

Université de Montréal

**Étude de la caractérisation de récepteurs à la sérotonine et dopamine
potentiellement impliqués dans la mémoire et l'apprentissage d'*Aplysia
californica***

par
Demian Barbas

Département de Biochimie
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en Biochimie

Juin 2005

©Demian Barbas, 2005



W

4

U58

2005

v. 135



Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Étude de la caractérisation de récepteurs à la sérotonine et dopamine
potentiellement impliqués dans la mémoire et l'apprentissage d'*Aplysia
californica***

présentée par :
Demian Barbas

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Gerardo Ferbeyre, Ph.D.,	Président-rapporteur
Luc DesGroseillers, Ph.D.,	Directeur de recherché
Vincent F. Castellucci, Ph.D.,	Co-Directeur de recherche
Terence E. Hébert, Ph.D.,	Membre du jury
Thomas W. Abrams, Ph.D.,	Examineur externe
Pierre Jolicoeur, Ph.D.	Représentant du doyen

Thèse acceptée le : 29/08/2005

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier le Dr. Luc DesGroseillers pour m'avoir accueilli dans son laboratoire durant mon baccalauréat, question de débiter mon apprentissage de biochimiste. Je le remercie pour sa grande disponibilité, pour la confiance qu'il m'a témoignée durant mon doctorat, pour ses précieux conseils sur mon projet de doctorat et sur la vie en générale et pour ces quelques parties de soccer le dimanche matin en sa compagnie. Je me considère privilégié d'avoir progressé comme scientifique sous son aile.

J'aimerais également remercier chaleureusement le Dr. Vincent F. Castellucci pour son support en tant que co-directeur. Son dynamisme, sa disponibilité malgré son emploi du temps chargé, sa grande expérience en tant que chercheur ainsi que son soutien constant furent pour moi une grande source de motivation et d'inspiration.

Je tiens particulièrement à remercier le Dr. Jacques P. Zappulla. Il a non seulement été mon mentor durant les trois premières années dans le laboratoire, mais il a également été le précurseur de mon projet doctorat. Je lui voue un respect inestimable et le remercie pour son amitié, sa grande générosité et pour toutes ces merveilleuses conversations le vendredi après-midi autours d'un bon café. Malgré son caractère bougon, notre complicité nous a permis de partager que de bons moments à rigoler.

Un gros merci au Dr. Stéphane Angers pour sa collaboration précieuse, pour nos innombrables discussions scientifiques mais plus important, pour cette belle complicité et amitié que nous avons développées au cours des années. Il m'a non seulement baptisé «*la Pancarte*» mais il a gracieusement propagé ce pseudonyme dans le département.

Je voudrais remercier le Dr. Michel Bouvier avec qui j'ai eu la chance de collaborer mais également pour sa personnalité contagieuse et en tant que scientifique de premier plan.

Merci également aux Dr. Habib Mohamed et Dr. John H. Byrne pour leur collaboration.

Je remercie chaleureusement Annie Campbell pour son support et sa collaboration tout au long de mon doctorat. Un gros merci pour ton travail assidu, particulièrement durant les expériences d'hybridation *in situ* et culture neuronale.

Je remercie tous les membres des laboratoires DesGroseillers et Castellucci durant toutes ces années. Particulièrement, Louise Wickham, Ming Luo, Nadia Bonvouloir, Thomas Duchaine, Mélanie Carpentier, Luc Furic et Georges Elvira, formant l'ancienne garde, qui furent pour moi de précieux collègues. Toto, Nade, Lulu de Furax, Georgita et Mel, merci pour votre amitié, ces beaux moments passés ensemble dans le labo et pour ses innombrables conversations sur tout sauf le labo.

Je tiens également à remercier tous les membres du Département de Biochimie de l'UdeM, dont Mireille Fyfe, Monique Vasseur et Louise Cournoyer pour leur assistance technique. Une pensée particulière à FX Valois-Campbell, Galia Ghaddar, Ali Salahpour, Alex Benoît, Andreas Breit, Laurent Châtel-Chaix, Fred-Antoine Mallette, Mathieu St-Louis que je considère non seulement comme des amis mais également comme des scientifiques exceptionnels.

Je remercie mes grands amis, Phil et Charlot, pour leur soutien constant durant toutes ces années. Malgré leurs blagues innombrables sur mon emploi du temps, je sais qu'ils sont fiers de leur chum!!!!

À mon épouse, Annie Montmarquette, je dirais tout simplement que ta présence à mes côtés me rend non seulement un meilleur homme, mais fait en sorte que toutes ces petites choses qui composent notre quotidien sont synonymes de bonheur pour moi. Sa confiance, sa patience et ses encouragements me permirent de persévérer dans cette aventure. Merci pour notre passé, notre présent, notre avenir et bien plus encore.

Je tiens à remercier ma famille et particulièrement mes parents sans qui je n'aurais pu compléter de si longues études. Cette thèse est le fruit de leur grand courage et de leur persévérance puisque qu'ils ont quitté l'Argentine pour nous permettre, à moi et mon frère, d'avoir toutes les chances et les possibilités d'accomplir nos rêves. Ils m'ont légué leur amour pour l'éducation et la vie en générale. C'est mon père qui m'a initié à la Biochimie en me présentant une brochure du Département de Biochimie de l'Université de Montréal. Pour toutes ces raisons, je leur dédis cet ouvrage.

Finalement, merci au CRSNG, au FCAR/FRSQ, à la FES pour leur soutien financier et merci aux membres du jury d'avoir accepté d'évaluer cette thèse.

Résumé

De plus en plus de travaux en neurosciences commencent à apporter des éléments de réponse quant aux mécanismes moléculaires responsables de l'élaboration de la mémoire et de l'apprentissage. Depuis le début des années 1970, les progrès scientifiques importants dans ce domaine ont été réalisés chez l'aplysie. La sérotonine (5-HT) est un neurotransmetteur qui joue un rôle déterminant chez cet invertébré dans l'activation et la modulation de ces phénomènes par l'intermédiaire de récepteurs couplés aux protéines G. Il reste que même si l'on réduit le système à sa plus simple expression biologique, l'action de ce neurotransmetteur mobilise une réponse qui ne peut s'expliquer totalement par les éléments connus jusqu'à maintenant. Dans cette optique, nous avons entrepris des travaux qui consistent à identifier ces récepteurs sérotoninergiques. De plus, nous voulons caractériser les mécanismes moléculaires responsables de l'action de ces récepteurs. Pour y parvenir, nous avons utilisé une approche de criblage d'une banque d'ADNc du système nerveux central (SNC) de l'aplysie pour cloner de nouveaux récepteurs sérotoninergiques.

Dans un premier temps, nous avons donc complété la caractérisation moléculaire et pharmacologique du récepteur 5-HT_{ap2}, qui s'est avéré être le second récepteur à 5-HT couplé négativement à l'adénylate cyclase identifié chez l'aplysie. Nous nous sommes concentrés par la suite à déterminer la cartographie de l'expression des récepteurs 5-HT_{ap1} et 5-HT_{ap2}, deux récepteurs couplés à G_i et exprimés dans le SNC. Par hybridation in situ, nous avons déterminé que l'ARNm de ces deux protéines était exprimé dans la majorité de grappes de cellules sensorielles chez l'aplysie en comparant la localisation

des signaux d'hybridation avec ceux de la sensorine. Nous avons également confirmé le rôle potentiel d'autorécepteur de ces deux protéines par la détection de leur expression dans plusieurs neurones sérotoninergiques.

Finalement, nous avons également identifié un récepteur dopaminergique durant nos criblages. Le récepteur Ap_{dop1} est un récepteur de type D1, donc couplé positivement à l'adénylate cyclase et qui est également capable d'augmenter la concentration en AMPc suite à la liaison de 5-HT et d'octopamine, mais ce à des concentrations élevées. Ce nouveau récepteur possède également une activité constitutive qui augmente le seuil d'excitabilité des neurones sensoriels microinjectés. Par conséquent, nous venons donc d'identifier le premier récepteur dopaminergique, exprimé dans le SNC de l'aplysie, et qui potentiellement pourrait être impliqué dans la modulation de la réponse de renforcement.

Nos travaux nous ont donc permis de nous doter d'outils moléculaires et pharmacologiques essentiels pour mieux comprendre l'importance des récepteurs à 5-HT couplés négativement à l'adénylate cyclase dans la modulation de la mémoire et l'apprentissage chez l'aplysie. De plus, nous avons entrepris l'exploration du rôle de la dopamine et d'un récepteur dopaminergique dans le SNC de l'aplysie, particulièrement dans la réponse de renforcement.

Mots clés: Aplysie, mémoire, apprentissage, sérotonine, dopamine, récepteurs couplés aux protéines G.

Abstract

The experimental model *Aplysia* has been a very useful system to study the cellular and molecular mechanisms of behavioral modification. Much emphasis has been placed in the signaling cascade involved in modulating ionic channels or synaptic transmission. On the other hand, few studies have been devoted to the receptor family of one major neuromodulator in this system, serotonin (5-HT). Serotonin is an important neurotransmitter in activating molecular cascades essential in learning and memory processes in this invertebrate via binding to G protein-coupled receptors. Little was known about the overall functions of 5-HT in these mechanisms, as we had not identified the 5-HT receptors implicated in synapse modulation.

In order to further understand serotonergic pathways implicated in behavioral modification, we established screening experiments to characterize new serotonergic receptors in *Aplysia* and to eventually understand their cellular distribution, their activation and signaling mechanisms. Our main approach was to screen a cDNA library from the central nervous system (CNS) by PCR amplification.

We have first reported the molecular and pharmacological characterization of a novel 5-HT receptor, 5-HT_{ap2}, which is negatively coupled to adenylate cyclase. We then further investigated the mRNA distribution of the two known G_i-coupled receptors in *Aplysia* CNS, 5-HT_{ap1} and 5-HT_{ap2}. By *in situ* hybridization, we observed the presence of both receptors in almost all sensory neuron clusters of various reflexes by comparing hybridization signal with those identified with a sensorin probe specific to

mechanoreceptors. We also confirmed expression of both receptors in some presynaptic serotonergic neurons, suggesting a possible autoreceptor role for these proteins.

We further identified a novel dopamine receptor in our original screen. The Ap_{dop1} receptor is similar to the mammalian D1 family and is coupled positively to adenylate cyclase. After binding to Ap_{dop1} receptor, dopamine, but also 5-HT and octopamine at rather higher concentrations, induce an increase in [cAMP] in cells expressing this receptor. We also observed a significant constitutive activity of the receptor in sensory neurons expressing recombinant Ap_{dop1} . Expression of Ap_{dop1} receptor increases the threshold of excitability of these neurons in an agonist-independent way.

All these results gave yield molecular and pharmacological tools to further investigate how G_i -coupled 5-HT receptors are essential in modulating learning, and memory in *Aplysia*. In addition, we are now able to determine the importance of dopamine and more specifically of a G_s -coupled dopamine receptor, in reinforcement responses in these processes.

Key words: *Aplysia*, learning, memory, serotonin, dopamine, G protein coupled receptor.

Table des matières

Remerciements	iv
Résumé	vi
Abstract	viii
Liste des tableaux	xiii
Liste des figures	xiv
Liste des notations et des symboles	xvi
1 Introduction	1
1.1 Apprentissage et mémoire	1
1.1.1 Apprentissage non associatif	2
1.1.2 Apprentissage associatif	2
1.1.3 Mémoire à court terme et long terme	6
1.2 <i>Aplysia californica</i> : un modèle de choix	7
1.2.1 Système nerveux de l'aplysie	9
1.2.2 Caractéristiques des ganglions du SNC	13
1.2.3 Avantages de l'aplysie sur le plan expérimental	19
1.3 Neurobiologie de l'apprentissage chez l'aplysie	19
1.3.1 Habituation chez l'aplysie	20
1.3.2 Sensibilisation du réflexe de la branchie	23
1.3.3 Conditionnement classique chez l'aplysie	25
1.3.4 Circuits neuronaux du réflexe de retrait du siphon et de la queue	25
1.4 Rôles de la 5-HT dans la facilitation synaptique	28
1.4.1 Modulation des circuits neuronaux des réflexes par la 5-HT durant la sensibilisation	30
1.4.2 Cascade biochimique activée par la 5-HT dans les SN	32
1.5 Récepteurs à 5-HT	38
1.5.1 Récepteurs couplés aux protéines G	38
1.5.2 Divergences évolutives des récepteurs à 5-HT	43
1.5.3 Caractérisation initiale des récepteurs à 5-HT dans le SNC de l'aplysie	45
1.5.4 Caractérisation moléculaire, structurale, pharmacologique et tissulaire récepteurs à 5-HT chez l'aplysie	48
1.6 Dopamine	56
1.6.1 Récepteurs à DA	58
1.6.2 Mécanismes dopaminergiques et LTP	59
1.6.3 Dopamine chez les invertébrés	63
1.6.4 Dopamine chez l'aplysie	69
1.6.4.1 Cellule R15	70

1.6.4.2	Réflexe de retrait de la branchie	72
1.6.4.3	Comportement d'alimentation	73
1.7	Projet de recherche de doctorat	79
Préambule au chapitre 2		83
2	Functional characterization of a novel serotonin receptor (5-HT_{ap2}) expressed in the CNS of <i>Aplysia californica</i>	84
2.1	Abstract	84
2.2	Introduction	85
2.3	Materials and methods	87
2.4	Results	93
2.4.1	Cloning and structural characteristics of 5-HT _{ap2}	93
2.4.2	Transient expression of 5-HT _{ap2} in HEK 293 and COS-7 cells	97
2.4.3	Pharmacological characterization	100
2.4.4	5-HT _{ap2} signaling	100
2.4.5	Tissue distribution of 5-HT _{ap2} transcripts in <i>Aplysia</i>	104
2.4.6	5-HT application inhibits afterdischarge in the bag cells	106
2.5	Discussion	108
2.5.1	Structural and functional characteristics of 5-HT _{ap2}	108
2.5.2	Possible physiological roles of 5-HT _{ap2}	110
2.6	Acknowledgements	113
Préambule au chapitre 3		114
3	Comparative localization of two serotonin receptors and sensorin in the CNS of <i>Aplysia californica</i>	115
3.1	Abstract	115
3.2	Introduction	116
3.3	Materials and methods	118
3.4	Results	122
3.4.1	Buccal ganglia	122
3.4.2	Cerebral ganglion	124
3.4.3	Pleuro-pedal ganglia	128
3.4.4	Abdominal ganglion	130
3.5	Discussion	137
3.5.1	Expression of 5-HT _{ap2} in the bag cells	137
3.5.2	Expression of 5-HT _{ap1} and 5-HT _{ap2} in the clusters of sensory neurons	138
3.5.3	Expression in other identifiable cells	140
3.6	Acknowledgements	142
Préambule au chapitre 4		143
4	An <i>Aplysia</i> dopamine 1-like receptors: molecular and functional characterization	144
4.1	Abstract	144
4.2	Introduction	145
4.3	Materials and methods	147
4.4	Results	153

4.4.1 Cloning of an <i>Aplysia</i> dopamine receptor	153
4.4.2 Structural characteristics of the Ap _{dop1} receptor	155
4.4.3 Ap _{dop1} protein distribution	158
4.4.4 Transient expression of Ap _{dop1} in HEK 293 cells	158
4.4.5 Stimulation of second messenger pathway	161
4.4.6 Pharmacological characterization of heterologously expressed Ap _{dop1} receptor	165
4.4.7 Expression of the Ap _{dop1} receptor in <i>Aplysia</i> sensory neurons	167
4.5 Discussion	171
4.5.1 Pharmacological properties of the Ap _{dop1} receptor	172
4.5.2 The Ap _{dop1} receptor displays constitutive activity	173
4.5.3 Potential physiological role of Ap _{dop1}	174
4.6 Acknowledgements	175
5 Discussion	176
5.1 Clonage et caractérisation de RCPG chez l'aplysie	177
5.1.1 Clonage et caractérisation du récepteur 5-HT _{ap2}	177
5.1.2 Distribution de récepteurs à 5-HT couplés à G α_i	182
5.1.3 Clonage et caractérisation du récepteur Ap _{dop1}	184
5.2 Hypothèses sur les rôles physiologiques des récepteurs identifiés	192
5.2.1 Rôles physiologiques potentiels pour les récepteurs 5-HT _{ap1-ap2}	193
5.2.2 Activation de cascades moléculaires par les récepteurs 5-HT _{ap1-ap2}	196
5.2.3 Rôles physiologiques potentiels du récepteur Ap _{dop1}	200
5.3 Perspectives	203
5.3.1 Clonage de récepteurs à 5-HT couplés positivement à l'adénylate cyclase	203
5.3.2 Caractérisation des cellules 5-HT _{ap1} , 5-HT _{ap2} et Ap _{dop1} positives	204
5.3.3 Inhibition de l'expression des RCPG clonés chez l'aplysie	206
5.3.4 Séquençage du génome de l'aplysie	210
5.4 Conclusions	211
Bibliographie	214
Annexe 1 : Autorisation des coauteurs	253
Annexe 2 : Autorisation des coauteurs	254
Annexe 3 : Coauthors authorization	255
Annexe 4: Multiple serotonergic mechanisms contributing to sensitization in <i>Aplysia</i>: evidence of diverse serotonin receptor subtype	256
Annexe 5 : A novel actin isoform is expressed in the ovotestis of <i>Aplysia californica</i>	270

Liste des tableaux

1.1	Comparaison des affinités de plusieurs ligands à perturber la liaison du LSD[³ H] sur des membranes de cellules transfectées avec l'ADNc du récepteur 5-HT _{ap1} .	52
1.2	Antagonistes testés pour l'inhibition de la stimulation de l'adénylate cyclase dans le SNC de l'aplysie par la 5-HT.	55
2.1	Comparison of the affinities of various compounds that compete with the binding of [³ H]LSD to the membranes of cells transfected with the 5-HT _{ap2} , 5HT _{ap1} and 5-HT _{lym} cDNA.	102
4.1	Comparison of potency of various agonists in activation of Ap _{dop1} receptor in transiently transfected HEK 293 cells.	165
4.2	Summary data of electrophysiological responses.	170
5.1	Caractéristiques des RCPG identifiés et exprimés dans le SNC de l'aplysie.	192

Liste des figures

1.1	Divers types d'apprentissages non associatifs.	3
1.2	Apprentissage associatif.	5
1.3	Cycle vital de l'aplysie.	8
1.4	Illustration de l'aplysie.	10
1.5	Système nerveux de l'aplysie.	12
1.6	Structure des cellules nerveuses des vertébrés et des invertébrés.	14
1.7	Carte des différents neurones identifiés dans les ganglions buccaux.	15
1.8	Cartographie des neurones dans le ganglion abdominal de l'aplysie.	18
1.9	Réflexe du retrait de la branchie, du siphon et de la queue.	21
1.10	Habituation étudiée au niveau cellulaire.	22
1.11	Organisation anatomique des voies impliquées dans la sensibilisation.	24
1.12	Représentation schématique du circuit neuronal modulant les réflexes de retrait de la queue et du siphon.	26
1.13	Stimulation cellulaire et moléculaire de la 5-HT.	34
1.14	Les RCPG et leurs mécanismes d'activation.	39
1.15	Potentialisation à long terme dans l'hippocampe (LTP).	61
1.16	Conditionnement instrumental chez l'aplysie.	74
2.1	Molecular cloning of the 5-HT _{ap2} receptor cDNA.	94
2.2	Structural relationship of 5-HT _{ap2} with other serotonin receptors.	96
2.3	Genomic organization of the 5-HT _{ap2} gene.	98
2.4	Transient expression of 5HT _{ap2} at the cell-surface.	99
2.5	Binding studies of radiolabelled LSD to 5HT _{ap2} in membranes of transfected HEK 293 cells.	101
2.6	Stimulation of 5-HT _{ap2} by 5-HT and 5-CT decreases the level of intracellular cAMP.	103
2.7	Tissue distribution of 5-HT _{ap2} mRNA in <i>Aplysia</i> .	105
2.8	Inhibition of the bag cells afterdischarge by application of serotonin.	107

3.1	Cellular localization of sensorin mRNA in <i>Aplysia</i> ganglia.	123
3.2	Cellular localization of 5-HT _{ap1} mRNA in the buccal ganglion.	125
3.3	Cellular localization of 5-HT _{ap2} mRNA in the buccal ganglion.	126
3.4	Localization of 5-HT _{ap1} , 5-HT _{ap2} and sensorin mRNA in the cerebral ganglion.	127
3.5	Cellular localization of 5-HT _{ap1} mRNA in the pleuro-pedal ganglia.	129
3.6	Cellular localization of 5-HT _{ap2} mRNA in the pleuro-pedal ganglia.	131
3.7	Cellular localization of 5-HT _{ap1} mRNA in the abdominal ganglion.	132
3.8	Cellular localization of 5-HT _{ap2} mRNA in the abdominal ganglion.	134
3.9	Cellular localization of 5-HT _{ap2} mRNA in the bag cells of the abdominal ganglion.	135
3.10	Schematic representation of the dorsal and ventral surfaces of the abdominal ganglion with expression patterns of 5-HT _{ap1} and 5-HT _{ap2} .	136
4.1	Ap _{dop1} receptor sequence and structure.	154
4.2	Structural relationship of Ap _{dop1} with other dopamine receptors.	157
4.3	Tissue distribution of the Ap _{dop1} receptor in <i>Aplysia</i> .	159
4.4	Expression of the Ap _{dop1} receptor at the cell-surface.	160
4.5	Relative levels of intracellular cAMP in Ap _{dop1} expressing cells.	162
4.6	Pharmacological profile of Ap _{dop1} receptor.	164
4.7	Expression of the Ap _{dop1} receptor in <i>Aplysia</i> sensory neurons.	168
4.8	Electrophysiological responses following agonist stimulation of microinjected sensory neurons.	169
5.1	Clonage de nouveaux récepteurs à 5-HT chez l'aplysie.	178
5.2	Représentation schématique des rôles potentiels des récepteurs à 5-HT dans la modulation des propriétés neuronales chez l'aplysie.	194
5.3	Expression du récepteur Ap _{dop1} dans la neuropile des ganglions buccaux de l'aplysie.	202
5.4	Localisation du neurone B51 dans le ganglion buccal.	209

Liste des notations et des symboles

AC	Adénylate cyclase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
cAMP ou AMPc	Cyclic adenosine 3':5'- monophosphate / adénosine monophosphate 3':5'-cyclique
ARNdb	Acide ribonucléique double brin
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ASW	Artificial sea water
ATP	Adénosine triphosphate
α -BCP	Alpha bag cell peptide
CNS	Central nervous system
COS-7	Monkey kidney cells
5-CT	5-carboxamidotryptamine maleate
DA	Dopamine
DAG	Diacylglycérol
ELH	Egg-laying hormone
ERK	Extracellular-signal-regulated kinase
EST	Expressed sequence tag
GDP	Guanosine diphosphate
GPCR	G protein coupled receptors
G protein	GTP binding protein
GTP	Guanosine triphosphate
HEK	Human embryonic kidney
5-HT	5-hydroxytryptamine ou serotonin ou sérotonine
IBMX	Isobutylmethoxyxanthine
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphate
kb	kilo-base
LSD	Lysergic acid diethylamide

MAP kinase/MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MN	Motor neuron ou neurone moteur
8-OH-DPAT	(±)-8-hydroxy- <i>dipropylaminotetralin</i> hydrobromide
PAPP	<i>p</i> -aminophenetyl- <i>m</i> -trifluoromethylphenyl piperazine
PCR	Polymerase chain reaction
PKA	Protéine kinase cAMP-dépendante
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
RT	Reverse transcription
RTK	Récepteur à tyrosine kinase
SN	Sensory neuron / neurone sensoriel
SNC	Système nerveux central
TM	Transmembranaire

1

Introduction

1.1 Apprentissage et mémoire

L'homme a toujours cherché à comprendre comment il apprend, mémorise et oublie. Pour en faire une définition simpliste, l'apprentissage est l'acquisition de nouvelles informations ou connaissances, et la mémoire correspond à la rétention de l'information acquise. L'un des défis majeurs des neurobiologistes est de déterminer comment ces informations sont traitées et stockées par les divers processus neuronaux. Plusieurs physiologistes et psychologues ont répertorié des distinctions entre différentes catégories de mémoire (Squire & Kandel, 1999). Par conséquent, il a été établi que le stockage des faits et des événements fait appel à la mémoire déclarative, alors que l'apprentissage des habilités motrices ou des comportements implique la mémoire procédurale. Il est compliqué d'étudier la mémoire déclarative puisqu'il est difficile de quantifier et de percevoir ce type de rétention d'informations cognitives. Puisque la mémoire procédurale correspond à l'apprentissage d'une réponse motrice en réaction à une stimulation sensorielle, il est beaucoup plus accessible d'étudier ce type

d'apprentissage car il peut se former le long de simples voies de réflexes qui lient les sensations à des mouvements. L'apprentissage procédural se divise en deux catégories: l'apprentissage non associatif et l'apprentissage associatif.

1.1.1 Apprentissage non associatif

L'apprentissage non associatif, comme l'habituation et la sensibilisation, décrit les changements observés, avec le temps, d'une réponse comportementale à un seul type de stimulus (Figure 1.1). L'habituation consiste à apprendre à ignorer un stimulus, à un arrêt de réponses motrices suite à la présentation répétée d'un stimulus (Figure 1.1A). Par exemple, lorsqu'on lit un livre, on reste insensible aux voitures qui passent à l'extérieur de la maison. La sensibilisation correspond à un renforcement de la réponse à tous les stimuli, y compris à ceux qui n'évoquaient aucune ou une faible réponse auparavant (Figure 1.1B). Lorsqu'il y a une soudaine perte d'éclairage à notre domicile, on devient sensible, on sursaute à tous bruits qui normalement ne nous troublent aucunement, comme la sonnerie du téléphone.

1.1.2 Apprentissage associatif

L'apprentissage associatif consiste à l'association d'événements ou de stimuli entre eux. Le conditionnement classique et instrumental sont des formes d'apprentissage associatif. Le conditionnement classique a été découvert et défini par le physiologiste russe Ivan Pavlov au début de ce siècle (Kandel et al., 1991). Il repose sur l'association

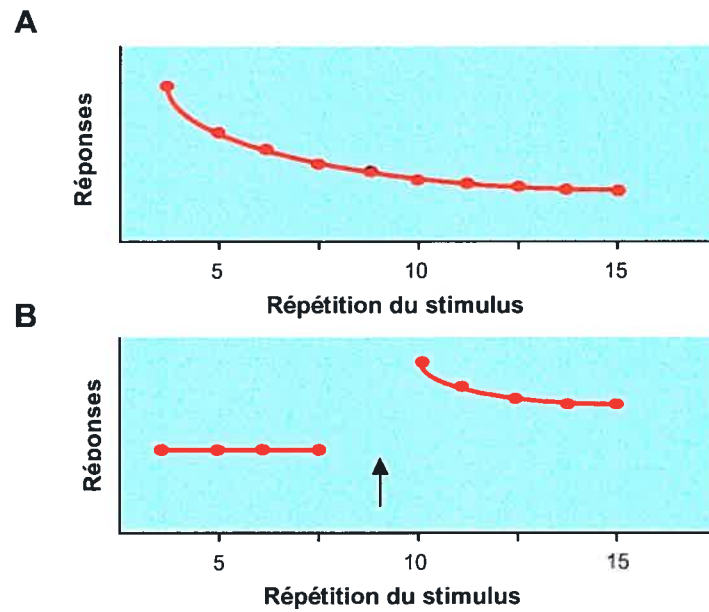
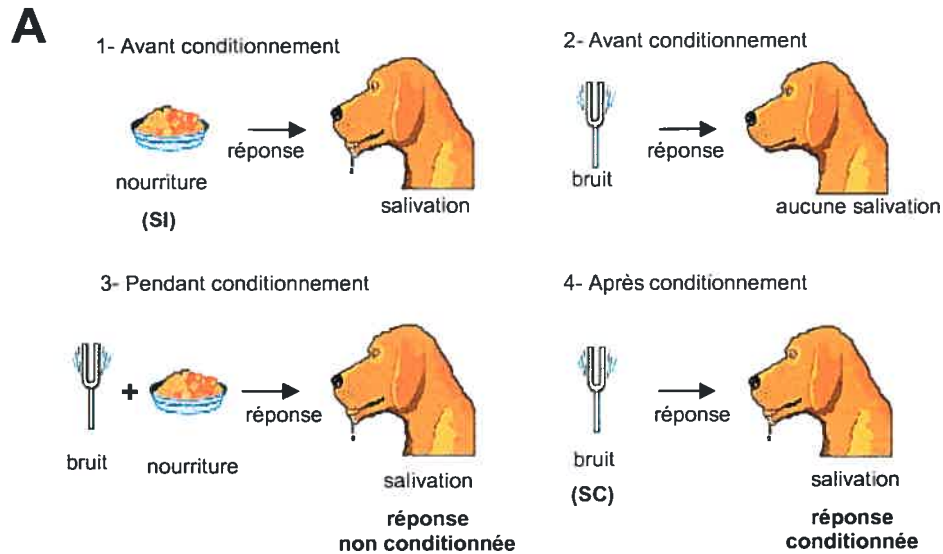


Figure 1.1- **Divers types d'apprentissage non associatif.** (A) Habituation. La présentation répétitive d'un stimulus produit une diminution de la réponse. (B) Sensibilisation. Un stimulus intense (↑) provoque une réponse exagérée à tous les stimuli qui suivent. Figure adaptée de Bear et al. (1999).

d'un stimulus qui évoque une réponse mesurable avec un second stimulus qui ne provoque pas cette réponse. L'expérience de Pavlov sur un chien permet la découverte qu'un animal apprend à associer le son d'une cloche (stimulus conditionnel, SC) à la présentation de nourriture (stimulus inconditionnel, SI) (Figure 1.2A). Le stimulus conditionnel provoque une réponse suite à un apprentissage, comme dans ce cas-ci le son de la cloche. Le second stimulus est de type inconditionnel car la réponse ne nécessite aucun apprentissage, comme la salivation d'un chien suite à la présentation de nourriture. Pour obtenir l'association de ces deux stimuli, il faut un certain nombre de conditions relatives à la ponctualité des opérations. Une fois que l'on enlève la viande, le son de la cloche est suffisant pour faire saliver le chien. Par conséquent, les mécanismes synaptiques impliqués dans le conditionnement classique doivent refléter ces contraintes temporelles.

L'apprentissage instrumental consiste à reconnaître une relation entre un comportement donné et un stimulus (le renforcement). C'est le psychologue Edward Thorndike qui a défini ce type d'apprentissage (Kandel et al., 1991). Par exemple, un animal va apprendre à associer l'appuie d'un levier avec l'accès à de la nourriture (Figure 1.2B). Également, le conditionnement instrumental se produit si la réponse a pour but d'éviter un stimulus douloureux comme un choc électrique. Comme pour le conditionnement classique, les contraintes de déroulement de l'apprentissage dans le temps sont importantes. Un élément clé du conditionnement instrumental est l'événement de renforcement, soit la corrélation entre l'expression d'un comportement instrumental et l'apport d'un renforcement.



B

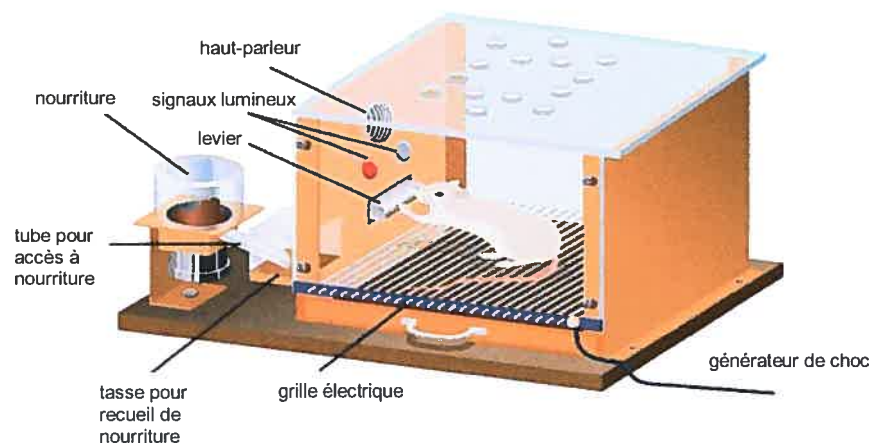


Figure 1.2- **Apprentissage associatif.** (A) Conditionnement classique. Apprentissage de l'animal à associer le son d'une cloche (stimulus conditionnel, SC) à la présentation de nourriture (stimulus inconditionnel, SI). Le stimulus inconditionnel entraîne la salivation du chien suite à la présentation de nourriture. Le stimulus conditionnel (SC) provoque une réponse suite à un apprentissage, comme dans ce cas-ci au son de la cloche. Une fois que l'on enlève la nourriture, le son de la cloche est suffisant pour faire saliver le chien. Figure adaptée de www.encarta.msn.com. (B) Conditionnement instrumental. Boîte de Skinner où la souris apprend à associer l'appuie d'un levier, bruits, signaux lumineux avec l'accès à la nourriture, ou éviter un choc électrique suite à un certain stimulus (présentation de signaux lumineux). Figure adaptée de Feldman (2004).

1.1.3 Mémoire à court terme et long terme

La mémoire est un phénomène qui possède une dimension temporelle. Selon ce critère, on distingue donc deux types de mémoires, soient la mémoire à court terme et la mémoire à long terme. La mémoire à court terme est de courte durée et à capacité limitée. L'information emmagasinée à court terme peut être oubliée rapidement par l'intervention d'un événement perturbateur. La mémoire à long terme présente donc un caractère plus durable, avec une capacité accrue et qui ne nécessite pas de répétition continue de l'apprentissage. Quels sont les mécanismes biochimiques impliqués dans le transfert de la mémoire à court terme à long terme? Suite aux travaux de Santiago Ramón y Cajal, l'idée d'étudier chez les mammifères les phénomènes cellulaires responsables de l'emmagasinage de l'information fut jugé très difficile, presque impossible (Squire & Kandel, 1999). Chez les mammifères, les modifications synaptiques peuvent impliquer 10 à 100 milliards de neurones. Chaque neurone peut effectuer plus de 1000 connections, ou synapses, pour un total de 10^{14} connections synaptiques. Par conséquent, ces considérations incitèrent plusieurs chercheurs à étudier le système nerveux rudimentaire d'invertébrés pour comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires, particulièrement les modulations synaptiques et les changements d'excitabilité des neurones, engendrant la mémoire suite à l'apprentissage. L'idée était de tirer profit de la simplicité de ces organismes, possédant des systèmes nerveux simples accessibles à l'analyse cellulaire et moléculaire des comportements. Les découvertes faites sur les invertébrés permirent donc une extrapolation et une transposition des connaissances chez des modèles mammifères comme la souris.

1.2 *Aplysia californica*: un modèle de choix

Depuis une quarantaine d'années, *Aplysia californica* a été grandement utilisé comme modèle d'étude pour identifier les mécanismes modulant la mémoire et l'apprentissage. Après avoir été appelé *Lernea*, *Tethys limacina* et *Laplysia depilans*, le terme générique *Aplysia* («qui ne se lave pas») a été donné par Gmelin en 1789 (Eales, 1921). L'aplysie a été comparé à un grand escargot marin par Pline l'Ancien dans *Naturalis Historia* (premier siècle après JC), et par Galien et Claudius Aelian un siècle plus tard. Initialement, il a été surnommé *Lepus marinus*, le lièvre marin, puisqu'il rappelle un lapin lorsqu'il est en position contracté à cause de ses gros et longs tentacules postérieurs et de son corps mou (Eales, 1921). L'aplysie est un mollusque gastéropode du genre *Aplysia* des opisthobranches. L'espèce la plus utilisée par les physiologistes est *Aplysia californica* que l'on retrouve sur la côte californienne. L'aplysie est un herbivore qui se nourrit d'algues marines. Son cycle de vie s'étend sur une année. On retrouve principalement une période de forte croissance vers la fin de l'été, suivie par une période de ponte en automne qui précède de très peu la mort. Chaque animal peut pondre plus d'un million d'œufs. Suite à la ponte, les œufs éclosent approximativement 12 jours plus tard pour donner naissance à des larves, appelées véligères. Le processus se poursuit par la métamorphose en aplysie juvénile (37^{ème} jour), puis en aplysie sexuellement mature (120^{ème} jour) (Kriegstein et al., 1974; Kandel, 1976, 1979) (Figure 1.3).

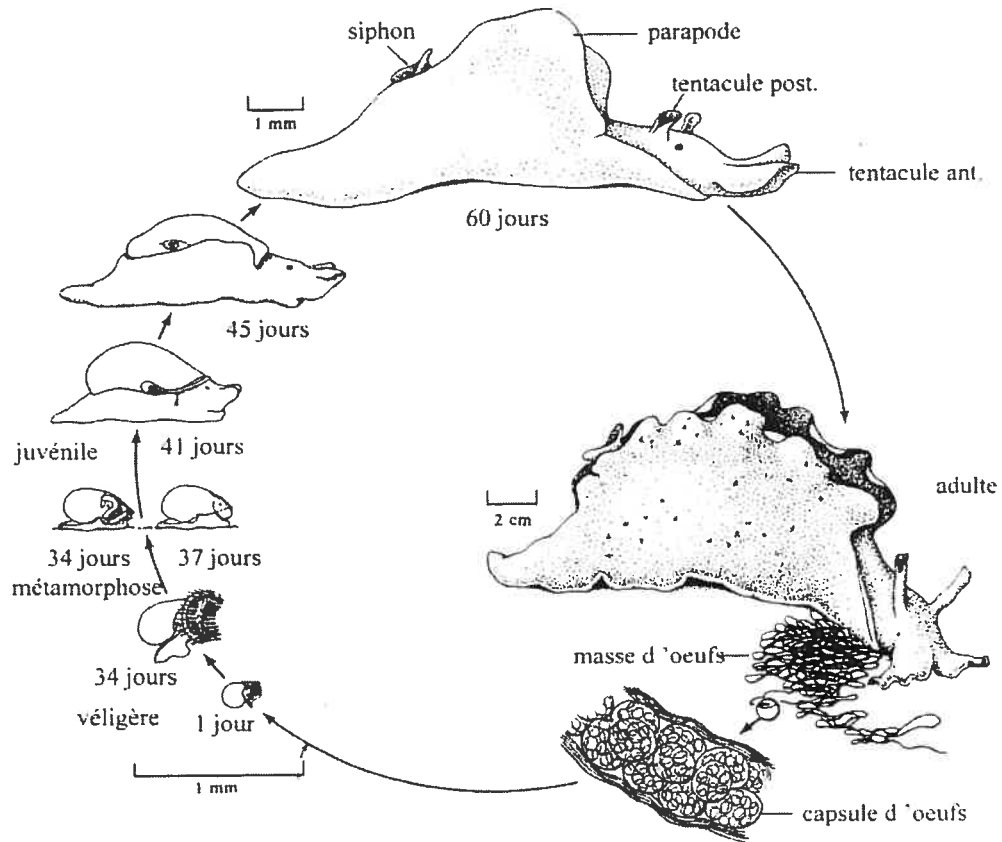


Figure 1.3- **Cycle vital de l'aplysie.** Après l'éclosion, le développement se divise en quatre phases: le stade véligère (jours 1-34), la métamorphose (jours 34-37), le stade juvénile (jours 37-120), et le stade adulte. L'apparence extérieure de chacune des phases est illustrée. L'aplysie sexuellement mature (120^{ème} jour) dépose les œufs sous forme d'une masse gélatineuse constituée d'un long chapelet de capsules contenant chacune de 15 à 20 œufs. Image adaptée de Kriegstein et al. (1974).

La morphologie de l'aplysie adulte présente les caractéristiques classiques des mollusques: une tête, un pied, un manteau et une masse viscérale (Figure 1.4A). Plus spécifiquement, la tête est constituée d'une bouche, deux yeux de petite taille et deux tentacules chémosensoriels. Ces tentacules sont utilisés pour la détection et l'ingestion de nourriture (Kandel, 1976). Le pied, s'étendant sur toute la longueur de l'animal, est un énorme muscle locomoteur. Les parapodes, qui sont deux extensions latérales du pied, se referment sur le dos de l'animal et ainsi aident à la natation (Figure 1.4A). L'épiderme du manteau s'allonge vers l'arrière pour former le siphon, à la base duquel se situe l'anus dont l'ouverture est contrôlée par un sphincter. La cavité du manteau s'ouvre antérieurement pour découvrir la branchie, la glande pourpre (ou opaline), les pores rénal et génital. La glande pourpre sécrète une encre pourpre foncée servant d'écran protecteur en cas de danger (Figure 1.4B). Tous ces organes recouvrent la masse viscérale composée du cœur, du tractus gastro-intestinal et des systèmes reproducteur et urinaire (Kandel, 1976).

1.2.1 Système nerveux de l'aplysie

L'aplysie possède un système nerveux central simple constitué de neurones de grandes tailles et facilement identifiables (Mazzarelli, 1893; Bergh, 1902; Arvanitaki & Cardot, 1941). Comparativement au cerveau mammifère, on ne dénombre que 20 000 cellules nerveuses chez cet invertébré. En plus d'être en nombre inférieur, ces neurones peuvent atteindre des dimensions allant jusqu'à 1 mm de diamètre, suffisamment grands pour être visible à l'œil nu. De telles dimensions font de ces cellules les plus grosses

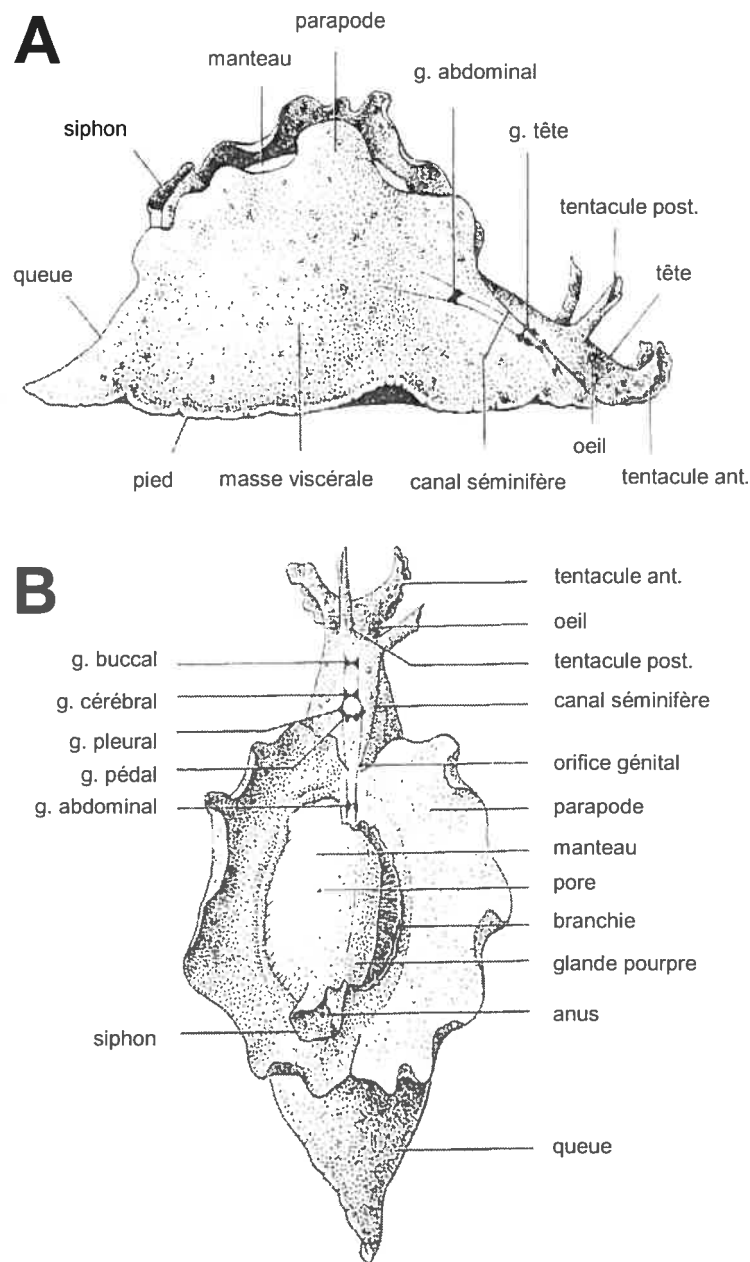


Figure 1.4- **Illustration de l'aplysie.** (A) Vue de côté de l'animal situant la tête, le manteau, la masse viscérale, le pied et les tentacules (antérieur ou ant.; et postérieur post.). (B) Vue dorsale. Les parapodes sont écartés pour distinguer des structures comme le siphon, la branchie et autres organes qui normalement ne sont pas exposés. Les ganglions (g.) du système nerveux sont montrés en superposition, soient les ganglions abdominal et cérébral et les ganglions de la tête (pleural, pédal, cérébral et buccal). Figure adaptée de Kandel (1976).

cellules nerveuses retrouvées dans le règne animal (Kandel, 2001) (Figure 1.5A). Le système nerveux central (SNC) de l'aplysie est constitué de quatre paires de ganglions (buccaux, cérébraux, pleuraux et pédaux), ou ganglions de la tête, formant un anneau symétrique autour de l'œsophage et d'un ganglion unique situé sous l'œsophage, le ganglion abdominal (Figure 1.5B). Les ganglions d'une paire sont reliés par un réseau de fibres nerveuses appelés commissure et aux autres ganglions par des connectifs. Chaque ganglion est constitué d'environ 2000 neurones et d'un nombre encore plus grand de cellules gliales. Puisque les ganglions sont bien espacés, il est facile de les analyser et de les manipuler individuellement.

Comme tous les systèmes nerveux, les ganglions des invertébrés se séparent en deux zones: une zone cellulaire contenant les corps cellulaires des neurones et une zone fibreuse, appelée neuropile, contenant les neurites. Contrairement à l'organisation chez les vertébrés où les zones se confondent, elles sont clairement identifiables chez les invertébrés. Les corps cellulaires sont organisés en sphères, proches de la surface externe du ganglion. Chaque neurone dirige son axone vers la neuropile retrouvée dans la région centrale du ganglion. La neuropile est en fait un champ synaptique important contenant les connexions qui existent entre les neurones d'un même ganglion et les axones provenant des autres ganglions. Étant donné que l'on retrouve les corps cellulaires en périphérie des ganglions, il nous est donc possible d'observer et d'identifier des cellules spécifiquement sur un ganglion intact et d'effectuer des enregistrements intracellulaires des potentiels d'action de ces cellules géantes. En plus des ganglions constituant le SNC, on retrouve chez l'aplysie de petits groupes de

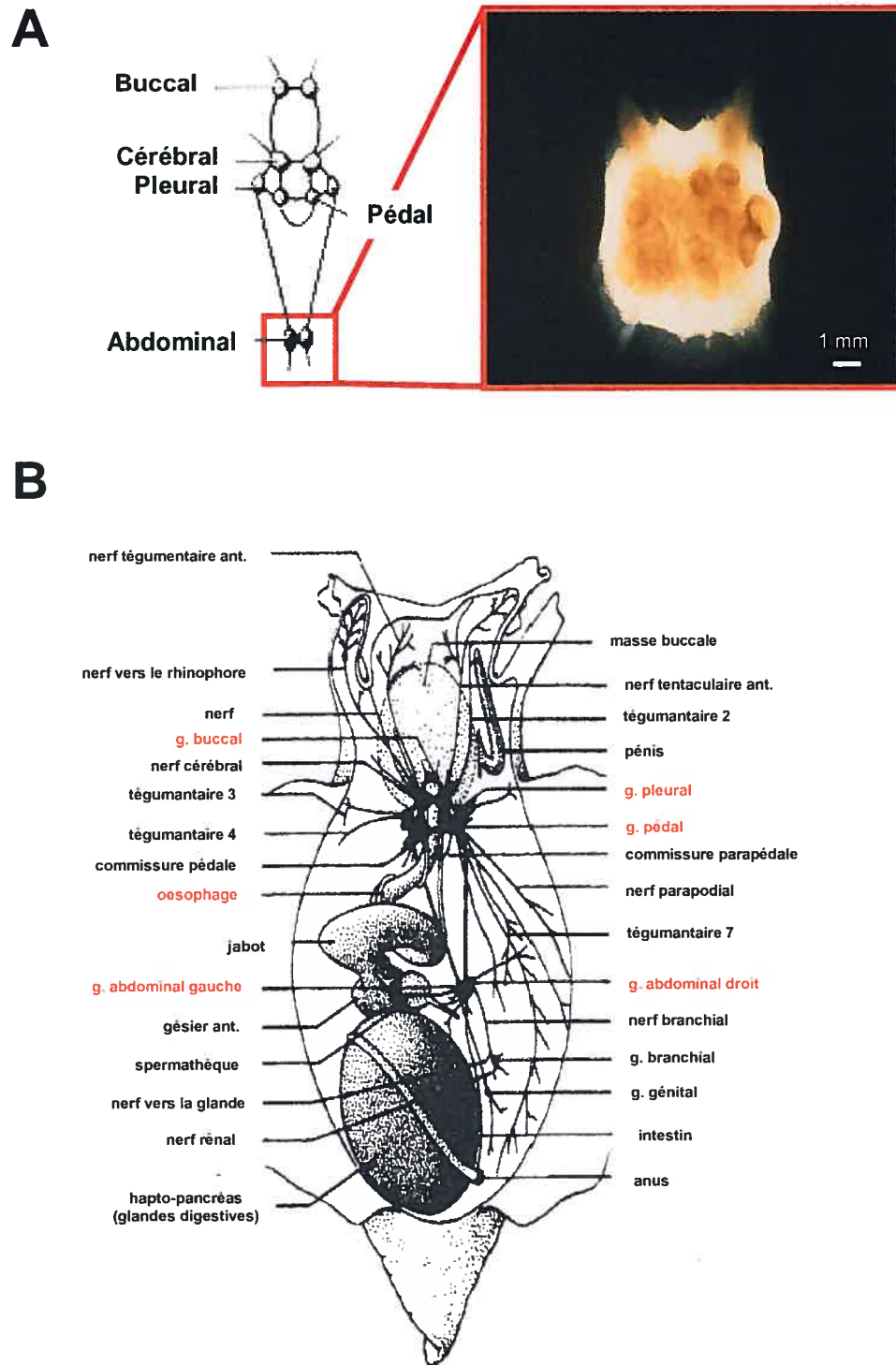


Figure 1.5- **Système nerveux de l'aplysie.** (A) Ganglions du système nerveux central. Photographie du ganglion abdominal pour montrer la dimension des cellules. Figure modifiée de Kandel (1979); Squire & Kandel (1999). (B) Plan général du système nerveux de l'aplysie en relation avec les autres organes. Les ganglions de la tête (indiqués en rouge) forment un anneau autour de l'œsophage. Adaptée d'Eales (1921).

neurones périphériques. Ces neurones innervent directement certains organes engendrant ainsi des réponses locales indépendantes du SNC (Kandel, 1979).

Au niveau de leur structure cellulaire, les cellules nerveuses des vertébrés sont similaires à celles des invertébrés. Par contre, la position de l'arborescence dendritique est différente. Chez les vertébrés, où il existe un large éventail de variations, les cellules nerveuses sont multipolaires; un axone émerge du corps cellulaire et un ou plusieurs dendrites émergent d'autres points (Figure 1.6). Chez les invertébrés, comme l'aplysie, les neurones sont plutôt monopolaires. Ainsi, un axone émerge du corps cellulaire et les dendrites de cet axone (Figure 1.6). Normalement, on retrouve peu de synapses au niveau du corps cellulaire. Elles sont distribuées en majorité le long des dendrites (Kandel et al., 1991).

