LP identifié par injection de dextran-fluorescéine ou par carte, le neurone LP est marqué à la neurobiotine dans une préparation (A2, projection maximale de 22 coupes optiques de 6  $\mu\text{m}$ ). Sur les 3 autres STG, il n'est pas marqué (A3, projection maximale de 24 coupes optiques de 6  $\mu\text{m}$ ). Sur 4 autres préparations, PD a été injecté à la neurobiotine et IC identifié par injection de dextran-fluorescéine ou carte. Le neurone IC a été trouvé marqué dans un STG (B2, projection maximale de 21 coupes optiques de 6  $\mu\text{m}$ ) et il est non marqué dans les 3 autres (B3, projection maximale de 24 coupes optiques de 6  $\mu\text{m}$ ). Les astérisques désignent les autres neurones du STG marqués à la neurobiotine quand le neurone d'intérêt est injecté.



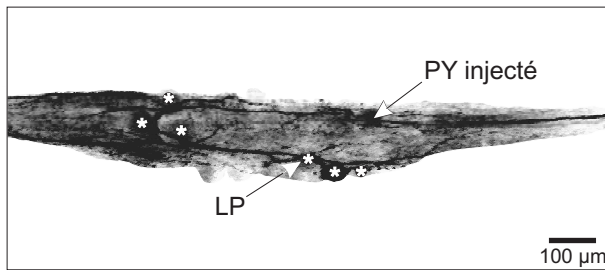
**A1**



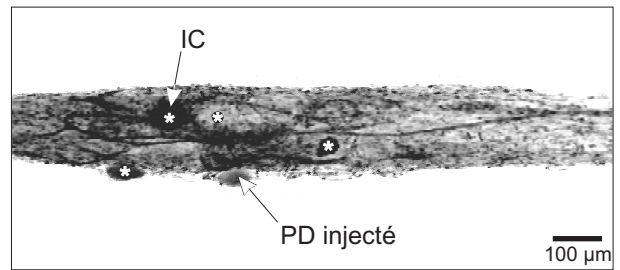
**B1**



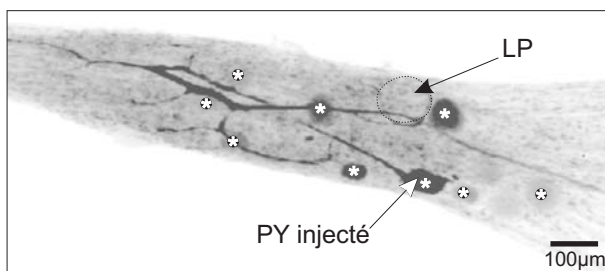
**A2**



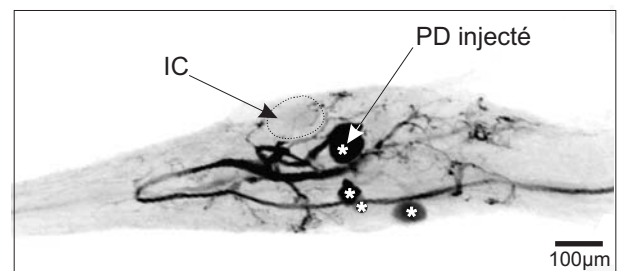
**B2**



**A3**



**B3**





à la neurobiotine dans IC (Fig. 20B2). Sur les 3 autres préparations, 4 à 7 neurones étaient toujours marqués, mais IC était toujours dépourvu de marquage (Fig. 20B3).

Les neurones LP et IC présentent donc un couplage métabolique rare avec PY et PD respectivement. De façon à confirmer la présence d'une synapse électrique entre PD et IC d'une part et PY et LP d'autre part, nous avons réalisé des mesures du coefficient de couplage entre ces neurones. Pour cela, après périfusion de liquide physiologique additionné de PTX et de TTX, un neurone PY ou PD (neurone présynaptique) est empalé avec deux électrodes pendant que LP ou IC (neurone postsynaptique) est empalé avec une unique microélectrode. Lorsqu'un courant positif ou négatif est injecté dans PY (Fig. 21A, I,  $\pm 20$  nA), nous observons une déflexion de même signe du potentiel de membrane dans LP ( $V_{LP}$ , moyenne de 10 traces pour les courants positifs et négatifs), ce qui indique que ces deux neurones sont électriquement couplés. La variation du potentiel de membrane de LP pour les injections de courants positifs et négatifs n'est pas symétrique. La courbe du voltage postsynaptique en fonction du voltage présynaptique confirme l'existence d'un couplage rectifiant sortant de PY vers LP, la synapse électrique unissant ces deux neurones ayant un faible mais significatif coefficient de couplage ( $8,5 \times 10^{-3} \pm 2,3 \times 10^{-3}$  pour les courants positifs).

De la même façon, lorsque du courant est injecté dans un neurone PD (Fig. 21B, I,  $\pm 20$  nA), le neurone IC voit son potentiel de membrane varier ( $V_{IC}$ , moyenne de 10 tracés). La courbe représentant les variations du potentiel postsynaptique en fonction des variations de potentiel présynaptique montre que le coefficient de couplage de PD vers IC est faible mais significatif ( $3,8 \times 10^{-3} \pm 1,1 \times 10^{-3}$  pour les courants négatifs) et qu'il est rectifiant entrant.

L'ensemble de ces résultats montre donc que, bien que LP et IC n'expriment pas d'innexine, ils présentent un faible couplage électrique rectifiant avec PY et PD respectivement et peuvent être occasionnellement couplés métaboliquement avec ces mêmes neurones.

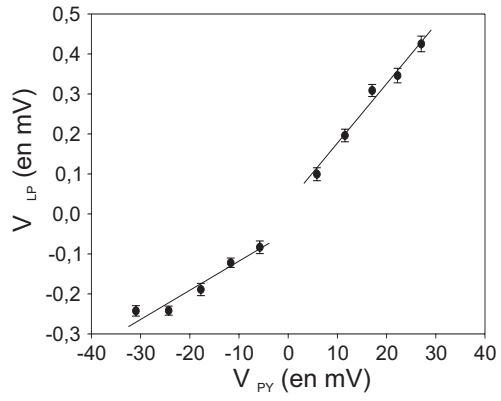
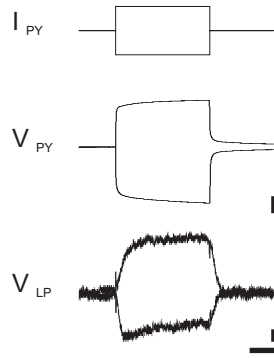
Il apparaît donc que les neurones exprimant très souvent une innexine, comme par exemple PD (en moyenne 80 % des PD identifiés expriment les innexines, voir Fig. 18B), sont fortement couplés électriquement (voir Fig. 12C) ainsi que métaboliquement (Fig. 10E). A l'inverse, les neurones n'exprimant pas d'innexine, présentent de très faibles couplages électriques et un couplage métabolique très occasionnel. L'occurrence d'expression des innexines pour un type neuronal donné, pourrait-elle être un bon indicateur de la force des couplages électriques et de la robustesse du couplage métabolique développées par ce type neuronal ?

#### 4- Corrélation entre l'expression des innexines et le couplage électrique et métabolique.

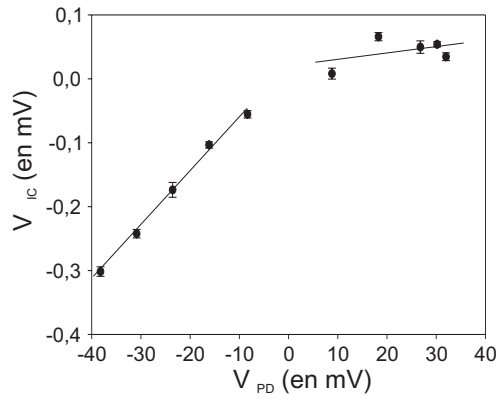
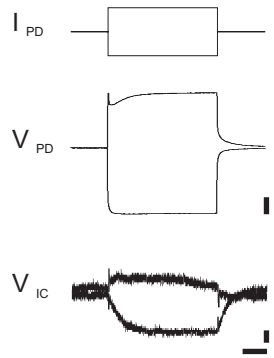
De façon à vérifier l'existence d'un lien entre la force des couplages électriques des neurones et leur pourcentage d'expression des innexines, nous avons corrélé le coefficient de couplage moyen mesuré pour l'injection de courants négatifs au sein d'une paire de neurones connus pour être

**Figure 21 : Les neurones n'exprimant aucune innexine présentent un faible coefficient de couplage électrique avec d'autres neurones du STG.** L'ensemble du SNST est d'abord périfusé avec du liquide physiologique additionné de TTX à  $10^{-6}$  M et de PTX à  $10^{-7}$  M. Lorsqu'un créneau de courant de -20 ou +20 nA est injecté dans un neurone PY (A,  $I_{PY}$ ), nous observons une variation du potentiel de membrane de ce neurone ( $V_{PY}$ , moyenne de 10 traces pour les courants négatifs et pour les courants positifs) ainsi que du neurone LP ( $V_{LP}$ , moyenne de 10 traces). La courbe représentant  $\Delta V_{LP}$  en fonction de  $\Delta V_{PY}$  permet de montrer l'existence d'un couplage rectifiant sortant de PY vers LP. De la même façon, des créneaux de courant de -20 et +20 nA ont été injectés dans un neurone PD (B,  $I_{PD}$ ) provoquant ainsi une déflexion du potentiel de membrane de PD ( $V_{PD}$ , moyenne de 10 traces) ainsi qu'une variation du potentiel membranaire de IC ( $V_{IC}$ , moyenne de 10 traces). La courbe représentant  $\Delta V_{IC}$  en fonction de  $\Delta V_{PD}$  permet de montrer l'existence d'un couplage rectifiant entrant de PD vers IC. Les barres verticales représentent 10 mV pour les enregistrements réalisés dans les neurones présynaptiques et 0,1 mV pour les enregistrements effectués dans les neurones postsynaptiques. La barre horizontale représente 100 ms.

**A**



**B**





électriquement couplés avec le pourcentage d'expression le plus faible de l'innexine 2 dans la paire de neurones considérée (Fig. 22A). Nous avons utilisé l'innexine 2 car elle est exprimée par un plus grand nombre de types neuronaux que l'innexine 1. De plus nous avons toujours retenu le pourcentage d'expression le plus faible au sein de la paire de neurones considérée car, si les innexines sont effectivement responsables de la formation des synapses électriques chez le homard, l'occurrence d'expression devrait être un facteur limitant pour la force du couplage électrique développé. Nous montrons que le coefficient de couplage et le taux d'expression de l'innexine 2 sont effectivement corrélés positivement ( $p < 0,05$ ,  $r^2 = 0,43$ ), ce qui suggère que les innexines sont liées au couplage électrique des neurones et que leur fréquence d'expression est un marqueur fiable de la force du coefficient de couplage électrique entre neurones.

Par ailleurs, nous avons constaté précédemment une variabilité parfois importante dans le dye-coupling, certains neurones n'étant couplés qu'occasionnellement voir rarement avec PD. Cette variabilité se retrouve dans l'expression des innexines, certains neurones les exprimant presque systématiquement, d'autres peu fréquemment. Là encore, nous montrons l'existence d'une corrélation positive entre l'occurrence du couplage métabolique des neurones du STG avec PD et le pourcentage le plus faible de l'expression de l'innexine 2 dans la paire considérée (Fig. 22B, PD-autre neurone dye-couplé,  $p < 0,05$ ,  $r^2 = 0,69$ ). Ce résultat indique que l'expression des innexines prédit la probabilité qu'à la neurobiotine de diffuser dans un neurone quand un de ses partenaires est injecté avec ce traceur.

Même si nous avons conscience des limites des corrélations que nous proposons, il semble que le taux d'expression des innexines soit étroitement lié à l'intensité des couplages électriques et métabolique entre les neurones du STG. En tout état de cause, cette méthode de détection des ARN<sub>m</sub> des innexines peut être utilisée pour étudier l'ensemble des synapses électriques dans le SNST.

## IV- Discussion

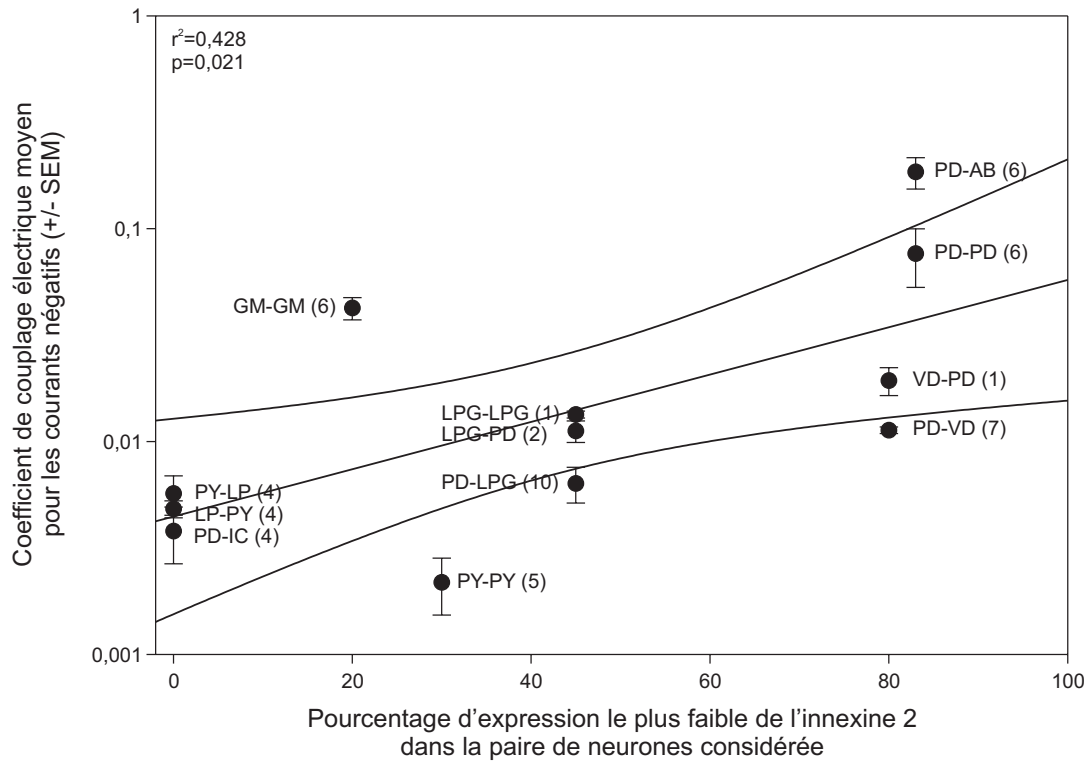
---

Dans ce chapitre, nous avons démontré que les neurones PD, contrairement à ce qui est communément admis, ne sont pas seulement couplés aux neurones pyloriques VD et AB, mais également à IC, et qu'ils établissent des interactions avec des neurones appartenant au réseau gastrique, LPG et DG ainsi qu'avec le neurone AM apparenté au réseau cardial. De plus, les techniques que nous avons utilisées permettent d'aborder la caractérisation des synapses électriques sous plusieurs angles. L'hybridation *in situ* avec les sondes *Hg-inx 1* et *Hg-inx 2* permet d'obtenir une vision d'ensemble de l'expression des innexines au sein des ganglions et donc un aperçu rapide et instantané du nombre de neurones potentiellement couplés. La diffusion de la neurobiotine permet de connaître rapidement l'ensemble des neurones couplés métaboliquement à un neurone déterminé.

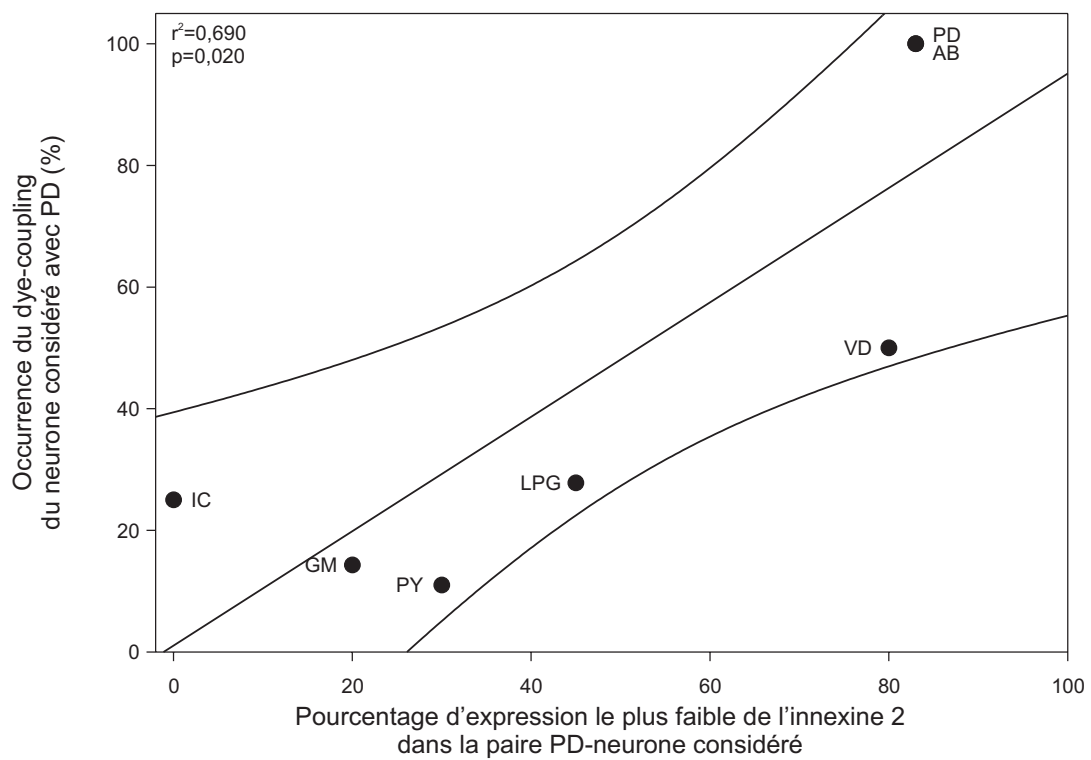
**Figure 22 : Le pourcentage d'expression de l'innexine 2 prédit l'étendue des couplages métaboliques et la force des couplages électriques.** De façon à vérifier le lien entre la force des couplages électriques et la fréquence d'expression de l'innexine 2, nous avons corrélé le coefficient de couplage de diverses paires de neurones avec le pourcentage d'expression le plus faible de l'innexine 2 dans chaque paire de neurones. Le coefficient de couplage est fortement corrélé au pourcentage d'expression de l'innexine 2 (A,  $p < 0,05$ ,  $r^2 = 0,69$ , le nombre entre parenthèses correspond au nombre de mesures de coefficient de couplage pour chaque paire). Nous avons également réalisé une corrélation entre l'occurrence du dye-coupling des neurones du STG avec PD et le pourcentage d'expression le plus faible de l'innexine 2 dans chaque paire PD-neurone considéré. Il existe une corrélation positive entre le pourcentage d'expression le plus faible de l'innexine 2 et l'occurrence du dye-coupling (B,  $p < 0,05$ ,  $r^2 = 0,43$ ).



**A**



**B**





Enfin, la mesure du coefficient de couplage permet de caractériser de façon précise la synapse électrique unissant deux neurones et de déterminer la force du couplage électrique ainsi que le type de couplage existant entre les deux neurones d'intérêt. Bien que permettant une analyse des couplages à différents niveaux, du plus global avec l'hybridation *in situ* au plus précis avec la mesure du coefficient de couplage, nous avons montré que les données issues de ces différentes techniques sont étroitement liées. Enfin, nous avons montré qu'un fort couplage électrique peut être supporté par un faible nombre d'appositions membranaires.

## 1- Comparaison des différentes techniques d'étude des jonctions gap et de leurs limites.

### *1.1- La diffusion de sondes.*

Nous avons, dans une première approche, utilisé la diffusion de la neurobiotine pour l'étude des couplages du neurone PD. Les résultats obtenus rendent compte du couplage métabolique du neurone considéré, la diffusion de la sonde étant censée mimer le passage de métabolites tels l'AMP<sub>c</sub> (Bedner et al., 2006; Bedner et al., 2003) ou l'IP<sub>3</sub> (Ayad et al., 2006; Clair et al., 2001; Kandler and Katz, 1998; Saez et al., 1989), molécules connues pour diffuser à travers les jonctions gap et assurer un couplage métabolique des cellules. Cependant, la diffusion de sonde est également un bon marqueur du couplage électrique puisque *Fan et al* (2005) ont montré que les neurones connus pour être électriquement couplés dans le système nerveux central de la sangsue sont également couplés métaboliquement. La diffusion de la neurobiotine leur a permis de mettre en évidence de nouvelles connections des neurones via les jonctions gap (ce point, retrouvé dans notre modèle, sera discuté ultérieurement). De plus, ces auteurs, en accord avec d'autres résultats obtenus sur le neurone latéral géant de l'écrevisse (Antonsen and Edwards, 2003), indiquent que la neurobiotine ne diffuse pas à travers les synapses électriques rectifiantes dans le sens laissant passer les courants négatifs.

Nous trouvons effectivement un lien très étroit entre couplage électrique et couplage métabolique, les valeurs de coefficient de couplage et d'occurrence du dye-coupling étant fortement corrélées. Il faut cependant noter que GM et PY présentent parfois du couplage métabolique et jamais de couplage électrique évident avec PD (ce dernier point est discuté dans le paragraphe 1.2). Par contre, nos résultats ne semblent pas être en adéquation concernant la diffusion de la neurobiotine à travers les synapses rectifiantes. En effet, alors que les synapses unissant PD à IC d'une part et PY à LP d'autre part sont rectifiantes dans deux sens différents (entrante et sortante respectivement), la neurobiotine semble pouvoir passer aussi bien de PD vers IC que de PY vers LP. De plus, la synapse électrique de PD vers AM et de PD vers VD laisse passer les courants négatifs plus facilement que les courants positifs mais la neurobiotine chargée positivement est capable de passer cette synapse dans plus de 50 % des préparations. Dans notre système, la force du couplage électrique est le principal



facteur permettant de prédire la fréquence de diffusion de la neurobiotine à travers une synapse électrique considérée alors que le caractère rectifiant de la synapse ne semble pas influencer sur le sens de la diffusion de la neurobiotine.

La diffusion de sondes à travers des jonctions gap connues pour être rectifiantes a déjà été mise en évidence quelque soit le sens de la rectification. En effet, la synapse électrique hétérotypique formée par la connexine 32 et la connexine 26 (Barrio et al., 1992; Suchyna et al., 1999) présente une asymétrie de sa conductance selon le signe de la différence de potentiel appliquée : la conductance est plus forte quand la cellule portant l'hémicanal formé par la connexine 26 est plus positive que celle portant la connexine 32 et diminue quand la différence de potentiel est inversée. Or, le jaune lucifer est capable de franchir les deux sens de telles synapses (Elfgang et al., 1995).

Ces apparentes contradictions dans la relation qui existe entre diffusion des molécules et propriétés électrophysiologiques des synapses électriques peuvent s'expliquer par la relation complexe qui existe entre différents facteurs impliqués dans le passage des courants électriques et des molécules. En effet, la charge de la molécule est importante (Cao et al., 1998), ainsi que sa taille (Gong and Nicholson, 2001), mais il faut également tenir compte de la jonction gap elle-même. Les connexines ou innexines qui la constituent présentent des répartitions de charges variées et la taille du pore va également déterminer les molécules et les ions susceptibles de diffuser. Il est donc important de bien caractériser ces relations dans le modèle utilisé. En effet, la composition des synapses électriques peut différer grandement, notamment entre vertébrés possédant des connexines et invertébrés utilisant des innexines et, par conséquent, le lien existant entre couplage métabolique et couplage électrique est lui-même susceptible de varier de manière importante.

Nous avons également remarqué que pour certains types neuronaux un couplage métabolique fréquent existe avec le neurone PD mais que tous les membres de ce groupe neuronal ne sont pas marqués. Les neurones LPG, par exemple, ont une occurrence de couplage métabolique avec PD de 28 % alors que seule une préparation sur les quatre où ces neurones sont marqués présente du marquage à la neurobiotine dans les deux LPG. Ce résultat est particulièrement étonnant si nous considérons que les deux LPG ont un couplage électrique statistiquement significatif avec PD dans 90 % des cas et que la mesure du coefficient de couplage entre PD et les deux LPG d'une même préparation a été effectuée, montrant que les deux LPG sont électriquement couplés. Pour expliquer une telle différence entre les résultats obtenus pour le couplage électrique et le couplage métabolique, il faut envisager qu'une faible quantité de la sonde parvienne à ces neurones et que la taille des LPG étant importante, la concentration de la sonde dans ces neurones soit parfois insuffisante pour émettre une fluorescence après traitement à l'avidine-DCS supérieure au bruit de fond.



1.2- La mesure des coefficients de couplage.

Nous avons, dans un deuxième temps, utilisé la mesure du coefficient de couplage pour caractériser les synapses électriques. Cette technique, bien que permettant une analyse précise des propriétés électrophysiologiques de la synapse considérée, oblige l'expérimentateur à s'adresser à deux neurones en particulier. Ainsi, la cartographie des synapses électriques par cette méthode est un travail long et une vision de l'ensemble des couplages d'un neurone est difficile à obtenir. De plus, la technique de double électrode entraîne des lésions non négligeables du neurone ainsi empalé, même si les électrodes sont disposées de façon à être le plus éloignées possible et à limiter les dommages sur le neurone d'intérêt. Par conséquent, des neurones présentant un très faible couplage électrique avec le neurone PD pourraient ne pas apparaître couplés en utilisant cette technique. En effet, les lésions dues à l'empalement vont provoquer une diminution de la résistance d'entrée du neurone et une augmentation des courants de fuite. Ce phénomène a pour conséquence de diminuer la quantité de courant électrique arrivant au niveau de la synapse électrique et donc les variations de potentiel dans le neurone postsynaptique seront moins grandes. Cette altération de la résistance d'entrée pourrait expliquer que des neurones couplés à la neurobiotine avec PD, comme PY et GM, ne présentent pas de couplage électrique alors que PD et PY sont couplés dans d'autres espèces de décapode comme *Jasus lalandii* (Nagy, 1981). Ceci pourrait également expliquer les différences de coefficient de couplage enregistrées pour une même paire de neurones entre différents STG, notamment visibles dans les SEM de ces mesures (voir Fig. 12B). En effet, les neurones ayant des positions au sein du STG, et parfois des tailles, changeantes d'une préparation à l'autre, ils ne sont pas accessibles de la même façon et donc la position des électrodes est susceptible d'être différente, entraînant des dommages variables du neurone.

Nous avons par ailleurs constaté qu'un certain nombre de synapses caractérisées dans ce système présentent une forte rectification entrante. On peut se demander dans quelle mesure cette rectification ne constitue pas un artefact dû à la méthode utilisée. En effet, quand des courants positifs sont injectés dans un neurone PD, la résistance d'entrée de ce dernier chute (voir Fig. 3C1) du fait de l'ouverture de canaux voltage-dépendants. Le courant injecté est alors moins à même d'atteindre les sites des jonctions gap et donc moins à même de provoquer une variation de potentiel dans le neurone postsynaptique (effet de shunt). Ceci pourrait expliquer la rectification observée pour les valeurs de courant positives. Cependant, dans le cadre de cette hypothèse, la totalité des synapses unissant PD à un autre neurone présenterait une rectification entrante ce qui n'est pas le cas (rectification sortante pour PD-AB, linéaire pour PD-PD, PD-DG, PD-LPG). Ainsi, les variations de résistance d'entrée observées pour les injections de courants positifs semblent peu influencer sur les caractéristiques du couplage électrique.





En outre, il faut signaler que les mesures n'ont pas été faites sur des paires de neurones isolées. En effet, lorsque des mesures de couplage sont faites entre deux neurones, alors que leurs partenaires électriquement couplés sont encore vivants, une partie du courant injecté dans le neurone présynaptique et parvenant au neurone postsynaptique est susceptible de passer par les autres neurones couplés à la paire considérée. Nous avons ainsi remarqué que lorsque le neurone AB est tué par photo-ablation, le couplage entre les neurones PD diminue de plus de 60 %. Nous n'avons pas réalisé nos expériences sur paires de neurones isolées d'abord pour des raisons techniques. Dans l'absolu, un tel protocole nécessite de tuer 33 neurones dans un STG pour n'en conserver que 2 ce qui d'une part est très long et d'autre part nécessite d'utiliser un grand nombre de préparations. De plus, la photo-ablation provoque la libération de radicaux libres qui ont tendance à diffuser dans le liquide physiologique et provoquer la mort de l'ensemble des cellules de la préparation. Par ailleurs, la mesure des coefficients de couplage dans une préparation dans laquelle l'ensemble des neurones est vivant permet de caractériser la force globale (couplage direct et indirect) et non pas seulement la force du couplage direct entre deux neurones. Ainsi, cette analyse correspond davantage aux conditions trouvées dans l'animal intact et les caractéristiques mises en avant par ce type d'étude sont plus proches des conditions physiologiques.

### 1.3- L'hybridation *in situ*.

La troisième méthode utilisée dans ce travail pour étudier le couplage des neurones consiste à observer par hybridation *in situ* l'expression des gènes codant pour les innexines. La présence dans les innexines de homard des quatre domaines transmembranaires, caractéristiques de la topographie des connexines (Goodenough et al., 1996; Saez et al., 2003) et des innexines (Panchin, 2000), ainsi que de quatre cystéines, nécessaires à l'appariement des connexons de deux cellules et donc à la formation de la jonction gap (Dahl et al., 1991; Dahl et al., 1992), suggèrent que les protéines codées par les gènes *Hg-inx 1* et *Hg-inx 2* sont impliquées dans la formation des synapses électriques. Toutefois aucune preuve directe de l'implication des protéines codées par *Hg-inx 1* et *Hg-inx 2* dans la formation des synapses électriques n'a été apportée à ce jour.

Nos travaux amènent un faisceau d'arguments complémentaires supportant cette hypothèse. Nous avons démontré que les neurones exprimant au moins une innexine sont tous électriquement et métaboliquement couplés alors que les neurones n'exprimant aucune des deux innexines, LP et IC, présentent un couplage métabolique unidirectionnel rare et de très faibles coefficients de couplage électrique. De plus, la fréquence d'expression de l'innexine 2 est fortement corrélée à la force des couplages électriques et à la fréquence du dye-coupling avec le neurone PD. Nous pouvons émettre l'hypothèse que, plus un neurone apparaît fréquemment marqué, plus il exprime des taux élevés d'ARN<sub>m</sub> et donc plus il exprime de protéines, ceci conduisant à un fort couplage électrique. Chacune



de ces relations de causalité peut-être discutée. Par exemple, de nombreuses régulations post-transcriptionnelles peuvent modifier la quantité de protéines formées à partir du même nombre d'ARN<sub>m</sub> dans les neurones et donc le niveau d'expression de l'ARN<sub>m</sub> ne reflète pas celui de la protéine (Daly and Ziff, 1997; Irace et al., 2005; Piri et al., 2003). D'autre part, des variations dans la stabilité de la protéine synthétisée peuvent influencer grandement le phénotype finalement observé, ici la force du couplage. Enfin, ce dernier est fortement dépendant des propriétés électrotoniques des neurones considérés. Toutefois, des expériences réalisées sur des astrocytes en culture montrent une forte relation entre le niveau de l'ARN<sub>m</sub> de la connexine 43, la quantité de protéine et la perméabilité des jonctions gap (Batter et al., 1992; Blomstrand et al., 1999). Notre approche en hybridation *in situ*, consistant à identifier les cellules des réseaux exprimant ou n'exprimant pas les innexines, ne nous permet pas de quantifier les niveaux d'ARN<sub>m</sub> pour chacun des neurones. Il est cependant possible d'imaginer que les ARN<sub>m</sub> ne sont transcrits que très transitoirement, lorsqu'un renouvellement des innexines est nécessaire. Cette hypothèse expliquerait la grande hétérogénéité (absence ou présence) de marquage observée au niveau de neurones homologues tels les GM, PY, LPG et PD. Ainsi, un neurone non marqué pourrait exprimer des innexines. Dans le cadre de cette hypothèse, les neurones les plus fortement couplés et donc exprimant le plus d'innexines nécessitent un renouvellement plus fréquent de leurs innexines, ce qui accroît la probabilité de les observer comme marqués en hybridation *in situ*.

On notera que le critère permettant de déterminer si un neurone exprime ou non une innexine est un marquage dense autour du noyau, correspondant probablement aux transcrits localisés au niveau du reticulum endoplasmique granuleux et donc en voie de traduction.

En effet, il est probable que les innexines aient une durée de vie assez longue. Des expériences sur la drosophile (Curtin et al., 2002) montrent que la durée de vie des innexines est d'environ 6 heures et il est possible qu'elle soit plus longue chez les homards qui vivent dans des eaux froides, permettant aux cellules de ne pas renouveler fréquemment les protéines formant les synapses électriques.

Enfin, un seuil de détection trop élevé peut également rendre compte de l'absence d'expression des innexines dans des neurones faiblement couplés, et donc exprimant peu les transcrits des innexines. Ceci pourrait expliquer pourquoi les neurones LP et IC ne présentent jamais d'ARN<sub>m</sub> pour les innexines alors qu'ils sont électriquement couplés de façon systématique mais faiblement avec PY et PD respectivement. L'utilisation des techniques de détection plus sensibles, comme la RT-PCR sur cellule unique, permettrait d'apporter une réponse définitive sur la présence ou non d'ARN<sub>m</sub> pour *Hg-inx 1* et *Hg-inx 2* dans ces neurones.



## 1.4- Conclusions et perspectives.

La confrontation des résultats obtenus par les différentes techniques que nous avons utilisées au cours de ce travail indique que les trois indicateurs utilisés pour la détermination et la caractérisation d'une synapse électrique, la diffusion d'une sonde, le passage de courants électriques ou l'expression d'ARN<sub>m</sub> codant pour les innexines, sont complémentaires et convergentes. En effet, la mesure du coefficient de couplage, même si elle permet de déterminer avec précision les caractéristiques du couplage électrique entre deux neurones particuliers, ne permet pas d'avoir une vue d'ensemble des couplages électriques élaborés par un neurone. Ce dernier point est plutôt adressé par le dye-coupling qui permet de connaître l'ensemble des partenaires couplés à un neurone et de déterminer ainsi le réseau de neurones interconnectés par des synapses électriques formé à partir de ce neurone d'intérêt. L'hybridation *in situ* visant à détecter la présence des ARN<sub>m</sub> codant pour les innexines nous donne une idée des neurones susceptibles de former des synapses électriques sur l'ensemble d'un système nerveux.

De plus, comme dans notre système la diffusion de la neurobiotine ne semble pas dépendre du sens de rectification des synapses, la fréquence du couplage métabolique est un bon indicateur de la force du couplage électrique. Par ailleurs, les corrélations positives existant entre le coefficient de couplage, l'occurrence du couplage métabolique et la fréquence d'expression de l'innexine 2 tendent à montrer que l'un de ces facteurs suffit à prédire les deux autres.

Plusieurs points restent néanmoins en suspens. En effet, nous n'apportons pas d'éléments permettant de déterminer si le caractère rectifiant ou linéaire d'une synapse électrique est conditionné par l'expression de deux innexines différentes dans les deux neurones. En première analyse, nous ne pouvons pas démontrer une répartition différentielle de l'expression des deux innexines en fonction du type du couplage établi par les neurones du STG. Les deux neurones PD, par exemple, expriment fréquemment les deux innexines comme le neurone VD, mais le coefficient de couplage entre les neurones PD est linéaire alors qu'il est rectifiant entre PD et VD. Il est cependant possible que le neurone VD établisse des synapses électriques non rectifiantes avec d'autres neurones du STG et que les protéines codées par *Hg-inx 1* et *Hg-inx 2* aient une localisation cellulaire différente, l'une d'entre elles permettant la mise en place de synapses rectifiantes et l'autre, des synapses non rectifiantes. En outre, l'expression d'innexines différentes dans deux neurones unis par une synapse électrique n'est pas une condition nécessaire à l'établissement d'une synapse rectifiante. En effet, si des travaux utilisant des systèmes d'expression hétérologue ont permis de démontrer que l'expression de deux types différents d'innexines de part et d'autre de la jonction gap permet la mise en place d'une synapse électrique rectifiante (Dykes et al., 2004), ces mêmes travaux montrent qu'un seul type d'innexine suffit à établir des synapses fortement rectifiantes. Dans ces conditions, on peut envisager, chez le



homard, que les propriétés de rectification d'une synapse soient liées davantage aux propriétés intrinsèques des innexines qu'à la composition en innexines de la jonction gap.

Bien évidemment, on ne peut pas exclure l'existence d'autres innexines, chez le homard, dont l'expression différente de part et d'autre d'une synapse électrique permettrait la rectification. Par ailleurs, l'existence d'autres innexines permettrait d'expliquer la raison pour laquelle des neurones comme LP et IC qui n'expriment jamais les innexines 1 et 2 présentent un faible couplage électrique et un rare couplage métabolique. La drosophile possède au moins 7 gènes codant pour les innexines et exprimés par les neurones (Stebbins et al., 2002) et *C. elegans* environ 6 (Starich et al., 2001). Il est donc probable que le homard en possède plus de deux.

## 2- Rôles des synapses électriques du neurone PD.

Nous avons montré au cours de ce travail, que le neurone PD établit des interactions à travers les synapses électriques avec des neurones provenant de l'ensemble des réseaux du SNST. En effet, outre le couplage avec des neurones pyloriques (AB, PD, VD, IC), nous avons mis en évidence l'existence de synapses électriques avec des neurones gastriques (LPG, DG) et un neurone appartenant au réseau cardinal (AM). Nous n'avons pas pu mettre en évidence de synapses électriques entre PD et les neurones œsophagiens du STG (les quatre IPSP). Les neurones électriquement couplés à PD présentent tous une très forte modulation pylorique puisque les neurones DG et LPG présentent des oscillations de leur potentiel de membrane de type gastrique mais émettent des bouffées de potentiels d'action sur un rythme pylorique. Le neurone AM a une activité caractéristique du rythme pylorique, en phase avec le neurone VD. On ne peut pas exclure que cette modulation pylorique soit la conséquence du fonctionnement des synapses électriques de PD vers les neurones considérés. En effet, les courants hyperpolarisants qui passent efficacement de PD vers l'ensemble de ses partenaires peuvent repolariser rythmiquement ces différentes cellules leur conférant ainsi une activité de type pylorique. Cependant, une telle modulation peut être tout aussi bien médiée par des synapses chimiques. Pour préciser le rôle des synapses électriques du neurone PD dans cette modulation de type pylorique, il serait nécessaire de procéder au blocage de ces synapses via des substances telles la carbénoxolone (par exemple, Winmill and Hedrick, 2003; Yang and Michelson, 2001), l'octanol (par exemple Froes et al., 1999; Rami et al., 2001; Shinohara et al., 2000a) ou l'halothane (par exemple Shinohara et al., 2000a ; Shinohara et al., 2000b) connues pour inhiber la communication à travers les jonctions gap. Cependant, ces substances présentent de très nombreux effets secondaires sur notre préparation (très forte dépolarisation, arrêt total des activités rythmiques) et il n'existe pas de preuves que ces substances agissent spécifiquement sur les jonctions gap des invertébrés.

Des études récentes ont montré que la densité et les combinaisons de canaux ioniques exprimés par un type neuronal donné (PD, LP) peuvent varier considérablement d'une préparation à l'autre





(Schulz et al., 2006). Or, des études de modélisation ont permis de montrer que plusieurs combinaisons distinctes de propriétés membranaires et de forces synaptiques permettent de produire un même patron d'activité (Prinz et al., 2004). Nous trouvons que les neurones métaboliquement couplés à PD, ainsi que les valeurs de coefficient de couplage, varient d'une préparation à l'autre. Dans ces conditions il est possible d'envisager que le neurone PD sera plus ou moins influencé par les conductances exprimées par les autres cellules. Ainsi, les conductances des neurones couplés à PD pourraient plus ou moins participer, via les jonctions gap, à l'établissement des caractéristiques électrophysiologiques de PD. Les conductances seraient ainsi réparties au sein du réseau de neurones électriquement couplés et non plus seulement au sein de l'arborisation dendritique d'un neurone.

La présence de synapses rectifiantes ou linéaires entre PD et les autres neurones du STG est intéressante à plusieurs titres. Tout d'abord, les synapses qu'établit le neurone PD avec les neurones gastriques (LPG et LPG) sont linéaires, ce qui veut dire que l'influence de PD s'exerce à tout moment sur ces neurones. Ensuite, au sein du réseau pylorique, PD établit des synapses rectifiantes entrantes avec le neurone qu'il inhibe chimiquement (IC) et avec celui inhibé par AB (VD). Cette rectification permet le passage préférentiel du courant lorsque PD est plus hyperpolarisé que VD et IC et le limite lorsque PD est plus dépolarisé que ces deux neurones. Dans sa phase dépolarisée, le neurone PD peut donc inhiber chimiquement ses partenaires sans que le courant transjonctionnel, lié à la forte différence de potentiel existant de part et d'autre de la synapse électrique, ne vienne contrecarrer cette action. Dans sa phase hyperpolarisée, la synapse chimique est inactive mais PD peut continuer d'inhiber VD et IC via les synapses électriques unissant ces neurones.

### 3- Caractérisation morphologique des synapses électriques entre les neurones PD.

Nous avons montré que deux neurones électriquement et métaboliquement couplés, les neurones PD, établissent un faible nombre de zones d'apposition membranaire, zones potentielles de localisation des synapses électriques entre ces neurones, comme cela a été observé chez l'écrevisse (el Manira and Clarac, 1994) ou la lamproie (Christensen, 1983). Ceci peut paraître étonnant au premier abord, car ces deux neurones étant fortement couplés électriquement, nous pourrions nous attendre à ce qu'ils présentent de nombreux sites d'interaction. Cependant, ce type de résultats a été montré pour les synapses chimiques pour lesquelles peu de sites de libérations du neurotransmetteur sont en général observés entre les neurones pré et postsynaptique. Les cellules pyramidales des réseaux hippocampiques, par exemple, réalisent une unique zone de contact responsable de la libération de neurotransmetteurs avec leurs cellules cibles (Gulyas et al., 1993). De faibles nombres de zones d'interactions synaptiques ont été retrouvées entre cellules pyramidales et interneurons dans le cortex visuel du chat (Buhl et al., 1997; Tamas et al., 1997) et suggérées entre cellules réceptrices et neurones de projection uniglomérulaires chez la blatte (Distler and Boeckh, 1997). Finalement, deux zones



d'apposition ont été trouvées entre les neurones LP et un neurone PD dans des zones restreintes de leur arborisation, correspondant chacune à des sites de libération des neurotransmetteurs (Cabirol-Pol et al., 2002). La nécessité d'un faible nombre d'apposition pour établir de fortes relations synaptiques électriques peut s'expliquer par le fait que les courants générés par les propriétés membranaires des neurones peuvent se propager jusqu'aux terminaisons, sans beaucoup d'atténuation (Golowasch, 1990). Ainsi, les courants générés par un PD n'ont pas besoin de nombreux sites de jonctions électriques pour être transmis à l'autre PD et la présence d'un faible nombre de synapses électriques permet au neurone de conserver une résistance d'entrée importante en limitant les courants de fuite par les jonctions gap.

Cependant, nos zones d'apposition ne correspondent pas nécessairement à des synapses électriques et il est très probable que nous surestimons leur nombre dans la présente étude. En effet, chacune des appositions membranaires visualisées ici correspond à une zone où les deux membranes sont distantes de moins de 0,3  $\mu\text{m}$ . Or, la réalisation d'une jonction gap nécessite un rapprochement des membranes inférieur à 3 nm (Benedetti and Emmelot, 1965; Goodenough and Revel, 1970; Revel and Karnovsky, 1967), soit une résolution bien supérieure à celle qu'il est possible d'obtenir en microscopie confocale. Pour confirmer la présence de jonctions gap il aurait été nécessaire de combiner l'approche par microscopie confocale avec une étude en microscopie électronique. Le protocole pour réaliser ce type de travail a été mis au point au laboratoire (Cabirol-Pol, 1998) et consiste en l'injection de jaune lucifer dans un neurone et d'un mélange de dextran-rhodamine et de peroxydase de raifort (HRP) dans l'autre. Les préparations sont observées au microscope confocal puis fixées. La HRP est ensuite révélée par la diaminobenzidène (DAB) puis, après traitement des STG pour la microscopie électronique, des coupes ultrafines sériées sont réalisées et un soin tout particulier est apporté aux parties du ganglion présentant les zones d'apposition. Le jaune lucifer est enfin révélé grâce à un anticorps couplé à des billes d'or puis les coupes sont observées. Ce type de protocole s'est révélé particulièrement adapté pour observer la synapse chimique entre LP et PY car d'une part les structures propres à cette synapse sont aisément identifiables (présence de vésicules synaptiques dans le compartiment présynaptique) et d'autre part la localisation de cette synapse au sein du STG était connue permettant de réaliser des coupes ultrafines sur une portion restreinte du STG. Dans le cas des synapses électriques, seul un rapprochement des membranes plasmiques des deux neurones est observable en microscopie électronique à transmission avec une bande dense aux électrons entre les membranes plasmiques des deux cellules (Revel and Karnovsky, 1967; Saez et al., 2003). D'autre part, l'absence de localisation préférentielle au sein du STG des synapses électriques nous aurait conduit à sectionner l'ensemble du STG.

Une autre approche aurait été de réaliser des triples marquages en microscopie confocale permettant de montrer la présence des innexines détectées par immunocytochimie au niveau de certaines zones d'apposition membranaire. Nous noterons qu'au sein du laboratoire aucun des



anticorps anti-innexines testés (anti-innexine 2 de drosophile et anti-shaking B neural de drosophile) n'ont donné de résultats sur notre modèle.

Une étude menée sur la moelle épinière de la lamproie a montré que les interneurons géants établissent peu de synapses électriques avec le neurone  $I_2$  et que ces synapses ne présentent pas de localisation particulière, la distance entre les jonctions gap et l'origine de l'arborisation n'étant pas constante (Christensen, 1983). Ces auteurs montrent cependant que la distance électrotonique avec l'origine de l'arbre dendritique est beaucoup plus conservée, assurant ainsi une même atténuation du signal entre les différentes entrées synaptiques.

Ainsi, dans les interactions entre PD via les jonctions gap, ce n'est pas la distance entre la synapse électrique et le soma ou l'ordre de la branche supportant la jonction gap qui sont primordiales mais plutôt la distance électrotonique des synapses électriques avec une zone particulièrement importante dans l'activité des neurones comme, par exemple, la zone de genèse des oscillations du potentiel de membrane ou la zone d'initiation des potentiels d'action. Dans ce cas, toutes les modifications du potentiel de membrane initiées par cette zone seront simultanément transmises au second PD, à plusieurs endroits de son arborisation, permettant une synchronisation immédiate de ces deux neurones sur l'ensemble de leurs branches. Pour vérifier la validité de ces hypothèses une étude par modélisation informatique est nécessaire en utilisant les données issues de nos reconstructions et les modèles de conductances déjà existants pour les neurones du STG. En modifiant la position des synapses électriques nous serons en mesure d'observer l'importance de leur localisation dans l'activité des neurones PD.



## *Chapitre 3*

*Modulation des synapses électriques chez l'adulte : effets de l'histamine et de la mise en jeu de neurones histaminergiques impliqués dans la reconfiguration des réseaux*

*En essayant continuellement on finit par réussir. Donc : plus ça rate, plus on a de chance que ça marche.  
Jacques Rouxel*





## I- Introduction.

---

Nous nous sommes attachés, dans le chapitre précédent, à caractériser les synapses électriques au sein du STG par différentes approches méthodologiques en nous intéressant particulièrement aux couplages que le neurone PD établit avec les autres neurones du STG.

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à déterminer le rôle que pourraient jouer les synapses électriques dans l'expression des différents réseaux du SNST adulte. Il est maintenant bien établi que ces réseaux peuvent exprimer un large éventail d'activités motrices distinctes, l'expression de chaque activité motrice étant contrôlée par la mise en jeu d'une ou plusieurs afférences modulatrices selon un patron d'activité spécifique (Blitz et al., 1999; Blitz and Nusbaum, 1997; Faumont, 1999; Meyrand et al., 2000; Meyrand et al., 1991; Nagy and Cardi, 1994). Les répercussions d'une altération des propriétés membranaires (Cazalets et al., 1990b) ou de la force des synapses chimiques (Faumont et al., 2005) par des neurones modulateurs et leurs substances neuromodulatrices ont été bien étudiées. Par contre les éventuelles répercussions d'une modulation de la force des synapses électriques sur l'activité produite par les réseaux ont été, à notre connaissance, très peu étudiées par des approches physiologiques. Or, des travaux réalisés sur des préparations adultes de vertébrés (McMahon and Brown, 1994; McMahon et al., 1989; Shinohara et al., 2000b) et d'invertébrés (Johnson et al., 1993; Johnson et al., 1994) montrent l'existence d'une modulation des synapses électriques.

Le SNST, de part la bonne connaissance du système neuromodulateur et le faible nombre de neurones constituant ce dernier (environ 40, Le Feuvre et al., 2001), constitue un modèle de choix pour tester l'importance de la modulation des synapses électriques par les neurones modulateurs dans la plasticité d'expression des réseaux.

Parmi les neurones modulateurs, la paire de neurones PS est capable de reconfigurer à long terme les deux réseaux du STG, les réseaux pylorique et gastrique, en un réseau unique (voir Fig. 7, Meyrand et al., 1991; Meyrand et al., 1994). Cette reconfiguration passe par la mise sous silence de certains neurones, comme LP, la modification des propriétés membranaires d'autres neurones, tels LP et PD qui voient leurs propriétés oscillatoires fortement altérées (Cazalets et al., 1990b) et enfin des modifications des connections synaptiques, comme la synapse chimique de MG vers PD et AB qui est potentialisée (Faumont et al., 2005). Par ailleurs, cette paire de neurones est aisément stimuable en plaçant deux électrodes extracellulaires sur le nerf contenant ces neurones, l'*ivn* (Cazalets et al., 1990a).

Nous disposons donc d'un modèle de reconfiguration des réseaux bien caractérisé dans lequel le rôle des synapses électriques n'a jamais été étudié. Nous avons donc cherché à caractériser une éventuelle modulation des synapses électriques lors de l'activation des neurones PS et à dégager une



implication fonctionnelle de cette modulation. Nous nous sommes, dans un premier temps, focalisés sur la synapse électrique unissant les deux PD, ceux-ci étant une cible directe des neurones PS (Cazalets et al., 1990b; Faumont, 1999) puis, dans la mesure du possible, nous avons cherché à étendre ces résultats à d'autres paires de neurones (notamment PD-DG et PD-LPG). Nous avons ainsi caractérisé les effets des neurones PS sur la résistance d'entrée et le coefficient de couplage des neurones PD. Puis, nous avons identifié le principal neuromédiateur responsable des effets de PS, l'histamine, et par application exogène de ce neurotransmetteur, nous avons étudié ses effets sur le couplage électrique et métabolique de PD ainsi que sur le couplage d'autres paires de neurones. Ensuite, nous avons localisé les synapses histaminergiques sur le neurone PD puis nous avons décrit le système histaminergique chez l'adulte.

## II- Caractérisation de l'action des neurones modulateurs PS sur les couplages électriques entre les neurones PD.

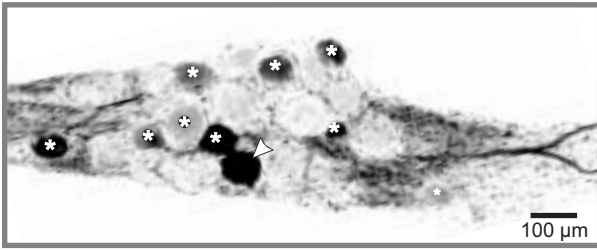
---

---

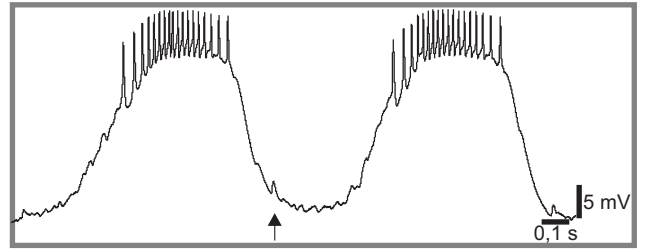
Nous avons vu dans le chapitre précédent que le nombre de neurones présentant un couplage métabolique avec PD est très variable (4 à 11 neurones, Fig. 9C). Pour expliquer cette variabilité, nous avons cherché à établir une relation entre le nombre de neurones couplés métaboliquement à PD dans une expérience donnée et l'activité des neurones PS au cours de cette même expérience. Les neurones PS n'ayant pas été enregistrés au cours de ces expériences, nous avons utilisé la fréquence moyenne des PPSE produits par PS sur les neurones PD comme indicateur de l'activité de PS. Nous avons constaté que les préparations pour lesquelles un grand nombre de neurones sont métaboliquement couplés à PD (Fig. 23A1, astérisques, 10 neurones marqués), peu de PPSE dus à PS sont visibles sur les enregistrements électrophysiologiques du PD injecté (Fig. 23B1, flèche noire, un PPSE visible sur un cycle) alors que les STG pour lesquels peu de neurones sont marqués à la neurobiotine (Fig. 23A2, 6 neurones marqués) présentent davantage de PPSE (Fig. 23B2, flèches noires, cinq PPSE sur un cycle). Nous avons mis en évidence l'existence d'une corrélation négative entre le nombre de cellules marquées à la neurobiotine et la fréquence des PPSE dus à PS enregistrés dans PD (Fig. 23C,  $p < 0,05$ ,  $r^2 = 0,41$ ). Ainsi, il apparaît que plus un neurone PD reçoit d'informations synaptiques excitatrices des neurones PS, moins il compte de partenaires métaboliquement couplés. Ceci suggère donc que les neurones PS sont capables de moduler l'importance des couplages métaboliques et/ou électriques de PD. Pour vérifier cette hypothèse, les effets d'une stimulation directe des neurones PS sur le couplage entre les deux neurones PD ont été testés. Afin de faciliter la mesure des résistances d'entrée et des coefficients de couplage entre neurones, les expériences ont été réalisées en eau de mer artificielle (EMA) de façon à ralentir le rythme pylorique et permettre d'appliquer des créneaux de courant dans les neurones PD. Les neurones PS ont ensuite été stimulés avec des électrodes extracellulaires placées

**Figure 23 : La fréquence de la décharge des neurones PS est corrélée au nombre de neurones dye-couplés avec PD.** Lorsqu'un neurone PD est injecté (têtes de flèche blanches) avec de la neurobiotine, un nombre variable de cellules sont marquées (astérisques). Les projections maximales de deux STG montrent ici 9 (A1) et 5 (A2) neurones marqués en plus du neurone injecté. Sur les enregistrements de ces mêmes préparations, on note une nette différence de l'activité de PS. En effet, dans le PD correspondant au STG présenté en A1, peu de PPSE sont visibles (B1, flèche) alors que dans le second, PS est très actif (B2, flèches). Sur les 13 préparations ainsi analysées, nous avons pu mettre en évidence une corrélation négative (C,  $p < 0,05$ ,  $r^2 = 0,41$ ) entre la fréquence des PPSE de PS et le nombre de neurones marqués à la neurobiotine après son injection dans un PD. Le point gris foncé correspond à la préparation A1 et celui en gris clair à la préparation A2.

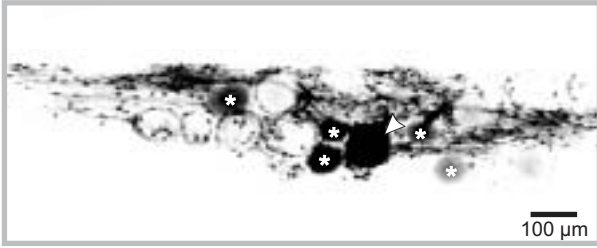
A1



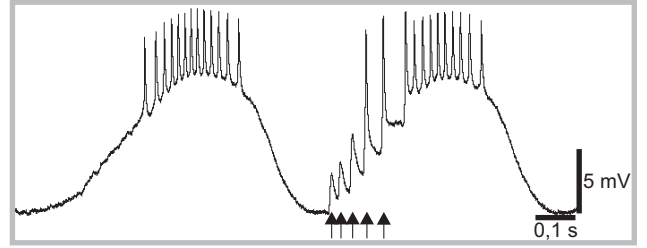
B1



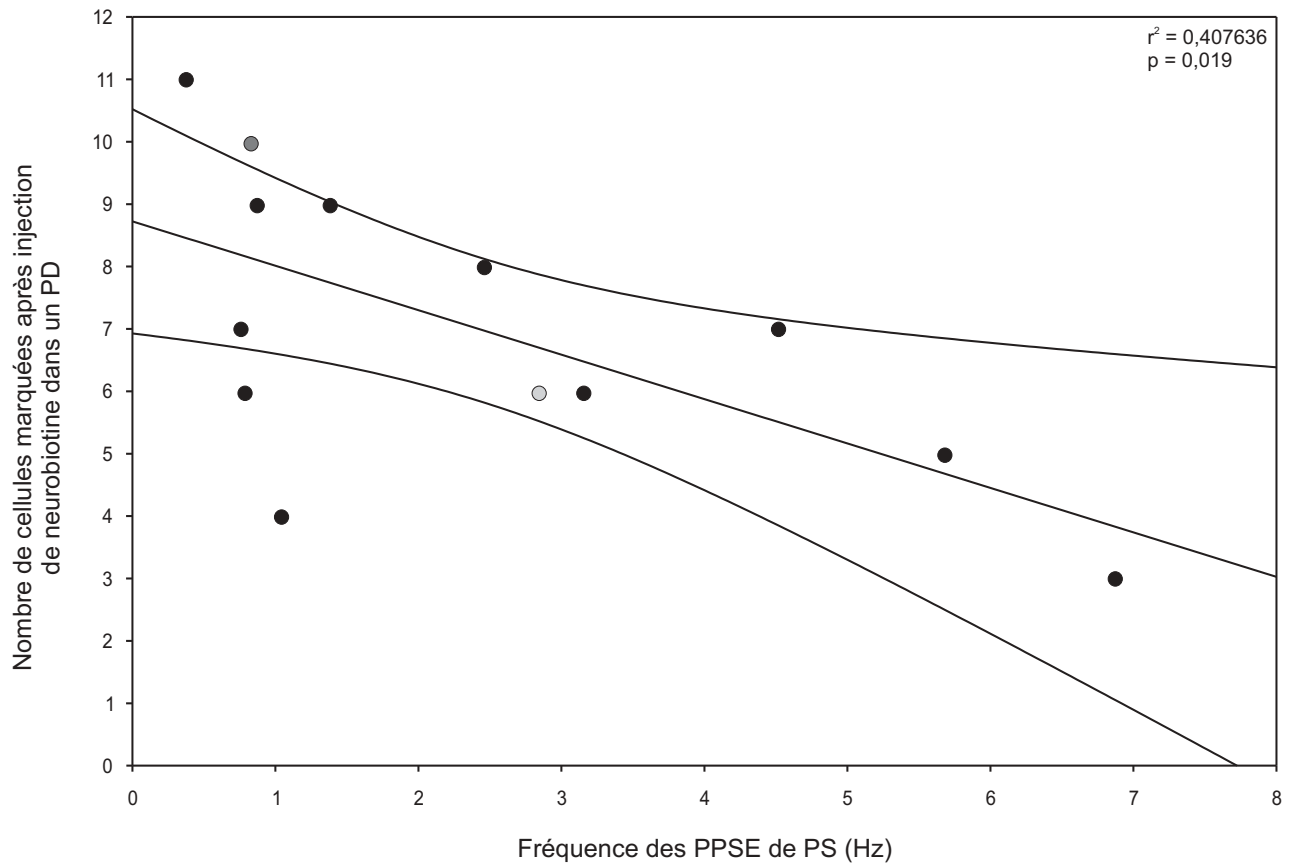
A2



B2



C





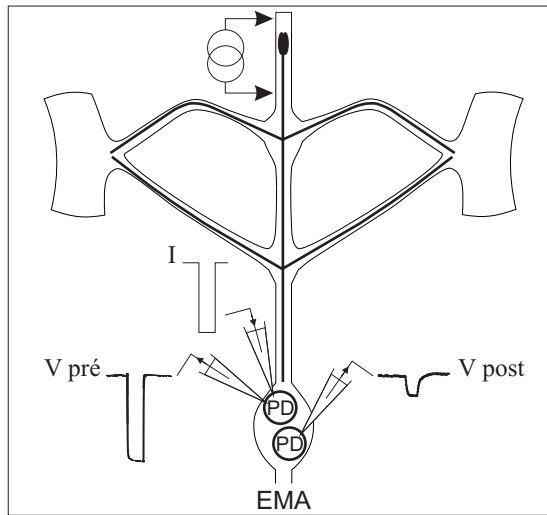
sur l'*ivn* de part et d'autre de leur corps cellulaire (Fig 24A). Les créneaux de courant dans le neurone PD présynaptique sont appliqués manuellement pendant la période du cycle où il est le plus hyperpolarisé (Fig. 24B, courant injecté, 300 à 500 ms, -10 à -20 nA) puis les neurones PS sont stimulés (50 à 100 Hz, 5ms, 1 à 4 V pendant 10 s). La figure 24B montre l'exemple d'un enregistrement ainsi obtenu. Quand l'*ivn* est stimulé (Fig. 24B, barre noire), nous constatons l'apparition d'un plateau dans les neurones PD qui se prolonge pendant toute la durée de l'activation de PS ainsi que la présence, à haute fréquence, de PPSE. Après l'arrêt de la décharge de PS, les neurones PD sont très hyperpolarisés puis leurs oscillations réapparaissent au fur et à mesure qu'ils se repolarisent. Ces phénomènes sont caractéristiques de l'activation des neurones PS et nous serviront par la suite de critères permettant de déterminer la réussite d'une stimulation de l'*ivn*. En outre, nous notons que, suite à la décharge de PS, les variations de potentiel des deux neurones PD entraînées par l'injection de courant diminuent d'amplitude. Ceci indique une diminution de la résistance d'entrée des neurones PD et une diminution probable de leur coefficient de couplage. De façon à confirmer ces observations, une évaluation de la résistance d'entrée et du coefficient de couplage est réalisée pour chaque créneau de courant injecté dans PD : le rapport des variations du potentiel de membrane du PD présynaptique sur le courant injecté est calculé, donnant la résistance d'entrée, et le rapport des variations du potentiel du PD postsynaptique sur les variations de potentiel du neurone présynaptique est calculé, ce qui nous permet de déterminer le coefficient de couplage entre PD. Nous avons répété cette opération pour deux stimulations de PS successives séparées d'environ 120 s. Les deux stimulations de PS provoquent une nette diminution de la résistance d'entrée de PD (Fig. 24C1) celle-ci revenant à ces valeurs contrôles environ 100 s après la fin de l'activation de PS. Cependant, nous pouvons constater que la première stimulation induit une diminution de résistance d'entrée supérieure à la seconde. Le coefficient de couplage est également fortement diminué après la première stimulation de PS et ne revient pas à ces valeurs contrôles (Fig. 24C2). La seconde stimulation provoque une diminution de coefficient de couplage similaire à la première et dont les valeurs reviennent au niveau de celles obtenues avant la seconde stimulation.

Cette expérience a été renouvelée sur un total de trois SNST. Pour chaque préparation et pour chaque stimulation, nous avons retenu trois valeurs de résistance et de coefficient de couplage avant stimulation de l'*ivn* (valeurs contrôles), trois valeurs juste après la fin de l'activation de PS, c'est-à-dire de 0 à 10 s après l'arrêt de l'activité de ce neurone, et enfin trois valeurs 100 s après la fin de la stimulation de PS. Les mesures pour chacune de ces trois conditions ont été normalisées par la moyenne des valeurs contrôles. Le fait de garder trois valeurs pour chaque condition permet de tenir compte de l'incertitude existant sur les mesures de l'amplitude des variations de potentiel membranaire suite à l'application des créneaux de courant. En effet, même si nous nous attachons à appliquer ces créneaux toujours au même moment du cycle de PD, l'activité des neurones ne permet pas d'utiliser exactement le même niveau de potentiel de référence pour chaque mesure. Ainsi, la

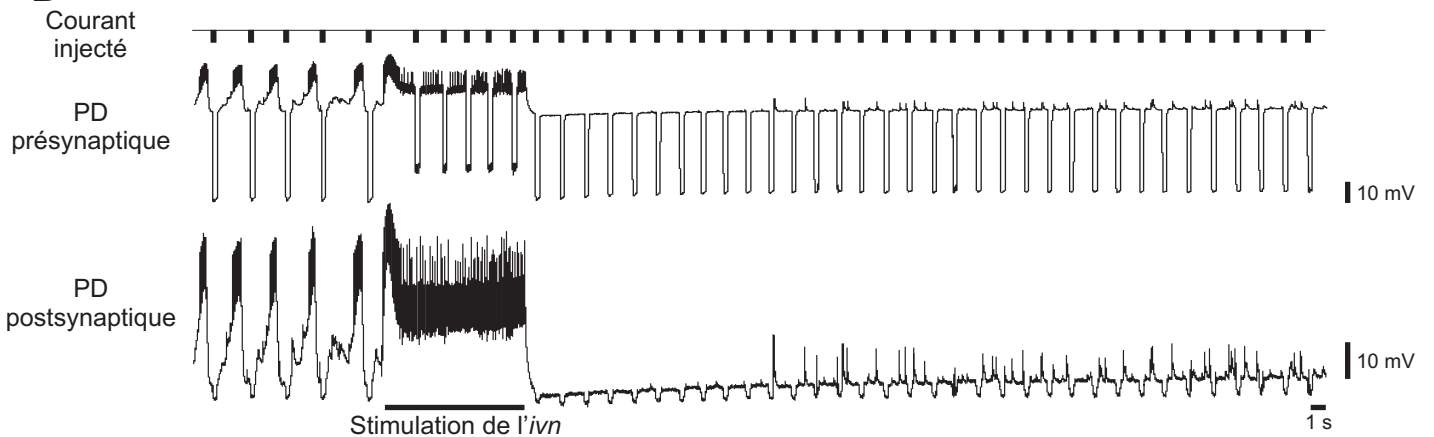
**Figure 24 : La stimulation électrique de l'*ivn* diminue la résistance d'entrée et le coefficient de couplage des neurones PD.** De l'eau de mer artificielle (EMA) est superfusée sur l'ensemble de la préparation de façon à ralentir le rythme pylorique. Une stimulation électrique est appliquée sur l'*ivn* au moyen d'électrodes extracellulaires de façon à stimuler les neurones PS (A). Le couplage électrique entre les neurones PD est mesuré simultanément à la stimulation de PS : un PD est empalé avec deux électrodes, une pour injecter du courant (-10 à -20 nA, 0,1 à 0,5 Hz, 300 à 500 ms), l'autre pour mesurer le potentiel membranaire de ce neurone (PD présynaptique), l'autre PD est implanté avec une électrode permettant de mesurer son potentiel (PD postsynaptique). Un exemple des enregistrements ainsi obtenus est présenté en B, la barre noire représente la durée de stimulation de l'*ivn*. Notons la présence d'un plateau et de PPSE à haute fréquence lors de la stimulation de l'*ivn*, caractéristiques de l'activation en bouffées des neurones PS. La résistance du neurone présynaptique et le coefficient de couplage entre neurones sont ensuite déterminés et les variations de leur valeur dans le temps sont représentées (C1 et C2 respectivement). Deux stimulations successives de l'*ivn* ont été effectuées (la première correspond aux points noirs, la seconde aux points blancs) séparées d'environ 120 s. Les résultats sur l'ensemble des expériences ainsi réalisées (n=3) sont présentés en D1 pour la résistance d'entrée et en D2 pour le coefficient de couplage. Pour chaque expérience trois valeurs sont prises avant stimulation de l'*ivn*, trois autres dans les 10 secondes suivant la fin de l'activation de PS et enfin trois autres 100 secondes après la fin de la décharge de PS. Ces valeurs sont ensuite normalisées par la valeur moyenne du contrôle avant la première stimulation. Les étoiles indiquent les différences significatives (RM ANOVA :  $p < 0,01$ , suivie d'un test post-hoc de Newmann-Keuls : \* :  $p < 0,05$ , \*\* :  $p < 0,01$ ). Notons que les valeurs du coefficient de couplage du contrôle de la première stimulation de l'*ivn* sont statistiquement différentes des celles mesurées 100 s après l'arrêt de PS (Newmann-Keuls :  $p < 0,01$ , non indiqué en D2).



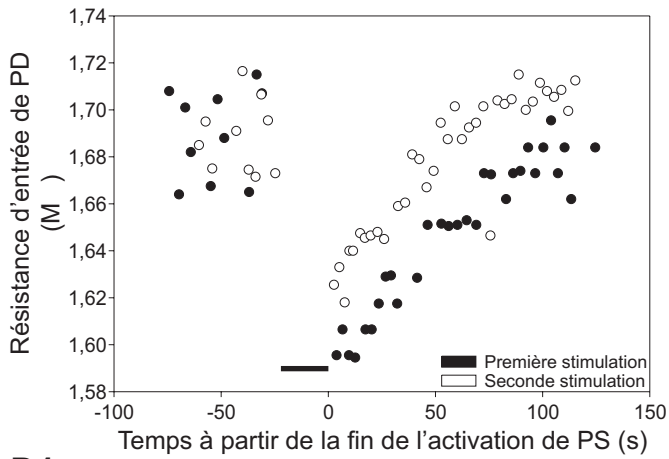
**A**



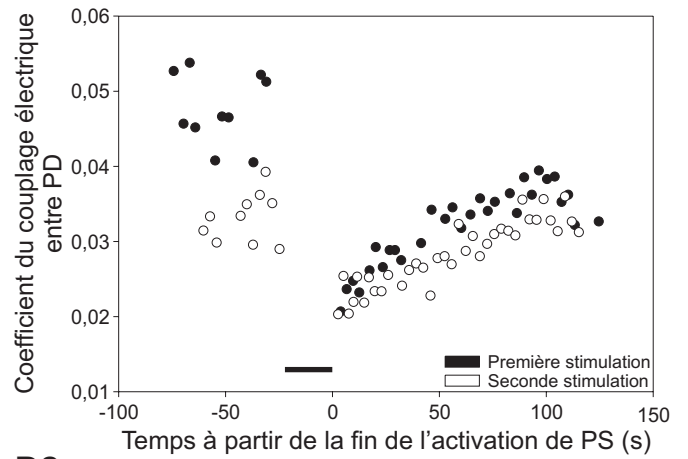
**B**



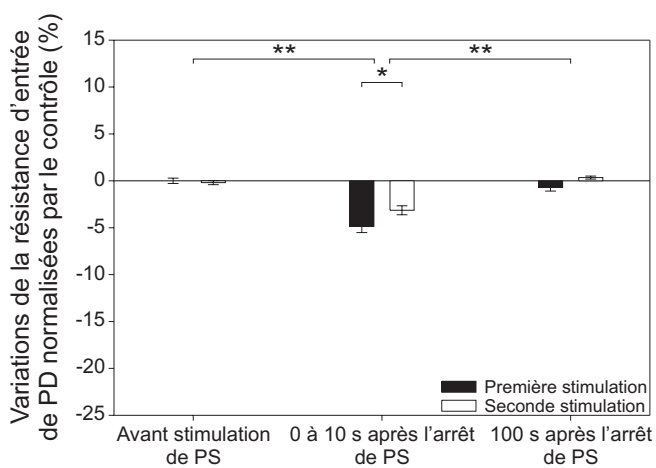
**C1**



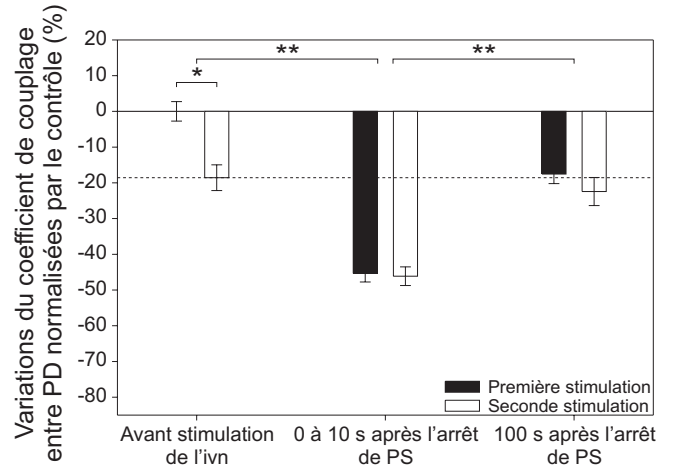
**C2**



**D1**



**D2**



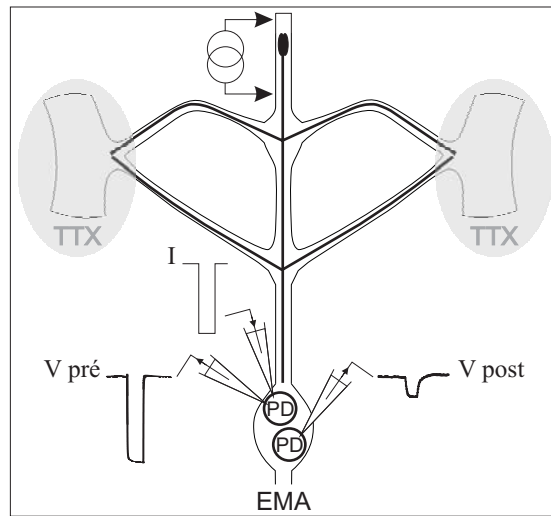


stimulation des neurones PS diminue significativement (RM ANOVA,  $p < 0,01$ ) et de manière réversible la résistance d'entrée de PD (Fig. 24D1). Notons que la première stimulation entraîne une diminution plus importante de la résistance d'entrée que la seconde. De même, la première stimulation de PS induit une diminution significative du coefficient de couplage entre les deux PD (Fig. 24D2,  $45,3 \pm 2,4 \%$ , RM ANOVA,  $p < 0,01$ ). Cependant, cette diminution n'est pas entièrement réversible puisque le coefficient de couplage reste inférieur (de  $17,5 \%$ ) à la valeur contrôle 100 s après l'arrêt de PS. Lors de la seconde stimulation on observe également une diminution du coefficient de couplage qui amène ce dernier aux valeurs observées lors de la première stimulation (post-hoc : Newman-Keuls,  $p > 0,9$ ,  $-45,1 \pm 2,6 \%$  par rapport au contrôle de la première stimulation soit environ  $-27 \%$  par rapport au contrôle de la seconde stimulation). Cette seconde diminution du coefficient de couplage est entièrement réversible car le coefficient de couplage revient à des valeurs comparables à celles précédant la seconde stimulation de PS (Fig. 24D, pointillés). Ces expériences suggèrent que l'action de PS sur le couplage électrique entre les deux PD peut être vu comme la somme d'une diminution à long terme et d'une diminution à court terme réversible du couplage électrique.

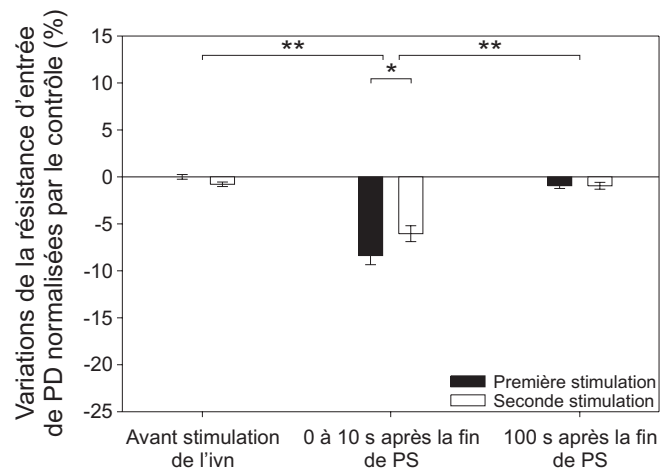
Les neurones PS sont des neurones qui projettent à la fois sur le STG et sur les CoG (Cazalets et al., 1990a; Meyrand et al., 1991) et leurs effets sur le couplage électrique entre les neurones PD peuvent donc faire appel à la mise en jeu de neurones commissuraux. Nous avons donc effectué des stimulations de ces neurones sur des préparations où l'activité des neurones des CoG a été bloquée par de la TTX à  $10^{-7}$  M (Fig. 25A). Dans ces conditions, nous observons des effets des neurones PS sur les PD similaires à ceux observés sans blocage des CoG : la résistance d'entrée des PD est diminuée de  $8,4 \pm 1 \%$  lors de la première stimulation de PS et de  $6 \pm 0,8 \%$  après la seconde stimulation (Fig. 25B). Le coefficient de couplage est diminué de  $48,8 \pm 3,5 \%$  après chaque activation de PS (Fig. 25C). Suite à ces stimulations, les valeurs du coefficient de couplage restent très inférieures à celles observées avant la première stimulation de PS puisqu'elles ne représentent, en moyenne, que  $22 \%$  des valeurs contrôles. L'action des neurones PS sur le couplage électrique des PD est donc direct et ne passe pas par les CoG. Des travaux antérieurs aussi bien chez le homard que chez d'autres espèces de crustacés ont permis de montrer que l'histamine est l'un des neurotransmetteurs exprimés (Christie et al., 2004; Faumont, 1999; Le Feuvre et al., 2001) et utilisés (Christie et al., 2004) par les neurones PS ou leurs homologues, les neurones inférieurs ventriculaires (IV). Il a même été suggéré que les neurones PS seraient la seule source d'histamine pour le STG (Christie et al., 2004; Faumont, 1999).

**Figure 25 : Les effets de PS sur les couplages électriques au sein du STG ne passent pas par un effet via les CoG.** Les stimulations de PS sont réalisées avec de la TTX à  $10^{-7}$  M sur les CoG de façon à prévenir toute action indirecte de PS sur le STG via ces ganglions (A). Les effets de PS sur la résistance d'entrée (B) et sur le coefficient de couplage (C) dans ces conditions (n=3) sont peu différents de ceux obtenus sans blocage des CoG (comparer avec Fig. 24). Les étoiles indiquent les différences significatives (RM ANOVA :  $p < 0,01$ , suivie d'un test post-hoc de Newmann-Keuls : \* :  $p < 0,05$ , \*\* :  $p < 0,01$ ). Là encore, les valeurs du coefficient de couplage du contrôle de la première stimulation de l'*ivn* sont statistiquement différentes des celles mesurées 100 s après l'arrêt de PS (Newmann-Keuls :  $p < 0,01$ , non indiqué en D2).

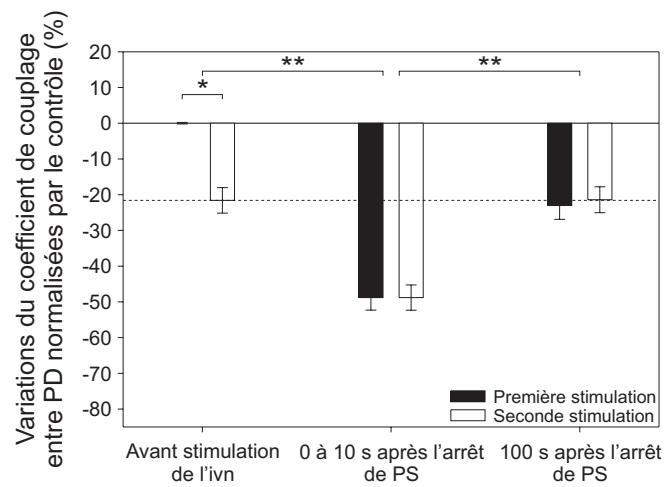
**A**



**B**



**C**





### III- L'histamine : médiateur principal des effets de PS sur les couplages électriques des neurones PD.

---

---

#### 1- Stimulation de PS lors du blocage des récepteurs histaminergiques.

Pour déterminer si ces effets de PS sont médiés par l'histamine, nous avons réalisé les mêmes expériences que précédemment mais en présence de cimétidine  $10^{-3}$  M (Fig. 26A1), un antagoniste des récepteurs histaminergiques efficaces chez les invertébrés (el Manira and Clarac, 1994; Hashemzadeh-Gargari and Freschi, 1992; Orona and Ache, 1992). Dans ces conditions, la décharge des neurones PS n'entraîne pas de modification de la résistance d'entrée des neurones PD (Fig. 26B1, RM ANOVA,  $p > 0,5$ ). Une diminution du coefficient de couplage est observée, mais cette diminution est beaucoup plus faible qu'en l'absence de cimétidine et réversible aussi bien lors de la première que de la seconde stimulation des PS (Fig. 26C1). Pour confirmer ces effets, de l'histamine à forte concentration ( $10^{-3}$  M) a été utilisée pour saturer les récepteurs au lieu de les bloquer avec la cimétidine (Fig. 26A2). Ces expériences ont montré les mêmes résultats qu'avec la cimétidine : absence d'effet sur la résistance d'entrée (Fig. 26B2) et faible diminution réversible du coefficient de couplage (Fig. 26C2).

Ces résultats montrent que les effets de PS sur la résistance d'entrée sont entièrement médiés par l'histamine ainsi que la majorité des effets à court terme et la totalité des effets à long terme sur le coefficient de couplage. Il faut noter que PS semble également induire une diminution réversible d'environ 11 % du coefficient de couplage des neurones PD probablement médiée par d'autres substances neuromodulatrices.

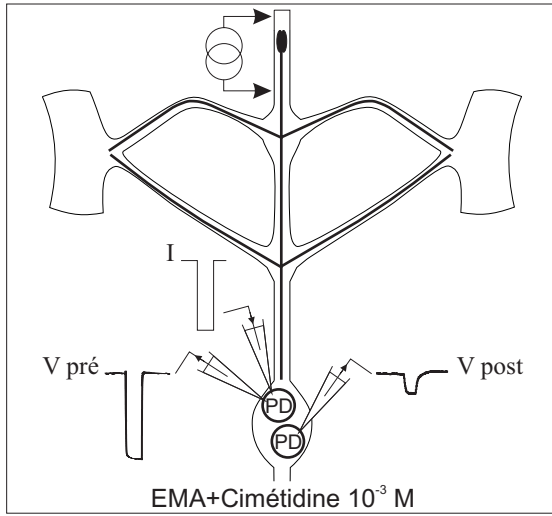
#### 2- Effets de l'application locale d'histamine sur les neurones PD.

Pour préciser les effets de l'histamine sur la résistance et le couplage des neurones PD, nous avons réalisé des mesures de couplage lors de deux éjections d'histamine à  $10^{-3}$  M à proximité du STG (Fig. 27A). En effet, l'éjection, ou puff, d'histamine est le mode d'application à notre disposition qui s'apparente le plus à la façon dont l'histamine est susceptible d'être libérée lors de la décharge de PS car elle permet une exposition de courte durée des neurones du STG à ce neurotransmetteur. L'éjection d'histamine a des effets semblables à ceux de PS car elle provoque une hyperpolarisation et un arrêt de l'activité des neurones PD dont les oscillations reviennent peu à peu à leur amplitude normale lors de leur repolarisation (Fig. 27B). L'application locale d'histamine entraîne une importante diminution réversible de la résistance d'entrée des neurones PD ainsi que de leur coefficient de couplage, et ce lors des deux applications (Fig. 27C1 et C2). Une quantification réalisée sur trois expériences montrent que l'éjection d'histamine induit une diminution significative de la

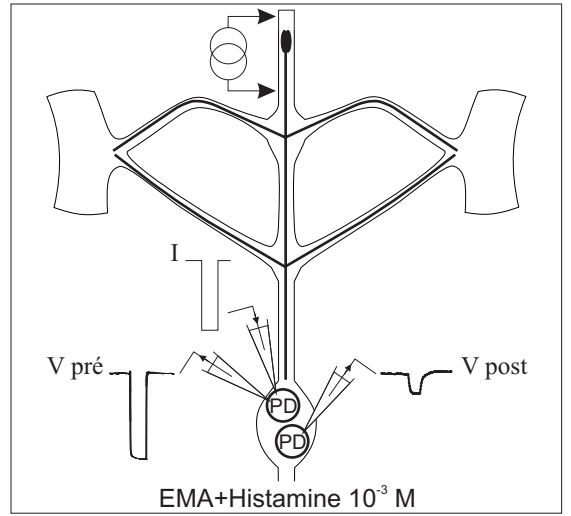
**Figure 26 : Les effets de PS sur les neurones PD sont principalement médiés par l’histamine.** Les stimulations de PS en présence d’un inhibiteur des récepteurs H2, la cimétidine, à  $10^{-3}$  M (A1) ou en présence d’histamine  $10^{-3}$  M (A2) abolissent la diminution de la résistance d’entrée des neurones PD suite à la stimulation de l’*ivn* (B1 et B2 respectivement) et le coefficient de couplage entre PD n’est pratiquement plus affecté (C1 et C2 respectivement). Ces deux expériences ont été réalisées sur 3 préparations, les étoiles indiquent les différences significatives (RM ANOVA :  $p < 0,01$ , suivie d’un test post-hoc de Newmann-Keuls : \*\* :  $p < 0,01$ ).



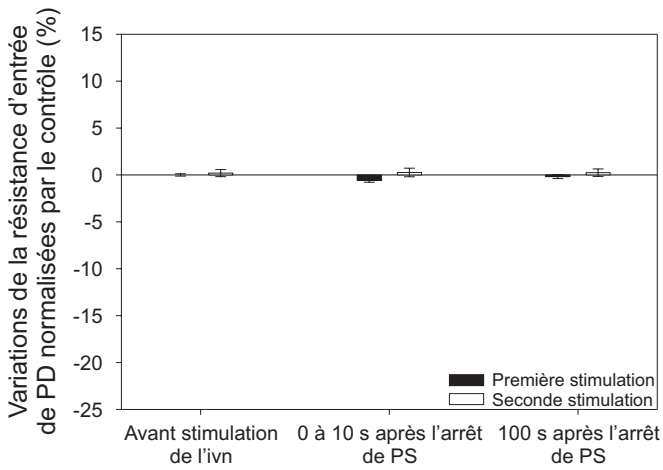
**A1**



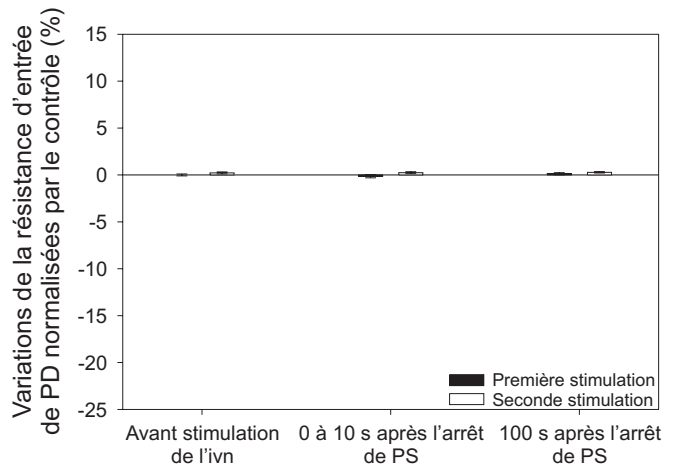
**A2**



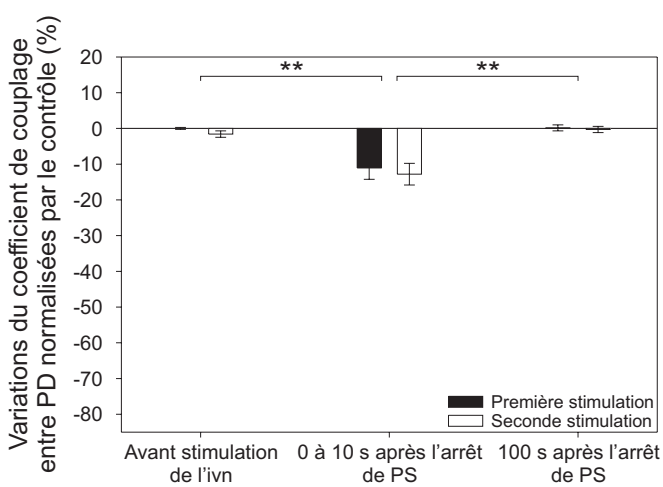
**B1**



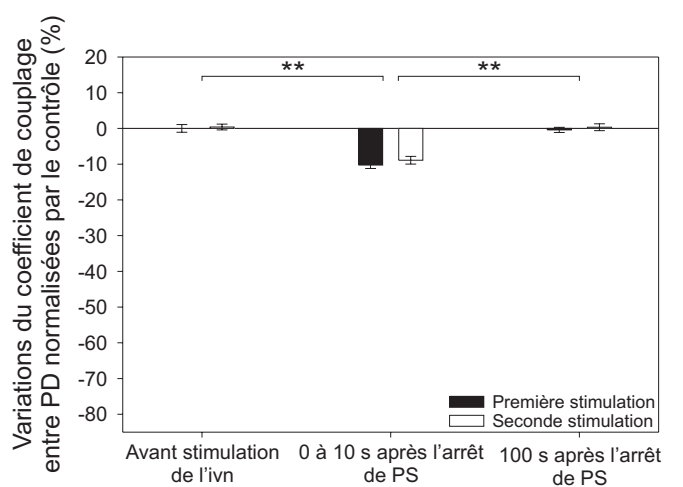
**B2**



**C1**



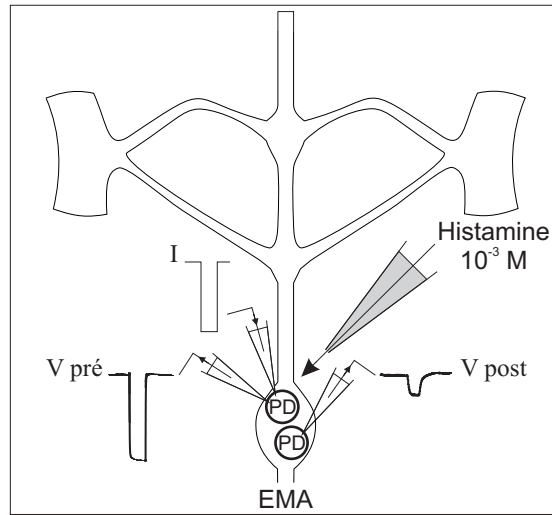
**C2**



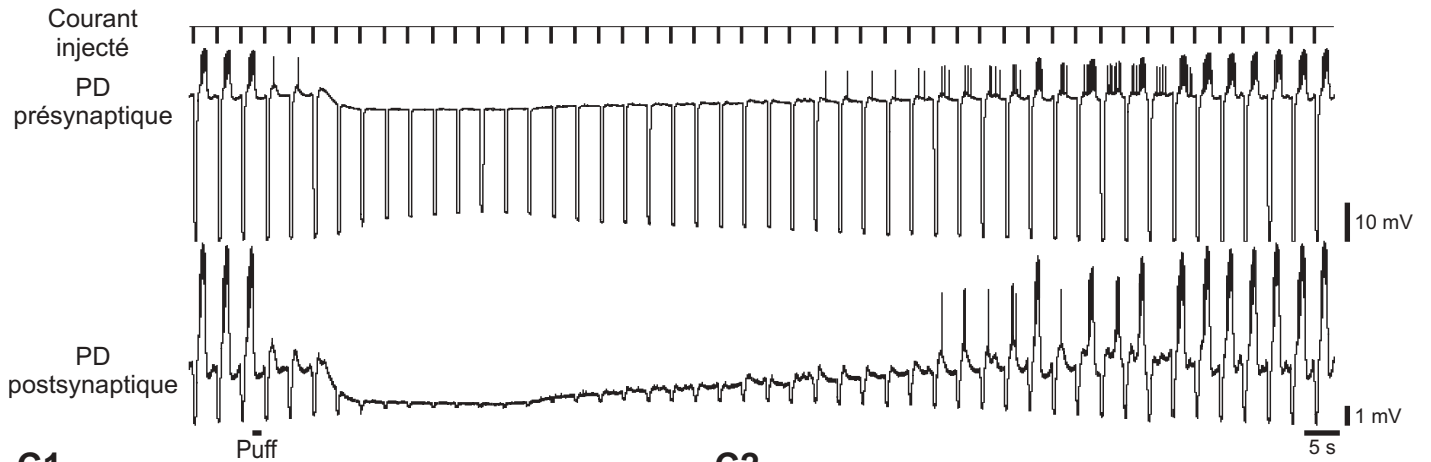
**Figure 27 : L'éjection d'histamine à proximité du STG mime une partie des effets de PS.**

Le couplage entre neurones PD est mesuré lors de l'éjection d'histamine à  $10^{-3}$  M sur le STG (A). Les enregistrements obtenus (B) montrent que l'éjection d'histamine (puff) mime les effets de PS concernant les diminutions de résistance d'entrée et de coefficient de couplage ainsi que l'hyperpolarisation observée après la fin du plateau induit par la décharge de PS. Ces effets sur la résistance d'entrée et sur le coefficient de couplage sont observés respectivement dans PD 1 et PD 2 par l'injection de créneaux de courant dans PD 1 (-20 nA, 0,2 Hz, 500 ms). Les effets de l'éjection de l'histamine sur la résistance et le coefficient de couplage pour cette expérience sont représentés en C1 et C2. Deux éjections successives ont été effectuées (la première est représentée par des points noirs, la seconde par des points blancs) séparées de 200 s. Pour chaque expérience réalisée (n=3), trois valeurs de résistance et de coefficient de couplage ont été prises avant le puff, trois autres 15 à 20 s après l'éjection de l'histamine et enfin, trois autres après retour des oscillations puis normalisées par la valeur moyenne du contrôle du premier puff. La diminution moyenne de la résistance d'entrée et du coefficient de couplage sont présentés en D1 et D2 respectivement. Les étoiles indiquent les différences significatives (RM ANOVA :  $p < 0,01$ , suivie d'un test post-hoc de Newmann-Keuls : \* :  $p < 0,05$ , \*\* :  $p < 0,01$ ).