1.2.2 Caractéristiques des ganglions du SNC

Les quatre paires de ganglions formant l'anneau, présentent des caractéristiques morphologiques, biologiques et physiologiques particulières. Les ganglions buccaux sont les plus petits ganglions avec des neurones qui peuvent atteindre des diamètres entre 100 et 200 μm . Utilisant plusieurs critères, Gardner (1971) et Kandel (Gardner & Kandel, 1972) identifièrent 11 grosses cellules dans chaque ganglion buccal (Figure 1.7). Pour chacune de ces cellules, une cellule jumelle est retrouvée du côté opposé du ganglion symétrique avec des propriétés physiologiques et fonctionnelles similaires. Les

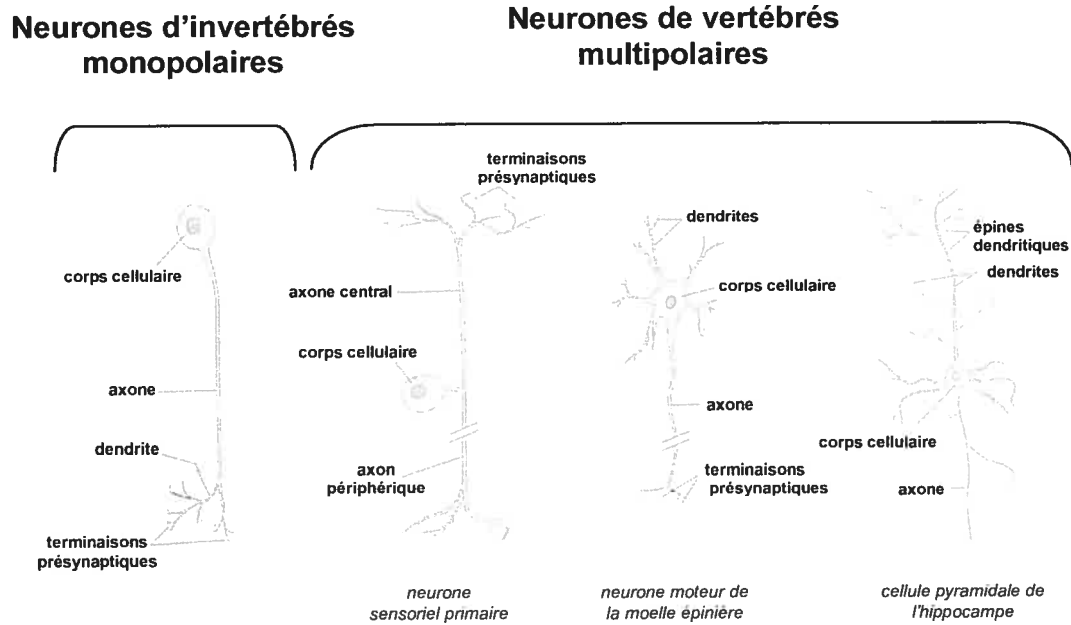


Figure 1.6- **Structure des cellules nerveuses des vertébrés et des invertébrés.** Les neurones d'invertébrés sont monopolaires. Les dendrites émanent de l'axone principal et forment des synapses avec des cellules présynaptiques. Les neurones des vertébrés sont multipolaires, avec ramifications dendritiques à chaque pôle. Adaptée de Squire et Kandel (1999).

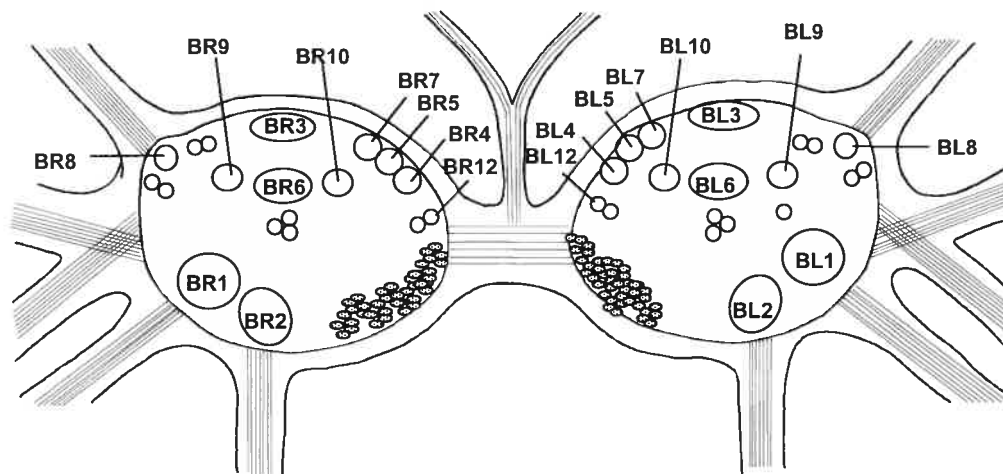


Figure 1.7- **Carte des différents neurones identifiés dans les ganglions buccaux.** Positions symétriques des cellules des deux ganglions. Ces cellules sont identifiées par un nombre et les lettres BL (pour «buccal left» ou buccal gauche) et BR (« buccal right » ou buccal droit). Figure adaptée de Gardner (1971).

ganglions buccaux innervent le pharynx, les glandes salivaires, l'œsophage, la portion antérieure du tube digestif et les muscles de la masse buccale (Kandel, 1979).

Les ganglions cérébraux innervent diverses structures sensorielles comme la bouche, les yeux, les tentacules antérieurs et postérieurs. Ils sont composés essentiellement de petites cellules (30-50 μm de diamètre). Ils contrôlent différents aspects du processus d'alimentation. Deux cellules géantes symétriques, les cellules métacérébrales (MCC pour «metacerebral cells»; 250 μm de diamètre), se démarquent par leur rôle central dans la modulation de l'action motrice dans l'alimentation (Kandel, 1979).

Les ganglions pédaux se situent au niveau ventrolatéral de l'aplysie. Ces ganglions ne sont pas complètement symétriques puisque le ganglion droit est plus grand et est relié à plus de nerfs périphériques que le ganglion gauche. Ces ganglions constituent l'agrégat de cellules nerveuses le plus imposant du SNC. Ces neurones peuvent atteindre 150 à 300 μm de diamètre. Ils innervent le pied, les parapodes, la tête et le pénis. Par conséquent, ils contrôlent les mouvements de locomotion en général, ainsi que la sécrétion de mucus par le pied et la peau (Kandel, 1979).

Les ganglions pleuraux sont situés à côté des ganglions pédaux. Il y a une différence entre le ganglion pleural gauche et le droit. On retrouve dans le ganglion pleural gauche une cellule de très grande taille (800 μm de diamètre), appelée «left giant cell» ou LP1. Cette cellule possède des propriétés physiologiques similaires à celles de

la cellule géante R2 retrouvée dans l'hémisphère droit du ganglion abdominal (Hughes & Tauc, 1963; Giller & Schwartz, 1971). La stimulation électrique de ces ganglions conduit à la contraction et/ou à l'inhibition de la contraction de la branchie (Kandel, 1979). Également, on retrouve un amas de cellules sensorielles, l'amas ventro-caudal (VC pour «ventrocaudal clusters»). Ces neurones, par leur nombre important, leur accessibilité et leur apparente uniformité au niveau des réponses enregistrées sont grandement utilisés pour l'étude de la plasticité synaptique chez l'aplysie (Walters & al., 1983; 2004).

Contrairement aux ganglions constituant l'anneau de la tête, le ganglion abdominal est asymétrique. Il contrôle différentes fonctions viscérales (reproduction, circulation et excrétion), les mouvements de rétraction défensive des organes extérieurs (du siphon et de la branchie notamment) et du manteau, certains processus neuroendocriniens (ponte des oeufs, équilibre osmotique) et neuroglandulaires (sécrétion d'encre). Il est divisé en deux hémisphères: droit (ou «right»: R) et gauche («left»: L). Il existe une cartographie détaillée de la position de la majorité des neurones constituant ce ganglion (Figure 1.8). Ces cellules nerveuses sont de coloration et de taille variables pouvant aller, pour les plus grosses, jusqu'à 1 mm de diamètre (cellules L2 à L6 et R2) (Kandel, 1976; Koester & Kandel, 1977).

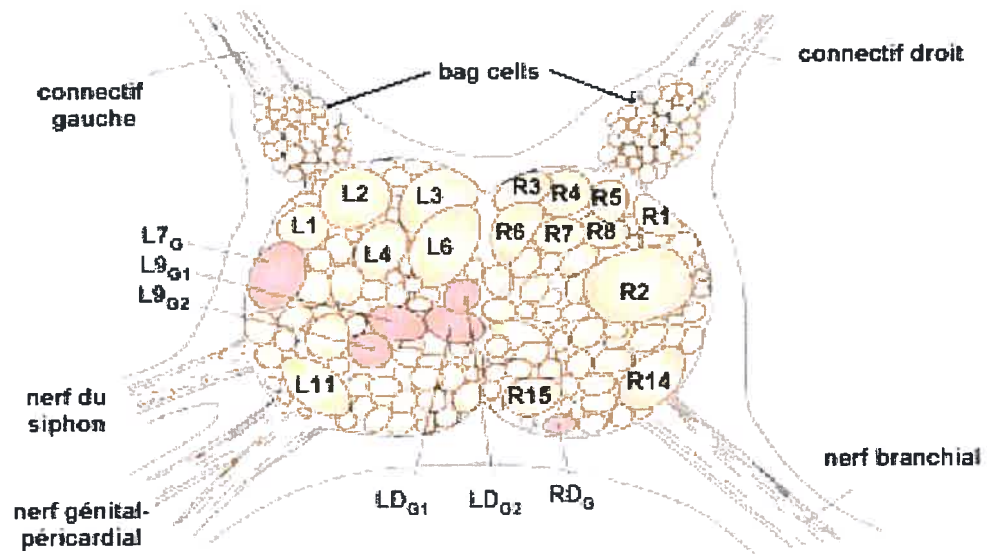


Figure 1.8- **Cartographie des neurones dans le ganglion abdominal de l'aplysie.** Vue dorsale du ganglion abdominal montrant les neurones moteurs de la branchie (en pourpre) participant dans la modulation du retrait de la branchie. Les neurones sont identifiés par la lettre L (pour «left» ou gauche) ou R (pour «right» ou droit). Les neurones moteurs portent le suffixe G pour «gill» ou branchie. Figure adaptée de Squire & Kandel (1999) et Frazier et al. (1967).

1.2.3 Avantages de l'aplysie sur le plan expérimental

La description détaillée du SNC de l'aplysie nous permet de mettre en perspective les grands avantages de cet organisme sur le plan de l'expérimentation. L'aplysie possède donc un (1) système nerveux de petite taille, contenant plus ou moins 10 millions de fois moins de neurones que le cerveau humain. (2) Ces neurones sont de grosse taille, atteignant des diamètres importants facilitant les études électrophysiologiques. (3) Il est facile d'identifier ces cellules nerveuses puisqu'il existe des cartographies détaillées. Aussi, les neurones d'aplysie peuvent être classés par taille, lieu et propriétés électrophysiologiques. (4) Les circuits neuronaux sont reconnaissables chez l'aplysie puisque les neurones identifiés établissent les mêmes connexions entre eux, d'un individu à l'autre. Finalement, (5) l'aplysie possède une génétique simplifiée. Un petit génome et un cycle de vie relativement court en font un sujet potentiel de choix pour l'étude de la génétique et de la biologie moléculaire de l'apprentissage.

1.3 Neurobiologie de l'apprentissage chez l'aplysie

Les comportements observables et modulables chez l'aplysie sont assez limités quand au nombre mais restent quand même complexes (Kandel, 1979). À l'échelle cellulaire, un comportement donné n'implique qu'une centaine de cellules nerveuses, permettant potentiellement de déterminer le circuit neuronal complet générant ce comportement (Kandel, 2001). Puisque l'on peut identifier la majorité des neurones, il est donc possible d'associer les changements dans les propriétés individuelles de ces

neurones et de les corréler à un comportement. L'aplysie permet d'associer des changements cellulaires spécifiques survenant lors d'un comportement particulier. Il est par la suite possible d'identifier les événements moléculaires et biochimiques sous-jacents ces changements cellulaires observés (Byrne, 1987).

Irving Kupfermann et Eric R. Kandel identifiaient de simples réflexes défensifs qui s'apparentent au retrait de la main suite au contact avec un objet chaud (Kandel, 1979, 2001). Lorsqu'un faible stimulus est appliqué au siphon, la queue se contracte et le siphon et la branchie se rétractent sous le manteau pour se protéger (Figure 1.9). Il est possible de modifier ce réflexe par trois formes d'apprentissage: l'habituation, la sensibilisation et le conditionnement classique.

1.3.1 Habituation chez l'aplysie

L'habituation est une forme d'apprentissage simple non associative qui a été étudiée en détail chez l'aplysie. Une légère pression tactile sur le siphon de l'aplysie provoquera une contraction de celui-ci et de la branchie. Cependant, si le stimulus est répété, l'animal le reconnaîtra comme anodin et cessera de se contracter. L'aplysie est donc «habitué». On sait maintenant qu'en réponse à une stimulation, un potentiel excitateur est généré par les neurones sensoriels du siphon qui innervent à la fois les neurones moteurs de la branchie et des interneurones (Figure 1.10A). Les potentiels synaptiques s'additionnent et provoquent une forte décharge dans les cellules motrices, entraînant une contraction musculaire de la branchie. Lorsque le stimulus est présenté à

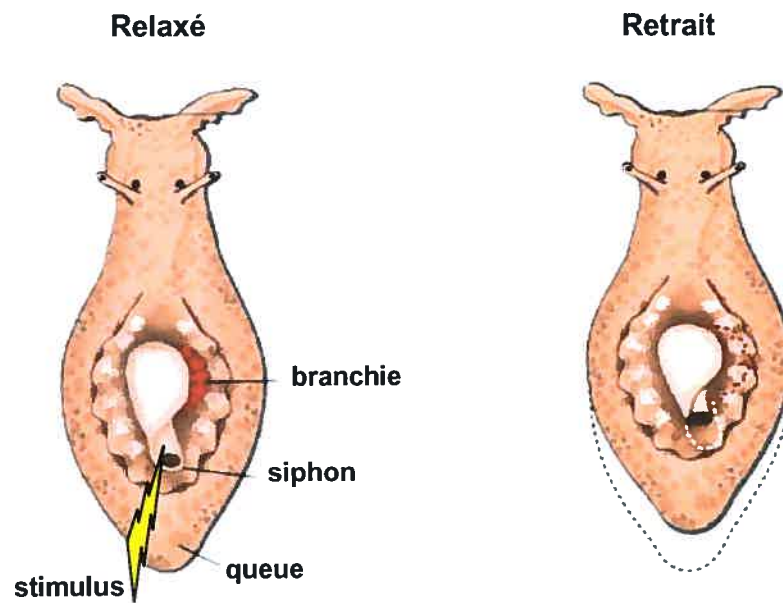


Figure 1.9- **Réflexe du retrait de la branchie, du siphon et de la queue.** Suite à l'application d'un stimulus sur le siphon, on remarque le retrait de la queue, du siphon et de la branchie sous le manteau. Figure inspirée de Kandel (2001).

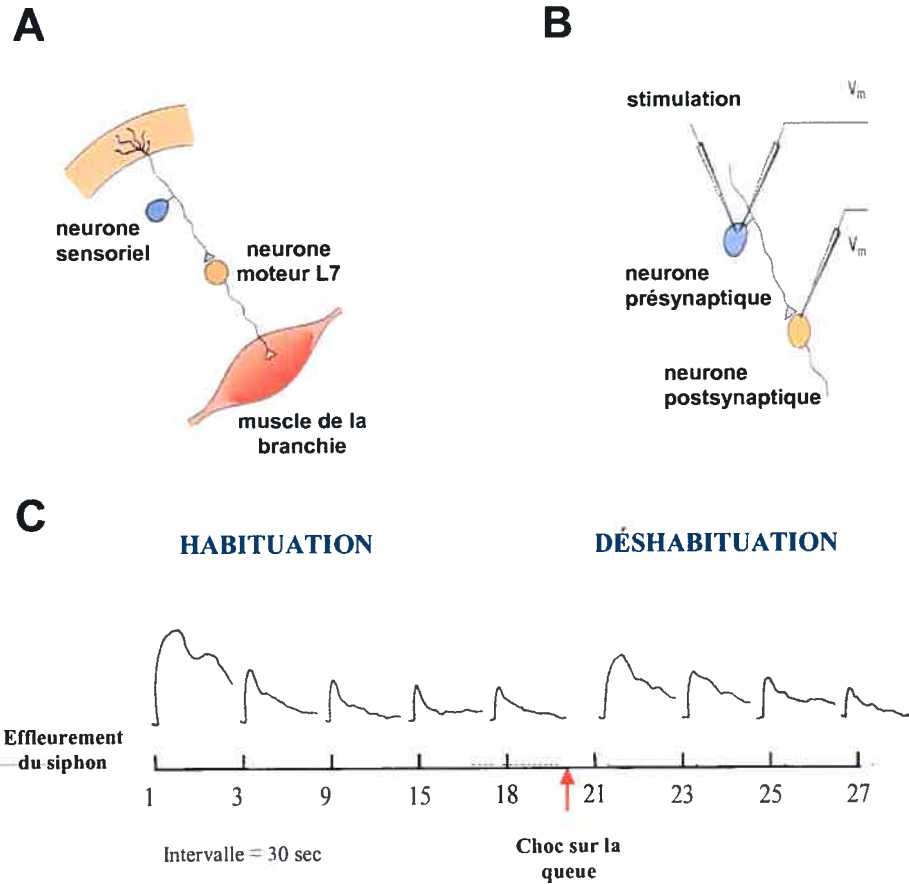


Figure 1.10- **Habituation étudiée au niveau cellulaire.** (A) Représentation simplifiée de l'organisation anatomique du réflexe de retrait. Le neurone sensoriel détecte les stimuli appliqués sur la peau du siphon et est en contact avec le neurone moteur responsable de la contraction de la branchie. (B) Une stimulation au niveau du neurone sensoriel engendre un potentiel synaptique qui provoque une décharge du neurone moteur. (C) Illustration du protocole utilisé pour produire l'habituation. Lorsque le stimulus est répété, il y a diminution de la réponse au niveau du neurone moteur. Figure adaptée de Carew et al. (1971); Pinsker et al. (1973); Bear et al. (1999).

répétition, les potentiels synaptiques engendrés dans les neurones moteurs diminuent graduellement, ayant comme résultat une diminution de la réponse motrice (Figure 1.10B). Cette réduction de réponse est due en grande partie à la diminution de la libération de neurotransmetteur par les neurones sensoriels, un site important de changements dans le circuit impliqué dans le réflexe de retrait de la branchie (Castellucci & Kandel, 1974). De plus, on observe également une diminution dans le nombre de connections synaptiques. Ces changements, appelés dépression, peuvent se conserver à long terme (Castellucci et al., 1978).

1.3.2 Sensibilisation du réflexe de la branchie

Il est également possible de «faciliter» le réflexe du retrait de la branchie en faisant précéder le stimulus faible par un second stimulus appliqué à une autre partie du corps. Ce second stimulus est souvent une forte stimulation tactile ou douloureuse, comme par exemple un choc électrique. Dans ces conditions, la réponse du neurone moteur de la branchie est supérieure à celle enregistrée suite à la faible stimulation. Eric Kandel, Irving Kupfermann, Harold Pinsker, Vincent F. Castellucci, Thomas J. Carew et Robert Hawkins établirent les paramètres nécessaires pour engendrer la facilitation du réflexe (Kandel, 2001). Ainsi, ils ont identifié une forme d'apprentissage où les modifications de la plasticité synaptique étaient corrélées au comportement. Contrairement à l'habituation qui est un processus homosynaptique, la sensibilisation est dite hétérosynaptique car elle implique deux circuits nerveux différents (Figure 1.11) (Byrne & Kandel, 1996).

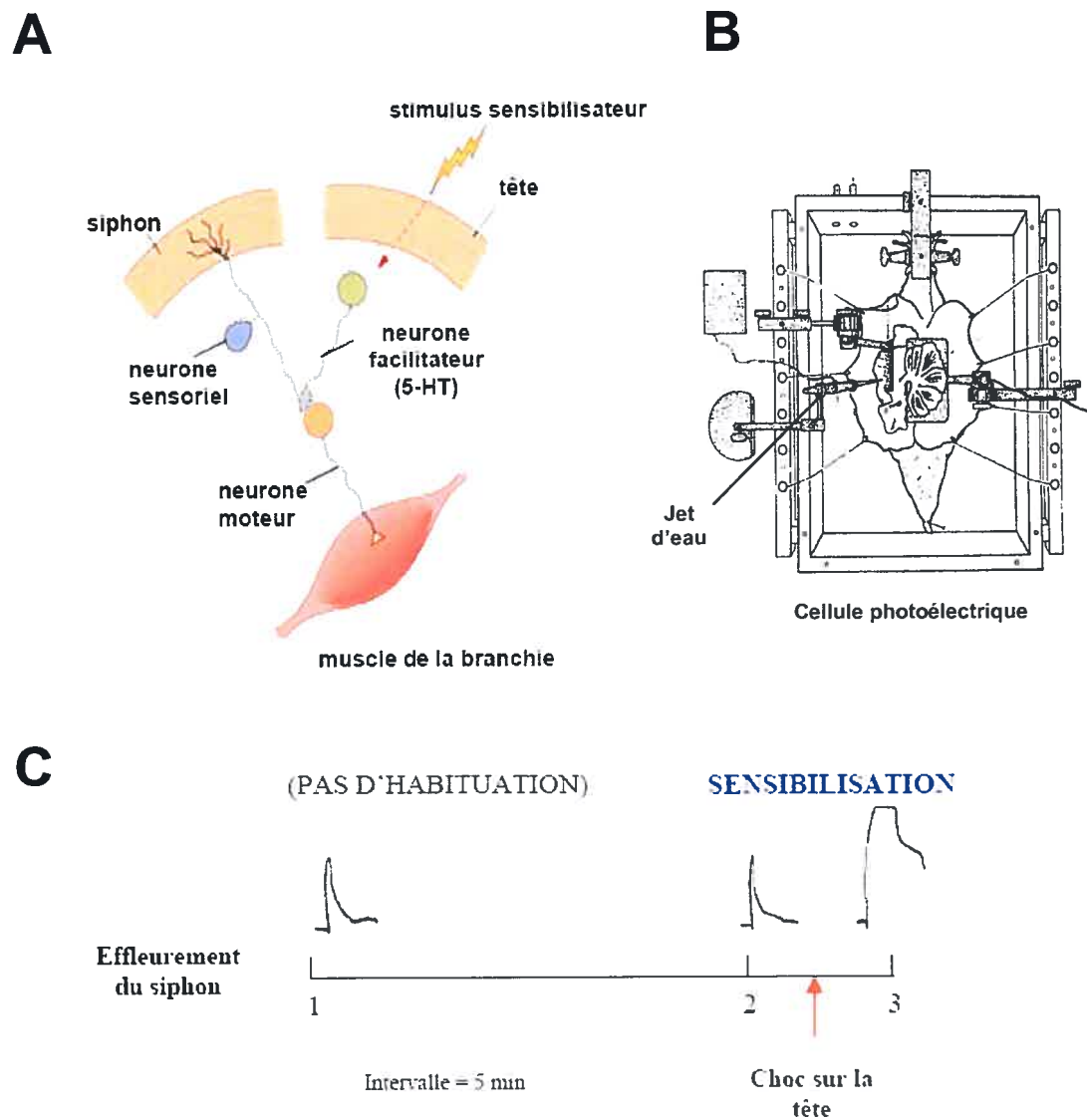


Figure 1.11- **Organisation anatomique des voies impliquées dans la sensibilisation.** (A) Un stimulus sensibilisateur appliqué à la tête de l'aplysie active un neurone facilitateur sérotoninergique qui va relâcher de la sérotonine (5-HT). La 5-HT va faciliter la terminaison de l'axone sensoriel et entraîner une sensibilisation de la réponse motrice. (B) Type de préparation utilisée pour mesurer les paramètres du réflexe. (C) Protocole utilisé pour produire la sensibilisation. Figure modifiée de Carew et al. (1971); Pinsker et al. (1973); Bear et al. (1999).

1.3.3 Conditionnement classique chez l'aplysie

Il est possible d'augmenter la réponse d'un réflexe plus efficacement et plus longtemps que lors de la sensibilisation. Il suffit de forcer l'animal à associer un stimulus conditionnel (provoque une réponse suite à un apprentissage) à un stimulus inconditionnel (qui ne nécessite pas d'apprentissage pour provoquer une réponse). Le stimulus inconditionnel (SI) est normalement un choc violent sur la queue et le stimulus conditionnel (SC), une légère stimulation du siphon qui ne provoque normalement qu'une faible réponse. Si la stimulation de la queue est appariée avec une stimulation du siphon, la réponse à la stimulation du siphon est alors augmentée (conditionnement classique). Au point de vue des circuits cellulaires impliqués, le conditionnement classique utilise les mêmes que la sensibilisation. Un choc sur la queue active des interneurons modulateurs, principalement sérotoninergiques, qui sont connectés aux neurones sensoriels du siphon. Ce qui distingue le conditionnement de la sensibilisation est la fenêtre de temps entre l'appariement des deux stimuli (Carew et al., 1983; Hawkins et al., 1983, 1986). Le conditionnement n'agit que si le SC précède le SI de 0,5 secondes au maximum (Squire & Kandel, 2001).

1.3.4 Circuits neuronaux du réflexe de retrait du siphon et de la queue

Les circuits neuronaux modulant les réflexes de défense ont été grandement étudiés chez l'aplysie. On connaît les circuits impliqués dans l'induction des réflexes de retrait du siphon et de la queue (Figure 1.12). Ces réflexes impliquent les ganglions abdominal, pleuraux et pédaux (Marinesco & Carew, 2002; Bristol et al., 2004). Un

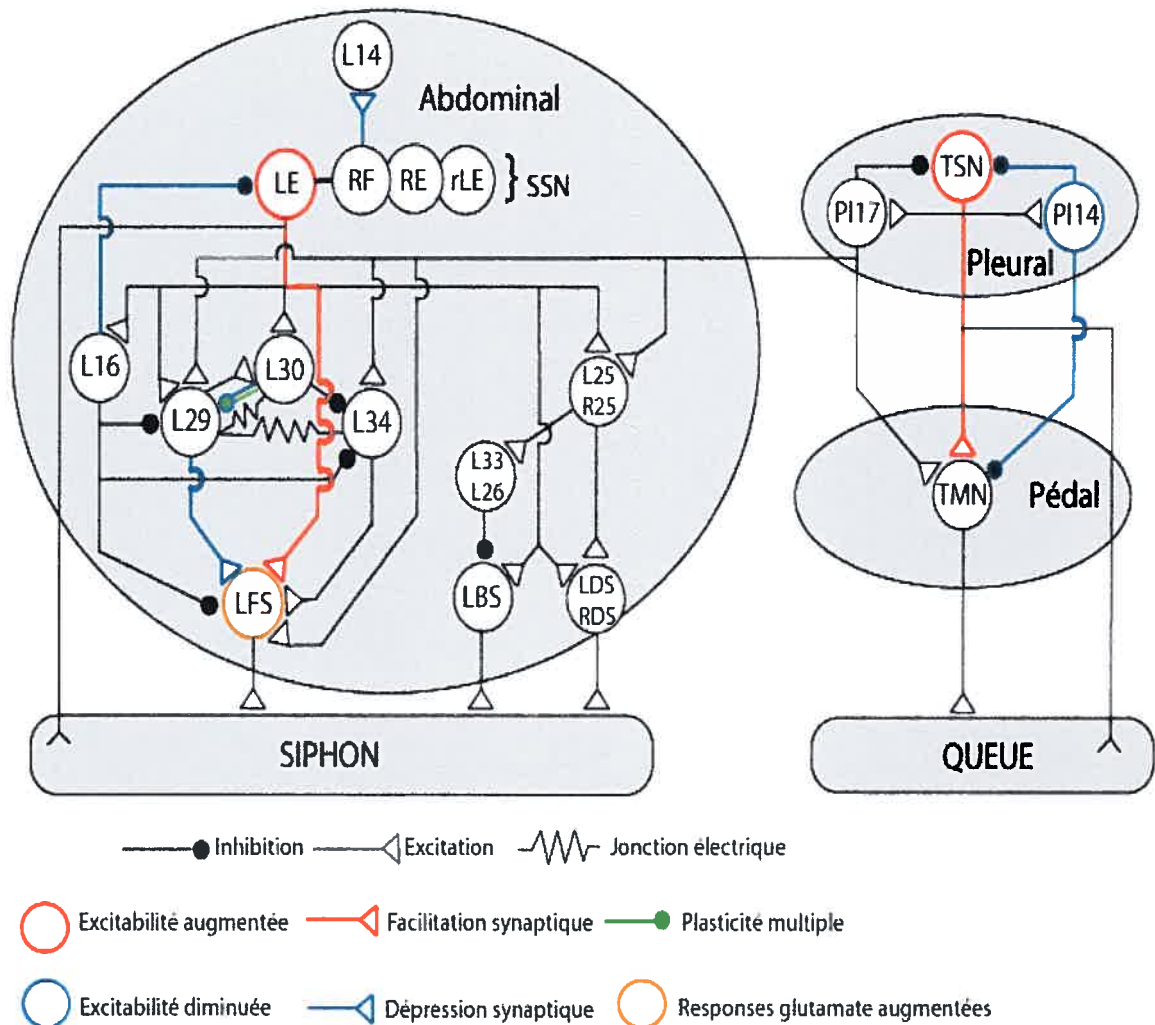


Figure 1.12- Représentation schématique du circuit neuronal modulant les réflexes de retrait de la queue et du siphon. Les corps cellulaires des neurones sont dans les ganglions abdominal, pleural et pédal. Une stimulation tactile sur la queue ou le siphon active les neurones sensoriels de la queue (TSN) ou du siphon (SSN), ce qui excite les MNs à travers les contacts monosynaptiques SN-MN ou par les voies polysynaptiques dépendamment des interneurons impliqués. La 5-HT exerce ses actions multiples sur le circuit: (1) elle provoque la dépression synaptique et/ou (2) la diminution de l'excitabilité des interneurons inhibiteurs (bleu); (3) la facilitation synaptique et (4) l'augmentation de l'excitabilité des neurones sensoriels (rouge). L14, un MN de la glande pourpre, montre une dépression synaptique induite par la 5-HT sur les SNs RF. 5-HT induit la plasticité multiple (réponses multiples) aux synapses L30-L29 (vert) et augmente la réponse glutamatergique dans les MNs LFS (beige). Figure adaptée de Barbas et al. (2003).

stimulus tactile appliqué sur le siphon ou sur la queue active les neurones sensoriels (SNs) de ces organes, ce qui excite les neurones moteurs (MNs) à travers des contacts monosynaptiques SN-MN et des voies polysynaptiques (Cleary et al., 1995; Frost & Kandel, 1995). Plusieurs interneurons sont impliqués dans ces voies polysynaptiques (Kanz et al., 1979; Byrne, 1983; Eberly & Pinsker, 1984; Buonomano et al., 1992; Cleary & Byrne, 1993; Xu et al., 1994; Frost & Kandel, 1995). Les neurones moteurs reçoivent des inputs facilitateurs et inhibiteurs. Il y aura donc sommation des potentiels synaptiques au niveau de MNs. Par exemple, normalement l'activation des voies polysynaptiques provoque une amplification de l'excitation des MNs du siphon, et ce même si l'on retrouve des contacts avec des interneurons inhibiteurs. Donc, la réponse finale est la résultante des sommations des activités synaptiques des voies monosynaptiques et polysynaptiques (Trudeau & Castellucci, 1992; White et al., 1993; Antonov et al., 1999).

Au point de vue de la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la modulation de la mémoire et de l'apprentissage, l'étude de la sensibilisation chez l'aplysie à apporter beaucoup de réponses. La sensibilisation repose sur le renforcement de la transmission synaptique entre un neurone sensoriel (SN) et un neurone moteur (MN), c'est-à-dire une augmentation dans l'excitabilité du SN et une facilitation dans la synapse SN-MN. De plus en plus d'évidences suggèrent que la plasticité synaptique dans la synapse SN-MN dépend de la relâche de sérotonine (5-HT) dans le SNC de l'aplysie durant la sensibilisation (Brunelli et al., 1976; Mackey et al., 1989; Marinesco & Carew, 2002). La 5-HT est une monoamine dérivée d'un acide aminé, le tryptophane.

Le tryptophane est d'abord transformé en un intermédiaire appelé 5-HTP (5-hydroxytryptophane) par la tryptophane hydroxylase. Le 5-HTP est finalement transformé en 5-HT par la 5-HTP-décarboxylase. La 5-HT activerait essentiellement une cascade qui mène à la production d'adénosine monophosphate 3'5'-cyclique (AMPC) et à l'activation de la protéine kinase AMPC-dépendante (PKA) dans le neurone sensoriel, ce qui entraîne une augmentation de la transmission dans les synapses SN-MN (Brunelli et al., 1976; Castellucci et al., 1980, 1982; Bernier et al., 1982; Abrams et al., 1984; Ocorr & Byrne, 1985; Ocorr et al., 1986; Ghirardi et al., 1992; Klein, 1993). Il est devenu évident que la 5-HT agit sur diverses cellules nerveuses dans les circuits impliqués dans les réflexes défensifs et est donc un neurotransmetteur central dans la modulation de l'apprentissage et de la mémoire chez l'aplysie (Barbas et al., 2003).

1.4 Rôles de la 5-HT dans la facilitation synaptique

L'importance de la 5-HT dans la sensibilisation a initialement été suggérée dans une série d'articles par Brunelli et al. (1976) et Castellucci & Kandel (1976). Ces travaux démontrèrent pour la première fois une corrélation entre la sensibilisation du réflexe de retrait de la branchie et une augmentation de la relâche de neurotransmetteurs du neurone sensoriel (SN) vers le neurone moteur (MN). Ce phénomène fut donc appelé facilitation présynaptique (Castellucci & Kandel, 1976). On peut reproduire la facilitation en augmentant la concentration de 5-HT extracellulaire ou par injection intracellulaire d'AMPC.

Des efforts considérables furent consacrés à identifier les neurones sérotoninergiques impliqués dans la facilitation présynaptique et à déterminer si effectivement la 5-HT était relâchée dans la SNC de l'aplysie durant la sensibilisation. Mackey et al. (1989) montrèrent qu'une paire de neurones sérotoninergiques symétriques, CC3 (ou CB1; voir Xin et al., 2001) dans le ganglion cérébral, est activée par une stimulation électrique au niveau de la queue. De plus, l'activation de l'une de ces cellules par l'injection de courant intracellulaire est suffisant pour produire la facilitation des synapses SN-MN ainsi que l'augmentation de l'excitabilité dans les neurones sensoriels du ganglion abdominal (Mackey et al., 1989; Wright et al., 1995). Par contre, la facilitation produite par l'activation de CC3 (CB1) est plus faible et dure moins longtemps que l'application exogène de 5-HT (Mackey et al., 1989). En utilisant des méthodes de détection électrochimique, Marinesco & Carew (2002) purent détecter une relâche brève de 5-HT dans la SNC de l'aplysie en réponse à une stimulation électrique au niveau du nerf P9 de la queue, stimulation analogue à un choc électrique appliqué au niveau de la queue pour produire une sensibilisation. Cette libération de 5-HT dure 30-40 secondes et plafonne à une concentration de 100-200 nM dans la neuropile entourant les synapses SN-MN de la queue et les corps cellulaires de SN (Marinesco & Carew, 2002). Une augmentation du niveau de 5-HT dans l'hémolymphe (fluide corporelle de l'aplysie) a également été détectée lors de la sensibilisation (Levenson et al., 1999).

La seule étude de comportement connue sur un animal intact fut accomplie par Glanzman et al. (1989). Ils utilisèrent un agent chimique, 5,7-dihydroxytryptamine (5,7-DHT), qui agit comme toxine pour perturber les voies sérotoninergiques. Les animaux traités montrèrent des comportements altérés (incapacité à se mouvoir). Ces animaux étaient quand même susceptibles à l'habituation de réflexes défensifs. Glanzman et al. (1989) observèrent également que la facilitation synaptique et l'habituation de réflexes défensifs étaient grandement affectées, suggérant que la libération de 5-HT est importante pour ces processus d'apprentissage. Il devenait donc primordial d'identifier précisément les circuits neuronaux sérotoninergiques impliqués dans les processus de mémoire et d'apprentissage pour pouvoir en perturber les fonctions en ciblant spécifiquement certains neurones impliqués.

1.4.1 Modulation des circuits neuronaux des réflexes par la 5-HT durant la sensibilisation

Plusieurs neurones impliqués dans le retrait du siphon et de la queue sont modulés par l'application exogène de 5-HT (Figure 1.12). Fitzgerald & Carew (1991), ainsi que Trudeau et Castellucci (1992, 1993), entreprirent de déterminer les distinctions entre les voies monosynaptiques et polysynaptiques lors de la sensibilisation. Ces deux groupes montrèrent que contrairement aux connections monosynaptiques SN-MN qui sont facilitées par la 5-HT, les voies polysynaptiques sont inhibées. Plusieurs groupes de synapses sont inhibés par la 5-HT (Figure 1.12) (Frost et al., 1985; Frost et al., 1988; Fisher & Carew, 1993; Xu et al., 1995; Storozhuk & Castellucci, 1999a; Bristol et al.,

2001). Plusieurs réponses sérotoninergiques sont également observées dans le ganglion abdominal. Le siphon est innervé par au moins quatre groupes de SNs du ganglion abdominal (LE, rLE, RE et RF; Dubuc & Castellucci, 1991; Frost & Kandel, 1995), qui peuvent être différemment modulés par la 5-HT. Par exemple, la 5-HT augmente l'excitabilité des cellules du groupe LE et facilite les synapses avec les neurones moteurs. À l'opposé, la 5-HT inhibe les synapses des cellules RF (Figure 1.12; Storozhuk & Castellucci, 1999b). La 5-HT peut également induire des réponses multiples sur une même synapse (ou metaplasticité) (Fischer & Carew, 1995; Fischer et al., 1997; Fischer et al., 2000). En plus de moduler l'activité des SNs, la 5-HT possède également une action directe sur les MNs (Frost et al., 1988; Dubuc & Castellucci, 1991). Elle facilite les réponses glutamatergiques (de type AMPA) dans les neurones moteurs LFS (Chitwood et al., 2001).

L'ensemble de ces résultats indique donc que la modulation des circuits des réflexes par la 5-HT implique une variété de types cellulaires qui répondent différemment à la 5-HT. Lorsque la 5-HT est libérée dans le SNC de l'aplysie, elle active une variété de mécanismes moléculaires, notamment des récepteurs sérotoninergiques, qui ne sont pas uniformément exprimés d'un neurone à l'autre. Cette différence dans la population des protéines d'un neurone à l'autre provoque une variété de modulations de la transmission et l'excitabilité synaptique par la 5-HT.

1.4.2 Cascade biochimique activée par la 5-HT dans les SN

L'étude de la synapse SN-MN chez l'aplysie a permis d'analyser la mémoire à court et long terme au niveau cellulaire et moléculaire. Normalement, une stimulation forte peut provoquer une sensibilisation à court terme, durant 20-30 minutes. Quatre ou cinq stimulations espacées induisent une sensibilisation à moyen terme (intermédiaire) ou long terme, durant quelques heures et quelques jours respectivement (Pinsker et al., 1973; Castellucci & Kandel, 1976; Scholz & Byrne, 1987; Sutton et al., 2001, 2002). De la même manière, une application exogène de 5-HT entraîne une facilitation à court terme, tandis que cinq brèves applications espacées (ou une très longues) de 5-HT induisent une facilitation à moyen terme ou à long terme (Frost et al., 1985; Montarolo et al., 1986; Sutton & Carew, 2000). Au niveau des mécanismes moléculaires, la sensibilisation et la facilitation de la synapse SN-MN nécessitent l'activation de mécanismes identiques: (1) la sensibilisation et la facilitation à court terme reposent sur la modification covalente de protéines, (2) à moyen terme sur la synthèse de nouvelles protéines, et (3) long terme sur la transcription et traduction de nouvelles protéines (Castellucci et al., 1986, 1989; Montarolo et al., 1986; Ghirardi et al., 1995; Sutton et al., 2001). La facilitation à long terme nécessite donc la transcription et traduction de nouvelles protéines contribuant à l'augmentation de l'efficacité de la transmission synaptique se traduisant en une augmentation de la relâche de neurotransmetteurs, en l'augmentation du niveau d'excitabilité des neurones et en une croissance de nouvelles synapses (dans le cas de la sensibilisation, facilitation) (Bailey et al., 2004).

Plusieurs évidences démontrent qu'une simple application de 5-HT sur un SN entraîne une augmentation de la concentration en AMPc et l'activation de PKA (Bernier et al., 1982; Castellucci et al., 1982; Abrams et al., 1984; Ocorr & Byrne, 1985; Ocorr et al., 1986; Byrne & Kandel, 1996; Müller & Carew, 1998) (Figure 1.13A). La 5-HT provoque également une translocation à la membrane de la protéine kinase C (PKC) Ca^{2+} -dépendante et augmente son activité (Sacktor & Schwartz, 1990; Kruger et al., 1991; Sossin et Schwartz, 1992; Braha et al., 1993; Sossin et al., 1993; Sossin et al., 1994). Une petite contradiction subsiste puisque Manseau et al. (2001) montrèrent que le blocage de l'isoforme PKC Ca^{2+} -indépendante perturbe la facilitation par la 5-HT aux synapses SN-MN, tandis que le blocage de l'isoforme Ca^{2+} -dépendant n'a aucun effet. L'activation de PKA et PKC permet à ces protéines de (1) phosphoryler des canaux ioniques spécifiques et de (2) moduler les mécanismes d'exocytose (Figure 1.13A). La PKA, en phosphorylant des canaux potassiques (types S), provoque une réduction de leur conductance et leur fermeture (Siegelbaum et al., 1982). Cette action contribue à l'augmentation de l'excitabilité membranaire et de la durée des potentiels d'action suivant une application de 5-HT (Klein et al., 1982; Pollock et al., 1985; Baxter & Byrne, 1989). Des canaux potassiques voltage dépendant (K_v) peuvent être également phosphorylés par PKA et PKC (Baxter & Byrne, 1989, 1990; Goldsmith & Abrams, 1992; Sugita et al., 1992). L'augmentation de la durée des potentiels d'action est un mécanisme important pour accroître l'efficacité de la transmission synaptique par l'accroissement d'influx de Ca^{2+} dans les terminaisons nerveuses. La 5-HT est également capable d'augmenter la relâche de neurotransmetteurs, indépendamment des variations de la durée des potentiels d'action, et d'augmenter la mobilisation de

vésicules synaptiques aux sites de libération des neurotransmetteurs, ou zones actives (Hochner et al., 1986; Braha et al., 1990; Sugita et al., 1992; Klein, 1993, 1994).

Le recrutement de PKA et PKC par la 5-HT est différent selon la durée de l'application de 5-HT et l'état de la synapse. Des bloqueurs de PKA sont plus efficaces pour prévenir la facilitation synaptique suite à une courte application de 5-HT, versus des bloqueurs de PKC qui eux fonctionnent mieux après de longues applications (Braha et al., 1990; Hochner & Kandel, 1992; Sugita et al., 1992). La facilitation de synapses déprimées est bloquée par des inhibiteurs PKC et non PKA, tandis que les inhibiteurs PKA bloquent la facilitation de synapses non déprimées (Braha et al., 1990; Goldsmith & Abrams, 1991; Ghirardi et al., 1992). Les éléments moléculaires expliquant les contraintes de temps et d'états de la synapse permettant ou non le recrutement de PKC ou PKA par la 5-HT ne sont pas connus (Byrne & Kandel, 1996). L'une des explications proviendrait des mécanismes d'activation de récepteurs sérotoninergiques.

En plus d'observer une activation de PKA et PKC, la répétition d'ajout de 5-HT recrute une série de kinases, les MAP kinases, (également appelées ERK) (Figure 1.13A). Une fois activées, on observera la translocation des MAP kinases au noyau pour favoriser l'expression de gènes essentiels pour le maintien de la facilitation à long terme (Martin et al., 1997a; Michael et al., 1998; Sharma et al., 2003; Bailey et al., 2004). Cette activation de la transcription s'effectue par la phosphorylation de CREB1 (facteur de transcription; «cAMP-responsive element binding protein») et du répresseur CREB2. Les MAP kinases sont également responsables de la phosphorylation de protéines

cytosoliques telles que l'apCAM («*Aplysia* cell adhesion molecules»), et de facteurs de transcriptions comme *C/EBP* («CCAAT-box-enhanced binding-protein») (Figure 1.13A). La phosphorylation d'apCAM permet la défasciculation des neurites et la croissance de nouvelles synapses (Bailey et al., 1997). L'activation des ERK par la 5-HT et la facilitation à long terme sont également dépendantes de l'activation de tyrosine kinases, plus spécifiquement des récepteurs à tyrosine kinase (RTK ou plus spécifiquement ApTrkl) (Purcell et al., 2003; Ormond et al., 2004). Comment peut-on expliquer que la stimulation répétée de 5-HT active la voie des MAP kinases et des tyrosine kinases? Encore une fois, il faudra connaître l'identité moléculaire des récepteurs sérotoninergiques impliqués pour pouvoir identifier ces mécanismes.

L'utilisation d'une culture de neurones sensoriels bifurqués, qui contactent deux neurones moteurs éloignés l'un de l'autre (Martin et al., 1997a; Figure 1.13B), a permis de démontrer l'existence de mécanismes moléculaires encore plus complexes. Lorsqu'un neurone reçoit un input de 5-HT, et en même temps un input du neurotransmetteur FMRFamide, un térapeptide, sur une synapse différente, la dépression produite par FMRFamide prédomine sur la facilitation induite par la 5-HT. Cette domination s'explique par la phosphorylation d'une MAP kinase p38, le recrutement du répresseur CREB2 et d'une déacétylase induisant une répression d'ApC/EBP et la déacétylation des histones. Cette action négative surpasse donc le recrutement de CREB1 par la 5-HT. CREB1 est normalement capable de former un complexe avec CBP («CREB binding protein»), ce qui acétyle des lysines sur les histones et qui décondense la chromatine (Guan et al., 2002, 2004; Bailey et al., 2004) (Figure 1.13A).

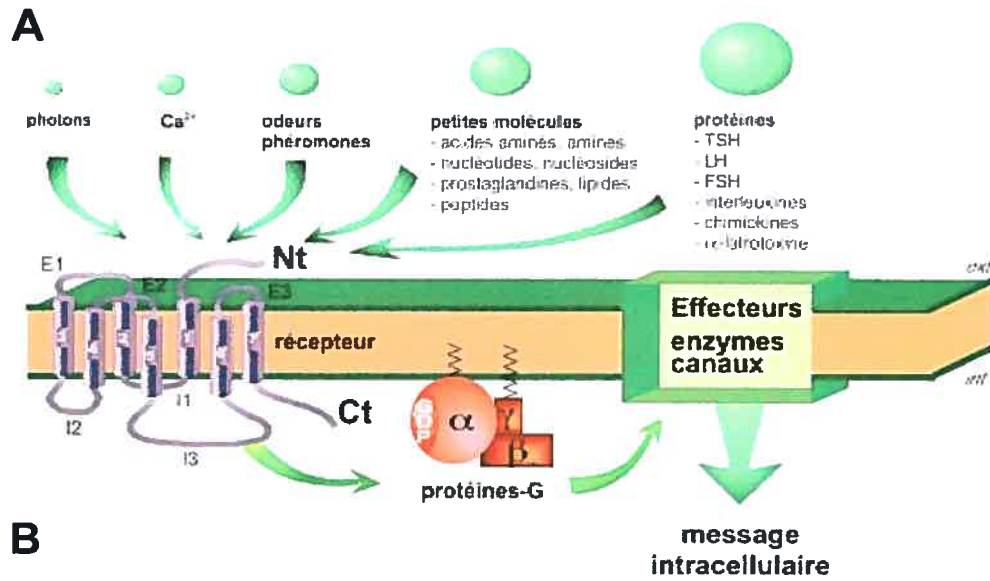
L'activation des processus de transcription par la 5-HT semble être un processus qui peut être synapse spécifique et qui ne peut s'appliquer à toutes les régions d'un neurone. Durant la facilitation à long terme, une stimulation unique de 5-HT sur une synapse en particulier est essentielle pour produire un marquage synaptique. Ce marquage consiste en des modifications covalentes PKA dépendantes qui marquent les synapses spécifiquement pour la croissance de celles-ci. De plus, cette application unique provoque la traduction et la synthèse de protéines locales (Casadio et al., 1999; Bailey et al., 2004). Puisque les ARNm sont produits dans le corps cellulaire (plus précisément dans le noyau), ils doivent rester dormants avant d'atteindre la synapse marquée. Si et al. (2003a) ont montré que l'homologue de la protéine CPEB de l'aplysie («cytoplasmic polyadenylation element binding protein»), protéine capable d'activer des ARNm dormants par l'élongation de leur queue polyA, est une molécule importante pour l'induction de la traduction locale de protéines durant la stabilisation de la mémoire à long terme. De plus, apCPEB agirait comme un prion, qui sous sa forme dominante, soit la forme auto-répliquative de la protéine, serait active et capable de déclencher la traduction des ARNm dormants (Si et al., 2003b). La 5-HT est donc responsable de l'activation d'une cascade biochimique complexe. Toutes ces modifications sont par conséquent déclenchées par la liaison de la 5-HT sur des récepteurs couplés aux protéines G (Figure 1.13A).

1.5 Récepteurs à 5-HT

L'activation de récepteurs sérotoninergiques joue donc un rôle déclencheur dans les processus de mémoire et d'apprentissage chez l'aplysie. Des efforts considérables ont été entrepris pour non seulement identifier ces récepteurs mais également caractériser les mécanismes d'action de ces protéines. La majorité de ces récepteurs sont des protéines de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG).

1.5.1 Récepteurs couplés aux protéines G

Les RCPG sont des protéines ubiquistes et polyvalentes impliquées dans la signalisation cellulaire et représentant des cibles pharmacologiques privilégiées pour le développement de médicaments. Ils représentent la plus grande famille de récepteurs membranaires avec plus de 600 récepteurs distincts identifiés chez l'humain (Lander et al., 2001). Leur importance biologique est illustrée par la diversité des hormones qui utilisent ces récepteurs afin d'acheminer un signal biologique de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule (Bockaert & Pin, 1999). Tous ces récepteurs possèdent sept domaines transmembranaires hydrophobes capables de former des hélices alpha aptes à traverser la membrane plasmique (Figure 1.14A). Ces domaines hydrophobes sont les régions les mieux conservées dans les RCPG, surtout au niveau des récepteurs répondant à un ligand commun. Il n'est donc pas étonnant de retrouver les acides aminés essentiels pour l'interaction avec le ligand à l'intérieur de ces domaines (Hibert et al., 1991). Les RCPG sont activés par la liaison d'un ligand, qui vient se loger dans la poche formée par



B

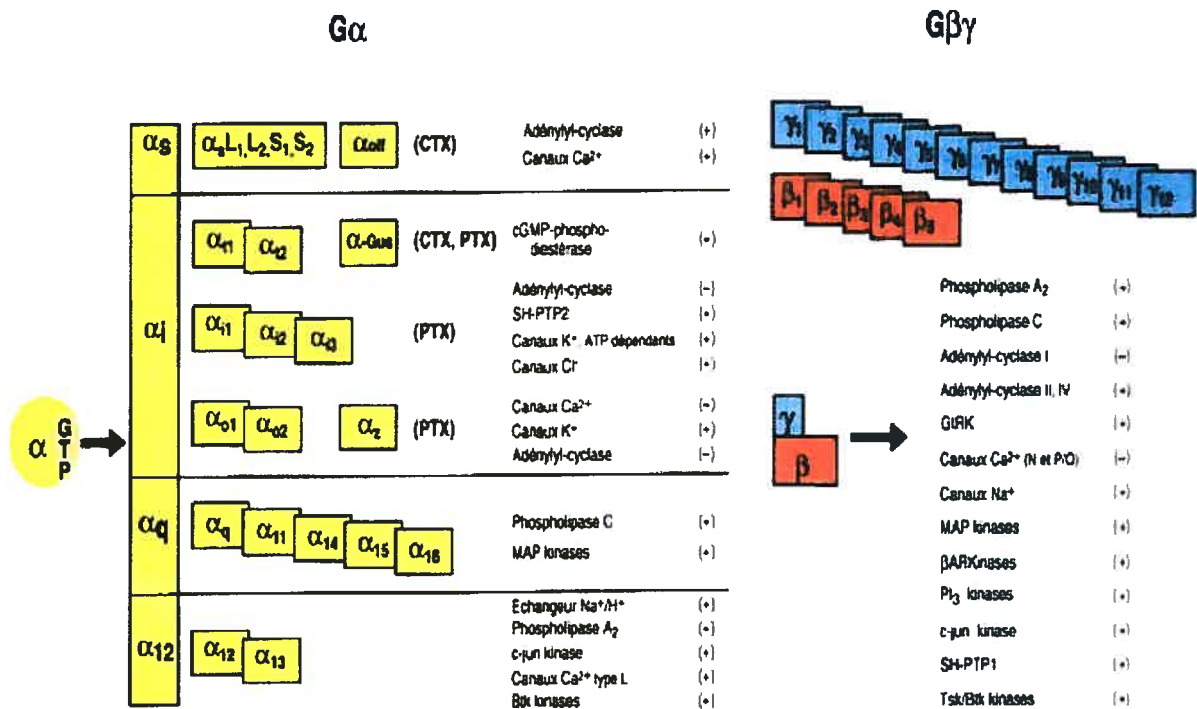


Figure 1.14- Les RCPG et leurs mécanismes d'activation. (A) Représentation schématique des RCPG. Les sept domaines transmembranaires sont représentés (en mauve). Différentes classes de ligands sont également représentés. On remarque la présence de la protéine G hétéotrimerique. Figure adaptée de Bockaert & Pin (1999). (B) Combinaisons et variétés multiples de protéines G. Figure tirée de Bockaert & Pin (1998).

les sept domaines transmembranaires. Cette liaison entraîne un changement de conformation de la partie intracellulaire du récepteur, et active une protéine G hétérotrimérique (α , β , γ) en catalysant l'échange d'une molécule de GDP pour une molécule de GTP sur la sous-unité α de la protéine G. La sous-unité α liée au GTP se dissocie de la sous-unité $\beta\gamma$ et peut interagir avec la protéine effectrice. Le dimère $\beta\gamma$ peut également activer diverses voies de signalisation (Bourne et al., 1991). Ce sont les régions intracellulaires des RCPG qui sont impliquées dans leur interaction avec les protéines G, notamment la troisième boucle intracellulaire (Kobilka et al., 1988).

Les RCPG possèdent plusieurs sites de modification post-traductionnelle. La portion N-terminale et les boucles extracellulaires comportent plusieurs sites potentiels de glycosylation (O'Dowd et al., 1989a). Les domaines intracellulaires présentent habituellement des sites de phosphorylation qui jouent un rôle majeur dans la régulation de l'activité du récepteur (Freedman & Lefkowitz, 1996; Böhm et al., 1997). De multiples récepteurs présentent des sites de palmytation sur des résidus cystéines dans la queue C-terminale. La palmytation des RCPG sert à ancrer la queue C-terminale des récepteurs à la membrane plasmique (Ovchinnikov et al., 1988; O'Dowd et al., 1989b). Finalement, on peut retrouver des séquences importantes pour l'exportation de récepteurs nouvellement synthétisés vers la membrane et le recyclage de ces récepteurs une fois internalisés. Ce type de séquences a été particulièrement identifié pour les récepteurs dopaminergiques mammifères de type 1 (Bermak et al., 2001; Vargas & von Zastrow, 2004).

La réponse cellulaire induite par la liaison du ligand sur le récepteur dépend de l'affinité du récepteur à une combinaison de protéines G. On dénombre plusieurs sous-unités α distinctes liant toutes le GTP et possédant une activité GTPasique permettant l'hydrolyse de GTP en GDP. Celles-ci peuvent être groupées en quatre familles (G_s , G_i , G_q et G_{12}) activant des voies de signalisation distinctes (Bockaert & Pin, 1998) (Figure 1.14B).

Les adénylates cyclases sont sans doute les effecteurs des protéines G les mieux caractérisés (Sunahara et al., 1996). L'adénylate cyclase est une protéine membranaire intégrale qui catalyse la formation d'AMPc à partir de l'ATP. Elle est modulée positivement ou négativement par les différentes sous-unités des protéines G. Les sous-unités α_s , qui font parties du complexe hétérotrimérique G_s , activent l'enzyme alors que les sous-unités α_i , du complexe appelé G_i , l'inactivent (Bockaert & Pin, 1998).

La seconde catégorie d'effecteurs regroupe les phospholipases. L'activation des phospholipases C β_1 et β_3 (PLC) par les diverses sous-unités de la famille $G\alpha_q$ est la plus documentée. La PLC est une enzyme membranaire qui provoque le clivage d'un phospholipide membranaire (le PIP_2 ou phosphatidylinositol-4,5-diphosphate), qui en le scindant forme deux molécules jouant des rôles de seconds messagers: le diacylglycérol (DAG) et l'inositol-1,4,5-triphosphate (IP_3). L' IP_3 , soluble dans l'eau, diffuse à l'intérieur de la cellule et se fixe sur des récepteurs spécifiques situés à la surface du réticulum endoplasmique lisse et sur d'autres organelles. L'activation de ces récepteurs (canaux calciques) par l' IP_3 provoque une sortie de calcium à partir de ces réserves

intracellulaires. Le DAG, soluble dans les lipides membranaires, agit au voisinage de la membrane où il active la PKC (Kandel et al., 1991; Byrne et al., 1993).

Les RCPG peuvent également moduler des canaux ioniques. Les canaux GIRKS («G-protein inward rectifying potassium channel»; canaux à rectifications entrants) sont activés par la liaison, à leurs extrémités N- et C-terminales, des sous-unités $\beta\gamma$. Par contre, la liaison de ces mêmes sous-unités $\beta\gamma$ mène à l'inhibition de canaux Ca^{2+} (de type N et P/Q) (Jan & Jan, 1997; Schneider et al. 1997). De plus en plus on identifie des effecteurs qui sont directement modulés par les récepteurs. Par exemple, on dénote les arrestines qui sont impliquées dans le processus de désensibilisation des RCPG, des protéines à domaines (SH_2 , PDZ et EVH), ainsi que des petites protéines G de la famille de Rho (Kozasa et al., 1998; Hall et al., 1999).

Les RCPG peuvent activer les voies des MAP kinases (Gutkind, 1998). L'activation des voies ERK requiert non seulement l'activation de protéines G hétérotrimériques mais aussi l'activation de tyrosines kinases (Luttrell, 2002). Le rôle de la β -arrestine comme molécule de signalisation, plus particulièrement comme molécule d'échafaudage dans la signalisation RCPG-MAP kinases, est essentiel pour recruter des protéines importantes dans l'activation de ces voies (Luttrell et al., 2001).

Suite à une stimulation prolongée et soutenue par un agoniste, il y a diminution de la réponse cellulaire induite par le récepteur. Ce phénomène est appelé désensibilisation. La désensibilisation est causée par le découplage fonctionnel du

récepteur de la protéine G. Ce découplage provoque une phosphorylation du récepteur au niveau des boucles intracellulaires et de la queue C-terminale. La phosphorylation du récepteur permet le recrutement de la β -arrestine, une protéine ayant une affinité accrue pour le récepteur phosphorylé. La β -arrestine, liée au récepteur, empêche donc l'interaction aux protéines G et atténue sa capacité de signalisation. De plus, la β -arrestine promeut l'internalisation du récepteur pour le recyclage ou l'élimination de celui-ci (McDonald & Lefkowitz, 2001).

Diverses études ont montré que les RCPG pouvaient exister et fonctionner sous formes dimériques ou même oligomériques, particulièrement par l'utilisation de techniques de transfert d'énergie (FRET ou BRET). L'assemblage et le ciblage des récepteurs à la membrane plasmique semblent être des processus régulés par la dimérisation. Les concepts d'oligomérisation et même d'hétérodimérisation des RCPG entraînent une diversification de la signalisation des RCPG. (Bouvier, 2001; Angers et al., 2002). Tous ces concepts structurels et fonctionnels des RCPG en font des molécules possédant une capacité diversifiée d'activation, de régulation et de signalisation.

1.5.2 Divergences évolutives des récepteurs à 5-HT

Les récepteurs sérotoninergiques sont classés en sept familles distinctes. Ce regroupement est effectué sur la base de leurs voies de signalisation et de leurs identités de séquences (Hoyer et al., 1994; Peroutka, 1995). Six de ces familles sont composées de récepteurs couplés aux protéines G métabotropiques. Les récepteurs 5-HT₁ et 5-HT₅

inhibent l'adénylate cyclase (récepteurs couplés à G_i), tandis que les récepteurs 5-HT₄, 5-HT₆ et 5-HT₇ l'activent (récepteurs couplés à G_s). Les récepteurs de type 5-HT₂ vont plutôt activer la PLC et stimulent donc le métabolisme du PIP₂ (récepteurs couplés à G_q). Les récepteurs de type 5-HT₃, formant des canaux ioniques Na^+K^+ directement activés par le ligand et occasionnant une dépolarisation rapide des neurones suite à l'ouverture du canal, ne font pas partie de la famille des RCPG (Hoyer et al., 1994).

Puisque des récepteurs à 5-HT ont été identifiés chez les invertébrés les plus primitifs, ils ont dû apparaître il y a plus de 800 millions d'années (Vernier et al., 1995; Tierney, 2001). Le récepteur primordial ou ancestral aurait rapidement divergé en trois groupes principaux de paralogues: le premier groupe de la grande famille des récepteurs 5-HT₁ (comprenant les récepteurs de type 1, 5 et 7); le second des récepteurs de type 2; le troisième des récepteurs de type 6. Ce premier événement moléculaire de diversification se serait produit il y a 750 millions d'années approximativement. Des divergences subséquentes suivirent au niveau du premier groupe il y a 600 millions d'années: les récepteurs 5-HT₅ et 5-HT₇ divergèrent des récepteurs 5-HT₁. Tous ces événements précèdent l'évolution des vertébrés à partir des invertébrés, il y a 600 millions d'années. Par conséquent, on peut prédire que l'on devrait retrouver des membres des trois classes majeures de récepteurs à 5-HT chez les invertébrés. De plus, au courant de l'évolution, à l'intérieur de chaque sous types de récepteurs, on retrouve également des événements de divergences subséquentes qui agrandissent la diversité au niveau de chaque famille (Peroutka & Howell, 1994; Peroutka, 1995; Tierney, 2001). Par exemple, la famille des récepteurs 5-HT₁ a divergée en cinq sous-types: 5-

HT_{1A,B,D,E,F}. Puisque ces changements se sont produits après la divergence des vertébrés et des invertébrés en groupes évolutifs distincts, il est peu probable que ces sous-types soient présents chez les invertébrés (Peroutka & Howell, 1994). On doit également noter que depuis les premières analyses phylogénétiques, la séquence des récepteurs 5-HT₄ (Gerald et al., 1995) a été publiée. Les analyses subséquentes ont rapidement identifié cette famille de récepteur comme étant la résultante d'une divergence initiale du récepteur ancestral, il y a 750 millions d'années (Gerald et al., 1995; Barbas et al., 2003).

1.5.3 Caractérisation initiale des récepteurs à 5-HT dans le SNC de l'aplysie

Les effets de la 5-HT chez l'aplysie furent initialement rapportés dans les neurones (Gerschenfeld & Tauc, 1961; Cedar & Schwartz, 1972), le cœur (Koester et al., 1973) et la branchie (Kebabian et al., 1979). En 1974, Gerschenfeld et Paupardin-Tritsch (1974a) observèrent six réponses différentes suite à l'application de 5-HT: quatre réponses qui se caractérisent par une augmentation de la conductance membranaire (appelée *A*, *A'*, *B* et *C*), versus deux réponses où l'on voit une diminution de la conductance (α et β) (Gerschenfeld & Paupardin-Tritsch, 1974a). Pellmar et Carpenter (1980) identifièrent une septième réponse différente qui est dépendante du voltage et du calcium. Toutes ces réponses se distinguent par des expériences de voltage imposé selon leur temps d'action, sélectivité ionique et l'induction d'une augmentation ou d'une diminution de la conductance membranaire. Ces études sont donc les premières

indications de l'existence possible d'une variété de récepteurs à 5-HT dans le SNC de l'aplysie et ce même si ces réponses électrophysiologiques pouvaient être induites par un même récepteur couplé à différentes cascades biochimiques.

La présence de multiples récepteurs sérotoninergiques fut confirmée par des méthodes biochimiques. Saitoh et Shih (1987) ont montré qu'un agoniste spécifique aux récepteurs 5-HT_{1A} (le 1-[2-(4-azidophenyl)ethyl]4-(3-trifluorométhylphenyl)piperazine ou azido-PAPP), pouvait être utilisé comme sonde pour du marquage par photoaffinité pour identifier des récepteurs à 5-HT. Ils ont observé la présence de cinq polypeptides sur un gel SDS-PAGE suite à l'incubation d'azido-PAPP[³H] sur une préparation membranaire neuronale. Ce marquage était aboli par la 5-HT qui déplace la liaison de la sonde aux récepteurs. Ces résultats suggèrent donc l'existence de cinq récepteurs à 5-HT différents.

Puisque l'intérêt pour définir le rôle de la 5-HT chez l'aplysie est grandissant, il est devenu primordial d'identifier les propriétés pharmacologiques des récepteurs à 5-HT de ce mollusque. Les techniques de liaison classiques aux récepteurs se sont montrées efficaces pour l'identification et la caractérisation pharmacologique de ce type de protéines dans les tissus d'invertébrés. Drummond et al. (1980) rapportèrent la première étude détaillée de la localisation de récepteurs à 5-HT dans plusieurs tissus neuronaux et non neuronaux. Pour ce faire, ils ont effectué des essais de liaison avec le LSD[³H] (lysergic acid diethylamide, un agoniste non spécifique de récepteurs à 5-HT) et des essais de modulation de l'activité de l'adénylate cyclase par la 5-HT. La liaison

spécifique de LSD[³H], capable d'être déplacée par la 5-HT, a été observée dans la branchie, le cœur, les muscles buccaux et dans tous les ganglions du SNC de l'aplysie. La stimulation par la 5-HT de l'adénylate cyclase a également été mesurée sur des préparations membranaires de ganglions, de muscles et de connectifs.

Kadan et Hartig (1988) prirent avantage de la sensibilité accrue de l'iode ¹²⁵ pour caractériser la distribution de récepteurs à 5-HT dans l'aplysie. Ils ont identifié une population de sites de liaison à haute affinité pour la 5-HT, marqués par le LSD-I¹²⁵, dans les ganglions de l'aplysie. Par la suite, ils se sont concentrés à déterminer la puissance de plusieurs agents pharmacologiques à déplacer la liaison de LSD-I¹²⁵ sur des sections de ganglions pédaux et abdominaux. L'ordre décroissant de puissance des ligands est: méthysergide (antagoniste 5-HT₁₋₂₋₇) > cyproheptadine (antagoniste 5-HT₁₋₂) > miansérine (antagoniste/agoniste inverse 5-HT₂) > cinansérine (antagoniste de récepteurs à 5-HT chez l'aplysie; Brunelli et al., 1976; Newlin et al., 1980) > 5-HT > kétansérine (antagoniste 5-HT₂) > bufoténine (agoniste 5-HT₁₋₂) > 8-OH-DPAT (agoniste 5-HT_{1A}). Kadan et Hartig (1988) observèrent également une diminution de la liaison de la 5-HT sur les sites LSD-I¹²⁵ suite à l'ajout de Gpp(NH)p (5'-guanylylimidodiphosphate), un analogue du GTP difficilement métabolisé, suggérant un couplage des récepteurs à 5-HT aux protéines G chez l'aplysie.

Evans et al. (1991) utilisèrent également le LSD-I¹²⁵, pour caractériser la localisation de récepteurs à 5-HT, en se concentrant principalement sur cinq neurones majeurs du quadrant gauche supérieur du ganglion abdominal (L1, L2, L3, L4 et L6). Ils

ont également déterminé les propriétés électrophysiologiques des réponses produites par ces neurones suite à l'application de 5-HT. Premièrement, du marquage intense a uniquement été observé au niveau du soma de paires de neurones symétriquement localisés dans le ganglion abdominal (L1 et R1). La liaison de LSD-I¹²⁵ est bloquée par des concentrations de 5-HT de l'ordre du micromolaire et par de plus petites concentrations d'antagonistes sérotoninergiques tels que la cyproheptadine et la miansérine, confirmant les résultats obtenus par Kadan et Hartig (1988). Deuxièmement, ils ont enregistré des réponses variées à la 5-HT dans ces cellules du quartier gauche supérieur du ganglion abdominal. Les cellules L3 et L6 montrèrent une augmentation de la conductance en K⁺ en réponse à la 5-HT qui n'est pas inhibée par la cyproheptadine ou miansérine. Les cellules L2 et L4 possèdent une réponse biphasique à la 5-HT: une augmentation dans la conductance de Na⁺, qui est inhibée par la cyproheptadine ou par la miansérine, suivie d'une conductance au Ca²⁺ voltage-dépendante qui est bloquée par le Co²⁺ et non par des antagonistes sérotoninergiques. Finalement, les cellules L1 et sa partenaire symétriquement localisée, R1, montrent en plus des réponses Na⁺ et Ca²⁺, une augmentation de la conductance en Cl⁻ qui peut être inhibée par le LSD, la cyproheptadine ou la miansérine.

1.5.4 Caractérisation moléculaire, structurale, pharmacologique et tissulaire de récepteurs à 5-HT chez l'aplysie

On ne connaît pour l'instant que la séquence de trois récepteurs à 5-HT chez l'aplysie. Li et al. (1995) furent les premiers à isoler des gènes qui codent pour des

récepteurs à 5-HT. Ils ont utilisé des oligonucléotides dégénérés, dont la séquence correspond aux acides aminés conservés dans les domaines transmembranaires six et sept chez tous les récepteurs sérotoninergiques connus, pour amplifier potentiellement de nouveaux récepteurs. De cette manière, ils ont isolé deux clones génomiques: *Ap5-HT_{B1}* et *Ap5-HT_{B2}*. Le gène *Ap5-HT_{B1}* code pour une protéine de 453 acides aminés, contenant sept passages hydrophobes membranaires potentiels, une courte troisième boucle intracellulaire et une longue queue C-terminale. Par buvardage de type Southern, les auteurs montrèrent que ce gène ne possède aucun intron. Le gène *Ap5-HT_{B2}* ne possède également aucun intron et code pour une protéine très similaire de 422 acides aminés. Si on compare la séquence en acides aminés de ces deux clones, on constate un très haut pourcentage d'identité entre ces deux séquences (90%), surtout au niveau de la séquence des domaines transmembranaires et des régions adjacentes. Fait intéressant, il est possible que d'autres récepteurs similaires soient présents dans le génome de l'aplysie puisque par analyse de buvardage de type Southern de l'ADN génomique, l'hybridation à une sonde correspondant à la région codante d'*Ap5-HT_{B1}* révéla cinq bandes distinctes. Des analyses phylogénétiques démontrèrent que les récepteurs *Ap5-HT_{B1}* et *Ap5-HT_{B2}* sont des protéines distinctes et éloignées des autres récepteurs à 5-HT connus.

Pour identifier le profil pharmacologique de ces deux récepteurs homologues, Li et al. (1995) établirent des lignées stables de cellules HEK 293 exprimant *Ap5-HT_{B1}* et *Ap5-HT_{B2}*. Ils démontrèrent dans ce système hétérologue que ces deux récepteurs, en réponse à la 5-HT, stimulaient l'activité de la PLC avec une réponse maximale à 100 nM

de 5-HT. Le EC_{50} (valeur quantitative de l'affinité du récepteur pour un ligand et de son efficacité correspondant à la concentration pour atteindre 50% de la réponse maximale) pour la 5-HT a été évalué à 1.8 nM pour le récepteur Ap5-HT_{B1} et de 1.5 nM pour le récepteur Ap5-HT_{B2}. La méthiothépine (un antagoniste non spécifique sérotoninergique) et le spiperone (antagoniste 5-HT₁₋₂) inhibent la stimulation de la PLC par la 5-HT et ce à une concentration de 10 μ M. Par contre, la cyproheptadine (10 μ M), un antagoniste 5-HT₁₋₂, n'a aucun effet.

Par des expériences de RT-PCR sur les ARNm isolés de divers tissus d'aplysie, Li et al. (1995) observèrent que l'ARNm du récepteur Ap5-HT_{B1} est exclusivement exprimé dans l'ovotestis et dans la spermathèque, alors que l'ARNm du récepteur Ap5-HT_{B2} se trouve uniquement dans le SNC. Puisque les récepteurs Ap5-HT_{B1} et Ap5-HT_{B2} possèdent des profils pharmacologiques similaires mais sont exprimés dans des tissus différents, les auteurs ont suggéré que ces deux récepteurs résultent probablement d'une duplication d'un gène ancestral, plaçant le gène sous le contrôle de promoteurs différents.

Par leurs lieux d'expression, on peut avancer les hypothèses que le récepteur Ap5-HT_{B1} est probablement important pour la modulation de la reproduction de l'aplysie et que le récepteur Ap5-HT_{B2} est essentiel pour activer les voies PLC-PKC dépendantes dans le SNC. Puisque l'activation de divers isoformes de la PKC contribue à la facilitation de la relâche de neurotransmetteurs, à la modulation des courants K^+ et à l'excitabilité neuronale, déterminer la contribution du récepteur Ap5-HT_{B2} dans la

modulation synaptique devient donc essentielle pour pouvoir comprendre comment moduler les voies PLC-PKC dépendantes (Ghirardi et al., 1992; Sossin et al., 1994; Sugita et al., 1994).¹

Un troisième récepteur à 5-HT a été cloné et caractérisé par Angers et al. (1998). À l'aide d'amorces dégénérées contenant également les séquences correspondant aux acides aminés conservés dans les domaines transmembranaires six et sept, ils ont criblé par PCR des banques d'ADNc du SNC et de rein. Ils ont isolé un ADNc codant pour une protéine de 492 acides aminés (5-HT_{ap1}) contenant sept sections constituées majoritairement d'acides aminés hydrophobes, une grande troisième boucle intracellulaire et une courte queue C-terminale, caractéristique de récepteurs de type 5-HT₁ (Boess & Martin, 1994; Gerhardt & van Heerikhuizen, 1997). Des analyses par buvardage de type Southern sur de l'ADN génomique montrèrent que le gène *5-HT_{ap1}* ne contient pas d'intron et ne possède pas d'homologue dans le génome d'aplysie. Par analyse phylogénétique, ils ont produit un dendrogramme qui place le récepteur 5-HT_{ap1} à l'intérieur du groupe primitif des récepteurs de type 5-HT_{1,5,7}. Pour démontrer que ce récepteur est bel et bien un membre de la famille des récepteurs 5-HT₁, les auteurs ont déterminé le profil pharmacologique du récepteur 5-HT_{ap1}. Pour ce faire, ils ont exprimé le récepteur, fusionné à un épitope *c-myc* à l'extrémité N-terminale, dans des cellules mammifères HEK 293. Sur des membranes plasmiques isolées provenant de ces cellules, on constate que le LSD[H³] lie de manière dose dépendante le récepteur 5-HT_{ap1} avec un K_d de 0.56 nM. L'ordre décroissant de puissance pour la compétition à la liaison au

¹ Les auteurs ont publiés en 2003 (Journal of Neuroscience, volume 23, exemplaire 11), une correction sur la nature sérotoninergique de ces récepteurs. Par conséquent, ils ne peuvent affirmer avec certitude que ces récepteurs activent la PLC suite à la liaison de 5-HT.

récepteur 5-HT_{ap1} au LSD[H³] déterminé pour plusieurs ligands sérotoninergiques est représenté dans le Tableau 1.1.

Tableau 1.1- Comparaison des affinités de plusieurs ligands à perturber la liaison du LSD[³H] sur des membranes de cellules transfectées avec l'ADNc du récepteur 5-HT_{ap1}.

Ligands	Spécificité	Ki (nM)
5-CT	agoniste 5-HT ₁	1,04
Méthiothépine	antagoniste 5-HT	2,62
PAPP	agoniste 5-HT _{1A} /antagoniste 5-HT _{1D}	9,50
5-HT		13,23
Methysergide	antagoniste 5-HT ₁₋₂₋₇	15,01
Clozapine	antagoniste 5-HT ₂	56,63
8-OH-DPAT	agoniste 5-HT _{1A}	73,96
Méteergoline	antagoniste 5-HT ₁₋₂₋₇	90,66
Yohimbine	antagoniste récepteur α ₂ -adrénergique	222,37
Mésulergine	antagoniste 5-HT ₂₋₇	245,52
Kétansérine	antagoniste 5-HT ₂	288,18
SCH 23390	antagoniste récepteur à dopamine D1	616,14
NAN 190	antagoniste 5-HT _{1A}	> 1000
Dopamine		> 1000
Spiperone	antagoniste 5-HT ₁₋₂ /récepteur à dopamine D2	> 1000
Alprénolole	antagoniste β ₁ - et β ₂ -adrénergique	> 1000

Tableau modifié de Angers et al. (1998).

L'analyse de ce profil obtenu ressemble beaucoup au profil des récepteurs 5-HT₇. L'affinité du récepteur 5-HT_{ap1} pour l'agoniste 5-CT est l'unique donnée compatible avec les récepteurs 5-HT₁. La haute affinité observée pour la 5-HT est compatible avec les niveaux caractérisés pour les récepteurs mammifères 5-HT_{1A,B,D,F} et 5-HT₇. Ces

résultats indiquent donc que le récepteur 5-HT_{ap1} est similaire aux récepteurs 5-HT₁₋₇ mammifères, sans pouvoir l'associer plus spécifiquement à l'une ou l'autre de ces sous-familles. Il n'est donc pas surprenant d'observer que dans le même système d'expression hétérologue de cellules HEK 293, l'activation du récepteur 5-HT_{ap1} par la 5-HT inhibe l'adénylate cyclase stimulée par la forskoline, et ce de manière dose dépendante. Cette inhibition est bloquée par l'antagoniste méthiothépine (100 nM). Ce résultat permet enfin d'associer clairement le récepteur 5-HT_{ap1} aux récepteurs 5-HT₁ couplés à G_i.

Pour déterminer la distribution tissulaire de la protéine 5-HT_{ap1}, Angers et al. (1998) produirent un anticorps polyclonal anti-5-HT_{ap1}, dirigé contre la troisième boucle extracellulaire. Des expériences d'immunobuvardage de type Western, réalisées sur des extraits de membranes plasmiques de plusieurs tissus, démontrèrent que ce récepteur est exprimé dans la branchie, le cœur, le canal séminifère, le rein et l'ovotestis. Également, la protéine a été retrouvée dans tous les ganglions du SNC de l'aplysie. Ces résultats furent confirmés par RT-PCR.

L'application de 5-HT a généralement été associée à une augmentation du niveau d'AMPC chez l'aplysie. Il y a quand même quelques données dans la littérature qui indiquent que la 5-HT est capable d'induire des réponses inhibitrices (Jennings et al., 1981; Frost et al., 1988; Fisher & Carew, 1993; Ram et al., 1994; Xu et al., 1995; Storozhuk & Castellucci, 1999a,b; Bristol et al., 2001). Dans tous ces cas, l'activation d'un récepteur à 5-HT couplé à G_i dans le SNC pourrait être impliquée. L'implication de ce type de récepteurs, spécialement dans leur rôle au niveau de la modulation de la

mémoire et de l'apprentissage chez les mammifères, a été documentée. Dépendamment de leur localisation cellulaire, ils peuvent inhiber l'activation électrique d'un neurone (diminuer le seuil d'excitabilité) ou diminuer la relâche de neurotransmetteurs (communément appelés autorécepteurs) (Buhot et al., 1995; Buhot, 1997). Pour l'instant, aucun lien n'a été établi entre l'activation du récepteur 5-HT_{apI} et l'inhibition de processus neuronaux chez l'aplysie. Par sa distribution et son niveau d'affinité pour la 5-HT, le récepteur 5-HT_{apI} est un candidat intéressant dans les processus de modulation des neurones sérotoninergiques, comme autorécepteurs, ou des interneurons puisque la 5-HT y tient un rôle inhibiteur dans les voies polysynaptiques (Trudeau & Castellucci, 1992; 1993).

Aucun récepteur à 5-HT couplé positivement à l'adénylate cyclase n'a encore été cloné chez l'aplysie. Cohen et al. (2003) utilisèrent récemment une approche pharmacologique pour tenter de caractériser le ou les récepteurs à 5-HT (dénommés 5-HT_{apAC}) capables d'activer l'adénylate cyclase dans le SNC de l'aplysie. Ils ont également examiné la modulation des propriétés électrophysiologiques des SNs induites par la 5-HT et dépendantes de l'AMPC. Concrètement, ils ont identifié des ligands capables d'induire une inhibition efficace de l'activation de ces récepteurs couplés à G_s. La concentration utilisée de 5-HT pour induire une activation de l'adénylate cyclase était de 25 µM (réponse presque maximale; 1 µM induisait 50% de la réponse). L'ordre décroissant des niveaux de puissance de ces divers antagonistes est répertorié dans le Tableau 1.2. De tous les antagonistes testés, la méthiothépine fut le plus efficace. Cet antagoniste inhibait spécifiquement deux aspects de l'activité neuronale 5-HT

dépendante: (1) l'augmentation de l'excitabilité et (2) l'accroissement des potentiels. Pour les auteurs, la méthiothépine devenait donc l'antagoniste de choix pour analyser le rôle de la 5-HT dans diverses formes de neuromodulation chez l'aplysie (Cohen et al., 2003).

Tableau 1.2- Antagonistes testés pour l'inhibition de la stimulation de l'adénylate cyclase dans le SNC de l'aplysie par la 5-HT.

Antagonistes	Spécificité
Méthiothépine	antagoniste 5-HT
Méteergoline	antagoniste 5-HT _{1-2,7}
Fluphénazine	antagoniste récepteurs dopamine à D1/D2
Clozapine	antagoniste 5-HT ₂
Cyproheptadine	antagoniste 5-HT _{1,2}
Risperidone	antagoniste 5-HT ₂ /antagoniste D2
Ritansérine	antagoniste 5-HT _{2A} /agoniste inverse
NAN-190	antagoniste 5-HT _{1A}
<i>Antagonistes inactifs</i>	
GR-113808	antagoniste 5-HT ₄
SB-204070	antagoniste 5-HT ₄
Olanzapine	antagoniste 5-HT _{2,6}
Ro-04-6790	antagoniste 5-HT ₆
RS-102221	antagoniste 5-HT _{2C}
Siperone	antagoniste 5-HT _{2A/1} /antagoniste D2

Adaptée de Cohen et al. (2003)

Nos connaissances actuelles sur la modulation des circuits neuronaux des réflexes et les cascades biochimiques activées par la 5-HT ne peuvent expliquer la totalité des effets que l'on observe. L'identification supplémentaire de récepteurs à 5-HT permettrait d'acquérir un spectre plus large d'outils moléculaires impliqués dans

l'activation et la modulation des voies sérotoninergiques dans la mémoire et l'apprentissage chez l'aplysie. Dans le SNC de l'aplysie, il y a plusieurs autres neurotransmetteurs qui peuvent être relâchés et venir moduler les voies sérotoninergiques dépendantes, créant un ordre de complexité des réponses pour l'instant inconnu. Par ces sites potentiels de relâche dans le SNC et par les propriétés des voies activées dans les systèmes mammifères, la dopamine (DA) est un neurotransmetteur qui pourrait avoir un rôle neuromodulateur pour l'instant peu exploré chez l'aplysie.

1.6 Dopamine

La tyrosine est l'acide aminé précurseur de trois neurotransmetteurs aminergiques possédant un noyau cathécol: la noradrénaline, l'adrénaline et la dopamine. La tyrosine est initialement transformée en DOPA (L-dihydroxyphénylalanine) par la tyrosine hydroxylase. Par la suite, la DOPA est convertie en dopamine par la DOPA décarboxylase. La DA est un neurotransmetteur prédominant dans les cerveaux mammifères où elle est essentielle dans le contrôle de plusieurs fonctions physiologiques comme les activités motrices, les émotions, les facultés cognitives et les réponses de renforcement (Missale et al., 1998).

Les neuroscientifiques se sont toujours intéressés à comprendre comment les voies dopaminergiques exercent leurs fonctions puisque un dérèglement de la

transmission dopaminergique serait à l'origine de pathologies telles le Parkinson, la schizophrénie et le syndrome de Tourette (Missale et al., 1998). Plus particulièrement, les multiples travaux concernant les rôles de la DA dans les mécanismes de renforcement et de récompense dévoilèrent l'importance de la DA dans la plasticité neuronale (Wickens et al., 2003). Au début des années cinquante, James Olds et Peter Milner ont réalisé une expérience sur le rat porteur d'une électrode implantée dans le cerveau, de sorte que les structures nerveuses pouvaient être stimulées localement à n'importe quel moment. Brièvement, le rat se déplaçait dans la cage librement et recevait une stimulation au cerveau chaque fois qu'il se retrouvait dans un endroit particulier de la cage, soit l'endroit où il pouvait appuyer sur un levier. Cette stimulation entraînait une sensation positive et donc le rat revenait rapidement à cet endroit pour recevoir cette stimulation en appuyant sur ce levier (Bear et al., 1999). C'est ainsi que l'on découvrit les procédures de renforcement du cerveau. Par la suite, plusieurs évidences pharmacologiques démontrèrent que la DA est impliquée dans l'autostimulation et les systèmes de récompense et que ces mécanismes sont à la base de la toxicomanie (Berke & Hyman, 2000). Il est intéressant de noter que les mécanismes moléculaires impliqués dans la dépendance aux drogues sont également modulés dans l'apprentissage associatif. Ces mécanismes impliquent l'activation de récepteurs dopaminergiques (Berke & Hyman, 2000).

1.6.1 Récepteurs à DA

On peut répertorier l'identification et la caractérisation de cinq sous-types de récepteurs à DA (D1-D5). L'analyse de la structure primaire de ces récepteurs révèle que ces protéines sont des membres de la famille des RCPG. L'organisation génomique des récepteurs à DA chez les mammifères supporte le concept qu'ils aient dérivé du gène ancestral en deux familles qui principalement se distinguent par leur profil pharmacologie et la présence ou l'absence d'introns: les familles D1 et D2 (Missale et al., 1998).

Les récepteurs de la grande famille D1, regroupant plus spécifiquement les récepteurs D1 et D5, sont codés par des gènes qui ne contiennent pas d'introns (Civelli et al., 1993). Normalement, on constate une queue C-terminale environ sept fois plus grande pour les récepteurs de la famille D1 que pour ceux de la famille D2. On retrouve un motif hydrophobe dans la queue C-terminale, liant la protéine DRIP78, qui permettant le transport des récepteurs D1 à la surface et donc l'exportation de la protéine du réticulum endoplasmique (Bermak et al., 2001). Vargas et von Zastrow (2004) ont démontré la présence d'un motif important pour le recyclage des récepteurs D1 à la membrane, essentiel pour prévenir le cheminement vers les lysosomes pour la dégradation, dans la portion proximale de l'extrémité carboxy-terminale. On peut également noter que ces récepteurs possèdent une courte troisième boucle intracellulaire (Civelli et al., 1993). Pharmacologiquement, on peut distinguer les récepteurs D1 et D5 (Tiberi & Caron, 1994; Jackson et al., 2000). Dans de multiples types cellulaires, les récepteurs de type D1, suite à la liaison à la dopamine, activent l'adénylate cyclase

(Missale et al., 1999). Également, les récepteurs D1 peuvent moduler le niveau de calcium intracellulaire, notamment par l'activation de la PLC suite à un couplage à G_q (Jin et al., 2001). Plus spécifiquement, le récepteur D5 possède une activité constitutive qui stimule l'adénylate cyclase sans la liaison d'un agoniste (Tiberi & Caron, 1994). Plusieurs études ont permis d'identifier des acides aminés importants pour maintenir cette activité constitutive (Charpentier et al., 1996; Iwasiow et al., 1999; Demchyshyn et al., 2000; Jackson et al., 2000)

Les récepteurs de la famille D2 (comprenant les récepteurs D2, D3 et D4) sont normalement codés par des gènes interrompus par des introns (Civelli et al., 1993). Ces récepteurs possèdent une longue troisième boucle intracellulaire ainsi qu'une courte queue C-terminale (Missale et al., 1999). Les profils pharmacologiques varient entre les récepteurs D2, D3 et D4 (Missale et al., 1999). Les récepteurs de la famille D2 sont inhibent l'adénylate cyclase. Plusieurs données indiquent que suite à l'activation des récepteurs D2, une augmentation du courant sortant potassique est observée, provoquant une hyperpolarization de la cellule. En fait, les récepteurs D2 formeraient des complexes de signalisation avec certains canaux potassiques, les GIRK ou plus spécifiquement les IRK («inward rectifier K^+ channels») (Gregerson et al., 2001; Lavine et al., 2002).

1.6.2 Mécanismes dopaminergiques et LTP

La modulation de la LTP (pour «long-term potentiation») par la DA a été étudiée dans quelques régions cérébrales mammifères comme l'hippocampe, le néocortex et le

striatum. Toutes ces régions reçoivent principalement des projections dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale et de la substance noire (Bear et al., 1999). L'étude de la LTP dans l'hippocampe, plus particulièrement dans les cellules pyramidales CA1 dont les neurones des collatérales de Schaffer forment des synapses avec ces cellules, a contribué grandement à l'élucidation des fonctions dopaminergiques (Figure 1.15A). L'utilisation d'antagonistes spécifiques aux récepteurs D1 et D5 empêcherait la maintenance de la LTP à long terme (Huang & Kandel, 1995; Swanson-Park et al., 1999). Des souris déficientes en récepteurs D1 montrent également une LTP qui décline après seulement six heures (Matthies et al., 1997). Ces travaux ne sont que quelques exemples d'études démontrant l'importance de récepteurs à DA de type D1 pour la phase tardive de la LTP (Jay, 2003). Ainsi, l'activation de récepteurs D1, agissant lors d'un signal de renforcement dans la mémoire, pourrait être importante pour déterminer si les changements synaptiques sont suffisants pour maintenir une réponse à long terme, particulièrement durant la L-LTP («late phase LTP») (Berke & Hyman, 2000).

La modulation de la LTP par la DA implique l'activation de la cascade AMPc/PKA (Figure 1.15B). La liaison de la DA au récepteur D1 active l'adénylate cyclase et provoque donc l'augmentation de la concentration d'AMPc. La PKA est ensuite activée et la libération des sous unités catalytiques actives de PKA permet la phosphorylation de cibles localisées dans divers compartiments cellulaires. Par exemple, PKA peut phosphoryler la protéine DARPP-32 («DA and cAMP-regulated phosphoprotein») et la convertir en inhibiteur de la phosphatase PP1 (Hemmings et al., 1984). L'inhibition de PP1 provoque également l'activation de la CaMKII (kinase II

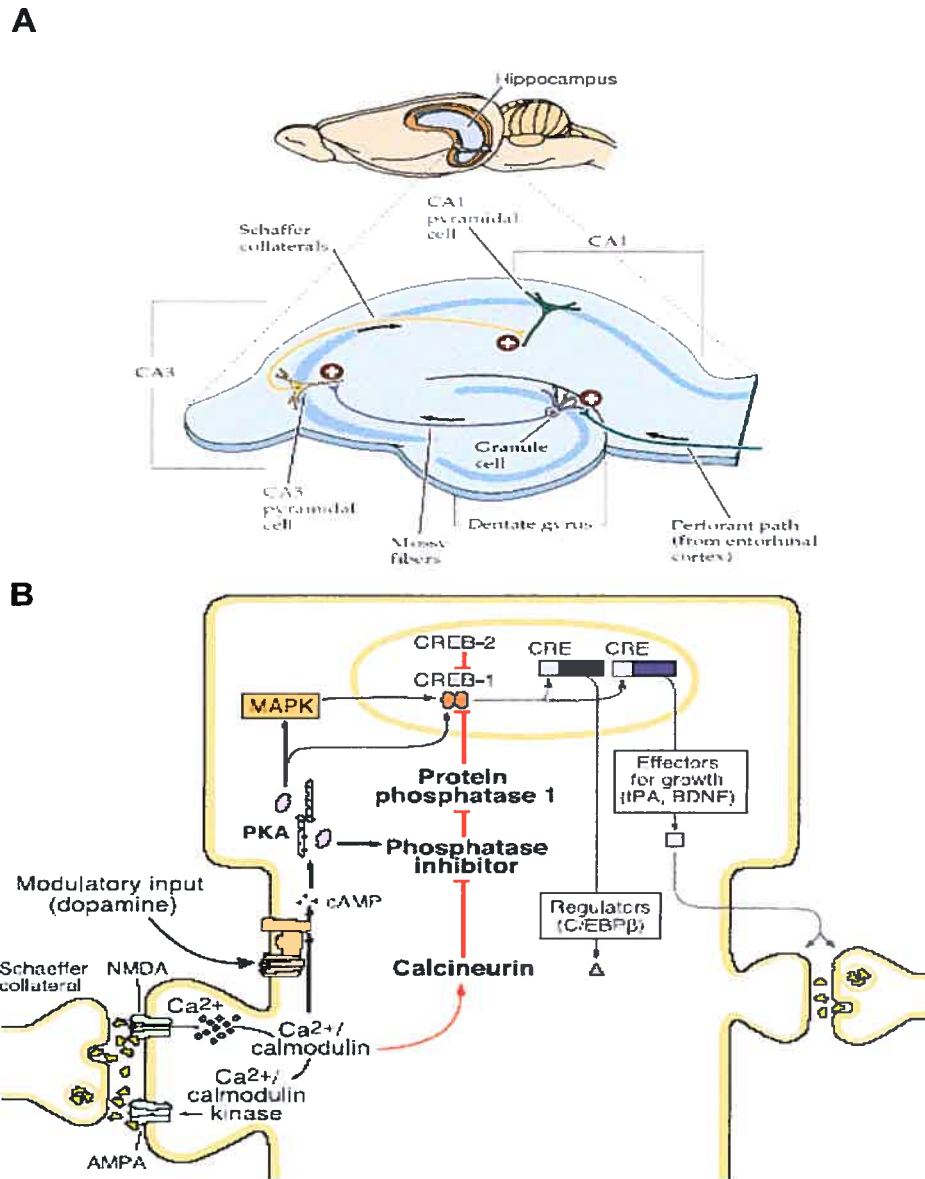


Figure 1.15- **Potentialisation à long terme dans l'hippocampe (LTP).** (A) Circuits impliqués dans la LTP de l'hippocampe de rat. La plupart des expériences utilisent les synapses des collatérales de Schaffer sur les neurones pyramidaux du champ CA1. Le sens des flèches indique le sens des afférences majeures et leur action stimulatrice (signifiée par un +). Figure tirée de Purves et al. (2001). (B) Modèle de la LTP des cellules pyramidales. La phase initiale de la LTP active des récepteurs NMDA glutamatergiques, induisant un influx de Ca^{2+} dans le neurone postsynaptique. Une induction répétée produit une L-LTP (longue LTP) dépendante de la transcription et traduction de protéines. L'activation de PKA, MAPK, CREB, suite à un signal de renforcement dopaminergique, est induite par la liaison de DA à un récepteur de type D1, stimulant l'adénylate cyclase. L'activation est indiquée par (\rightarrow) ainsi que l'inactivation par (\neg). Figure provenant de Kandel (2001).

calcium-calmoduline-dépendante), une enzyme clé dans la LTP pour l'induction et le maintien de l'efficacité de transmission synaptique durant la LTP (Blitzer et al., 1998; Lisman et al., 2002). La PKA phosphoryle également CREB pour promouvoir la transcription de gènes essentiels pour la croissance cellulaire et le maintien de la L-LTP (Jay, 2003). L'activation de PKA par les récepteurs D1 est également impliquée dans la modulation des courants induits par les récepteurs NMDA (Cepeda et al., 1998). Ainsi cette réponse synergique est modulée par des mécanismes PKA et Ca^{2+} dépendants (Wang & O'Donnel, 2001). La concentration de Ca^{2+} peut également être augmentée par un couplage à G_q du récepteur D1 (Lezcano & Bergson, 2002). L'activation de PKA durant la LTP induit également une phosphorylation des récepteurs AMPA, ce qui augmente leur expression à la surface du neurone (Lee et al., 2000a; Swayze et al., 2004).

Dépendamment de la proportion de récepteurs D1 ou D2 exprimés à la surface, on peut observer une inhibition de la LTP ou même une induction de LTD («long-term depression»). Les récepteurs D2 peuvent non seulement induire une inhibition de la réponse D1 dépendante, mais favoriser la déphosphorylation de plusieurs protéines par l'atténuation de l'action de PKA (Jay, 2003). Les récepteurs D2 peuvent également inhiber la phosphorylation des sous-unités NR1, importantes pour le fonctionnement des récepteurs NMDA. De plus, il est important de noter la présence d'une boucle négative d'action de certaines protéines pour arrêter la LTP. La PP1 est activée par la calcineurine, une phosphatase calcium/calmoduline-dépendante. La calcineurine déphosphoryle DARP-32 et bloque l'inhibition de la PP1 (Jay, 2003).

La LTP implique des changements dans la concentration de protéines synaptiques. Le marquage synaptique, telle qu'identifié chez l'aplysie, proviendrait de la modification de protéines rendant la synapse prête à procéder à des changements à long terme suite à des signaux provenant du noyau (Martin et al., 1997a). Chez les mammifères, les théories sur le renforcement de la mémoire suggèrent que suite à une action, il y a une fenêtre de temps où un marqueur peut modifier cette action après la réception d'un signal de renforcement (Houk et al., 1995; Schultz, 1998). Un mécanisme candidat qui pourrait être impliqué dans l'établissement de marqueurs synaptiques serait que la DA viendrait modifier l'expression de gènes durant le signal de renforcement (Berke & Hyman, 2000). Déterminer si la DA est également importante pour induire un signal de renforcement chez les invertébrés permettrait d'établir des modèles expérimentaux et moléculaires qui nous renseigneraient sur les liens existants avec le marquage synaptique.

1.6.3 Dopamine chez les invertébrés

L'importance de la DA et des récepteurs à DA dans le système nerveux central de divers invertébrés a depuis longtemps été reconnue (Weiss & Drummond, 1981; Sonetti et al., 1987; Walker & Holden-Dye, 1989; Ali & Orchard, 1994; Hall, 1994). Deux modèles d'invertébrés se distinguent particulièrement pour leur utilisation dans l'élucidation des systèmes dopaminergiques: *Drosophila melanogaster* (mouche à fruit) et *Caenorhabditis elegans*.

L'une des premières indications de l'importance de la DA chez la drosophile a été montrée chez les mutants *Ddc*. Ces mouches mutantes, caractérisées par des performances amoindries dans les essais de mémoire associative, possèdent une activité réduite de la DOPA décarboxylase (Tempel et al., 1984). Elles présentent une arborisation dendritique aberrante (Budnik et al., 1989). À l'aide de protocoles d'hybridation à faible astringence, les premiers récepteurs à DA chez la drosophile furent clonés: *Dmdop1* (Gotzes et al., 1994) et *dDA1* (Sugamori et al., 1995). Ces deux récepteurs sont identiques à l'exception d'une extension de 126 acides aminés retrouvée dans la portion N-terminale de *Dmdop1*. Par contre, on sait aujourd'hui que ces deux récepteurs sont dérivés du même gène, soit *DmDOP1* ou également appelé *DopR35EF* (indiquant sa position chromosomique), puisque l'extension observée proviendrait uniquement d'une substitution de nucléotides et d'insertions dans le gène *dDA1* d'une drosophile provenant d'une lignée différente (Gotzes & Baumann, 1996). Ainsi, le récepteur *DmDOP1* démontre une grande similarité au niveau de la séquence des domaines transmembranaires avec les récepteurs D1 (53,1%) et D5 (51,8%) mammifères. Il présente certaines irrégularités au niveau de l'affinité des ligands spécifiques à cette famille de récepteurs mammifères (Gotzes et al., 1994; Sugamori et al., 1995). Dans la mouche adulte, le gène est exprimé uniformément dans le SNC, chevauchant bien la distribution des fibres dopaminergiques déterminée par immunohistochimie (Blenau & Baumann, 2001). Un orthologue de ce récepteur fut également cloné chez *Apis mellifera* (abeille) (Blenau et al., 1998). Le récepteur *AmDOP1* est également couplé à G_s et présente un profil pharmacologique différent de

celui identifié pour les récepteurs de la famille des récepteurs D1 mammifères (Blenau et al., 1998). Comme les récepteurs D5 mammifères, AmDOP1 possède une activité constitutive. L'agoniste inverse *cis(Z)*-flupentixol renverse cette activité agoniste indépendante (Mustard et al., 2003).

Un second type de récepteur activateur de l'adénylate cyclase fut également identifié chez la drosophile. Encore une fois, le gène peut donner naissance à deux protéines, DAMB et DopR99B, qui se distinguent uniquement par 27 acides aminés variables dans la queue C-terminale (Feng et al., 1996; Han et al., 1996). Le récepteur DopR99B est non seulement capable d'induire une augmentation de la concentration en AMPc, mais peut produire un accroissement de la quantité de Ca^{2+} , probablement par un couplage à G_q (Feng et al., 1996; Reale et al., 1997). Leurs profils pharmacologiques diffèrent l'un de l'autre et également par rapport à ceux des récepteurs D1/D5 mammifères (Reale et al., 1997). L'ARNm de DAMB/DopR99B a été détecté dans le système nerveux central et périphérique (Han et al., 1996; Feng et al., 1996). Il est intéressant de noter que le récepteur DAMB montre un patron d'expression qui est très similaire à celle de l'adénylate cyclase Ca^{2+} -calmoduline dépendante encodée par le gène *rutabaga* (Han et al., 1992; Blenau & Baumann, 2001). Ce gène est essentiel à la formation de la mémoire à court terme (STM) puisque dans des mouches déficientes en *rutabaga*, la STM est retrouvée uniquement lorsqu'il y a expression transitoire de l'adénylate cyclase encodée (McGuire et al., 2003). Cette adénylate cyclase intégrerait les signaux cellulaires provenant de l'activation de RCPG et du complexe Ca^{2+} /calmoduline (Davis, 1993). La colocalisation de DAMB et du produit du gène

rutabaga dans les axones et la capacité de DAMB à activer l'adénylate cyclase suggèrent que ce récepteur est un excellent candidat pour induire les signaux de renforcement durant l'apprentissage associatif (Han et al., 1996). Un orthologue pour DAMB chez l'abeille a également été cloné: le récepteur AmDOP2 ou AmBAR6 (Kokay et al., 1999). Cet orthologue est positivement couplé à l'adénylate cyclase mais peu de données pharmacologiques existent concernant le niveau d'affinité et de puissance pour des ligands pharmacologiques.