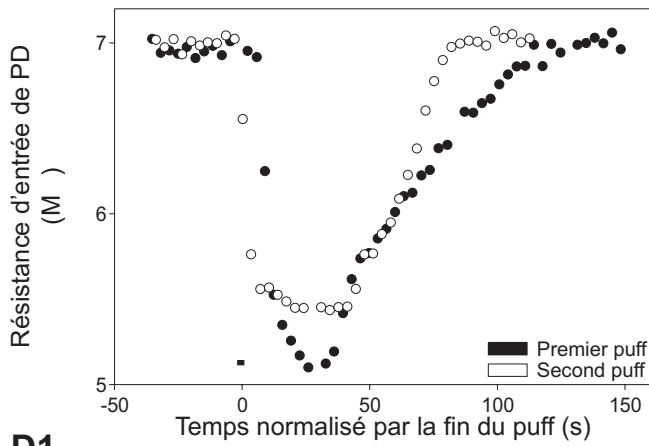
**A**



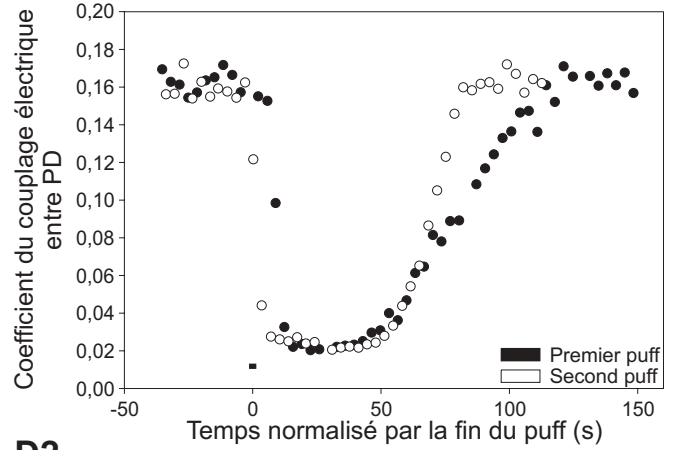
**B**



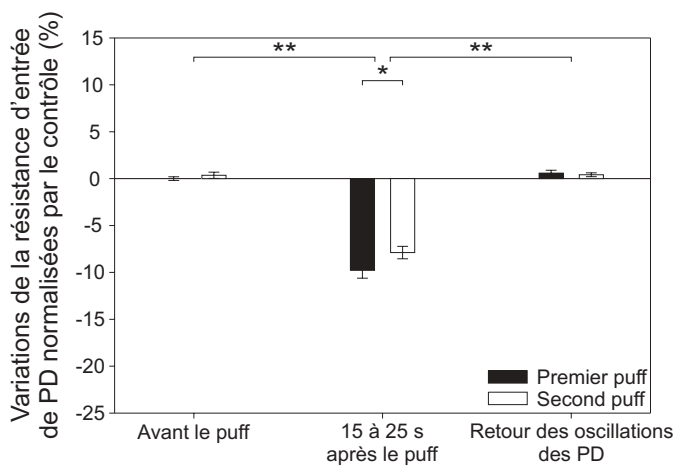
**C1**



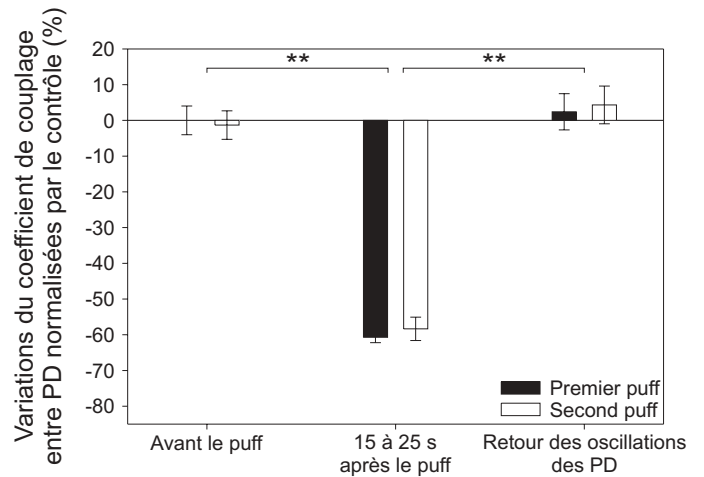
**C2**



**D1**



**D2**





résistance d'entrée des neurones (RM ANOVA,  $p < 0,01$ ) de  $9,8 \pm 0,8$  % lors du premier puff et de  $7,9 \pm 0,9$  % pour le second (Fig. 27D1), ces deux diminutions étant statistiquement différentes (post-hoc : Newman-Keuls,  $p < 0,05$ ). De même, le coefficient de couplage diminue de manière réversible de  $60,7 \pm 1,5$  % et de  $58,3 \pm 3,2$  % lors du premier et du second puff, ces deux diminutions ne présentant aucune différence statistique (Fig. 27D2, post-hoc : Newman-Keuls,  $p > 0,7$ ).

Ces résultats indiquent que, en plus de mimer les effets des neurones PS sur l'activité des neurones, l'éjection d'histamine reproduit également leur action sur la résistance d'entrée et leur effet à court terme sur le coefficient de couplage entre PD. On peut noter qu'aucun effet à long terme n'est observé dans ces conditions expérimentales. Ceci suggère que la modulation à long terme des couplages électriques par PS nécessite l'action conjointe de l'histamine et d'un autre neurotransmetteur.

#### IV- Les diminutions des coefficients de couplage entre neurones PD sous l'action de l'histamine sont-elles dues à une modulation des synapses électriques ?

---

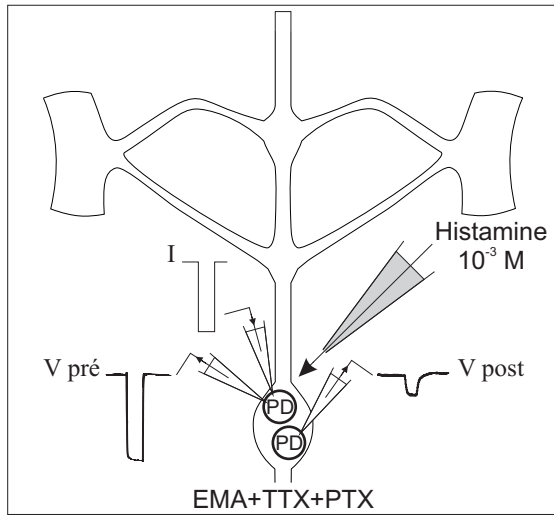
---

##### 1- Action des bloquants des canaux ioniques sur la résistance d'entrée et les coefficients de couplage des neurones PD.

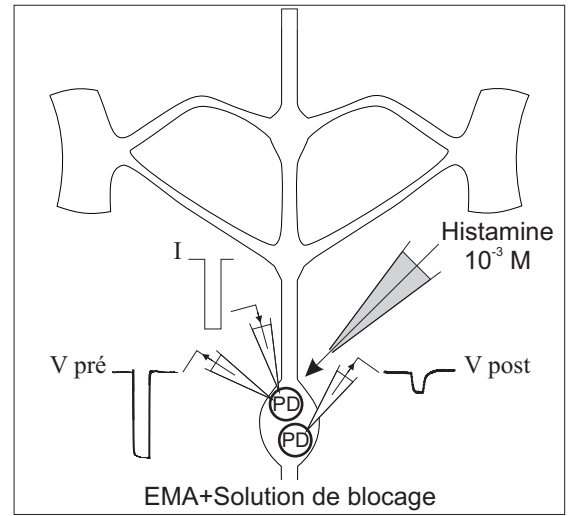
La diminution des coefficients de couplage observée aussi bien lors de la stimulation de PS que de l'application locale d'histamine peut avoir deux origines : soit l'histamine agit effectivement sur les synapses électriques pour les fermer, soit la diminution du couplage entre les PD n'est que le reflet de la diminution de la résistance d'entrée de ces neurones. En effet, une diminution de la résistance d'entrée du neurone présynaptique va augmenter les courants de fuite donc moins de courant arrivera à la synapse électrique et la variation de voltage dans le neurone postsynaptique sera diminuée. Pour discriminer entre ces deux hypothèses nous avons voulu empêcher la diminution de résistance d'entrée provoquée par l'histamine. Les données bibliographiques (el Manira and Clarac, 1994; Hashemzadeh-Gargari and Freschi, 1992; McClintock and Ache, 1989) indiquent que l'histamine ouvre, chez les crustacés, des canaux perméables aux ions chlorures et nous disposons de substances, comme la picrotoxine (PTX), capables de bloquer ce type de conductance. Nous avons donc périfusé sur quatre préparations de l'eau de mer artificielle dans laquelle ont été diluées de la PTX à une concentration de  $10^{-6}$  M et de la tétridotoxine (TTX) à  $10^{-7}$  M, cette dernière permettant de bloquer l'activité des neurones PD et d'acquérir une meilleure sensibilité sur la mesure des variations de résistance et de coefficient de couplage (Fig. 28A1). Dans ces conditions, un premier puis un second puff d'histamine à  $10^{-3}$  M diminuent significativement la résistance d'entrée de PD (RM ANOVA,  $p < 0,01$ ) de  $19,1 \pm 1,3$  % et de  $11,5 \pm 1,2$  % respectivement (Fig. 28B1), et le coefficient de couplage de  $77,7 \pm 4,7$  % et de

**Figure 28 : Les effets de l’histamine sur la résistance d’entrée et sur le coefficient de couplage entre PD ne sont pas abolis par la présence, dans le liquide physiologique, de bloqueurs de conductances.** L’éjection d’histamine  $10^{-3}$  M sur un STG superfusé avec de l’eau de mer artificielle additionnée de TTX  $10^{-7}$  M et de PTX  $10^{-6}$  M (A1, n=4) ou avec des bloqueurs de courants (A2, n=3) n’empêchent pas la diminution de résistance d’entrée (B1 et B2) ni la diminution du coefficient de couplage entre PD (C1 et C2). Notons que, dans la solution de blocage, le premier et le second puff d’histamine entraînent une diminution de la résistance d’entrée de PD comparable contrairement à ceux réalisés sous TTX et PTX seules. Les étoiles indiquent les différences significatives (RM ANOVA :  $p < 0,01$ , suivie d’un test post-hoc de Newmann-Keuls : \*\* :  $p < 0,01$ ).

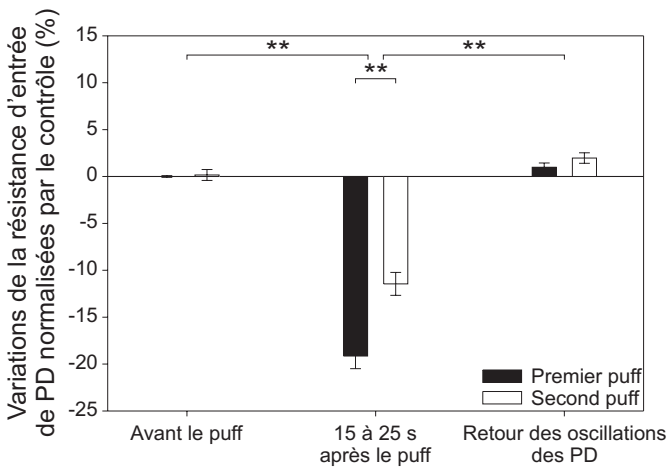
**A1**



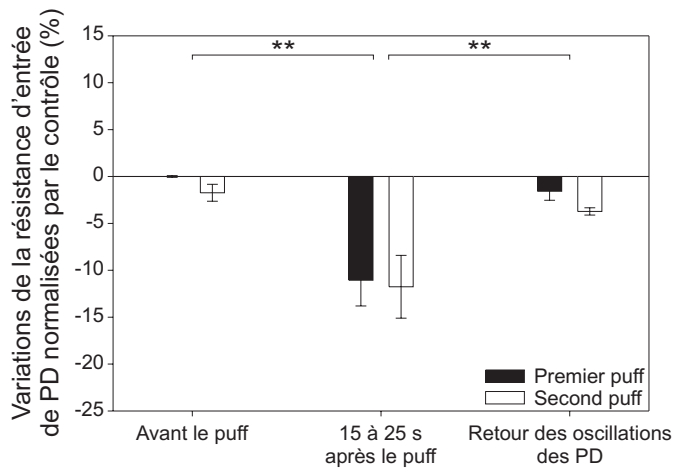
**A2**



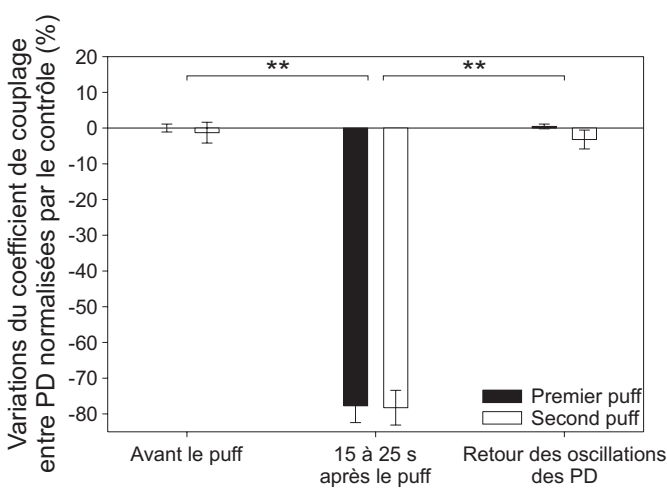
**B1**



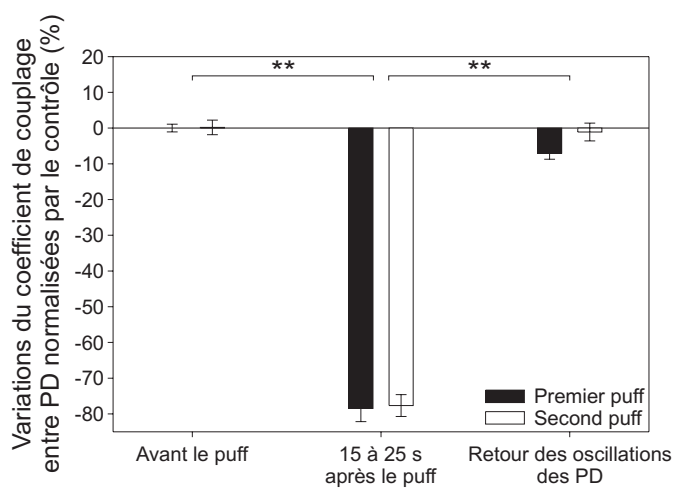
**B2**



**C1**



**C2**







78,3 ± 4,9 % (Fig. 28C1). La PTX est donc inefficace pour bloquer les variations de résistance d'entrée provoquées par l'histamine car même des concentrations bien supérieures à celles utilisées ici (jusqu'à 10<sup>-3</sup> M) n'empêchent pas cette diminution (résultats non montrés). Pour bloquer les conductances additionnelles que l'histamine pourrait ouvrir, nous avons essayé de bloquer l'ouverture d'un maximum de canaux ioniques. Les canaux chlorures, les canaux sodiques voltage-dépendants, les conductances potassiques et les canaux I<sub>h</sub> et I<sub>A</sub> ont été bloqués par la superfusion d'une solution de blocage (voir méthodes) puis deux puffs successifs d'histamine ont été effectués (Fig. 28A2). Dans ces conditions, la résistance d'entrée des neurones PD diminue toujours de 11,1 ± 2,7 % suite au premier puff et de 11,8 ± 3,3 % après le second (Fig. 28B2) et leur coefficient de couplage diminue de 78,5 ± 3,7 % et de 77,7 ± 3,1 % (Fig. 28C2).

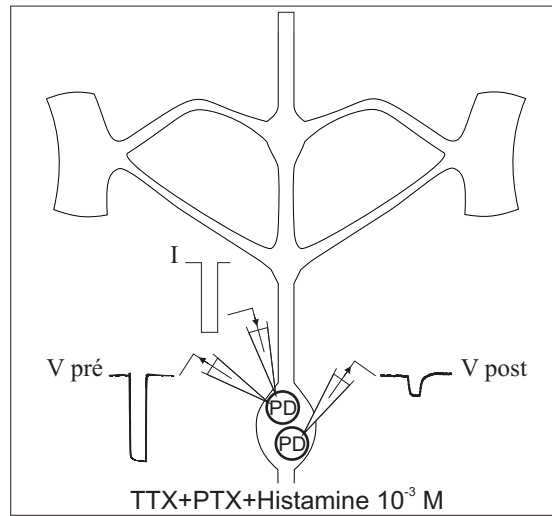
## 2- Effets d'une application prolongée d'histamine sur le couplage électrique entre les neurones PD.

L'ajout de bloqueurs des conductances de PD dans le liquide de périfusion s'est révélé incapable d'empêcher les modifications de résistance d'entrée de ce neurone lors de l'application d'histamine. Or, les canaux chlorures ouverts par ce neuromédiateur se désensibilisent (Hashemzadeh-Gargari and Freschi, 1992; McClintock and Ache, 1989) et il est donc possible d'envisager d'appliquer l'histamine sur de longues durées de façon à ce que la résistance revienne à ces valeurs contrôles et de vérifier la diminution du couplage entre PD. En outre, ce protocole permet d'éviter certaines différences d'effets entre les STG dues notamment à la variabilité de la quantité d'histamine libérée par le puff, les différences dans la localisation de la pipette servant à faire l'éjection et donc des différences dans l'accès de l'histamine à ses récepteurs cibles.

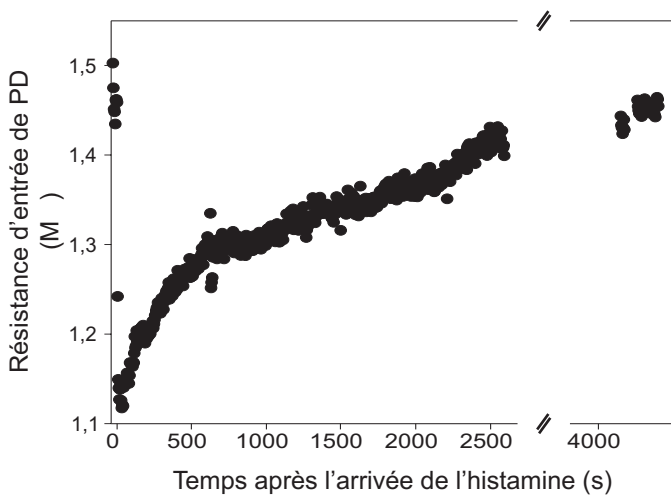
Nous avons donc effectué des expériences dans lesquelles le liquide physiologique additionné de TTX et de PTX a été périfusé de façon à stopper l'activité des neurones du STG (contrôle) puis des créneaux de courant ont été injectés (-20 nA, 0,1 Hz, 500 ms) et enfin l'histamine diluée dans le liquide physiologique à une concentration de 10<sup>-3</sup> M a été superfusée (Fig 29A). La résistance d'entrée du neurone PD présynaptique ainsi que le coefficient de couplage entre les deux PD ont ensuite été calculés pour chaque créneau de courant et leur évolution dans le temps est présentée en figure 29B1 et B2 respectivement pour une expérience. Nous pouvons constater que l'histamine diminue fortement la résistance de PD dès son arrivée sur le STG, les valeurs de résistance passant d'une moyenne de 1,46 MΩ à un minimum de 1,12 MΩ puis augmente progressivement pour retrouver les valeurs contrôles au bout d'environ 1 heure, alors que l'histamine est toujours superfusée (Fig. 29B1). L'application de l'histamine à long terme permettant effectivement d'abolir la diminution de résistance d'entrée observée à court terme, nous pouvons maintenant déterminer si ce neuromédiateur agit sur les synapses électriques. Le coefficient de couplage diminue très fortement lors de l'arrivée de

**Figure 29 : L'histamine  $10^{-3}$  M appliquée dans le bain induit une diminution de résistance d'entrée qui se désensibilise et une diminution non réversible du coefficient de couplage entre les neurones PD.** Les effets de l'application à long terme de l'histamine à  $10^{-3}$  M sur la résistance d'entrée et le coefficient de couplage des neurones PD ont été mesurés après arrêt des activités des neurones par superfusion d'un liquide physiologique additionné de TTX  $10^{-7}$  M et de PTX  $10^{-6}$  M (A). Des injections de créneaux de courant de -20 nA (0,1 Hz, 500 ms) sont réalisées pendant toute la durée de la périfusion de l'histamine. Les déflexions du potentiel de membrane du PD présynaptique et du PD postsynaptique dues à ces injections de courant sont mesurées de façon à calculer la résistance d'entrée et le coefficient de couplage. Les résultats obtenus montrent une forte diminution de la résistance d'entrée de PD qui revient à ces valeurs contrôles après 1 heure d'application (B1). Le coefficient de couplage est également fortement diminué par l'arrivée de l'histamine mais reste très inférieur à sa valeur contrôle à la fin de l'application (B2). Les courbes  $\Delta V_{\text{pré}}$  en fonction de I et  $\Delta V_{\text{post}}$  en fonction de  $\Delta V_{\text{pré}}$  ont été par ailleurs réalisées pour 3 préparations pour déterminer la résistance d'entrée et le coefficient de couplage respectivement. La résistance d'entrée diminue de façon significative après 30 minutes d'application d'histamine puis revient à ses valeurs contrôles après 1 heure d'application, le rinçage n'ayant que peu d'effets (C1). Les valeurs de coefficient de couplage sont fortement diminuées après 30 minutes d'application, ne varient pas après 1 heure et le rinçage ne permet qu'un faible retour (C2). Les étoiles indiquent les différences significatives (One-Way ANOVA :  $p < 0,01$ , suivie d'un test post-hoc de Newmann-Keuls : \*\* :  $p < 0,01$ ).

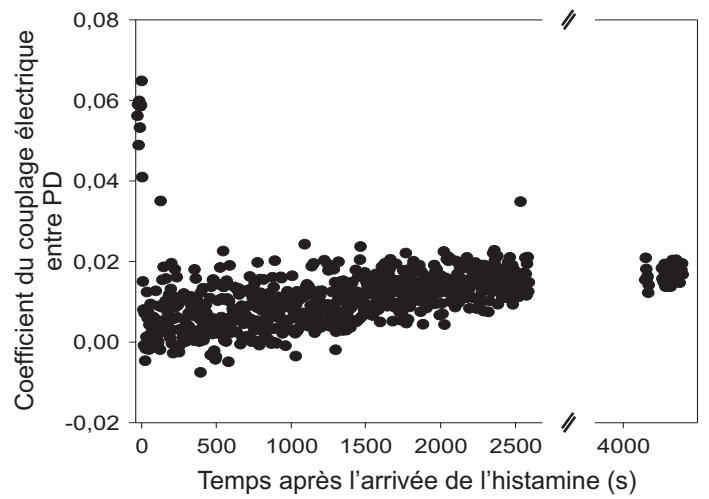
**A**



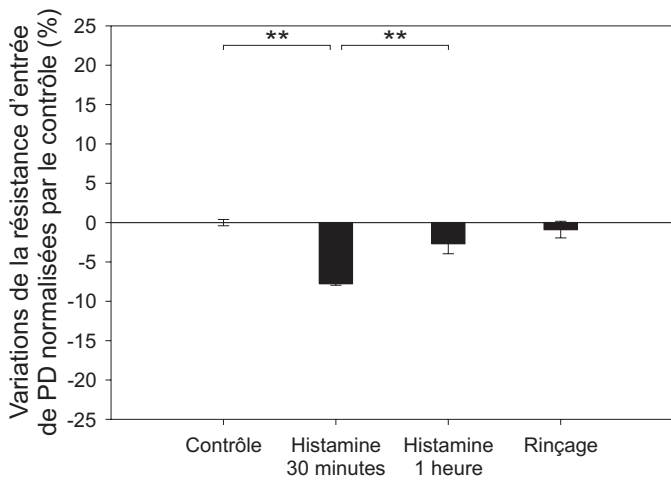
**B1**



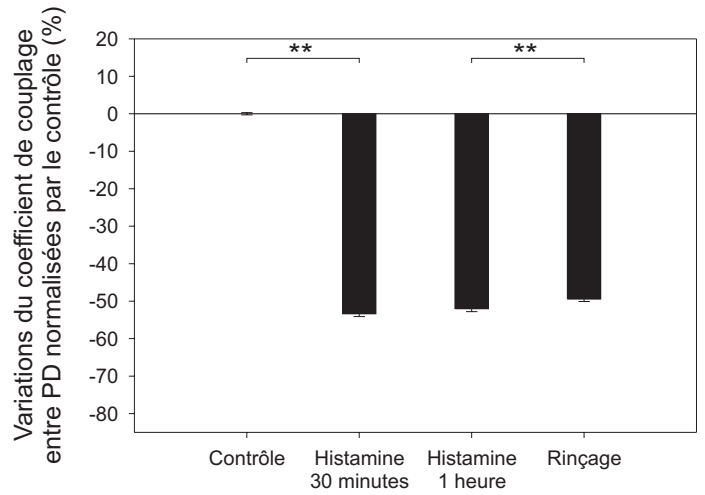
**B2**



**C1**



**C2**



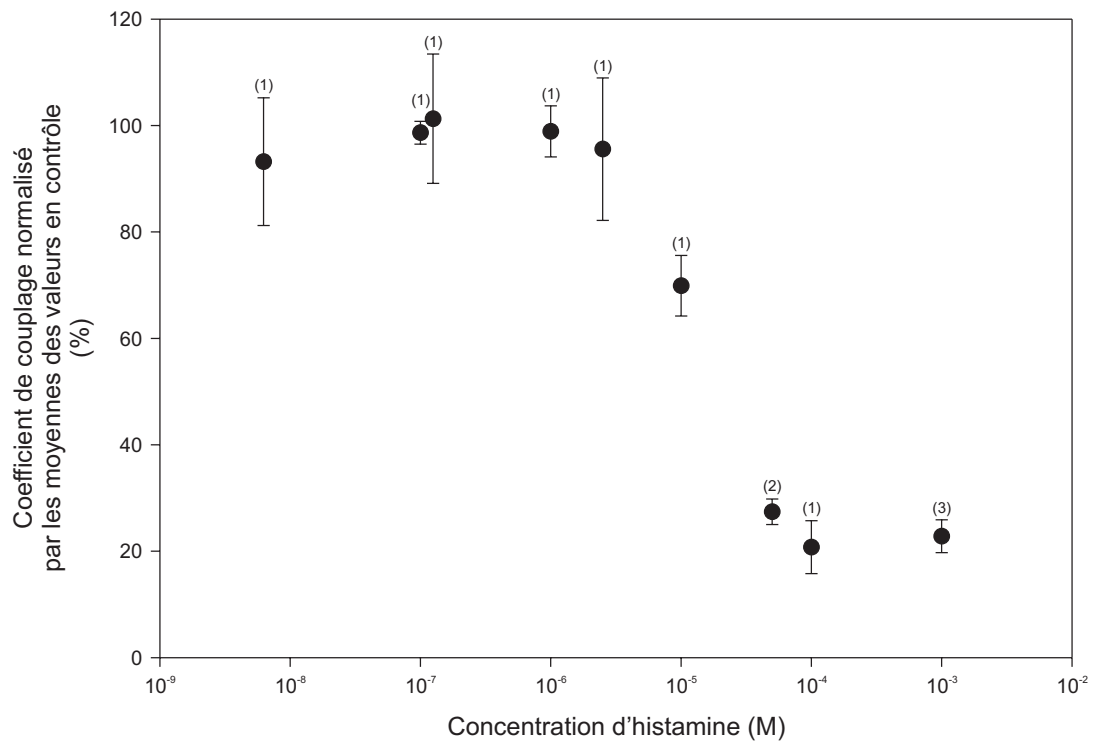


l'histamine mais, contrairement à la résistance d'entrée, ses valeurs restent très inférieures aux valeurs contrôles, même après 1 heure de périfusion (Fig. 29B2). Ainsi, le coefficient de couplage diminue de 0,056 à 0,001 et ne augmente que jusqu'à 0,017 en moyenne dans cette expérience. Nous avons donc choisi de réaliser des mesures de résistance et de couplage électrique avant application d'histamine (contrôle) puis après 30 minutes et 1 heure d'application et enfin après un rinçage de 30 minutes à 1 heure sur 3 préparations. Pour effectuer ces mesures, les courbes représentant les variations du potentiel du neurone présynaptique en fonction du courant injecté et celles représentant les variations du potentiel du neurone postsynaptique en fonction des variations du potentiel du neurone présynaptique ont été réalisées pour les conditions contrôles, après 30 minutes et 1 heure d'application d'histamine et enfin après le rinçage. Ceci nous a permis de déterminer la résistance d'entrée des neurones PD et leur coefficient de couplage dans ces quatre conditions. Nous constatons que la résistance d'entrée diminue de  $7,8 \pm 0,2$  % après 30 minutes d'application, alors qu'elle n'est inférieure à ces valeurs contrôle que de  $2,7 \pm 1,3$  % après 1 heure, le rinçage permettant de revenir aux valeurs contrôles ( $1 \pm 1,1$  %, Fig. 29C1). Le coefficient de couplage est beaucoup plus affecté par l'histamine, puisqu'il est diminué de  $53,3 \pm 0,8$  % et de  $52 \pm 0,8$  % après 30 minutes et 1 heure d'application de l'histamine respectivement (Fig. 29C2). Le rinçage permet une augmentation statistiquement significative du coefficient de couplage (One-Way ANOVA :  $p < 0,01$  suivie d'un test post-hoc : Newman-Keuls,  $p < 0,01$ ), mais il reste très largement inférieur au contrôle, puisqu'il ne représente que  $49,4 \pm 0,7$  % des valeurs de couplage observées avant application.

Au cours de ces expériences, nous n'avons jamais réussi à obtenir un retour des coefficients de couplage, même après de longs rinçages (1 heure et plus). Cette absence de retour peut avoir deux origines : soit l'histamine diminue durablement le couplage entre les neurones PD, soit nous avons utilisé une concentration trop forte d'histamine qui empêche tout rinçage.

Afin de tester cette dernière hypothèse, nous avons réalisé une courbe concentration-réponse pour déterminer la concentration d'histamine pour laquelle les effets sur le coefficient de couplage sont maximum (Fig 30). Ces expériences ont permis de montrer qu'une concentration de  $10^{-4}$  M suffit à obtenir l'effet maximal sur la diminution du coefficient de couplage. Nous avons donc utilisé de l'histamine à  $10^{-4}$  M dans du liquide physiologique auquel a été ajouté de la TTX et de la PTX (Fig. 31A) puis mesuré la résistance et le coefficient de couplage des PD. L'histamine à  $10^{-4}$  M diminue la résistance de PD de  $9,6 \pm 0,9$  % après 30 minutes d'application (Fig. 31B), celle-ci revenant au niveau de ces valeurs contrôle après 1 heure puis, suite au rinçage, une augmentation de  $11 \pm 1,7$  % est constatée. Le coefficient de couplage est diminué de  $79,3 \pm 0,3$  % après 30 minutes et de  $60,4 \pm 0,8$  % après 1 heure de périfusion d'histamine, mais il revient à ses valeurs contrôles après le rinçage (Fig. 31C). Ainsi l'utilisation d'une dose plus faible d'histamine permet d'obtenir un retour au coefficient de couplage aux valeurs contrôles après rinçage. On notera que l'augmentation concomitante de la résistance de PD laisse toutefois persister un doute quant à la réalité du rinçage de l'effet sur le

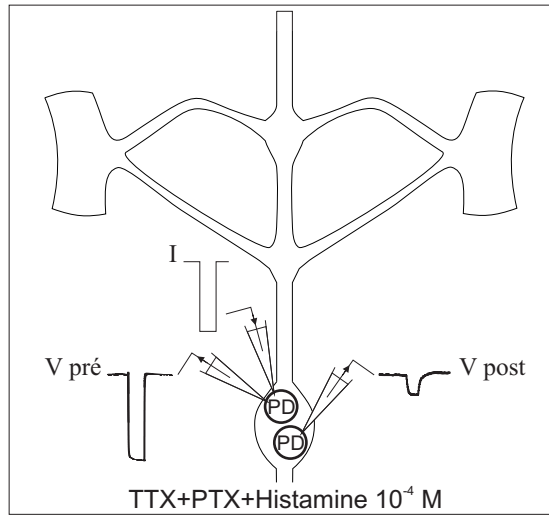
**Figure 30 : L’histamine diminue les coefficients de couplage de façon concentration-dépendante.** L’application de concentrations croissantes d’histamine sur des STG induit une diminution progressive du coefficient de couplage entre les neurones PD. Pour chaque concentration d’histamine, les mesures de coefficient de couplage ont été réalisées au bout de 30 minutes. Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de préparations utilisées pour chaque concentration. Les mesures ont été effectuées entre les deux PD, dans les deux sens.



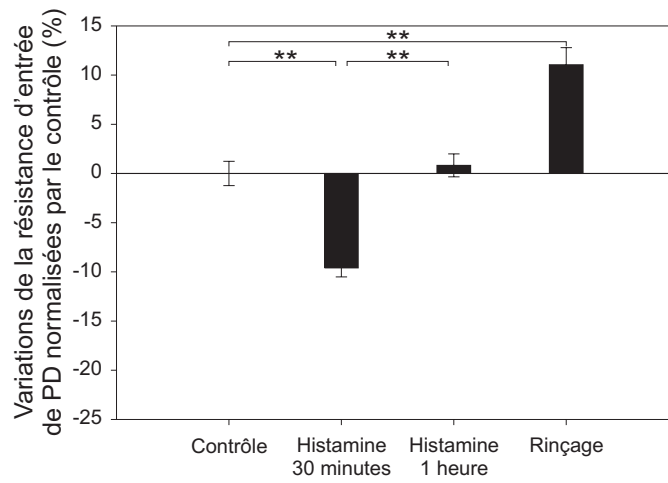
**Figure 31 : Une application d’histamine à  $10^{-4}$  M diminue de façon réversible la résistance d’entrée et le coefficient de couplage entre les neurones PD.** L’histamine  $10^{-4}$  M diluée dans du liquide physiologique modifié avec de la TTX  $10^{-7}$  M et de la PTX  $10^{-6}$  M est appliquée sur la préparation (A). La résistance d’entrée (B) ainsi que le coefficient de couplage (C) diminuent suite à l’application de l’histamine, de façon réversible (n=3). Notons toutefois une augmentation significative de la résistance d’entrée après rinçage de l’histamine. Les étoiles indiquent les différences significatives (One-Way ANOVA :  $p < 0,01$ , suivie d’un test post-hoc de Newmann-Keuls : \*\* :  $p < 0,01$ ).



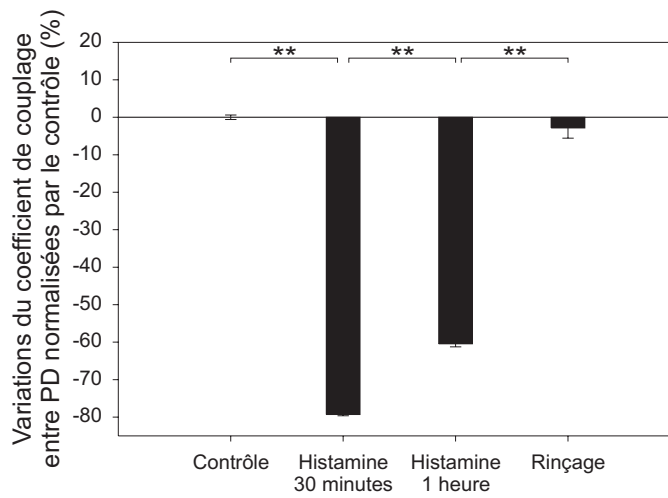
**A**



**B**



**C**





coefficient de couplage. Enfin, quelque soit la dose d'histamine utilisée ( $10^{-3}$  ou  $10^{-4}$  M), la forte diminution des coefficients de couplage observée après 1 heure d'application d'histamine, alors que les valeurs de résistance d'entrée sont retournées à leurs valeurs contrôles, démontre que la diminution des coefficients de couplage est liée à une fermeture des jonctions gap et n'est pas une conséquence de la variation de la résistance d'entrée des neurones.

### 3- L'histamine agit-elle directement sur les synapses électriques reliant les deux neurones PD ?

Comme mentionné dans la discussion du chapitre précédent, une partie du coefficient de couplage observé entre les deux neurones PD est liée à l'existence d'un couplage indirect passant notamment par l'interneurone AB. Dès lors, Nous pouvons nous demander si la diminution du coefficient de couplage suite à l'application d'histamine ne résulte pas du blocage des couplages indirects entre les deux PD. Afin de tester cette hypothèse, nous avons appliqué l'histamine après avoir tué un maximum de neurones couplés à PD (Fig. 32A) qui pourraient être responsables de ce couplage indirect (AB, VD, DG). Au bout de 30 minutes, l'application d'histamine diminue de façon significative aussi bien la résistance d'entrée (Fig. 32B,  $-21,6 \pm 1$  %) que le coefficient de couplage entre les neurones PD (Fig. 32C,  $-78,8 \pm 1,2$  %). L'histamine semble donc capable d'avoir un effet modulateur direct sur la synapse électrique entre les deux PD.

Au cours de l'ensemble des expériences, nous avons constaté que l'histamine diminue très fortement le couplage électrique entre les deux PD (jusqu'à 78 %) sans toutefois l'abolir totalement. Cette diminution pourrait être néanmoins suffisante pour empêcher le passage des petites molécules, ce qui aboutirait à un découplage, du point de vue métabolique, des neurones PD.

## V- Modulation du couplage métabolique de PD par l'histamine et extension des effets de l'histamine aux interactions gastro-pyloriques.

---

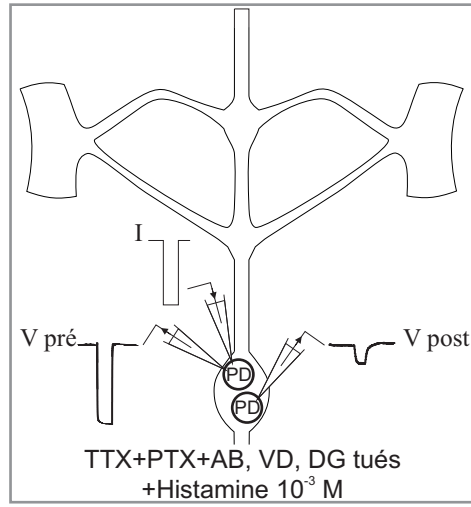
---

### 1- Réduction par l'histamine du couplage métabolique de PD avec ses partenaires.

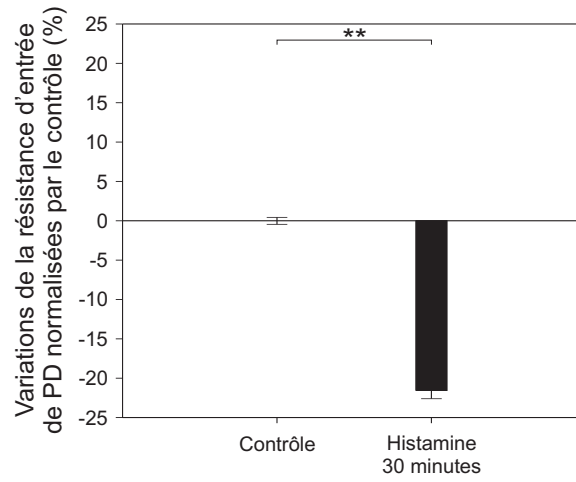
La présence d'histamine  $10^{-3}$  M dans le liquide physiologique lorsqu'un neurone PD est injecté avec de la neurobiotine entraîne une nette diminution du nombre de neurones dye-couplés avec PD (comparer Fig. 33A1 et A2, astérisques). Sur les 7 PD injectés dans ces conditions, nous avons montré une diminution significative de nombre de neurones présentant du couplage métabolique avec PD (One-Way ANOVA,  $p < 0,01$ ), le nombre de neurones marqués à la neurobiotine passant de 7 à 3 en moyenne (Fig. 33B). Cependant, la périfusion d'une concentration d'histamine de  $10^{-3}$  M provoque un arrêt des activités de l'ensemble des neurones du STG (Faumont, 1999) et on ne peut exclure que la

**Figure 32 : L'histamine agit directement sur la synapse électrique unissant les neurones PD.** Pour vérifier l'existence d'une action directe et spécifique de l'histamine sur le coefficient de couplage entre les neurones PD, les neurones AB, VD et DG sont tués par photo-ablation puis du liquide physiologique avec de la TTX  $10^{-7}$  M et de la PTX  $10^{-6}$  M est superfusé (A). L'histamine à  $10^{-3}$  M provoque une diminution de la résistance membranaire de PD (B) ainsi qu'une diminution du coefficient de couplage (C) au bout de 30 minutes. Les étoiles indiquent les différences significatives (One-Way ANOVA :  $p < 0,01$ , suivie d'un test post-hoc de Newmann-Keuls : \*\* :  $p < 0,01$ ).

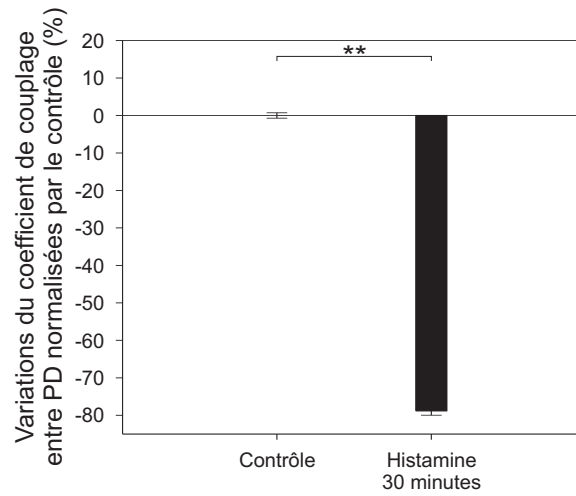
**A**



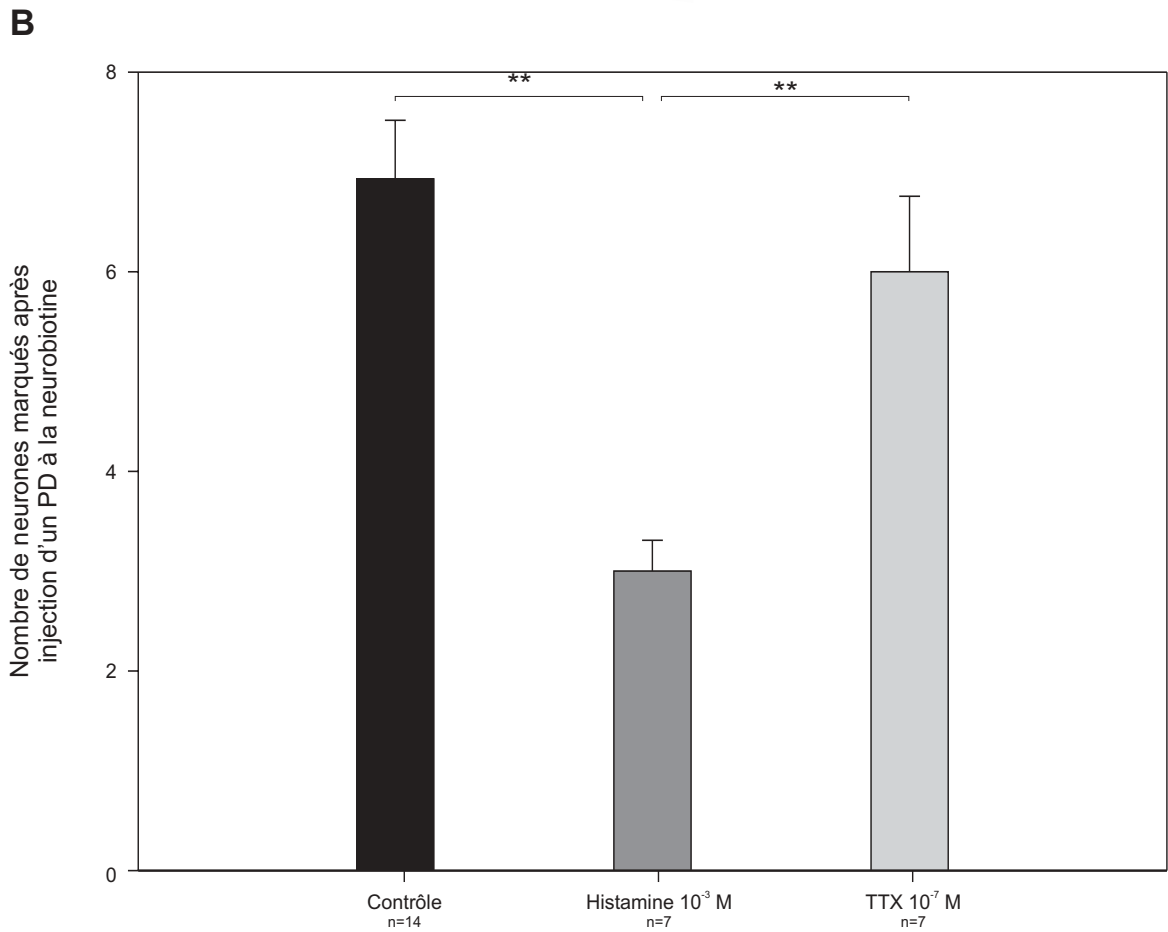
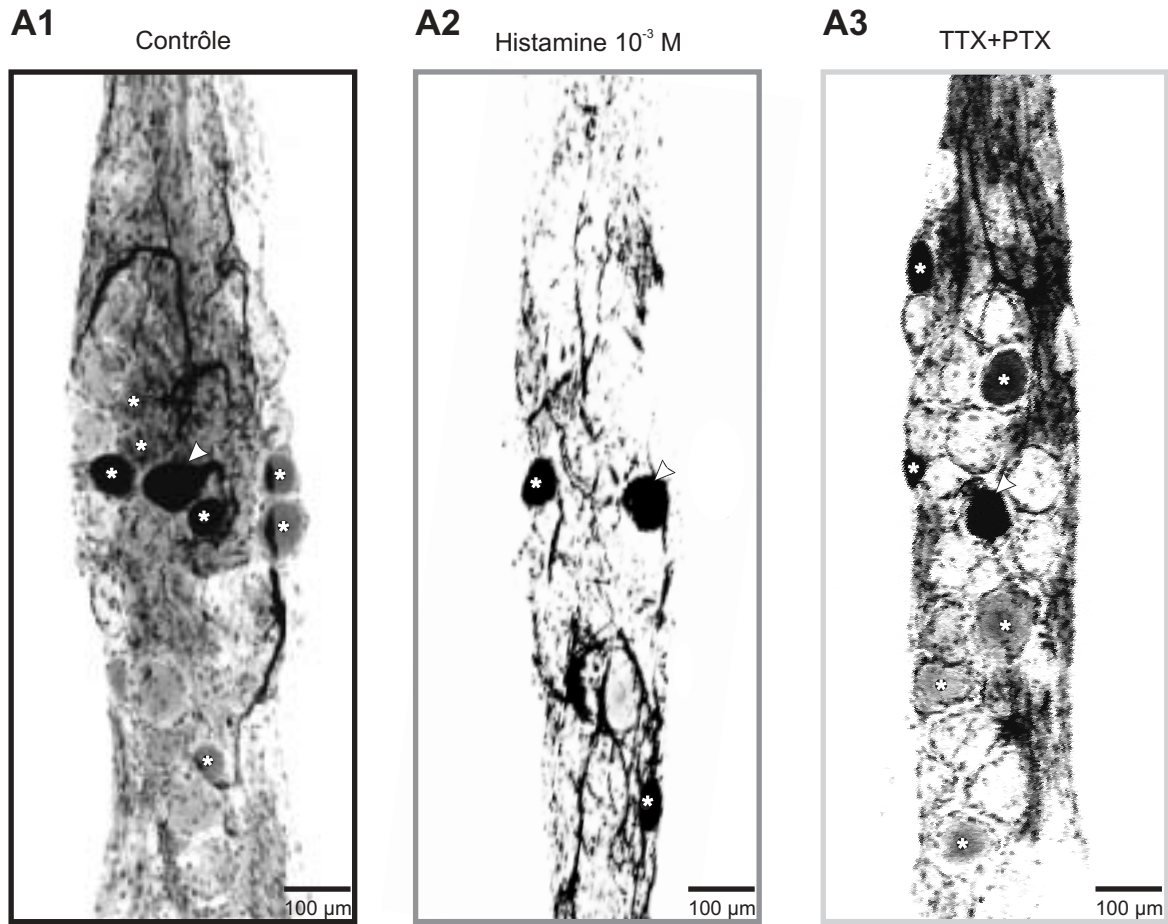
**B**



**C**



**Figure 33 : L’histamine diminue le couplage métabolique de PD.** L’injection d’un neurone PD à la neurobiotine (têtes de flèche blanches) en condition contrôle (A1) et sous  $10^{-3}$  M d’histamine (A2) montre une diminution du nombre de neurones recevant la neurobiotine sous histamine par rapport au contrôle (astérisques). Cette diminution n’est pas activité-dépendante, puisqu’une préparation superfusée avec de la TTX  $10^{-7}$  M dans laquelle un PD est injecté à la neurobiotine (A3, tête de flèche blanche) montre un nombre de neurones marqués équivalent aux conditions contrôles (comparer A1 et A3). Les résultats obtenus sur l’ensemble des préparations pour chaque condition sont présentés dans le graphe B. Les étoiles indiquent les différences significatives (One-Way ANOVA :  $p < 0,01$ , suivie d’un test post-hoc de Newmann-Keuls : \*\* :  $p < 0,01$ ). Les micrographies présentées en A sont des projections maximales de 57 (A1 et A3) et 59 (A2) coupes optiques de 2,5  $\mu\text{m}$  chacune.







diffusion de la neurobiotine à travers les synapses électriques soit activité-dépendante. Pour s'affranchir d'un tel biais, nous avons bloqué l'activité des neurones du STG par ajout de TTX  $10^{-7}$  M dans le liquide physiologique puis réalisé des injections de PD (Fig. 33A3). Le nombre de neurones marqués sous TTX est similaire à celui obtenu dans un liquide physiologique normal car nous n'avons pas observé de différence significative entre le contrôle (7 neurones marqués) et la TTX (6 neurones marqués, post-hoc : Newman-Keuls,  $p > 0,3$ ).