Caenorhabditis elegans est un modèle qui a permis l'analyse génétique du système dopaminergique. On retrouve huit neurones sensoriels dopaminergiques dans le système nerveux central de *C. elegans* hermaphrodite (Sulston et al., 1975). Six autres neurones dopaminergiques sont retrouvés dans des structures uniques chez les mâles (Suo et al., 2004). L'application exogène de DA inhibe la locomotion, la défécation, l'absorption de nourriture et la ponte des œufs (Schafer & Kenyon, 1995; Weinshenker et al., 1995; Suo et al., 2004). Certains antagonistes D2 inhibent ces effets. Quelques mutants déficients en gènes contrôlant la synthèse et la propagation du signal de la DA (tyrosine hydroxylase, GTP cyclohydrolase, DOPA décarboxylase, transporteur vésiculaire) ont été caractérisés (Suo et al., 2004). Un nématode sauvage ralentit ses mouvements lors du contact avec une source de bactéries, ce qui permet de maximiser l'absorption en permettant à l'animal de rester près de la source de nourritures. Ces mutants montrent des problèmes lors de la détection de la nourriture et par conséquent ne ralentissent pas (Duerr et al., 1999; Sawin et al., 2000). Cette absence d'arrêt est renversée par l'application de DA dans le milieu. Un autre comportement impliquant la

dopamine est la fréquence des mouvements tournants. Un nématode va tourner en présence de nourriture, ce qui permet à l'animal d'augmenter le temps passé près des sources de nourriture et diminuer la distance de recherche. En absence de nourritures, *C. elegans* diminue significativement sa fréquence de mouvements tournants (Hills et al., 2002). Une perturbation du système dopaminergique, soit par l'ablation de neurones dopaminergiques, mutations ou par l'ajout d'antagonistes dopaminergiques, élimine la capacité de tourner en présence de nourriture (Suo et al., 2004). Finalement, un transporteur à DA a été identifié et, comme chez les mammifères, est capable d'induire une dégénérescence des neurones dopaminergiques chez *C. elegans* (Nass et al., 2002).

Jusqu'à maintenant, trois récepteurs ont été identifiés et clonés chez *C. elegans*: le récepteur DOP-1 (Suo et al., 2002; Sanyal et al., 2004), le récepteur DOP-2 (Suo et al., 2003) et le récepteur DOP-3 (Chase et al., 2004). Le récepteur DOP-1 est un récepteur de type D1 (Gotzes et al., 1994; Sugamori et al., 1995). Contrairement aux membres de la famille D1 mammifère, le gène codant pour le récepteur DOP-1 contient huit introns, produisant au moins trois isoformes issues d'épissage alternatif dans la région de la troisième boucle intracellulaire et de la queue C-terminale. En plus de stimuler l'adénylate cyclase, DOP-1 peut également faciliter l'activation de canaux potassiques de type Kir3.2 (Sanyal et al., 2004). Ce récepteur possède une activité constitutive qui est inhibée par l'agoniste inverse flupentixol en système hétérologue (Sanyal et al., 2004). Le récepteur DOP-2 est quant à lui un récepteur de type D2 (Suo et al., 2003). Le gène codant pour DOP-2 peut produire deux variants dans la longueur de leur troisième boucle intracellulaire. Le récepteur DOP-3 est également un récepteur

semblable aux récepteurs D2 mammifères (Chase et al., 2004). On ne connaît que les profils pharmacologiques des récepteurs DOP-1 et DOP-2 qui se distinguent passablement des récepteurs mammifères (Suo et al., 2004).

La perturbation de l'expression des récepteurs à DA chez le nématode a permis de mieux identifier leurs rôles. L'inhibition de l'expression de DOP-1, due à la présence d'ARN interférents, provoque un ralentissement des mouvements en général et une diminution dans la capacité du nématode à répondre à un stimulus tactile, réponse normalement contrôlée par des neurones sensoriels (Keating et al., 2003). Sanyal et al. (2004) ont isolé une lignée mutante qui a une délétion de 2.4 kb dans le gène *dop-1*. Ce mutant ne montre aucun défaut de locomotion, de ponte des œufs et de réponse induite par la nourriture. Étant donné que le récepteur DOP-1 est exprimé dans des neurones sensoriels, les auteurs ont testé si le mutant répondait différemment aux stimuli tactiles. Le mutant s'habitue plus rapidement à des stimuli. Cette habitude est renversée par l'expression de DOP-1 dans les neurones sensoriels (Sanyal et al., 2004.) Chase et al. (2004) ont plutôt généré des mutants dont les gènes *dop-1*, *dop-2* et *dop-3* étaient perturbés par délétions de séquences et/ou perturbations du cadre de lecture. Ils ont regardé et mesuré la capacité de ces divers mutants à ralentir en présence de bactéries. Seulement le mutant *dop-3* ne ralentissait pas par rapport au ver sauvage. Ce défaut pouvait être renversé par transformation avec un transgène contenant le gène *dop-3* sauvage. Un double mutant déficient en *dop-1* et *dop-3* montre des caractéristiques semblables au nématode sauvage. L'activation du récepteur DOP-1 empêche donc le contrôle du ralentissement par DOP-3 (Chase et al., 2004). L'application de DA paralyse

normalement le ver, sauf dans le cas des mutants *dop-3*. Le double mutant *dop-1* et *dop-3* est également paralysé dans ces conditions. Par conséquent, le récepteur DOP-3 est responsable de l'inhibition de la locomotion alors que le récepteur DOP-1 montre une action activatrice.

La drosophile et le nématode nous ont donc permis d'identifier non seulement des récepteurs à DA possédant des profils pharmacologiques particuliers, mais également d'en comprendre leurs rôles potentiels dans le contrôle des voies dopaminergiques. On possède encore peu de données entourant l'importance de la dopamine et plus précisément des récepteurs à DA dans la mémoire et l'apprentissage. L'aplysie présente donc un modèle intéressant pour déterminer si la dopamine est bel et bien un neurotransmetteur essentiel pour induire les signaux de renforcement durant l'apprentissage associatif.

1.6.4 Dopamine chez l'aplysie

Les premières évidences de réponses dopaminergiques chez l'aplysie furent rapportées par Gerschenfeld et Tauc (1964) qui enregistrèrent des réponses excitatrices et hyperpolarisantes suite à l'application de DA, résultats corroborés par Ascher (1972). Carpenter et al. (1971) identifièrent le contenu en DA de divers tissus chez l'aplysie. On retrouve de la DA dans tous les ganglions du système nerveux, particulièrement dans les ganglions pédaux. Puisque ces ganglions sont principalement impliqués dans le contrôle de la locomotion en général (Kandel, 1979), ces observations sont donc les premières

évidences de l'implication possible de la DA dans l'intégration des effets moteurs chez l'aplysie. Fait intéressant, l'application de DA sur certains neurones provoque des réponses biphasiques qui sont le résultat de réponses excitatrices suivies de réponses inhibitrices (Ascher, 1972). Il y aurait au moins deux récepteurs à DA différents, un pour induire la dépolarisation, un autre pour l'hyperpolarisation, tels que montré par la capacité de divers antagonistes à inhiber l'une ou l'autre de ces réponses. Pour l'instant, certaines cellules ont été bien caractérisées pour leur réponse à la DA. Des réponses excitatrices dominantes sont observées dans certaines cellules antérieures des ganglions pleuraux, dans les cellules LP1 et R2 ainsi que dans les neurones LB et LC du ganglion abdominal (Ascher, 1972). On constate des réponses inhibitrices dopaminergiques dans la majorité des cellules sensorielles classiques utilisées pour les cultures neuronales (VC, LE, rLE, RE) et les cellules RB du ganglion abdominal (Ascher, 1972; Dubuc & Castellucci, 1991). Les scientifiques se sont concentrés sur trois systèmes particuliers pour mieux comprendre la contribution des voies dopaminergiques chez l'aplysie: la cellule rythmique R15, la branchie et les circuits neuronaux impliqués dans l'ingestion de nourriture.

1.6.4.1 Cellule R15

La cellule R15 se trouve dans le ganglion abdominal, plus précisément du côté dorsal inférieur, dans le quadrant droit du ganglion, et atteignant des diamètres entre 300 à 500 μm (Winlow & Kandel, 1976) (Figure 1.8). Weinreich et al. (1972) observèrent des niveaux de DOPA décarboxylase significatifs dans R15. La caractéristique particulière de cette cellule est son activité rythmique, distinguée par des rafales de

potentiels d'action. En résumé, on remarque un regroupement de potentiels d'action suivit par une hyperpolarisation importante, créant un temps mort entre chaque rafale (Adams & Benson, 1985). L'application de 5-HT, à des concentrations de l'ordre du 10^{-5} M, provoque une hyperpolarisation persistante. La 5-HT bloque complètement la portion de regroupements de potentiels d'action (ou rafale). Cette activité modulée par la 5-HT est induite par l'AMPC, l'activation de canaux K^+ (Adams & Benson, 1985) et une augmentation d'une conductance en Cl^- (Lotshaw & Levitan, 1987). Par contre, à des concentrations de 10^{-4} M, la 5-HT dépolarise R15 (Tremblay et al., 1976). Ascher (1972) montra que la DA hyperpolarise R15, et ce pour plusieurs minutes. Cette hyperpolarisation DA dépendante désensibilise également après dix minutes d'application (Tremblay et al., 1976). Lorsque l'on mesure les paramètres d'action de la DA sur la synapse RC1-R15, l'effet est sur la terminaison présynaptique et n'implique pas l'action d'interneurones (par des expériences avec des concentrations élevées de cations divalents) (Tremblay et al., 1976). L'utilisation d'agents pharmacologiques suggère l'existence de récepteurs différents sensibles soit à la DA ou à la 5-HT (Tremblay et al., 1976). L'action de la DA s'explique par la fermeture de canaux Na^+ (Adams et al., 1980) et/ou par l'augmentation de la conductance en K^+ (Chesnoy-Marchais, 1984). On constate également une diminution de l'influx de calcium axodendritique dans R15 induite par la DA (Lewis et al., 1984). L'injection d'inhibiteurs de PKA ne renverse pas la réponse dopaminergique dans le neurone R15 (Adams & Levitan, 1982) (Levitan et Levitan (1988)). La cellule R15 représente donc un modèle intéressant pour étudier les mécanismes moléculaires responsables de l'inhibition des potentiels d'action en rafales par la DA.

1.6.4.2 Réflexe de retrait de la branchie

Le réflexe du retrait de la branchie et son habituation subséquente sont induits par la stimulation tactile répétée du siphon (Lukowiak & Peretz, 1977). Il a été démontré que la stimulation du neurone moteur L₉ de la branchie (Figure 1.8), neurone dopaminergique, est suffisante pour renverser l'habituation. La relâche de DA, entre autre par L₉, induit une augmentation dans l'amplitude du réflexe de retrait de la branchie et prévient l'habituation (Ruben & Lukowiak, 1979). La DA peut également augmenter l'efficacité de la transmission synaptique du neurone moteur L7 de la branchie (Figure 1.8) à induire la contraction de ce tissu (Ruben & Lukowiak, 1979). De faibles concentrations de DA (10^{-7} M) provoquent une contraction régulière de la branchie tandis que des concentrations supérieures entraînent une contraction tonique (Swann et al., 1982a). En présence de magnésium, bloquant les transmissions synaptiques chimiques, la DA induit quand même la contraction de la branchie, suggérant la présence de récepteurs à DA sur les muscles fibreux de ce tissu (Swann et al., 1982a). Sur des cultures primaires de fibres musculaires de la branchie dissociées de l'aplysie, la DA est également capable de provoquer une contraction de ces cellules (Cawthorpe & Lukowiak, 1990). La DA active l'adénylate cyclase dans la branchie, donc la facilitation du réflexe de retrait de la branchie par l'AMPC est consistant avec d'autres mécanismes de facilitation (Weiss & Drummond, 1981; Swann et al., 1982a; Ruben & Lukowiak, 1983).

1.6.4.3 Comportement d'alimentation

Les scientifiques commencent à mieux cerner les subtilités du conditionnement instrumental chez l'aplysie (Nargeot et al., 1997; 1999a,b,c; Brembs et al., 2002; Brembs, 2003). Les neurones clés impliqués dans les mouvements lors du comportement d'alimentation sont connus. On les retrouve dans le ganglion buccal et ils contrôlent les mouvements d'ingestion et de rejet de la radula (un organe ressemblant à une langue) dans la masse buccale (Figure 1.16A). On peut conditionner ce comportement classiquement et instrumentalement (Nargeot et al., 1997; Lechner et al., 2000a,b; Brembs et al., 2002).

Le nerf de l'œsophage En2 est essentiel durant l'alimentation de l'aplysie. Lorsque l'animal attrape et avale des algues, on peut enregistrer des bouffées de potentiels dans ce nerf (Figure 1.16B) (Brembs et al., 2002). Le nerf de l'œsophage serait important pour transmettre l'information concernant la présence de nourriture aux ganglions buccaux. Dans le but d'imiter le signal provoqué par la présence de nourriture (signal de récompense) dans une expérience de conditionnement instrumental, le nerf En2 fut stimulé *in vivo* à chaque fois que l'animal produisait un mouvement de morsure en absence de nourriture. Les stimulations conservaient le patron ressemblant à celui des activités enregistrées en présence de nourriture. Suite à ces stimulations, l'animal était capable de produire plus de morsures sans stimulation par rapport à un animal n'ayant pas reçu ces stimulations. Donc, ces stimulations correspondraient à des signaux provenant de la présence de nourriture, donc à des signaux de renforcement (Brembs et al., 2002). Ces signaux de renforcement du nerf de l'œsophage se traduisent

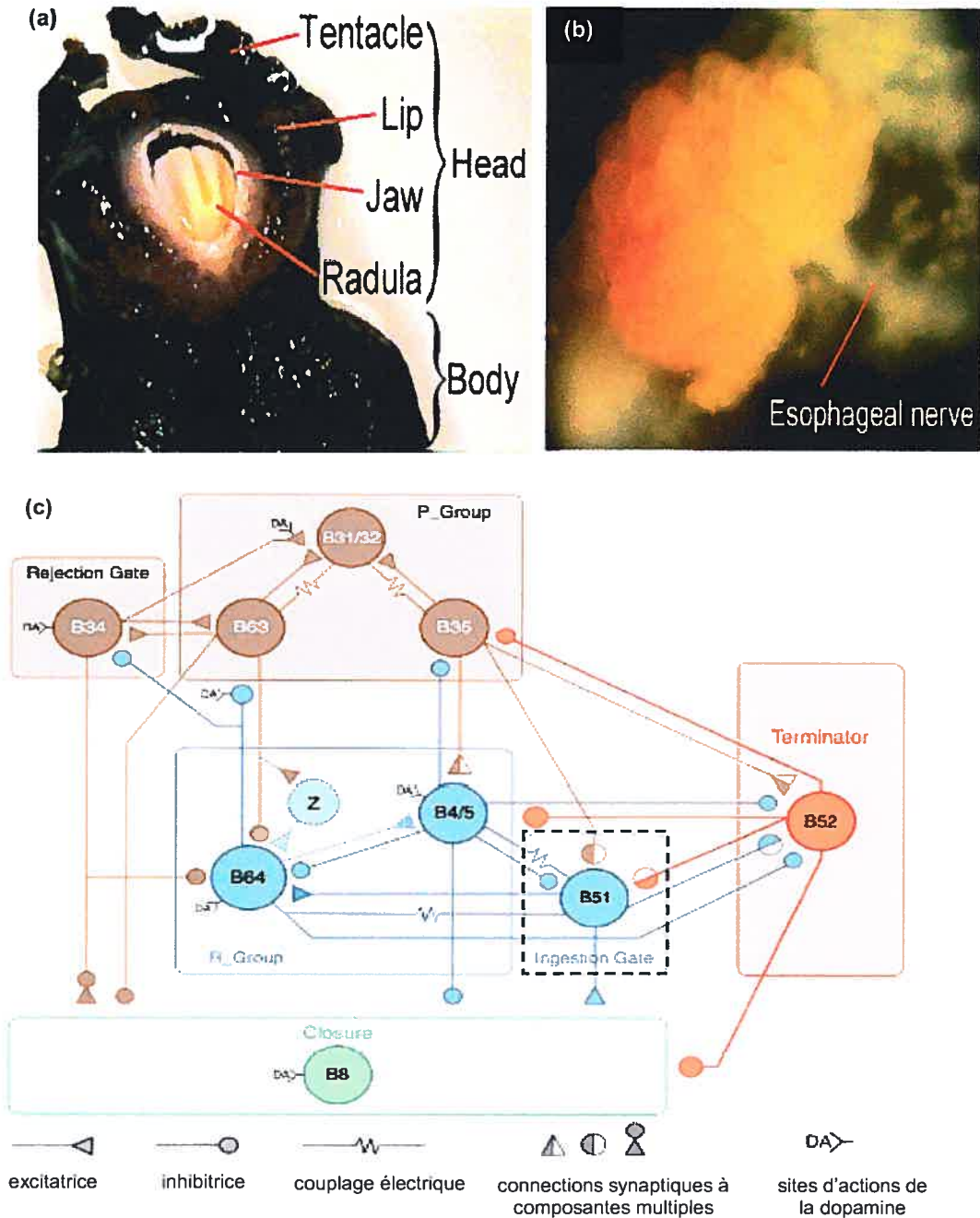


Figure 1.16- **Conditionnement instrumental chez l'aplysie.** (A) Photographie de la tête et de la bouche durant une bouchée de l'aplysie. (B) Photographie de la surface caudale du ganglion buccal où les neurones ont une coloration caractéristique orangée. Le nerf de l'œsophage En2 est aussi visible. (C) Diagramme représentant le modèle du circuit de neurones buccaux impliqués dans les mouvements de la bouche. Le neurone B51 est encadré en pointillé. Figure tirée de Brembs (2003).

par l'activité neuronale induite dans les ganglions buccaux. Dans ces ganglions, le neurone B51 est essentiel pour déterminer la nature des mouvements de la radula (mouvements de rejet ou ingestion) (Figure 1.16C).

Plusieurs évidences montrent que le neurone B51 est actif durant l'envoi de signaux de renforcement du nerf En2 et que la source de ces signaux serait la relâche de DA par le nerf de l'œsophage (Nargeot et al., 1999c). Par conséquent, B51 devient donc une cellule candidate pour recevoir les influx convergents durant le comportement instrumental et les signaux de récompenses dopaminergiques (Brembs, 2003). Suite à une expérience de conditionnement instrumental, on remarque que les propriétés biophysiques de la membrane ont été modifiées, produisant un état plus excitable (Brembs et al., 2002). En culture isolée de cellules B51, un système analogue du conditionnement instrumental, si on applique de la DA juste après la dépolarisation induite, comme lors d'un mouvement d'ingestion, on observe les mêmes changements biophysiques que ceux retrouvés durant le conditionnement instrumental (Brembs et al., 2002). La modulation de la plasticité dans B51 provoque des modifications des propriétés biophysiques des neurones du circuit pour les rendre plus activables et contribue à augmenter les mouvements d'ingestion suite à un conditionnement instrumental (Brembs, 2003). Ainsi, chez l'aplysie, on observe une convergence sur le neurone B51 entre le conditionnement instrumental et les signaux de renforcement (ou de récompense) induits par la DA.

Dans le conditionnement classique, En2 semble également important pour induire un signal de renforcement. Reyes et al. (2004) démontrèrent que la DA est également importante pour le renforcement du conditionnement classique (Nargeot et al., 1999c), et entraîne des changements *in vivo* et *in vitro* de l'activité de B51. Par contre, la DA n'a pas les mêmes effets sur les propriétés de B51 durant le conditionnement classique et instrumental. Le conditionnement classique entraîne une relâche de DA ce qui augmente le seuil d'excitabilité de B51 (Lorenzetti et al., 2004). Cette augmentation provoque un état moins excitable du neurone B51. Ainsi, l'animal ne sera pas en mesure de produire des mouvements d'ingestion aussi facilement. Il faut un stimulus conditionnel pour renverser l'état d'excitabilité de B51. Le neurone B51 devient donc une cellule sur laquelle on peut comparer directement la différence entre les mécanismes responsables du conditionnement classique et instrumental.

Il n'y a pas que le neurone B51 qui répond à la DA. Dans une préparation semi intacte de la tête de l'aplysie, Kabotyanski et al. (2000) montrèrent que l'ajout de DA dans le bain induisait des mouvements d'ingestion, suggérant que la DA module l'activité de plusieurs cellules nerveuses. Il y a au moins cinq cellules dans les ganglions buccaux et soixante-dix autres dans les ganglions cérébraux qui sont dopaminergiques. Au moins trois axones sont positifs pour la DA dans chaque connectifs entre les ganglions cérébraux et buccaux (Goldstein & Schwartz, 1989).

Certaines autres données intéressantes concernant les rôles potentiels de la DA ont été rapportées dans la littérature. Par exemple, l'infusion de DA induit une

contraction de la glande opaline. L'action de la DA n'est pas affectée par le blocage général des transmissions synaptiques au niveau de la glande, suggérant l'action directe de la DA sur les cellules musculaires entourant la glande (Tritt & Byrne, 1982). De plus, non seulement la DA induit une contraction accentuée de la glande, mais semble également avoir un effet sur le niveau de relâche d'encre (Tritt & Byrne, 1982). Le rôle de la DA au niveau de la modulation des effets moteurs chez l'aplysie a également été confirmé par Flinn et al. (2001) qui utilisèrent des antagonistes dopaminergiques pour étudier les effets du blocage de récepteurs à DA sur des comportements moteurs. Ils observèrent que l'action de l'antagoniste SCH 23390 (D1 spécifique) entraînait une augmentation de l'ouverture du parapode, du retrait du siphon et du déplacement de l'aplysie (mouvement de galop vers l'avant de l'animal). Très peu de données existent sur les effets de la DA sur les neurones sensoriels impliqués dans le réflexe de retrait du siphon ou de la queue. Billy et Walters (1989) observèrent que la DA induit une augmentation du seuil d'excitabilité des neurones sensoriels de la queue, les rendant donc moins excitables. Cet effet est en accord avec l'inhibition présynaptique causée par la DA dans les neurones sensoriels innervant le siphon (Abrams et al., 1984). On peut significativement augmenter le réflexe de retrait du siphon en utilisant des antagonistes dopaminergiques, potentiellement par facilitation des neurones sensoriels (Flinn et al., 2001). Par conséquent, la DA a un effet plutôt inhibiteur sur la facilitation, l'habituation ou sur le conditionnement classique chez l'aplysie.

À ce jour, aucun récepteur à DA n'a été identifié chez l'aplysie. Dans la littérature, il existe certaines données concernant la distribution potentielle de récepteurs

dopaminergiques. Drummond et al. (1980) utilisèrent un essai de compétition de la liaison de LSD[³H] sur divers tissus et ganglions, liaison inhibée par la DA. De manière générale, ils identifièrent des sites de liaison DA spécifiques dans tous les tissus testés (branchie, cœur, masse buccale, pied), mais c'est au niveau des ganglions du système nerveux central de l'aplysie qu'ils ont retrouvé le plus de récepteurs à DA (Drummond et al., 1980).

La seule étude faisant état de l'utilisation de plus d'un antagoniste dopaminergique fut accomplie par Chandhoke et al. (2001). Les auteurs utilisèrent des ligands radioactifs D1 (SCH 23390), D2/D3 (quinpirole) et D4 (clozapine) spécifiques. Des niveaux de liaison spécifique pour ces divers types de récepteurs, ou du moins pour ces ligands, furent mesurés (Chandhoke et al., 2001). Cette étude nous laisse donc présager l'existence potentielle de divers types de récepteurs à DA chez l'aplysie avec des profils pharmacologiques distincts.

L'analyse de la diversité des voies de signalisation activées par la DA permet de prédire le type de récepteurs à DA qui pourraient être activés. Les travaux de Weiss et Drummond (1981) permirent de démontrer la capacité de la DA à stimuler l'adénylate cyclase dans des extraits de branchie d'aplysie. Précisément, la DA augmente 3 à 5 fois l'activité de l'adénylate cyclase (EC_{50} de 10 μ M). L'utilisation d'antagonistes a permis d'observer une similitude entre ces récepteurs à DA et les récepteurs à 5-HT capables d'activer l'adénylate cyclase dans la branchie. Sasaki et Sato (1987) observèrent que l'hyperpolarisation induite par la DA dans certains neurones était non seulement

associée à un accroissement de la perméabilité au K^+ , mais que cette réponse était sensible à un traitement à la toxine de pertussis. Cette toxine provoque l'ADP-ribosylation de la sous unité $G\alpha_i$ ce qui stabilise son association aux sous-unités $G\beta\gamma$ et empêche son action inhibitrice sur la cyclase. Ainsi, on retrouve chez l'aplysie des récepteurs à DA couplés à une protéine $G\alpha_i$.

Le clonage et la caractérisation de récepteurs dopaminergiques permettra de développer des outils pharmacologiques, biochimiques et moléculaires dans l'objectif de cibler spécifiquement ces récepteurs pour déterminer les fonctions de la DA dans la mémoire et l'apprentissage chez l'aplysie.

1.7 Projet de recherche de doctorat

Notre laboratoire s'intéresse depuis plusieurs années à déterminer les mécanismes déclencheurs des modifications synaptiques à la base des phénomènes de mémoire et d'apprentissage. Nous utilisons une approche réductionniste, soit l'utilisation de l'aplysie, pour comprendre ces mécanismes par l'observation de formes simples d'apprentissage et de mémoire au niveau cellulaire et moléculaire.

La 5-HT est responsable de l'activation d'une cascade biochimique complexe qui entraîne des événements moléculaires à la base de la modification des réflexes de défense de l'aplysie suite à un processus d'apprentissage. Toutes ces modifications sont

déclenchées par la liaison de la 5-HT sur des récepteurs couplés aux protéines G. Des efforts considérables ont été entrepris pour non seulement identifier ces récepteurs mais également caractériser les mécanismes d'action de ces protéines. Malgré les données actuelles sur les éléments impliqués dans cette cascade activée par la sérotonine et la nature des récepteurs identifiés, il reste que même si l'on réduit le système à sa plus simple expression biologique, l'action de la 5-HT mobilise une réponse complexe qui ne peut s'expliquer totalement par les éléments identifiés jusqu'à ce jour. Il devient nécessaire de connaître en détail les récepteurs impliqués. Nous avons élaboré un projet de recherche nous permettant de cloner et caractériser de nouveaux récepteurs sérotoninergiques dans le SNC de l'aplysie.

Par conséquent, à l'aide d'amorces dégénérées contenant les séquences correspondant aux acides aminés conservés dans les domaines transmembranaires six et sept, nous avons criblé par PCR une banque d'ADNc du SNC pour identifier des fragments correspondant potentiellement à de nouveaux récepteurs sérotoninergiques. De cette manière, on obtient théoriquement un produit de PCR hétérogène contenant cette région correspondante de tous les récepteurs à 5-HT chez l'aplysie exprimés dans le SNC. Ainsi, nous avons cloné l'ADNc, à partir de l'un de ces fragments, d'un récepteur de type 5-HT₁, couplé négativement à l'adénylate cyclase et exprimé exclusivement dans le SNC de l'aplysie (5-HT_{ap2}). Le récepteur 5-HT_{ap2} est également capable d'activer l'adénylate cyclase. Les résultats rapportant la caractérisation moléculaire, pharmacologique et l'implication potentiel de ce récepteur dans la régulation de la ponte des œufs de l'aplysie furent publiés dans le *Journal of*

Neurochemistry en 2002 et font l'objet du second chapitre de cet ouvrage (Barbas et al., 2002).

Étant donné que nous venions d'identifier un second récepteur de type inhibiteur de l'adénylate cyclase exprimé dans le système nerveux central de l'aplysie, nous avons entrepris des travaux nous permettant de déterminer la localisation spécifique de ces deux récepteurs, soient les récepteurs 5-HT_{ap1} et 5-HT_{ap2}, dans les divers ganglions (Angers et al., 1998; Barbas et al., 2002). Par hybridation *in situ*, nous avons établi une cartographie détaillée de la localisation des ARNm codant pour ces récepteurs. Pour déterminer si l'on retrouvait ces ARNm dans des neurones sensoriels, nous avons comparé l'hybridation de ces sondes avec celle obtenue avec une sonde nous permettant d'identifier les neurones sensoriels positifs à la sensorine. Nous venons donc d'identifier la nature et la localisation des neurones exprimant l'un et/ou l'autre de ces récepteurs. Ainsi, nous croyons que ces résultats, qui font l'objet du troisième chapitre de cet ouvrage et qui furent publiés dans la revue *Journal of Comparative Neurology* (Barbas et al., 2005a), nous permettront de non seulement prédire leurs fonctions mais également d'aller modifier l'activité de ces récepteurs au niveau cellulaire pour pouvoir en déterminer leurs rôles.

À partir de nos criblages par PCR d'une banque d'ADNc du SNC avec les mêmes amorces dégénérées, préalablement utilisées dans le laboratoire pour identifier des récepteurs à 5-HT, nous avons complété le clonage d'un autre récepteur qui s'est avéré être dopaminergique. Le récepteur Ap_{dop1} est capable d'activer l'adénylate cyclase

suite à la liaison de la DA et de la 5-HT dans un système hétérologue. On remarque également une activité constitutive du récepteur. Un anticorps dirigé contre la troisième boucle extracellulaire nous a permis de confirmer une expression forte dans le SNC de l'aplysie. Par microinjection dans des neurones sensoriels, nous avons observé que l'expression de cette protéine change l'état d'excitabilité des neurones sensoriels et que le récepteur Ap_{dop1} est également capable de stimuler l'activité des neurones chez l'aplysie. Ces travaux, que l'on retrouve en détail dans le quatrième chapitre et qui ont été soumis à *Journal of Neurochemistry* (Barbas et al., 2005b), représentent la première identification d'un récepteur dopaminergique chez l'aplysie. Nous pensons que le récepteur Ap_{dop1} serait impliqué dans la modulation du conditionnement instrumental au niveau du neurone B51 et possiblement dans la modulation de l'habituation du réflexe de retrait de la branchie. De plus, l'identification de cette protéine nous permettra de pouvoir explorer le rôle de la DA comme signal de renforcement.

2

Préambule

La 5-HT est responsable de l'activation d'une cascade biochimique qui entraîne des modifications moléculaires à la base de la modulation des réflexes de défense de l'aplysie suite à un processus d'apprentissage (Barbas et al., 2003). L'activation de récepteurs sérotoninergiques joue donc un rôle d'initiateur dans les processus de mémoire et d'apprentissage chez l'aplysie. Puisque l'on ne connaît pas notamment le ou les récepteurs sérotoninergiques activateurs de l'adénylate cyclase exprimés à la surface des neurones sensoriels, nous pensons que l'évaluation de la contribution de la 5-HT dans la modulation de ces phénomènes ne peut qu'être incomplète. L'objectif de l'un de nos projets de recherche consiste à identifier les molécules essentielles dans l'activation des voies sérotoninergiques, par conséquent cloner et caractériser de nouveaux récepteurs sérotoninergiques dans le SNC de l'aplysie. Nous pourrions alors mieux comprendre comment les voies de signalisation cellulaire activées par la sérotonine interagissent pour provoquer des modifications synaptiques qui sont responsables des formes élémentaires d'apprentissage. Ces travaux furent publiés en 2002 (Barbas et al., 2002).

Functional characterization of a novel serotonin receptor (5-HT_{ap2}) expressed in the CNS of *Aplysia californica*

Demian Barbas^{1*}, Jacques P. Zappulla^{1,a*}, Stéphane Angers¹, Michel Bouvier¹, Vincent F. Castellucci^{2,3}, Luc DesGroseillers^{1,3}

¹Département de biochimie, ²Département de physiologie, ³Centre de recherches en sciences neurologiques, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7.

^aPresent address: INSERM U546, Hôpital de la Pitié Salpêtrière, 105 Boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France. *

The first two authors contributed equally to this work.

Correspondence author: Dr. Luc DesGroseillers, Département de biochimie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale "Centre-Ville", Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7, Tel: 514-343-5802, Fax: 514-343-2210, e-mail: desgros@bcm.umontreal.ca

Key words: adenylyl cyclase inhibition; *Aplysia californica*; bag cells; CNS; G-protein-coupled receptor; serotonin.

Publié dans: *J. Neurochem.* (2002) 80: 335-345.

2.1 Abstract

Serotonin has been shown to be a neuromodulator in the *Aplysia californica* CNS. The diversity of serotonin actions is due to the existence of several different receptor subtypes. In this study we report the cloning of a full length cDNA, coding for a

novel serotonin receptor (5-HT_{ap2}). The receptor protein bears the characteristics of G protein-coupled receptors. It shares 68% and 34% of its amino acid sequence identity with the 5-HT_{lym} receptor from *Lymnaea stagnalis* and the mammalian 5-HT_{1A} receptor respectively. When transfected in HEK 293 cells, 5-HT_{ap2} was negatively coupled to adenylate cyclase. Ligand binding analysis indicated that the order of potencies of various drugs for the inhibition of [³H]LSD binding was: methiothepin > metergoline > 5-CT > PAPP > 5-HT > ketanserin > NAN-190 > 8-OH-DPAT > clozapine. RT-PCR amplification of RNA isolated from different tissues indicated that this receptor is expressed in the CNS and in bag cells. The expression of 5-HT_{ap2} restricted to the CNS suggests an important role for this receptor in the modulation of neuronal functions in *Aplysia*. Moreover, the high expression of 5-HT_{ap2} in the bag cells, associated with its pharmacological profile, suggests that this receptor may be implicated in modulating the afterdischarge during the egg-laying behavior.

2.2 Introduction

Over the last 20 years, important progress has been made in understanding the cellular and molecular mechanisms underlying behavioral plasticity and learning. In these processes, the modulation of ionic conductance is mediated by the combinatorial integrated action of several neurotransmitters, among which serotonin (5-HT; 5-hydroxytryptamine) selectively regulates different neuronal systems through the

activation of distinct receptor subtypes (Cassel & Jeltsch, 1995; Gerhardt & Heerikhuizen, 1997; Buhot, 1997; Meneses, 1998; Pauwels, 2000).

In the mollusk *Aplysia californica*, 5-HT is associated with different behaviors (Hen, 1993; Walters & Ambron, 1995; Pittenger & Kandel, 1998). In this invertebrate, one of the most studied behaviors is a withdrawal reflex, where 5-HT induces short- and long-term synaptic changes in sensory neurons (for review see Glanzman, 1995; Pittenger & Kandel, 1998). Similarly, 5-HT modulates the function of peptidergic neurons involved in the reproductive behavior in *Aplysia* (Jennings et al., 1981). As observed in mammals, the stimulation of different 5-HT-receptor subtypes (Drummond et al., 1980; Kadan & Hartig, 1988; Emptage & Carew, 1993; Sun et al., 1996) leads to the production of distinct second messengers through the activation of multiple effectors such as adenylate cyclase (Bacsai et al., 1993) and phospholipase C (Ghirardi et al., 1992; Li et al., 1995). Rise in second messengers then leads to the activation of protein kinase C (Ghirardi et al., 1992; Byrne & Kandel, 1996), protein kinase A (Ghirardi et al., 1992; Bacsai et al., 1993) and mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) (Martin et al., 1997b).

Despite the crucial role of the serotonergic system in *Aplysia* behavior, little is known about the characteristics of its molecular components. In *Aplysia*, 5-HT acts on at least six different receptor subtypes to activate different postsynaptic responses (Gerschenfeld & Paupardin-Trich, 1974b; Kadan & Hartig, 1988). So far, only three 5-HT receptors have been characterized in this invertebrate. Li et al. (1995) cloned two

closely related receptors, Ap5-HT_{B1} and Ap5-HT_{B2}, that stimulates phospholipase C in response to 5-HT and are expressed in the CNS (Ap5-HT_{B2}) and in the reproductive system (Ap5-HT_{B1}). However, they could not be readily grouped within any of the mammalian subgroups based on amino acid sequence identity. The third receptor gene encoded a 5-HT₁-like receptor, negatively coupled to adenylate cyclase and is expressed in various tissues (Angers et al., 1998). However, the contribution of these receptors to the numerous physiological functions modulated by 5-HT in *Aplysia* is unknown.

In order to gain insight into the molecular characterization of other serotonergic receptors in *Aplysia*, we isolated a new 5-HT receptor (5-HT_{ap2}) with significant sequence and structural homologies with the 5-HT₁ receptor family. Transient expression in HEK 293 cells confirms this analysis, demonstrating that this receptor is negatively coupled to adenylate cyclase in response to 5-HT. Using RT-PCR, a restricted expression was detected in the central nervous system, suggesting a potential role for this protein in the modulation of synaptic connections and neuronal properties.

2.3 Materials and methods

Animals and compounds – *Aplysia californica* weighing 100-200 g were purchased from the *Aplysia* Resource Facility (Miami, FL) or from Marine Specimen Unlimited (Pacific Palisades, CA), maintained in an aerated seawater tank at 15°C and fed every day *ad libitum*. [N-methyl-³H]lysergic acid diethylamide ([³H]LSD) and [³H]adenine were

purchased from NEN (Mississauga, Ontario, Canada). ATP, cyclic AMP (cAMP), 5-carboxamidotryptamine maleate (5-CT), clozapine n-oxide, dopamine hydrochloride, forskolin, (\pm)-8-hydroxy-*dipropylaminotetralin* hydrobromide (8-OH-DPAT), 5-hydroxytryptamine (5-HT), isobutylmethoxyxanthine (IBMX), ketanserin tartrate, metergoline, methiothepin mesylate, NAN-190 hydrobromide, octopamine and *p*-aminophenethyl-*m*-trifluoromethylphenyl piperazine (PAPP) were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada).

PCR amplification and cloning of 5-HT_{ap2} cDNA - Phage DNAs (200 ng) isolated from an *Aplysia* random-primed λ GT10 CNS cDNA library was PCR-amplified for 40 cycles (94°C for 1.5 min, 40 °C for 2 min and 72 °C for 1 min) in the presence of two degenerate primers (800 ng each) corresponding to the highly conserved receptor sequences found in the sixth and seventh transmembrane (TM) domains: 5'-(G,C)IGCITT(T,C)ITIITITG(C,T)TGG(C,T)TGG(C,T)TICCITT(C,T)TT-3', and 5'-TCIGGII(A,T)(G,A)AAIATIG(T,C)(G,A)TA(G,A)ATIA(T,C)IGG(A,C)TT-3'. PCR products were fractionated on a 4% agarose gel and a 147 bp fragment (5-HT_{ap2A}) was subcloned into pCR 2.1 plasmid (Invitrogen, Carlsbad, CA) and sequenced according to the Sequenase protocol (United States Biochemical Corp.). To clone the full-length cDNA, we performed PCR-amplifications on the same phage DNAs using sense and antisense 5-HT_{ap2}-specific primer (5'-GACGAGCGGAACATTCCCATC-3' and 5'-GATGGGAATGTTCCGCTCGTC-3') and two λ GT10 specific primers (5'-AGCAAGTTCAGCCTGGTTAGTC-3' and 5'-CTTATGAGTATTTCTTCCAGGGTA-3'). The products of these PCR-amplifications (5-HT_{ap2B} and 5-HT_{ap2C}) were subcloned

into PCR 2.1 or pZAPA/TA vectors, and sequenced (Figure 2.1A). pZAPA/TA plasmid was constructed by ligating two complementary oligonucleotides (5'-AGCTTCCATGGATATCATGGCCAACAAAACCATGGG-3' and 5'-AATCCCATGGTTTTGTTGGCCATGATATCCATGGA-3') containing *XcmI* sites between the *EcoRI-HindIII* sites of pBluescript vector (Stratagene, CA). Digestion with the restriction enzyme *XcmI* produces single thymidine (T) overhangs allowing cloning of unmodified PCR products. To obtain the missing 5' end of the transcript we performed a final PCR-amplification using an antisense 5-HT_{ap2B}-specific primer (5'-CTGTTATGTCTGAATCATTGTTAGGG-3') and the λGT10 specific primer described above (5-HT_{ap2D}; Figure 2.1A). All PCR-amplifications were performed with the proofreading polymerase Vent from New England Biolabs (Mississauga, Ontario, Canada). Overlapping sequences were read from multiple clones generated from independent PCR amplifications.

Transient expression and immunofluorescence - The coding region of 5-HT_{ap2} was PCR-amplified with the Vent DNA polymerase and the primer pair 5'-CCATCGATGACGACTCCGGGACACTTAGCTC-3' and 5'-CCATGCATTTCAATCGTCACTGGTGCCC-3' (underlined: *ClaI* restriction site). The product was subcloned in pZAPA/TA vector and sequenced. The product was digested with *ClaI* and *BamHI* and subcloned in frame with the c-myc epitope in pcDNA3/RSV/MYC. The pcDNA3/RSV/MYC plasmid was previously obtained by adding the c-myc epitope EQKLISEEDLN (Degols et al., 1991, Cravchik & Matus, 1993) to the pcDNA3/RSV vector (Jockers et al., 1996). Human embryonic kidney cells

(HEK 293) and monkey kidney cells (COS-7) were transfected with the recombinant plasmid by calcium phosphate-mediated transfection. Cells were collected 48 hours post-transfection for functional assays.

For immunofluorescence, COS-7 cells transiently expressing 5-HT_{ap2} were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 15 min at room temperature. The cells were then blocked with 1% BSA in PBS. Cells were incubated with the anti-myc 9E10 monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA), or with a rabbit anti-calnexin antibody (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) for 1 h at room temperature in PBS containing 0.1% bovine serum albumin (BSA). For intracellular labeling, cells were permeabilized with 0.3% Triton X-100 in PBS containing 0.1% BSA. Cells were washed in permeabilization buffer and incubated with Texas red-conjugated species-specific secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Pa.) in blocking buffer for 1 h. Mounting was done in ImmunoFluor mounting medium (ICN, Costa Mesa, CA). Cells were visualized by immunofluorescence, using 63X plan Apochromat objective of a Zeiss Axioskop fluorescence microscope.

Ligand binding analysis - Membranes were prepared from 5-HT_{ap2} transfected HEK 293 cells as described by Hebert *et al.* (1996). Membranes were resuspended in 75 mM Tris pH 7.4, 5 mM MgCl₂ and 2 mM EDTA buffer. For saturation experiments, 25 µg of membrane proteins were incubated in duplicate with increasing concentrations of [³H]LSD (71.5 Ci/mmol) for 60 minutes at room temperature in a total volume of 500 µl. Non-specific binding was defined in the presence of 10 µM of methiothepin.

Competition binding assays were done in duplicate with 25 µg of membrane proteins, in the presence of increasing concentrations of competing agents (10^{-13} M to 10^{-4} M) and 4 nM of [3 H]LSD for 60 min at room temperature. All assays were terminated by rapid filtration over Whatman GF/C glass fiber filters (Xymotech Biosystems, Mt. Royal, Qc.) and rinsed three times with 50 mM Tris pH 7.4. The amount of bound [3 H]LSD was determined by scintillation spectrophotometry (Wallac 1409 liquid scintillation counter).

cAMP accumulation - The cAMP content was measured by the pre-labeling technique, as described by Ansanay et al. (1992). Cells were incubated with 2 µCi/ml [3 H]adenine overnight. 5×10^5 cells per point were then washed and incubated with 2.5 mM IBMX, 1 µM forskolin and the indicated drugs in a final volume of 300 µl PBS for 20 min at 37°C. The reaction was stopped by aspiration of the medium and addition of 500 µl of ice-cold 5% trichloroacetic acid. A 100 µl solution of carrier (5mM ATP and 5mM cAMP) was added to the mixture. Cellular proteins were centrifuged at 5000Xg. [3 H]ATP and [3 H]cAMP were then separated by sequential chromatography on Dowex and alumina columns (Bio-Rad, Mississauga, Ontario, Canada) (Salomon et al., 1974). Total cAMP accumulation was measured by assessing the transformation: $[\text{}^3\text{H}]\text{cAMP}/([\text{}^3\text{H}]\text{ATP} + [\text{}^3\text{H}]\text{cAMP}) \times 1000$.

Tissue distribution studies - Total RNA extracted from the CNS, kidney, gill, ovotestis, buccal mass, heart, ganglia of the nervous system and the bag cells were purified using RNeasy Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions, reverse transcribed, and PCR amplified with the OneStep RT-PCR Kit (Qiagen) for 35 cycles

(94°C for 1 min, 54°C for 1 min and 72°C for 1.5 min) with the primer pair 5'-TCTTATCTGCTGGCTACCC-3' and 5'-TTCAGCGTGTTCCTTACGTC-3' (nucleotides 1616-1864). The PCR products were fractionated on a 2% agarose gel. As positive control, we used actin primers as described in DesGroseillers et al. (1994).

Afterdischarge measurements - All experiments were performed at room temperature (22°C) on isolated abdominal ganglia. Before dissection, the animals were anesthetized with the injection of an isotonic MgCl₂ solution (385 mM) corresponding to approximately a third of their volume. Dissection of the abdominal ganglia was performed in a cold (4°C) extracellular medium made from equal volumes of 385 mM MgCl₂ and artificial sea water (ASW; NaCl 460 mM, KCl 10 mM, CaCl₂ 11 mM, MgCl₂ 55 mM and HEPES buffer 10 mM pH 7.6). Both pleuro-abdominal connectives were cut close to the pleural ganglion. The ganglia were pinned to the bottom of a Sylgard-coated chamber (3 ml volume) filled with 2 ml ASW. The right connective (approximately 2 mm) was aspirated into a suction electrode for stimulation. All preparations were rested under constant superfusion of ASW for one hour; this rest period was followed by an additional rest of 30 min. The bag cell afterdischarge was initiated by electrical stimulation of the right connective (15 s pulse train at 6Hz, 23 V, 2.5 ms duration) and recorded with an extracellular electrode placed over the right bag cell cluster. The afterdischarge was monitored with a chart recorder at 5 mm/s (initial part of the afterdischarge) and 1 mm/s (later part). 5-HT and 5-CT were added to the bath 2 min 45 s after the end of connective stimulation (3 min after its beginning). The drugs were added directly to a static bath (2 ml volume) to obtain a final desired

concentration of 1 μM . We used separate preparations to evaluate the various treatments because a second bag cell afterdischarge is generally difficult to obtain from a single preparation within a single day (Kaczmarek et al., 1978).

2.4 Results

2.4.1 Cloning and structural characteristics of 5-HT_{ap2}

Using degenerate primers based on the peptidic sequences of the sixth and the seventh transmembrane domains of serotonergic G protein-coupled receptors (GTP binding protein; GPCR), and cDNAs derived from an *Aplysia* λGT10 CNS library, a fragment of 147 bp was amplified, cloned and sequenced. In order to clone the complete cDNA sequence, we used nested oligonucleotides derived from the cloned cDNA fragment (5-HT_{ap2A}) and primers derived from the λGT10 vector sequence. Three overlapping clones (5-HT_{ap2B}, 5-HT_{ap2C} and 5-HT_{ap2D}) covering 1876 bp of the 5-HT_{ap2} sequence were amplified and cloned (Figure 2.1A). The 1876 bp reconstituted cDNA contains an open reading frame encoding a protein of 567 amino acids with a predicted molecular mass of 63 kDa (Figure 2.1B).

Hydrophobicity analysis of the deduced protein reveals the presence of seven transmembrane domains characteristic of GPCRs (data not shown). The 5-HT_{ap2} protein displays several key features common to mammalian and invertebrate serotonin

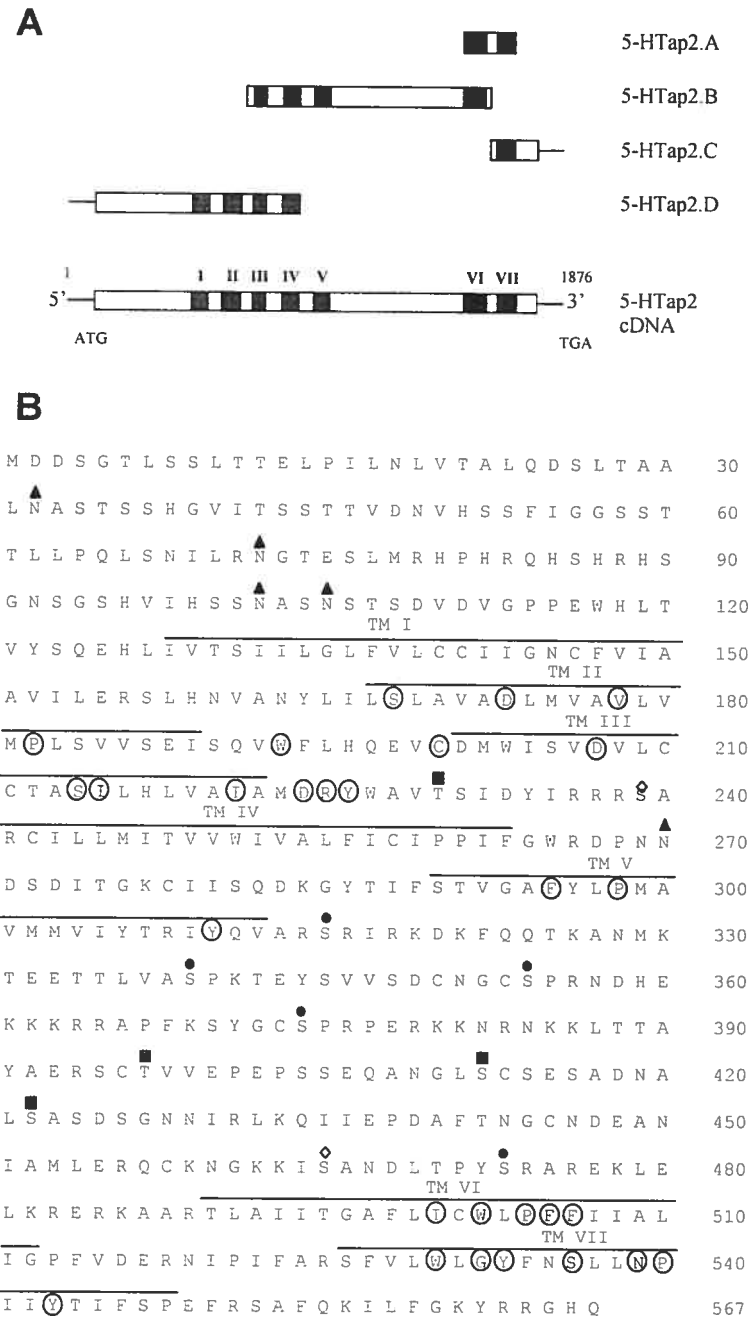


Figure 2.1- Molecular cloning of the 5-HT_{ap2} receptor cDNA. (A) Schematic representation of the cloned 5-HT_{ap2} cDNA. Four overlapping cDNA fragments (5-HT_{ap2A} to 5-HT_{ap2D}) were PCR-amplified from DNA isolated from a CNS cDNA library, using degenerate and nested primers. The reconstituted full-length cDNA is schematized at the bottom. The open reading frame is represented by boxes, the putative transmembrane domains by black boxes, and the 5' and 3' untranslated regions by lines. (B) Amino acid sequence of the 5-HT_{ap2} receptor. Amino acids are given in single letter code. Amino acids that are conserved among 5-HT receptors are circled. Potential N-linked glycosylation sites (▲) and consensus sites for phosphorylation by protein kinase A (PKA) (◇), protein kinase C (PKC) (●) and casein kinase II (CKII) (■) are indicated. Transmembrane domains (TM I to TM VII) are indicated. The nucleotide sequence for 5-HT_{ap2} has been deposited into the GenBank database and is available under accession number AF372526.

receptors. In particular, Asp¹⁷³ residue in TM-II, the tripeptide DRY (Asp²²⁴-Arg²²⁵-Tyr²²⁶) at the interface of TM-III and the second intracellular loop, and the NPXXY motif (Asn⁵³⁹-Pro⁵⁴⁰-Tyr⁵⁴³) in TM-VII are conserved. These residues were shown to be important for receptor activation in members of the subfamily 1A of GPCRs (Boess & Martin, 1994; Oliveira et al., 1994; Boackert & Pin, 1999). Others amino acids that are conserved in all known G protein-coupled 5-HT receptors were also found (Figure 2.1B).

5-HT_{ap2} may potentially undergo several post-translational modifications (Figure 2.1B): (i) N-glycosylation in the extracellular amino part and in the second extracellular loop; (ii) phosphorylation by protein kinase A, protein kinase C or casein kinase II. No cysteine residues are present within the C-terminal loop, suggesting that this receptor is not palmitoylated. Its large third cytoplasmic loop and its short carboxy tail are reminiscent of members of vertebrate 5-HT₁ receptor family (Boess & Martin, 1994) (Figure 2.1B). Amino acid sequence comparisons between the 5-HT_{ap2} receptor and other 5-HT receptors show significant sequence identity to the 5-HT₁-like receptors (Figure 2.2A), and a dendrogram analysis places 5-HT_{ap2} within the family of mammalian 5-HT₁ receptors (Figure 2.2B).

A Southern blot analysis of genomic DNA reveals that the *5-HT_{ap2}* gene is probably intronless and does not have a close homolog in the *Aplysia* genome. Indeed, a single band was observed when the restriction enzymes used to digest the DNA do not cut in the region covered by the probe, and two bands are present when the restriction

sites are present in the probe sequence (Figure 2.3). Similar results were described for the 5-HT₁-like *Aplysia* receptor 5-HT_{ap1} (Angers et al., 1998), and this genomic organization seems to be a common feature of several genes of the 5-HT₁ subfamily (Gerhardt & van Heerikhuizen, 1997).

2.4.2 Transient expression of 5-HT_{ap2} in HEK 293 and COS-7 cells

The cDNA encoding the 5-HT_{ap2} receptor was inserted in an expression vector in fusion with a c-myc epitope at its NH₂ terminus. The resulting recombinant protein was transiently expressed in HEK 293 cells. Expression of the receptor was monitored with an anti-myc monoclonal antibody. In the immunoblot, a band with an apparent molecular weight of 63 kDa was detected (Figure 2.4A). The size of this band corresponds to the predicted molecular weight of the 5-HT_{ap2} receptor monomer. Bands of higher molecular weight were also detected. These bands may represent oligomers, as oligomerization of serotonin receptors have recently been reported (Lee et al., 2000b).

To confirm that the 5-HT_{ap2} receptor is expressed at the cell-surface, the myc-tagged protein was transiently expressed in COS-7 cells. Immunofluorescence analysis of non-permeabilized cells showed that the 5-HT_{ap2} receptor is expressed at the cell surface of COS-7 cells (Figure 2.4B-1). In the same conditions, immunofluorescence signal was not detected with the anti-calnexin antibody, a specific marker of the rough endoplasmic reticulum (Figure 2.4B-3). Upon cell-permeabilization, calnexin was detected within the expected cellular compartment (Figure 2.4B-4).

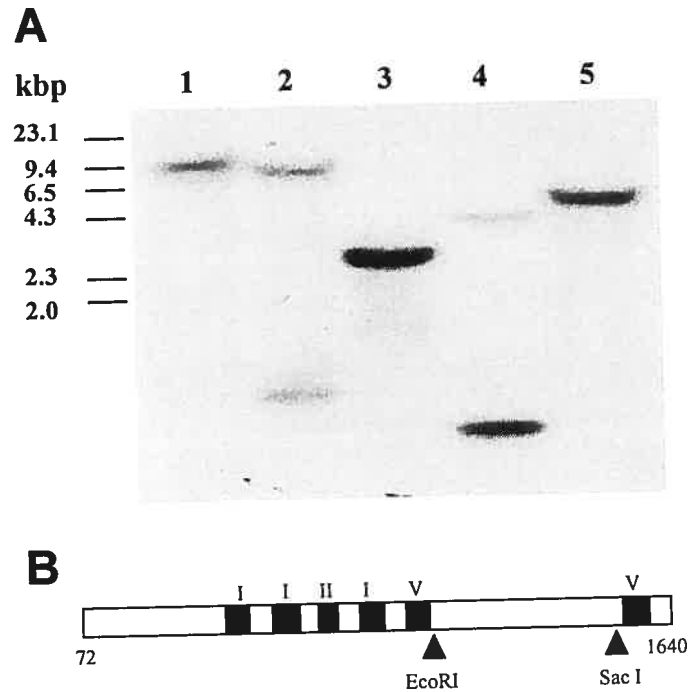


Figure 2.3- **Genomic organization of the 5-HT_{ap2} gene.** (A) Southern blot analysis of the 5-HT_{ap2} gene. Genomic DNA was isolated from ovotestis and digested with either *Xba*I (lane 1), *Sac*I (lane 2), *Hind*III (lane 3), *Eco*RI (lane 4) or *Bgl*II (lane 5). Digested DNA (10 µg/lane) was run on a 0.8% agarose gel, transferred to a nitrocellulose membrane, and hybridized at high stringency with the [³²P]-labeled fragment as previously described (Wickham and DesGroseillers, 1991). DNA molecular weight markers are indicated in kilobase pairs (kbp) on the left. (B) [³²P]-labeled 5-HT_{ap2} fragment representation. [³²P]-labeled 5-HT_{ap2} fragment (nucleotides 72-1640) was used as a probe. *Xba*I, *Hind*III and *Bgl*II sites are not present in the probe sequence whereas *Sac*I and *Eco*RI appear once. Positions of *Eco*RI and *Sac*I restriction sites are indicated by (▲).

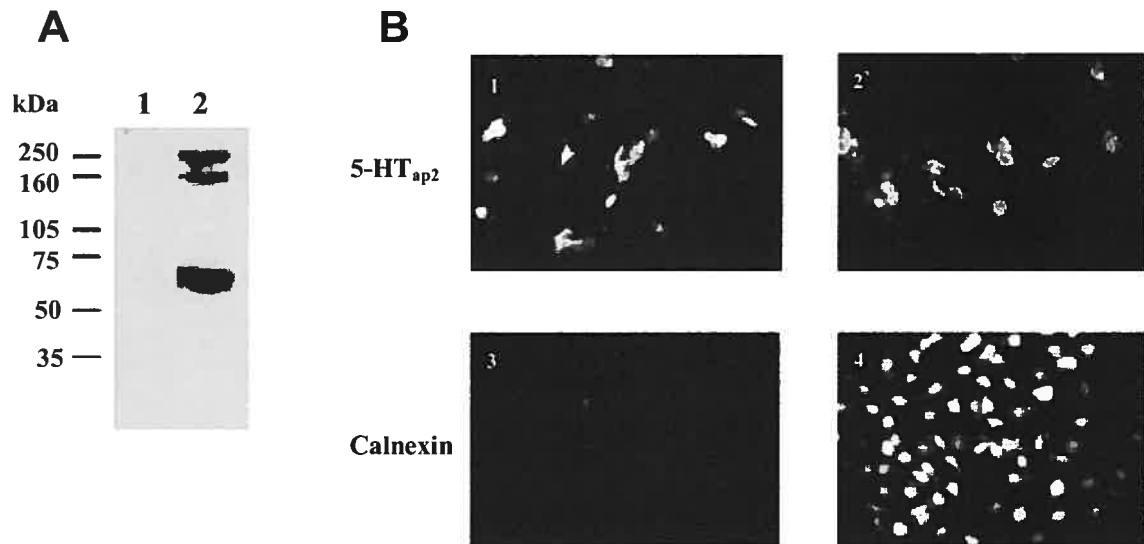


Figure 2.4- **Transient expression of 5HT_{ap2} at the cell-surface.** A- Western blot analysis of 5HT_{ap2} in transiently transfected HEK 293 cells. Total protein extract (50 μ g) prepared from membranes of transiently transfected HEK 293 cells with cDNA myc-tagged coding for 5-HT_{ap2} receptor (lane 2), was separated on a 8% SDS-polyacrylamide gel under non-reducing conditions, blotted, and detected with an anti-myc antibody. Cells transfected with pCDNA3/RSV vector clone (lane 1) were used as control. Molecular weight marker positions are indicated in kilodaltons. B- Membrane localization of 5-HT_{ap2} in transiently transfected COS-7 cells. COS-7 cells were transfected with a cDNA coding for a myc-tagged 5-HT_{ap2} protein. These cells were labelled with anti-myc (1, 2) or anti-calnexin (3, 4) antibodies, before (1, 3) or after (2, 4) permeabilization with Triton X-100.

2.4.3 Pharmacological characterization

To determine whether the 5-HT_{ap2} cDNA encoded a functional receptor, we isolated membranes from HEK 293 cells in which we transiently expressed the 5-HT_{ap2} receptor. Membranes bound [³H]LSD in a saturable and dose-dependent manner with an estimated K_d of 4.37 nM (Fig.2.5A). No binding was observed on membranes from cells transfected with the pCDNA3/RSV vector (data not shown).

We next tested the ability of various serotonergic agonists and antagonists to displace [³H]LSD from HEK 293 cells in which we transiently expressed the 5-HT_{ap2} receptor. The rank order of affinity of these drugs is listed in Table 2.1, and illustrated in Figure 2.5B. As expected, 5-HT displayed a higher affinity for the receptor than dopamine and octopamine. Except for 5-HT, clozapine and ketanserin, the pharmacological profile of 5-HT_{ap2} is similar to the one reported for the 5-HT_{1ym} receptor (Table 2.1) (Sugamori et al., 1993).

2.4.4 5-HT_{ap2} signaling

In order to test whether the 5-HT_{ap2} receptor is a new member of the 5-HT₁ receptor family, we measured the variations in the [³H]cAMP level following 5-HT application. In transiently transfected cells, we did not detect an increase in the level of cAMP in response to serotonin (data not shown). This was expected since the molecular structure and pharmacological profile of the 5-HT_{ap2} receptor suggested that it is coupled

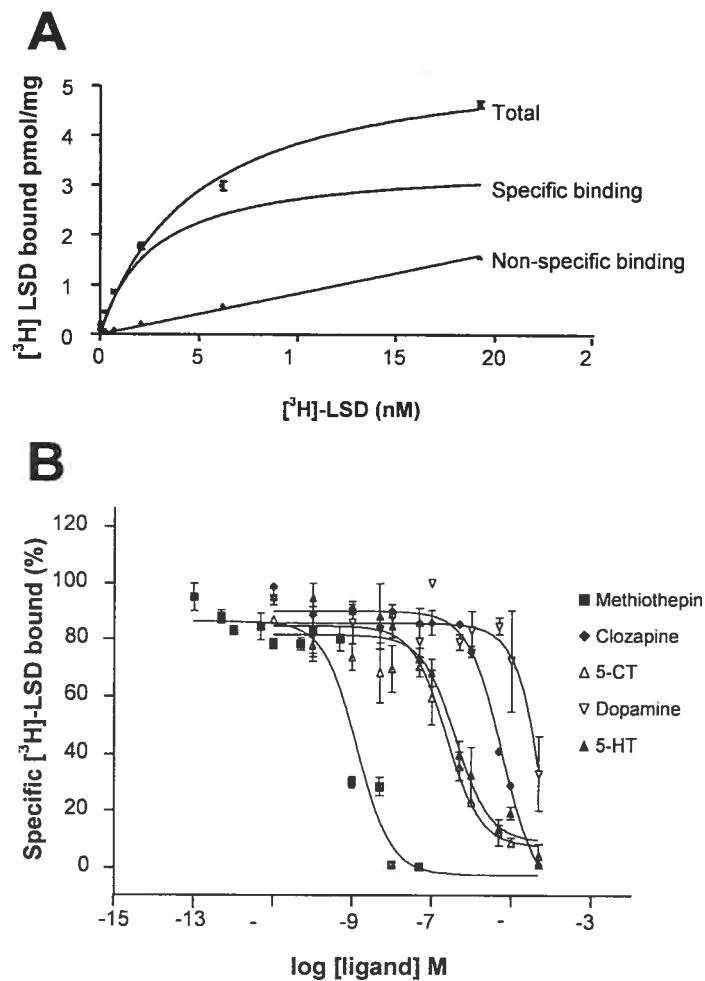


Figure 2.5- **Binding studies of radiolabelled LSD to 5HT_{ap2} in membranes of transfected HEK 293 cells.** (A) Saturation of specific [³H]LSD binding to 5-HT_{ap2}. Membranes harvested from transiently expressing 5-HT_{ap2} cells were incubated with increasing concentrations of [³H]LSD for 60 minutes at room temperature. Non-specific binding was defined in the presence of 10 μM of unlabelled methiothepin. Results are representative of one of three independent experiments. (B) Competition binding assays for 5-HT_{ap2}. Membranes from transiently expressing 5-HT_{ap2} cells were incubated with 4 nM of [³H]LSD in the presence of increasing concentrations of unlabelled competitors. Results at each concentration are presented as a percentage of the specific binding in the absence of the competitor. Data are representative of three independent experiments with each point measured in duplicate and were analyzed by a computer-assisted nonlinear analysis (GraphPad PRISM 3.0).

Table 2.1- Comparison of the affinities of various compounds that compete with the binding of [³H]LSD to the membranes of cells transfected with the 5-HT_{ap2}, 5HT_{ap1} and 5-HT_{lym} cDNA.

Drug	Ki (nM)		
	5-HT _{ap2}	5-HT _{ap1} ^a	5-HT _{lym} ^b
Methiothepin	0.3	2.62	0.1
Metergoline	36	90.66	55
5-CT	162	1.04	282
PAPP	182	9.50	410
5-HT	241	13.23	1562
Ketanserin	561	288.18	2554
NAN-190	1030	>1000	732
8-OH-DPAT	2089	73.96	1100
Clozapine	2124	56.63	12
Dopamine	>10000	>1000	9130

Estimated affinities are given as K_i values in nanomolar concentrations and were determined by a computer-assisted nonlinear curve analysis (GraphPad PRISM 3.0 computer program). K_i values for 5-HT_{ap2} receptor are expressed as the mean of three different determinations. ^aRetrieved from Angers et al. (1998); ^bretrieved from Sugamori et al. (1993).

to G_i, and therefore inhibits adenylate cyclase. To confirm this hypothesis, we first stimulated adenylate cyclase with forskolin and then measured the level of cAMP following 5-HT application. In these conditions, forskolin-induced cAMP accumulation was efficiently inhibited by 5-HT (Figure 2.6). The same result was obtained with the agonist 5-CT. This effect was dose dependent and saturable, the potencies for 5-HT and 5-CT being consistent with their respective rank of affinities for inhibition of [³H]LSD binding (Table 2.1). In addition, 5-HT produced no inhibition of cAMP accumulation

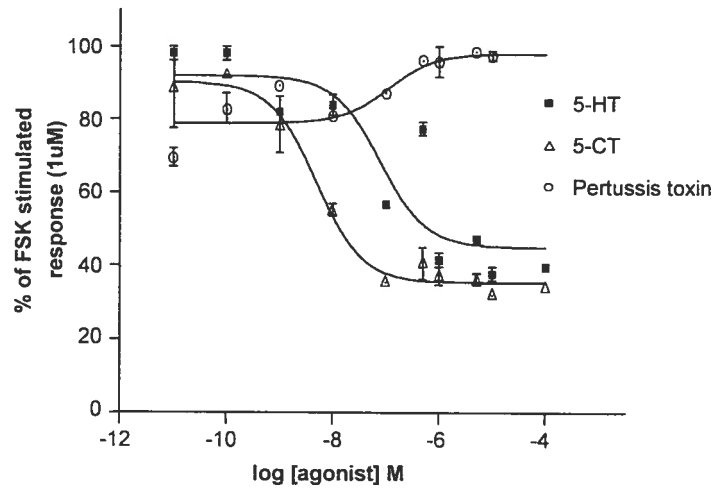


Figure 2.6- **Stimulation of 5-HT_{ap2} by 5-HT and 5-CT decreases the level of intracellular cAMP.** cAMP levels are expressed as a percentage of the value obtained with 1 μM forskolin (100%) in the absence of 5-HT or agonists. Pertussis toxin was added 14 h before the experiment in the presence of increasing concentration of 5-HT. The values are the mean of an experiment done in triplicate and are representative of three such experiments. Data were analyzed by a computer-assisted nonlinear analysis (GraphPad PRISM 3.0).

in the presence of 1 nM of the antagonist methiothepin (data not shown). Pertussis toxin, a known Gi-protein inhibitor, at a concentration of 50 ng/ml, completely blocked the effect of 5-HT, indicating that 5-HT_{ap2} receptor interacts with a pertussis toxin sensitive G protein. Interestingly, treatment with pertussis toxin not only inhibits Gi-dependent decrease of cAMP level but also seems to unveil a functional coupling between 5-HT_{ap2} and Gs-protein that produces an increase in the cAMP level (Figure 2.6). Examples of such dual coupling to Gs and Gi pathways have been reported (Eason & Liggett, 1995; Xiao et al., 1995). As a control, increasing concentration of 5-HT had no effect on cAMP levels in untransfected HEK cells treated with forskolin (data not shown). These experiments demonstrate that activation of 5-HT_{ap2} receptor inhibits adenylate cyclase and cAMP accumulation through its functional coupling to a mammalian Gi protein in HEK 293 cells. In addition, under certain physiological circumstances, 5-HT_{ap2} might also be coupled to Gs and increase cAMP level.

2.4.5 Tissue distribution of 5-HT_{ap2} transcripts in *Aplysia*

To determine the presence of the 5-HT_{ap2} mRNA in various tissues of *Aplysia*, we used a RT-PCR-based screening strategy on total RNA isolated from the *Aplysia* CNS, kidney, ovotestis, gill, buccal mass and heart. Using 5-HT_{ap2}-specific primers, a 248 nt fragment was PCR-amplified only in the CNS (Figure 2.7A). In this tissue, the 5-HT_{ap2} mRNA could be detected in the abdominal ganglion (without the bag cells), in the bag cells and also weakly in the cerebral and pleural-pedal ganglia (Figure 2.7B). Expression was confirmed by Southern blotting and hybridization with a 5-HT_{ap2}-

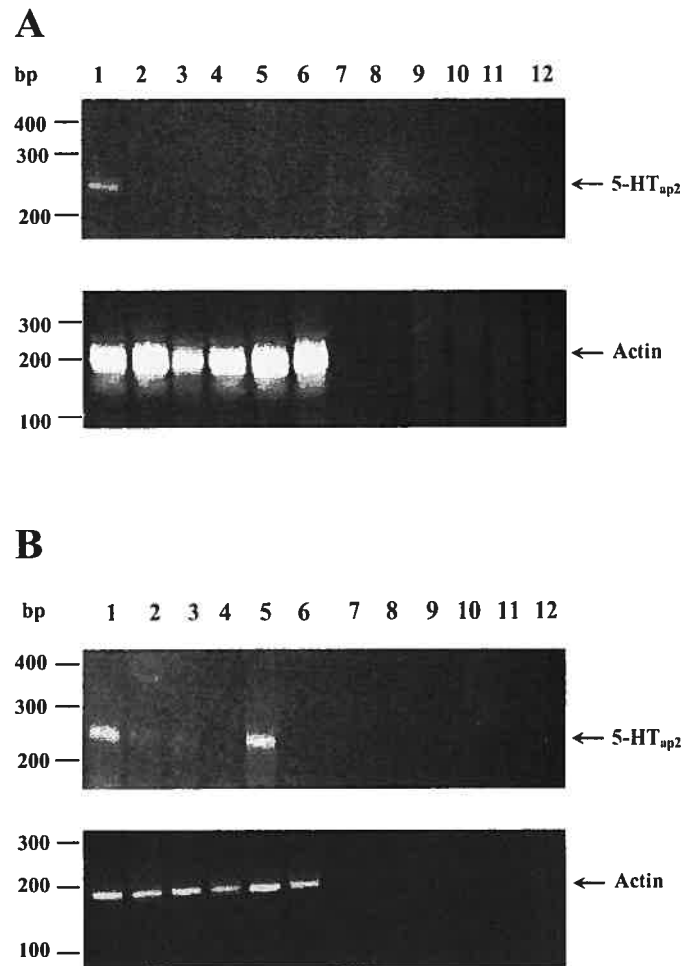


Figure 2.7- **Tissue distribution of 5-HT_{ap2} mRNA in *Aplysia*.** A – Upper panel: RT-PCR amplification of 5-HT_{ap2} from total RNA isolated from the CNS (lanes 1,7), kidney (lanes 2,8), gill (lanes 3,9), ovotestis (lanes 4,10), buccal mass (lanes 5,11) and heart (lanes 6,12). The PCR products were visualized by ethidium bromide staining after separation on a 2% agarose gel. Lower panel: PCR amplification of a control gene (actin). Lanes 7 to12: controls without reverse transcription. B – Upper panel: RT-PCR amplification of 5-HT_{ap2} from total RNA isolated from the abdominal ganglion (lanes 1,7), cerebral ganglion (lanes 2,8), pooled pleural and pedal ganglia (lanes 3,9), buccal ganglion (lanes 4,10), bag cells (lanes 5,11) and buccal mass (lanes 6,12). The PCR products were visualized by ethidium bromide staining after separation on a 2% agarose gel. Lower panel: amplification of a control gene (actin). Lanes 7 to12: controls without reverse transcription.

specific oligonucleotide (data not shown).

2.4.6 5-HT application inhibits afterdischarge in the bag cells

Since 5-HT_{ap2} is expressed in bag cells, we tested its possible involvement in the regulation of the afterdischarge by focusing on the effect of two drugs selected for their high affinity for 5-HT_{ap2}: the agonist 5-CT and the antagonist methiothepin. The afterdischarges were initiated by the electrical stimulation of the right connective. After application of 1 μ M of 5-HT, we observed a rapid decrease in the number of spikes per minute (Figure 2.8A), reflecting afterdischarge inhibition. The same effect can be obtained by application of the agonist 5-CT (1 μ M). By contrast, pre-treatment of the ganglia with 1 μ M of the antagonist methiothepin inhibited the effect of 5-HT on the bag cell afterdischarge (Figure 2.8A). The total duration of the afterdischarge in the control group ranged from 9.5 to 50 min with a median of 13.3 min (mean 21.23 ± 9.64 , $n=5$) (Figure 2.8B). The afterdischarge was significantly shorter in the groups treated with 5-HT and 5-CT. The median duration was 5.5min (range 3.85 to 5.9, mean= 5.18 ± 0.456 , $n=4$) and 5.72min (range 4.33 to 9.18, mean= 6.81 ± 0.94 , $n=5$), respectively. When the ganglia were pretreated with the antagonist methiothepin (1 μ M), the application of 5-HT had little effect. The median duration was 11.05min (mean 11.67 ± 2.267 , $n=4$). Because of the demonstrated affinity of the drugs for 5-HT_{ap2}, and since 5-HT_{ap2} is present in the bag cells, these results can be interpreted as an indication that the cloned receptor may mediate the inhibition of afterdischarge by 5-HT in the bag cells.

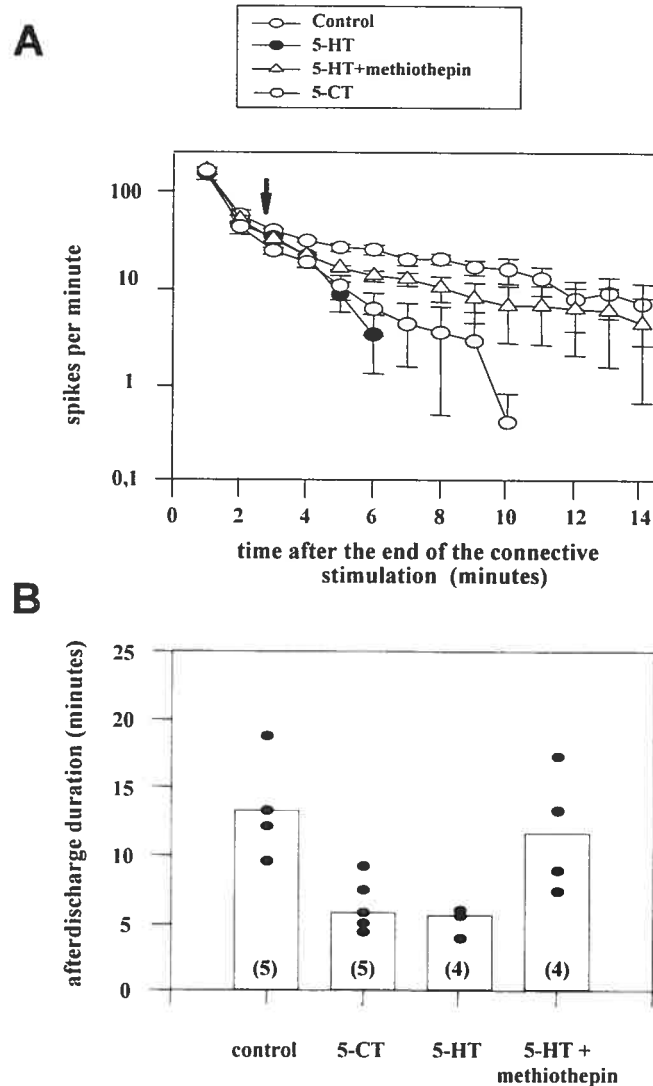


Figure 2.8- **Inhibition of the bag cells afterdischarge by application of serotonin.** (A) Time course of the afterdischarge. The arrow indicates the time at which the agonist was applied in all the experimental groups. Ganglia from “5-HT + methiothepin group” were pretreated with methiothepin ($1 \mu\text{M}$) 30 min before the connective stimulation. Spike frequencies are presented as the mean \pm SEM. (B) Summary of the afterdischarge duration. The median values and the individual data points are illustrated. One outlayer data point (50 min) for the control group is not shown on the graph; however, this value is included in the median value and in the statistical analysis. A non-parametric Mann-Whitney (two-tailed) test was used to evaluate the differences between the groups. The U and probability values were the following; control group versus 5-CT group, $U=0$, $P=0.008$; control versus 5-HT, $U=0$, $P=0.016$; 5-HT versus 5-HT in the presence of methiothepin $U=0$, $P=0.028$.

2.5 Discussion

Results reported in this paper describe the characterization of 5-HT_{ap2}, an *Aplysia californica* 5-HT₁-like receptor predominantly expressed in the CNS. The full length nucleotide sequence encodes a protein of 567 amino acids, which shows the principal features of a G protein-coupled serotonin receptor, including seven hydrophobic transmembrane domains, putative N-linked glycosylation sites on its N-terminal side, and several phosphorylation consensus sequences. Especially, residues important for receptor activation in members of the subfamily 1A of GPCRs and others amino acids that are conserved in all known G protein-coupled 5-HT receptors were also found.

2.5.1 Structural and functional characteristics of 5-HT_{ap2}

Sequence analysis reveals that 5-HT_{ap2} has a close amino acid identity (68%) with the *Lymnaea stagnalis* serotonin receptor 5-HT_{lym} (Sugamori et al., 1993), suggesting that they may be homologous. It is interesting to note that the highest sequence identity between 5-HT_{ap2} and 5-HT_{lym} was found within the transmembrane sequences (94%). The actual working model of G-protein-coupled receptors that are members of the subfamily 1A of GPCRs activated by small ligands like monoamines, suggests that the ligand-binding site is formed within the membrane (Bikker et al., 1998; Boackert & Pin, 1999). Our results, demonstrating that these two receptors display similar pharmacological profiles when expressed in heterologous systems, are in good agreement with this model. The functional coupling of 5-HT_{lym} to a second messenger

system has not yet been determined and since this receptor presents a pharmacological profile and a general structure highly related to the 5-HT_{ap2} receptor, 5-HT_{lym} may also be negatively coupled to adenylate cyclase.

5-HT_{ap2} also presents a high sequence identity with the *Aplysia* receptor 5-HT_{ap1} (37%) (Angers et al., 1998), the 5-HT_{1Ahum} (34%) and the 5-HT_{dro2A} receptors (29%), suggesting that the 5-HT_{ap2} receptor is associated with the mammalian 5-HT₁ family. This is in part confirmed by a dendrogram analysis which groups 5-HT_{ap2} with the members of the 5-HT₁ family, and by the pharmacological experiments that showed that 5-HT_{ap2} is negatively coupled to adenylate cyclase. However, its pharmacological profile displays important differences with those of the mammalian members of this subfamily. Methiothepin, a nonselective 5-HT antagonist, showed the strongest affinity. Its affinity for 5-HT_{ap2} was higher than those reported for its binding to any other cloned mammalian 5-HT receptors. Compounds like 5-HT and 5-carboxamidotryptamine (5-CT), which normally bind to mammalian 5-HT₁ receptors with high affinity (1-10 nM), showed a lower affinity for the 5-HT_{ap2} receptor. 8-OH-DPAT, a 5-HT_{1A}-specific agonist, PAPP, a 5-HT_{1A} agonist and 5-HT_{ID} antagonist, and NAN-190, a very specific 5-HT_{1A} antagonist, showed very poor affinity for 5-HT_{ap2}. Ketanserin and clozapine, two 5-HT₂ receptor antagonists, bound 5-HT_{ap2} with poor affinity. Metergoline, a 5-HT₁, 5-HT₂ and 5-HT₇ antagonist, showed the same affinity for the *Aplysia* 5-HT_{ap2} receptor than for the mammalian 5-HT_{1A} and 5-HT_{ID} receptors. It is not surprising to find that the pharmacological profiles of 5-HT receptors from mollusks and mammals are difficult to compare, considering the large phylogenetic distances existing between these two

classes (Sugamori et al., 1993; Angers et al., 1998; Tierney 2001). These results suggest that the function of 5-HT_{ap2} receptor is probably closely related to those of an ancestor gene, which existed before the divergence of the 5-HT receptor subtypes in vertebrates, and that it kept characteristics of more than one receptor subtype.

The pharmacological profile of 5-HT_{ap2} is distinct from the one reported for 5-HT_{ap1}, another *Aplysia* 5-HT₁-like receptor (Table 2.1). It will now be possible to discriminate between these receptors in 5-HT-induced physiological responses using appropriate agonists and/or antagonists.

2.5.2 Possible physiological roles of 5-HT_{ap2}

The neuroendocrine bag cells clusters are involved in the regulation of the egg-laying behavior in *Aplysia* by generating a long-lasting afterdischarge, causing the release of the peptide egg-laying hormone (ELH) into the hemolymph (Stuart & Strumwasser, 1980; Arch & Berry, 1989; DesGroseillers, 1990). This process was reported to be dependent on the stimulation of adenylate cyclase (Kaczmarek et al., 1978; Kauer & Kaczmarek, 1985). Afterdischarge activity could be inhibited in a dose-dependent manner by extracellular application of low concentrations of serotonin (0.1-1 μ M concentration range) (Jennings et al., 1981) and by the alpha bag cell peptide (α -BCP) (Kauer et al., 1987; Redman & Berry, 1990). Interestingly, inhibition of afterdischarge by α -BCP correlated with a reduction in cAMP levels in bag cell neurons (Kauer et al., 1987) and accordingly this effect was blocked by pretreatment of the

neurons with pertussis toxin, suggesting mediation by an inhibitory guanylate nucleotide-binding protein (Gi-protein) (Redman & Berry, 1990). It is likely that 5-HT inhibited afterdischarge by the same mechanism, therefore 5-HT_{ap2} receptor seems to be a good candidate for mediating this effect. Its high expression in the bag cells, its ability to inhibit adenylate cyclase through Gi-protein and the fact that the physiological doses of 5-HT and of the agonist 5-CT sufficient to inhibit afterdischarge were very close to the K_i values of these compounds for the receptor, suggest that it may be involved in this function. Afterdischarge inhibition can not be achieved through activation of 5-HT_{ap1}, another *Aplysia* 5-HT₁-like receptor, since it is not expressed in the bag cells (Angers & DesGroseillers, unpublished data). However, we do not exclude the possibility that other receptors are expressed in bag cells and/or involved in modulation of afterdischarge. Previous studies have shown that 5-HT increases the level of cAMP in resting bag cells (Bernier et al., 1982; Bruehl & Berry, 1985). These experiments were done with high concentrations of 5-HT (100 μM) and not during afterdischarge. It will be necessary to determine the level of cAMP during 5-HT-induced inhibition of the afterdischarge to determine whether this inhibition is blocked by pretreatment with pertussis toxin.

Another reported function of serotonin is the 5-HT-induced potentiation of the acetylcholine-elicited contractions of the *Aplysia* buccal mass. Indeed, Ram et al. (1994) reported that an *Aplysia* 5-HT_{1A}-like receptor was present in this tissue and that this receptor presented pharmacological similarities to the gastropod 5-HT_{lym} receptor. This effect was shown to be efficiently competed by the antagonist NAN-190 in the nanomolar range and mimicked by the agonist 8-OH-DPAT in the micromolar range.

Despite the fact that the pharmacological behavior of 5-HT_{ap2} is similar to the one described for 5-HT_{1ym}, we failed to detect the presence of 5-HT_{ap2} by RT-PCR in the buccal mass. This result suggests that 5-HT_{ap2} is probably not involved in this process, and that at least another 5-HT₁-like receptor exists in this mollusk.

Is 5-HT_{ap2} involved in the signal transduction role that serotonin plays in the modulation of the withdrawal reflex? Storozhuk and Castellucci (1999b) have observed that 5HT depresses the sensory neuron connections in the RF cluster, a group of mechanoreceptor neurons for the withdrawal reflex. Receptors negatively coupled to adenylate cyclase such as 5-HT_{ap2} seems to be good candidates for this function. It will be particularly interesting to determine whether 5-HT_{ap2} is expressed in these neurons. Similarly, pathways in which activation of MAP kinases are implicated in the establishment of long-term facilitation are worth investigation (Martin et al., 1997b). Koch et al. (1994) demonstrated that stimulation of different Gi-coupled receptors in different cell types leads to the activation of MAP kinase. In mammals, links between 5-HT receptors that inhibit adenylate cyclase and learning and memory processes have been established. Dependent on their localization in neurons, these receptors can act by inhibiting their firing rate and/or by decreasing their neurotransmitter release. For example stimulation of 5-HT_{1A} receptors has been reported to generate detrimental effects on working memory in mice, whereas inactivation of these receptors antagonizes these effects (Buhot, 1997). Another example was reported by Buhot et al. (1995) who

the 5-HT_{ap2} receptor in the *Aplysia* CNS, both at the cellular and sub-cellular levels, should provide us with some clues about its implication in the modulation of synaptic transmission that occurs during behavioral modifications.

2.6 Acknowledgements

This work was supported by the Canadian Institutes for Health Research (CIHR) and Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR) grants to LDG and VFC. We thank Louise Cournoyer for her assistance with cell culture, Maksim V. Storozhuk for electrophysiological experiments, Dr. Wayne S. Sossin, Dr. Allan M. Smith and Ali Salahpour for critical reading of this manuscript.

3

Préambule

Suite au clonage et à la caractérisation du récepteur 5-HT_{ap2}, nous voulions déterminer la localisation spécifique de ce récepteur dans le SNC de l'aplysie. Normalement, selon la littérature, la 5-HT agirait principalement en activant l'adénylate cyclase. Ainsi, il était difficile d'envisager des fonctions physiologiques pour des récepteurs sérotoninergiques couplés à G_i comme les récepteurs 5-HT_{ap1-ap2}. Par hybridation *in situ*, nous voulions établir une cartographie détaillée de la localisation des ARNm codant pour les récepteurs 5-HT_{ap1} et 5-HT_{ap2}. Pour déterminer si l'on retrouvait ces récepteurs dans les diverses grappes de neurones sensoriels, nous avons comparé l'hybridation obtenue pour les sondes d'ARN des récepteurs 5-HT_{ap1} et 5-HT_{ap2} avec celle obtenue pour la sensorine, un peptide uniquement exprimé dans les neurones sensoriels. Cette cartographie nous permettra d'identifier les circuits neuronaux modulés par ces récepteurs et ainsi déterminer les fonctions physiologiques des ces protéines. Ces travaux furent publiés dans *Journal of Comparative Neurology* (Barbas et al., 2005a).

3

Comparative localization of two serotonin receptors and sensorin in the CNS of *Aplysia californica*

Demian Barbas¹, Annie Campbell², Vincent F. Castellucci^{2,3}, Luc DesGroseillers^{1,3}

¹Département de biochimie, ²Département de physiologie, ³Centre de recherches en sciences neurologiques, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7.

Correspondence author: Dr. Luc DesGroseillers, Département de biochimie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale "Centre-Ville", Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7, Tel: 514-343-5802, Fax: 514-343-2210, e-mail: desgros@bcm.umontreal.ca

Key words: serotonin; receptor; sensorin; *Aplysia californica*; neuron; *in situ* hybridization; invertebrate.

Publié dans: *J. Comp. Neurol.* (2005) 490: 295-304.

3.1 Abstract

Aplysia californica is a powerful model for understanding the cellular and molecular mechanisms underlying modulation of neuronal plasticity and learning. In the central nervous system of *Aplysia*, serotonin is associated with various behaviors. For example, it induces short-, intermediate- and long-term synaptic changes in sensory neurons during learning and inhibits the afterdischarge of the bag cells that initiate egg

laying behavior. Little is known about the nature and contribution of serotonin receptors involved in the numerous serotonin-mediated physiological responses in *Aplysia*. Recently, two G_i-coupled serotonin receptors (5-HT_{ap1} and 5-HT_{ap2}) were cloned. We now report that using *in situ* hybridization to express the profile of these receptors, we are able to gain critical insight into their roles in the behavior of *Aplysia*. We compared their distribution to that of sensorin-A, a peptide specifically found in sensory neurons. We wished to determine their involvement in some simple forms of behavioral modifications. 5-HT_{ap1} and 5-HT_{ap2} mRNAs are expressed in all ganglia of the *Aplysia* central nervous system. Stronger signal was observed with the 5-HT_{ap2} antisense probe than with the 5-HT_{ap1} antisense probe. Notably, mRNA coding for the receptors was found in several identified neurons, in the bag cells, in characterized serotonergic neurons and in neurons of the mechanosensory clusters that expressed sensorin. We also observed heterogeneity of receptor expression between R2, LP11 and among neurons of a single cluster of sensory neurons. These results suggest that 5-HT_{ap1} and 5-HT_{ap2} receptors may regulate the response to serotonin and/or its release in several neurons.

3.2 Introduction

Across species, the neurotransmitter serotonin (5-HT; 5-hydroxytryptamine) modulates many behaviors that vary among species (Cassel and Jeltsch, 1995; Buhot, 1997; Gerhardt and Heerikhuizen, 1997; Meneses, 1998; Pauwels, 2000). The mollusk *Aplysia californica* has been developed as a powerful model system for understanding

the cellular and molecular mechanisms underlying behavioral plasticity and learning. In particular, studies on the modification of the defensive reflexes lead to the characterization of the molecular determinants involved in short-, intermediate- and long-term synaptic changes in sensory neurons (for review see Glanzman 1995; Pittenger and Kandel 1998; Barbas et al., 2003). We know that through increase in the cAMP concentration in sensory neurons, 5-HT regulates synaptic plasticity (for reviews see Kandel, 2001; Barbas et al., 2003). One major challenge is to fully understand the biological processes at the molecular level that are responsible for these actions and their possible role in learning and memory.

Recently, two G_i -coupled 5-HT receptors were cloned in *Aplysia*. The 5-HT_{ap1} receptor is negatively coupled to adenylyate cyclase and expressed in various tissues including the central nervous system (CNS) (Angers et al., 1998). The second G_i -coupled receptor (5-HT_{ap2}) is exclusively expressed in the CNS (Barbas et al., 2002). The contribution of these receptors to the numerous physiological functions modulated by 5-HT in *Aplysia*, and especially in synaptic plasticity remains unknown. We know that 5-HT activates adenylyate cyclase activity during plasticity (Bernier et al., 1982; Yovell et al., 1987). However, in the mouse hippocampus, downregulation of adenylyate cyclase activity via inhibitory G_i -coupled receptors is also critical for memory formation. This suggests that a balance of inhibitory and stimulatory regulators of adenylyate cyclase is required for optimal cAMP signaling (Pineda et al., 2004).

To examine the specific role of 5-HT_{ap1} and 5-HT_{ap2} receptors in the modulation of behaviors in *Aplysia*, *in situ* hybridization (ISH) was performed on the ganglia of the CNS. We wished to localize their expression in specific cells with a special focus on expression in the bag cells and in sensory neurons. While bag cells are easily identifiable by their position in the abdominal ganglion, ISH with a sensorin antisense probe was required to identify mechanosensory neurons. The *sensorin* gene codes for sensorin-A, a nanopeptide specifically expressed in clusters of sensory cells (Brunet et al., 1991; Walters et al., 2004). Mapping the expression of the *5-HT_{ap1}* and *5-HT_{ap2}* genes provides critical information concerning the distribution and heterogeneity of receptor populations in specific presynaptic and postsynaptic neurons within the circuits that produce behaviors in *Aplysia*. In this study, we show that 5-HT_{ap1} and 5-HT_{ap2} mRNA are localized in all *Aplysia* ganglia and in several clusters of neurons expressing sensorin mRNA. This suggests that they play multiple roles in the CNS and that they may be involved in the fine regulation of synaptic plasticity.

3.3 Materials and methods

Animals and compounds - *Aplysia californica* weighing 100–200 g were purchased from the *Aplysia* Resource Facility (Miami, FL) or from Marinus Scientific (Garden Grove, CA, USA), maintained in an aerated seawater tank at 15°C and fed every second day *ad libitum*. Specimens were anesthetized by injection of isotonic MgCl₂ solution (385 mM) corresponding to approximately one-third of the animal volume. Ganglia were dissected

in equal volumes of isotonic $MgCl_2$ and in a saline solution (NaCl 460 mM; KCl 10 mM; $CaCl_2$ 11 mM; $MgCl_2$ 55 mM; and Tris 10 mM; pH 7.6). Dissected ganglia were immersed in a solution of 30% sucrose in saline buffer for 15 min; frozen in 2-methylbutane 98%; embedded in Tissue-Tek O.C.T. compound (1:5 with distilled water, Miles Inc, Elkhart, IN, USA); and cut into 15- μ m sections. Sections were mounted on super frost slides (Fisher Scientific, Nepean, Ontario, Canada) and stored at $-80^\circ C$ until used.

Cloning of cDNA vectors - A 995 bp fragment (nt 316 to 1311, GenBank accession number [AF041039](#)) of 5-HT_{ap1} receptor (Angers et al., 1998) was PCR-amplified from the full-length cDNA using the sense 5'-CAGAGGATGGGAAGAAACG-3' and antisense 5'-CATTCTCCTGGACATCTAGC-3' primers. A 793 bp fragment (nt 104 to 897, GenBank accession number [AF372526](#)) of 5-HT_{ap2} receptor (Barbas et al., 2002) was PCR-amplified from the full-length cDNA using sense 5'-CTGTTATGTCTGAATCATTGTTAGGG-3' and antisense 5'-ACCGACGTACCTATCCTGAAC-3' primers. Resulting fragments were cloned in pGEM-T Easy Vector (Promega, Madison, WI, USA), digested with *EcoRI*, subcloned in pcDNA3 vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and sequenced.

The *Aplysia* sensorin-A (Brunet et al., 1991) probe was PCR-amplified from DNA (200 ng) isolated from an *Aplysia* random-primed λ GT10 CNS cDNA library, using the sense (5'-GAATAGAGAACTGAGAGC-3') and antisense (5'-GGAAAAAAGCTTTATGTAATTTTTGTCAG-3') sensorin-specific primers. The 581

bp product (nt 2 to 583, GenBank accession number **X56770**) was subcloned in pTOPO 2.1 vectors (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), sequenced, digested with *EcoRI*, subcloned in pcDNA3 vector and sequenced. PCR-amplifications were performed with the proofreading Pfu Turbo polymerase (Stratagene, La Jolla, CA, USA).

Synthesis of cRNA probes - The pcDNA3-5HT_{ap1} vector was linearized with HindIII and used as template to synthesize the single-stranded antisense RNA probe with Sp6 RNA polymerase. As control, the sense RNA probe was synthesized with T7 RNA polymerase after linearization of the plasmid with XbaI. The 5-HT_{ap2} antisense probe was synthesized with T7 RNA polymerase after linearization of the pcDNA3-5HT_{ap2} vector with XbaI. The sense probe was produced with Sp6 RNA polymerase after linearization of the plasmid with HindIII. The antisense and sense sensorin probes were synthesized with Sp6 RNA polymerase or T7 RNA polymerase after linearization of the pcDNA3-sensorin vector with BamHI or EcoRV respectively. Probes were labeled with [³⁵S]UTP and [³⁵S]CTP (1250 Ci/mmol; Amersham, Arlington Heights, IL, USA).

In situ hybridization - ISH was performed as described (Ruchon et al., 1998) with few modifications. Frozen sections were fixed in 4% formaldehyde for 60 min and washed in PBS. Sections were treated for 10 min with acetic anhydride and glacial acetic acid in 0.1 M TEA solution (pH 8), washed in 2 X SSC solution (1 X SSC = 0.15 M NaCl, 0.015 M Na citrate; pH 7.2), dehydrated with alcohol and incubated overnight at 55°C in hybridization solution (75% formamide, 3 X SSC, 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4), 1 X Denhardt's solution, 0.5 mg/ml yeast tRNA and 10% dextran sulfate). The

probes (2×10^6 cpm) in 70 μ l of hybridization buffer (+ 200 mM DTT) were applied to each slide and slides were incubated at 55°C for 24 hrs. After hybridization, sections were washed in 2 X SSC for 20 min, 1 X SSC for 10 min and 0.5 X SSC for 10 min, treated with RNase A (200 μ M) for 30 min at 37°C to remove unbound cRNAs and washed again at 55°C in 0.5 X and 0.1 X SSC for 30 min, and at room temperature in 0.5 X SSC for 10 min. Sections were dehydrated in a series of alcohol baths, dried and exposed with X-ray film for 3 days to confirm hybridization positive signals. Slices were immersed in NTB-2 emulsion (Kodak, Rochester, NY, USA) at 4°C and stored at -80°C for 7 to 15 days. Slices were developed in D19 solution (Kodak, Rochester, NY, USA), fixed in sodium thiosulfate 45% and stained with hematoxylin (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) and eosin solution (Fisher Scientific, Nepean, ON, Canada). Hybridization was examined under dark- and brightfield illumination using a Nikon Eclipse E800 microscope (Nikon, Melville, NY, USA) equipped with a CoolSnap fx 12 bits CCDs camera (Roper Scientific, San Jose, Ca, USA). Images were stored, manipulated and analyzed with MetaMorph 5.0 (Universal Imaging Corporation, Downingtown, PA, USA). The final figures were edited with Adobe Illustrator 9.0 (Adobe Systems, San Jose, CA, USA) and some pictures were adjusted for brightness and contrast with Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems, San Jose, CA, USA).

3.4 Results

To map the expression of the *5-HT_{ap1}* and *5-HT_{ap2}* genes in the *Aplysia* CNS, serial sections of the paired buccal and ring ganglia (cerebral, pleural and pedal) and of the single unpaired abdominal ganglion were prepared and treated for ISH. Expression of the receptors was compared to that of sensorin, a marker of sensory cells, to determine whether the receptors are expressed in mechanosensory cells. Hybridization signals of sensorin were observed in all sensory clusters, and even in neuronal fibers as reported before (Figure 3.1) (Brunet et al., 1991; Walters et al., 2004). *5-HT_{ap1}* and *5-HT_{ap2}* antisense cRNA probes were generated from the N-terminal regions of each cDNA that are not conserved among 5-HT receptors (Hen, 1993). mRNA coding for *5-HT_{ap1}* and *5-HT_{ap2}* receptors were observed in all ganglia. Stronger hybridization signal repeatedly found with the antisense *5-HT_{ap2}* probe than with the *5-HT_{ap1}* probe confirmed that the former receptor is well expressed in the CNS (Barbas et al., 2002). ISH labeling with each probe was repeated 5 times using different animals. Expression was similar among animals. The controls, sense RNA probes were always negative (data not shown).

3.4.1 Buccal ganglia

Strong staining of *5-HT_{ap1}* mRNA was observed in several neurons of the ganglion. In particular, expression was observed in some but not all symmetrical motor

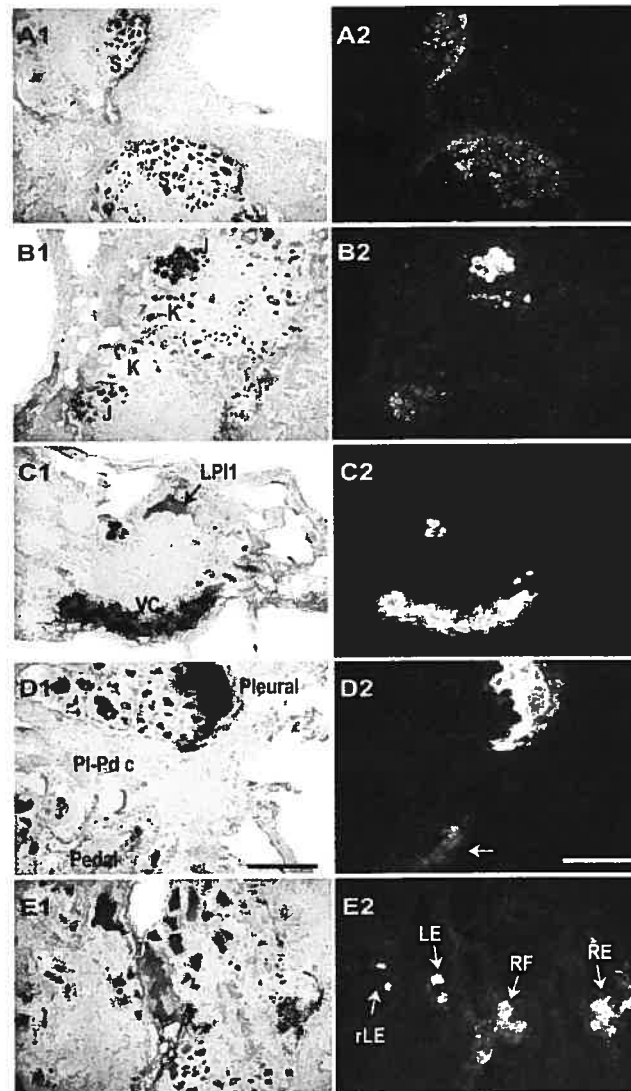


Figure 3.1- **Cellular localization of sensorin mRNA in *Aplysia* ganglia.** Brightfield (A1-E1) and the corresponding darkfield (A2-E2) illumination images of the buccal (A1,A2), cerebral (B1,B2), pleural (C1,C2), pleuro-pedal (D1,D2) and abdominal (E1,E2) ganglia are shown. The sensory clusters and the LPI1 (left pleural giant cell) neuron are indicated. D1, Pleural and pedal ganglia and the pleuro-pedal connective (PI-Pd c) are indicated. D2, White arrow, sensorin mRNA labeled fibers. Scale bars = 300 μm .

neurons (Figure 3.2A,D). Symmetrical cells have common synaptic input, similar firing patterns and the same response to acetylcholine (Gardner, 1971; Kandel, 1976; Gardner and Kandel, 1977; Church and Lloyd, 1991). Staining of other smaller unidentified cells, especially in the S cluster, was also observed. Cells in the S cluster also expressed sensorin mRNA (Figure 3.2B,C). Only some of the neurons in the S cluster were positive for the receptor mRNA. The diversity in the sensory neuron population suggested that individual cells may respond differently to 5-HT. This observation was also observed in other sensory clusters and with both receptors (see below).