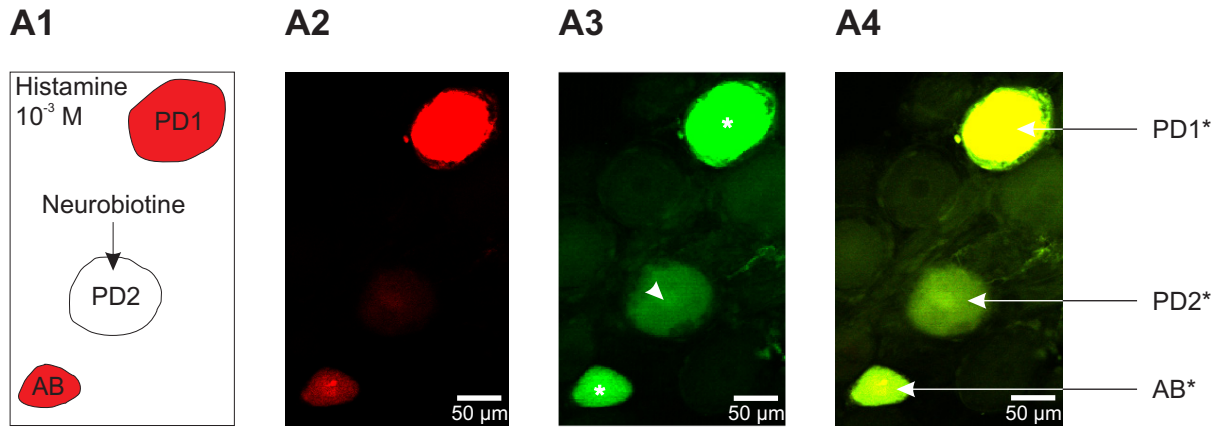
## 2- Identification des neurones restant métaboliquement couplés à PD sous histamine.

L'application d'histamine entraînant une forte diminution du nombre de neurones dye-couplés à PD, nous avons recherché les neurones dont le couplage métabolique avec PD est maintenu en présence de ce neurotransmetteur. Nous avons donc identifié certains neurones par injection de dextran couplé à la rhodamine ou à la fluorescéine (Fig. 34A1, AB et PD1) en présence d'histamine  $10^{-3}$  M puis nous avons injecté un neurone PD à la neurobiotine. Le marquage dextran révèle les neurones identifiés (Fig. 34A2) et le marquage à la neurobiotine (Fig. 34A3, astérisques), les neurones couplés à PD (deux sur l'exemple illustré). La superposition des deux marquages (Fig. 34A4) montre que les neurones couplés au PD injecté sont l'autre neurone PD et AB. Les identifications réalisées sur 7 préparations (Fig. 34B) montrent que seules l'autre PD et AB restent dye-couplés au PD injecté. L'ensemble des résultats (Fig. 34C) montre donc un découplage quasi-total du groupe PD/AB des autres neurones du STG, ce qui implique notamment une disparition des interactions entre PD/AB et les neurones du réseau gastrique tels que DG et LPG (ces deux neurones n'apparaissent jamais métaboliquement couplés à PD sous histamine). Notons la présence de deux préparations montrant quatre neurones marqués (soit un de plus que dans le groupe PD/AB) et d'une préparation montrant trois neurones marqués dont un n'est pas l'interneurone AB (soit, là encore, un neurone marqué n'appartenant pas au groupe PD/AB).

## 3- Confirmation électrophysiologique de l'affaiblissement des synapses électriques entre PD et les neurones gastriques sous histamine.

Nous avons vérifié si le découplage métabolique entre PD-DG et PD-LPG se traduit également au niveau du couplage électrique en mesurant les coefficients de couplage de PD avec LPG (Fig. 35A1) et de PD avec DG (Fig. 35B1) après 30 minutes de superfusion d'histamine à  $10^{-3}$  M. Nous avons constaté une diminution significative de  $66,1 \pm 2$  % du coefficient de couplage de PD vers LPG (Fig. 35A2) et de  $52,4 \pm 4,2$  % du couplage PD-DG (Fig. 35B2). Ainsi, l'histamine provoque effectivement une diminution du couplage entre PD et des neurones du réseau gastrique.

**Figure 34 : PD est dye-couplé avec le second PD et AB sous histamine à  $10^{-3}$  M.** Un PD est injecté avec de la neurobiotine pendant que le second PD et AB sont injectés avec du dextran-rhodamine (A1) en présence d'histamine  $10^{-3}$  M. L'image en A2 montre le résultat de l'injection de la rhodamine à l'objectif X20. La révélation de la neurobiotine avec de l'avidine-DCS couplée à la fluorescéine montre que le neurone injecté (A3, tête de flèche) ainsi que deux autres neurones (astérisques) sont marqués. La superposition des marquages pour les deux fluorophores permet de montrer que les deux seuls neurones encore dye-couplés à PD dans cette préparation sont l'autre PD et AB (A4). Ces micrographies sont des projections maximales de 30 coupes optiques de 2  $\mu\text{m}$ . Sur l'ensemble des expériences réalisées, 2 à 4 neurones ont été trouvés dye-couplés à PD (B) et seuls AB et le second PD restent encore couplés à PD. Le tableau C montre l'occurrence du dye-coupling pour chaque type neuronal.



**B**

Nombre total de neurones marqués

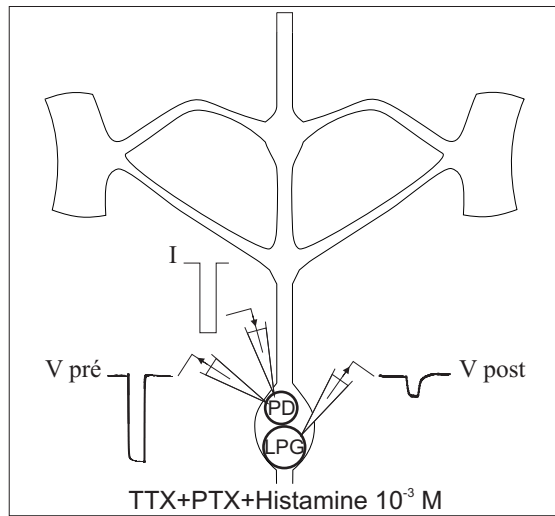
	3	3	2	2	4	4	3
PD injecté	■	■	■	■	■	■	■
PD	■				■	■	■
AB	■				■	■	■
VD					■	■	■
IC					■		
PY					■	■	
PY					■	■	
PY						■	
LPG					■	■	
LPG					■	■	
MG			■				
LG					■	■	
DG			■		■	■	■
GM					■	■	
GM					■		
AM					■	■	■
IPSP			■		■	■	
Nombre de neurones marqués non identifiés	0	2	1	1	1	1	1

**C**

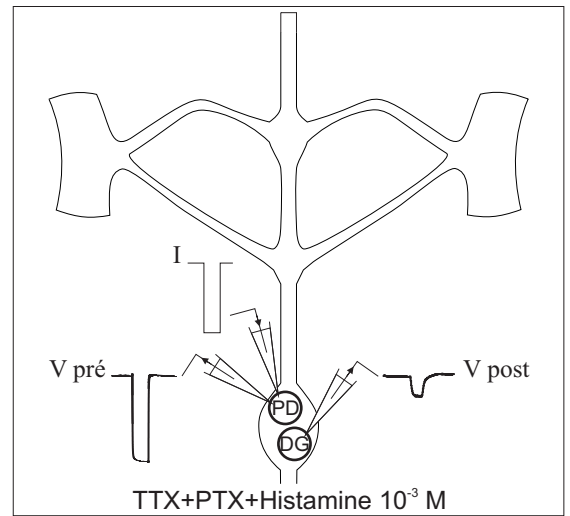
Type neuronal	Occurrence du dye-coupling avec PD (%)	n
PD	100	4
AB	75	4
VD	0	3
IC	n.d.	1
LP	n.d.	0
PY	0	6
LPG	0	4
MG	n.d.	1
LG	n.d.	2
DG	0	4
Int1	n.d.	0
GM	0	3
AM	0	3
IPSP	0	3

**Figure 35 : L’histamine diminue le coefficient de couplage entre PD et les neurones gastriques DG et LPG.** La mesure du coefficient de couplage de PD vers LPG (A1) et vers DG (A2) en présence d’histamine diluée à  $10^{-3}$  M dans du liquide physiologique avec de la TTX  $10^{-7}$  M et de la PTX  $10^{-6}$  M montre que ce neurotransmetteur diminue le coefficient de couplage de PD vers ces deux neurones gastriques (B1 et B2 respectivement, n=1 pour chaque couple). Les étoiles indiquent les différences significatives (One-Way ANOVA :  $p < 0,01$ , suivie d’un test post-hoc de Newmann-Keuls : \*\* :  $p < 0,01$ ).

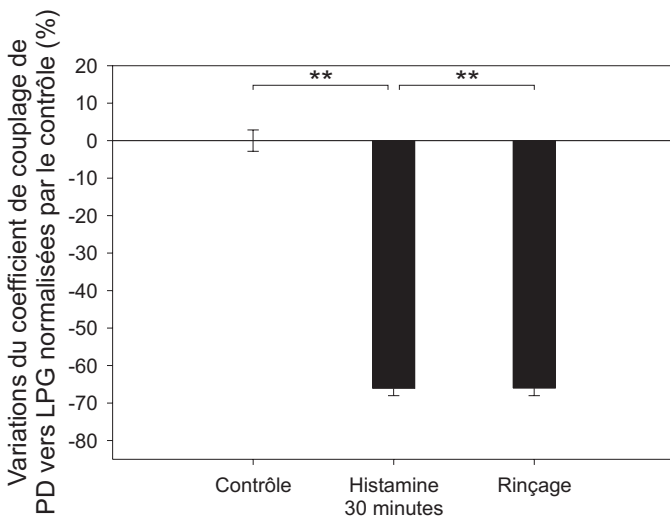
**A1**



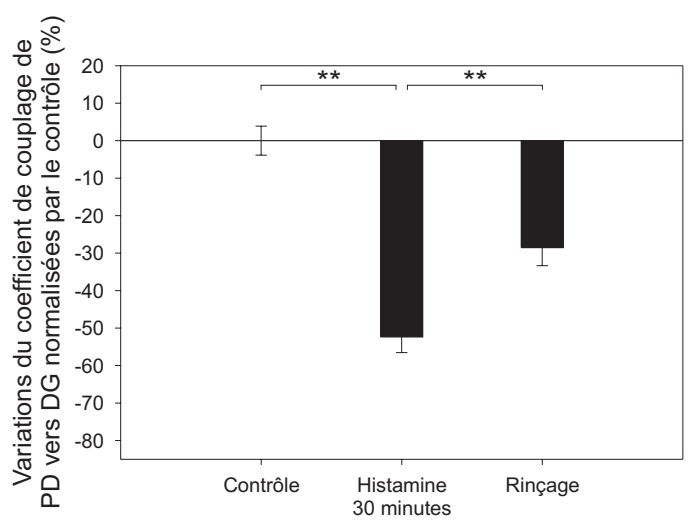
**B1**



**A2**



**B2**





L'histamine mime la plus grande partie des effets de PS sur le coefficient de couplage et sur la résistance d'entrée des neurones PD, cependant nous avons vu qu'une partie de la diminution du couplage entre les PD est indépendante de ce neuromédiateur (Fig. 26C1 et C2). Nous avons donc cherché à savoir si les co-transmetteurs exprimés par PS, tels que les peptides apparentés au FMRF-amide, peuvent également modifier les coefficients de couplage entre les neurones PD.

## VI- Absence de modulation des couplages électriques par un neuromédiateur peptidergique.

---

---

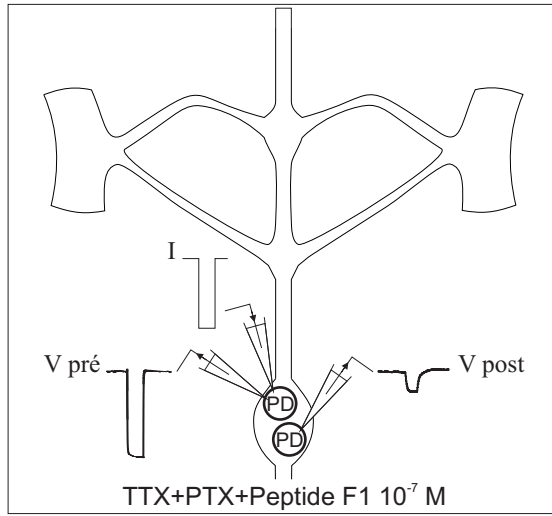
Nous avons utilisé le peptide F1 connu pour être l'un des peptides de type FMRF-amide exprimé chez *Homarus americanus* (Trimmer et al., 1987) et pour avoir des effets excitateurs sur le rythme pylorique chez *Procambarus clarkii* (Tierney et al., 1997) et *Cancer borealis* (Weimann et al., 1993). Pour s'affranchir d'une action indirecte de ce peptide (par la mise en jeu de neurones commissuraux ou par la modulation d'une autre synapse électrique que celle unissant les deux PD), nous avons appliqué le F1 dilué à  $10^{-7}$  M dans du liquide physiologique avec de la PTX et de la TTX (Fig. 36A) sur des STG où les neurones AB, VD et DG ont été préalablement tués (n=3). Un créneau de courant de -20 nA injecté dans un PD (Fig. 36B, I) entraîne des variations de potentiel peu différentes en contrôle, après 1 heure d'application de F1 ou après rinçage que ce soit au niveau présynaptique (Fig. 36B, V pré) qu'au niveau postsynaptique (Fig. 36B, V post). En effet, l'application du F1 n'entraîne aucune modification significative de la résistance d'entrée des PD (Fig. 36C1, One-Way ANOVA :  $p > 0,08$ ). De la même façon, l'application de F1 sur le STG n'entraîne aucune modification du coefficient de couplage entre les PD (Fig. 36C2). Le peptide F1 ne semble donc pas être l'un des vecteurs de l'action de PS sur les neurones PD alors que l'histamine a un rôle prépondérant dans ses effets.

Nous avons donc, dans un deuxième temps, recherché les bases morphologiques de l'interaction entre le système neuromodulateur histaminergique et les neurones PD. Dans cette optique, nous avons cherché à déterminer s'il existe des indices morphologiques permettant d'étayer l'hypothèse d'une libération d'histamine à proximité des zones d'appositions membranaires entre les deux PD, sites potentiels des synapses électriques (voir chapitre précédent).

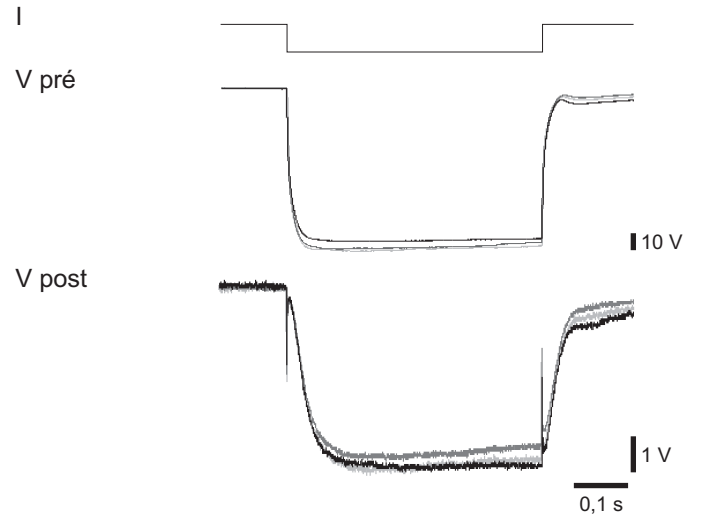
**Figure 36 : Le peptide F1 n'a pas d'effet significatif sur la résistance d'entrée et le coefficient de couplage des neurones PD.** Le neurone PS étant connu pour exprimer des peptides de type FMRF-amide, nous avons testé les effets du peptide F1, neurotransmetteur isolé chez le homard américain qui a des effets excitateurs sur les neurones pyloriques. Le peptide F1, est appliqué sur des préparations à une concentration de  $10^{-7}$  M avec de la TTX  $10^{-7}$  M et de la PTX  $10^{-6}$  M (A). Un créneau de courant de -20 nA injecté dans le PD présynaptique (B, I) induit une variation du potentiel de membrane des neurones présynaptique (B,  $V_{\text{pré}}$ ) et postsynaptique (B,  $V_{\text{post}}$ ). Les déflexions du potentiel membranaire sont semblables en condition contrôle (en noir), après 2 heures d'application de F1 (en gris foncé) et après rinçage (en gris clair) pour les neurones pré et postsynaptiques. Ces observations sont retrouvées sur l'ensemble des préparations (n=3) pour la résistance d'entrée (C1) et le coefficient de couplage (C2) qui ne sont pas affectés par l'application de F1.



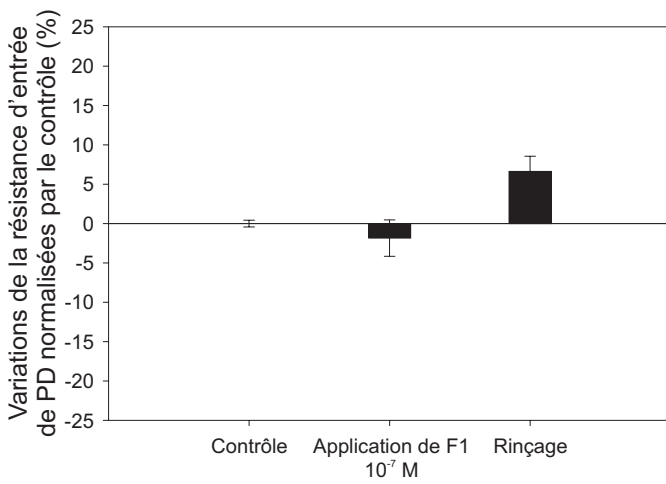
**A**



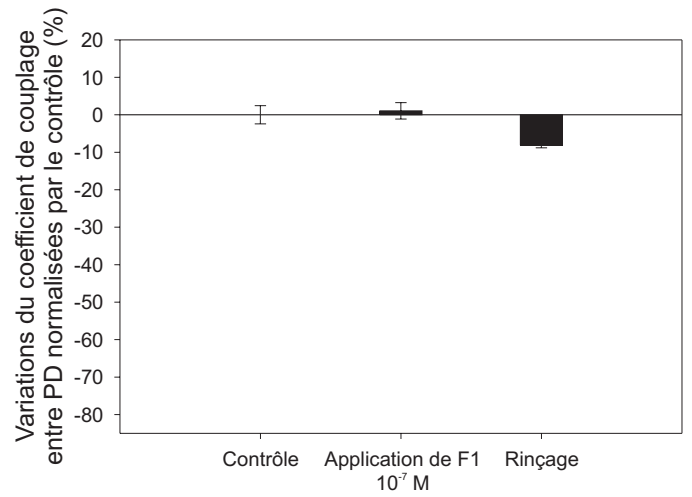
**B**



**C1**



**C2**



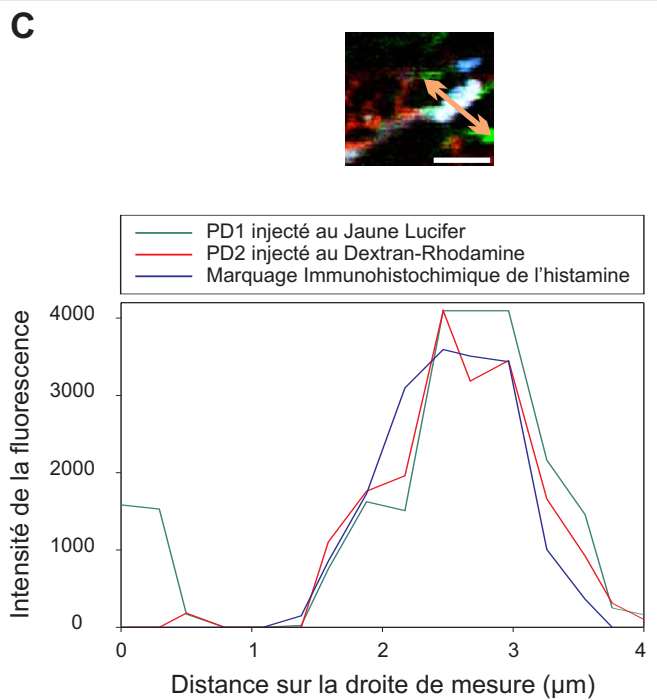
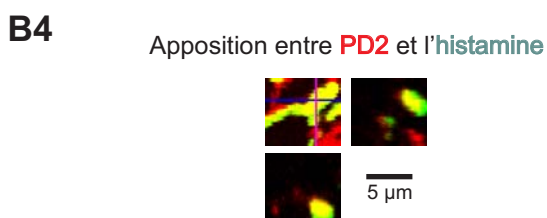
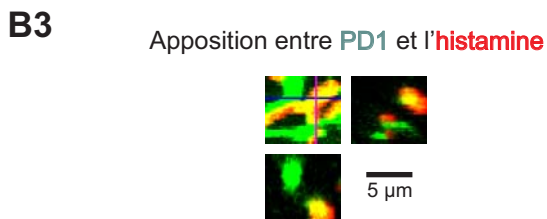
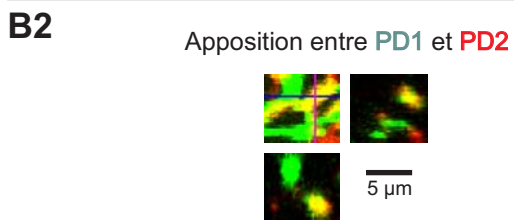
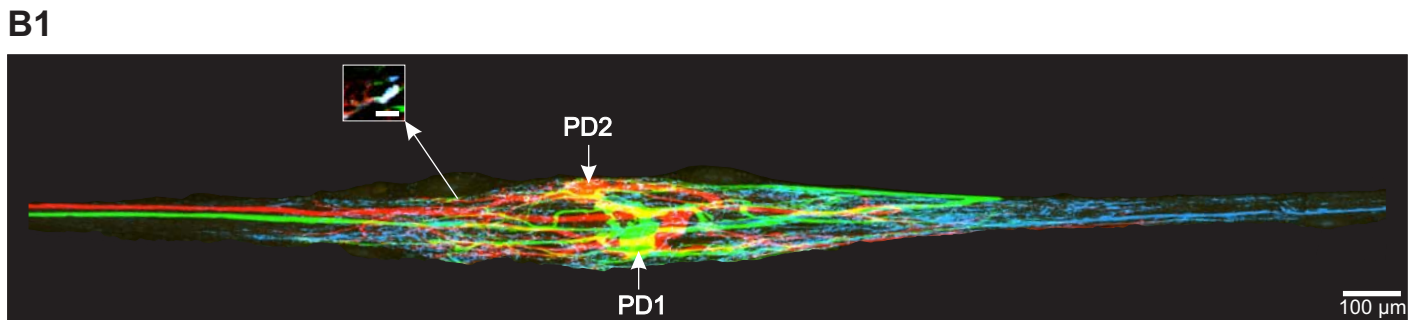
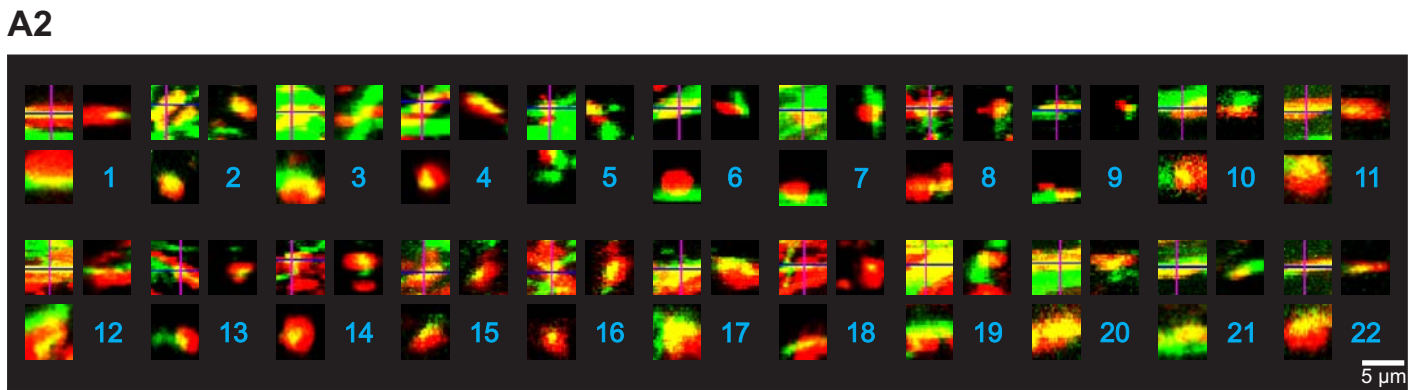
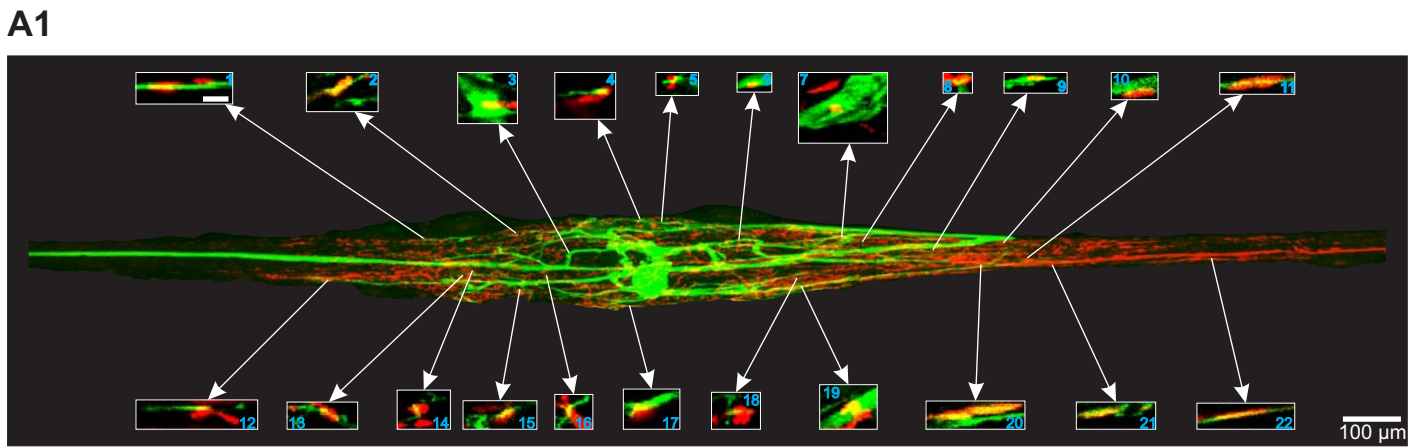


## VII- Bases morphologiques de l'interaction entre le système modulateur histaminergique et les neurones PD.

### 1- Interaction entre le système histaminergique et les neurones PD : vers une colocalisation des synapses histaminergiques et des synapses électriques reliant les deux PD.

Dans le but de démontrer l'existence de synapses chimiques histaminergiques sur le neurone PD, nous avons réalisé trois expériences de double marquage dans lesquels un neurone PD a été injecté avec une molécule fluorescente (jaune lucifer, dextran-rhodamine, ou dextran fluorescéine) et le système histaminergique a été révélé par immunocytochimie (anticorps secondaire couplé à la cyanine-5). L'observation de ces préparations en microscopie confocale à l'objectif X40 (Fig. 37A1) puis X60 (Fig. 37A1, encadrés et Fig. 37A2) a permis de révéler la présence d'une moyenne de 13 (4 à 22) zones de colocalisation des deux marquages, pouvant correspondre potentiellement à des synapses histaminergiques sur l'arborisation dendritique de PD. Ces zones de colocalisation ne semblent pas être localisées de façon préférentielle dans une zone particulière du STG. En effet, aucune différence statistique (One-Way ANOVA,  $p > 0,6$ ) n'est trouvée entre le nombre de colocalisations des fluorophores dans la zone comprise entre les deux corps cellulaires de PD, dans celle délimitée par le soma du PD le plus antérieur et l'extrémité du STG du côté du *stn* et dans celle située entre le corps cellulaire du PD le plus postérieur et l'extrémité du STG côté *dvn*. Nous avons alors cherché à déterminer si les zones de colocalisation entre le système histaminergique et les neurones PD sont au voisinage immédiat des appositions membranaires des deux PD. Une telle colocalisation apporterait un support morphologique à l'idée selon laquelle l'histamine serait libérée à proximité immédiate des synapses électriques pour moduler leur efficacité. Nous avons donc réalisé l'injection des deux neurones PD d'une même préparation, l'un avec du jaune lucifer (Fig. 37B1, PD1), l'autre avec du dextran-rhodamine (PD2) puis effectué le protocole d'immunocytochimie pour détecter la présence de l'histamine. Après analyse à l'objectif X40, nous avons relevé 19 zones où le marquage des deux PD ainsi que celui de l'immunocytochimie se superposent sur les mêmes branches des neurones. La fixation à l'EDAC étant peu adaptée à la conservation des fluorophores injectés dans PD, le marquage au dextran-rhodamine a rapidement photoblanchi, empêchant toute étude systématique de ces zones à l'objectif X60. Cependant, pour l'une de ces zones où les trois fluorophores sont colocalisés, nous avons pu réaliser une acquisition au X 60. L'analyse de la série de coupes optiques ainsi obtenues montre que, sur l'une d'entre elles, les marquages de PD 1, de PD2 et de l'histamine sont présents au même endroit (Fig. 37B1, en vert, rouge et bleu respectivement). Nous avons ensuite analysé la série de coupes optiques en multiplan en considérant les fluorophores deux par deux. L'observation du marquage de PD1 (Fig. 37B2, en vert) et du marquage pour PD2 (en rouge) montre que ces deux

**Figure 37 : Localisation des synapses histaminergiques sur les neurones PD.** Un neurone PD est injecté avec du dextran-fluorescéine (A1 en vert) puis, après fixation, une immunohistochimie est réalisée de façon à détecter l’histamine (A1, en rouge). Des acquisitions au microscope confocal à l’objectif X40 sont ensuite effectuées sur l’ensemble du STG puis le ganglion est reconstitué à partir des projections maximales de ces séries de coupes optiques (A1, 8 projections maximales de 113 coupes optiques de 1  $\mu\text{m}$  d’épaisseur mises bout à bout). Les zones pour lesquelles les deux marquages se superposent (en jaune) sur une seule coupe optique sont confirmées par observation à l’objectif X60 (encarts numérotés de 1 à 22, chacun correspond à une coupe optique de 0,3  $\mu\text{m}$  d’épaisseur, la barre en 1 représente 5  $\mu\text{m}$ ). Chaque zone est identifiée au moyen d’un marqueur puis observée en multiplans (A2). La série de coupes optiques réalisées à l’objectif X60 (en haut à gauche) est observée dans le plan X/Z (trait bleu) et dans le plan Y/Z (trait mauve). Sur chacun de ces plans, une zone de colocalisation des deux marquages est recherchée (en bas à gauche et en haut à droite respectivement). Les zones qui satisfont à ces critères sont considérées comme des zones pouvant potentiellement supporter des synapses chimiques histaminergiques. Sur une préparation, les deux neurones PD ont été injectés, l’un avec du dextran-fluorescéine (B1, en vert), l’autre avec du dextran-rhodamine (B1, en rouge). Ensuite, l’anticorps anti-histamine a été appliqué puis a été révélé par un anticorps anti-immunoglobuline de lapin couplé à la cyanine-5 (B1, en bleu ciel). Comme précédemment, des acquisitions à l’objectif X40 ont été réalisées sur l’ensemble du ganglion (B1, 8 projections maximales de 113 coupes optiques de 1  $\mu\text{m}$  d’épaisseur mises bout à bout). Sur une coupe optique à l’objectif X60 (B1, encart, la barre représente 5  $\mu\text{m}$ ), nous avons mis en évidence une colocalisation des trois fluorophores. L’observation en multiplans révèle que ces fluorophores sont bien colocalisés deux à deux dans une même zone (B2 : PD1 en vert et PD2 en rouge, B3 : PD1 en vert et histamine en rouge, B4 : PD2 en rouge et histamine en vert). De façon à confirmer définitivement ce résultat, le profil de fluorescence pour chaque fluorophore a été réalisé sur une coupe optique, le long d’une droite (C, en haut, trait rose, la barre représente 5  $\mu\text{m}$ ). Nous constatons que les trois fluorophores présentent un pic d’intensité de fluorescence pour un même point de la droite (C, en bas).





fluorophores sont colocalisés. La même analyse, aux mêmes niveaux en X et en Y de la série de coupes optiques, entre PD1 (Fig. 37B3, en vert) et l'histamine (en rouge) montre que ces marquages sont également colocalisés, tout comme ceux présents dans PD2 (Fig. 37B4, en rouge) et l'histamine (en vert).

Enfin, nous avons réalisé un profil d'intensité de fluorescence pour les différents marqueurs et pour une coupe optique sur une ligne orthogonale aux neurites (Fig. 37C, ligne rose). Le résultat ainsi obtenu est présenté sous forme de graphe. Il montre que, à une même distance de l'origine de la droite de mesure, un pic d'intensité est observable pour les trois fluorophores, signe qu'ils sont colocalisés en un même point de l'espace.

Ainsi, nos expériences de double marquage nous ont permis d'apporter un support morphologique aux interactions entre PD et le système histaminergique. Le triple marquage apporte un support morphologique à l'hypothèse d'une modulation directe des synapses électriques par l'histamine. Cependant, nos résultats ne nous permettent pas d'affirmer que l'histamine que nous visualisons ici provient des neurones PS car rien n'indique que ces neurones soient à l'origine de l'ensemble de l'innervation histaminergique dans le SNST. Par conséquent, nous avons caractérisé le système histaminergique sur l'ensemble du SNST de façon à identifier toutes les sources possibles de l'histamine dans le STG.

## 2- Description du système histaminergique au sein du SNST adulte.

Nous avons donc, dans un premier temps, réalisé des expériences d'immunohistochimie avec notre anticorps dirigé contre l'histamine sur des préparations entières de SNST. Nous avons trouvé deux corps cellulaires marqués dans l'*ivn* (Fig. 38A) correspondant aux neurones PS, dont les axones peuvent être suivis jusqu'à l'OG. Au niveau de ce ganglion (Fig. 38B) les axones de chacun de ces deux neurones se séparent dans les deux *ion* et dans l'*on*, donnant naissance à deux fibres nerveuses dans chaque *ion* ainsi qu'à deux fibres projetant dans l'*on*. Dans les *ion* les fibres de PS sont les seuls neurites immunopositifs à l'histamine alors que lorsque l'*on* se rapproche des *son*, une troisième fibre apparaît marquée, provenant soit du *stn*, soit de l'un des *son*. Les *son* possèdent de 5 à 11 fibres marquées à l'histamine mais l'origine de ces fibres n'a pas été déterminée, du fait de leur nombre important et de la difficulté à les suivre jusqu'au corps cellulaire qui leur donne naissance. Il n'est pas exclu que ces fibres proviennent des CoG puisqu'un marquage histaminergique important est détectable dans ces ganglions (Fig. 38C) : on y trouve en moyenne 9 neurones histaminergiques dont 3 sont en général localisés le long du connectif et les 6 autres sont proches du *son*. De plus, nous pouvons noter la présence d'un important neuropile immunopositif à l'histamine au centre des CoG (astérisque). Les fibres histaminergiques présentes dans les *son* se rencontrent au niveau de la jonction de l'*on* et du *stn* et il apparaît nettement que certaines bifurquent dans le *stn* (Fig. 38D). Une partie de

**Figure 38 : Immunoréactivité à l'histamine dans le SNST adulte.** L'anticorps anti-histamine a été utilisé sur des préparations de SNST adulte dégainées, puis révélé avec un anticorps anti-immunoglobuline de lapin couplé à de la cyanine-5. Deux corps cellulaires, correspondant aux neurones PS, sont marqués dans l'*ivn* (A, projection maximale de 29 coupes optiques de 3  $\mu\text{m}$ ), 12 neurones sont également marqués dans les CoG (C, projection maximale de 35 coupes optiques de 3  $\mu\text{m}$ ) ainsi que du neuropile (astérisque) et d'autres encore, correspondant aux neurones GPR, apparaissent immunoréactifs à l'histamine dans les *lvn* (F, têtes de flèche, projection maximale de 58 coupes optiques de 2  $\mu\text{m}$ ). Des fibres nerveuses, correspondant aux prolongements neuritiques des neurones PS, sont notamment révélées dans l'OG (B, projection maximale de 23 coupes optiques de 3  $\mu\text{m}$ ), dont la bifurcation dans l'*on* et les *ion* apparaît nettement sur cette micrographie. De nombreuses fibres nerveuses sont visibles au niveau de la jonction des *son*, de l'*on* et du *stn* (D, projection maximale de 43 coupes optiques de 3  $\mu\text{m}$ ) ainsi qu'un neuropile dense dans le STG (E, projection maximale de 29 coupes optiques de 3  $\mu\text{m}$ ).







ces fibres, 7 en moyenne, parviennent jusqu'au STG (Fig. 38E) où du neuropile histaminergique est observé, constitué d'un marquage sous forme de ponctuation dense, suggérant une importante innervation histaminergique des neurones de ce ganglion. Des fibres histaminergiques, 5 en moyenne, sont également présentes dans le *dvn*. Enfin, nous avons trouvé que les neurones sensoriels GPR, localisés dans les *lvn* (Fig. 38F, têtes de flèche), présentent une très importante immunoréactivité histaminergique jamais décrite à ce jour. Il apparaît donc que le neuropile histaminergique observé au niveau du STG peut provenir de trois sources différentes : les neurones PS, les neurones histaminergiques des CoG et les neurones GPR (Fig. 39). Notons que cette immunoréactivité se retrouve très tôt au cours du développement dans les neurones PS, dans les neurones des CoG ainsi que dans les GPR (résultats non montrés).

Cet anticorps n'ayant jamais été utilisé, à notre connaissance, chez les crustacés, les résultats que nous venons de décrire peuvent résulter d'un marquage aspécifique. En effet, des travaux réalisés précédemment avec un autre anticorps (Faumont, 1999) n'ont permis de mettre en évidence que quatre corps cellulaires histaminergiques dans l'ensemble du SNST (les deux PS et un neurone dans chaque CoG). Pour vérifier la spécificité de notre anticorps primaire vis-à-vis de l'histamine, une préincubation de cette immunoglobuline a été réalisée soit avec de l'histamine soit avec de la sérotonine toutes deux à une concentration de  $10^{-3}$  M. Ensuite, le mélange a été appliqué sur des *ivn* dégainés puis l'anticorps primaire a été révélé par incubation avec l'anticorps secondaire. Les neurones PS (Fig. 40A1) ne sont pas marqués lorsque l'anticorps primaire est incubé avec l'histamine (Fig. 40A2), ce qui montre que notre anticorps a une plus forte affinité pour l'histamine que pour d'autres neurotransmetteurs trouvés dans le SNST de homard. L'incubation avec la sérotonine, amine trouvée dans les GPR (Katz et al., 1989; Kilman et al., 1999; Tierney et al., 1999), n'empêche pas la réaction de l'anticorps puisque les neurones PS (Fig. 40B1) et GPR (Fig. 40B2) ainsi que le STG et les CoG présentent le marquage typique que nous avons décrit précédemment. Le marquage que nous avons observé chez l'adulte ne résulte donc pas d'un artefact mais relève bien d'une interaction spécifique de l'anticorps avec l'histamine présente dans le SNST.

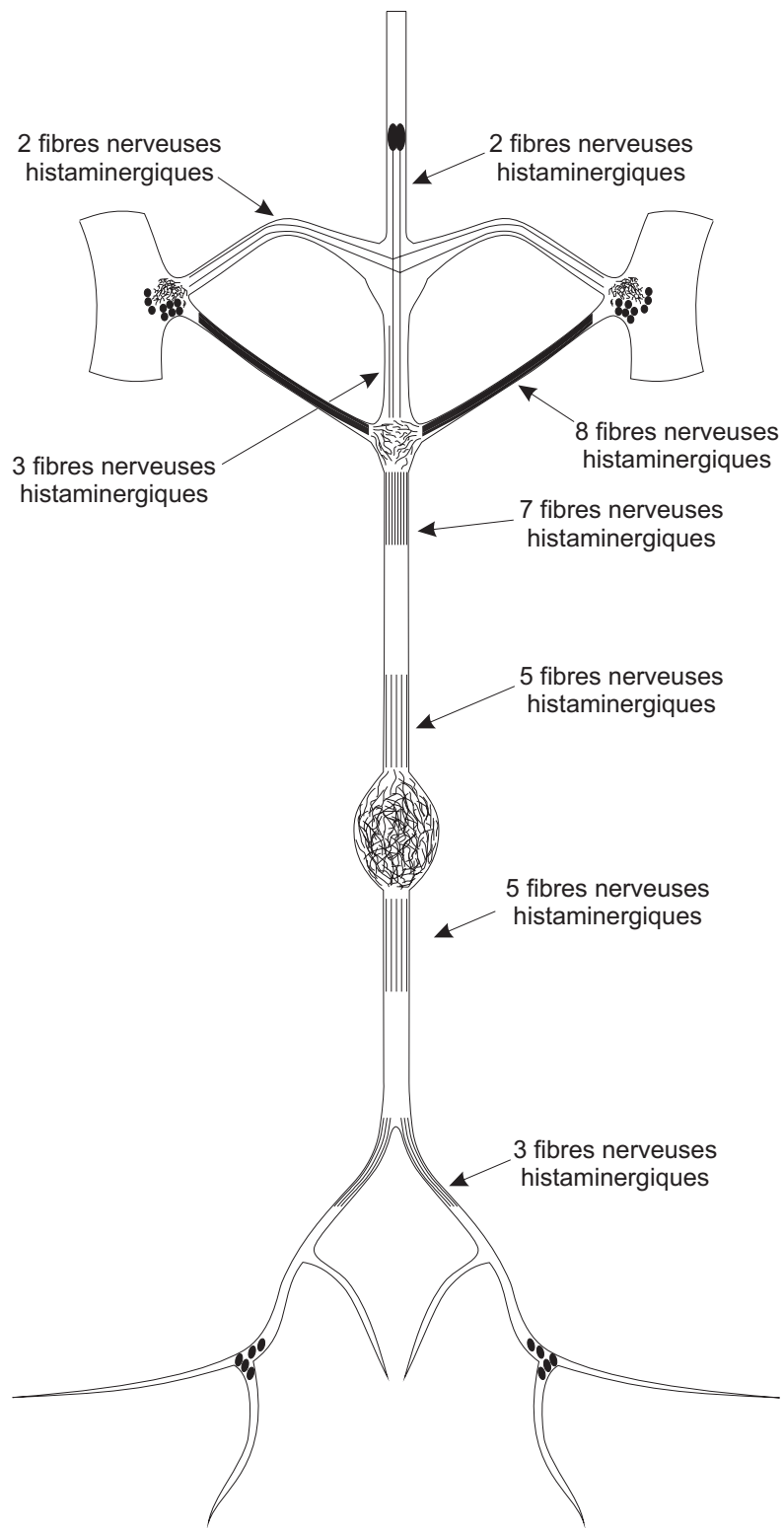
## VIII- Discussion.

---

Au cours de ce travail, nous avons montré que PS diminue directement à la fois la résistance d'entrée des neurones PD et leur coefficient de couplage. Cet effet passe principalement par l'histamine car des antagonistes histaminergiques empêchent le neurone PS de réaliser son action sur la résistance d'entrée des PD et altère considérablement ses capacités à diminuer la force des synapses électriques entre les PD. De plus, l'éjection d'histamine à proximité du ganglion permet de reproduire

**Figure 39 : Schéma récapitulatif des marquages histaminergiques dans le SNST adulte.**

Les fibres (traits noirs) et les neurones histaminergiques (ronds noirs) sont indiqués dans un schéma du SNST adulte. Le nombre moyen de neurites immunopositifs pour l'histamine, observés sur 6 préparations, est indiqué pour les différents nerfs.

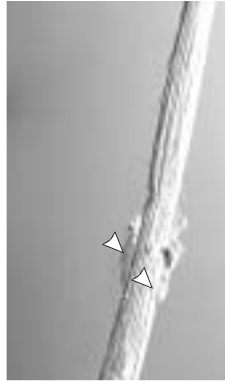


**Figure 40 : L'anticorps dirigé contre l'histamine est spécifique de ce neurotransmetteur.**

Pour vérifier la spécificité de l'anticorps primaire anti-histamine dont nous disposons, des contrôles ont été effectués. Lorsque l'anticorps est incubé 24 heures avec de l'histamine à  $10^{-3}$  M puis appliqué sur des préparations d'*ivn* contenant les neurones PS (A1, têtes de flèche, micrographie en contraste de phase) l'anticorps secondaire ne révèle aucun marquage des neurones PS (A2, projection maximale de 30 coupes optiques de 3  $\mu\text{m}$ ). Lorsque l'anticorps primaire est incubé avec de la sérotonine  $10^{-3}$  M avant d'être utilisé, les neurones PS ainsi que les neurones situés dans le *lvn*, les GPR, sont marqués (B1 et B2, têtes de flèche, projections maximales de 19 coupes optiques de 3  $\mu\text{m}$ ).

Préincubation de l'anticorps primaire avec de l'histamine  $10^{-3}$  M

**A1**



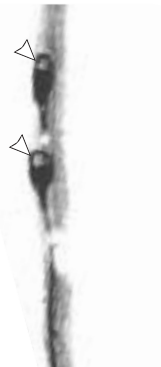
**A2**



100  $\mu$ m

Préincubation de l'anticorps primaire avec de la sérotonine  $10^{-3}$  M

**B1**



**B2**



100  $\mu$ m





une partie des effets de PS sur l'activité de PD et sur leur couplage électrique ainsi que la totalité de ses effets sur la résistance d'entrée.

Les effets de l'histamine sur la résistance d'entrée et sur le coefficient de couplage sont par ailleurs bien distincts : nous avons démontré par des applications de longue durée que la diminution de la résistance d'entrée est due à l'ouverture d'une conductance capable de se désensibiliser alors que les effets de l'histamine sur le coefficient de couplage se maintiennent pendant toute la durée de l'application. L'histamine est donc bien capable de moduler l'efficacité des synapses électriques. De plus, l'histamine diminue de façon drastique l'étendue du couplage métabolique du neurone PD vers les autres neurones du STG, notamment en supprimant la diffusion de la neurobiotine de PD vers les neurones gastriques (DG et LPG) qui lui sont couplés en conditions contrôles. De plus, l'histamine est capable de réduire fortement le coefficient de couplage de PD vers ces deux neurones. La caractérisation morphologique des interactions entre le neurone PD et le système histaminergique nous a permis de démontrer l'existence d'appositions entre les neurones PD et le neuropile histaminergique. Certaines de ces appositions sont par ailleurs localisées à proximité immédiate des zones d'apposition entre les deux PD. Ces zones de triple apposition constituent un support morphologique potentiel pour l'hypothèse selon laquelle des synapses histaminergiques seraient à proximité immédiate des synapses électriques et réguleraient ainsi leur fonctionnement. Notons cependant que, lors de cette caractérisation immunocytochimique, nous avons révélé la présence de multiples sources d'histamine au sein du SNST, questionnant l'idée selon laquelle PS serait à l'origine de l'ensemble de l'innervation histaminergique du SNST (Christie et al., 2004; Faumont, 1999).

### 1- Les effets de PS sur le neurone PD.

Nous avons montré deux effets principaux des interneurons PS sur les neurones PD : PS est capable de diminuer la résistance d'entrée des neurones PD et leur coefficient de couplage.

Ce premier effet de PS sur la résistance d'entrée a déjà été montré sur des neurones du STG de *Cancer borealis* (Claiborne and Selverston, 1984). Les auteurs montrent qu'en stimulant les neurones équivalents aux neurones PS chez le crabe, les neurones ventriculaires inférieurs (neurones IV), la résistance membranaire de certains neurones du STG diminue à cause de l'ouverture d'une conductance chlorure et d'une conductance potassique plus faible. L'ouverture de ces canaux et l'entrée d'ions chlorures dans la cellule peuvent expliquer l'hyperpolarisation des neurones PD concomitante avec une diminution de leur résistance d'entrée. Outre l'hyperpolarisation des neurones pyloriques comme PD, qui participe probablement aux effets supprimeurs des neurones PS sur le réseau pylorique du homard (Cazalets et al., 1990a), la diminution de la résistance d'entrée crée un effet de « shunt » qui pourrait participer à la perte des propriétés oscillatoires des neurones PD suite à



la décharge de PS (Cazalets et al., 1990b). De plus, comme chez le crabe, la majeure partie des conductances ouvertes par la stimulation des neurones PS se désensibilise.

Les effets de PS sur le couplage électrique des neurones du STG n'avaient, jusqu'à présent, jamais été étudiés. Nous montrons que la stimulation de PS induit une forte diminution du coefficient de couplage entre les neurones PD. Cependant, il n'est pas possible de déterminer si cette diminution est le fruit de la diminution de la résistance d'entrée ou si au contraire, PS est capable d'agir de manière spécifique sur les synapses électriques. Plusieurs indices laissent cependant supposer que cette deuxième hypothèse est probable.

Premièrement, les effets de PS sur la résistance d'entrée de PD et sur leur coefficient de couplage ont des propriétés très distinctes. En effet, la conductance ouverte par PS se désensibilise au fur et à mesure des stimulations, ce qui entraîne une diminution de résistance d'entrée moins importante au cours de stimulations successives de l'*ivn*. Ainsi, nous devrions également observer une moins grande diminution des couplages électriques si les variations de résistance étaient à l'origine des variations de coefficient de couplage. Or, les diminutions de coefficient de couplage sont identiques pour les deux stimulations de PS. De plus, nous remarquons que les valeurs de coefficient de couplage ne reviennent pas à leur valeur de contrôle après la première stimulation de PS, suggérant des effets à long terme de ces neurones sur les synapses électriques, alors que nous observons un retour systématique des valeurs de résistance d'entrée.

En second lieu, lorsque la cimétidine ou l'histamine sont appliquées dans le liquide physiologique, toute modification de la résistance d'entrée est abolie alors qu'une diminution de coefficient de couplage persiste. Il existe donc des modifications du coefficient de couplage entre les neurones PD indépendantes des modifications de résistance d'entrée.

Ces deux points indiquent donc que les neurones PS peuvent agir spécifiquement sur les synapses électriques. Il est important de noter que la diminution de la résistance d'entrée induite par PS contribue, par un effet de « shunt », à diminuer davantage le couplage électrique entre les neurones

## 2- Comparaison des effets de l'application de l'histamine et de la mise en jeu des neurones PS sur les neurones PD.

De nombreuses études montrent que les neurones PS et les neurones IV utilisent l'histamine comme neurotransmetteur. D'une part, ces deux types de neurones sont immunopositifs à l'histamine (Christie et al., 2004; Faumont, 1999; Le Feuvre et al., 2001; Mulloney and Hall, 1991; Pulver et al., 2003). D'autre part l'histamine est capable de mimer une partie des effets de PS (Christie et al., 2004; Claiborne and Selverston, 1984; Faumont, 1999) et, comme les neurones PS, elle ouvre une conductance chlorure chez les crustacés (Bayer et al., 1989; Hashemzadeh-Gargari and Freschi, 1992; McClintock and Ache, 1989). Enfin, la cimétidine bloque à la fois les effets des neurones PS et de



l'histamine (Bayer et al., 1989; Christie et al., 2004). Dans cette étude, nous retrouvons des similarités des effets de PS et de l'histamine au niveau de leurs influences sur les neurones PD. La diminution de résistance d'entrée présente de fortes similarités lorsqu'elle est induite par une stimulation de l'*ivn* ou une éjection d'histamine à proximité du ganglion, notamment en ce qui concerne les propriétés de désensibilisation. Par ailleurs, l'activation de PS comme l'éjection d'histamine provoquent une importante diminution du coefficient de couplage entre les PD.

Cependant, les effets de PS ne sont reproduits qu'en partie par l'application locale d'histamine. En effet, la stimulation des PS induit une forte diminution des coefficients de couplage pouvant durer plusieurs minutes. Cet effet à long terme n'est pas retrouvé lors de l'application locale d'histamine. Pourtant nos études montrent que l'histamine est nécessaire à l'obtention de ces effets à long terme, la stimulation de PS en présence de cimétidine ne permettant pas de les obtenir. Plusieurs hypothèses peuvent rendre compte de cette différence dans les effets à long terme entre la stimulation de PS et l'application d'histamine. Premièrement, la cimétidine pourrait ne pas être suffisamment spécifique du système histaminergique chez les crustacés et donc entraver l'action d'autres substances libérées lors de la stimulation de PS, qui seraient responsables de son effet à long terme. En effet, PS est connu pour exprimer de nombreux neurotransmetteurs : histamine (Christie et al., 2004; Faumont, 1999; Le Feuvre et al., 2001; Mulloney and Hall, 1991; Pulver et al., 2003), peptides apparentés au FMRF-amide (Christie et al., 2004; Faumont, 1999; Fenelon et al., 1998; Le Feuvre et al., 2001; Skiebe et al., 1999b; Tierney et al., 1997), orcokinines (Li et al., 2002; Skiebe et al., 2002) et probablement acétylcholine (pour revue, voir Skiebe, 2003). Deuxièmement, comme mentionné dans les résultats, il est possible d'envisager que cet effet à long terme résulte d'un phénomène de co-modulation nécessitant l'action conjointe d'au moins deux neuromodulateurs, l'histamine et une autre substance. En effet, la stimulation de PS après blocage du système histaminergique n'induit pas cet effet (car seule l'autre substance est active) et l'application d'histamine seule n'est pas non plus suffisante pour reproduire cet effet car il manque l'autre substance.

Le nombre important de substances potentiellement libérées par PS dans le STG pourrait par ailleurs expliquer les différences observées dans l'amplitude des réponses lors de la stimulation de PS d'une part, et lors de l'éjection d'histamine d'autre part. En effet, l'histamine entraîne une diminution de la résistance d'entrée et du coefficient de couplage plus importante que la stimulation de PS. On peut envisager que les co-transmetteurs libérés par PS limitent les diminutions de résistance et de coefficient de couplage de façon à assurer un contrôle fin de ces deux paramètres. Une autre hypothèse est que la quantité d'histamine éjectée par le puff est bien supérieure à celle libérée par PS, expliquant ainsi la plus forte diminution de résistance et de coefficient de couplage obtenues par l'application exogène de neurotransmetteur.

Nous avons déjà noté que la stimulation des PS ainsi que l'application d'histamine entraînent une diminution de résistance d'entrée. L'une des caractéristiques de cette diminution est sa très forte



désensibilisation au cours du temps. Cette désensibilisation n'est plus observée en présence d'une solution contenant des bloqueurs des conductances ioniques telle celle utilisée dans les expériences de la figure 26A alors qu'elle persiste lorsque seules la TTX et la PTX sont utilisées. Or, l'histamine est connue pour ouvrir de fortes conductances chlorures et de plus faibles conductances potassiques chez *Panulirus interruptus* (Claiborne and Selverston, 1984; Sigvardt and Mulloney, 1982). Comme du TEA est présent dans la solution de blocage et que c'est un inhibiteur des conductances potassiques, il est fort probable qu'au moins une des conductances impliquées dans ce phénomène de désensibilisation soit une conductance potassique ouverte par l'histamine chez *Homarus gammarus*.

Nous avons utilisé cette propriété de désensibilisation pour déterminer si l'action de l'histamine sur les coefficients de couplage résulte d'une modulation de l'efficacité des synapses électriques ou d'un « shunt » lié à la diminution de la résistance d'entrée de PD. Nous avons montré que l'histamine agit bien sur les synapses électriques indépendamment de ses effets sur la résistance d'entrée. De nombreux travaux ont reporté l'implication des amines dans la modulation des synapses électriques que ce soit chez les vertébrés (Hampson et al., 1992; He et al., 2000; McMahan and Brown, 1994; McMahan et al., 1989; McMahan and Mattson, 1996; Rorig and Sutor, 1996) ou les invertébrés (Johnson et al., 1993; Johnson et al., 1994; Moss et al., 2005; Wildering and Janse, 1992). Par contre, peu de travaux ont rapporté une modulation des synapses électriques par l'histamine (Figuerola et al., 2004; Hatton and Yang, 1996; Hatton and Yang, 2001).

### 3- Rôles fonctionnels de la modulation des synapses électriques lors de la reconfiguration par PS.

Nous avons observé que l'histamine diminue les couplages électriques du neurone PD de manière générale, c'est-à-dire que non seulement elle diminue la force des couplages électriques entre les deux PD et entre PD et AB (non montré dans ce manuscrit) mais également entre PD et les neurones gastriques DG et LPG. Elle fait également disparaître le couplage métabolique entre le réseau pylorique et le réseau gastrique (par l'intermédiaire des synapses entre PD et DG d'une part et PD et LPG d'autre part). Si nous considérons que la décharge de PS a les mêmes effets sur les jonctions gap que l'application d'histamine, il est donc possible d'imaginer que les neurones PS ont le même effet de découplage intra et inter-réseaux.

La diminution des couplages au sein du groupe pacemaker pylorique (que ce soit entre PD et AB ou entre les deux PD) pourrait être à l'origine de l'arrêt des oscillations dans les neurones PD. Si *Cazalets et al.* (1990b) ont montré que l'arrêt des oscillations de AB suite à la décharge des PS n'a pas lieu lorsque les deux neurones PD sont tués, suggérant ainsi un rôle fondamental pour les jonctions gap dans cette inhibition des propriétés oscillatoires de AB, nous avons cependant observé que, dans la majorité des préparations, le neurone AB ne montre pas d'inhibition à moyen et à long terme de ses





capacités oscillatoires, à l'inverse des PD. Il y a donc un découplage des oscillations au sein du groupe pacemaker après la décharge de PS, le neurone AB continuant à osciller alors que les neurones PD n'oscillent plus. Dans ces conditions, il est logique de faire l'hypothèse que la fermeture des synapses électriques provoquée par la décharge de PS autorise ce découplage physiologique. Notre hypothèse de travail était donc qu'en rétablissant les synapses électriques au sein du groupe PD-AB, nous forcerions la réapparition des oscillations dans l'ensemble du groupe ce qui empêcherait la reconfiguration des réseaux par PS.

Une autre conséquence de la fermeture des jonctions gap suite à la décharge de PS pourrait être de supprimer la modulation pylorique qui affecte normalement les neurones gastriques DG et LPG via la fermeture des synapses électriques unissant ces neurones à PD. Notre hypothèse de travail était donc que l'arrêt de cette modulation pylorique est nécessaire d'une façon ou d'une autre à la reconfiguration des réseaux par PS.

Ne pouvant pas bloquer de façon spécifique la diminution de la force des jonctions gap par des agents pharmacologiques nous avons utilisé la technique de dynamic clamp qui permet de rétablir, pendant et dans les secondes qui suivent la décharge de PS, les synapses électriques fermées par celui-ci. Le rétablissement des synapses électriques entre PD et AB d'une part et entre PD et DG ou LPG d'autre part par dynamic clamp (n=2) ne nous a pas permis de bloquer les effets de PS. Il est probable que cette absence d'effet soit due en partie à des problèmes techniques. En effet, le système de dynamic clamp permet de mimer la présence de synapses électriques au niveau des corps cellulaires alors que nous avons vu que les zones potentielles de localisation des synapses électriques sont situées loin du soma au sein de l'arborisation dendritique. De plus, nous noterons que notre système de dynamic clamp ne nous a pas permis de rétablir plus d'une seule synapse par expérience alors qu'il aurait été probablement nécessaire de compenser la fermeture de toutes les synapses électriques affectées par la décharge PS.

#### 4- Synapses histaminergiques sur le neurone PD.

Le nombre de synapses chimiques histaminergiques sur le neurone PD est assez faible : il varie de 4 à 22 (13 en moyenne). Ces chiffres sont comparables à ceux révélés par des études menées chez la sangsue montrant que 13 à 30 contacts synaptiques sont présents entre un neurone sensoriel et un motoneurone, répartis sur l'ensemble de l'arborisation motoneuronale (DeRiemer and Macagno, 1981). Par contre, ce nombre de synapses paraît assez élevé en comparaison des deux sites d'apposition observés au microscope confocal entre deux neurones du STG de homard, LP et PD (Cabirol-Pol et al., 2002). Il se pourrait donc que les relations synaptiques au sein d'un réseau local soient supportées par un faible nombre de synapses alors que les interactions à distance nécessitent un plus grand nombre de synapses pour parvenir à une efficacité similaire. Au sein du STG, les larges



dépolarisations produites par les neurones, en particulier pylorique, se propagent avec peu de pertes et sont donc capables de produire une forte libération de neurotransmetteur via les synapses graduelles (Anderson and Barker, 1981; Graubard et al., 1980; Graubard et al., 1983; Raper, 1979). Ainsi, peu de synapses chimiques sont nécessaires à une transmission efficace du signal vers les cellules cibles. Au contraire, pour les neurones éloignés de leurs cibles, comme les neurones modulateurs et sensoriels projetant sur des motoneurones, la transmission du message dépend de la genèse de potentiels d'action pour éviter l'atténuation de signal due à la grande distance séparant ces neurones de leurs cibles. Or, les potentiels d'action, même émis en bouffées à très haute fréquence, n'entraîneraient qu'une faible libération de neurotransmetteurs. Ainsi, les neurones utilisant ce type de communication auraient besoin d'un plus grand nombre de sites de libération de neurotransmetteur pour transmettre efficacement l'information. D'autre part, la grande quantité de neurotransmetteurs mis en jeu par les synapses graduelles dans le STG devrait entraîner d'importantes modifications du potentiel postsynaptique qui pourrait donc se propager dans l'ensemble de la cellule malgré les phénomènes d'atténuation. A l'inverse, chaque potentiel d'action ne libérant qu'une faible quantité de neurotransmetteur, il est probable que les modifications du potentiel postsynaptique déclenchées par celui-ci soient de plus faible amplitude (malgré les phénomènes de sommation temporelle). Ces variations de potentiel se trouveront donc plus facilement atténuées et ne pourront donc pas affecter l'ensemble de l'arborisation. La répartition homogène des synapses sur l'arborisation permettrait donc d'affecter la totalité de l'arborisation du neurone postsynaptique. A l'appui de cette hypothèse nous avons mis en évidence que les synapses histaminergiques sur PD ne sont pas localisées préférentiellement au niveau du STG mais que ces synapses sont retrouvées aussi bien sur des branches situées plutôt du côté du *stn* que sur des neurites proches du *dvn*.

Nous avons trouvé que l'histamine reproduit au moins en partie les effets de la mise en jeu des neurones PS. De plus, nous avons mis en évidence l'existence d'un support morphologique possible à une action directe de l'histamine sur les synapses électriques (voir triple marquage). Par contre, notre étude immunocytochimique a révélé que le neuropile histaminergique présent dans le STG peut provenir d'autres sources que les neurones PS. Chez le crabe, des études immunocytochimiques ont permis de montrer que seules deux fibres histaminergiques sont présentes dans le *stn* et que ces deux fibres sont les prolongements des neurones IV (Christie et al., 2004). Ceci a amené Christie et al. à suggérer que les neurones IV constituent la seule source d'histamine dans le STG (voir également Faumont, 1999). Notre étude a, au contraire, révélé la présence d'en moyenne cinq fibres nerveuses dans le *stn* ce qui suggère fortement que les neurones PS ne constituent pas la seule source d'histamine pour le STG. En effet, nous avons mis en évidence trois sources d'histamine dans le SNST : des neurones commissuraux, les neurones PS et les neurones sensoriels GPR.

Le marquage de neurones dans les CoG a déjà été reporté chez le crabe (Christie et al., 2004). Dans ce modèle, 0 à 6 neurones commissuraux sont histaminergiques, l'un deux se trouvant à la



périphérie et projetant un axone dans le connectif périoesophagien. Les autres neurones sont trop faiblement marqués pour pouvoir mettre en évidence la présence d'un axone histaminergique. Même si nous trouvons un nombre de neurones histaminergiques dans les CoG du homard plus important que dans les CoG du crabe, les deux marquages présentent de grandes similitudes. En effet, nous trouvons également 1 à 3 neurones situés en périphérie du ganglion qui sont fortement marqués et dont l'axone semble projeter dans les connectifs et 5 à 9 grosses cellules rondes proches des *son*, avec un marquage plus faible et ne présentant pas d'axone visible. Les cibles de ces cellules histaminergiques restent donc à déterminer. A l'heure actuelle, on ne peut pas exclure qu'elles projettent sur le STG.

Une autre source possible d'histamine a été identifiée en montrant l'immunoréactivité histaminergique des neurones GPR. A notre connaissance, c'est la première fois qu'une immunoréactivité histaminergique dans ces neurones sensoriels est reportée. En effet, les neurones GPR sont connus pour exprimer l'allatostatine, la sérotonine, le peptide FLRF-amide et l'acétylcholine (Katz et al., 1989; Katz and Harris-Warrick, 1989; Kiehn and Harris-Warrick, 1992b; Kilman et al., 1999; Marder et al., 1995; Skiebe, 1999a; Tierney et al., 1999). Il a été montré que ces neurones sensoriels GPR contactent des neurones modulateurs dans les CoG (Beenhakker et al., 2005; Blitz et al., 2004) mais aussi qu'ils établissent des synapses fonctionnelles avec certains neurones du STG (Katz and Harris-Warrick, 1989; Katz and Harris-Warrick, 1990; Katz and Harris-Warrick, 1991). Ainsi, une partie de l'arborisation histaminergique du STG pourrait provenir de ces neurones sensoriels et PS ne serait donc pas l'unique source d'histamine pour ce ganglion. Au cours de nos observations, nous avons cependant remarqué la présence de fibres nerveuses histaminergiques de forts diamètres semblant traverser le ganglion. Il semble donc important de déterminer si les neurones GPR établissent effectivement des contacts histaminergiques au sein du STG ou s'ils les réservent aux neurones modulateurs des ganglions antérieurs.



## *Chapitre 4*

*Modulation des synapses électriques lors de la maturation des réseaux de neurones : rôles du GABA dans l'émergence des réseaux adultes du SNST*

*Dans les sciences, le chemin est plus important que le but. Les sciences n'ont pas de fin.  
Erwin Chargaff*





## I- Introduction.

---

---

Les expériences présentées dans le chapitre précédent ont démontré l'existence d'une modulation aussi bien de l'étendue (diffusion de neurobiotine) que de la force (coefficient de couplage) des couplages électriques. Cette modulation peut résulter de la mise en jeu directe de certains neurones modulateurs, connus pour induire une plasticité d'expression des réseaux adultes.

La modulation des synapses électriques est également susceptible de jouer un rôle fondamental dans la plasticité ontogénétique des réseaux de neurones. En effet, des études ont permis de démontrer que, aux stades précoces du développement embryonnaire, les neurones sont massivement mais transitoirement couplés, l'étendue du couplage diminuant au cours de l'ontogenèse (Connors et al., 1983; Peinado et al., 1993a). Cependant, le rôle de cette diminution dans la maturation et l'expression des réseaux au cours du développement demeure inconnu.

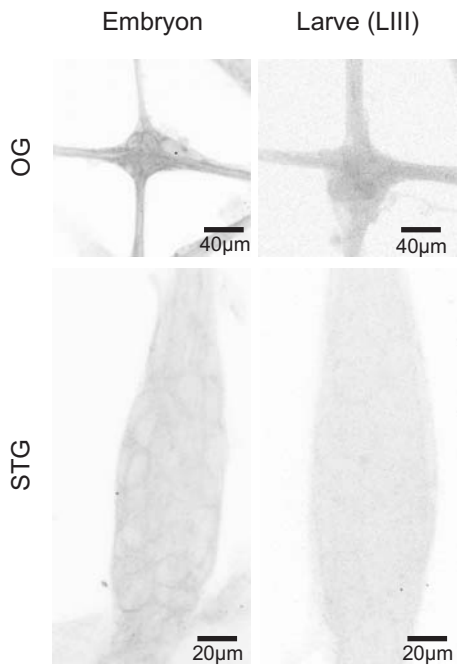
Dans le présent chapitre nous nous sommes demandés si une telle diminution des couplages électriques s'observe durant l'ontogenèse des réseaux du SNST et quels peuvent en être les mécanismes de contrôle et les rôles fonctionnels au cours de la mise en place des réseaux.

Le développement du SNST du homard a fait l'objet de nombreuses études au sein du laboratoire. Le SNST, avec ses principaux nerfs et ganglions, est identifiable très tôt au cours du développement (Casasnovas and Meyrand, 1995). Il a été montré que la population de neurones du STG est également établie très précocement et ne subit pas de remaniement au cours de l'ontogenèse (Fenelon et al., 1998). De la même façon, l'architecture cellulaire du système modulateur (neurones modulateurs et projections de ces derniers) est en place dès la moitié du développement embryonnaire (Le Feuvre et al., 2001). Cependant, les neurotransmetteurs exprimés par ce système neuromodulateur diffèrent chez l'embryon et chez l'adulte (Fenelon et al., 1999; Kilman et al., 1999; Le Feuvre et al., 2001). Alors que les neurones du SNST adulte sont organisés en trois réseaux moteurs générant trois rythmes distincts (pylorique, gastrique et œsophagien), les neurones du SNST embryonnaire sont organisés en un réseau unique générant un patron moteur unifié (Casasnovas and Meyrand, 1995). Au cours de l'ontogenèse, il a été montré que : 1) l'expression des rythmes adultes se fait à partir de la métamorphose séparant les stades larvaires III et IV (Casasnovas and Meyrand, 1995), 2) un changement de l'environnement modulateur chez l'embryon peut conduire à l'expression anticipée des rythmes adultes (Le Feuvre et al., 1999) et 3) une étude de modélisation a suggéré qu'une diminution de la force et de l'étendue des couplages électriques peut à elle seule rendre compte de l'émergence de plusieurs réseaux distincts à partir d'un large réseau unique (Bem et al., 2002).

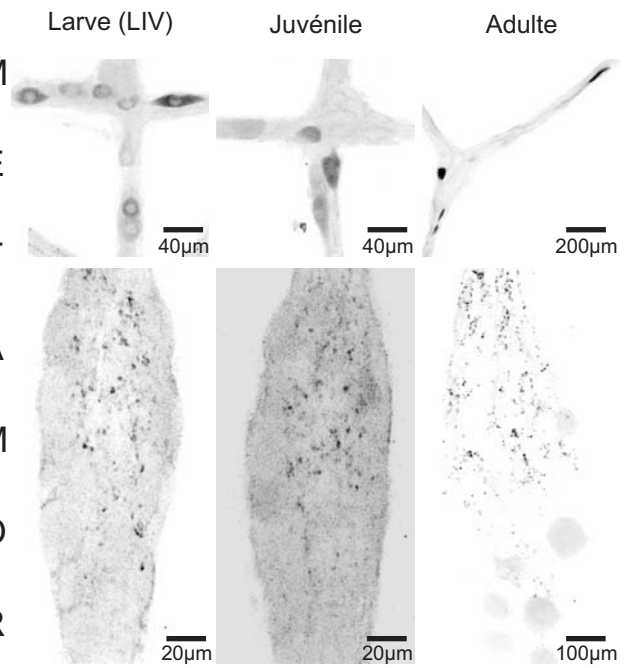
Des études complémentaires ont récemment permis de montrer que le neurotransmetteur GABA apparaît au sein du système neuromodulateur à l'issue de la métamorphose (Fig. 41). Son apparition coïncide donc avec l'expression des réseaux adultes. A ce jour cette modification de

**Figure 41 : Le GABA apparaît dans l'OG et dans le STG après la métamorphose, au moment de la scission de l'unique réseau embryonnaire en trois réseaux adultes.** Des expériences d'immunohistochimie visant à détecter le GABA montrent que ce neurotransmetteur est absent de l'OG et du STG du stade embryonnaire jusqu'au stade L III. Après la métamorphose (pointillés), des neurones œsophagiens expriment le GABA et du neuropile GABAergique est détecté dans le STG. Ces marquages se retrouvent du stade L IV au stade adulte. L'apparition du GABA dans l'OG et le STG coïncide donc avec l'apparition des trois réseaux adultes (pylorique, gastrique et œsophagien) à partir de l'unique réseau embryonnaire (B). Les micrographies présentées en A sont des projections maximales de 24 à 42 coupes optiques de 1 à 3  $\mu\text{m}$  réalisées à l'objectif X50 à immersion à eau (pour les stades embryonnaire, L III, L IV et juvénile) et à l'objectif X10 (pour le stade adulte).

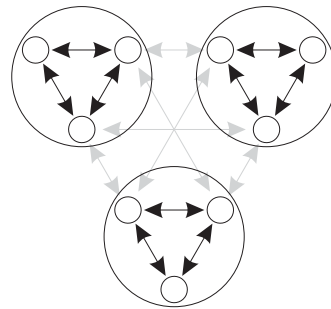
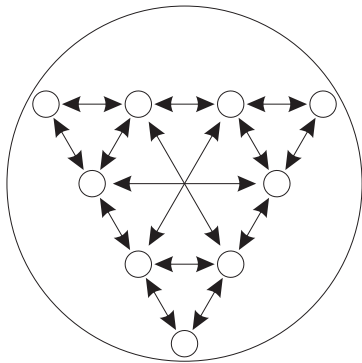
**A**



M  
E  
T  
A  
M  
O  
R  
P  
H  
O  
S  
E



**B**





l'expression du GABA constitue la seule altération de l'environnement neuromodulateur connue qui coïncide avec l'émergence des réseaux adultes. Nous avons donc cherché à déterminer si l'apparition du GABA entraîne l'expression des réseaux adultes et si cet effet du GABA passe par une diminution de l'étendue et/ou de la force des couplages électriques. Un préalable à cette étude a été de démontrer qu'il y a bien une diminution des couplages électriques au sein du SNST au cours de l'ontogenèse.

## II- Diminution du couplage des neurones au sein du SNST au cours de l'ontogenèse.

---

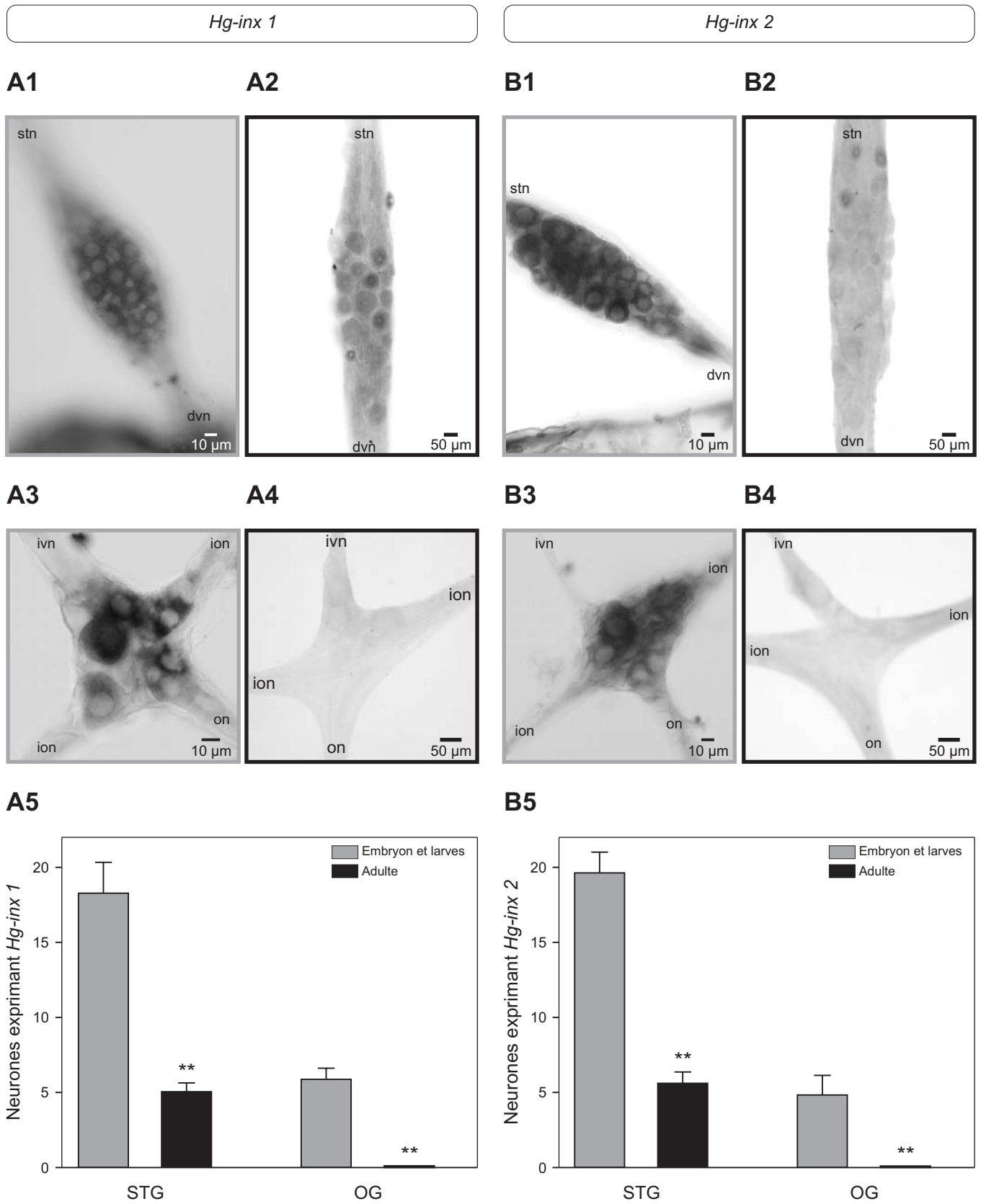
---

Nous avons vu, dans le chapitre 2, que nous disposons de trois outils pour étudier les synapses électriques : la diffusion de la neurobiotine, qui permet de connaître l'étendue du couplage métabolique des neurones, la mesure du coefficient de couplage, pour déterminer la force de ces synapses électriques et enfin l'hybridation *in situ*, qui permet d'étudier l'expression des ARN<sub>m</sub> des innexines 1 et 2 du homard. D'autre part nous avons montré, à l'aide de corrélations, que ces trois paramètres sont étroitement liés et que la mesure de l'un d'eux permet de prédire l'état des deux autres. Ainsi, une forte fréquence d'expression des innexines est associée à de fortes occurrences de couplage métabolique et de forts coefficients de couplage (Fig. 22). Pour des raisons techniques, essentiellement liées à la taille des cellules à enregistrer, il n'est pas possible de mesurer les coefficients de couplage dans le SNST embryonnaire. En revanche les autres approches expérimentales (diffusion de neurobiotine et hybridation *in situ* pour les innexines) peuvent être mises en œuvre aussi bien chez l'embryon que chez l'adulte. Nous nous sommes donc servis de ces techniques pour déterminer les modifications de couplage électrique au cours du développement.

### 1- Diminution de l'expression des innexines au cours du développement.

Nous avons, dans un premier temps, caractérisé l'expression des ARN<sub>m</sub> codant pour les innexines 1 et 2 sur des préparations embryonnaires et larvaires au stade LI, LII et LIII. Les hybridations *in situ* réalisées avec la sonde antisens *Hg-inx 1* sur des préparations de SNST embryonnaires et larvaires révèlent un nombre important de neurones du STG qui présentent un dense marquage en forme d'anneau autour de leur noyau (Fig. 42A1), signe que de nombreux neurones expriment l'innexine 1 alors que, dans les STG adultes, le nombre de neurones présentant ce type de marquage est plus faible (Fig. 42A2). De la même façon, les OG des préparations adultes (Fig. 42A4) n'ont en général aucun neurone exprimant l'innexine 1 alors que, dans les OG embryonnaires, plusieurs somas de neurones sont intensément marqués (Fig. 42A3). Les expériences réalisées avec la sonde antisens *Hg-inx 1* sur 11 STG embryonnaires et larvaires et 19 STG adultes indiquent que le nombre de neurones exprimant l'innexine 1 est significativement plus important chez l'embryon

**Figure 42 : Le nombre de neurones du SNST exprimant les innexines 1 et 2 du homard diminue au cours du développement.** Les micrographies réalisées après des hybridations *in situ* effectuées avec les sondes antisens *Hg-inx 1* (A) ou *Hg-inx 2* (B) montrent un nombre bien plus important de cellules marquées dans les STG des animaux avant métamorphose (micrographies A1, 27 neurones marqués pour *Hg-inx 1* et B1, 23 neurones marqués pour *Hg-inx 2*) que dans les STG adultes (micrographies A2 et B2 montrant 5 et 4 neurones exprimant les innexines 1 et 2 respectivement). De la même façon, plusieurs neurones expriment ces deux gènes dans les OG des animaux avant métamorphose (micrographies A3 et B3, avec 7 neurones marqués) alors qu'aucun neurone œsophagien n'exprime les ARN<sub>m</sub> des innexines chez l'adulte (micrographies A4 et B4). En moyenne,  $18,3 \pm 2,1$  neurones sont marqués dans les STG des animaux avant métamorphose pour l'innexine 1 (n=11) et  $19,6 \pm 1,4$  neurones expriment l'innexine 2 (n=8), alors que seulement  $5 \pm 0,6$  (n=19) et  $5,6 \pm 0,7$  (n=18) neurones expriment ces deux gènes respectivement chez l'adulte (A5 et B5). Dans l'OG des animaux avant métamorphose,  $5,9 \pm 0,7$  (n=8) et  $4,8 \pm 1,3$  (n=6) neurones expriment *Hg-inx1* et *Hg-inx* respectivement 2 alors qu'aucun neurone n'est marqué dans les OG adultes (n=10 et n=8 respectivement). Les étoiles représentent une différence significative du nombre de neurones exprimant l'innexine 1 ou 2 dans le ganglion considéré entre adultes et animaux avant métamorphose (Mann-Whitney rank sum test, \*\* : p<0,01).







(Mann-Whitney rank sum test,  $p < 0,01$ ), où 7 à 27 neurones sont marqués par la sonde *Hg-inx 1*, que chez l'adulte, où seuls 2 à 11 neurones expriment ce gène (Fig. 42A5). Les hybridations *in situ* effectuées sur 8 OG embryonnaires ou larvaires et sur 10 OG adultes montrent une très nette différence dans le nombre de cellules exprimant l'innexine 1 dans ce ganglion puisque plusieurs cellules sont marquées chez les embryons et les larves ( $5,9 \pm 0,7$  en moyenne) alors qu'aucun neurone œsophagien n'exprime l'innexine 1 chez l'adulte.

Les hybridations effectuées avec la sonde antisens *Hg-inx 2* rapportent des résultats similaires à ceux obtenus avec la sonde *Hg-inx 1*. En effet, dans les STG embryonnaires et larvaires (Fig. 42B1), plus de neurones présentent le marquage dense autour du noyau, signe de la présence d'ARN<sub>m</sub> pour l'innexine 2, à ces stades qu'au stade adulte (Fig. 42B2). Par ailleurs, plusieurs neurones dans les OG embryonnaires et larvaires sont marqués par la sonde (Fig. 42B3,  $n=6$ ), ce qui n'est pas le cas dans les OG adultes (Fig. 42B4,  $n=8$ ). Ainsi, les 9 STG embryonnaires et larvaires et les 18 STG adultes traités avec la sonde *Hg-inx 2* montrent que le nombre de cellules exprimant l'innexine 2 est significativement plus élevé chez les embryons et les larves (15 à 26 neurones marqués) que les adultes (2 à 10 neurones marqués) (Fig. 42B5, Mann-Whitney rank sum test,  $p < 0,001$ ).

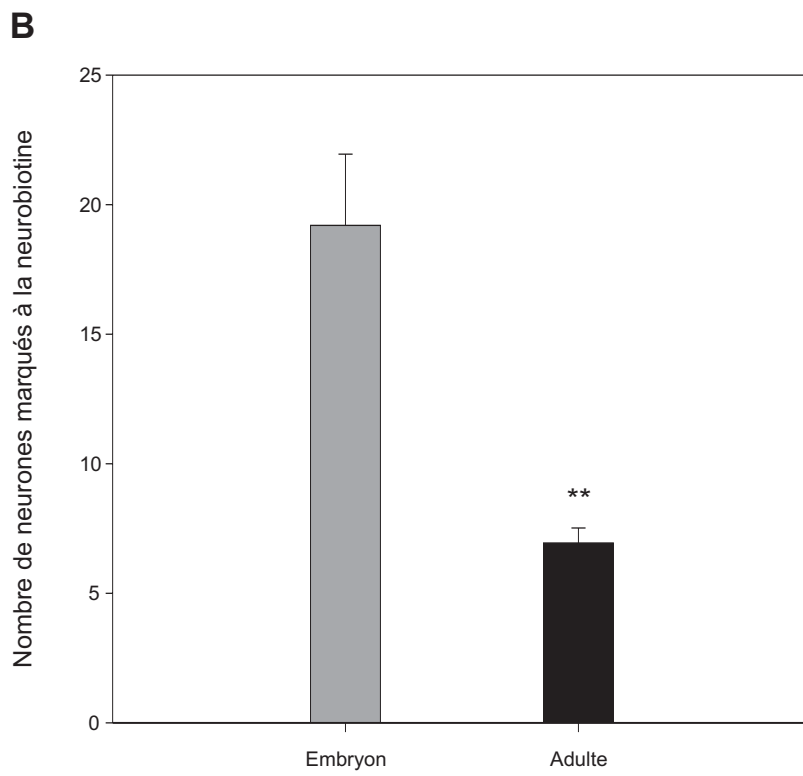
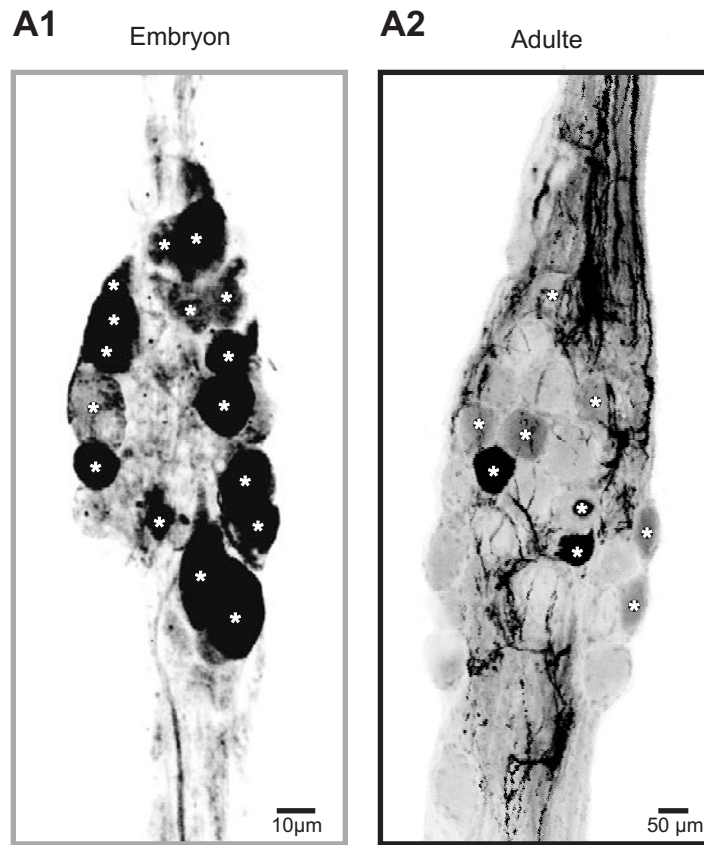
Ces résultats montrent que le nombre de neurones exprimant l'innexine 1 et l'innexine 2 diminue de manière drastique au cours du développement aussi bien dans le STG que dans l'OG. Nous avons alors cherché à déterminer si cette diminution de l'expression des ARN<sub>m</sub> codant pour les protéines formant les jonctions gap se traduit par une diminution de l'étendue des couplages électriques.

## 2- Diminution du couplage métabolique dans le STG au cours de l'ontogenèse.

En seconde approche, nous avons utilisé la diffusion de la neurobiotine pour déterminer si une diminution de l'étendue des couplages électriques peut être observée au cours du développement. Dans cette étude nous nous sommes limités au STG car d'une part les neurones de l'OG ne sont pas directement accessibles chez l'embryon et d'autre part le STG contient l'intégralité des neurones constituant les réseaux pylorique et gastrique. Nous avons donc injecté de la neurobiotine dans un neurone PD embryonnaire puis dénombré les neurones révélés par l'avidine-DCS couplée à un fluorophore (Fig. 43A1). Dans cet exemple, nous révélons, au total, 16 neurones marqués à la neurobiotine (astérisques), nombre bien supérieur à celui observé dans des préparations de STG adultes sur lesquelles la même expérience est réalisée (Fig. 43A2). Nous avons répété ces injections sur un total de 5 STG embryonnaires qui ont montré 13 à 28 neurones marqués à la neurobiotine soit une moyenne de  $19,2 \pm 2,7$ . Ce nombre de neurones est largement supérieur au nombre de neurones couplés à PD chez l'adulte, puisqu'une moyenne de  $6,9 \pm 0,6$  neurones seulement sont marqués lorsqu'un PD adulte est injecté à la neurobiotine. Ainsi, le nombre de neurones marqués lors de

**Figure 43 : L'étendue des couplages électriques diminue au cours du développement.**

Lorsqu'un neurone PD embryonnaire est injecté avec la neurobiotine, 16 neurones sont marqués au total (A1, projection maximale de 79 coupes optiques de 1  $\mu\text{m}$ , astérisques blancs), alors que seuls 9 neurones sont marqués lorsqu'un PD adulte est injecté à la neurobiotine (A2, projection maximale de 66 coupes optiques de 2,5  $\mu\text{m}$ ). Sur les 5 STG embryonnaires sur lesquels cette expérience a été réalisée, nous avons trouvés  $19,2 \pm 2,7$  neurones marqués (n=5), alors qu'une moyenne de  $6,9 \pm 0,6$  neurones (n=14) sont marqués chez l'adulte (B). Les étoiles indiquent une différence significative (One-Way ANOVA,  $p < 0,01$ ).





l'injection de neurobiotine dans le neurone PD embryonnaire est statistiquement supérieur (One-Way ANOVA,  $p < 0,01$ ) au nombre de neurones marqués lors de l'injection de neurobiotine dans le neurone PD adulte (Fig. 43B).

Ces expériences de diffusion de la neurobiotine indiquent donc que le couplage métabolique diminue au cours du développement. D'autre part, comme nous l'avons vu précédemment par hybridation *in situ*, une diminution de l'expression des ARN<sub>m</sub> codant pour les innexines est observée au cours du développement. Etant donné les corrélations qui ont pu être observées dans le second chapitre, il paraît raisonnable de supposer que l'on observe également une diminution de la force des couplages électriques au cours du développement. Enfin, les données obtenues par hybridation *in situ* suggèrent également que cette diminution du couplage électrique et métabolique n'intervient pas avant la fin du troisième stade larvaire.