Similarly, 5-HT_{ap2} mRNA was found in several but not all symmetrical motor neurons (Figure 3.3A,D). From the position of the cells, it is likely that at least some of these neurons expressed both 5-HT_{ap1} and 5-HT_{ap2} mRNA (Figure 3.2D, 3.3D). Expression was also found in unidentified small cells (Figure 3.3D). Several neurons in the S cluster, particularly in the upper part near the commissure, expressed 5-HT_{ap2} mRNA (Figure 3.3B,C), although the number of positive neurons slightly varied among animals.

3.4.2 Cerebral ganglion

Very few cells in the cerebral ganglia expressed 5-HT_{ap1} mRNA (Figure 3.4A). Positive cells were located in the J and K clusters on the ventral side of each hemiganglion. These clusters contain mechanosensory cells that express sensorin (Figure 3.4B) suggesting that 5-HT_{ap1} mRNA is expressed in some sensory cells. About

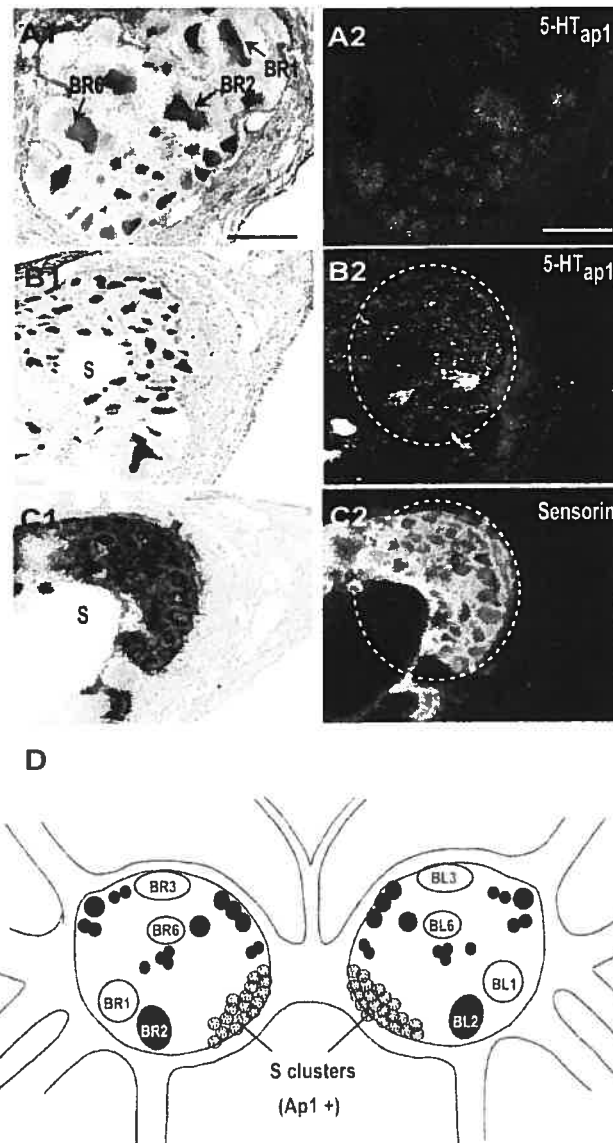


Figure 3.2- Cellular localization of 5-HT_{ap1} mRNA in the buccal ganglion. Brightfield (A1-C1) and darkfield (A2-C2) illumination images of regions positive for 5-HT_{ap1} mRNA. A1-A2) Localization of 5-HT_{ap1} mRNA. B-C) Localization of 5-HT_{ap1} (B2) and sensorin (C2) mRNA in the S cluster. The region where 5-HT_{ap1} and sensorin mRNA are expressed is circled by a dotted line. Scale bars = 300 μ m. A1, position of large motor neurons are indicated. D) Schematic representation of the caudal surface of the buccal ganglion. Expression of 5-HT_{ap1} is indicated by black circles (●) and that of sensorin by shaded circles (◐). Cells are indicated by letters BL or BR, corresponding to location in left or right buccal ganglion followed by one- or two-digit number. Symmetric cells have the same number. S cluster (Ap1+) indicates that some of the cells in the cluster express the 5-HT_{ap1} mRNA. Schematic diagram inspired by Kandel (1976).

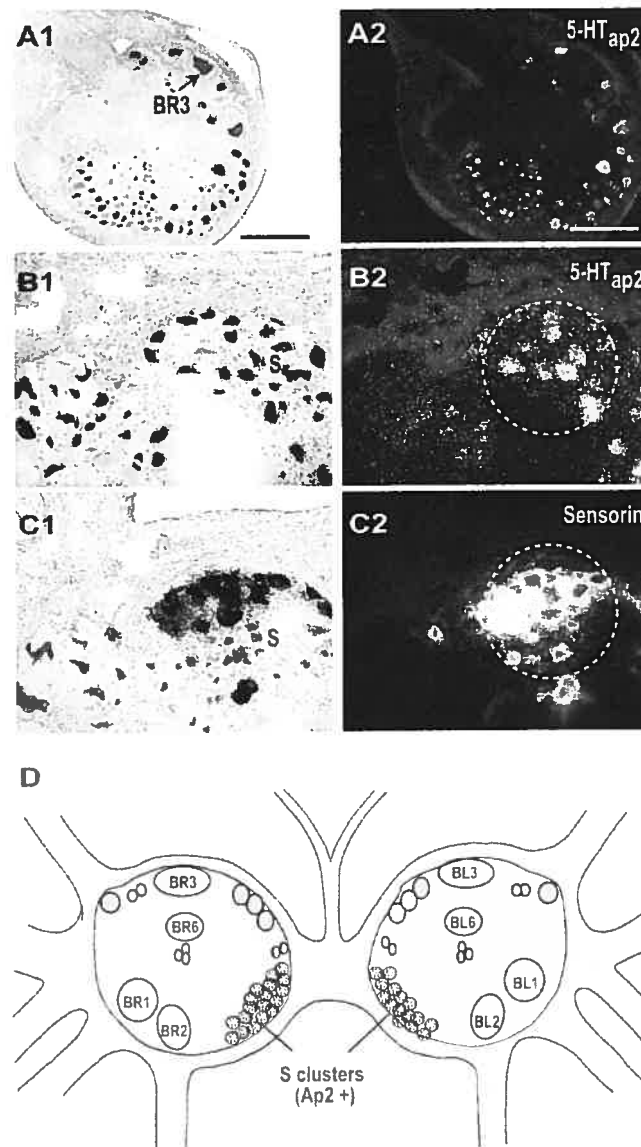


Figure 3.3- Cellular localization of 5-HT_{ap2} mRNA in the buccal ganglion. Brightfield (A1-C1) and darkfield (A2-C2) illumination images of regions positive for 5-HT_{ap2} mRNA. A2) Localization of 5-HT_{ap2} mRNA. B-C) Localization of 5-HT_{ap2} (B2) and sensorin (C2) mRNA in the S cluster. A1, BR3 neuron is identified for reference and positioning. The region where 5-HT_{ap2} and sensorin mRNA are expressed is circled by a dotted line. Scale bars = 300 μ m. D) Schematic representation of the caudal surface of the buccal ganglion. Expressions of 5-HT_{ap2} (○) and of sensorin (⊙) mRNA are shown. Cells are indicated by letters BL (left buccal or BR (right buccal) corresponding to location in buccal ganglion followed by one- or two-digit number. Symmetric cells have the same number. S clusters (Ap2 +) indicates that some of the cells in the cluster express the 5-HT_{ap2} mRNA. Schematic diagram inspired by Kandel (1976).

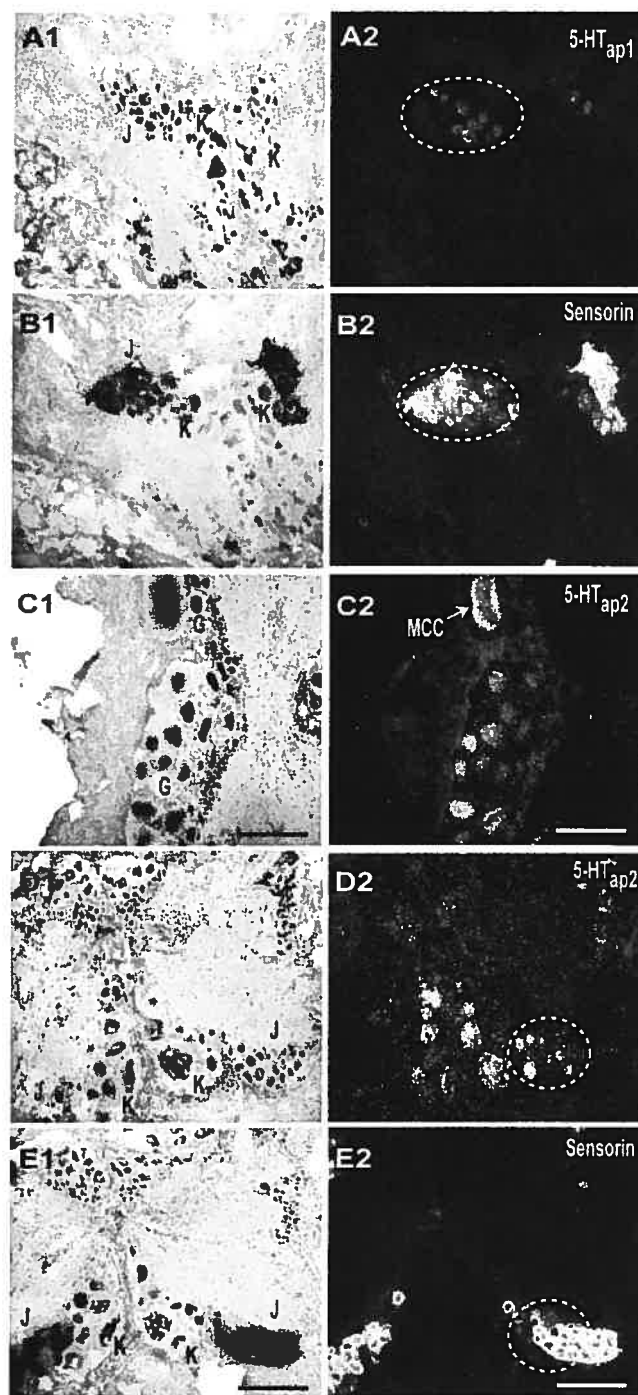


Figure 3.4- Localization of 5-HT_{ap1}, 5-HT_{ap2} and sensorin mRNA in the cerebral ganglion. Brightfield (A1-E1) and darkfield (A2-E2) illumination images of the cerebral ganglion. Expressions of 5-HT_{ap1} (A2), 5-HT_{ap2} (C2,D2) and sensorin (B2,E2) mRNA are shown. A1, B1, D1, E1, positions of the J and K clusters are indicated. C1, position of the G clusters is represented. C2, hybridization in the MCC (giant metacerebral cell) is shown. The regions where 5-HT_{ap1} or 5-HT_{ap2} and sensorin mRNA are expressed are circled by a dotted line. Scale bars = 300 μ m.

10 sensory cells were positive among about 125 sensory cells in each hemiganglion (Walters et al., 2004).

The 5-HT_{ap2} receptor was found in 12 large neurons of the G clusters located in the anterior part of the ganglion (Figure 3.4C). We also observed some positive staining in smaller neurons surrounding the G clusters. 5-HT_{ap2} mRNA was observed in very small cells (not more than 4 cells in each experiment) in the E clusters, located near the cerebral-buccal connectives (data not shown). Interestingly, 5-HT_{ap2} mRNA was also found in the giant metacerebral cells (MCC) (Figure 3.4C). MCCs are a bilateral pair of large serotonergic neurons that have extensive central and peripheral synaptic outputs (Kupfermann et al., 1979; Fox and Lloyd, 1998). Expression was also found in 10 to 20 sensory neurons of the sensorin-positive J and K clusters and in at least 3 large cells on each side of the lower part of the septum that surrounds the sensory cluster (Figure 3.4D,E).

3.4.3 Pleuro-pedal ganglia

mRNA coding for the 5-HT_{ap1} receptor was widely expressed in the pedal ganglion. Expression of 5-HT_{ap1} mRNA was visible in several large neurons including neurons of quadrants II, IIIa, IIIb and IIIc (Figure 3.5A,D). Precise identification of these cells was difficult because of the lack of detailed maps of the ganglion and the variability in the morphology of the cells from animal to animal. Nevertheless, very large neurons were positive near the pedal nerves, specifically one neuron in the IIIa and

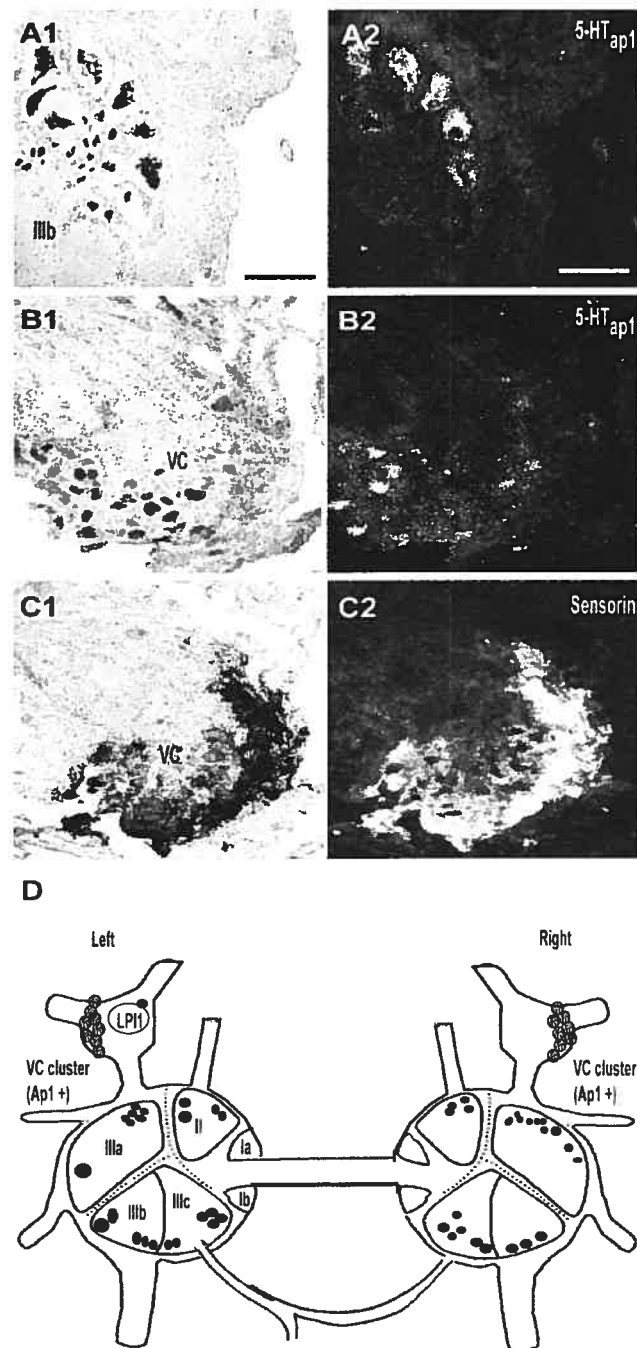


Figure 3.5- Cellular localization of 5-HT_{ap1} mRNA in the pleuro-pedal ganglia. Brightfield (A1-C1) and darkfield (A2-C2) illumination images of regions positive for 5-HT_{ap1} mRNA. **A2)** Localization of 5-HT_{ap1} mRNA. **B-C)** Localization of 5-HT_{ap1} (B2) and sensorin (C2) mRNA in the VC clusters. **A1,** quadrant IIIb is identified for reference and positioning. The region where 5-HT_{ap1} and sensorin mRNA are expressed is circled by a dotted line. Scale bars = 300 μ m. **D)** Schematic representation of the pleuro-pedal ganglia. Expressions of 5-HT_{ap1} (●) and of sensorin (⊙) mRNA are shown. VC cluster (Ap1 +) indicates that some of the cells in the cluster express the 5-HT_{ap1} mRNA. Various quadrants and neuron LP11 are identified for reference and positioning. Schematic diagram adapted from Walters et al. (1983).

two neurons in the IIIb regions of the left pedal ganglion where serotonin neurons were described (Longley and Longley, 1986; Hawkins, 1989). Staining of neurons in this region suggests that the 5-HT_{ap1} receptor may be expressed in serotonergic neurons. No correlation can be observed in the size and position of 5-HT_{ap1}-expressing neuron in the left versus right pedal ganglia. In the pleural ganglia, 5-HT_{ap1} mRNA was found in few neurons of the sensorin-positive VC clusters (Figure 3.5B,C,D). A positive neuron observed just beside LP11 did not express sensorin (Figure 3.5D).

The 5-HT_{ap2} receptor is expressed in both the pedal and pleural ganglia. In the pedal ganglion, 5-HT_{ap2} was found in several neurons of all quadrants (Figure 3.6A,D). Significantly more neurons were shown to express the 5-HT_{ap2} receptor than the 5-HT_{ap1} receptor. In the pleural ganglion, 5-HT_{ap2} mRNA was localized in 5 to 8 cells surrounding the VC clusters. These cells were larger than sensory neurons (Figure 3.6B). The identifiable giant LP11 cell in the left pleural ganglion was positive for 5-HT_{ap2} mRNA (Figure 3.6B,D). The lack of staining observed in the sensorin-positive VC clusters (Figure 3.6B,C,D) indicated that sensory neurons in this cluster did not express the 5-HT_{ap2} receptor.

3.4.4 Abdominal ganglion

5-HT_{ap1} mRNA was found in the abdominal ganglion in a few large neurons including one RUQ neuron (Figure 3.7A,B,C). 5-HT_{ap1} mRNA widely expressed in unidentified small cells was noticeable in 3 cells near the R9 and R15 neuron. Cells near

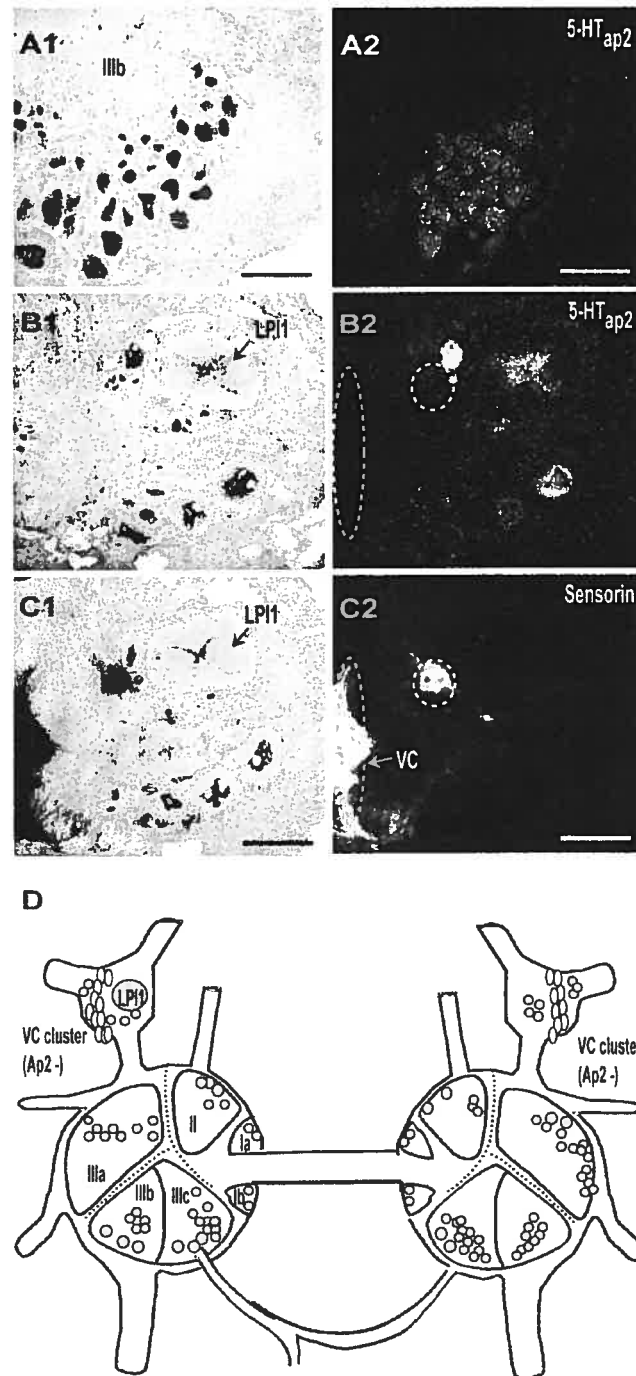


Figure 3.6- Cellular localization of 5-HT_{ap2} mRNA in the pleuro-pedal ganglia. Brightfield (A1-C1) and darkfield (A2-C2) illumination images of regions positive for 5-HT_{ap2} mRNA. **A2)** Localization of 5-HT_{ap2} mRNA. **B-C)** Localization of 5-HT_{ap2} (**B2**) and sensorin (**C2**) mRNA in the VC clusters. **A1,** quadrant IIIb is identified for reference and positioning. **B1, C1)** The LPI1 neuron which expresses 5-HT_{ap2} mRNA is indicated. Circles with dotted lines show that neurons express sensorin mRNA but not 5-HT_{ap2} mRNA. Scale bars = 300 μ m. **D)** Schematic representation of the pleuro-pedal ganglia. Expression of 5-HT_{ap2} mRNA (●) is shown. Quadrants and neuron LPI1 are identified for reference and positioning. VC clusters (○; Ap2-) indicates that cells in the cluster do not express 5-HT_{ap1} mRNA. Schematic diagram adapted from Walters et al. (1983).

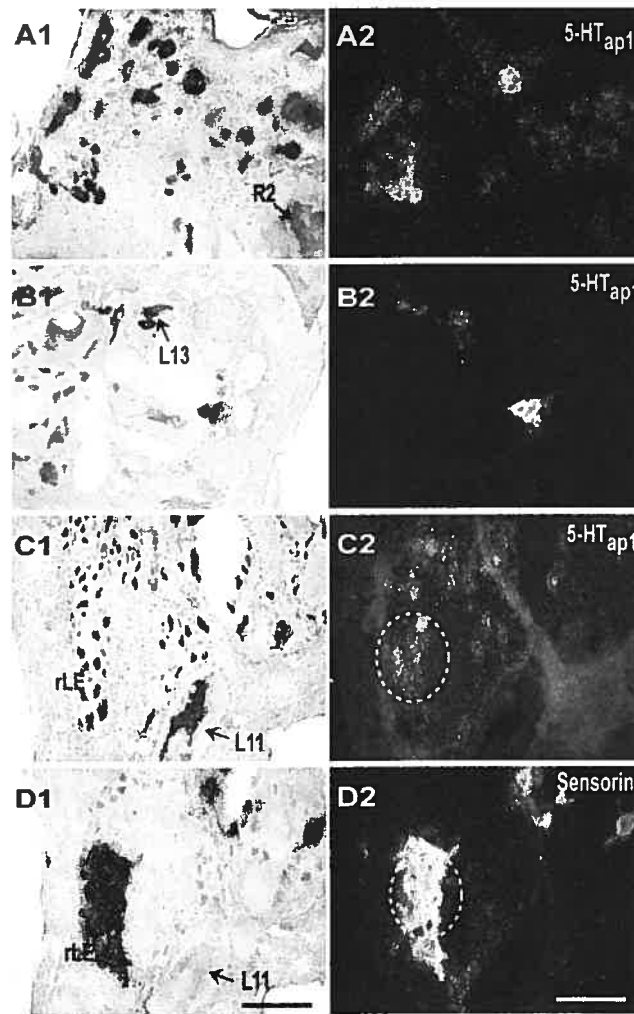


Figure 3.7- Cellular localization of 5-HT_{ap1} mRNA in the abdominal ganglion. Brightfield (A1-D1) and darkfield (A2-D2) illumination images of regions positive for 5-HT_{ap1} (A2, B2,C2) or sensorin (D2) mRNA. C-D, The regions where 5-HT_{ap1} and sensorin mRNA are both expressed are circled by a dotted line. Large neurons and the rLE cluster are identified for reference and positioning. Scale bars = 300 μ m.

the R15 neuron are presumably part of the RB group of cells (Figure 3.10). The rLE, RE and RF clusters of sensory neurons were positive for 5-HT_{ap1} mRNA but not the LE cluster (Figure 3.7C,D). A greater proportion of sensory neurons in the abdominal ganglion expressed the 5-HT_{ap1} receptor as compared to expression in other sensory clusters of the head ganglia.

The 5-HT_{ap2} mRNA displayed a different pattern of hybridization and no potential colocalization when 5-HT_{ap1} mRNA was visible (Figure 3.10). 5-HT_{ap2} mRNA was found in unidentified small cells near R14, and near the septum surrounding R15 (Figure 3.8A,C). Cells near the R15 neuron are part of the RB group of cells. Three large neurons, all found near the right and left connectives (presumably L1 and RUQ cells) were positive for 5-HT_{ap2} mRNA. No hybridization for the 5-HT_{ap2} mRNA was observed in R2 (Figure 3.8A-C). Its absence in R2 was unexpected since the 5-HT_{ap2} mRNA was found in neuron LP11 in the pleural ganglion (Figure 3.8A-C). These cells are related by their appearance, molecular components and their electrophysiological properties (Hughes and Tauc, 1963; Giller and Schwartz, 1971; Kandel, 1976). As observed for 5-HT_{ap1}, 5-HT_{ap2} was found in rLE, RE and RF sensory clusters but not in LE (Figure 3.8D-F; 10).

Interestingly, 5-HT_{ap2} mRNA was also found in the neuroendocrine bag cells (Figure 3.9A), consistent with its potential role as a modulator of afterdischarge during egg-laying behavior (Barbas et al., 2002). Although the hybridization signal was faint,

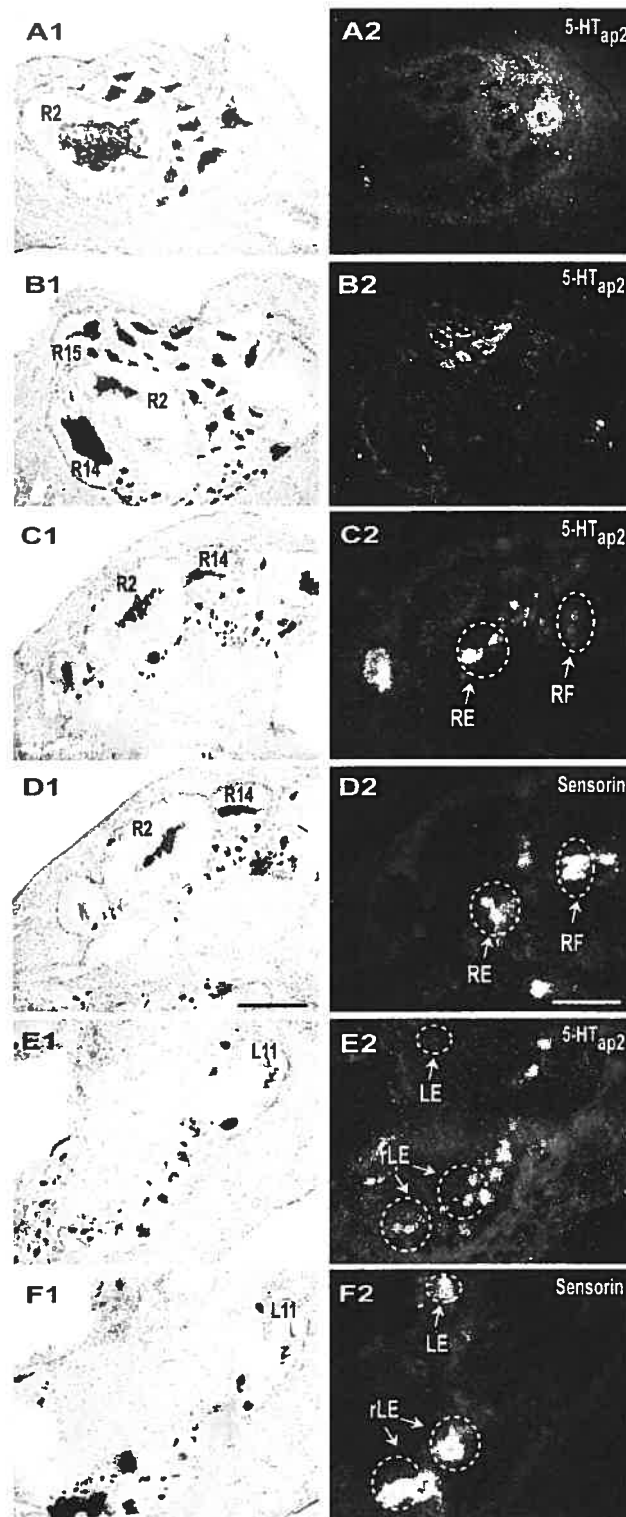


Figure 3.8- Cellular localization of 5-HT_{ap2} mRNA in the abdominal ganglion. Brightfield (A1-F1) and darkfield (A2-F2) illumination images of regions positive for 5-HT_{ap2} (A2, B2, C2, E2) or sensorin (D2, F2) mRNA. C-F, The regions where 5-HT_{ap2} and sensorin mRNA are both expressed are circled by a dotted line. E2-F2, LE cluster, positive for sensorin and negative for 5-HT_{ap2} mRNA, is circled by a dotted line. Large neurons and sensory clusters are identified for reference and positioning. Scale bars = 300 μ m.

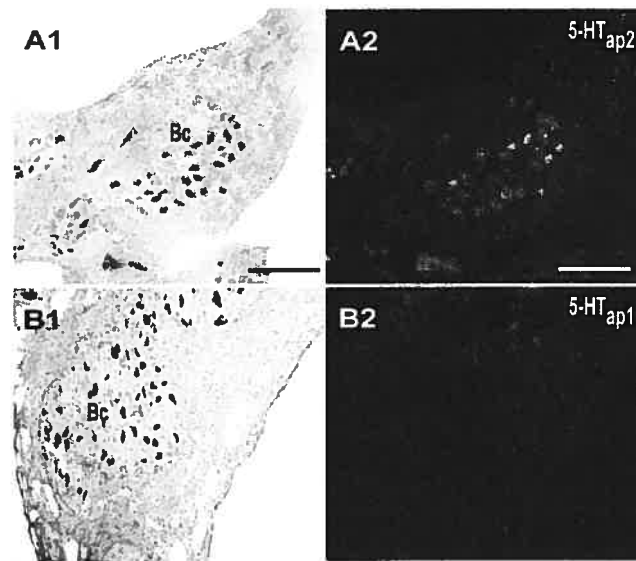


Figure 3.9- Cellular localization of 5-HT_{ap2} mRNA in the bag cells of the abdominal ganglion. Brightfield (A1,B1) and darkfield (A2,B2) illumination images of bag cells (Bc) using antisense 5-HT_{ap2} (B1) or 5-HT_{ap1} (B2) probes. Scale bar = 300 μ m.

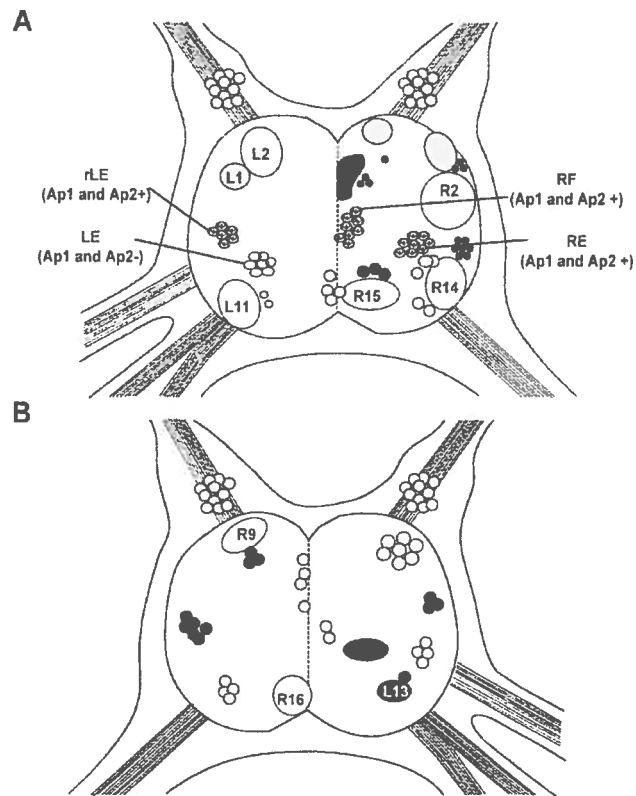


Figure 3.10- Schematic representation of the dorsal (A) and ventral (B) surfaces of the abdominal ganglion with expression patterns of 5-HT_{ap1} (●) and 5-HT_{ap2} (○). Clusters of sensory neurons (rLE, LE, RF and RE) were identified with the sensorin probe. Cells are indicated by letters L (left) or R (right), corresponding to locations in hemiganglion followed by one- or two-digit number. Sensory clusters (RE, RF and rLE) that also express 5-HT_{ap1} or 5-HT_{ap2} mRNA (Ap1 and Ap2 +) are illustrated (⊗). The LE cluster was negative for 5-HT_{ap1} and 5-HT_{ap2} expression (Ap1 and Ap2 -). Schematic diagram adapted from Kandel (1976).

the majority of the bag cells were positive. No 5-HT_{ap1} hybridization signal was observed in these neuroendocrine cells (Fig. 3.9B).

3.5 Discussion

Assigning a role to G_i-coupled receptors in *Aplysia* is not straightforward. Although radio-labeled ligands can identify serotonin-responsive cells, they add no information about the nature of expressed receptors (Kadan and Hartig, 1988). Therefore, quantification of the cAMP level in cells is required to determine the nature of the serotonin receptors. It is a difficult challenge to screen for a decrease in the cAMP level in neurons following serotonin application especially when pathways that trigger this response are unknown. ISH overcomes these difficulties and allows direct positioning of receptor mRNA. This led us to focus our study on two major pathways for which serotonin-induced inhibitory responses were documented.

3.5.1 Expression of 5-HT_{ap2} in the bag cells

The neuroendocrine bag cells clusters that are located around each of the pleuro-abdominal connectives near the abdominal ganglion initiate the egg-laying behavior in *Aplysia* by generating a long-lasting afterdischarge that causes the release of egg-laying hormone (ELH) and other peptides into the hemolymph (Kaczmarek et al., 1978; Stuart and Strumwasser, 1980; Kauer and Kaczmarek, 1985; Arch et al., 1989; DesGroseillers,

1990). Afterdischarge is triggered by a stimulus that activates the adenylate cyclase and increases the level of cAMP. Interestingly, afterdischarge can be inhibited by 5-HT (Jennings et al., 1981). Pharmacological studies have shown that the 5-HT_{ap2} receptor is a good candidate for mediating this inhibiting effect (Barbas et al., 2002). Expression of the *5-HT_{ap2}* gene in the bag cells, as determined by ISH in our study, is consistent with this hypothesis. Interestingly, neuron L1 in the abdominal ganglion, which is transiently excited by bag cell activity (Mayeri et al., 1985), also expresses the 5-HT_{ap2} receptor. This is consistent with the previous observation that neuron L1 is labeled by ¹²⁵I-LSD (Evans et al., 1991), a strong ligand of 5-HT receptors. It is thus possible that the 5-HT_{ap2} receptor may couple bag cell activity with that of neurons that are stimulated by the bag cells, in a concerted mechanism that regulates egg -laying.

3.5.2 Expression of 5-HT_{ap1} and 5-HT_{ap2} in the clusters of sensory neurons

Among the most intensively studied models of short- and long-term memory are the gill/siphon withdrawal and tail withdrawal reflexes of *Aplysia* (Byrne, 1987; Kandel, 2001). In these withdrawal reflexes, molecular components of sensory neurons can be modified to modulate the strength of their connection with motor neurons. It is now well documented that serotonin is a major modulator of this pathway (Barbas et al., 2003). Serotonin induces synaptic plasticity through activation of a still uncharacterized G_s-coupled receptor that stimulates adenylate cyclase and increases cAMP levels (Kandel, 2001, Barbas et al., 2003). Nevertheless, 5-HT is also known to depress sensory neuron

connections in the RF cluster, a group of mechanosensory neurons involved in the withdrawal reflex (Storozhuk and Castellucci, 1999a,b). It is thus likely that G_i -coupled 5-HT receptors that inhibit adenylate cyclase also may play critical role(s) in modulating learning and memory processes.

The G_i -coupled 5-HT_{ap1} and 5-HT_{ap2} receptors are expressed in almost all clusters of sensory cells. It is unclear whether they are co-expressed with the putative serotonin-activated G_s -coupled receptor. Nevertheless, their expression in the sensory cell clusters confirms the importance for a cell to be able to modulate its cAMP level. Indeed downregulation of G_i -dependent response in mice that results in an increase in cAMP level and enhanced synaptic plasticity impairs certain forms of learning (Pineda et al., 2004). Therefore, a balance between the stimulatory and inhibitory regulators of adenylate cyclase is likely to be required for optimal cAMP signaling and appropriate synaptic plasticity in the process of memory formation (Mansuy, 2004). Alternatively, the expression of the receptors in relatively few sensory cells may suggest that these receptors define a sub-population of sensory neurons that may be involved in specific functions, for example in inhibitory pathways such as that of the RF cluster (Storozhuk and Castellucci, 1999b). In all cases, the molecular diversity of these cells will contribute to the fine regulation that is required to respond to varied environmental changes.

In addition to the monosynaptic component of the withdrawal reflex (sensory neurons to motor neurons), there is a significant polysynaptic pathway that includes

several excitatory and inhibitory interneurons (Trudeau and Castellucci, 1992; Trudeau and Castellucci, 1993; Barbas et al., 2003). Is it possible that the 5-HT_{ap1} and 5-HT_{ap2} receptors are expressed in these cells (Trudeau and Castellucci, 1992; Trudeau and Castellucci, 1993)? Further identification of 5-HT_{ap1} and 5-HT_{ap2} receptor-positive cells and further characterization of interneurons are needed to address this hypothesis. Several interneurons have been identified but these cells are small and mainly identified by physiological and connectivity properties (Barbas et al., 2003).

3.5.3 Expression in other identifiable cells

mRNA coding for 5-HT_{ap1} and 5-HT_{ap2} were found in several identified large neurons in each ganglion. Some of these neurons are serotonergic, supporting our hypothesis that these receptors may act as autoreceptors that modulate local synthesis and release of 5-HT (Angers et al., 1998; Barbas et al., 2002). In rats, somatodendritic autoreceptors are known to reduce cell firing and curtail the synthesis and release of 5-HT (Buhot et al., 1995; Buhot, 1997). Among 5-HT-positive receptor cells, the giant cerebral neurons (MCC), some smaller neurons located near the MCC, large number of cells in the pedal ganglia in area IIIa-b and the RB cells of the abdominal ganglion were shown to express serotonin (Longley and Longley, 1986; Hawkins, 1989). Both receptor mRNAs were also found in large cells in the IIIc area of the pedal ganglia. Positioning of these neurons is reminiscent of cells localized in a cluster of large neurons near the dorsomedial surface of the ganglia that fire in phase with opening of the parapodia and are designated as parapodial opener-phase cells (POP cells; McPherson and

Blankenship, 1991). POP cells utilize 5-HT to modulate the neuromuscular junction of parapodial swim muscles (McPherson and Blakenship, 1991). Further characterization on the nature of 5-HT_{ap1-ap2} positive neurons in this IIIc region of the pedal ganglia is necessary to conclude that these G_i-coupled receptors are expressed in POP cells.

Both receptors are also expressed in neurons that are not known to express or respond to serotonin. Many of these cells, such as L13 and RUQ in the abdominal ganglion are known to release chemical neurotransmitters and/or peptides (Yanaura et al., 1993; Rittenhouse & Price, 1986). The potential physiological role(s) of a G_i-coupled 5-HT receptor in these cells are unknown. Further investigations will be necessary to determine the importance 5-HT_{ap1} and 5-HT_{ap2} in modulating neuronal activity and/or transmitter release in these cells. Potential co-expression of 5-HT_{ap1} and 5-HT_{ap2} mRNA was suggested in several sensory neuron clusters. Expression of two G_i-coupled receptors in a cell may increase the capacity of this neuron to respond to 5-HT. 5-HT_{ap1} and 5-HT_{ap2} receptors have very distinct pharmacological profiles (Angers et al., 1998; Barbas et al., 2002) that allow differential and/or complementary responses to 5-HT.

Future comparative studies focusing on the identification 5-HT receptor expression sites, 5-HT releasing neurons and 5-HT neuron connectivity network with electrophysiological recording will be necessary to further characterize the contributions of 5-HT receptors in 5-HT-dependent pathways. Does downregulation of 5-HT G_i-coupled receptors, measured using RNAi and/or antisense approaches alter the ability of

sensory neurons to respond to 5-HT and to modulate various reflexes in *Aplysia*? We also wish to examine different types of behavioral modifications to determine if they are able to alter the ratio of these diverse 5-HT G_i-coupled receptors.

3.6 Acknowledgements

We thank Jeanne Lavoie for her excellent technical support and Jadwiga Marcinkiewicz and Mieczyslaw Marcinkiewicz for help with *in situ* hybridization. This work was supported by grants MOP-14142 and MGC-57079 from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). DB received studentships from Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

4

Préambule

La DA est un neurotransmetteur essentiel dans le contrôle de l'alimentation et du conditionnement instrumental chez l'aplysie. Quelques évidences dans la littérature indiquent la présence potentielle de divers récepteurs dopaminergiques dans le SNC de l'aplysie. Par contre, l'identification de ces récepteurs ainsi que des cascades moléculaires modulées par ces protéines nous sont pour l'instant manquantes. Suite à notre criblage de la banque d'ADNc du SNC, nous avons cloné le premier récepteur dopaminergique chez l'aplysie. Même si nous voulions au départ caractériser de nouveaux récepteurs à 5-HT, l'identification d'un récepteur dopaminergique nous permettra de mieux comprendre comment les voies de signalisation dopaminergiques interagissent pour moduler la plasticité synaptique à la base des formes d'apprentissage et de mémoire chez l'aplysie. Par son expression dans le SNC, par son profil pharmacologique ainsi que par son activité constitutive, ce nouveau récepteur présente des caractéristiques inédites pour ce type de protéines.

4

An *Aplysia* dopamine 1-like receptor: molecular and functional characterization

Demian Barbas¹, Jacques P. Zappulla^{1a}, Stéphane Angers¹, Michel Bouvier¹, Habib A. Mohamed², John H. Byrne², Vincent F. Castellucci^{3,4}, Luc DesGroseillers^{1,4}

¹Département de biochimie, ³Département de Physiologie, ⁴Centre de recherches en sciences neurologiques, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7. ²W. M. Keck Center for the Neurobiology of Learning and Memory, Department of Neurobiology and Anatomy, The University of Texas Medical School at Houston, Houston, Texas 77030.

^aPresent address: INSERM U546, Hôpital de la Pitié Salpêtrière, 105 Boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France.

Correspondence author: Dr. Luc DesGroseillers, Département de biochimie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale "Centre-Ville", Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7, Tel: 514-343-5802, Fax: 514-343-2210, e-mail:

████████████████████

Running Title: Identification of a D1-like dopamine receptor in *Aplysia*.

Publié dans: soumis à *J. Neurochem.* (2005).

4.1 Abstract

In *Aplysia*, the neurotransmitter dopamine is involved in the regulation of various physiological processes and motor functions, like feeding behavior and in the siphon-gill

withdrawal reflex. In this paper, we report the cloning and characterization of the first *Aplysia* D1-like dopamine receptor (Ap_{dop1}) mainly expressed in the CNS, heart and buccal mass. Following expression of the Ap_{dop1} receptor in mammalian HEK293 cells, higher level of cAMP was observed in the absence of receptor ligand showing that Ap_{dop1} is constitutively active. This activity was blocked by the inverse agonist flupentixol. Application of dopamine (EC_{50} of 35 nM) or serotonin (EC_{50} of 36 μ M) to Ap_{dop1} -transfected HEK293 cells further increased the level of cAMP suggesting that the receptor is linked to the stimulatory G_s protein pathway. When expressed in cultured *Aplysia* sensory neurons, Ap_{dop1} immunoreactivity was observed in the cell body and neurites. Its expression in sensory neurons produced an increase in hyperpolarization in the absence of agonist and an increase in membrane excitability following simulation by dopamine. Stimulation of membrane excitability was observed in the presence of pertussis toxin to inhibit G_i proteins inhibitory pathway normally induced by dopamine in *Aplysia* sensory neurons. Ap_{dop1} sensitivity to dopamine makes it a potential modulator of operant conditioning procedure.

4.2 Introduction

Dopamine (DA) is involved in a large variety of physiological and behavioural processes in animals ranging from mollusk to mammals. This catecholamine plays a critical role in cognition and emotion, and the last decade has seen a large increase in the experimental evidence for a role in both synaptic plasticity and memory processes

(Wickens et al., 2003). Cellular responses to DA are mediated via G protein-coupled receptors (GPCR), and generally manifest their action by regulating adenylate cyclase activity. The DA receptors in vertebrate are classified into two major classes based on their sequence similarity and pharmacological profile: D1-like and D2-like receptors which include the D1 and D5 receptor subtypes and the D2, D3 and D4 receptor subtypes, respectively. D1-like receptors stimulate adenylyl cyclase and phosphatidylinositol (PI) metabolism whereas D2-like receptors inhibit adenylyl cyclase and activate K⁺ channels (Missale et al., 1998).

DA is a common neurotransmitter in molluscs (Carpenter et al., 1971; Luborsky & Jacklet, 1976; Gospe, 1983; Sugamori et al., 1994). In *Aplysia californica*, DA is found in the buccal ganglia, where it is involved in feeding behavior and in the appetitive operant conditioning procedure that induces long-term memory (Brembs et al., 2002). DA is also present in the neuropile of the pedal ganglia (McCaman et al., 1973; Jahan-Parwar & Fredman, 1978), in the peripheral nerves (Swann et al., 1982b) and in the gill (Peretz & Estes, 1974) where it modulates motor control. In particular, DA has been shown to enhance gill contractions following siphon touch and to prevent habituation of the gill and siphon withdrawal reflexes (Ruben & Lukowiak, 1979, 1983; Tritt & Byrne, 1982).

Binding assays with specific radiolabeled ligands to individual vertebrate receptor subtypes confirm the presence of D1-, D2-, D3- and D4-like receptors in *Aplysia* (Chandhoke et al., 2001). DA receptor binding was reported in the pleural, pedal

and cerebral ganglia, with the highest levels found in the pleural ganglia (Drummond et al., 1980). Lower levels of binding are seen on muscle tissue and nerves (Drummond et al., 1980). Similarly, dopamine-induced activation of adenylate cyclase was demonstrated in the gill (Kebabian et al., 1979; Weiss & Drummond, 1981). However, the molecular characterization of DA receptors and other dopaminergic signaling pathways is still lacking.

Due to the importance of *Aplysia californica* as an animal model in the understanding of dopamine action during learning and memory processes, the goal of this study was to clone the first dopamine receptor from this mollusk and develop a functional system to analyze this receptor. In this regard, a cDNA was isolated from CNS tissue of adult *Aplysia* that encodes a putative seven transmembrane G protein-coupled receptor.

4.3 Materials and methods

Animals and compounds—*Aplysia californica* weighing 100-200 g were purchased from the *Aplysia* Resource Facility (Miami, FL, USA) or from Marine Specimen Unlimited (Pacific Palisades, CA, USA), maintained in an aerated seawater tank at 15°C and fed every day *ad libitum*. [N-methyl-³H]lysergic acid diethylamide ([³H]LSD) and [³H]adenine were purchased from NEN (Mississauga, Ontario, Canada). ATP, cyclic AMP (cAMP), S(+)-apomorphine hydrochloride, (+)-butaclamol hydrochloride,

(±)Chloro-APB hydrobromide, (±)-6-Chloro-PB hydrobromide, dopamine hydrochloride, cis-(Z)-Flupentixol dihydrochloride, 5-hydroxytryptamine (5-HT), (±)-7-hydroxy-2-(di-*n*-propylamino) tetralin hydrobromide ((±)-7-OH-DPAT), R(+)-lisuride, isobutylmethoxyxanthine (IBMX), methiothepin mesylate, octopamine, pergolide mesylate salt, R(+)-SCH-23390 hydrochloride and spiperone were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada).

PCR amplification and cloning of *Ap_{dop1}* cDNA- PCR amplification with degenerate primers (Figure 4.1A; primers 1 and 2) of phage DNA (200 ng) isolated from an *Aplysia* random-primed λGT10 central nervous system cDNA library was previously described (Barbas et al., 2002). Phage DNAs was PCR-amplified for 40 cycles (94°C for 1.5 min, 40 °C for 2 min and 72 °C for 1 min) in the presence of two degenerate primers (800 ng each) corresponding to the highly conserved receptor sequences found in the sixth and seventh transmembrane (TM) domains: 5'-(G,C)IGCITT(T,C)ITIIITITG(C,T)TGG(C,T)TGG(C,T)TICCITT(C,T)TT-3', and 5'-TCIGGII(A,T)(G,A)AAIATIG(T,C)(G,A)TA(G,A)ATIA(T,C)IGG(A,C)TT-3'. PCR products were fractionated on a 4% agarose gel and a 144 bp fragment (*Ap_{dopA}*; Figure 4.1A)) was subcloned into pCR 2.1 plasmid (Invitrogen, Carlsbad, CA) and sequenced according to the Sequenase protocol (United States Biochemical Corp.). To clone the full-length cDNA of *Ap_{dop1}*, PCR-amplifications were done with *Aplysia* random-primed λGT10 central nervous system and kidney cDNA libraries. For 3'-RACE, a sense *Ap_{dop1}*-specific primer (5'-GTACGATCCGACGCTGATACC-3'; primer 3 in Figure 4.1A) and a λGT10 specific antisense primer (5'-

CTTATGAGTATTTCTTCCAGGGTA-3'; primer 4) were used. Two rounds of 5'-RACE were performed with *Ap_{dop1}* antisense primers (5'-GGTATCAGCGTCGGATCGTAC-3', primer 5; and then 5'-CGTGTCGTAATACAAAGCCTTGTGG-3', primer 7) and the λ GT10 specific sense primer (5'-AGCAAGTTCAGCCTGGTTAGTC-3', primer 6). Resulting products were subcloned into pZAPA/TA vector (Barbas et al., 2002) and sequenced. PCR-amplifications were performed with the proofreading polymerase Vent from New England Biolabs (Mississauga, Ontario, Canada). Overlapping sequences were read from multiple clones generated from independent PCR amplifications.