Etant donné la concomitance de la diminution des couplages électriques, de l'apparition du GABA au sein du système neuromodulateur et de l'expression des rythmes adultes, nous avons cherché à déterminer l'influence du GABA sur l'expression des réseaux du SNST et sur le couplage électrique des neurones du STG aussi bien chez l'adulte que chez l'embryon.

### III- Rôles du GABA dans la maturation des réseaux du SNST.

---

---

Des résultats obtenus au laboratoire ont démontré que l'application exogène de GABA ou d'agonistes GABAergiques sur des préparations embryonnaires ne suffit pas à révéler l'expression des rythmes adultes. En effet, la superfusion de GABA exerce des effets très fortement inhibiteurs sur l'ensemble du SNST embryonnaire qui entraînent un arrêt total des activités rythmiques chez l'embryon. La plupart des agonistes GABAergiques caractérisés chez les vertébrés sont sans effet chez les invertébrés (Swensen et al., 2000a). De fait, l'application de ces agonistes sur les préparations embryonnaires ne modifie pas l'activité embryonnaire unique enregistrée sur ces préparations chez le homard (Le Feuvre, communication personnelle). En l'absence d'outils pharmacologiques permettant de mimer l'apparition du GABA chez l'embryon, nous avons donc utilisé la stratégie expérimentale inverse, à savoir bloquer les systèmes GABAergiques dans la préparation adulte. De la même façon que précédemment en l'absence d'antagonistes spécifiques du GABA efficaces chez les invertébrés, nous avons choisi d'utiliser un inhibiteur de la synthèse du GABA, l'acide 3-mercato-propionique (3-MPA). Cette molécule a déjà été utilisée avec succès chez les invertébrés (Golan and Grossman, 1996; Le Bon-Jego and Cattaert, 2002; Pearlstein et al., 1998) et le blocage de la synthèse du GABA peut être aisément vérifiée par des approches immunocytochimiques.

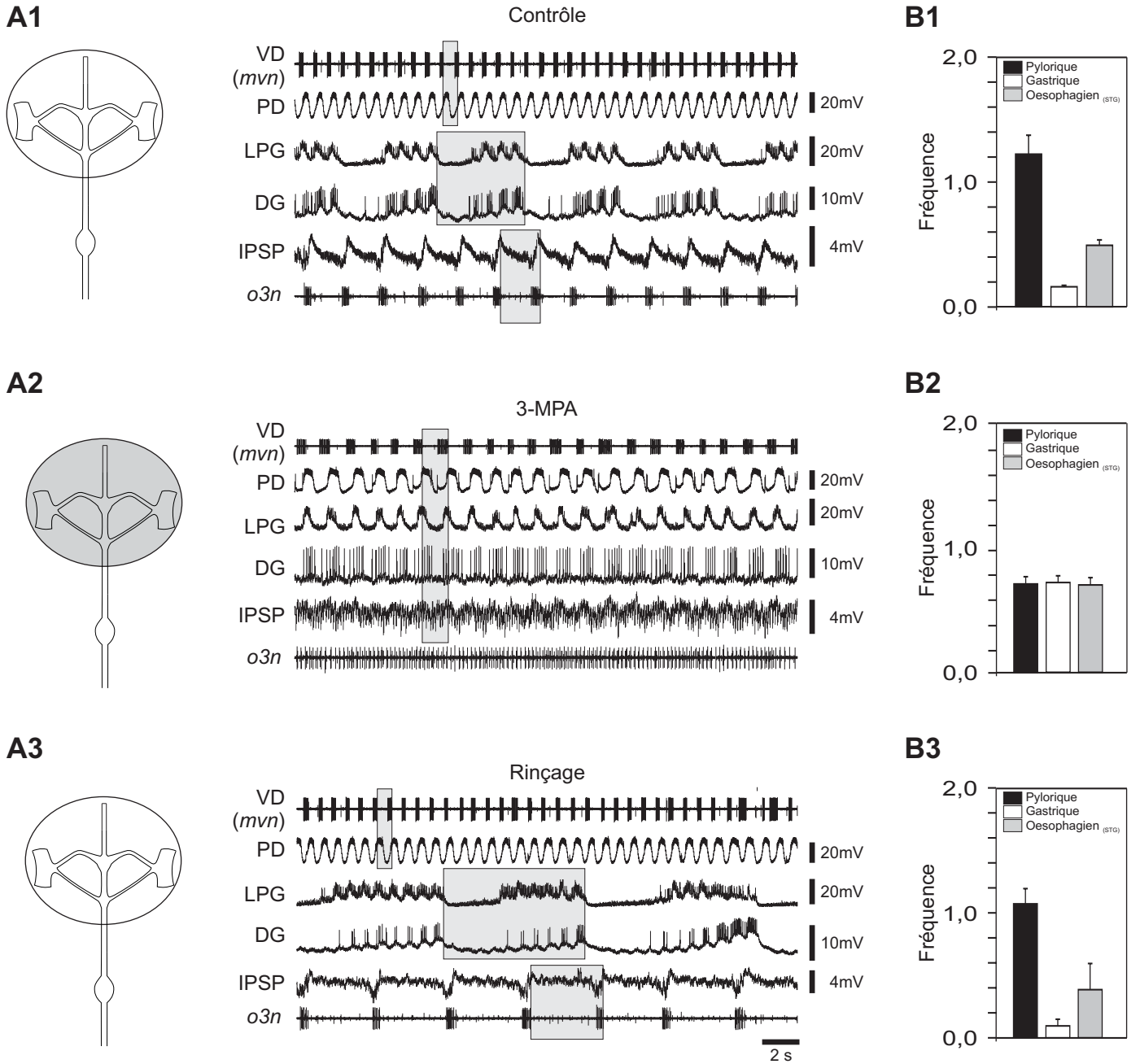


1- Effets de l'application de 3-MPA chez l'adulte.*1.1- Le 3-MPA appliqué sur les ganglions antérieurs unifie les rythmes adultes.*

L'acide 3-mercaptopropionique (3-MPA) est un inhibiteur de l'enzyme responsable de la formation du GABA à partir de l'acide glutamique (la glutamic acid decarboxylase ou GAD). Comme tous les corps cellulaires des neurones modulateurs GABAergiques projetant sur le STG sont localisés dans l'OG ou les CoG (Cournil et al., 1990), nous avons appliqué le 3-MPA ( $10^{-3}$  M) sur les ganglions antérieurs (OG et CoG) de 9 préparations sur lesquelles étaient enregistrés les rythmes pylorique, gastrique et œsophagien (Fig. 44A1). Le réseau œsophagien comprenant des neurones répartis sur plusieurs ganglions, nous avons enregistré son activité à la fois au niveau du STG (par des enregistrements intracellulaires des neurones IPSP) et au niveau des nerfs moteurs œsophagiens (*o3n*, *o4n*). L'application de 3-MPA sur les ganglions antérieurs ne modifie pas à court terme (moins d'1 h) les rythmes pylorique, gastrique et œsophagien (données non montrées). Après 1h à 5h d'application du 3-MPA sur les ganglions antérieurs, nous observons une unification des trois rythmes adultes pylorique, gastrique et œsophagien enregistrés au niveau des neurones du STG (Fig. 44A2; n=7 sur 9). Cette activité rythmique unifiée n'est cependant pas visible au niveau des motoneurones œsophagiens, situés en dehors du STG, qui présentent une activité tonique (Fig. 44A2, voir *o3n*). L'analyse des fréquences des rythmes produits par les trois réseaux indique qu'il n'y a aucune différence significative (One-Way ANOVA) entre la fréquence produite par le réseau pylorique ( $0,76 \pm 0,06$  Hz), gastrique ( $0,77 \pm 0,05$  Hz) et œsophagien ( $0,76 \pm 0,06$  Hz) mais que la fréquence unifiée de ces réseaux est différente de celle produite par chacun des trois réseaux en conditions contrôles (pylorique :  $1,25 \pm 0,10$ Hz; gastrique :  $0,16 \pm 0,01$ Hz; œsophagien :  $0,47 \pm 0,06$  Hz) (Fig. 44B1 et B2). Un retour aux trois rythmes adultes contrôles est observé 1 à 2 heures après le début du rinçage du 3-MPA (Fig. 44B3; n=2 sur 2; notons que la plupart des préparations n'ont pas été rincées mais utilisées soit pour des expériences de diffusion de neurobiotine soit pour caractériser l'immunoréactivité GABA). Enfin, dans deux préparations, l'application de 3-MPA sur les ganglions antérieurs n'a pas affecté les trois réseaux adultes qui ont continué à exprimer une activité rythmique similaire à celle observée en contrôle. Dans 13 préparations supplémentaires où seuls les rythmes pylorique et gastrique ont été enregistrés, l'application de 3-MPA sur les ganglions antérieurs a entraîné l'expression d'un rythme unique dans 8 préparations. Au total le 3-MPA a donc provoqué l'expression d'un rythme unique dans 15 préparations sur 22.

**Figure 44 : L'application d'un inhibiteur de l'enzyme de synthèse du GABA sur les ganglions antérieurs unifie les rythmes des neurones du STG.** En condition contrôle (A1), nous constatons la présence des trois rythmes caractéristiques du SNST (cadres gris) : un rythme rapide produit par le réseau pylorique (enregistré ici de manière extracellulaire au niveau du *mvn* et de manière intracellulaire au niveau du neurone PD), un beaucoup plus lent issu du réseau gastrique (voir les enregistrements intracellulaires de LPG et DG) et enfin le rythme œsophagien (enregistré de manière extracellulaire au niveau du nerf œsophagien *o3n* et intracellulaire au niveau d'une cellule IPSP), intermédiaire entre les deux. Ces trois activités présentent des fréquences différentes (B1) : le réseau pylorique oscille à une fréquence de 1,25 Hz, le réseau gastrique, à une fréquence de 0,16 Hz et le réseau œsophagien à une fréquence de 0,47 Hz. Lorsque le 3-MPA, inhibiteur de l'enzyme de synthèse du GABA (GAD), est appliqué sur les ganglions antérieurs (A2) les rythmes s'unifient et les neurones du STG (pyloriques, gastriques et œsophagiens) adoptent une fréquence d'activité d'environ 0,7 Hz (B2, n=7 sur 9). Notons que l'activité rythmique enregistrée sur les nerfs œsophagiens disparaît et laisse place à une activité tonique (voir *o3n*). Après un rinçage de 1 à 2 heures (A3) nous assistons à un retour des activités à leur rythme observé en contrôle (B3, n=2).







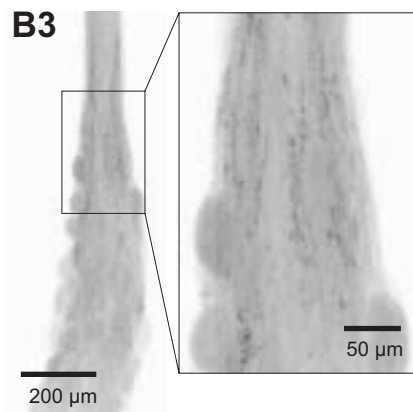
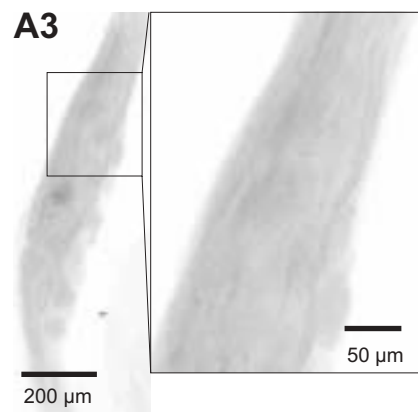
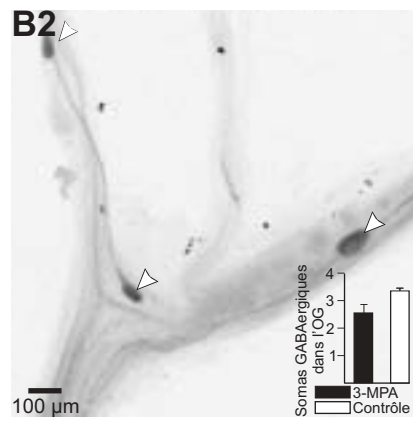
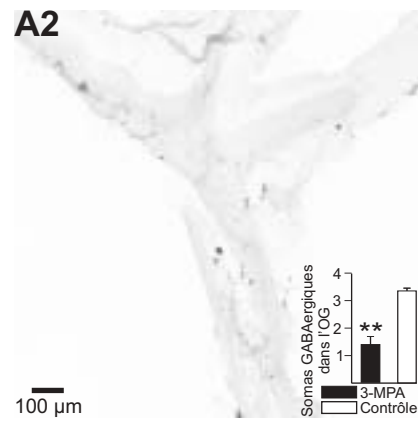
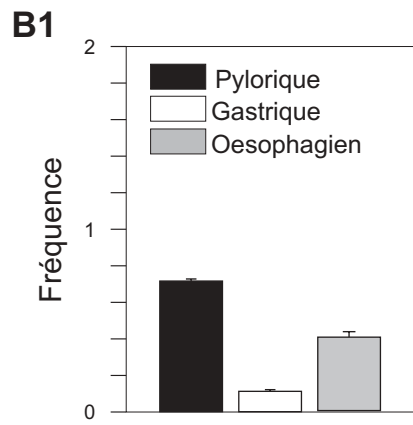
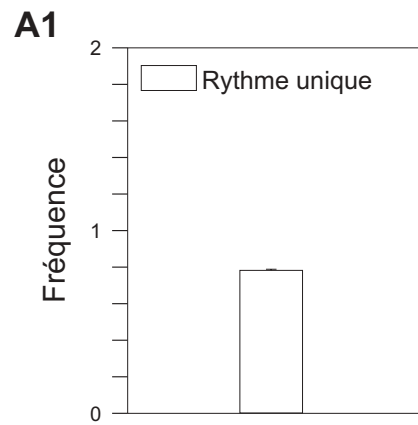
*1.2- L'expression du rythme unifié sous 3-MPA s'accompagne d'une réduction de l'immunoréactivité GABA au niveau de l'OG et d'une disparition du neuropile GABAergique au niveau du STG.*

Afin de déterminer si les effets du 3-MPA sont dus à une disparition du GABA dans le système neuromodulateur, nous avons procédé à la détection immunocytochimique du GABA dans 11 préparations après application de 3-MPA et comparé cette immunoréactivité à celle observée dans les préparations adultes contrôles. Parmi ces 11 préparations 6 exprimaient le rythme unifié (Fig. 45A1) et 5 présentaient toujours les trois rythmes typiques des contrôles après 4 heures d'application de 3-MPA (Fig. 45B1). Dans les préparations exprimant le rythme unifié, l'immunoréactivité GABAergique est fortement diminuée par rapport aux préparations contrôles. En effet, au niveau de l'OG, le nombre de neurones présentant une immunoréactivité GABAergique ( $1,33 \pm 0,6$ ) est statistiquement inférieur au nombre de neurones GABAergiques observés dans les OG des préparations adultes contrôle ( $3,46 \pm 0,21$ ;  $n=6$ ; One-Way ANOVA :  $p<0,01$ ; Fig. 45A2). De plus, aucune immunoréactivité GABAergique ne peut être décelée au niveau du STG de ces préparations ( $n=3$  sur 3; Fig. 45A3) tandis qu'un fin neuropile GABAergique est observé dans les STG adultes contrôles ( $n=5$  sur 6; voir Fig. 41). Au contraire, dans les préparations qui, traitées au 3-MPA, expriment toujours les 3 rythmes caractéristiques de l'adulte, le nombre de somas immunoréactifs au GABA dans l'OG ( $2,6 \pm 0,6$ ) ne présente pas de différence significative avec le nombre observé sur les préparations contrôles (Fig. 45B2). Ces préparations montrent par ailleurs la présence d'un fin neuropile GABAergique au niveau de la partie antérieure du STG ( $n=2$  sur 2; Fig. 45B3) comparable à celui observé dans les préparations contrôles (voir Fig 41).

*1.3- L'application de 3-MPA sur le STG ne modifie ni les activités rythmiques ni l'immunoréactivité GABA dans le SNST.*

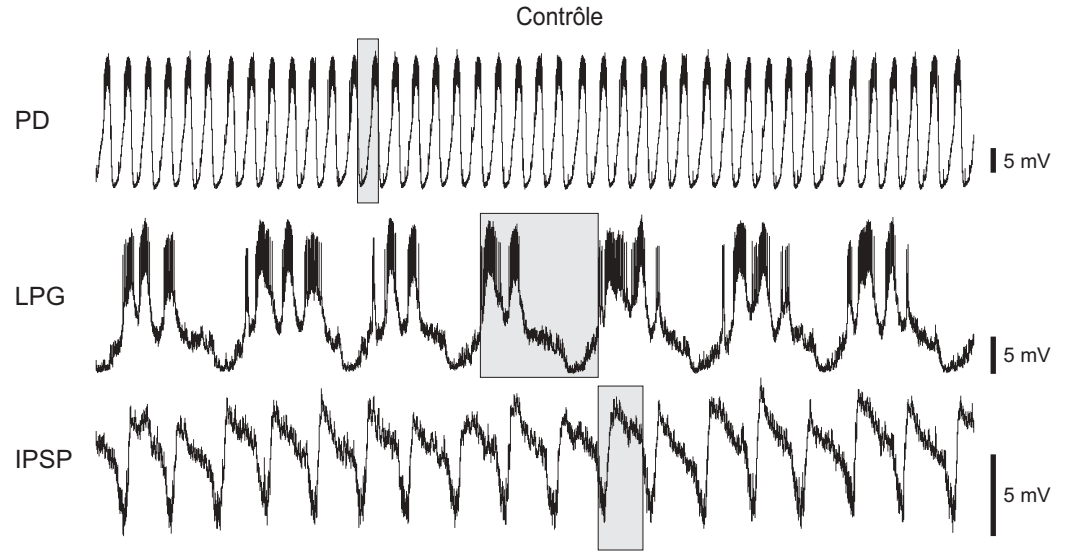
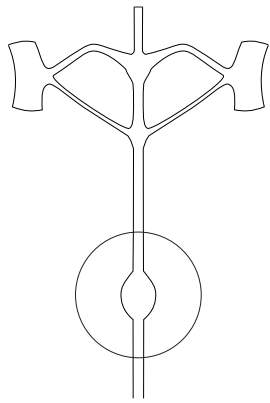
Il est connu, par différents travaux réalisés chez les vertébrés, que le GABA peut être synthétisé aussi bien au niveau des corps cellulaires des neurones qu'au niveau des terminaisons axoniques de ces derniers (Caserta and Barker, 1994; Lugo-Garcia and Blanco, 1991; van den Pol, 1985). Nous avons donc procédé à l'application de 3-MPA sur le STG uniquement. Cette application ne modifie pas l'expression des trois rythmes pylorique, gastrique et œsophagien ( $n=3$  sur 3; Fig. 46A1 et A2). De plus, la détection immunocytochimique du GABA réalisée dans deux de ces préparations montre la présence de 4 neurones marqués dans l'OG (Fig. 46B1, têtes de flèche) et la présence d'un fin neuropile GABAergique clairement visible dans la partie antérieure du STG (Fig. 46B2). Ces expériences montrent que la synthèse de GABA n'a pas lieu au niveau des terminaisons axonales des

**Figure 45 : L'expression d'un rythme unique par les neurones du STG est associée à la disparition du GABA dans l'OG et le STG.** Lorsqu'un rythme unique est exprimé par les neurones du STG après application de 3-MPA sur les ganglions antérieurs (A1, n=6), le GABA disparaît de l'OG (A2, projection maximale de 79 coupes optiques de 1µm). Sur l'ensemble des préparations, le nombre de neurones œsophagiens immunopositifs au GABA après traitement au 3-MPA est très inférieur à celui dénombré dans les OG en conditions contrôles (A2, encart, One-Way ANOVA : \*\* :  $p < 0,01$ ). De plus, aucun neuropile GABAergique n'est détecté dans le STG (A3, projection maximale de 29 coupes optiques de 3 µm). Inversement, lorsque les trois rythmes sont maintenus dans le STG après application de 3-MPA (B1, n=5), des neurones œsophagiens expriment toujours le GABA (B2, têtes de flèche blanches, projection maximale de 50 coupes optiques de 3 µm), le nombre de ces neurones n'étant pas différent du nombre de neurones œsophagiens GABAergiques en conditions contrôles (B2, encart). Dans ces mêmes préparations, nous constatons la présence de neuropile immunopositif au GABA dans le STG (A3, projection maximale de 29 coupes optiques de 3 µm). Les encarts en A3 et B3 correspondent respectivement à des projections maximales de 26 et 27 coupes optiques de 3 µm prises au niveau des zones encadrées dans le STG à l'objectif X10 avec un zoom optique de 3.

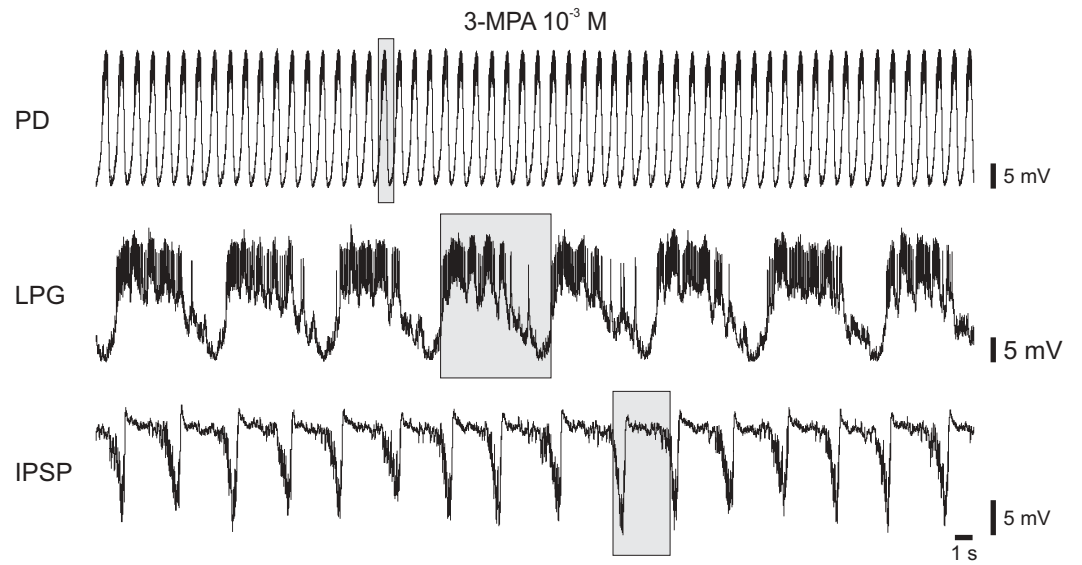
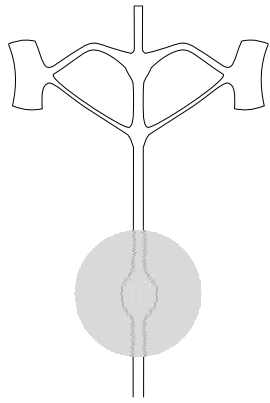


**Figure 46 : Le 3-MPA appliqué sur le STG ne modifie ni les activités rythmiques ni l'immunoréactivité GABA dans le SNST.** Sur trois préparations adultes exprimant des rythmes pylorique, gastrique et œsophagien (A1, enregistrements intracellulaires de PD, LPG et IPSP), l'application de 3-MPA pendant 3 heures (A2) n'apporte aucun changement aux rythmes observés. Sur les trois préparations ainsi traitées, l'immunohistochimie anti-GABA révèle, à l'objectif X10, quatre neurones (B1, têtes de flèche blanches) et leurs neurites (B1, flèches noires) marqués dans l'OG (B2, projection maximale de 16 coupes optiques de 3 $\mu$ m) ainsi que du neuropile marqué dans le STG (B3, projection maximale de 24 coupes optiques de 3  $\mu$ m). L'encart en B2 représente une projection maximale de 15 coupes optiques de 5 $\mu$ m de la zone encadrée du STG observée à l'objectif X10 avec un zoom optique de 3.

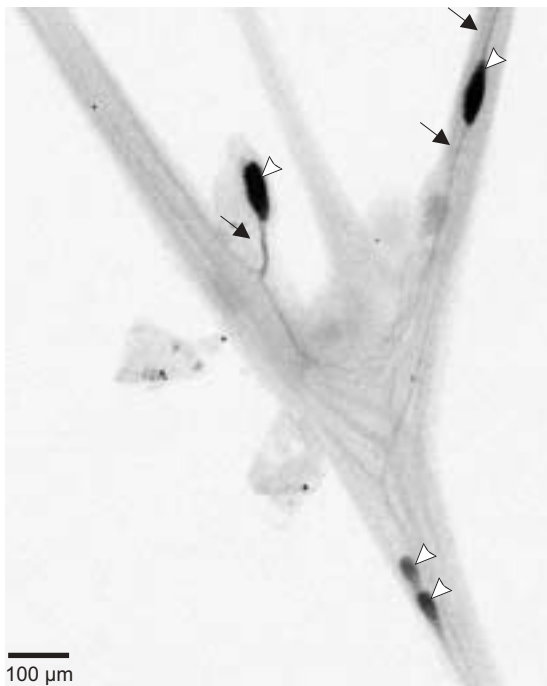
**A1**



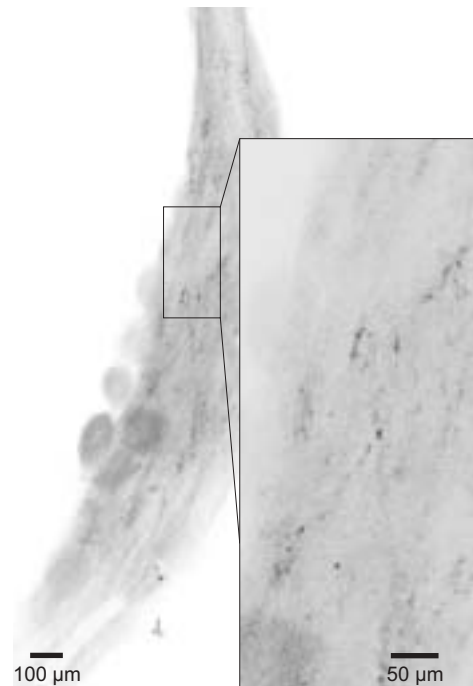
**A2**



**B1**



**B2**







neurones modulateurs mais bien au niveau de leurs corps cellulaires situés dans les ganglions antérieurs.

L'ensemble de ces résultats indique que la déplétion ou la réduction des niveaux de GABA au sein du système modulateur adulte entraîne l'expression d'un patron moteur unifié au niveau des neurones du STG. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer que les trois réseaux adultes produisent une activité unifiée après application de 3-MPA.

*1.4- Le rythme unique produit sous 3-MPA résulte d'une reconfiguration des réseaux adultes en un unique réseau moteur.*

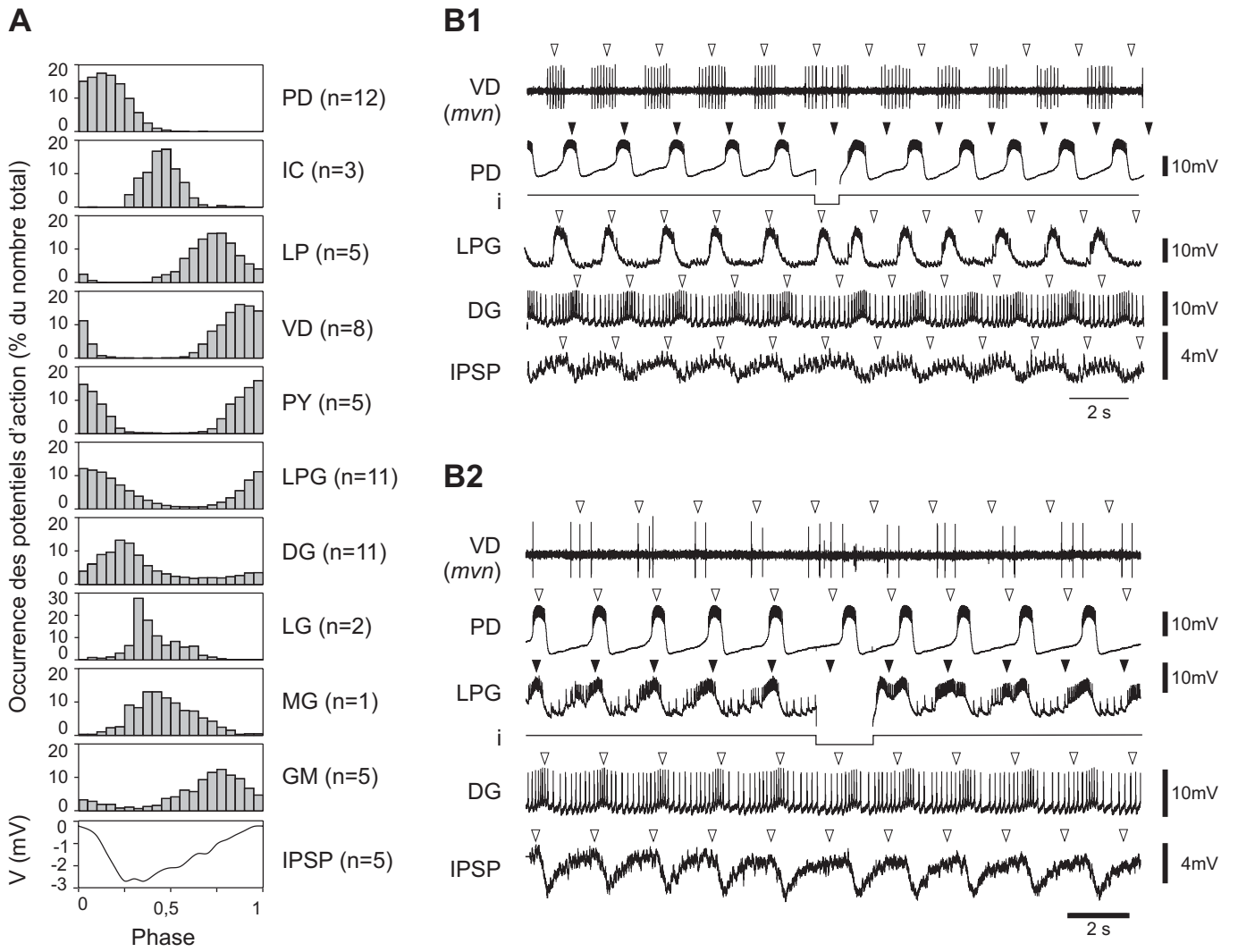
Tout d'abord les neurones des réseaux pylorique, gastrique et œsophagien peuvent osciller de façon indépendante à des fréquences très similaires. Deuxièmement, l'unification des rythmes peut avoir pour origine la mise en jeu d'une afférence modulatrice qui imposerait son propre rythme à l'ensemble des réseaux du SNST. Troisièmement, l'expression d'une fréquence unifiée peut être la conséquence de la reconfiguration des trois réseaux adultes en un unique réseau moteur.

Dans le cadre de la première hypothèse (réseaux indépendants opérant à des fréquences similaires), les phases des neurones appartenant aux différents réseaux ne devraient pas être liées. Nous avons donc comparé les relations de phase des neurones du STG en prenant comme référence le neurone PD (Fig. 47A). La phase est déterminée en calculant le pourcentage de potentiels d'action de chaque neurone par rapport au cycle d'activité du neurone PD. Pour les IPSP, dont l'activité consiste en des séries d'hyperpolarisations rythmiques provoquées par l'arrivée de potentiels postsynaptiques inhibiteurs, les variations du potentiel de membrane ont été utilisées. L'ensemble des neurones pyloriques, gastriques et œsophagiens enregistrés au niveau du STG (PD, IC, LP, VD, PY, LPG, DG, LG, MG, GM et IPSP) présente des relations de phase constantes avec PD, aussi bien au cours d'une expérience que sur l'ensemble des expériences réalisées (Fig. 47A). Ces résultats indiquent que les trois réseaux ne fonctionnent pas de manière indépendante.

Dans le cadre de la seconde hypothèse (réseaux soumis à une afférence modulatrice qui imposerait son rythme à l'ensemble des neurones), il ne devrait pas être possible d'entraîner l'activité de ces neurones. En effet, toute perturbation appliquée à l'un des neurones pour avancer ou retarder sa décharge serait compensée par la décharge de l'afférence qui ramènerait ce neurone dans sa phase d'origine. Nous avons testé cette hypothèse en injectant de brefs courants hyperpolarisants dans les neurones pyloriques (n=7) et gastriques (n=4). L'injection d'un courant hyperpolarisant dans le neurone PD (Fig. 47B1, i), retarde sa décharge mais entraîne également un retard dans la décharge de l'ensemble des neurones enregistrés. Ce recadrage de l'activité des neurones est maintenu au cours des cycles qui suivent l'injection des courants hyperpolarisants (comparer la décharge réelle des neurones avec les temps de décharge attendus en l'absence de perturbation indiqués par les têtes de flèche). Les

**Figure 47 : Les neurones du STG adulte s'organisent en un unique réseau sous 3-MPA.**

L'occurrence des potentiels d'action pour chaque motoneurone, ou les variations de potentiel de membrane pour les IPSP, normalisée par la période de décharge de PD montre que la phase de l'ensemble des neurones du STG par rapport à celle de PD est constante au cours du temps et d'une préparation à l'autre (A). Le nombre de représentants de chaque type neuronal utilisé pour ces mesures est indiqué entre parenthèses. Des injections de courant négatif (-3 nA, 0,5 à 1,5 s) dans un neurone PD (B1) ou LPG (B2) retardent leur décharge mais entraînent également un retard dans la décharge de l'ensemble des neurones enregistrés. Les flèches indiquent le moment où la bouffée d'activité serait attendue en l'absence de l'injection de courant.





mêmes résultats sont obtenus lorsqu'une injection d'un courant hyperpolarisant est réalisée dans le neurone LPG (Fig. 47B2). Ces expériences démontrent donc que le rythme unifié obtenu sous 3-MPA ne résulte pas de la mise en jeu d'une afférence modulatrice rythmique qui imposerait sa fréquence à l'ensemble des neurones. Au contraire, le rythme unifié obtenu sous 3-MPA résulte de la reconfiguration des trois réseaux adultes pylorique, gastrique et œsophagien en un unique réseau moteur.

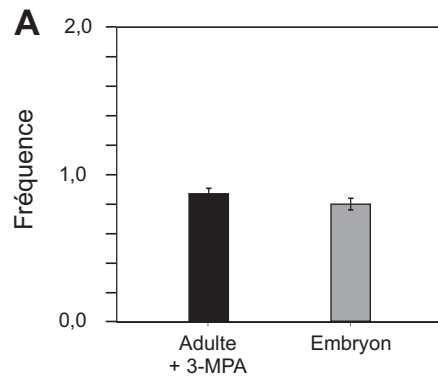
En l'absence de GABA dans le système modulateur, les neurones du STG adulte se réorganisent en un unique réseau moteur. De la même façon, dans le SNST embryonnaire, où le système neuromodulateur est également dépourvu de GABA, les neurones du STG sont organisés en un réseau unique (Casasnovas and Meyrand 1995, voir également Fig. 41). On peut donc se demander si le rythme unique observé dans les préparations adultes traitées au 3-MPA et le rythme unique observé dans les préparations embryonnaires sont générés par un même réseau fonctionnel. Nous avons donc comparé les principales caractéristiques de ces deux rythmes.

## 2- Le rythme embryonnaire et le rythme adulte unifié sous 3-MPA sont générés par un même réseau fonctionnel.

Nous avons concentré notre étude sur les neurones gastriques et pyloriques car seules les IPSP passent en rythme unique après application de 3-MPA (les autres neurones œsophagiens présents dans les ganglions antérieurs deviennent toniques sous 3-MPA, voir Fig. 44A2, *o3n*) et les IPSP ne sont pas identifiables chez l'embryon.

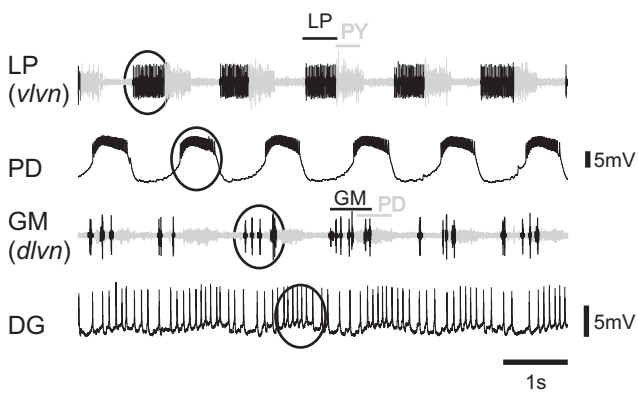
Tout d'abord, nous montrons que la fréquence du rythme unique sous 3-MPA chez l'adulte (Fig. 48A,  $0,87 \pm 0,07$  Hz,  $n=13$ ) est identique à celle enregistrée chez l'embryon ( $0,79 \pm 0,07$  Hz,  $n=9$ ) puisque aucune différence significative n'est observée entre ces deux fréquences (Mann-Whitney). De plus, les séquences d'activation des neurones sont très similaires chez l'adulte traité au 3-MPA et chez l'embryon (comparer la décharge successive des neurones LP, PD, GM et DG chez l'adulte, Fig. 48B1, et chez l'embryon, Fig. 48B2). Les phases de décharge de chaque neurone enregistrable à la fois chez l'adulte et chez l'embryon (PD, DG, LG, LP, GM, PY) sont très similaires chez l'adulte (Fig. 48C1) et chez l'embryon (Fig. 48C2). En effet, la séquence d'activation est identique dans les deux cas. De plus, aucune différence statistique n'a été mise en évidence dans la phase de décharge moyenne des neurones PD, DG, LP et GM entre préparations adultes sous 3-MPA et préparations embryonnaires (Watson  $U^2$ ) même si des différences notables peuvent être observées dans la répartition globale de la décharge (voir en particulier la décharge de DG). Pour les autres neurones, LG et PY, ces phases de décharge moyenne semblent également très proches bien qu'aucune comparaison statistique n'ait pu être effectuée du fait d'un trop faible nombre d'enregistrements.

**Figure 48 : Chez l'embryon et en présence de 3-MPA chez l'adulte, les neurones du STG s'organisent en un même réseau fonctionnel.** L'unique réseau adulte observé après application de 3-MPA a la même fréquence d'activité que l'unique réseau embryonnaire (A). La séquence d'activité de deux neurones pyloriques (LP et PD) et de deux neurones gastriques (GM et DG) montre une forte similitude entre l'adulte sous 3-MPA (B1) et l'embryon (B2). Chez l'adulte, les enregistrements sont réalisés extracellulairement pour LP et GM (sur le *vlvn* et sur le *dlvn* respectivement, l'activité d'autres neurones visible sur ces enregistrements apparaît en gris) et intracellulairement pour les neurones PD et DG. Chez l'embryon, les tracés présentés sont des enregistrements intracellulaires au niveau des muscles cibles des neurones LP, PD, GM et DG. Les cercles indiquent une bouffée d'activité pour chaque neurone (adulte) ou muscle (embryon). Les neurones présentent la même relation de phase entre l'adulte après traitement au 3-MPA (C1) et l'embryon (C2). Les graphes représentent l'occurrence d'apparition des potentiels d'action normalisée par rapport à la période d'activité de PD, les nombres entre parenthèses indiquent le nombre de neurones utilisés pour ces mesures pour chaque type neuronal.



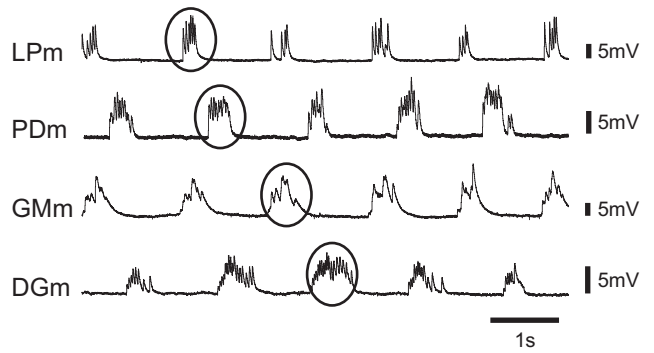
**B1**

Adulte + 3-MPA



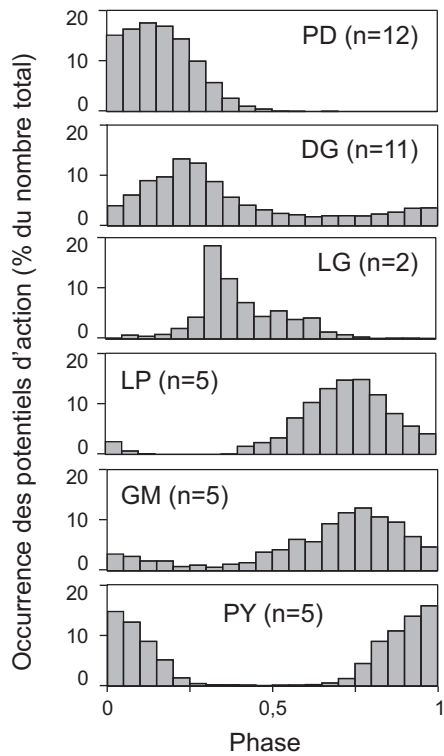
**B2**

Embryon



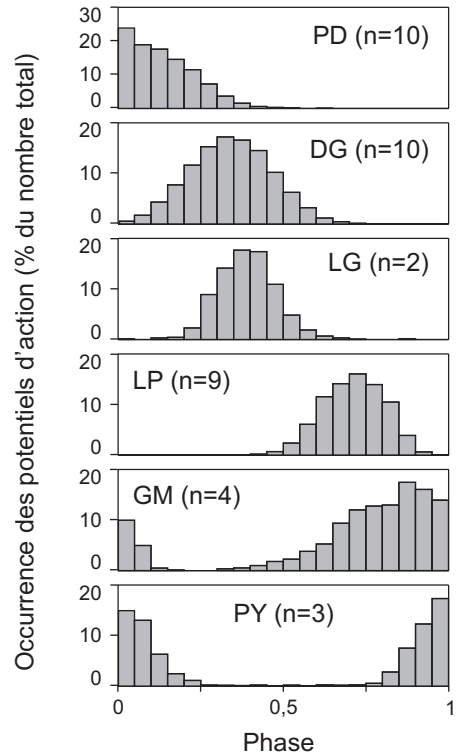
**C1**

Adulte + 3-MPA



**C2**

Embryon







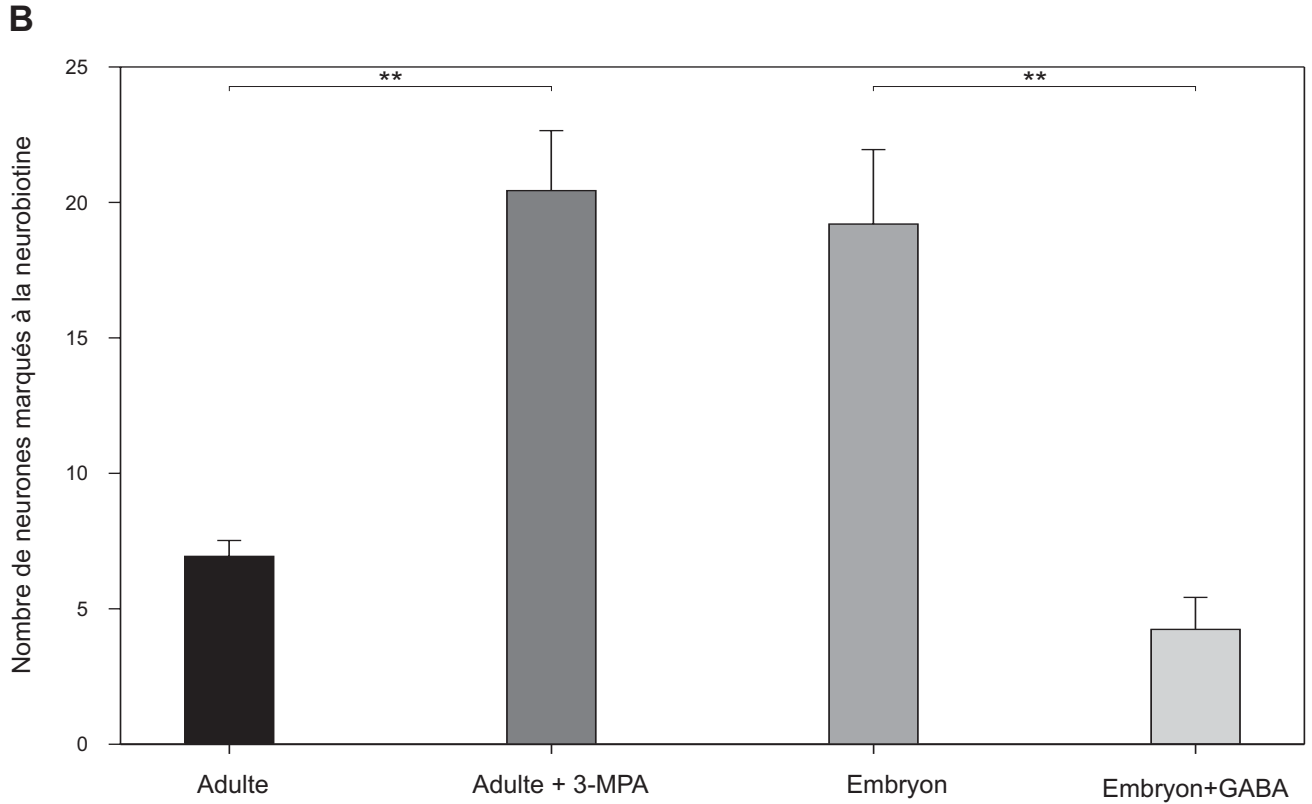
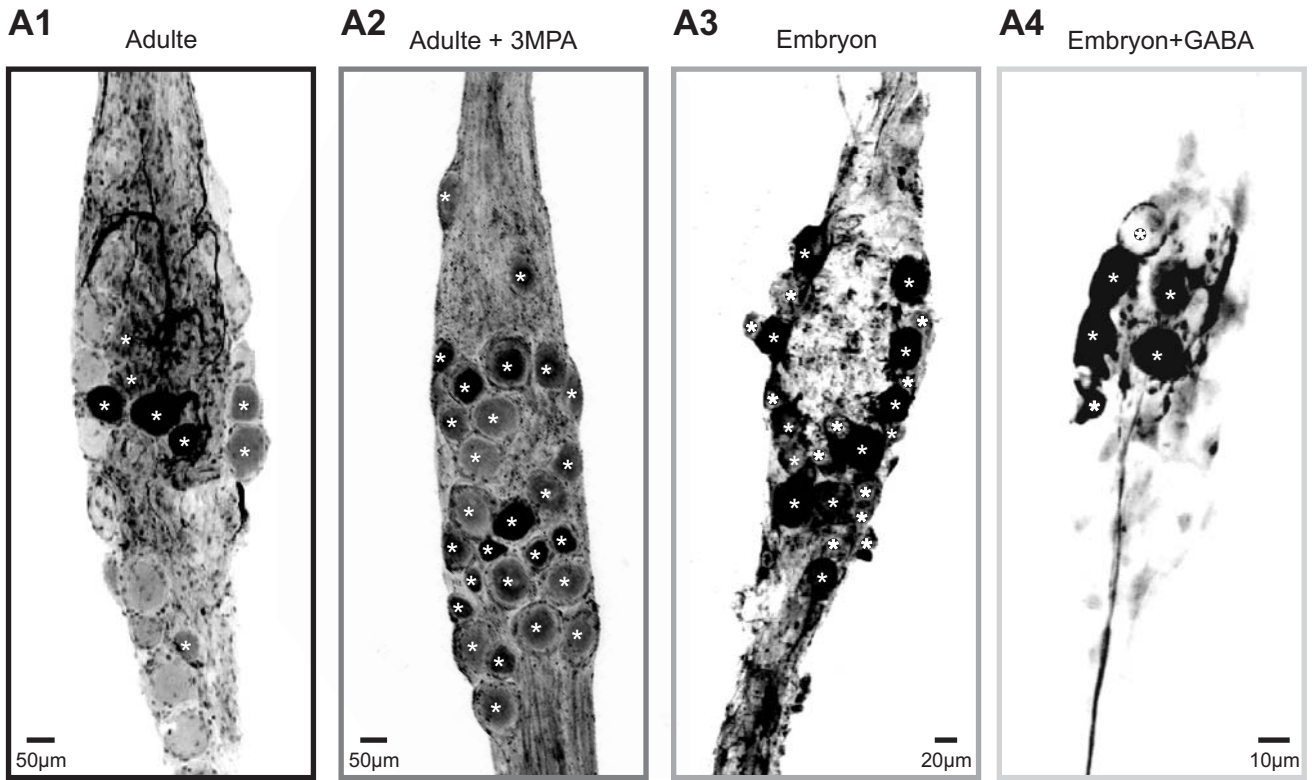
Nous montrons donc que le réseau unique observé chez l'adulte après application de 3-MPA est fonctionnellement identique au réseau embryonnaire unique en termes de fréquence et de patron d'activité. Ainsi, les réseaux adultes gardent leurs capacités à produire des activités de type embryonnaire qui s'expriment lorsque les ganglions modulateurs sont déplétés en GABA. Ces résultats suggèrent donc que l'apparition du GABA au stade L IV pourrait être à l'origine de la scission de l'unique réseau embryonnaire en trois réseaux adultes. Des travaux de modélisation ont suggéré qu'une diminution de l'étendue et de la force des couplages électriques au sein du STG, pourrait à elle seule rendre compte de l'émergence des réseaux adultes à partir de l'unique réseau embryonnaire (Bem et al., 2002). De plus, nous avons démontré précédemment que l'étendue des couplages électriques est plus importante dans les préparations embryonnaires exprimant le rythme unique que dans les préparations adultes. Nous avons donc cherché à déterminer si, à l'inverse, la reconfiguration des réseaux adultes en un réseau de type embryonnaire s'accompagnait d'une augmentation de l'étendue des couplages électriques et si le GABA pouvait directement moduler l'étendue des couplages chez l'adulte et chez l'embryon.