Transient expression of the *Ap_{dop1}* receptor- The coding region of *Ap_{dop1}* was PCR-amplified from *Aplysia* genomic DNA using the proofreading polymerase Pfu Turbo (Startagene, La Jolla, CA, USA) and the primer pair 5'-CCATCGATATCATGAACTTCAACCTCACGAACC-3' (primer 8 in Figure 4.1A; underlined: *Cla*I restriction site) and 5'-CTGGATCCCAACTCGCATCTTAGCAAGCC-3' (primer 9; underlined: *Bam*HI restriction site). The resulting product was subcloned in pZAPA/TA vector and sequenced. pZAPA/TA-*Ap_{dop1}* DNA was digested with *Cla*I and *Bam*HI and subcloned in frame with the c-myc epitope in pCDNA3/RSV/MYC. The pCDNA3/RSV/MYC plasmid was previously obtained by ligating complementary oligonucleotides coding for the c-myc epitope EQKLISEEDLN (Degols et al., 1991; Cravchik & Matus, 1993) to the pCDNA3/RSV vector (Jockers et al., 1996). Human embryonic kidney cells

(HEK293) were transfected with the recombinant plasmid by the calcium phosphate procedure. Cells were collected 48 hours post-transfection for functional assays.

For immunofluorescence, transfected HEK293 cells were incubated with the anti-myc 9E10 monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) or with a mouse anti α -tubulin antibody (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA) before or after cell permeabilization as previously described (Barbas et al., 2002). Cells were then incubated with an Alexa Fluor 594 anti-mouse secondary antibody (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) and visualized by immunofluorescence, using a Nikon Eclipse E800 microscope (Nikon, Melville, NY, USA) equipped with a CoolSnap fx 12 bits CCDs camera (Roper Scientific, San Jose, Ca, USA). Images were analyzed with the MetaMorph 5.0 software (Universal Imaging Corporation, Downingtown, PA, USA).

Generation of anti- $A_{p_{dop1}}$ antibody- Detection of the $A_{p_{dop1}}$ protein was performed with a rabbit polyclonal antibody raised by a commercial vendor (Genemed Synthesis, San Francisco, CA, USA) against a peptide whose sequence (AAYDPTLIPHKV) was derived from the third extracellular loop. Specificity of the antibody was evaluated. The anti- $A_{p_{dop1}}$ recognizes only the *myc* tagged $A_{p_{dop1}}$ receptor expressed in HEK293 cells. No immunoreactivity was observed when cells extract were incubated with the immune peptide.

Immunoprecipitation and Western blot analysis- For immunoprecipitation of Ap_{dop1} protein, transfected cells were harvested 72 h post-transfection, washed three times in PBS and incubated in the blocking buffer (PBS containing 0.2% bovine serum albumin) for 1h on ice. Cells were lysed and proteins were solubilized in the radioimmune precipitation buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM iodoacetamide, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.1 mg/ml benzamidine, 2.5 µg/ml leupeptin) for 30 min on ice and centrifuged at 12,000 × g for 15 min at 4 °C to remove cellular debris. Cell lysates were incubated with the mouse monoclonal anti-*myc* (9E10) antibody (1:250 dilution) in the blocking buffer overnight at 4°C before the addition of protein A-Sepharose for 4h. Immunoprecipitates were washed four times with the cold radioimmune precipitation buffer, resuspended in sample buffer (60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 4 M urea, and 100 mM dithiothreitol) and heated at 50°C. Protein concentration was evaluated with the DC Protein assay kit (Bio-Rad, Mississauga, Ontario, Canada) using bovine serum albumin as standard. Protein samples were resolved by 8% SDS-PAGE electrophoresis, transferred to nitrocellulose membrane, immunoblotted with rabbit polyclonal anti-*myc* antibodies (1µg/ml) (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) and revealed with a Renaissance chemiluminescence kit (PerkinElmer Life Sciences, Montréal, Qc, Canada).

cAMP measurement- cAMP content was measured by a pre-labelling technique as previously described (Salomon et al., 1974; Barbas et al., 2002). Total cAMP accumulation was measured by assessing the transformation: $\frac{[^3\text{H}]\text{cAMP}}{[^3\text{H}]\text{ATP} + [^3\text{H}]\text{cAMP}} \times 1000$.

Isolation of *Aplysia* sensory neurons- Adult animals were anaesthetized by injection of 60-100 ml of isotonic MgCl₂ solution. Pleuropedal ganglia were removed, desheathed and digested in 1% protease-artificial seawater. Sensory neurons (SNs) from the ventrocaudal cluster of the pleural ganglia were mechanically dissociated and transferred to separate dishes (Falcon #1008; Becton Dickinson Canada Inc., Mississauga, Canada) containing L-15 medium (modified for *Aplysia*) (Schacher & Proshansky, 1983) supplemented with hemolymph (7%) and bovine serum albumin (0.01%). Sensory neurons were separated from cell debris, plated and allowed to adhere in L15-containing dishes (Falcon #3001; Becton Dickinson Canada Inc., Mississauga, Canada).

Expression of *Ap_{dop1}-eGFP* in sensory neurons- Full-length *Ap_{dop1}* cDNA was PCR-amplified with the proofreading polymerase Pfu Turbo (Startagene, La Jolla, CA, USA) and the primer pair 5'-CGGTCGACATGATCATGAACTTCAACCTC-3' (underlined: *SalI* restriction site) and 5'-CCGGATCCTTGCAAGCCGCATTCTTTC-3' (underlined: *Bam*HI restriction site). The product was subcloned in pZAPA/TA vector, sequenced, digested with *SalI* and *Bam*HI and subcloned in frame with eGFP-NI (Clontech, Palo Alto, CA, USA) in the pNEX-3 vector (gift from Dr. W. S. Sossin, McGill University) (Kaang, 1996). Microinjection of *Ap_{dop1}-eGFP* plasmid DNA (1 µg/µl DNA and 2% fast green in distilled water) was done with backfilled glass pipettes (~5 MΩ) using a pico-injector (PLI-100; Medical Systems, Greenvale, NY, USA). After impalement, sensory neurons were rapidly filled by delivering short air puffs (10-40 psi) until the cell soma became uniformly green. Injected sensory neurons were visualized at

4x and 10x with a Nikon fluorescence microscope (Optiphot-2) equipped with a BM510 filter (Nikon, Tokyo, Japan). For expression analysis, microinjected sensory neurons were fixed in 2% paraformaldehyde-ASW and processed for immunofluorescence. Confocal microscopy was performed with a Zeiss (North York, Ontario, Canada) LSM 510 confocal laser microscope. Images were analyzed using the Zeiss LSM 510 software.

4.4 Results

4.4.1 Cloning of an *Aplysia* dopamine receptor

We previously took advantage of the sequence conservation within transmembrane domains six and seven of serotonergic GPCRs to isolate DNA fragments encoding serotonin receptors in *Aplysia* (Barbas et al., 2002; Angers et al., 1998). We applied this same strategy, to attempt to clone a dopamine receptor. From the sequence of a first 144 bp PCR product (Figure 4.1A; Ap_{dopA}), specific oligonucleotide primers were designed for 3'- and 5'-RACE to PCR-amplify a complete cDNA. Three overlapping clones (ApdopB, ApdopC and ApdopD) covering 1551 bp were amplified and cloned (Figure 4.1A). The reconstituted cDNA contained an open reading frame coding for a putative protein of 450 amino acids with a predicted molecular weight of 50 kDa. Amino acid sequence comparisons between the Ap_{dop1} receptor and other invertebrate GPCRs show significant sequence identity with the AmDOP1 receptor

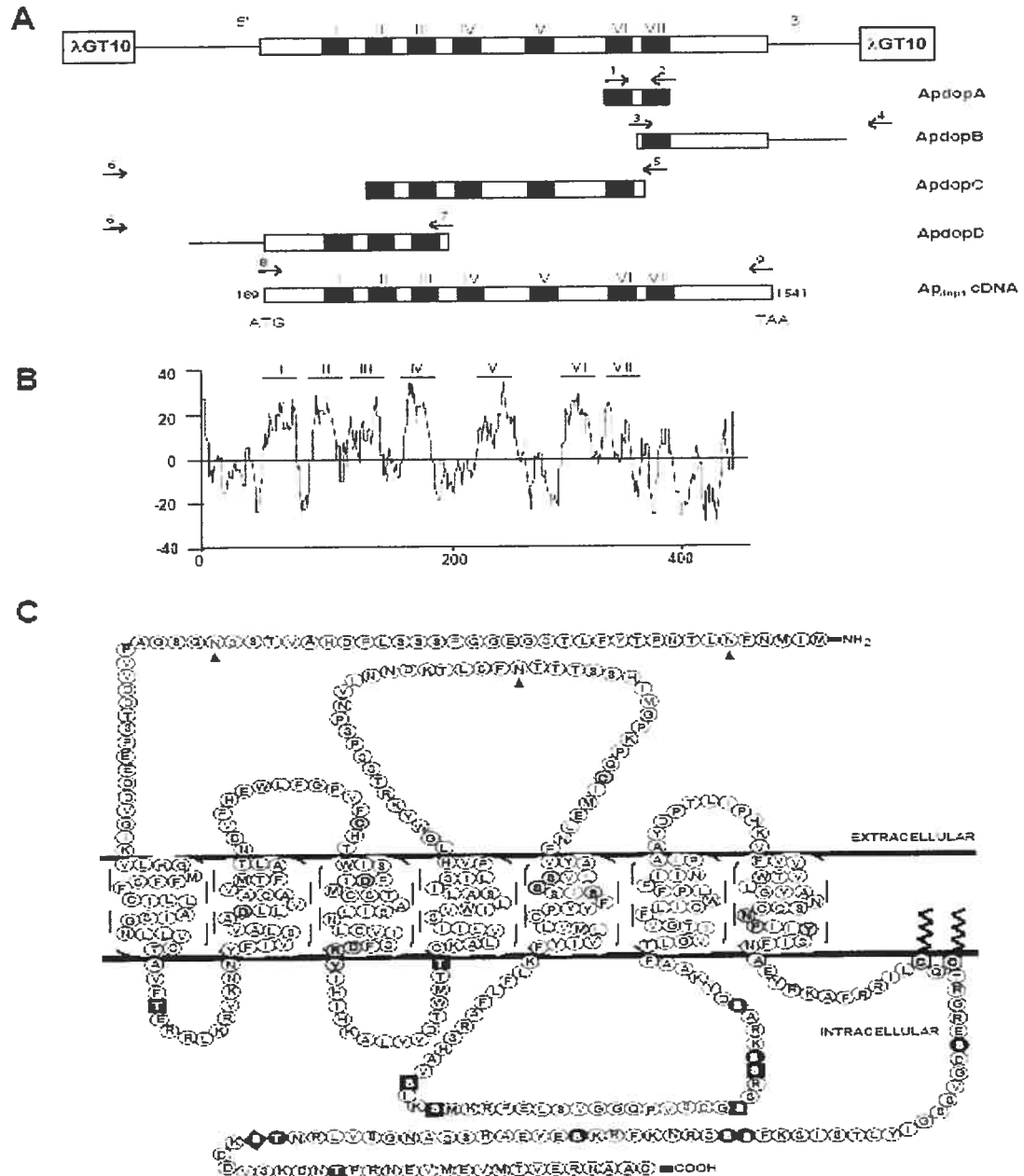


Figure 4.1- Ap_{dop1} receptor sequence and structure. (A) Molecular cloning of the Ap_{dop1} receptor cDNA. The ApdopA fragment was PCR-amplified from DNA isolated from a CNS cDNA library using two degenerate oligonucleotide primers (1 and 2) derived from conserved sequences in transmembrane domains VI and VII of GPCRs. The ApdopB, ApdopC and ApdopD were isolated from CNS and kidney cDNA libraries by PCR-amplification using AP_{dop1}-sequence specific primers (3, 5 and 7) and phage-specific primers (4 and 6). The reconstituted full-length cDNA was amplified from genomic DNA with AP_{dop1}-specific primers (8 and 9). Primers positions, as described in the materials and methods, are indicated. The open reading frame is represented by boxes and the transmembrane domains are indicated by the black regions. Lines represent the 5' and 3' untranslated regions. (B) Hydrophobicity plot of the deduced Ap_{dop1} amino acid sequence. Regions above the dotted line are hydrophobic. Transmembrane domains are numbered and indicated. The hydropathy plot was done using the method of Kyte and Doolittle (Kyte & Doolittle, 1982). (C) Schematic representation of Ap_{dop1} sequence and structure. Amino acids are given in single letter code. Amino acids that are conserved among GPCRs are indicated by (*). Potential N-linked glycosylation sites (▲) and consensus sites for phosphorylation by protein kinase A (PKA) (●), protein kinase C (PKC) (■) and casein kinase II (CKII) (◆) are indicated. Transmembrane domains (◻), extracellular and intracellular regions are also identified. Potential palmitoylation sites are indicated (⊙). The nucleotide sequence for Ap_{dop1} has been deposited into the GenBank database and is available under accession number AY918891.

(43%), a D1-like dopamine receptor from *Apis mellifera* (Figure 4.2B) (Blenau et al., 1998). Consistently, we named this novel protein Ap_{dop1}.

4.4.2 Structural characteristics of the Ap_{dop1} receptor

The deduced Ap_{dop1} protein shared many characteristics in common with members of the GPCR family and, more specifically, with dopamine receptors. As expected, hydrophobicity analysis revealed the presence of seven transmembrane domains (Figure 4.1B). Many key amino acids conserved through evolution were also present in Ap_{dop1} (Figure 4.1C), in particular the tripeptide DRY (Asp¹⁵² – Arg¹⁵³ – Tyr¹⁵⁴) in the cytoplasmic end of the predicted third transmembrane domain and the NPXXY motif (Asn³²⁵ – Pro³²⁶ – Tyr³²⁹) in the predicted seventh transmembrane domain. These residues were shown to be important for activation of receptors of the GPCR 1A subfamily (Boess & Martin, 1994; Oliveira et al., 1994; Bockaert & Pin, 1999). Single cysteine residues (Cys¹²⁸ and Cys²²⁸) in the first and second extracellular loop were also conserved. These cysteines are important to stabilize the functional receptor structure by forming disulfide bond (Dixon et al., 1987; Fraser, 1989). Two aspartate residues in the second (Asp¹⁰⁰) and third (Asp¹³⁵) transmembrane domains were conserved in all catecholamine receptors where they are important for binding of the amine groups of catecholamine (Strader et al., 1988). Three serine residues in the fifth transmembrane domain in Ap_{dop1} receptor (Ser²⁴², Ser²⁴³ and Ser²⁴⁶) which are postulated to interact with the catecholamine ring hydroxyl groups (Strader et al., 1989; Pollock et al., 1992) were

also present in Ap_{dop1}. Thus, the Ap_{dop1} receptor has the important amino acid side chains required for binding dopamine.

The Ap_{dop1} receptor may potentially undergo several post-translational modifications (Figure 4.1C): (i) N-glycosylation in the extracellular N-terminal region and in the second extracellular loop; (ii) phosphorylation by protein kinase A, protein kinase C and casein kinase II. Ap_{dop1} receptor could also undergo post-translational palmitoylation at conserved cysteine residues in the C-terminal tail, probably to anchor its cytoplasmic tail to the membrane (O'Dowd et al., 1989; Mouillac et al., 1992). Its short third cytoplasmic loop is reminiscent of members of D1-like receptors and of many receptors coupled to G_s proteins (Missale et al., 1998) (Figure 4.1C). We can also notice that the second extracellular loop of Ap_{dop1} (44 amino acids) is longer than what we usually observed for D1 receptor subtypes (27 amino acids), but reminiscent of D5 receptor (41 amino acids) (Missale et al., 1998) (Figure 4.1C).

A dendogram analysis placed Ap_{dop1} within members of the mammalian D1-like receptor family, closely related to the AmDOP1 receptor (Figure 4.2A). Further amino acid sequence comparisons between the Ap_{dop1} receptor and other D1-like receptors showed significant sequence identity, especially with invertebrate D1-like receptors (Figure 4.2B). Ap_{dop1} also shared sequence identity with the *Aplysia* Ap5-HT_{B2} receptor, a serotonin receptor that stimulates phospholipase C (Li et al., 1995).

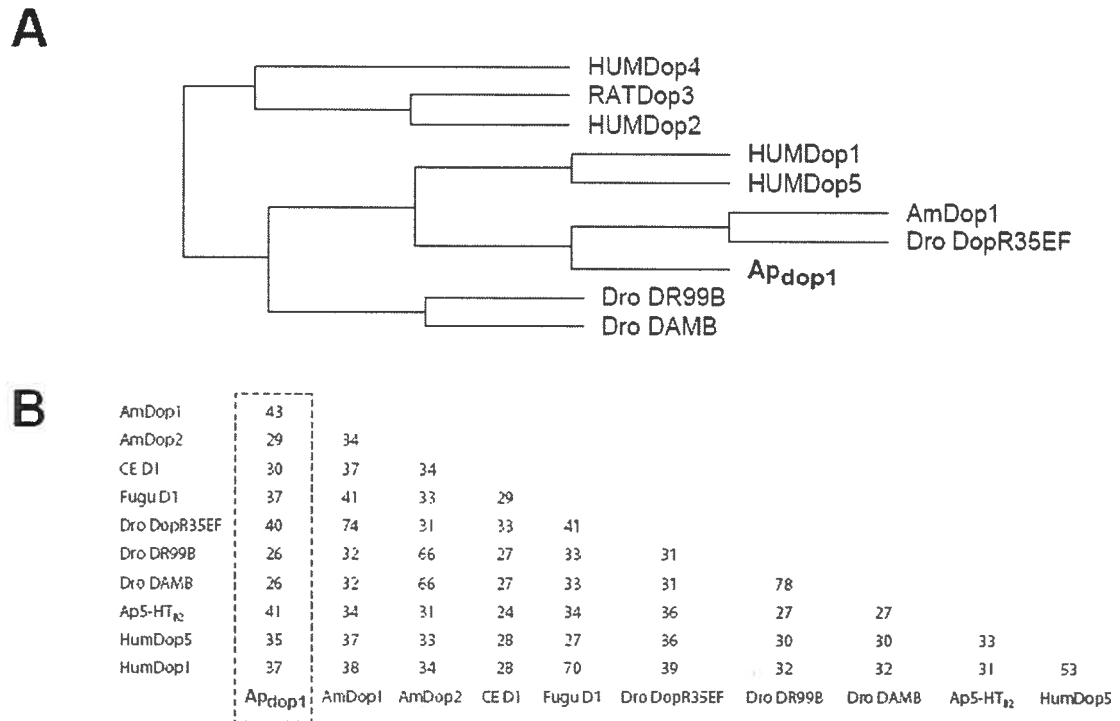


Figure 4.2- **Structural relationship of Ap_{dop1} with other dopamine receptors.** (A) Dendrogram analysis of different dopamine receptors. Sequences of dopamine receptors were compared and aligned using the ClustalW (Thompson et al., 1994) which was executed from GDE (Genetic Data Environment). Only amino acid positions that could be aligned without ambiguity were used for the analysis. The alignment was then used for phylogenetic comparisons using the PHYLIP package (J. Felsenstein, 1993, Phylip, Phylogeny Inference Package, version 3.5.1c and 3.6, University of Washington, Seattle, WA). Analysis was performed with a bootstrap procedure that computes the probability of occurrence of the branches for 1000 possible trees. Branching order was determined using the Fitch-Margoliash algorithm included in the PHYLIP package. Only branches occurring in >800 trees are represented. (B) Percentage of amino acid sequence identity among different D1-like receptors from several species. The Ap5-HT_{B2} serotonin receptor from *Aplysia* was also included. Am, *Apis mellifera*; Ap, *Aplysia*; CE, *Caenorhabditis elegans*; DRO, *Drosophila*; FUGU, *Fugu rubripes* (pufferfish); HUM, Human; RAT, *Rattus*.

4.4.3 Ap_{dop1} protein distribution

To determine the protein distribution of this receptor, plasma membrane extracts from various *Aplysia* tissues were prepared and analyzed by immunoblotting. Using the anti-Ap_{dop1} antibody, a major band of around 100 kDa was detected in membranes isolated from the central nervous system and the heart. Weaker signals were obtained from extracts of the buccal mass (Figure 4.3). Overexposure of the Western blot revealed the presence of the protein in the kidney and ovotestis extracts (data not shown). In the central nervous system, the protein was detected in the buccal ganglia (Figure 4.3). No immunoreactivity was observed when extracts were preincubated in the presence of the immune peptide, demonstrating the specificity of the antibody.

4.4.4 Transient expression of Ap_{dop1} in HEK 293 cells

To characterize the pharmacological profile of the Ap_{dop1} receptor, a c-myc tag was fused at its N-terminus and the myc-Ap_{dop1} protein was transiently expressed in HEK 293 cells. Expression of the receptor was monitored with anti-myc monoclonal and/or polyclonal antibodies. On a Western blot prepared with immunoprecipitated protein, several bands were observed indicating that the receptor is expressed (Figure 4.4A). To characterize these bands and the sub-cellular location of the receptor within the cells, endoglycosidase treatments were performed. While bands are resistant to endoglycosidase H treatment, their size was reduced following endoglycosidase F treatment (Figure 4.4A), suggesting that the receptor was properly targeted to the plasma membrane in HEK 293 cells and was not retained in the

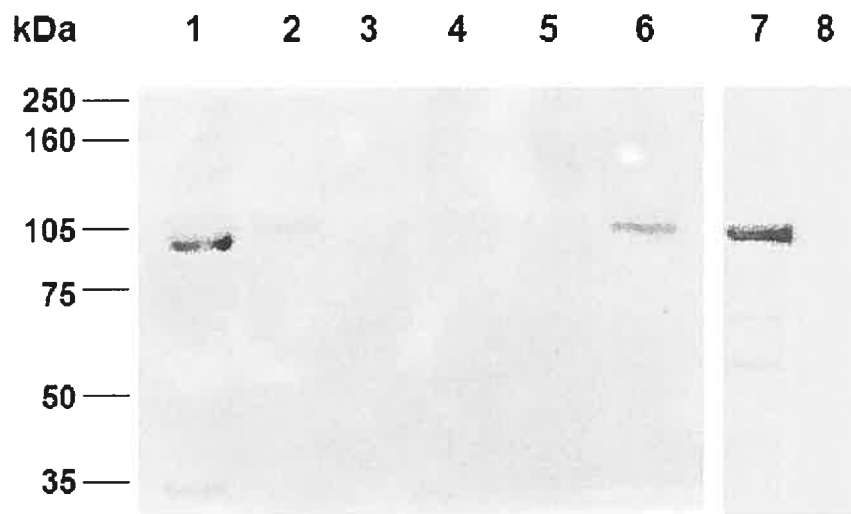


Figure 4.3- **Tissue distribution of the Ap_{dop1} receptor in *Aplysia*.** Western blot analysis of proteins isolated from different tissues. Membrane protein extracts (30 μ g) were resolved by SDS-PAGE and analyzed with anti-Ap_{dop1} antibody. CNS (*lane 1*), buccal mass (*lane 2*), kidney (*lane 3*), gill (*lane 4*), ovotestis (*lane 5*), heart (*lane 6*), buccal ganglia (*lane 7*; 50 μ g) and buccal ganglia preincubated with the peptide used to raise the antibody (*lane 8*; 50 μ g) were analyzed. Position of the molecular weight markers is indicated.

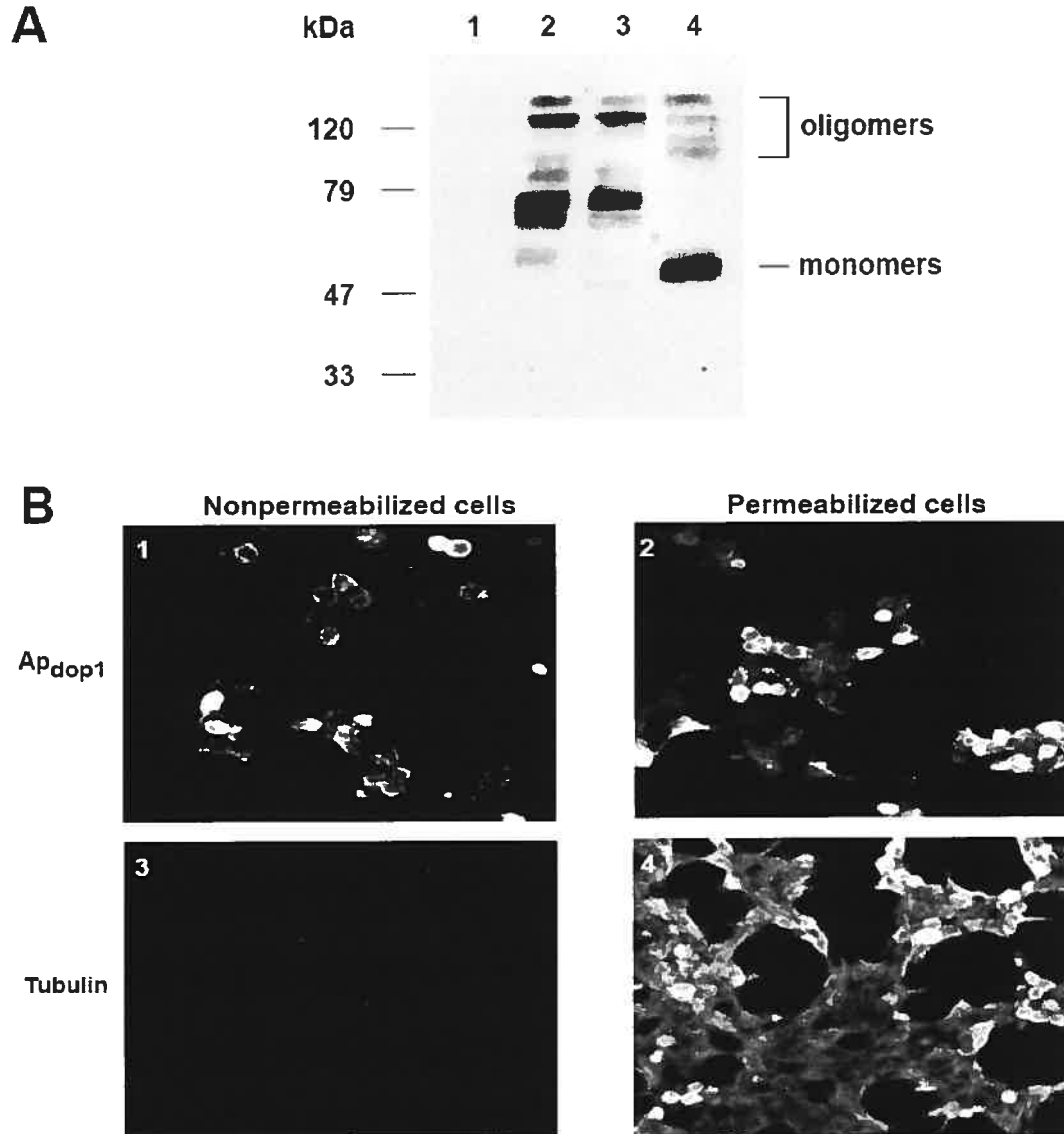


Figure 4.4- Expression of the Ap_{dop1} receptor at the cell-surface. (A) Western blot analysis of Ap_{dop1} in transfected HEK293 cells. HEK293 cells were transfected with cDNA coding for the *myc*-tagged Ap_{dop1} receptor. Total cell extracts were immunoprecipitated (lane 2) and digested with endoglycosidase H (lane 3) or deglycosidase F (lane 4). Proteins were separated on a 8% SDS-polyacrylamide gel and detected with a polyclonal anti-*myc* antibody. Cells transfected with the pCDNA3/RSV vector alone (lane 1) were used as control. Position of the molecular weight marker positions is indicated. (B) Membrane localization of Ap_{dop1} in transiently transfected HEK293 cells. HEK293 cells were transfected with cDNA coding for the *myc*-tagged Ap_{dop1} protein. Cells were labeled with anti-*myc* (1 and 2) or anti α -tubulin (3 and 4) antibodies before (1 and 3) or after (2 and 4) permeabilization with Triton X-100.

endoplasmic reticulum. In addition, the endoglycosidase F treatment showed that the core receptor has the size expected from the cDNA clone (50 kDa) and that the receptor is glycosylated. Bands of higher molecular weight may represent dimers and even oligomeric forms of the receptor. Oligomerization of dopamine receptors has recently been reported and is a pivotal aspect of the structure and function of GPCRs (Bouvier, 2001; Lee et al., 2003). Expression to the cell-surface of the *myc*-tagged protein was then confirmed by immunofluorescence analyses of nonpermeabilized and permeabilized transfected cells (Figure 4.4B). The Ap_{dop1} receptor was labeled with the anti-*myc* antibody on non-permeabilized cells showing that it reached the membrane and that its N-terminal extremity was on the extracellular side. In the same conditions, α -tubulin, an intracellular marker was not detected. Immunofluorescence signals for the Ap_{dop1} receptor and for α -tubulin were detected upon cell permeabilization (Figure 4.4B, right panels).

4.4.5 Stimulation of second messenger pathway

Based on Ap_{dop1} similarity with members of the D1-like receptor family, we next tested whether the Ap_{dop1} receptor is able to activate adenylyl cyclase. Interestingly, transfection of cDNA coding for Ap_{dop1} in HEK 293 cells (Figure 4.5) revealed that the receptor displays ligand-independent activity (Lefkowitz et al., 1993). Indeed, a large increase in the cAMP level was observed even in the absence of any agonist (Figure 4.5A). These data provides evidence that Ap_{dop1} is a constitutively active receptor. We next tested the ability of flupentixol to act as an inverse agonist, as demonstrated for

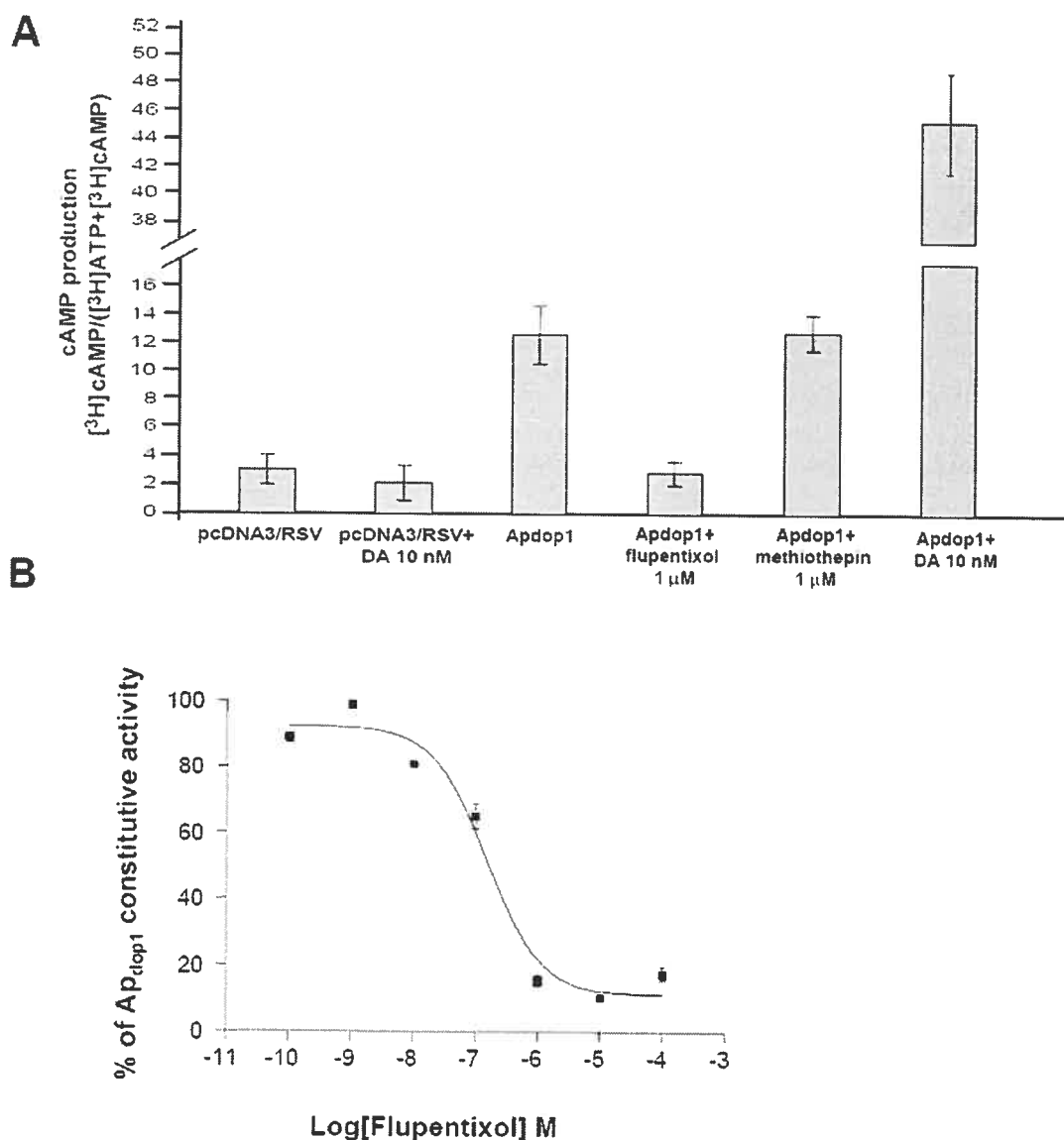


Figure 4.5- **Relative levels of intracellular cAMP in Ap_{dop1} expressing cells.** (A) HEK293 cells were transfected with either pcDNA3/RSV or pcDNA3/RSV/Ap_{dop1} vectors. They were then left untreated or stimulated with dopamine (10 nM), flupentixol or methiothepin (1 μM). cAMP accumulation was measured by assessing the transformation of [³H]ATP into [³H]cAMP as described previously (Wong et al., 1991). The values are the mean of fifteen experiments done in duplicate. (B) Effect of flupentixol on cAMP level in Ap_{dop1} expressing cells. cAMP levels are expressed as a percentage of the value obtained in the absence of flupentixol (100%). The values are the mean of an experiment done in duplicate and are representative of three such experiments. Data were analyzed by a computer-assisted nonlinear analysis (GraphPad PRISM 3.0).

other dopamine receptors with constitutive activity (Mustard et al., 2003; Sanyal et al., 2004). Treatment of the cells with flupentixol decreased cAMP constitutive production in a dose-dependent way, with an EC_{50} of 155 nM (Figure 4.5B). As a control, methiothepin, a selective 5-HT receptor antagonist, was not efficient in inhibiting the constitutive activity of Ap_{dop1} receptor, even at a concentration of 1 μ M (Figure 4.5A). These data show that the Ap_{dop1} receptor has ligand-independent activity and that flupentixol is an inverse agonist for this receptor.

Treatment of Ap_{dop1} transfected cells with DA increased the level of cAMP in a dose-dependent manner (Figure 4.5A, 4.6A) suggesting that the Ap_{dop1} receptor is coupled to G_s protein. The EC_{50} for dopamine was in the nanomolar range (Table 4.1). Interestingly, 5-HT and octopamine also stimulated adenylyl cyclase activity when bound to Ap_{dop1} but with lower potencies (Figure 4.6A and Table 4.1). Following dopamine, 5-HT or octopamine application, cAMP levels never increased on control HEK 293 cells that did not express the Ap_{dop1} receptor.

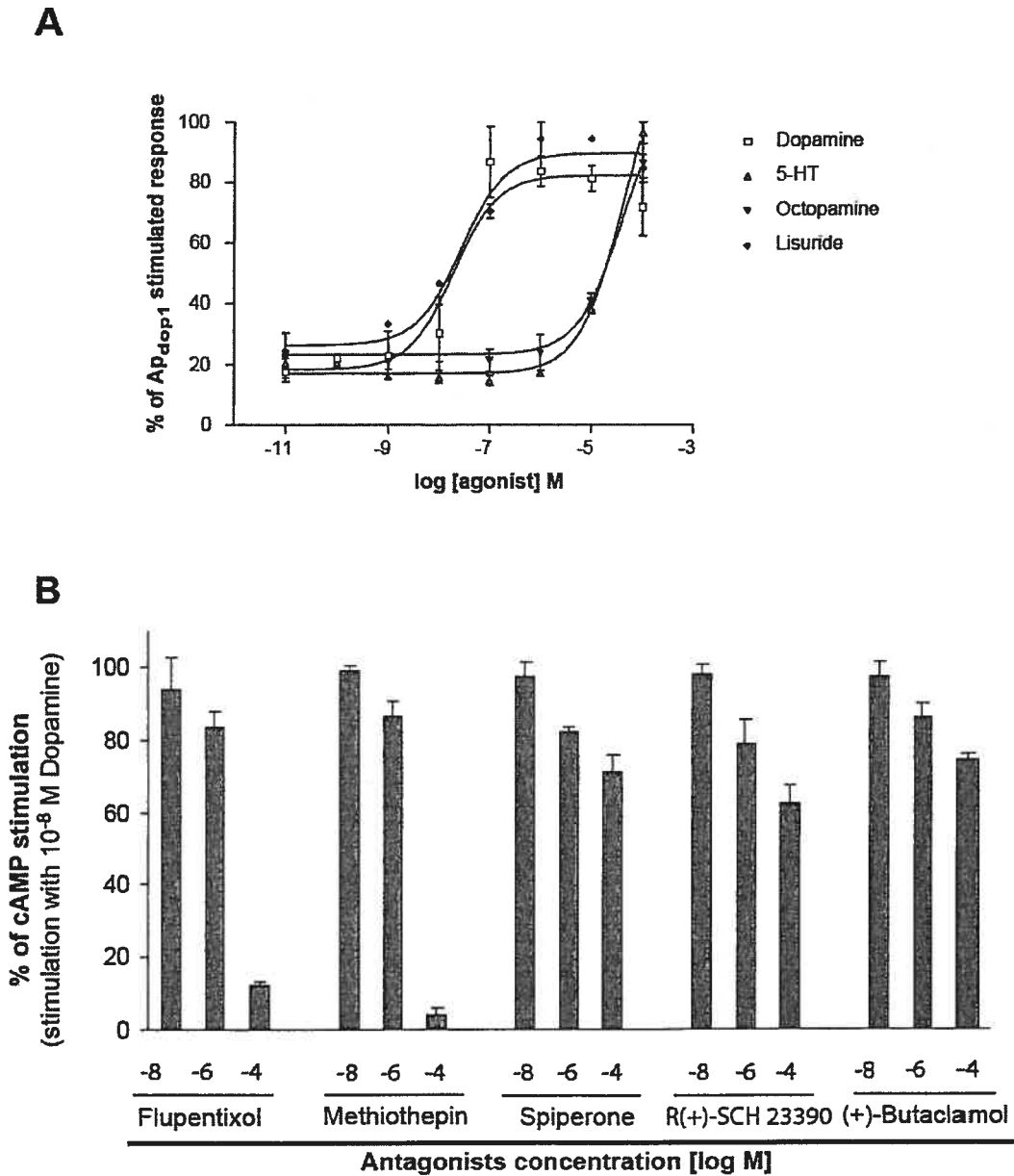


Figure 4.6- Pharmacological profile of A_{pDop1} receptor. (A) Agonist stimulation of A_{pDop1} increased the level of intracellular cAMP. HEK293 cells transfected with cDNA coding for A_{pDop1} were incubated in the presence of increasing concentrations of agonists. Intracellular cAMP level were expressed as a percentage of the maximal response (100%). The values are the mean of an experiment done in triplicate and are representative of three experiments. Data were analyzed by a computer-assisted nonlinear analysis (GraphPad PRISM 3.0). (B) Antagonists specificity. Transfected cells were stimulated with dopamine (10^{-8} M) and incubated in different concentrations of antagonists. Intracellular cAMP levels are expressed as a percentage of the value obtained with dopamine (100%) in the absence of antagonists. The values are the mean of an experiment done in triplicate and are representative of three experiments. Data were analyzed by a computer-assisted nonlinear analysis (GraphPad PRISM 3.0).

Table 4.1- Comparison of potency of various agonists in activation of $A_{p_{dop1}}$ receptor in transiently transfected HEK 293 cells.

Drug	Specificity	EC ₅₀ (nM)
Dopamine	DA receptors	35
Serotonin	5-HT receptors	36 070
Octopamine	OA receptors	3 430
R(+)-lisuride	D ₂ receptors	3
Pergolide	D ₁ /D ₂ receptors	50
(±)-Chloro-APB	D ₁ receptors	66
(±)-Chloro-PB	D ₁ receptors	205
(±)-7-OH-DPAT	D ₃ receptors	169
Apomorphine	DA receptors	552

Estimated potencies are given as EC₅₀ values in nanomolar concentrations and were determined by a computer-assisted nonlinear curve analysis (GraphPad PRISM 3.0 computer program). EC₅₀ values for $A_{p_{dop1}}$ receptor are expressed as the mean of three different determinations.

4.6 Pharmacological characterization of heterologously expressed

$A_{p_{dop1}}$ receptor

To determine the pharmacological profile of $A_{p_{dop1}}$, membrane fractions of transfected cells were incubated in the presence of the radioligand [³H]LSD ([N-*methyl*-³H]lysergic acid diethylamide) as done before with AmDOP1 (Blenau et al., 1998).

Although high-affinity binding was measured, saturation was never obtained (not shown). To circumvent this problem, several synthetic dopamine agonists known to activate vertebrate dopamine receptor subtypes were tested for their ability to modulate cAMP levels. The rank order of potency (EC_{50}) of these various agonists is listed in Table 4.1. As expected, DA was the most potent agonist for the receptor compared to serotonin and octopamine. The pharmacological profile of Ap_{dop1} receptor is not similar to the one reported for mammalian D1-like receptor (Table 4.1).

Similarly, we tested the ability of various dopaminergic antagonists to inhibit the Ap_{dop1} -dependent stimulation of adenylyl cyclase in response to dopamine application. Transfected and control cells were treated with 10^{-8} M dopamine (near the EC_{50} value of 35 nM) and increasing concentrations of different antagonists. The capacity of these compounds to inhibit 50% of the response was calculated. Flupentixol (a mixed D1/D2 dopamine receptor antagonist) and surprisingly methiothepin (a 5-HT receptor antagonist) were the only compounds able to inhibit at least 85% of the cAMP increase resulting from dopamine binding to the Ap_{dop1} receptor (Figure 4.6B). Spiperone (a selective D2 dopamine antagonist), R(+)-SCH 23390 (a selective D1 antagonist) and (+)-Butaclamol (a non specific dopamine receptor antagonist) did not significantly inhibit Ap_{dop1} -dependent cAMP production (Figure 4.6B). Altogether, these results show that classical dopaminergic antagonists are not efficient at inhibiting Ap_{dop1} activation.

4.4.7 Expression of the $A_{p_{dop1}}$ receptor in *Aplysia* sensory neurons

To further characterize the receptor in a more physiological context, we studied its distribution and physiological properties in cultured *Aplysia* sensory neurons. To determine its distribution in the cells, sensory neurons were microinjected with the pNEX-3/ $A_{p_{dop1}}$ -eGFP cDNA, fixed and observed by confocal microscopy seventy-two hours post injection. $A_{p_{dop1}}$ receptor was expressed in these cells and found both in the cell body (Figure 4.7A) and in neurites (Figure 4.7B). As control, pNEX-eGFP was randomly expressed in the nucleus and cytoplasm (Figure 4.7C). No fluorescence was observed when the pNEX vector alone was injected (Figure 4.7D).

We then performed electrophysiological recording to study the effect of dopamine on sensory neurons that expressed the $A_{p_{dop1}}$ receptor. Summary data are presented in Table 4.2. As controls, sensory neurons were injected with plasmid coding for eGFP. Uninjected cells and sensory neurons expressing eGFP responded as expected to 5-HT application, by an increase in membrane excitability (Figure 4.8A). Also, injection of plasmids coding for the octopamine receptor A_{poa1} from *Aplysia* (generous gift from Dr. BK Kaang, Seoul National University) (Chang et al., 2000) increased membrane excitability following exposure to octopamine as reported (Figure 4.8B) (Chang et al., 2000). The A_{poa1} receptor, a G_s -coupled octopamine receptor, efficiently stimulated neuronal activity presumably after activation of the adenylyl cyclase. These results showed that injection and expression of a foreign protein does not change the electrophysiological properties of the cells.

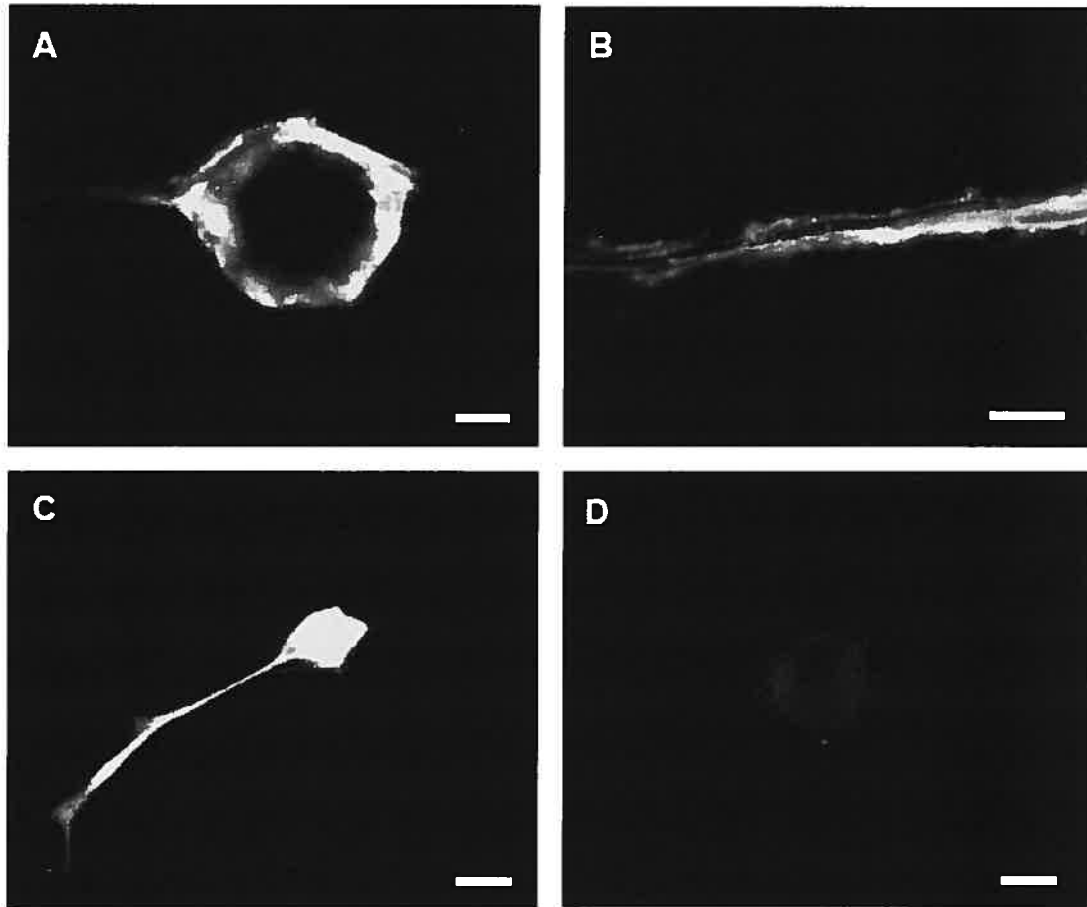


Figure 4.7- Expression of the Ap_{dop1} receptor in *Aplysia* sensory neurons. *Aplysia* sensory neurons were microinjected with either pNEX-3/ Ap_{dop1} -eGFP (A-B), pNEX-3/eGFP (C) or pNEX-3 (D) cDNA and visualized by confocal microscopy. Expression of the Ap_{dop1} receptor was seen both in the cell body (A) and neurites (B). Scale bar in A= 10 μ m; B= 10 μ m; C= 20 μ m; D= 20 μ m.

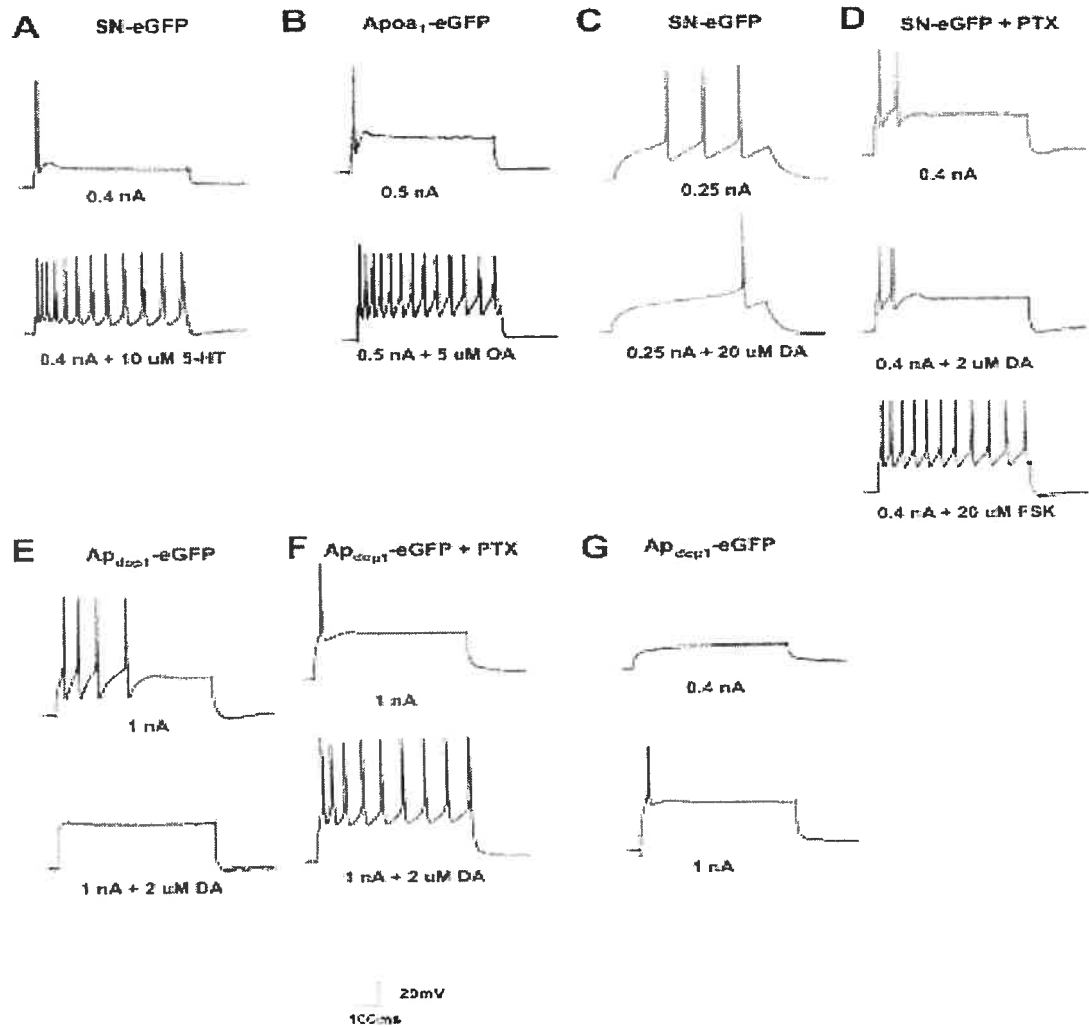


Figure 4.8- **Electrophysiological responses following agonist stimulation of microinjected sensory neurons.** Membrane excitability of injected eGFP- (A, C, D), Apoa₁-eGFP- (B) or Ap_{dop1}-eGFP- (E, F, G) expressing sensory neurons was tested in the absence (upper curves) or presence (lower curves) of 5-HT (A), octopamine (OA) (B) or dopamine (C, D, E, F). Application of 5-HT or octopamine increased membrane excitability. In contrast, dopamine decreased membrane excitability in sensory neurons even if the Ap_{dop1} receptor is expressed (D, E). This inhibition was overcome by pertussis toxin (PTX) treatment (D, F), an inhibitor of Gi proteins. PTX action did not affect ability to stimulate the adenylyl cyclase as demonstrated by treatment with forskolin (FSK) (D). Traces are representative of several recordings (Table 4.2).