### 3- Modulation des synapses électriques par le GABA.

#### *3.1- Etendue des couplages électriques en présence et en absence de GABA dans les préparations adultes et embryonnaires.*

Afin de pouvoir établir des comparaisons avec le système embryonnaire, nous avons utilisé la diffusion de neurobiotine comme méthode d'investigation des couplages électriques. Dans 7 préparations adultes traitées avec du 3-MPA pour lesquelles l'unification des rythmes des trois réseaux a été constatée, un neurone PD a été injecté avec de la neurobiotine et la diffusion de cette dernière vers les autres neurones du STG a été observée (Fig. 49A2). Le nombre de neurones marqués à la neurobiotine dans ces conditions a alors été comparé à celui observé lors de l'injection d'un neurone PD sur des préparations adultes contrôles ou sur des préparations embryonnaires. Alors que seuls 7 à 8 neurones sont marqués en conditions contrôles ( $7,6 \pm 0,7$ ), nous en dénombrons une vingtaine dans les préparations adultes traitées au 3-MPA ( $20,5 \pm 2,1$ ), soit un nombre similaire à celui observé après injection d'un neurone PD dans les préparations embryonnaires (Fig. 49A1, A2, A3 et B). En effet, le nombre de neurones marqués à la neurobiotine sur les préparations adultes traitées au 3-MPA est significativement supérieur au nombre de neurones marqués chez l'adulte en conditions contrôles (One-Way ANOVA,  $p < 0,01$ , suivie d'un test post-hoc de Newman-Keuls,  $p < 0,01$ ) mais il ne diffère pas du nombre de neurones marqués chez l'embryon. L'expression du réseau adulte unifié en présence de 3-MPA est donc associée à une augmentation de l'étendue des couplages électriques qui amène

**Figure 49 : Le GABA module l'étendue du couplage métabolique de PD.** Lorsqu'un neurone PD adulte est injecté à la neurobiotine en conditions contrôles, un nombre assez faible de neurones est marqué (A1, projection maximale de 57 coupes optiques de 2,5  $\mu\text{m}$ , astérisques blancs) comparé au nombre de neurones marqués à la neurobiotine dans les préparations pour lesquelles les rythmes des réseaux du STG sont unifiés par le traitement au 3-MPA (A2, projection maximale de 71 coupes optiques de 2,5  $\mu\text{m}$ ). Le nombre de neurones marqués est également très élevé lorsqu'un PD embryonnaire est injecté avec la neurobiotine (A3, projection maximale de 52 coupes optiques de 3  $\mu\text{m}$ ). Le couplage métabolique des neurones PD embryonnaires est très fortement diminué par l'application du GABA à  $10^{-3}$  M (A4, projection maximale de 65 coupes optiques de 2  $\mu\text{m}$ ). Sur les 14 préparations contrôles (B) le nombre de neurones marqués lorsque PD est injecté à la neurobiotine ( $6,9 \pm 0,6$  en moyenne) est statistiquement plus faible que celui des préparations adultes incubées avec le 3-MPA ( $20,4 \pm 2,2$  en moyenne,  $n=7$ ) ou embryonnaires ( $19,2 \pm 2,7$  en moyenne,  $n=5$ ). Par contre, il n'existe pas de différence significative entre le nombre de neurones marqués à la neurobiotine dans les préparations adultes en conditions contrôles et le nombre de neurones marqués à la neurobiotine dans les préparations embryonnaires incubées avec du GABA  $10^{-3}$  M ( $4,2 \pm 1,2$ ,  $n=4$ ) ainsi qu'entre le nombre de neurones marqués chez l'embryon et chez l'adulte traité au 3-MPA. Les étoiles représentent une différence statistiquement significative (One-Way ANOVA,  $p<0,01$ , suivie d'un test post-hoc de Newman-Keuls, \*\* :  $p<0,01$ ).





celle-ci à des niveaux comparables à ceux observés chez l'embryon. De plus, bien que l'application de GABA ne provoque pas l'expression des rythmes adultes chez l'embryon, nous avons pu démontrer que le GABA réduit significativement le nombre de neurones couplés à PD dans la préparation embryonnaire. En effet, alors qu'en conditions contrôles, un très grand nombre de neurones du STG embryonnaire apparaît marqué à la neurobiotine (Fig. 49A3), seuls quelques neurones apparaissent marqués lorsque les injections sont réalisées en présence de GABA à une concentration de  $10^{-3}$  M (Fig. 49A4). L'analyse statistique révèle que  $19,4 \pm 2,15$  neurones sont en moyenne marqués à la neurobiotine lorsqu'un neurone PD embryonnaire est injecté ( $n=5$ ; Fig. 49B), l'application de GABA diminuant significativement ce nombre à  $4,2 \pm 0,2$  neurones marqués ( $n=4$ , test post-hoc de Newman-Keuls,  $p<0,01$ ). Notons que le nombre de neurones marqués chez l'embryon en présence de GABA ne montre pas de différence statistiquement significative avec le nombre de neurones marqués chez l'adulte (Fig. 49B,  $p>0,1$ ). Le GABA est donc capable de diminuer l'étendue du couplage métabolique chez l'embryon de façon à l'amener à un niveau similaire à celui observé chez l'adulte.

Afin de caractériser plus en détails l'augmentation de l'étendue des couplages électriques sur les préparations adultes traitées au 3-MPA, nous avons identifié par cartographie (voir Fig. 10A, chapitre 2) les neurones dye-couplés à PD sous 3-MPA ( $n=6$ ) et comparé ces résultats à ceux obtenus en conditions contrôles (voir chapitre 2). Nous avons montré que des représentants de chaque type neuronal ont été marqués au moins une fois sur l'ensemble des 6 préparations (Fig. 50A). Ainsi, des neurones qui ne sont jamais couplés à la neurobiotine avec PD en contrôle (IPSP), sont métaboliquement couplés sous 3-MPA. De plus, les neurones occasionnellement (VD, DG et AM) ou rarement (PY, LPG) marqués en contrôle deviennent systématiquement dye-couplés à PD sous 3-MPA (Fig. 50B). Ces résultats montrent qu'au delà de l'augmentation de l'étendue des couplages l'absence de GABA induit un renforcement des synapses électriques entre PD et les neurones du réseau pylorique d'une part et les neurones des réseaux gastrique et œsophagien d'autre part.

En conclusion, nous montrons que l'expression d'un rythme moteur unifié chez l'adulte traité au 3-MPA est associée à une augmentation de l'étendue des couplages électriques. A l'inverse, au cours de l'ontogenèse l'émergence des trois réseaux adultes à partir de l'unique réseau embryonnaire est associée à une diminution de l'étendue des couplages électriques. Cette diminution pourrait être induite par l'apparition du GABA dans le système neuromodulateur. Ces données suggèrent fortement qu'une altération dans l'étendue des couplages électriques pourrait être à l'origine de la reconfiguration du réseau embryonnaire unique en de multiples réseaux adultes sous l'action du GABA. Nous nous sommes donc demandés si le GABA est capable de moduler directement l'étendue et la force des couplages électriques au sein du STG.

**Figure 50 : Le couplage inter et intra-réseau est augmenté lors de l'unification des rythmes chez l'adulte sous 3-MPA.** Un neurone PD est injecté à la neurobiotine dans des préparations adultes après unification des rythmes par le 3-MPA. Dans ces conditions, la plupart des neurones identifiés dans STG sont métaboliquement couplés à PD (A). Chaque colonne correspond à une préparation, la première ligne au nombre total de neurones marqués à la neurobiotine et la dernière au nombre de neurones marqués mais non identifiés. Les neurones marqués sont représentés par des cases noires, les non-marqués par des cases grises. La fréquence du couplage métabolique avec PD est fortement augmentée pour l'ensemble des types neuronaux (B, comparer avec Fig. 10E). La première colonne indique le type neuronal, la seconde, l'occurrence du couplage métabolique et la dernière le nombre de cellules identifiées pour chaque type neuronal. Les neurones pour lesquels la fréquence du dye-coupling avec PD n'a pas pu être déterminée, pour cause de nombre d'observations trop faible, sont indiqués par n.d.

**A**

Nombre total de neurones marqués	18	27	20	21	24	24
PD injecté	■	■	■	■	■	■
PD	■	■	■	■	■	■
AB			■		■	
VD	■	■	■	■	■	
IC		■	■	■	■	
LP		■	■		■	■
PY	■	■	■	■	■	■
PY	■	■	■		■	■
PY		■				■
LPG	■	■	■	■		■
LPG		■	■	■	■	■
MG	■					
LG	■	■			■	■
DG	■	■	■			■
Int1			■	■		■
GM	■	■	■	■	■	■
GM	■		■	■	■	■
GM	■		■	■	■	
GM	■		■	■	■	
GM	■					
AM		■	■	■	■	■
IPSP	■	■	■	■		■
IPSP	■		■			■
Nombre de neurones marqués non identifiés	7	12	5	11	10	8

**B**

Type neuronal	Occurrence du dye-coupling avec PD (%)	n
PD	100	6
AB	n.d.	2
VD	100	5
IC	50	4
LP	50	4
PY	100	13
LPG	100	10
MG	n.d.	1
LG	100	4
DG	100	4
Int1	n.d.	2
GM	55	20
AM	100	5
IPSP	100	8





3.2- Modulation directe des couplages électriques par le GABA dans les préparations adultes.

Pour déterminer s'il existe une action directe du GABA sur la force et l'étendue des couplages, nous avons bloqué l'ensemble du système neuromodulateur pour éviter la mise en jeu d'autres neurones modulateurs (perfusion de TTX à  $10^{-7}$  M) ainsi que l'ensemble des synapses inhibitrices affectant PD (perfusion de PTX à  $10^{-6}$  M) pour éviter tout effet de réseau lors de la perfusion de GABA (effets indirects).

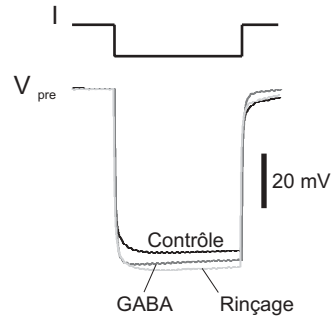
Nous avons donc comparé les coefficients de couplage avant et après application de GABA sur des STG adultes en présence de TTX et PTX. L'ensemble des expériences, réalisées sur un total de 5 STG, indique que le GABA n'altère pas de façon significative la résistance d'entrée de PD (Fig. 51A; One-Way ANOVA,  $p > 0,1$ ). Par contre, le coefficient de couplage diminue de  $52,8 \pm 0,9$  % après trente minutes d'application du GABA (Fig. 51B;  $p < 0,01$ ). Cet effet du GABA sur le coefficient de couplage est réversible ( $p < 0,01$ ) même si nous n'avons jamais observé de retour aux valeurs contrôles même après 2 heures de rinçage.

Ensuite, nous avons vérifié que cette diminution du coefficient de couplage entre les neurones PD adultes suite à l'application de GABA s'accompagne d'une diminution du couplage métabolique. Des neurones PD ont été injectés avec de la neurobiotine soit après périfusion de liquide physiologique additionné de PTX à  $10^{-6}$  M et de TTX à  $10^{-7}$  M (Fig. 51C1,  $n=7$ ) soit après périfusion de ce même liquide physiologique auquel est ajouté  $10^{-3}$  M de GABA (Fig. 51C2,  $n=5$ ). Le GABA diminue significativement le couplage métabolique de PD puisque sous TTX et PTX une moyenne de  $6 \pm 0,8$  neurones sont marqués alors qu'il n'est plus que de  $3 \pm 0,4$  dans les préparations superfusées avec le GABA (One-Way ANOVA,  $p < 0,05$ ).

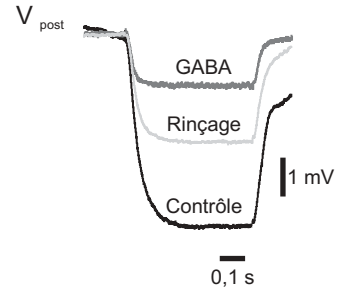
Ces résultats montrent donc que le GABA module directement à la fois la force et l'étendue des couplages électriques dans le STG adulte.

**Figure 51 : Le GABA diminue la force et l'étendue des couplages électriques chez l'adulte.** Un liquide physiologique additionné de TTX à  $10^{-7}$  M et de PTX  $10^{-6}$  M est superfusé sur les préparations de SNST et constitue les conditions contrôles. L'amplitude des variations de potentiel membranaire d'un PD provoquées par une injection de courant dans ce même neurone (-20 nA, 500 ms) varie peu en conditions contrôle (A1, en noir), après 30 minutes d'application de GABA  $10^{-3}$  M (en gris foncé) et après 30 minutes à 2 heures de rinçage (en gris clair). En revanche, les déflexions du potentiel du PD couplé (B1), sont fortement diminués par le GABA sans que le rinçage puisse les ramener totalement à leur amplitude enregistrée en contrôle. Pour les courants allant de -20 à 0 nA, nous constatons, sur la même préparation que la pente des droites représentant la résistance d'entrée (A2) varie peu entre ces trois conditions, alors que celles représentant le coefficient de couplage (B2) différent entre elles. La pente de la droite obtenue sous GABA est inférieure à celle du contrôle, la droite obtenue après rinçage ayant une pente intermédiaire. Sur ces graphes, les conditions contrôles sont représentées par un rond noir, l'application de GABA par un rond gris foncé et le rinçage par un triangle gris clair. Sur 5 préparations, la résistance d'entrée ne montre pas de variation significative (A3) alors que le coefficient de couplage est diminué de 52,8 % par le GABA, le rinçage ne permettant un retour que de  $47,6 \pm 0,6$  % en moyenne (B3). Après injection d'un neurone PD avec de la neurobiotine sur des préparations superfusées avec de la TTX et de la PTX (C1, projection maximale de 37 coupes optiques de  $2,5 \mu\text{m}$ ) nous observons 9 neurones marqués à l'objectif X10 alors que seuls deux neurones sont marqués lorsque du GABA est ajouté (C2, projection maximale de 44 coupes optiques de  $3 \mu\text{m}$ ). En C3, nous voyons que le GABA diminue significativement le nombre de neurones marqués ( $3 \pm 0,4$ ) par rapport aux conditions contrôles sous TTX et PTX ( $6 \pm 0,8$ ). Les étoiles représentent une différence statistiquement significative (One-Way ANOVA,  $p < 0,01$ , suivie d'un test post-hoc de Newman-Keuls, \*\* :  $p < 0,01$ ).

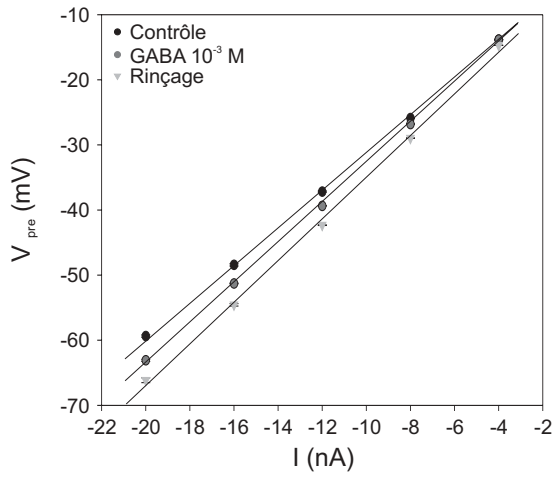
**A1**



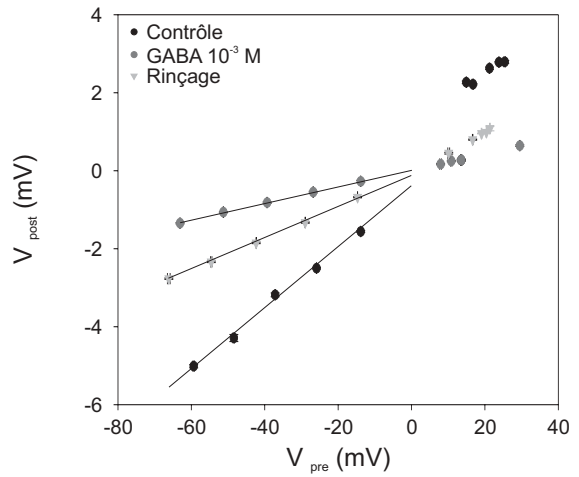
**B1**



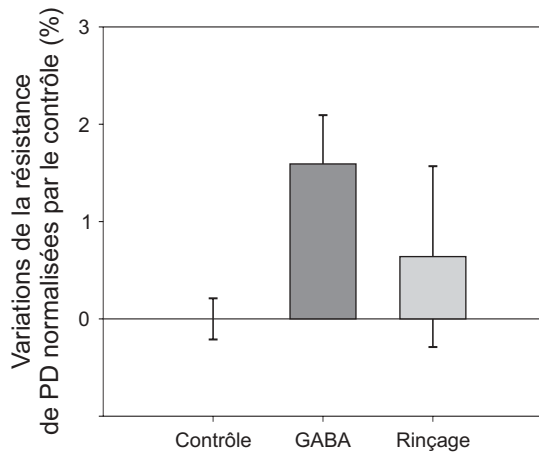
**A2**



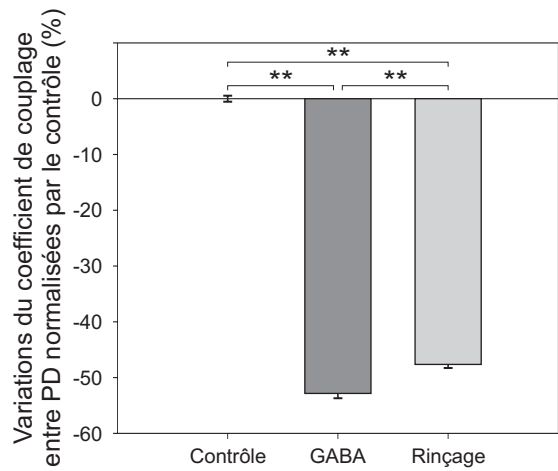
**B2**



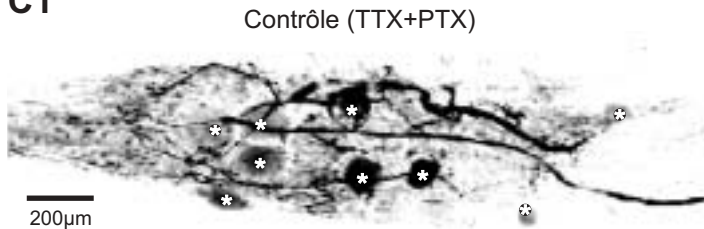
**A3**



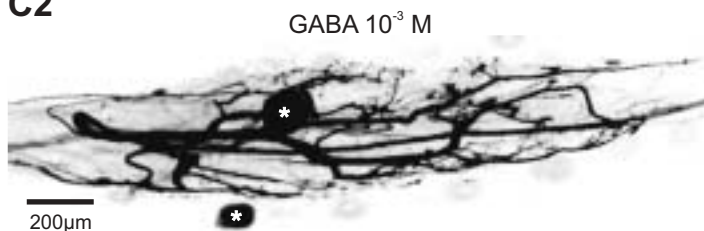
**B3**



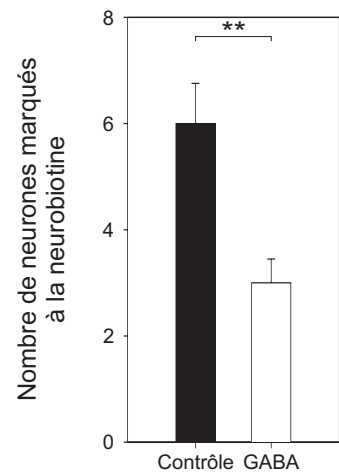
**C1**



**C2**



**C3**





## V- Discussion

---

Nous avons démontré au cours de ce chapitre que l'étendue du couplage métabolique et le nombre de neurones capables d'établir des synapses électriques diminuent dans le STG du homard au cours du développement et que cette diminution des couplages électriques est concomitante de la maturation de l'unique réseau embryonnaire en trois réseaux adultes ainsi que de l'apparition du GABA au sein du système neuromodulateur.

Par ailleurs, nous avons pu montrer l'importance du GABA dans l'expression des rythmes adultes en inhibant l'enzyme de synthèse du GABA, la GAD. Une fois les neurones modulateurs déplétés en GABA, les réseaux adultes sont reconfigurés en un réseau unique dont la période d'activité ainsi que les relations de phase sont identiques à celles observées chez l'embryon. De plus, cette unification des réseaux adultes passe par une augmentation de l'étendue des couplages électriques qui atteint alors des niveaux voisins de ceux observés chez l'embryon. Cette augmentation se traduit notamment par un renforcement des interactions entre les réseaux pylorique, gastrique et œsophagien telle qu'elle est visualisable par la diffusion de neurobiotine. Enfin, nous avons vérifié que le GABA est capable de diminuer directement la force et l'étendue des couplages électriques des neurones PD.

En résumé, ces résultats suggèrent que l'apparition du GABA dans le système modulateur lors de la métamorphose pourrait induire la reconfiguration du réseau embryonnaire unique en trois réseaux adultes distincts, en provoquant directement une diminution de l'étendue et de la force des couplages électriques. Enfin ces données démontrent que les réseaux de neurones peuvent exprimer indifféremment des phénotypes embryonnaires ou adultes en fonction de leur environnement neuromodulateur.

### 1- Rôles d'une diminution des couplages électriques au sein des réseaux neuronaux au cours du développement.

Il est généralement admis qu'à des stades précoces du développement les synapses électriques sont très répandues dans le système nerveux des vertébrés entraînant l'existence d'un couplage métabolique entre les neurones très étendu (Kandler and Katz, 1995). Plusieurs rôles ont été proposés concernant l'étendue importante de ces couplages. Tout d'abord dans les phases les plus précoces il a été suggéré que ces nombreuses synapses électriques pourraient participer aux phénomènes de neurogenèse ainsi qu'aux phénomènes de migration et de différenciation neuronale (Fushiki et al., 2003; Montoro and Yuste, 2004). Plus tardivement dans le développement, il semble que la maturation des propriétés électriques des neurones pyramidaux du néocortex soit achevée au moment où l'étendue



des couplages commence à diminuer, suggérant un rôle important des synapses électriques dans l'acquisition des propriétés membranaires intrinsèques des neurones (Yuste et al., 1995). De même, il a été proposé que des couplages étendus pourraient participer à la mise en place de l'organisation en colonnes du néocortex (Peinado et al., 1993b; Roerig and Feller, 2000). Dans ce dernier cas, c'est davantage le couplage métabolique qui joue un rôle en autorisant le passage d'inositol triphosphate au travers des jonctions gap alors que le couplage électrique ne semble pas être prépondérant (Kandler and Katz, 1998). Plus récemment, il a été suggéré que la large distribution des couplages électriques pourrait permettre l'expression d'activités neuronales structurées chez l'embryon avant la mise en place de la transmission synaptique chimique qui coïncide avec la diminution de l'étendue du couplage entre neurones (Arumugam et al., 2005; Dupont et al., 2006; Szabo et al., 2004). Enfin, dans la moelle épinière de mammifères il a été proposé que la genèse d'un patron moteur stable repose sur la synchronisation des oscillations des motoneurones néonataux au travers des synapses électriques (Tresch and Kiehn, 2000).

Cependant, à notre connaissance, les répercussions fonctionnelles de la diminution des couplages électriques au cours du développement demeurent méconnues. Des études de modélisation ont suggéré que la diminution des couplages électriques pourrait permettre l'émergence de plusieurs réseaux rythmiques distincts à partir d'un large réseau unique (Bem et al., 2002). Les expériences présentées dans ce chapitre apportent un très large faisceau d'arguments en faveur de cette hypothèse. En effet, nous montrons que l'émergence des multiples réseaux adultes à partir de l'unique réseau embryonnaire est associée avec une diminution des couplages électriques, observée aussi bien par les techniques de dye coupling que par les techniques d'hybridation *in situ*. A l'inverse, la fusion des trois réseaux adultes en un unique réseau de type embryonnaire s'accompagne d'une forte augmentation de l'étendue de ces couplages. Notons qu'il est même possible que l'étendue des couplages métaboliques chez l'embryon ait été sous estimée. En effet, plusieurs expériences d'injection de neurobiotine chez l'embryon ont permis de mettre en évidence la présence de neurones couplés à PD dans l'OG et les CoG ce qui n'est jamais observé chez l'adulte. Cette différence dans les neurones couplés à PD dans l'OG peut résulter de limitations techniques (la distance entre l'OG et le STG adultes est trop grande pour permettre la diffusion de la neurobiotine) mais aussi de l'absence de jonctions gap au niveau de l'OG chez l'adulte, ce que semblent confirmer les expériences d'hybridation *in situ*.

Une démonstration définitive de l'implication des synapses électriques dans l'émergence de multiples réseaux reste à effectuer. Deux étapes sont nécessaires. Tout d'abord, il nous faudrait démontrer que la diminution de l'étendue des synapses électriques s'opère bien à partir du stade LIV. En effet, si nous avons pu montrer que la diminution de l'expression des innexines n'intervenait pas avant le stade LIII, rien ne permet d'affirmer que cette diminution s'opère entre LIII et LIV et non pas plus tardivement au cours du développement. D'autre part, des expériences de dye-coupling aux différents stades larvaires seront nécessaires pour confirmer la chronologie de la diminution de





l'étendue des couplages électriques. L'autre étape consisterait soit à bloquer les synapses électriques chez l'embryon et observer l'expression des réseaux adultes, soit à augmenter uniquement l'étendue des couplages électriques dans les préparations adultes et observer la fusion des réseaux adultes en un unique réseau. Aucune des pistes explorées au laboratoire n'a à ce jour permis d'apporter une confirmation définitive de l'hypothèse avancée par les travaux de modélisation. En effet, comme discuté au premier chapitre, tous les bloqueurs des jonctions gap testés sur notre préparation présentent d'importants effets secondaires qui empêchent toute interprétation des résultats des expériences. Les expériences pour bloquer la synthèse des innexines par la technique d'interférence à l'ARN double brin n'ont jamais permis d'altérer les couplages électriques dans les préparations traitées. Enfin, dans les préparations adultes, les nombreux essais de dynamic clamp visant à augmenter artificiellement la force des couplages électriques entre deux cellules (par exemple entre AB et DG) n'ont jamais conduit à l'obtention d'un réseau unifié.

## 2- Rôles du GABA dans la modulation des synapses électriques.

A notre connaissance, peu de travaux ont mis en évidence une modulation du couplage électrique entre neurones par le GABA (Piccolino et al., 1982; Shinohara et al., 2000b). Nous démontrons ici que le GABA est capable de réduire l'étendue et la force des couplages électriques. A l'inverse de l'histamine étudiée au chapitre précédent, le GABA n'altère pas la résistance d'entrée des neurones. Pourtant la fermeture des jonctions gap devrait entraîner une augmentation de cette dernière. Au moins deux hypothèses peuvent rendre compte de cette absence d'effet sur la résistance d'entrée. Tout d'abord, l'augmentation de résistance d'entrée induite par la fermeture des jonctions gap pourrait être compensée par une diminution de la résistance d'entrée liée à l'ouverture de conductances par le GABA et non bloquées par la PTX. De telles conductances ont été reportées dans le STG de *Cancer borealis* (Swensen et al., 2000a). L'autre possibilité est que, les synapses électriques étant situées loin du corps cellulaire (voir chapitre 2), la détection de changements dans la résistance d'entrée telle que nous la mesurons au niveau du soma pourrait être impossible.

De multiples mécanismes pourraient permettre au GABA de moduler l'efficacité et l'étendue des synapses électriques. Tout d'abord, il a été démontré que les jonctions gap sont, chez les vertébrés, modulées, par phosphorylations par les protéine-kinases A et C (Bao et al., 2004; Cruciani and Mikalsen, 2002; Lampe and Lau, 2000; O'Brien et al., 2004; Shah et al., 2002; Urschel et al., 2006). Les innexines semblent également pouvoir être modulées grâce à la présence de nombreux sites de liaison pour la protéine-kinase C et/ou la caséine kinase II (Phelan, 2000). Chez les vertébrés, il existe différents types de récepteurs au GABA : les récepteurs GABA<sub>A</sub>, qui ouvrent des conductances chlorures et des récepteurs GABA<sub>B</sub>, récepteurs métabotropiques couplés aux protéines G. Chez les invertébrés, l'existence de récepteurs similaires aux récepteurs GABA<sub>B</sub> a été démontrée à la jonction



neuro-musculaire chez le homard (Miwa et al., 1990). L'ensemble des éléments permettant au GABA de moduler l'efficacité et l'étendue des couplages électriques via des cascades de seconds messagers semble donc présent dans les systèmes invertébrés.

Un autre mécanisme serait d'envisager que cette action du GABA sur les synapses électriques passe par l'ouverture de récepteurs canaux. En effet, *Swensen et al.* (2000a) ont reporté dans le STG de *Cancer borealis* la présence de réponses GABAergiques dépolarisantes. Or, dans les cellules musculaires d'écrevisse (Kaila and Voipio, 1987) ainsi que dans les cellules pyramidales de l'hippocampe (Perkins and Wong, 1996) la réponse dépolarisante au GABA passe essentiellement par un efflux d'ions  $\text{HCO}_3^-$  qui induit en conséquence une très importante baisse du pH intracellulaire. Or, dans de nombreuses espèces, et notamment chez les invertébrés, l'acidification intracellulaire entraîne une fermeture des jonctions gap (Peracchia, 1990; Spray et al., 1982). Il est donc possible que le GABA en induisant une sortie d'ions  $\text{HCO}_3^-$  au travers de récepteurs ionotropiques puisse provoquer une acidification du pH intracellulaire et une diminution des couplages électriques. Dans ces conditions, la PTX ne suffit pas à bloquer ces récepteurs canaux, puisque le GABA est capable de provoquer la diminution des couplages même en présence de cette drogue. Enfin, les deux mécanismes envisagés ici (récepteurs métabotrope et/ou ionotropique) ne sont pas mutuellement exclusifs.

Compte tenu des mécanismes envisagés, nous pouvons nous demander si le GABA exerce des effets à moyen ou à long terme sur l'étendue et la force des couplages électriques. En effet, la mise en jeu des cascades de seconds messagers de même qu'une acidification du soma peut nécessiter plusieurs minutes. Plusieurs indices expérimentaux plaident en faveur d'un effet à long terme du GABA. D'une part, il faut environ 5 heures pour observer un effet du 3-MPA ce qui laisse supposer que le GABA agit à moyen ou à long terme. D'autre part, les effets d'une application de GABA sur les coefficients de couplage persistent même après 2h de rinçage. Enfin, l'effet maximal du GABA sur le coefficient de couplage n'est en général obtenu qu'après une dizaine de minutes d'application de GABA. Cependant, pour certains de ces indices, il est possible d'avancer une explication alternative. Le délai entre l'application du 3-MPA et l'observation d'un effet sur les rythmes peut résulter d'une déplétion progressive des stocks de GABA. A cet égard, on notera que les préparations qui n'ont pas montré d'effet du 3-MPA présentent une immunoréactivité GABA identique à celle des contrôles. L'absence de rinçage des effets du GABA sur les coefficients de couplage pourrait être due à l'utilisation de doses trop fortes de GABA donc difficiles à rincer comme nous l'avons vu pour l'histamine.

Les effets à très long terme d'une application de GABA n'ont pas été étudiés. Or, les données obtenues par hybridation *in situ* montrent une diminution de l'expression des gènes des innexines au cours du développement. On peut donc faire l'hypothèse que chez l'adulte la présence de GABA réprime l'expression des innexines. Pour valider cette hypothèse, il serait nécessaire d'appliquer le 3 -



MPA sur des périodes encore plus longues (sur des préparations maintenues en culture organotypique) et de caractériser, par hybridation *in situ*, l'expression des innexines. Dans ces conditions, s'il y a bien un effet à long terme au niveau de l'expression génique, on devrait observer un nombre de cellules marquées plus important que sur les adultes contrôle. Une autre possibilité serait de tester les effets à long terme de l'application du 3-MPA en présence de bloqueurs de la transcription ou de la traduction des ARN<sub>m</sub>.

A l'inverse, nous pouvons envisager d'incuber des préparations embryonnaires maintenues en culture dans un milieu contenant du GABA. En effet, nous avons vu que le GABA est capable de moduler les synapses électriques chez l'embryon. En revanche, l'application de GABA sur des préparations embryonnaires ne permet pas de révéler les rythmes adultes. Plusieurs hypothèses peuvent rendre compte de cette absence d'effet. Tout d'abord, le GABA exerce des effets inhibiteurs extrêmement puissants (Cazalets et al., 1987). Ces effets inhibiteurs ne peuvent pas être totalement bloqués par la picrotoxine chez le homard (Swensen et al., 2000a) et ne peuvent pas être bloqués sans bloquer aussi la transmission glutamatergique. D'autre part, l'application de GABA sur toute une préparation embryonnaire n'est pas équivalente à une libération GABAergique restreinte à des cibles spécifiques au sein du STG telle qu'elle se rencontrera très certainement chez l'adulte lors de la mise en jeu des neurones modulateurs GABAergiques projetant sur le STG.

Il est très important de noter qu'au delà des cibles au sein du STG les neurones GABAergiques rencontrés chez l'adulte projettent également sur les CoG (Cournil et al., 1990). De ce fait, même si nous avons montré que le GABA peut agir directement sur le STG, on ne peut pas exclure que les effets du GABA passent également par les CoG. Pour simplifier, nous pouvons très schématiquement envisager que le GABA libéré au niveau des CoG inhibe un neurone modulateur dont la décharge maintient les synapses électriques ouvertes. Le 3-MPA en bloquant l'inhibition GABAergique sur ce neurone permettrait à celui-ci d'ouvrir les jonctions gap au niveau du STG. A l'heure actuelle, il n'est pas possible de déterminer l'importance relative des effets directs et des effets indirects du GABA. En effet, le 3-MPA appliqué sur les CoG affecte la transmission GABAergique aussi bien dans les ganglions antérieurs qu'au niveau du STG (voir Fig. 45). A l'inverse l'application de 3-MPA sur le STG ne semble pas interférer avec la transmission GABAergique au niveau du STG (voir Fig. 46). Ainsi nous ne pouvons pas spécifiquement altérer la transmission synaptique GABAergique dans les ganglions antérieurs ou dans le STG pour trancher entre ces deux modes d'action. De plus, il se peut que les deux mécanismes soient nécessaires à l'obtention des rythmes adultes en conditions physiologiques.



3- La reconfiguration des réseaux de neurones comme mécanisme ontogénétique.

Nous avons démontré dans ce chapitre que les réseaux adultes gardent la capacité d'exprimer des phénotypes de réseaux embryonnaires (par exemple, des couplages très étendus) et peuvent être reconfigurés en un unique réseau fonctionnel exprimant des patrons moteurs de type embryonnaire. Cependant, dans le système embryonnaire, les motoneurones œsophagiens participent à l'activité motrice rythmique du réseau unique. Nos résultats montrent que dans le réseau œsophagien adulte, les cellules IPSP dont les somas sont localisés dans le STG sont impliquées dans l'unique réseau fonctionnel observé chez l'adulte sous 3-MPA. A l'inverse, les motoneurones œsophagiens, dont les somas sont situés essentiellement dans l'OG et les CoG, déchargent toniquement sous 3-MPA. On peut avancer deux hypothèses pour expliquer ce recrutement partiel des membres du réseau œsophagien. Tout d'abord, la déplétion du GABA dans les ganglions antérieurs ne permet pas de reproduire intégralement l'état embryonnaire du fait que le GABA est déjà présent dans les CoG embryonnaires et pourrait être nécessaire à l'expression d'une activité rythmique dans les motoneurones œsophagiens. Deuxièmement, il existe bien évidemment des différences de taille extrêmement importantes entre le SNST embryonnaire (1 à 2 mm) et adulte (15 cm). Ces différences de taille ont probablement des répercussions sur les propriétés électrotoniques des neurones qui pourraient rendre compte de l'absence d'activité rythmique dans les motoneurones œsophagiens sur les préparations adultes traitées au 3-MPA. En effet, chez l'embryon, l'influence électrique des neurones du STG pourrait atteindre les neurones œsophagiens du fait de la faible distance électrotonique entre les neurones des ganglions antérieurs et ceux du STG. Au contraire, chez l'adulte la distance importante qui sépare les neurones du STG de ceux des ganglions antérieurs pourrait empêcher toute influence électrotonique entre les deux systèmes.

Des études précédemment réalisées au laboratoire ont démontré que le réseau embryonnaire unique peut être reconfiguré en deux réseaux moteurs distincts exprimant des activités rythmiques de type adulte lorsque des altérations de l'environnement neuromodulateur sont imposées (Le Feuvre et al., 1999). A l'inverse, nous démontrons ici que les multiples réseaux adultes peuvent être reconfigurés en un unique réseau fonctionnel exprimant une activité rythmique de type embryonnaire, là encore suite à une altération de l'environnement neuromodulateur (suppression du GABA). L'ensemble de ces résultats indique donc que l'expression des réseaux adultes observée à l'issue de la métamorphose résulte d'une reconfiguration réversible d'un unique réseau en trois réseaux adultes. L'implication des phénomènes de reconfiguration dans le contrôle de la plasticité adaptative des réseaux chez l'adulte a été démontrée à de nombreuses reprises (Combes et al., 1999b; Faumont et al., 2005; Lieske et al., 2000; Meyrand et al., 1991). Nos travaux nous permettent maintenant d'avancer que des phénomènes de reconfiguration réversible des réseaux pourraient également jouer un rôle clef dans la mise en place des réseaux adultes au cours du développement. Ce point de vue contraste avec





les conceptions communément admises de l'ontogenèse des réseaux. En effet, des études montrent que celle-ci requiert des modifications à long terme, généralement considérées comme irréversibles, telles que l'acquisition des canaux ioniques caractéristiques de l'adulte (Spitzer et al., 2002) ou encore des altérations dans les neurotransmetteurs exprimés (Allain et al., 2005) ou dans les propriétés synaptiques des neurones (Ben-Ari, 2002). Cependant, jusqu'à présent, il n'y avait à notre connaissance pas ou peu d'indications que ces changements pouvaient être réversibles. Nos données démontrent donc que le passage d'un réseau embryonnaire unique aux trois réseaux adultes peut être réversible. Nous pouvons donc nous demander quel est le rôle des changements ontogénétiques progressifs observés au niveau des propriétés cellulaires et synaptiques tels qu'ils ont été décrits dans plusieurs préparations. Nous montrons que les principales caractéristiques du rythme embryonnaire et du rythme unifié exprimé par les préparations adultes sous 3-MPA sont identiques, ce qui suggère que les deux rythmes sont générés par le même réseau fonctionnel. Cependant, ceci n'exclut pas qu'il puisse y avoir également des altérations dans l'expression des canaux ioniques ou des altérations dans les forces synaptiques chimiques au cours du développement. L'existence de tels changements a en effet été suggéré au cours du développement d'une espèce apparentée, le homard américain (Richards and Marder, 2000; Richards et al., 1999). De plus, des travaux de modélisation récents ont montré qu'un même patron moteur pouvait être produit par des combinaisons très différentes de canaux ioniques et de forces synaptiques au sein d'un réseau donné (Prinz et al., 2004). Dans notre cas, il n'est donc pas inenvisageable que les combinaisons de canaux exprimés par les neurones du STG soient différentes chez l'embryon et chez l'adulte.



## *Discussion générale*

*Rien ne vaut la recherche lorsqu'on veut trouver quelque chose.  
J. R. R. Tolkien*



L'un des buts de ce travail était de mettre en évidence l'existence d'une modulation des synapses électriques dans des conditions physiologiques et de comprendre le rôle que pouvait jouer cette modulation dans l'expression des réseaux. Nous avons démontré :

1) qu'une modulation de l'étendue et de la force des jonctions gap est associée à chacun des deux phénomènes de reconfiguration des réseaux observés, à savoir la reconfiguration des réseaux adultes suite à la décharge d'une paire de neurones modulateurs, et la reconfiguration ontogénétique liée à l'apparition d'un neurotransmetteur dans le système neuromodulateur.

2) que l'unification de plusieurs réseaux distincts peut faire intervenir soit une diminution de la force et de l'étendue des couplages électriques soit une augmentation du couplage électrique entre neurones d'un même réseau, mais également entre neurones appartenant à des réseaux différents.

3) que le rôle de la diminution des couplages électriques au cours du développement serait de permettre l'émergence de plusieurs réseaux adultes à partir d'un unique réseau embryonnaire.

Nous avons donc mis en évidence deux modes de modulation permettant une reconfiguration des réseaux du STG en un unique réseau fonctionnel. Cependant, dans un cas l'unification fait appel à une diminution de l'étendue et de la force des couplages électriques alors que dans le second type de reconfiguration, les couplages électriques sont augmentés. Nous avons donc affaire à deux mécanismes différents pour un même effet, l'unification des rythmes, ce qui nous amène à nous interroger sur la réelle importance de la modulation des couplages électriques dans ces reconfigurations.

Nous sommes en réalité en présence de deux reconfigurations des réseaux neuronaux qui, même si elles semblent très similaires, reposent sur des principes totalement différents.

Dans le cas de la reconfiguration des réseaux suite à l'activation des neurones PS, seuls certains neurones du STG sont, dans un premier temps, soumis à l'influence rythmique de PS qui leur impose son rythme. Dans le cas de la reconfiguration ontogénétique des réseaux (suppression du GABA), l'ensemble des neurones du STG est impliqué dans le patron moteur qui ne résulte pas de la mise en jeu d'une afférence rythmique.

Par ailleurs, l'unification des rythmes par PS repose sur la mise sous silence de certains neurones, comme LP, qui ne semble donc pas participer au nouveau réseau, alors que d'autres prennent une grande importance, comme le neurone MG. Ces modulations des propriétés endogènes et synaptiques des neurones semblent importantes pour la mise en place des effets à long terme de PS, puisque ces modifications se maintiennent pendant plusieurs secondes après la fin de la décharge de PS (voir Fig. 7, Faumont et al., 2005; Meyrand et al., 1994). Ceci aboutit à une hiérarchisation des neurones du STG. Pour mettre en place cette hiérarchie entre neurones, il est nécessaire de diminuer les interactions reposant sur les synapses électriques, qui permettent un couplage électrique et métabolique direct et bidirectionnel des neurones et donc une influence réciproque de ceux-ci, au profit des synapses chimiques, unidirectionnelles. Au contraire, lors de la reconfiguration provoquée



par la déplétion en GABA du SNST, l'ensemble des neurones semble jouer un rôle d'égale importance dans la mise en place de l'activité rythmique unique comme l'indique les expériences d'entraînement. Cette reconfiguration repose davantage sur la vision classique du rôle des jonctions gap dans l'activité des réseaux, c'est-à-dire qu'elles assurent un fort couplage entre les neurones, permettant une unification des rythmes.

Le rôle joué par les synapses électriques dans l'expression de l'activité des réseaux apparaît donc complexe. Une façon d'envisager cette complexité est de considérer que l'ouverture ou la fermeture des jonctions gap permet de connecter ou de déconnecter un neurone donné à de nouveaux compartiments neuritiques et donc d'apporter ou de supprimer à ce neurone des conductances ainsi que des synapses. Si la reconfiguration des réseaux repose effectivement sur une altération importante des propriétés intrinsèques des neurones ainsi que des influences synaptiques qu'ils reçoivent, alors la modulation des gaps, en rajoutant ou en supprimant des pans entiers d'arborisations neuronales, induira nécessairement une altération profonde des propriétés des neurones, des influences synaptiques qu'ils reçoivent, et donc de la sortie motrice des réseaux. Dans le cadre de cette hypothèse, la modulation des synapses électriques constituerait un moyen extrêmement puissant pour altérer les propriétés des neurones en n'agissant que sur un nombre très restreint d'éléments, les synapses électriques.

Enfin, il est intéressant de noter qu'un même mécanisme (la modulation des jonctions gap) peut être utilisé pour produire de la plasticité adaptative chez l'adulte ou de la plasticité ontogénétique. Précédemment, il a été suggéré que la plasticité ontogénétique et adaptative reposait sur la mise en jeu des mêmes éléments neuromodulateurs agissant sur les mêmes neurones cibles (Fenelon et al., 2004). Nos résultats permettent maintenant d'envisager que la plasticité adaptative et ontogénétique fait appel à un même mécanisme à savoir une modulation des couplages électriques. Les mêmes éléments sont donc réutilisés au cours de l'ontogenèse et chez l'adulte pour produire deux types de plasticité qui ne différeraient donc que par le moment où elles sont mises en jeu.





## *Bibliographie*

*Such precious wisdom must be shared.  
Daigotsu*



- Allain AE, Meyrand P, Branchereau P.** (2005). Ontogenic changes of the spinal GABAergic cell population are controlled by the serotonin (5-HT) system: implication of 5-HT1 receptor family. *J Neurosci* 25(38):8714-8724.
- Anderson WW, Barker DL.** (1981). Synaptic mechanisms that generate network oscillations in the absence of discrete postsynaptic potentials. *J Exp Zool* 216(1):187-191.
- Antonsen BL, Edwards DH.** (2003). Differential dye coupling reveals lateral giant escape circuit in crayfish. *J Comp Neurol* 466(1):1-13.
- Arumugam H, Liu X, Colombo PJ, Corriveau RA, Belousov AB.** (2005). NMDA receptors regulate developmental gap junction uncoupling via CREB signaling. *Nat Neurosci* 8(12):1720-1726.
- Ayad WA, Locke D, Koren IV, Harris AL.** (2006). Heteromeric, but not homomeric, connexin channels are selectively permeable to inositol phosphates. *J Biol Chem* 281(24):16727-16739.
- Bal T, Nagy F, Moulins M.** (1994). Muscarinic modulation of a pattern-generating network: control of neuronal properties. *J Neurosci* 14(5 Pt 2):3019-3035.
- Bao X, Altenberg GA, Reuss L.** (2004). Mechanism of regulation of the gap junction protein connexin 43 by protein kinase C-mediated phosphorylation. *Am J Physiol Cell Physiol* 286(3):C647-654.
- Barnes TM, Hekimi S.** (1997). The *Caenorhabditis elegans* avermectin resistance and anesthetic response gene *unc-9* encodes a member of a protein family implicated in electrical coupling of excitable cells. *J Neurochem* 69(6):2251-2260.
- Barrio LC, Suchyna T, Bargiello T, Xu LX, Roginski RS, Bennett MV, Nicholson BJ.** (1992). Gap junctions formed by connexins 26 and 32 alone and in combination are differently affected by applied voltage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(9):4220.
- Batter DK, Corpina RA, Roy C, Spray DC, Hertzberg EL, Kessler JA.** (1992). Heterogeneity in gap junction expression in astrocytes cultured from different brain regions. *Glia* 6(3):213-221.
- Bayer TA, McClintock TS, Grunert U, Ache BW.** (1989). Histamine-induced modulation of olfactory receptor neurones in two species of lobster, *Panulirus argus* and *Homarus americanus*. *J Exp Biol* 145:133-146.
- Bedner P, Niessen H, Odermatt B, Kretz M, Willecke K, Harz H.** (2006). Selective permeability of different connexin channels to the second messenger cyclic AMP. *J Biol Chem* 281(10):6673-6681.
- Bedner P, Niessen H, Odermatt B, Willecke K, Harz H.** (2003). A method to determine the relative cAMP permeability of connexin channels. *Exp Cell Res* 291(1):25-35.
- Beenhakker MP, DeLong ND, Saideman SR, Nadim F, Nusbaum MP.** (2005). Proprioceptor regulation of motor circuit activity by presynaptic inhibition of a modulatory projection neuron. *J Neurosci* 25(38):8794-8806.



- Bem T, Le Feuvre Y, Simmers J, Meyrand P.** (2002). Electrical coupling can prevent expression of adult-like properties in an embryonic neural circuit. *J Neurophysiol* 87(1):538-547.
- Ben-Ari Y.** (2002). Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci* 3(9):728-739.
- Benedetti EL, Emmelot P.** (1965). Electron microscopic observations on negatively stained plasma membranes isolated from rat liver. *J Cell Biol* 26(1):299-305.
- Bennett MV, Crain SM, Grundfest H.** (1959). Electrophysiology of supramedullary neurons in *Spheroides maculatus*. I. Orthodromic and antidromic responses. *J Gen Physiol* 43:159-188.
- Blitz DM, Beenhakker MP, Nusbaum MP.** (2004). Different sensory systems share projection neurons but elicit distinct motor patterns. *J Neurosci* 24(50):11381-11390.
- Blitz DM, Christie AE, Coleman MJ, Norris BJ, Marder E, Nusbaum MP.** (1999). Different proctolin neurons elicit distinct motor patterns from a multifunctional neuronal network. *J Neurosci* 19(13):5449-5463.
- Blitz DM, Nusbaum MP.** (1997). Motor pattern selection via inhibition of parallel pathways. *J Neurosci* 17(13):4965-4975.
- Blomstrand F, Aberg ND, Eriksson PS, Hansson E, Ronnback L.** (1999). Extent of intercellular calcium wave propagation is related to gap junction permeability and level of connexin-43 expression in astrocytes in primary cultures from four brain regions. *Neuroscience* 92(1):255-265.
- Buhl EH, Tamas G, Szilagyi T, Stricker C, Paulsen O, Somogyi P.** (1997). Effect, number and location of synapses made by single pyramidal cells onto aspiny interneurons of cat visual cortex. *J Physiol* 500(3):689-713.
- Cabirol-Pol MJ.** (1998). Caractérisation morphofonctionnelle d'un réseau neuronal simple. Implications de la géométrie des neurones et de la ségrégation des synapses intra-réseau et modulatrices. *Thèse Université Bordeaux I.*
- Cabirol-Pol MJ, Combes D, Fenelon VS, Simmers J, Meyrand P.** (2002). Rare and spatially segregated release sites mediate a synaptic interaction between two identified network neurons. *J Neurobiol* 50(2):150-163.
- Cao F, Eckert R, Elfgang C, Nitsche JM, Snyder SA, DF Hu, Willecke K, Nicholson BJ.** (1998). A quantitative analysis of connexin-specific permeability differences of gap junctions expressed in HeLa transfectants and *Xenopus* oocytes. *J Cell Sci* 111(1):31-43.
- Casasnovas B.** (1996). Différenciation et maturation des réseaux neuronaux au cours de l'ontogénèse : Etude anatomique, électrophysiologique et pharmacologique du système nerveux stomatogastrique des crustacés. *Thèse Université Bordeaux I.*
- Casasnovas B, Meyrand P.** (1995). Functional differentiation of adult neural circuits from a single embryonic network. *J Neurosci* 15(8):5703-5718.



- Caserta MT, Barker JL.** (1994). Development of the GABAergic phenotype in murine spinal cord-dorsal root ganglion cultures. *Int J Dev Neurosci* 12(8):753-765.
- Cazalets JR, Cournil I, Geffard M, Moulins M.** (1987). Suppression of oscillatory activity in crustacean pyloric neurons: implication of GABAergic inputs. *J Neurosci* 7(9):2884-2893.
- Cazalets JR, Nagy F, Moulins M.** (1990a). Suppressive control of the crustacean pyloric network by a pair of identified interneurons. I. Modulation of the motor pattern. *J Neurosci* 10(2):448-457.
- Cazalets JR, Nagy F, Moulins M.** (1990b). Suppressive control of the crustacean pyloric network by a pair of identified interneurons. II. Modulation of neuronal properties. *J Neurosci* 10(2):458-468.
- Chang Q, Gonzalez M, Pinter MJ, Balice-Gordon RJ.** (1999). Gap junctional coupling and patterns of connexin expression among neonatal rat lumbar spinal motor neurons. *J Neurosci* 19(24):10813-10828.
- Christensen BN.** (1983). Distribution of electrotonic synapses on identified lamprey neurons: a comparison of a model prediction with an electron microscopic analysis. *J Neurophysiol* 49(3):705-716.
- Christie AE, Stein W, Quinlan JE, Beenhakker MP, Marder E, Nusbaum MP.** (2004). Actions of a histaminergic/peptidergic projection neuron on rhythmic motor patterns in the stomatogastric nervous system of the crab *Cancer borealis*. *J Comp Neurol* 469(2):153-169.
- Claiborne BJ, Selverston AI.** (1984). Histamine as a neurotransmitter in the stomatogastric nervous system of the spiny lobster. *J Neurosci* 4(3):708-721.
- Clair C, Chalumeau C, Tordjmann T, Poggioli J, Erneux C, Dupont G, Combettes L.** (2001). Investigation of the roles of Ca(2+) and InsP(3) diffusion in the coordination of Ca(2+) signals between connected hepatocytes. *J Cell Sci* 114(11):1999-2007.
- Combes D.** (1993). Processus d'intégration dans un système sensori-moteur simple : mécanismes cellulaires impliqués dans le contrôle d'un réseau moteur par un neurone mécanorécepteur primaire chez le homard. *Thèse Université Bordeaux I*.
- Combes D, Meyrand P, Simmers J.** (1999a). Motor pattern specification by dual descending pathways to a lobster rhythm-generating network. *J Neurosci* 19(9):3610-3619.
- Combes D, Meyrand P, Simmers J.** (1999b). Dynamic restructuring of a rhythmic motor program by a single mechanoreceptor neuron in lobster. *J Neurosci* 19(9):3620-3628.
- Connors BW, Benardo LS, Prince DA.** (1983). Coupling between neurons of the developing rat neocortex. *J Neurosci* 3(4):773-782.
- Connors BW, Long MA.** (2004). Electrical synapses in the mammalian brain. *Annu Rev Neurosci* 27:393-418.
- Cournil I, Meyrand P, Moulins M.** (1990). Identification of all GABA-immunoreactive neurons projecting to the lobster stomatogastric ganglion. *J Neurocytol* 19(4):478-493.





- Cruciani V, Mikalsen SO.** (2002). Connexins, gap junctional intercellular communication and kinases. *Biol Cell* 94(7-8):433-443.
- Curtin KD, Zhang Z, Wyman RJ.** (1999). *Drosophila* has several genes for gap junction proteins. *Gene* 232(2):191-201.
- Curtin KD, Zhang Z, Wyman RJ.** (2002). Gap junction proteins expressed during development are required for adult neural function in the *Drosophila* optic lamina. *J Neurosci* 22(16):7088-7096.
- Cusato K, Bosco A, Rozental R, Guimaraes CA, Reese BE, Linden R, Spray DC.** (2003). Gap junctions mediate bystander cell death in developing retina. *J Neurosci* 23(16):6413-6422.
- Dahl G, Levine E, Rabadan-Diehl C, Werner R.** (1991). Cell/cell channel formation involves disulfide exchange. *Eur J Biochem* 197(1):141-144.
- Dahl G, Werner R, Levine E, Rabadan-Diehl C.** (1992). Mutational analysis of gap junction formation. *Biophys J* 62(1):172-180.
- Daly C, Ziff EB.** (1997). Post-transcriptional regulation of synaptic vesicle protein expression and the developmental control of synaptic vesicle formation. *J Neurosci* 17(7):2365-2375.
- DeRiemer SA, Macagno ER.** (1981). Light microscopic analysis of contacts between pairs of identified leech neurons with combined use of horseradish peroxidase and lucifer yellow. *J Neurosci* 1(6):650-657.
- Dermietzel R.** (1998). Gap junction wiring: a 'new' principle in cell-to-cell communication in the nervous system? *Brain Res Brain Res Rev* 26(2-3):176-183.
- Dermietzel R, Spray DC.** (1993). Gap junctions in the brain: where, what type, how many and why? *Trends Neurosci* 16(5):186-192.
- Devor A, Yarom Y.** (2002). Electrotonic coupling in the inferior olivary nucleus revealed by simultaneous double patch recordings. *J Neurophysiol* 87(6):3048-3058.
- Dickinson PS, Marder E.** (1989). Peptidergic modulation of a multioscillator system in the lobster. I. Activation of the cardiac sac motor pattern by the neuropeptides proctolin and red pigment-concentrating hormone. *J Neurophysiol* 61(4):833-844.
- Dickinson PS, Nagy F.** (1983). Control of a central pattern generator by an identified modulatory interneurone in crustacea. II. Induction and modification of plateau properties in pyloric neurones. *J Exp Biol* 105:59-82.
- Distler PG, Boeckh J.** (1997). Synaptic connections between identified neuron types in the antennal lobe glomeruli of the cockroach, *Periplaneta americana*: I. Uniglomerular projection neurons. *J Comp Neurol* 378(3):307-319.
- Draguhn A, Traub RD, Schmitz D, Jefferys JG.** (1998). Electrical coupling underlies high-frequency oscillations in the hippocampus in vitro. *Nature* 394(6689):189-192.



- Dupont E, Hanganu IL, Kilb W, Hirsch S, Luhmann HJ.** (2006). Rapid developmental switch in the mechanisms driving early cortical columnar networks. *Nature* 439(7072):79-83.
- Dykes IM, Freeman FM, Bacon JP, Davies JA.** (2004). Molecular basis of gap junctional communication in the CNS of the leech *Hirudo medicinalis*. *J Neurosci* 24(4):886-894.
- Eisen JS, Marder E.** (1982). Mechanisms underlying pattern generation in lobster stomatogastric ganglion as determined by selective inactivation of identified neurons. III. Synaptic connections of electrically coupled pyloric neurons. *J Neurophysiol* 48(6):1392-1415.
- el Manira A, Clarac F.** (1994). Presynaptic inhibition is mediated by histamine and GABA in the crustacean escape reaction. *J Neurophysiol* 71(3):1088-1095.
- Elfgang C, Eckert R, Lichtenberg-Frate H, Butterweck A, Traub O, Klein RA, Hulser DF, Willecke K.** (1995). Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *J Cell Biol* 129(3):805-817.
- Fan RJ, Marin-Burgin A, French KA, Otto Friesen W.** (2005). A dye mixture (Neurobiotin and Alexa 488) reveals extensive dye-coupling among neurons in leeches; physiology confirms the connections. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 191(12):1157-1171.
- Faumont S.** (1999). Mécanismes cellulaires impliqués dans la sélection de programmes moteurs multiples par un même système de contrôle descendant : approches électrophysiologiques, pharmacologiques et immunohistochimiques. *Thèse Université Bordeaux I.*
- Faumont S, Combes D, Meyrand P, Simmers J.** (2005). Reconfiguration of multiple motor networks by short- and long-term actions of an identified modulatory neuron. *Eur J Neurosci* 22(10):2489-2502.
- Fenelon VS, Casasnovas B, Faumont S, Meyrand P.** (1998). Ontogenetic alteration in peptidergic expression within a stable neuronal population in lobster stomatogastric nervous system. *J Comp Neurol* 399(3):289-305.
- Fenelon VS, Kilman V, Meyrand P, Marder E.** (1999). Sequential developmental acquisition of neuromodulatory inputs to a central pattern-generating network. *J Comp Neurol* 408(3):335-351.
- Fenelon VS, Le Feuvre Y, Meyrand P.** (2004). Phylogenetic, ontogenetic and adult adaptive plasticity of rhythmic neural networks: a common neuromodulatory mechanism? *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 190(9):691-705.
- Figuroa XF, Alvina K, Martinez AD, Garces G, Roseblatt M, Boric MP, Saez JC.** (2004). Histamine reduces gap junctional communication of human tonsil high endothelial cells in culture. *Microvasc Res* 68(3):247-257.
- Frank E.** (1993). New life in an old structure: the development of synaptic pathways in the spinal cord. *Curr Opin Neurobiol* 3(1):82-86.



- Friend DS, Gilula NB.** (1972). Variations in tight and gap junctions in mammalian tissues. *J Cell Biol* 53(3):758-776.
- Froes MM, Correia AH, Garcia-Abreu J, Spray DC, Campos de Carvalho AC, Neto MV.** (1999). Gap-junctional coupling between neurons and astrocytes in primary central nervous system cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(13):7541-7546.
- Furshpan EJ, Potter DD.** (1959). Transmission at the giant motor synapses of the crayfish. *J Physiol* 145(2):289-325.
- Fushiki S, Perez Velazquez JL, Zhang L, Bechberger JF, Carlen PL, Naus CC.** (2003). Changes in neuronal migration in neocortex of connexin43 null mutant mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 62(3):304-314.
- Galarreta M, Hestrin S.** (1999). A network of fast-spiking cells in the neocortex connected by electrical synapses. *Nature* 402(6757):72-75.
- Getting PA.** (1989). Emerging principles governing the operation of neural networks. *Annu Rev Neurosci* 12:185-204.
- Gibson JR, Beierlein M, Connors BW.** (1999). Two networks of electrically coupled inhibitory neurons in neocortex. *Nature* 402(6757):75-79.
- Golan H, Grossman Y.** (1996). Block of glutamate decarboxylase decreases GABAergic inhibition at the crayfish synapses: possible role of presynaptic metabotropic mechanisms. *J Neurophysiol* 75(5):2089-2098.
- Golowasch JP.** (1990). Characterisation of a stomatogastric ganglion neuron. A biophysical and a mathematical description. *PhD Dissertation, Brandeis University, Waltham, MA.*
- Gong XQ, Nicholson BJ.** (2001). Size selectivity between gap junction channels composed of different connexins. *Cell Commun Adhes* 8(4-6):187-192.
- Goodenough DA, Goliger JA, Paul DL.** (1996). Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu Rev Biochem* 65:475-502.
- Goodenough DA, Revel JP.** (1970). A fine structural analysis of intercellular junctions in the mouse liver. *J Cell Biol* 45(2):272-290.
- Graubard K, Raper JA, Hartline DK.** (1980). Graded synaptic transmission between spiking neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77(6):3733-3735.
- Graubard K, Raper JA, Hartline DK.** (1983). Graded synaptic transmission between identified spiking neurons. *J Neurophysiol* 50(2):508-521.
- Gulyas AI, Miles R, Sik A, Toth K, Tamamaki N, Freund TF.** (1993). Hippocampal pyramidal cells excite inhibitory neurons through a single release site. *Nature* 366(6456):683-687.
- Hampson EC, Vaney DI, Weiler R.** (1992). Dopaminergic modulation of gap junction permeability between amacrine cells in mammalian retina. *J Neurosci* 12(12):4911-4922.



- Harris-Warrick RM, Johnson BR, Peck JH, Kloppenburg P, Ayali A, Skarbinski J.** (1998). Distributed effects of dopamine modulation in the crustacean pyloric network. *Ann N Y Acad Sci* 860:155-167.
- Harris-Warrick RM, Marder E, Selverston AI, Moulins M.** (1992). Dynamic biological networks. The stomatogastric nervous system. *Cambridge The MIT Press*.
- Hartline DK, Maynard DM.** (1975). Motor patterns in the stomatogastric ganglion of the lobster *Panulirus argus*. *J Exp Biol* 62(2):405-420.
- Hashemzadeh-Gargari H, Freschi JE.** (1992). Histamine activates chloride conductance in motor neurons of the lobster cardiac ganglion. *J Neurophysiol* 68(1):9-15.
- Hatton GI, Yang QZ.** (1996). Synaptically released histamine increases dye coupling among vasopressinergic neurons of the supraoptic nucleus: mediation by H1 receptors and cyclic nucleotides. *J Neurosci* 16(1):123-129.
- Hatton GI, Yang QZ.** (2001). Ionotropic histamine receptors and H2 receptors modulate supraoptic oxytocin neuronal excitability and dye coupling. *J Neurosci* 21(9):2974-2982.
- He S, Weiler R, Vaney DI.** (2000). Endogenous dopaminergic regulation of horizontal cell coupling in the mammalian retina. *J Comp Neurol* 418(1):33-40.
- Helluy SM, Beltz BS.** (1991). Embryonic development of the American lobster (*Homarus americanus*) : quantitative staging and characterization of an embryonic molt cycle. *Biol Bull* 180:355-371.
- Hidaka S, Akahori Y, Kurosawa Y.** (2004). Dendrodendritic electrical synapses between mammalian retinal ganglion cells. *J Neurosci* 24(46):10553-10567.
- Irace C, Scorziello A, Maffettone C, Pignataro G, Matrone C, Adornetto A, Santamaria R, Annunziato L, Colonna A.** (2005). Divergent modulation of iron regulatory proteins and ferritin biosynthesis by hypoxia/reoxygenation in neurones and glial cells. *J Neurochem* 95(5):1321-1331.
- Johnson BR, Harris-Warrick RM.** (1990). Aminergic modulation of graded synaptic transmission in the lobster stomatogastric ganglion. *J Neurosci* 10(7):2066-2076.
- Johnson BR, Peck JH, Harris-Warrick RM.** (1993). Amine modulation of electrical coupling in the pyloric network of the lobster stomatogastric ganglion. *J Comp Physiol [A]* 172(6):715-732.
- Johnson BR, Peck JH, Harris-Warrick RM.** (1994). Differential modulation of chemical and electrical components of mixed synapses in the lobster stomatogastric ganglion. *J Comp Physiol [A]* 175(2):233-249.
- Kaila K, Voipio J.** (1987). Postsynaptic fall in intracellular pH induced by GABA-activated bicarbonate conductance. *Nature* 330(6144):163-165.
- Kandler K, Katz LC.** (1995). Neuronal coupling and uncoupling in the developing nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 5(1):98-105.





- Kandler K, Katz LC.** (1998). Coordination of neuronal activity in developing visual cortex by gap junction-mediated biochemical communication. *J Neurosci* 18(4):1419-1427.
- Katz PS, Eigg MH, Harris-Warrick RM.** (1989). Serotonergic/cholinergic muscle receptor cells in the crab stomatogastric nervous system. I. Identification and characterization of the gastropyloric receptor cells. *J Neurophysiol* 62(2):558-570.
- Katz PS, Harris-Warrick RM.** (1989). Serotonergic/cholinergic muscle receptor cells in the crab stomatogastric nervous system. II. Rapid nicotinic and prolonged modulatory effects on neurons in the stomatogastric ganglion. *J Neurophysiol* 62(2):571-581.
- Katz PS, Harris-Warrick RM.** (1990). Neuromodulation of the crab pyloric central pattern generator by serotonergic/cholinergic proprioceptive afferents. *J Neurosci* 10(5):1495-1512.
- Katz PS, Harris-Warrick RM.** (1991). Recruitment of crab gastric mill neurons into the pyloric motor pattern by mechanosensory afferent stimulation. *J Neurophysiol* 65(6):1442-1451.
- Kiehn O, Harris-Warrick RM.** (1992a). 5-HT modulation of hyperpolarization-activated inward current and calcium-dependent outward current in a crustacean motor neuron. *J Neurophysiol* 68(2):496-508.
- Kiehn O, Harris-Warrick RM.** (1992b). Serotonergic stretch receptors induce plateau properties in a crustacean motor neuron by a dual-conductance mechanism. *J Neurophysiol* 68(2):485-495.
- Kilman V.** (1998). Multiple roles of neuromodulators throughout life : an anatomical study of the crustacean stomatogastric nervous system. *PhD Dissertation, Brandeis University, Waltham, MA.*
- Kilman V, Fenelon VS, Richards KS, Thirumalai V, Meyrand P, Marder E.** (1999). Sequential developmental acquisition of cotransmitters in identified sensory neurons of the stomatogastric nervous system of the lobsters, *Homarus americanus* and *Homarus gammarus*. *J Comp Neurol* 408(3):318-334.
- Kloppenborg P, Levini RM, Harris-Warrick RM.** (1999). Dopamine modulates two potassium currents and inhibits the intrinsic firing properties of an identified motor neuron in a central pattern generator network. *J Neurophysiol* 81(1):29-38.
- Lampe PD, Lau AF.** (2000). Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins. *Arch Biochem Biophys* 384(2):205-215.
- Landesman Y, White TW, Starich TA, Shaw JE, Goodenough DA, Paul DL.** (1999). Innexin-3 forms connexin-like intercellular channels. *J Cell Sci* 112(14):2391-2396.
- Larimer JL.** (1988). The command hypothesis: a new view using an old example. *Trends Neurosci* 11(11):506-510.
- Le Bon-Jego M, Cattaert D.** (2002). Inhibitory component of the resistance reflex in the locomotor network of the crayfish. *J Neurophysiol* 88(5):2575-2588.



- Le Feuvre Y.** (2000). Répression des activités motrices adultes par un ensemble de neurones modulateurs chez l'embryon : étude morphologique, immunocytochimique et électrophysiologique des réseaux neuronaux du système nerveux stomatogastrique des crustacés. *Thèse Université Bordeaux I.*
- Le Feuvre Y, Fenelon VS, Meyrand P.** (1999). Central inputs mask multiple adult neural networks within a single embryonic network. *Nature* 402(6762):660-664.
- Le Feuvre Y, Fenelon VS, Meyrand P.** (2001). Ontogeny of modulatory inputs to motor networks: early established projection and progressive neurotransmitter acquisition. *J Neurosci* 21(4):1313-1326.
- Li L, Pulver SR, Kelley WP, Thirumalai V, Sweedler JV, Marder E.** (2002). Orcokinin peptides in developing and adult crustacean stomatogastric nervous systems and pericardial organs. *J Comp Neurol* 444(3):227-244.
- Lieske SP, Thoby-Brisson M, Telgkamp P, Ramirez JM.** (2000). Reconfiguration of the neural network controlling multiple breathing patterns: eupnea, sighs and gasps. *Nat Neurosci* 3(6):600-607.
- Llinas R, Baker R, Sotelo C.** (1974). Electrotonic coupling between neurons in cat inferior olive. *J Neurophysiol* 37(3):560-571.
- Loewenstein Y, Yarom Y, Sompolinsky H.** (2001). The generation of oscillations in networks of electrically coupled cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(14):8095-8100.
- Long MA, Landisman CE, Connors BW.** (2004). Small clusters of electrically coupled neurons generate synchronous rhythms in the thalamic reticular nucleus. *J Neurosci* 24(2):341-349.
- Lugo-Garcia N, Blanco RE.** (1991). Localization of GAD- and GABA-like immunoreactivity in ground squirrel retina: retrograde labeling demonstrates GAD-positive ganglion cells. *Brain Res* 564(1):19-26.
- MacVicar BA, Dudek FE.** (1981). Electrotonic coupling between pyramidal cells: a direct demonstration in rat hippocampal slices. *Science* 213(4509):782-785.
- MacVicar BA, Dudek FE.** (1982). Electrotonic coupling between granule cells of rat dentate gyrus: physiological and anatomical evidence. *J Neurophysiol* 47(4):579-592.
- Makowski L, Caspar DL, Phillips WC, Goodenough DA.** (1977). Gap junction structures. II. Analysis of the x-ray diffraction data. *J Cell Biol* 74(2):629-645.
- 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. *J Neurophysiol* 77(5):2736-2752.
- Marder E, Christie AE, Kilman VL.** (1995). Functional organization of cotransmission systems: lessons from small nervous systems. *Invert Neurosci* 1(2):105-112.



- Marder E, Weimann JM.** (1992). Modulatory control of multiple task processing in the stomatogastric nervous system. *In : Neurobiology of motor program selection.* Kien J, McCrohan CR and Winlow W eds.
- Maynard DM, Selverston AI.** (1975). Organization of the stomatogastric ganglion of the spiny lobster. IV. The pyloric system. *J Comp Physiol* 100:161-182.
- McClintock TS, Ache BW.** (1989). Histamine directly gates a chloride channel in lobster olfactory receptor neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(20):8137-8141.
- McDearmid JR, Scrymgeour-Wedderburn JF, Sillar KT.** (1997). Aminergic modulation of glycine release in a spinal network controlling swimming in *Xenopus laevis*. *J Physiol* 503(1):111-117.
- McMahon DG, Brown DR.** (1994). Modulation of gap-junction channel gating at zebrafish retinal electrical synapses. *J Neurophysiol* 72(5):2257-2268.
- McMahon DG, Knapp AG, Dowling JE.** (1989). Horizontal cell gap junctions: single-channel conductance and modulation by dopamine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(19):7639-7643.
- McMahon DG, Mattson MP.** (1996). Horizontal cell electrical coupling in the giant danio: synaptic modulation by dopamine and synaptic maintenance by calcium. *Brain Res* 718(1-2):89-96.
- Meyrand P, Faumont S, Simmers J, Christie AE, Nusbaum MP.** (2000). Species-specific modulation of pattern-generating circuits. *Eur J Neurosci* 12(7):2585-2596.
- Meyrand P, Simmers J, Moulins M.** (1991). Construction of a pattern-generating circuit with neurons of different networks. *Nature* 351(6321):60-63.
- Meyrand P, Simmers J, Moulins M.** (1994). Dynamic construction of a neural network from multiple pattern generators in the lobster stomatogastric nervous system. *J Neurosci* 14(2):630-644.
- Miller JP, Selverston AI.** (1979). Rapid killing of single neurons by irradiation of intracellularly injected dye. *Science* 206(4419):702-704.
- Miller JP, Selverston AI.** (1982a). Mechanisms underlying pattern generation in lobster stomatogastric ganglion as determined by selective inactivation of identified neurons. II. Oscillatory properties of pyloric neurons. *J Neurophysiol* 48(6):1378-1391.
- Miller JP, Selverston AI.** (1982b). Mechanisms underlying pattern generation in lobster stomatogastric ganglion as determined by selective inactivation of identified neurons. IV. Network properties of pyloric system. *J Neurophysiol* 48(6):1416-1432.
- Miwa A, Ui M, Kawai N.** (1990). G protein is coupled to presynaptic glutamate and GABA receptors in lobster neuromuscular synapse. *J Neurophysiol* 63(1):173-180.
- Montoro RJ, Yuste R.** (2004). Gap junctions in developing neocortex: a review. *Brain Res Brain Res Rev* 47(1-3):216-226.
- Moortgat KT, Bullock TH, Sejnowski TJ.** (2000). Gap junction effects on precision and frequency of a model pacemaker network. *J Neurophysiol* 83(2):984-997.



- Moss BL, Fuller AD, Sahley CL, Burrell BD.** (2005). Serotonin modulates axo-axonal coupling between neurons critical for learning in the leech. *J Neurophysiol* 94(4):2575-2589.
- Moulins M, Cournil I.** (1982). All-or-none control of the bursting properties of the pacemaker neurons of the lobster pyloric pattern generator. *J Neurobiol* 13(5):447-458.
- Mulloney B.** (1977). Organization of the stomatogastric ganglion of the spiny lobster. V. Coordination of the gastric and pyloric systems. *J Comp Physiol* 122:227-240.
- Mulloney B, Hall WM.** (1991). Neurons with histaminelike immunoreactivity in the segmental and stomatogastric nervous systems of the crayfish *Pacifastacus leniusculus* and the lobster *Homarus americanus*. *Cell Tissue Res* 266(1):197-207.
- Mulloney B, Selverston AI.** (1974a). Organization of the stomatogastric ganglion of the spiny lobster. I. Neurons driving the lateral teeth. *J Comp Physiol* 91:1-32.
- Mulloney B, Selverston AI.** (1974b). Organization of the stomatogastric ganglion of the spiny lobster. III. Coordination of the two subsets of the gastric system. *J Comp Physiol* 91:53-78.
- Nagy F.** (1981). Etude de l'expression d'activités motrices rythmiques organisées par des générateurs paucineuroniques du système nerveux stomatogastrique des crustacés décapodes. *Thèse Université Bordeaux I.*
- Nagy F, Cardi P.** (1994). A rhythmic modulatory gating system in the stomatogastric nervous system of *Homarus gammarus*. II. Modulatory control of the pyloric CPG. *J Neurophysiol* 71(6):2490-2502.
- Nagy F, Dickinson PS.** (1983). Control of a central pattern generator by an identified modulatory interneurone in crustacea. I. Modulation of the pyloric motor output. *J Exp Biol* 105:33-58.
- Nargeot R.** (1995). Plasticité des réseaux neuronaux stomatogastriques des crustacés : étude électrophysiologique et pharmacologique. *Thèse Université Bordeaux I.*
- Norris BJ, Coleman MJ, Nusbaum MP.** (1994). Recruitment of a projection neuron determines gastric mill motor pattern selection in the stomatogastric nervous system of the crab, *Cancer borealis*. *J Neurophysiol* 72(4):1451-1463.
- Nusbaum MP, Marder E.** (1989a). A modulatory proctolin-containing neuron (MPN). I. Identification and characterization. *J Neurosci* 9(5):1591-1599.
- Nusbaum MP, Marder E.** (1989b). A modulatory proctolin-containing neuron (MPN). II. State-dependent modulation of rhythmic motor activity. *J Neurosci* 9(5):1600-1607.
- O'Brien J, Nguyen HB, Mills SL.** (2004). Cone photoreceptors in bass retina use two connexins to mediate electrical coupling. *J Neurosci* 24(24):5632-5642.
- Orona E, Ache BW.** (1992). Physiological and pharmacological evidence for histamine as a neurotransmitter in the olfactory CNS of the spiny lobster. *Brain Res* 590(1-2):136-143.
- Panchin Y.** (2000). Gap junction communication in invertebrates : the innexin gene family. 49:389-422.





- Panchin Y, Kelmanson I, Matz M, Lukyanov K, Usman N, Lukyanov S.** (2000). A ubiquitous family of putative gap junction molecules. *Curr Biol* 10(13):R473-474.
- Pearlstein E, Watson AH, Bevengut M, Cattaert D.** (1998). Inhibitory connections between antagonistic motor neurones of the crayfish walking legs. *J Comp Neurol* 399(2):241-254.
- Peinado A, Yuste R, Katz LC.** (1993a). Extensive dye coupling between rat neocortical neurons during the period of circuit formation. *Neuron* 10(1):103-114.
- Peinado A, Yuste R, Katz LC.** (1993b). Gap junctional communication and the development of local circuits in neocortex. *Cereb Cortex* 3(5):488-498.
- Peracchia C.** (1990). Increase in gap junction resistance with acidification in crayfish septate axons is closely related to changes in intracellular calcium but not hydrogen ion concentration. *J Membr Biol* 113(1):75-92.
- Perkins KL, Wong RK.** (1996). Ionic basis of the postsynaptic depolarizing GABA response in hippocampal pyramidal cells. *J Neurophysiol* 76(6):3886-3894.
- Phelan P.** (2000). Gap junction communication in invertebrates : the innexin gene family. *Current Topics in Membranes* 49:389-422.
- Phelan P, Bacon JP, J.A. D, L.A. S, Todman MG, Avery L, Baines RA, Barnes TM, Ford C, Hekimi S, Lee R, Shaw JE, Starich T, Curtin KD, Sun YA, Wyman RJ.** (1998a). Innexins : a family of invertebrate gap-junction proteins. *Trends Genet* 14:348-349.
- Phelan P, Stebbings LA, Baines RA, Bacon JP, Davies JA, Ford C.** (1998b). *Drosophila* Shaking-B protein forms gap junctions in paired *Xenopus* oocytes. *Nature* 391(6663):181-184.
- Picolino M, Neyton J, Witkovsky P, Gerschenfeld HM.** (1982). gamma-Aminobutyric acid antagonists decrease junctional communication between L-horizontal cells of the retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(11):3671-3675.
- Piri N, Yamashita CK, Shih J, Akhmedov NB, Farber DB.** (2003). Differential expression of rod photoreceptor cGMP-phosphodiesterase alpha and beta subunits: mRNA and protein levels. *J Biol Chem* 278(39):36999-37005.
- Prinz AA, Bucher D, Marder E.** (2004). Similar network activity from disparate circuit parameters. *Nat Neurosci* 7(12):1345-1352.
- Pulver SR, Thirumalai V, Richards KS, Marder E.** (2003). Dopamine and histamine in the developing stomatogastric system of the lobster *Homarus americanus*. *J Comp Neurol* 462(4):400-414.
- Rami A, Volkman T, Winckler J.** (2001). Effective reduction of neuronal death by inhibiting gap junctional intercellular communication in a rodent model of global transient cerebral ischemia. *Exp Neurol* 170(2):297-304.
- Raper JA.** (1979). Nonimpulse-mediated synaptic transmission during the generation of a cyclic motor program. *Science* 205(4403):304-306.



- Revel JP, Karnovsky MJ.** (1967). Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *J Cell Biol* 33(3):C7-C12.
- Richards KS, Marder E.** (2000). The actions of crustacean cardioactive peptide on adult and developing stomatogastric ganglion motor patterns. *J Neurobiol* 44(1):31-44.
- Richards KS, Miller WL, Marder E.** (1999). Maturation of lobster stomatogastric ganglion rhythmic activity. *J Neurophysiol* 82(4):2006-2009.
- Roerig B, Feller MB.** (2000). Neurotransmitters and gap junctions in developing neural circuits. *Brain Res Brain Res Rev* 32(1):86-114.
- Rorig B, Sutor B.** (1996). Serotonin regulates gap junction coupling in the developing rat somatosensory cortex. *Eur J Neurosci* 8(8):1685-1695.
- Saez JC, Berthoud VM, Branes MC, Martinez AD, Beyer EC.** (2003). Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev* 83(4):1359-1400.
- Saez JC, Connor JA, Spray DC, Bennett MV.** (1989). Hepatocyte gap junctions are permeable to the second messenger, inositol 1,4,5-trisphosphate, and to calcium ions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(8):2708-2712.
- Schulz DJ, Goillard JM, Marder E.** (2006). Variable channel expression in identified single and electrically coupled neurons in different animals. *Nat Neurosci* 9(3):356-362.
- Selverston AI, Moulins M.** (1987). The crustacean stomatogastric system. *Heidelberg : Springer.*
- Selverston AI, Mulloney B.** (1974). Organization of the stomatogastric ganglion of the spiny lobster. II. Neurons driving the medial tooth. *J Comp Physiol* 91:33-51.
- Shah MM, Martinez AM, Fletcher WH.** (2002). The connexin43 gap junction protein is phosphorylated by protein kinase A and protein kinase C: in vivo and in vitro studies. *Mol Cell Biochem* 238(1-2):57-68.
- Shinohara K, Funabashi T, Mitushima D, Kimura F.** (2000a). Effects of gap junction blocker on vasopressin and vasoactive intestinal polypeptide rhythms in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro. *Neurosci Res* 38(1):43-47.
- Shinohara K, Hiruma H, Funabashi T, Kimura F.** (2000b). GABAergic modulation of gap junction communication in slice cultures of the rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* 96(3):591-596.
- Sigvardt KA, Mulloney B.** (1982). Properties of synapses made by IVN command-interneurones in the stomatogastric ganglion of the spiny lobster *Panulirus interruptus*. *J Exp Biol* 97:153-168.
- Simmers J, Moulins M.** (1988). A disynaptic sensorimotor pathway in the lobster stomatogastric system. *J Neurophysiol* 59(3):740-756.
- Skiebe P.** (1999a). Allatostatin-like immunoreactivity in the stomatogastric nervous system and the pericardial organs of the crab *Cancer pagurus*, the lobster *Homarus americanus*, and the crayfish *Cherax destructor* and *Procambarus clarkii*. *J Comp Neurol* 403(1):85-105.



- Skiebe P.** (2003). Neuropeptides in the crayfish stomatogastric nervous system. *Microsc Res Tech* 60(3):302-312.
- Skiebe P, Dietel C, Schmidt M.** (1999b). Immunocytochemical localization of FLRFamide-, proctolin-, and CCAP-like peptides in the stomatogastric nervous system and neurohemal structures of the crayfish, *Cherax destructor*. *J Comp Neurol* 414(4):511-532.
- Skiebe P, Dreger M, Meseke M, Evers JF, Hucho F.** (2002). Identification of orcokinin in single neurons in the stomatogastric nervous system of the crayfish, *Cherax destructor*. *J Comp Neurol* 444(3):245-259.
- Sloper JJ.** (1972). Gap junctions between dendrites in the primate neocortex. *Brain Res* 44(2):641-646.
- Sloper JJ, Powell TP.** (1978). Gap junctions between dendrites and somata of neurons in the primate sensori-motor cortex. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 203(1150):39-47.
- Sotelo C, Llinas R.** (1972). Specialized membrane junctions between neurons in the vertebrate cerebellar cortex. *J Cell Biol* 53(2):271-289.
- Spirito CP.** (1975). Organization of the crayfish oesophageal nervous system. *J Comp Physiol* 102:237-249.
- Spitzer NC, Kingston PA, Manning TJ, Conklin MW.** (2002). Outside and in: development of neuronal excitability. *Curr Opin Neurobiol* 12(3):315-323.
- Spray DC, Stern JH, Harris AL, Bennett MV.** (1982). Gap junctional conductance: comparison of sensitivities to H and Ca ions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(2):441-445.
- Starich T, Sheehan M, Jadrach J, Shaw J.** (2001). Innexins in *C. elegans*. *Cell Commun Adhes* 8(4-6):311-314.
- Starich TA, Lee RY, Panzarella C, Avery L, Shaw JE.** (1996). eat-5 and unc-7 represent a multigene family in *Caenorhabditis elegans* involved in cell-cell coupling. *J Cell Biol* 134(2):537-548.
- Stebbing LA, Todman MG, Phillips R, Greer CE, Tam J, Phelan P, Jacobs K, Bacon JP, Davies JA.** (2002). Gap junctions in *Drosophila*: developmental expression of the entire innexin gene family. *Mech Dev* 113(2):197-205.
- Suchyna TM, Nitsche JM, Chilton M, Harris AL, Veenstra RD, Nicholson BJ.** (1999). Different ionic selectivities for connexins 26 and 32 produce rectifying gap junction channels. *Biophys J* 77(6):2968-2987.
- Sun QQ, Dale N.** (1998). Differential inhibition of N and P/Q Ca<sup>2+</sup> currents by 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>1D</sub> receptors in spinal neurons of *Xenopus* larvae. *J Physiol* 510(1):103-120.
- Swensen AM, Golowasch J, Christie AE, Coleman MJ, Nusbaum MP, Marder E.** (2000a). GABA and responses to GABA in the stomatogastric ganglion of the crab *Cancer borealis*. *J Exp Biol* 203(14):2075-2092.



- Swensen AM, Marder E.** (2000b). Multiple peptides converge to activate the same voltage-dependent current in a central pattern-generating circuit. *J Neurosci* 20(18):6752-6759.
- Szabo TM, Faber DS, Zoran MJ.** (2004). Transient electrical coupling delays the onset of chemical neurotransmission at developing synapses. *J Neurosci* 24(1):112-120.
- Tamas G, Buhl EH, Somogyi P.** (1997). Fast IPSPs elicited via multiple synaptic release sites by different types of GABAergic neurone in the cat visual cortex. *J Physiol* 500(3):715-738.
- Tazaki K, Tazaki Y.** (1997). Neural control of the pyloric region in the foregut of the shrimp *Penaeus* (Decapoda : Penaeidae). *J Comp Physiol [A]* 181(4):367-332.
- Tazaki K, Tazaki Y.** (2000). Multiple motor patterns in the stomatogastric ganglion of the shrimp *Penaeus japonicus*. *J Comp Physiol [A]* 186(2):105-118.
- Tierney AJ, Blanck J, Mercier J.** (1997). FMRFamide-like peptides in the crayfish (*Procambarus clarkii*) stomatogastric nervous system: distribution and effects on the pyloric motor pattern. *J Exp Biol* 200(Pt 24):3221-3233.
- Tierney AJ, Godleski MS, Rattananont P.** (1999). Serotonin-like immunoreactivity in the stomatogastric nervous systems of crayfishes from four genera. *Cell Tissue Res* 295(3):537-551.
- Traub RD.** (1995). Model of synchronized population bursts in electrically coupled interneurons containing active dendritic conductances. *J Comput Neurosci* 2(4):283-289.
- Tresch MC, Kiehn O.** (2000). Motor coordination without action potentials in the mammalian spinal cord. *Nat Neurosci* 3(6):593-599.
- Trimmer BA, Kobienski LA, Kravitz EA.** (1987). Purification and characterization of FMRFamidelike immunoreactive substances from the lobster nervous system: isolation and sequence analysis of two closely related peptides. *J Comp Neurol* 266(1):16-26.
- Uemura E.** (1985). Age-related changes in the subiculum of *Macaca mulatta*: dendritic branching pattern. *Exp Neurol* 87(3):412-427.
- Urschel S, Hoher T, Schubert T, Alev C, Sohl G, Worsdorfer P, Asahara T, Dermietzel R, Weiler R, Willecke K.** (2006). Protein kinase A mediated phosphorylation of connexin36 in mouse retina results in decreased gap junctional communication between AII amacrine cells. *J Biol Chem.*
- van den Pol AN.** (1985). Dual ultrastructural localization of two neurotransmitter-related antigens: colloidal gold-labeled neurophysin-immunoreactive supraoptic neurons receive peroxidase-labeled glutamate decarboxylase- or gold-labeled GABA-immunoreactive synapses. *J Neurosci* 5(11):2940-2954.
- Vandecasteele M, Glowinski J, Venance L.** (2005). Electrical synapses between dopaminergic neurons of the substantia nigra pars compacta. *J Neurosci* 25(2):291-298.





- Velazquez JL, Han D, Carlen PL.** (1997). Neurotransmitter modulation of gap junctional communication in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 9(12):2522-2531.
- Veruki ML, Hartveit E.** (2002). Electrical synapses mediate signal transmission in the rod pathway of the mammalian retina. *J Neurosci* 22(24):10558-10566.
- Walton KD, Navarrete R.** (1991). Postnatal changes in motoneurone electrotonic coupling studied in the in vitro rat lumbar spinal cord. *J Physiol* 433:283-305.
- Watanabe A.** 1958. The interaction of electrical activity among neurons of lobster cardiac ganglion. *Jpn J Physiol* 8(4):305-318.
- Weimann JM, Marder E, Evans B, Calabrese RL.** (1993). The effects of SDRNFLRFamide and TNRNFLRFamide on the motor patterns of the stomatogastric ganglion of the crab *Cancer borealis*. *J Exp Biol* 181:1-26.
- Weimann JM, Meyrand P, Marder E.** (1991). Neurons that form multiple pattern generators: identification and multiple activity patterns of gastric/pyloric neurons in the crab stomatogastric system. *J Neurophysiol* 65(1):111-122.
- Wildering WC, Janse C.** (1992). Serotonergic modulation of junctional conductance in an identified pair of neurons in the mollusc *Lymnaea stagnalis*. *Brain Res* 595(2):343-352.
- Willecke K, Eiberger J, Degen J, Eckardt D, Romualdi A, Guldenagel M, Deutsch U, Sohl G.** (2002). Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem* 383(5):725-737.
- Wilson DM.** (1961). The central nervous system control of flight in the locust. *J Exp Biol* 38:471-479.
- Winmill RE, Hedrick MS.** (2003). Gap junction blockade with carbenoxolone differentially affects fictive breathing in larval and adult bullfrogs. *Respir Physiol Neurobiol* 138(2-3):239-251.
- Yang Q, Michelson HB.** (2001). Gap junctions synchronize the firing of inhibitory interneurons in guinea pig hippocampus. *Brain Res* 907(1-2):139-143.
- Yuste R, Nelson DA, Rubin WW, Katz LC.** (1995). Neuronal domains in developing neocortex: mechanisms of coactivation. *Neuron* 14(1):7-17.
- Yuste R, Peinado A, Katz LC.** (1992). Neuronal domains in developing neocortex. *Science* 257(5070):665-669.