Table 4.2- Summary data of electrophysiological responses.

Data sample identification	Number of spike before drug application	Drug	Number of spike after drug application	Number of cells examined
SN-eGFP (A)	1 spike	5-HT	8-13 spikes	n= 6
Apoa ₁ -eGFP (B)	1 spike	OA	9-13 spikes	n= 4
SN-eGFP (C)	3-4 spikes	DA	0-2 spikes	n= 5
SN-eGFP + PTX (D)	1-2 spikes	DA FSK	0-2 spikes 10-12 spikes	n= 4
Ap _{dop1} -eGFP (E)	3-4 spikes	DA	0-1 spikes	n= 7
Ap _{dop1} -eGFP + PTX (F)	1 spike	DA	9-11 spikes	n= 8

Representative traces are presented in Figure 4.8. 5-HT: serotonin; DA: dopamine; OA: octopamine; FSK: forskolin.

As expected, application of dopamine decreased membrane excitability (Figure 4.8C), confirming the hypothesis of a general dopamine inhibitory response in sensory neurons (Ascher, 1972). Sensory neurons were incubated in the presence of pertussis toxin (PTX; 50 ng/ml), a known G_i-protein inhibitor. In these conditions, the inhibitory effect of DA was prevented indicating that endogenous DA receptors interact with a PTX-sensitive G protein (Figure 4.8D). Nevertheless, in these conditions, facilitation, following cAMP increase, can still be triggered as observed after treatment with forskolin (FSK; 20 μM), showing that PTX did not inhibit cyclase activity. When injected with plasmid coding for the Ap_{dop1} receptor, sensory neurons still showed an inhibitory response following dopamine application at concentrations sufficient to induce maximal response of the receptor (Figure 4.8D). This was unexpected since the

receptor activates adenylyl cyclase in HEK 293 cells and by consequence should increase membrane excitability (Bernier et al., 1982). To test whether the inhibitory PTX-sensitive pathway masks the function of $A_{p_{dop1}}$, pNEX-3/ $A_{p_{dop1}}$ -eGFP-injected sensory neurons were cultured in the presence of PTX before application of DA. In these conditions, DA induced an increase in membrane excitability (Figure 4.8F). In addition, more current was necessary to induce spiking of the neuron, indicating that the mere presence of the receptor changes the state of excitability of the neuron (Figure 4.8G). The level of current necessary to induce spiking in neurons expressing the $A_{p_{dop1}}$ receptor varied between 0.8 to 1.2 nA ($n=7$), and 0.25 to 0.4 nA in neurons not expressing $A_{p_{dop1}}$ receptor (Figure 4.8A-D).

4.5 Discussion

The present study describes for the first time the characterization of a dopamine receptor in *Aplysia californica*. The $A_{p_{dop1}}$ receptor is a D1-like dopamine receptor since it stimulates adenylyl cyclase after binding of DA. The full-length nucleotide sequence encodes a protein of 450 amino acids, which shows conserved features of GPCRs, including the presence of seven predicted transmembrane domains, residues known to be important for receptor activation and many potential post-translational modification sites involved in mechanisms controlling receptor activity (Ng et al., 1994). However, the $A_{p_{dop1}}$ receptor lacks sequences previously described in mammalian D1 receptors

(Bernak et al., 2001; Vargas & von Zastrow, 2004) as being important for receptor recycling and for export from the endoplasmic reticulum.

4.5.1 Pharmacological properties of the $A_{p_{dop1}}$ receptor

The rank order of potency of various agonists in regard to adenylyl cyclase stimulation unequivocally establishes the $A_{p_{dop1}}$ receptor in the family of dopamine receptors. The pharmacological profile of $A_{p_{dop1}}$ receptor is very similar to that of the *Apis mellifera* AmDOP1 receptor (Blenau et al., 1998), consistent with their close sequence similarity. Pharmacological comparisons between $A_{p_{dop1}}$ and vertebrate D1-like receptors reveal important differences. The potency observed for the D2-like agonist R(+)-lisuride is higher than normally seen for D1-like receptors. Similarly, while the SCH 23390 antagonist blocks activation of vertebrate D1-like receptors with nanomolar affinity, it has no significant effect on the $A_{p_{dop1}}$ receptor. In contrast, flupentixol, a mixed D1/D2 dopamine receptor antagonist, blocks cAMP production following stimulation of the $A_{p_{dop1}}$ receptor by DA. The efficacy of flupentixol to inhibit cyclase activation by D1-like receptor was mainly reported for invertebrate receptors (Gotzes et al., 1994; Blenau et al., 1998; Sanyal et al., 2004). The fact that methiothepin, a serotonergic receptor antagonist, blocks $A_{p_{dop1}}$ stimulation of adenylyl cyclase was surprising. It nevertheless confirms the ability of $A_{p_{dop1}}$ receptor to bind 5-HT and potentially other serotonergic compounds with relatively high efficacy.

4.5.2 The $A_{p_{dop1}}$ receptor displays constitutive activity

HEK 293 cells expressing $A_{p_{dop1}}$ receptor contained higher levels of cAMP than untransfected cells. This result suggests that the $A_{p_{dop1}}$ receptor exhibits agonist-independent activity. Constitutive activation of adenylyl cyclase by dopamine receptors is not unique (Tiberi & Caron, 1994). Other invertebrate DA receptor, AmDOP1 from *Apis mellifera* (Mustard et al., 2003) and DOP-1 from *Caenorhabditis elegans* (Sanyal et al., 2004) possess strong constitutive activity. The physiological relevance of this unique property of some DA receptors remains unclear. It is likely that sustained high levels of intracellular cAMP found in cells expressing constitutively activated DA receptor have significant impact on various physiological dopaminergic cascades. Constitutively active receptors may act as on/off switches by lowering the signal-to-noise ratio (Lefkowitz et al., 1993). We have shown that flupentixol acts as an inverse agonist for $A_{p_{dop1}}$ receptor, as demonstrated for other invertebrate dopamine receptors (Mustard et al., 2003; Sanyal et al., 2004). It will be interesting to investigate whether this agonist-independent activity of $A_{p_{dop1}}$ receptor is regulated in *Aplysia* neurons, for example by an endogenous inverse agonist. Such inverse agonists have yet to be identified for biogenic amine receptors. Our preliminary data confirm that the $A_{p_{dop1}}$ receptor, when expressed in *Aplysia* sensory neurons, is also constitutively activated, because more current was needed to induce spiking of these neurons. This finding indicates that merely the presence of the receptor changes the state of excitability of the cell. This change could be explained by an interaction between the $A_{p_{dop1}}$ receptor and an inward rectifier K^+ (IRK channel, or G protein activated channel GIRKs), activation of the channel leading to membrane hyperpolarization and inhibition of Ca^{2+} -dependent action potentials

(Gregerson et al., 2001; Lavine et al., 2002; Sanyal et al., 2004). The Ap_{dop1} receptor does not contain either of the characteristics of the sequence shown to trigger constitutive activity of D5 dopamine receptors (Ile²⁸⁸ in the third intracellular loop and Gln⁴³⁹ in the C-tail) (Charpentier et al., 1996; Iwasiow et al., 1999; Demchyshyn et al., 2000; Jackson et al., 2000) are found in Ap_{dop1} receptor. It suggests that the structural elements responsible for Ap_{dop1} constitutive activity are different from those found in vertebrate dopamine receptors. Interestingly, the AmDOP1 receptor from *Apis mellifera* and the DOP-1 receptor from *C. elegans* do not have the mammalian signature either. Sequence comparison between D1-like invertebrate receptors might give us some clues concerning potential motifs responsible for this agonist-independent activity.

4.5.3 Potential physiological role of Ap_{dop1}

The *Aplysia* feeding behavior has proven to be valuable for the study of operant conditioning. Increasing evidence in *Aplysia* indicates that neurons activated during reward behavior constitute a convergence point for operant behavior and dopamine-mediated reward (Brembs et al., 2002, Brembs, 2003). Since Ap_{dop1} receptor is expressed in the buccal ganglia, further investigation will be necessary to determine if this novel receptor is involved in modulating activity of neurons receiving dopaminergic inputs, in operant behavior and/or dopamine-mediated reward. Since DA is known to be crucial for modulating the reward-seeking behaviors in mammalian models (Rankin, 2002), research on *Aplysia* dopaminergic system may provide key insights into understanding the molecular mechanisms implicated in operant behavior and reward.

4.6 Footnotes to title

We thank Louise Cournoyer for her assistance with cell culture, Dominique Nouel for assistance with the confocal microscope. D.B. received studentships from Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). H.M. and J.H.B. were supported by NIH grant MH58321. V.F. and L.D.G. are supported by the Canadian Institute of Health Research (CIHR) grants MOP-14142 and MGC-57079. M.B. is the holder of the Hans Selye Chair in molecular and cell biology and a Canada Research Chair in signal transduction and molecular pharmacology.

5

Discussion

La 5-HT est responsable de l'activation d'une cascade biochimique complexe qui entraîne des événements moléculaires comme la phosphorylation, la transcription, la traduction et la modification structurale de protéines durant les processus d'apprentissage et de mémoire chez l'aplysie. Toutes ces modifications sont déclenchées par la liaison de la 5-HT sur des récepteurs couplés aux protéines G. La nature de tous ces récepteurs demeure pour l'instant une énigme qu'il faut résoudre. Pour identifier et comprendre les mécanismes sérotoninergiques impliqués dans la modulation de la plasticité synaptique chez l'aplysie, il faut caractériser les récepteurs impliqués. Par exemple, le clonage d'un récepteur appelé 5-HT_{apAC} est essentiel pour nous permettre d'identifier les mécanismes moléculaires sous-jacents la facilitation synaptique. Par conséquent, des efforts considérables ont été entrepris pour non seulement identifier ces récepteurs mais également caractériser les mécanismes d'action de ces protéines. Ainsi, nos travaux ont permis de caractériser le récepteur 5-HT_{ap2}, mais également d'identifier un récepteur dopaminergique (Ap_{dop1}) exprimé dans le SNC de l'aplysie.

5.1 Clonage et caractérisation de RCPG chez l'aplysie

Notre laboratoire a ainsi donc entrepris de cloner de nouveaux récepteurs à 5-HT exprimés dans le SNC de l'aplysie. À l'aide d'amorces dégénérées contenant les séquences d'acides aminés conservés dans les domaines transmembranaires six et sept chez tous les récepteurs à 5-HT connus, nous avons criblé par PCR une banque d'ADNc du SNC pour identifier des fragments de nouveaux récepteurs sérotoninergiques. L'utilisation de ces séquences comme amorces pour cloner de nouveaux ADNc par similarité est une stratégie grandement utilisée (Li et al., 1995; Angers et al., 1998; Chang et al., 2000) (Figure 5.1A). De cette manière, on obtient théoriquement un produit de PCR hétérogène. Les motifs CWLPFF dans le sixième et le motif NPXXY (X étant un acide aminé variable) dans le septième domaine transmembranaire sont conservées chez les RCPG membres de la famille 1A (Boess & Martin, 1994, Oliveira et al., 1994; Bockaert & Pin, 1999). Suite à nos criblages, nous avons identifié quatre nouveaux clones qui nous ont permis de reconstituer la séquence des deux récepteurs ($5\text{-HT}_{\text{ap}2}$ et $\text{Ap}_{\text{dop}1}$) présentés dans cet ouvrage (Figure 5.1B).

5.1.1 Clonage et caractérisation du récepteur $5\text{-HT}_{\text{ap}2}$

Nous avons cloné un fragment de 147 nucléotides qui suite à des comparaisons de séquences, semblait représenté un nouveau récepteur à 5-HT (Figure 5.1B; récepteur $5\text{-HT}_{\text{ap}2}$). À l'aide d'oligonucléotides conçus à partir du fragment initial et d'amorces provenant du phage $\lambda\text{GT}10$ contenant la banque d'ADNc, nous avons pu reconstituer

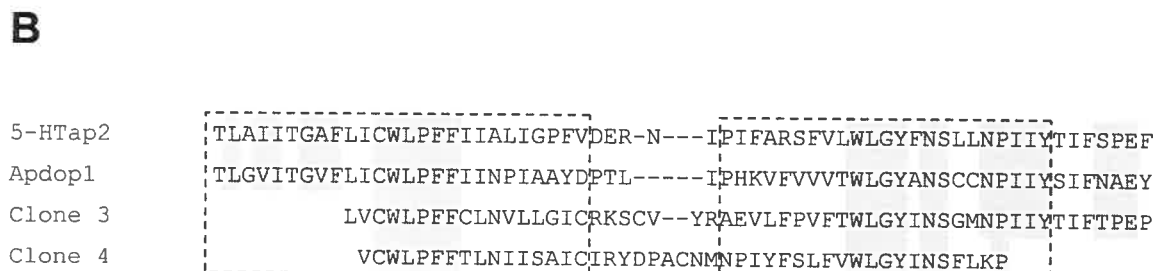
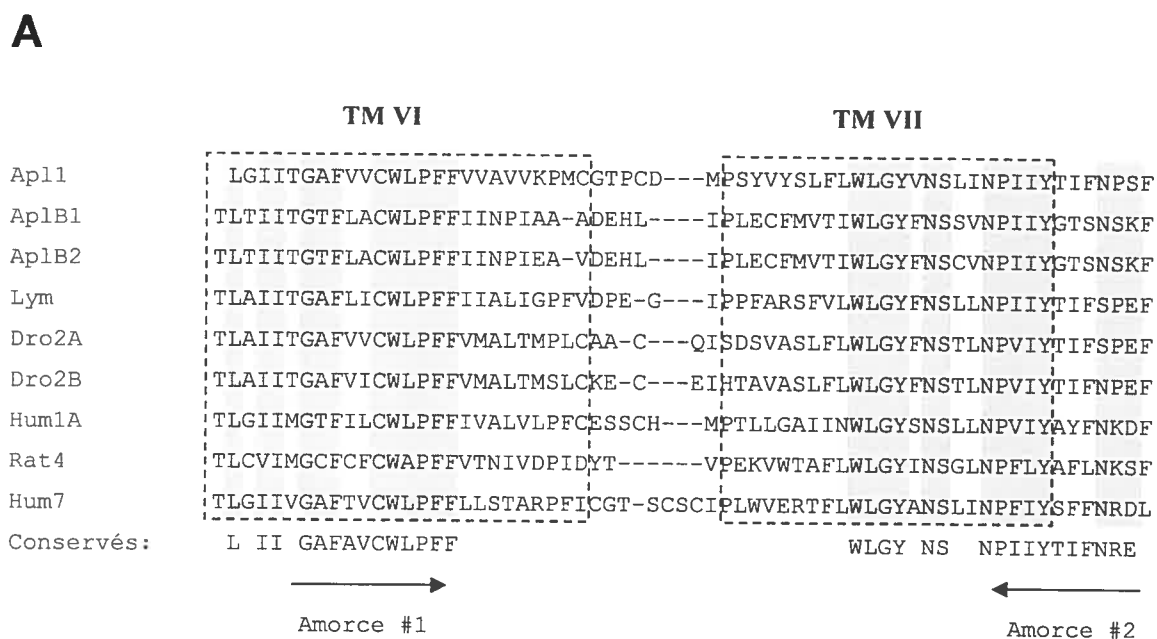


Figure 5.1- **Clonage de nouveaux récepteurs à 5-HT chez l'aplysie.** (A) Alignement des séquences des domaines transmembranaires six et sept de plusieurs récepteurs à 5-HT identifiés. La position des régions transmembranaires (VI et VII) est représentée par des boîtes pointillées. Les acides aminés conservés sont identifiés dans les encadrements gris. La position des amorces dégénérées est représentée par une flèche. *Apl*, *Aplysia*; *Dro*, *Drosophila*; *Lym*, *Lymnaea*; *Hum*, humain; *Rat*, rat. (B) Séquence des clones obtenus lors de nos criblages, notamment les acides aminés correspondant aux récepteurs 5-HT_{ap2} et Ap_{dop1}.

une séquence de 1876 paires de bases. Cet ADNc possède une région codante de 567 acides aminés, codant pour une protéine (5-HT_{ap2}) de 63 kDa (Barbas et al., 2002; travaux rapportés dans le chapitre 2).

Nous avons clairement établi que le récepteur 5-HT_{ap2} est capable d'inhiber la stimulation de l'adénylate cyclase, et ce par une protéine G sensible à la toxine de pertussis, confirmant les hypothèses avancées suite à l'analyse de la structure primaire. Préalablement à la caractérisation pharmacologique, nous avons observé que la protéine est 1) similaire par comparaison de séquences aux récepteurs de la famille 5-HT₁; 2) possède une longue troisième boucle intracellulaire et 3) une courte queue C-terminale caractéristique des récepteurs inhibiteurs de l'adénylate cyclase. Nous pouvons déjà conclure que la technique utilisée pour cloner des récepteurs à 5-HT à l'aide d'amorces provenant des domaines transmembranaires six et sept semble favoriser l'amplification de récepteurs de type inhibiteur. Lors de nos criblages, la majorité des clones provenant de l'amplification initiale avec les amorces dégénérées correspondaient aux récepteurs 5-HT_{ap1} et 5-HT_{ap2} (environ 90%). On peut supposer que l'ARNm de ces récepteurs est extrêmement enrichi par rapport à celui des autres récepteurs potentiels, ce qui se traduirait par une augmentation du nombre de matrices dans notre banque d'ADNc du SNC.

Par conséquent, nous venons de cloner un second récepteur de la famille des 5-HT₁ exprimé dans le SNC de l'aplysie. Dans des conditions identiques, soient une expression des protéines dans des cellules HEK 293, les récepteurs 5-HT_{ap1} et 5-HT_{ap2}

présentent des profils pharmacologiques différents. Il est particulièrement intéressant de noter que la méthiothépine, un antagoniste non sélectif sérotoninergique grandement utilisé chez l'aplysie pour inhiber les réponses sérotoninergiques, ne peut être utilisé pour distinguer l'action de l'un de ces récepteurs par rapport à l'autre. De plus, la méthiothépine est un antagoniste utilisé également pour inhiber l'activation d'un récepteur couplé à G_s sérotoninergique dans le SNC de l'aplysie (Cohen et al., 2003). Comme antagoniste, l'affinité pour la clozapine (antagoniste 5-HT₂) est suffisamment différente pour distinguer l'inhibition du récepteur 5-HT_{ap1} par rapport à celle du récepteur 5-HT_{ap2} (56.63 nM pour le récepteur 5-HT_{ap1} versus 2124 nM pour 5-HT_{ap2}). De plus, le récepteur 5-HT_{ap1} possède un niveau d'affinité supérieur pour la 5-HT (13.23 nM) comparativement au récepteur 5-HT_{ap2} (241 nM). Cette différence d'affinité pour la 5-HT permettrait en quelque sorte une certaine flexibilité pour la cellule quant à la régulation de la réponse sérotoninergique. Advenant le cas où l'inhibition doit être fine, l'expression du récepteur 5-HT_{ap1} semble plus plausible tandis que le récepteur 5-HT_{ap2} pourrait soit inhiber cette réponse dans des cellules recevant une concentration importante de 5-HT, ou une inhibition tardive suite à la relâche progressive de 5-HT dans le temps. Par contre, il est important de noter que les niveaux d'affinité pour la 5-HT de ces protéines concorde avec les niveaux endogènes mesurés par Marinesco & Carew (2002).

Si on tente d'identifier à quel sous type de la famille 5-HT₁ les récepteurs 5-HT_{ap1} et 5-HT_{ap2} appartiennent, on observe que leurs profils pharmacologiques respectifs possèdent des caractéristiques regroupant celles de plusieurs sous types, et même

certains niveaux d'affinité pour quelques ligands que l'on attribue à des récepteurs de type 5-HT₇, activateur de l'adénylate cyclase. On doit donc conclure que selon leur profil pharmacologique et par l'analyse phylogénétique, ces deux récepteurs possèdent des caractéristiques similaires au gène ancestral primitif qui évolua éventuellement pour donner naissance aux récepteurs 5-HT_{1,5,7}. Ceci démontre que l'utilisation de ligands synthétisés pour distinguer des récepteurs mammifères dans l'objectif d'associer des récepteurs d'invertébrés à des sous types préalablement établis chez les mammifères n'est pas une façon précise de distinguer ces protéines. Il faut plutôt comparer les profils entre récepteurs similaires chez l'aplysie pour obtenir des données pharmacologiques distinctives. Seule une telle analyse nous permettra de déterminer des agonistes et antagonistes spécifiques à un seul récepteur et permettre la manipulation pharmacologique des différentes voies de signalisation activées par la 5-HT dans les neurones de l'aplysie.

Nous avons également montré que dans les cellules HEK 293 traitées à la toxine de pertussis, ce qui inhibe l'action des protéines G_i, le récepteur 5-HT_{ap2} était capable dans ces conditions de stimuler l'adénylate cyclase. Ce résultat indique donc que des récepteurs caractérisés comme étant préférentiellement de type 5-HT₁ peuvent également stimuler l'adénylate cyclase. Par contre, nous ne pensons pas que le récepteur 5-HT_{ap2} est bel et bien le récepteur 5-HT_{apAC} tant convoité. Sa structure primaire et les données pharmacologiques observées dans un système hétérologue indiquent que le rôle principal de ce récepteur serait de bloquer l'activation de l'adénylate cyclase suite à une relâche de 5-HT. De plus, la concentration de 5-HT nécessaire pour induire une

activation de la cyclase dans ces conditions, de l'ordre du μM , est beaucoup plus importante que celle suffisante pour induire une inhibition de cette activité. De tels niveaux de 5-HT dépassent largement les concentrations physiologiques observées par Marinesco & Carew (2002). Cependant, nous pouvons envisager la possibilité que le récepteur 5-HT_{ap2} puisse venir agir comme récepteur de soutien pour provoquer une augmentation de la concentration d'AMPc lorsque cet accroissement est essentiel et vital pour la cellule.

5.1.2 Distribution de récepteurs à 5-HT couplés à G α_i

Il a été documenté que l'application de 5-HT provoque des réponses inhibitrices chez l'aplysie (Jennings et al., 1981; Frost et al., 1988; Fisher & Carew, 1993; Ram et al., 1994; Xu et al., 1995; Storozhuk & Castellucci, 1999a,b; Bristol et al., 2001). La liaison de la 5-HT à un récepteur couplé à G_i pourrait expliquer ces phénomènes. Pour éventuellement pouvoir cibler l'action des récepteurs 5-HT_{ap1} et 5-HT_{ap2} dans les phénomènes de mémoire et d'apprentissage, il faut connaître leur distribution dans le SNC de l'aplysie. Pour ce faire, nous avons décidé d'exploiter la sensibilité de l'hybridation *in situ* pour pouvoir déterminer une cartographie de l'expression de ces deux ARNm (Barbas et al., 2005a; travaux rapportés dans le chapitre 3). Étant donné que l'anticorps dirigé contre le récepteur 5-HT_{ap1} ne semble pas être efficace en immunocytochimie, la détection de l'ARNm était devenue la seule technique possible. Nous avons également utiliser la sensorine comme marqueur des neurones sensoriels pour discriminer entre ce type de cellules nerveuses et les neurones moteurs ou les

interneurones (Brunet et al., 1991; Walters et al., 2004). La sensorine-A est un nanopeptide (ARYRVGYMF-NH₂) uniquement exprimés dans les neurones sensoriels (Brunet et al., 1991; Walters et al., 2004). Par le fait même, nous confirmons les résultats de Walters et al. (2004) concernant l'identification des cellules sensorines positives dans le SNC de l'aplysie, seule étude détaillée publiée avant nos travaux. De manière générale, on a observé la présence de l'ARNm pour ces deux récepteurs dans tous les ganglions du SNC de l'aplysie. La sonde antisense correspondante au récepteur 5-HT_{ap2} nous donnait un signal plus intense que celle pour le récepteur 5-HT_{ap1} et ce à quantité égale. Ce résultat nous indique une expression potentielle plus forte du récepteur 5-HT_{ap2} dans le SNC, ce qui n'est pas surprenant puisque ce récepteur est uniquement exprimé dans les ganglions de l'aplysie. Certaines cellules, surtout quelques regroupements de cellules sensorielles, semblent posséder l'ARNm de ces deux récepteurs. Une explication possible pour consolider le fait qu'un neurone puisse posséder deux récepteurs de fonctions similaires est la capacité de ces récepteurs à être exprimés dans l'axone ou les dendrites. Également, l'affinité pour la 5-HT et leur diverses caractéristiques fonctionnelles (facilité à désensibiliser, stabilité à la surface, interactions avec d'autres protéines) pourraient également être des facteurs pouvant expliquer la présence de deux récepteurs de types 5-HT₁ différents à la surface d'une même cellule.

À l'exception des LE ne contenant aucun signal positif et des VC qui eux n'expriment que le récepteur 5-HT_{ap1}, toutes les autres grappes de cellules sensorielles contiennent l'ARNm de ces deux récepteurs. Fait intéressant, ce n'est pas tous les

neurones sensoriels d'un même groupe qui possèdent l'un ou l'autre de ces ARNm, ce qui va à l'encontre de l'homogénéité de ces cellules quant à la nature de la population de protéines exprimées et ce même si la réponse à la 5-HT semble toujours constante. Ce phénomène d'hétérogénéité est également observé par la présence de l'ARNm du récepteur 5-HT_{ap2} dans le neurone LP1 (ou LP11) du ganglion pleural gauche et son absence dans le neurone R2 du ganglion abdominal. Dans la littérature, il avait été rapporté que ces deux neurones étaient identiques selon leur taille, leurs propriétés moléculaires et électrophysiologiques (Hughes & Tauc, 1963; Giller & Schwartz, 1971; Kandel, 1976).

On a également observé la présence des ARNm pour les récepteurs 5-HT_{ap1} et 5-HT_{ap2} dans des neurones sérotoninergiques (cellules géantes MCC, cellules des ganglions pédaux, cellules RB du ganglion abdominal). De plus, par cette étude de localisation, nous avons confirmé uniquement la présence de l'ARNm de 5-HT_{ap2} dans les cellules neuroendocriniennes du ganglion abdominal («bag cells»), préalablement établie par RT-PCR (Barbas et al., 2002).

5.1.3 Clonage et caractérisation du récepteur Ap_{dop1}

À partir de nos criblages par PCR d'une banque d'ADNc du SNC avec les mêmes amorces dégénérées, nous avons complété le clonage d'un récepteur dopaminergique (Figure 5.1B). Nos travaux représentent la première identification d'un

récepteur dopaminergique exprimé dans le SNC chez l'aplysie (Barbas et al., 2005b; travaux rapportés dans le chapitre 4).

Rapidement après avoir déterminé la séquence codante complète du récepteur Ap_{dop1} , nous nous sommes aperçu que ce récepteur était dopaminergique mais plus spécifiquement de la famille D1, soit activateur de l'adénylate cyclase. L'analyse de la séquence primaire permet de constater que cette protéine possède une courte troisième boucle intracellulaire et une longue queue C-terminale, ce qui est retrouvé normalement chez des récepteurs activateur de l'adénylate cyclase (Missale et al., 1998). L'analyse phylogénétique confirma notre hypothèse puisque l'on retrouve Ap_{dop1} dans l'embranchement des récepteurs de la famille D1, activateur de l'adénylate cyclase. Ap_{dop1} semble particulièrement similaire au récepteur $AmDOP1$ d'*Apis mellifera* (Blenau et al., 1998). Par contre, on observe qu' Ap_{dop1} ne possède pas les séquences importantes pour l'exportation de récepteurs nouvellement synthétisés du réticulum endoplasmique (séquence à l'extrémité carboxy-terminale $FxxxFxxxF$ d'interaction avec la protéine DRiP78 où x est n'importe quel acide aminé) et pour le recyclage de ces récepteurs à la membrane. Ce type de motifs a été particulièrement identifié pour les récepteurs dopaminergiques mammifères de type D1 (Bermak et al., 2001; Vargas & von Zastrow, 2004). On ne retrouve que partiellement ces séquences dans les récepteurs similaires clonés chez d'autres espèces d'invertébrés (Gotzes et al., 1994; Sugamori et al., 1995; Blenau et al., 1998; Suo et al., 2002). On peut donc conclure que ces motifs sont apparus uniquement chez les mammifères, donc que les récepteurs d'invertébrés requièrent d'autres mécanismes régulant leur expression ou bien que les protéines

accessoires impliquées dans ces mécanismes lient des séquences différentes chez les récepteurs d'invertébrés.

L'analyse du profil pharmacologique du récepteur Ap_{dop1} a également révélé que l'utilisation de ligands synthétisés pour distinguer des récepteurs mammifères dans l'objectif d'associer des récepteurs d'invertébrés à des sous types préalablement établis n'était pas chose facile. Par exemple, on constate une grande efficacité de la R(+)-lisuride, un agoniste D2 spécifique (donc de récepteurs couplés à G_i) à stimuler l'adénylate cyclase suite à la liaison au récepteur Ap_{dop1} . Comme pour les récepteurs à DA identifiés chez d'autres espèces, il faut caractériser les RCPG d'invertébrés selon les cascades de seconds messagers que ces protéines induisent et non pas sur les niveaux d'affinité de certains ligands pour ces récepteurs.

Évidemment, nous avons déterminé que le récepteur Ap_{dop1} est capable d'activer l'adénylate cyclase suite à la liaison de la DA en système hétérologue (EC_{50} de 35 nM). De plus, le récepteur Ap_{dop1} peut également stimuler la cyclase suite à la liaison de la 5-HT et de l'octopamine, mais ce à des concentrations plus élevées (de l'ordre du μM). L'octopamine (OA), une monoamine structurellement similaire à la noradrénaline, agit comme neurohormone, comme molécule neuromodulatrice et comme neurotransmetteur chez les invertébrés (Roeder, 1999). L'OA est présente à des concentrations relativement élevées dans les tissus neuronaux et autres chez beaucoup d'invertébrés (Roeder, 1999). Ce neurotransmetteur peut donc potentiellement moduler plusieurs fonctions physiologiques étudiées chez les invertébrés jusqu'à maintenant, dont la mémoire et

l'apprentissage. Chez l'abeille, l'injection d'OA ou d'agonistes octopaminergiques facilite la formation de la mémoire (Menzel et al., 1988; 1990). Spécifiquement, on retrouve des quantités non négligeables d'OA dans les ganglions d'aplysie (Saavedra et al., 1974). Le récepteur Ap_{dop1} pourrait donc participer à la stimulation de l'adénylate cyclase dans des neurones recevant des inputs octopaminergiques dans le SNC de l'aplysie, et ce en synergie avec le récepteur $Apoa_1$ (récepteur à OA exprimé dans le SNC et capable de stimuler la cyclase chez l'aplysie; Chang et al., 2000).

Également, Ap_{dop1} pourrait participer à l'activation des réponses sérotoninergiques dans le SNC de l'aplysie, si les concentrations relâchées de 5-HT atteignent des niveaux supérieures à celles enregistrées par Marinesco & Carew (2002), qui étaient de l'ordre de 100 à 200 nM. Par contre, il est important de mentionner que ce récepteur est capable d'activer l'adénylate cyclase suite à des applications de 5-HT aux concentrations utilisées pour induire la facilitation synaptique chez l'aplysie par plusieurs scientifiques. Cohen et al. (2003) démontrèrent que dans le SNC d'aplysie, l'ajout de 1 μ M de 5-HT produit 50% de la réponse d'activation de la cyclase tandis que 25 μ M de 5-HT induit une réponse presque maximale. À ces concentrations de 5-HT, le récepteur Ap_{dop1} est activé et provoque une augmentation de la concentration en AMPc (EC_{50} pour la 5-HT est de 36 μ M). Nous pouvons donc conclure que par son expression dans le SNC, le récepteur Ap_{dop1} pourrait participer à la modulation de la plasticité synaptique par la 5-HT, surtout lors de relâche importante de 5-HT pour atteindre une réponse maximale de l'adénylate cyclase. De plus, Cohen et al. (2003) démontrèrent que non seulement la DA induit une activation de l'adénylate cyclase dans le SNC de

l'aplysie (activation faible; application de 200 μ M de DA), mais que la méthiothépine bloquait efficacement cette induction. Nous avons démontré que la méthiothépine est l'antagoniste le plus efficace pour inhiber l'activation du récepteur Ap_{dop1} et donc que ce nouveau récepteur serait un excellent candidat pour expliquer les caractéristiques pharmacologiques de l'activation de l'adénylate cyclase induite par la DA observées dans le SNC de l'aplysie.

Le récepteur Ap_{dop1} présente également une activité constitutive. Lors de transfections transitoires dans des cellules HEK 293, l'expression unique du récepteur était suffisante pour induire une augmentation agoniste indépendante de la concentration d'AMPC. L'agoniste inverse flupentixol s'est avéré efficace pour inhiber cette activité constitutive et ce de manière dose dépendante. Les récepteurs mammifères de type D5 possèdent une activité constitutive (Tiberi & Caron, 1994). Cette caractéristique de favoriser la conformation active du récepteur proviendrait particulièrement d'acides aminés retrouvés dans la troisième boucle intracellulaire et dans la queue C-terminale du récepteur (Charpentier et al., 1996; Iwasiow et al., 1999; Demchyshyn et al., 2000; Jackson et al., 2000). Si on compare la séquence du récepteur Ap_{dop1} dans ces portions à celle des récepteurs D5 mammifères, on ne retrouve pas les acides aminés importants. Par conséquent, nous pensons que d'autres motifs sont nécessaires pour stabiliser la conformation active de ce récepteur. On retrouve également cette activité agoniste indépendante pour d'autres récepteurs de type D1 invertébrés: le récepteur AmDOP1 d'*Apis mellifera* (Mustard et al, 2003) ainsi que le récepteur DOP-1 de *C. elegans* (Sanyal et al., 2004). Le flupentixol peut également être utilisé comme agoniste inverse

pour ces deux récepteurs. Il semble donc que la capacité de certains récepteurs dopaminergiques d'activer l'adénylate cyclase de manière constitutive soit une caractéristique conservée chez plusieurs espèces et donc que cette activité constitutive présenterait une importance fonctionnelle pour l'instant inconnue.

Par microinjection dans des neurones sensoriels, nous avons observé que l'expression du récepteur Ap_{dop1} change l'état d'excitabilité du neurone, c'est-à-dire que nous avons besoin de plus de courant pour induire des potentiels d'action dans le neurone sensoriel. Cette augmentation du seuil d'excitabilité du neurone pourrait s'expliquer par l'activation de canaux potassiques. Cette hypothèse repose sur le fait qu'une hyperpolarisation de la cellule entraînerait une augmentation du seuil d'excitabilité et que certains récepteurs D1 sont également capables d'interagir avec des canaux potassiques. Il a été montré que le récepteur DOP-1 de *C. elegans* facilitait l'activation de canaux Kir3.2 et que cette activation nécessitait une protéine G_{α_s} (Sanyal et al., 2004). Étant donné que nous ne connaissons pas l'identité moléculaire des canaux potassiques activés par les protéines G chez l'aplysie, il nous est donc pour l'instant difficile de démontrer cette hypothèse. L'inhibition de l'activité de ce type de canaux par divers inhibiteurs spécifiques pourrait nous donner quelques indications quant à la nature des canaux activés et éventuellement confirmer notre hypothèse. Nous avons pensé utiliser le flupentixol pour inhiber l'activité constitutive du récepteur mais il s'avère que cet agoniste inverse précipite dans les milieux utilisés pour la culture de neurones d'aplysie. Il faudra établir si cette activité n'est pas le résultat d'une surexpression de la protéine. Pour ce faire, il faudra déterminer, dans des neurones exprimant le récepteur

Ap_{dop1} endogène, si effectivement ces cellules possèdent des seuils d'activité plus élevés comparativement à d'autres neurones similaires n'exprimant pas le récepteur Ap_{dop1}.

Nous avons également confirmé que le récepteur Ap_{dop1} est capable de stimuler l'activité neuronale des SN d'aplysie suite à la liaison de la DA. Il est important de mentionner que dans des conditions physiologiques, les neurones sensoriels VC du ganglion pleural, lorsque mis en culture, répondent négativement à la DA. Si l'on induit une activité neuronale, traduite par quelques potentiels d'action, l'ajout de DA supprime cette stimulation et ce même si le récepteur Ap_{dop1} a été microinjecté dans ces neurones. Ce résultat était surprenant puisque normalement l'activation d'un récepteur couplé à G_s provoque l'augmentation de l'activité neuronale (Bernier et al., 1982). L'action inhibitrice de la DA dans les neurones sensoriels d'aplysie a été documentée préalablement et nous ne pouvons exclure pour l'instant que, dans les conditions expérimentales utilisées, le récepteur Ap_{dop1} soit capable de se coupler à G α_i , du moins dans les neurones sensoriels VC utilisés (Ascher, 1972). Par contre, si on traite ces neurones à la toxine de pertussis, l'effet inhibiteur de la DA est renversé et que dans ces conditions, on observe une stimulation de l'activité neuronale par le récepteur Ap_{dop1} suivant une liaison de la DA (voir chapitre 4; Figure 4.8).

Pour déterminer le profil d'expression du récepteur Ap_{dop1}, nous avons été confrontés au problème de détecter l'ARNm du récepteur. Par RT-PCR, nous n'avons jamais observé la présence du transcrite dans aucun extrait d'ARN total et ce de divers tissus. Cette absence de produits peut provenir de la faible abondance de l'ARNm du

récepteur Ap_{dop1}. De plus, nous n'avons jamais détecté cet ARNm par hybridation *in situ*, confirmant le facteur limitant de la quantité de l'ARNm du récepteur. Évidemment, cet ARNm est bel et bien présent, du moins dans le SNC puisque la banque d'ADNc utilisée pour amplifier ce récepteur provient des ARNm du SNC. Ainsi donc, nous avons produit un anticorps polyclonal contre la troisième boucle extracellulaire du récepteur Ap_{dop1}. Le choix de la troisième boucle comme peptide cible est motivé par le fait que nous pourrions utiliser cet anticorps comme antagoniste éventuel pour inhiber l'activité du récepteur dans des cellules exprimant de manière endogène cette protéine (Guarna et al., 2003). Par analyse de type Western sur des préparations membranaires de divers tissus, nous avons observé une bande majeure à 100 kDA. Ainsi, nous avons conclu que le récepteur Ap_{dop1} est principalement exprimé dans le SNC, la masse buccale, le cœur et faiblement dans le rein et l'ovotestis d'aplysie. Nous avons également détecté l'expression du récepteur Ap_{dop1} dans le ganglion buccal. Lors de l'immunoprécipitation du récepteur Ap_{dop1} exprimé dans des cellules HEK 293, nous avons également détecté des bandes suggérant la présence d'oligomères du récepteur Ap_{dop1}. L'expression de la protéine dans le cœur, le rein et l'ovotestis n'est pas surprenante puisque la DA a été détectée dans tous ces tissus (Carpenter et al., 1971).

Nos travaux sur l'identification de nouveaux RCPG, exprimés dans le SNC de l'aplysie, introduisent donc de nouvelles protéines potentiellement impliqués dans la modulation de la plasticité synaptique chez l'aplysie (Tableau 5.1).

Tableau 5.1- **Caractéristiques des RCPG identifiés et exprimés dans le SNC de l'aplysie.**

Récepteur	Neurotransmetteur	Second messenger	Référence
5-HT _{ap1}	5-HT	Inhibe l'adénylate cyclase	Angers et al. (1998)
5-HT _{ap2}	5-HT	Inhibe l'adénylate cyclase	Barbas et al. (2002)
Ap5-HT _{B2}	5-HT	Stimule la PLC	Li et al. (1995) ¹
5-HT _{apAC}	5-HT	Stimule l'adénylate cyclase	Cohen et al. (2003)
Ap _{dop1}	Dopamine	Stimule l'adénylate cyclase	Barbas et al. (2005b)
Apoa ₁	Octopamine	Stimule l'adénylate cyclase	Chang et al. (2000)

5.2 Hypothèses sur les rôles physiologiques des récepteurs identifiés

La caractérisation moléculaire, biochimique, pharmacologique et fonctionnelle des récepteurs 5-HT_{ap2} et Ap_{dop1} nous permet à ce stade-ci d'envisager certaines hypothèses quant à leurs rôles physiologiques dans le SNC et les cascades moléculaires modulées par ces protéines. De plus, la cartographie de l'expression des récepteurs 5-HT_{ap1-ap2} représente une étude détaillée de la nature des neurones exprimant ces récepteurs couplés à G_i. Par l'analyse de la localisation de l'expression de ces protéines, on peut également entrevoir les fonctions physiologiques régulées par ces récepteurs de types inhibiteurs de l'adénylate cyclase.

¹ Voir note en bas de page p.51.

5.2.1 Rôles physiologiques potentiels pour les récepteurs 5-HT_{ap1-ap2}

La liaison de la 5-HT à des récepteurs couplés à G_i devrait normalement interférer avec les cascades moléculaires dépendantes de l'AMPC (Figure 5.2). L'expression des récepteurs 5-HT_{ap1} et 5-HT_{ap2} à la surface de neurones sérotoninergiques suggèrent un rôle d'autorécepteur pour ces protéines. Ainsi, il contrôlerait la relâche de 5-HT à la synapse par le même neurone en inhibant la cascade AMPC dépendante produisant une synthèse de 5-HT. Normalement, comme documenté précédemment, l'application de 5-HT entraîne une stimulation de l'activité neuronale de tous les neurones sensoriels, excepté les RF. Il n'est pas surprenant d'observer que les récepteurs 5-HT_{ap1} et 5-HT_{ap2} soient exprimés dans les neurones sensoriels RF du ganglion abdominal. Suite à l'application de 5-HT au niveau des RF, on enregistre une inhibition de l'activité neuronale de ces cellules faisant partie du circuit impliqué dans le contrôle du réflexe de retrait du siphon (Storozhuk & Castellucci, 1999b). Il faudra confirmer que l'inhibition de l'activité neuronale des RF par la 5-HT est induite par une inhibition de l'activité de l'adénylate cyclase, suite à la liaison aux récepteurs 5-HT_{ap1} et 5-HT_{ap2}.

Fait intéressant, l'expression de l'un ou l'autre de ces récepteurs n'était pas homogène dans les grappes de cellules sensorielles, allant contre le dogme de l'homogénéité des neurones sensoriels d'une même grappe. Par conséquent, nous pensons que l'état d'excitabilité des neurones sensoriels varie selon la nature des protéines exprimées à la surface de ces cellules. L'application de 5-HT entraîne normalement une facilitation de ces multiples neurones sensoriels. Comme l'a démontré

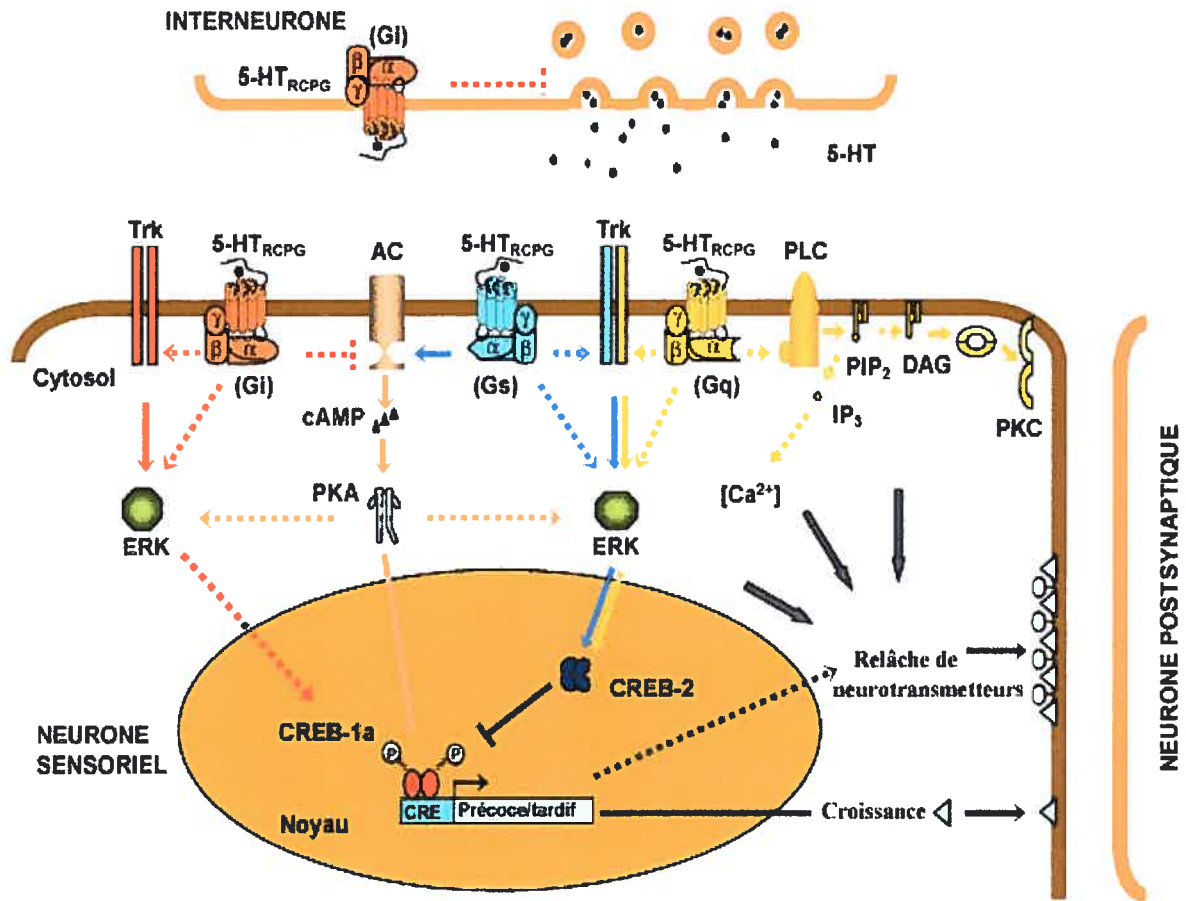


Figure 5.2- Représentation schématique des rôles potentiels des récepteurs à 5-HT dans la modulation des propriétés neuronales chez l'aplysie. La synapse SN-MN impliquée dans les réflexes de retrait est utilisée comme exemple. Après stimulation, les interneurons sérotoninergiques facilitateurs relâchent de la 5-HT qui va lier des récepteurs (5-HT_{RCPG}). La réponse finale dans le circuit dépendra de la nature des récepteurs et des molécules de signalisation exprimés dans chaque cellule. La liaison de la 5-HT à un récepteur couplé à G_s stimule l'adénylate cyclase (AC; cascade en rose). L'activation de l'AC augmente la concentration en AMPc et induit une activation de la protéine kinase A (PKA; activation indiquée par ↑ pleine). Une fois activée, la PKA peut phosphoryler et modifier de manière covalente plusieurs cibles potentielles, incluant des composants de la machinerie d'exocytose, pour augmenter l'accessibilité et la relâche de neurotransmetteurs. Suite à une stimulation répétée, PKA peut recruter des kinases régulées par des signaux extracellulaires (ERK, MAPK), et il y a translocation au noyau où PKA phosphoryle CREB (protéines liant les éléments de réponse à l'AMPc). La phosphorylation par les ERK du répresseur CREB-2 inhibe son action sur CREB-1a. La phosphorylation de CREB-1a induit la transcription de gènes précoces et tardifs essentiels à la croissance de nouvelles synapses et à la relâche soutenue de neurotransmetteurs. Les RCPG couplés à G_s peuvent également activer les ERK par transactivation (cascade en bleue) des récepteurs aux tyrosines kinases ou Trk (e.g., ApTrkl) ou par activation directe de la cascade ERK. Pour inhiber la relâche de 5-HT des interneurons, les RCPG couplés à G_i peuvent jouer le rôle d'autorécepteur présynaptique (inhibition indiquée par ⊥). Lorsque ces récepteurs sont exprimés à la surface de neurones sensoriels, on s'attend à une inhibition de l'activité de la cyclase et une réponse négative au niveau de la cascade en générale (cascade en rouge). Sous certaines conditions comme la relâche soutenue de 5-HT, les RCPG couplés à G_i pourraient compléter l'activation des ERK par transactivation des Trk ou par activation directe des composants de la cascade ERK. En plus des cascades de signalisation PKA dépendante, la 5-HT peut également activer des cascades phospholipase C (PLC)-PKC dépendante (cascade beige). Les RCPG couplés à G_q activent la PLC pour produire du diacylglycérol (DAG) et de l'inositol-1,4,5-triphosphate (IP₃). IP₃, soluble dans l'eau, diffuse dans le cytoplasme. Il lie des récepteurs sur le reticulum endoplasmique pour provoquer la relâche de Ca²⁺ des réserves internes. DAG reste à la membrane pour activer la protéine kinase C (PKC). Les RCPG couplés à G_q sont également capables d'activer les ERK. Pour simplifier le schéma, on n'a pas représenté les ERK potentiellement activées. La relâche de neurotransmetteurs peut également dépendre de d'autres facteurs (e.g., PKC, Ca²⁺; flèches grises). Les interactions spéculatives sont représentées par un trait pointillé (- - -). Figure adaptée de Barbas et al. (2003).

Pineda et al. (2004), il semble essentiel de maintenir un équilibre au niveau de la concentration en AMPc pour établir la mémoire. La présence des récepteurs 5-HT_{ap1} et 5-HT_{ap2} dans les cellules sensorielles supportent l'hypothèse qu'il faut des molécules stimulatrices et inhibitrices de l'adénylate cyclase pour maintenir une signalisation optimale dépendante de la concentration en AMPc. La contrainte inhibitrice est essentielle pour maintenir la spécificité synaptique de la plasticité neuronale observée durant la mémoire (Mansuy, 2004). De plus, l'expression de ces récepteurs à la surface de neurones sensoriels permettrait une réponse inhibitrice sur l'activité neuronale de ces cellules, induite par une relâche de 5-HT qui est généralement attribuée aux voies polysynaptiques et impliquant des interneurons (Barbas et al., 2003).

Nous avons confirmé par hybridation *in situ* l'expression du récepteur 5-HT_{ap2} dans les «bag cells». Ces cellules reçoivent des projections sérotoninergiques provenant des ganglions cérébraux et du ganglion abdominal (McPherson & Blankenship, 1991). Normalement, on observe une inhibition de l'activité neuronale soutenue de ces cellules durant la ponte des œufs suite à l'application de 5-HT. Les concentrations nécessaires pour induire cette inhibition par la 5-HT, également par l'agoniste 5-CT, respectent les niveaux d'affinité observés du récepteur 5-HT_{ap2} pour ces ligands. Cette réponse est renversée par l'ajout de méthiothépine. Par conséquent, à cause de la présence de l'ARNm et des concentrations nécessaires d'agonistes (5-HT et 5-CT) pour induire cette inhibition de l'activité soutenue, on peut spéculer que le récepteur 5-HT_{ap2} est normalement présent dans ces cellules neuroendocriniennes pour conserver le niveau d'AMPc bas et éviter que la décharge de ces neurones ne soit déclenchée inopinément

dans des périodes en dehors de celles où l'on constate une ponte des œufs. Une hypothèse également postulée est que les voies sérotoninergiques, qui sont grandement impliquées dans la modulation des circuits sensoriels de l'animal, empêchent l'aplysie de pondre des œufs lorsque l'animal est vulnérable, durant un danger potentiel. Ainsi, on observerait également un mécanisme de défense dont la réponse serait modifiée par la relâche de 5-HT. Par contre, personne n'a démontré pour l'instant que la 5-HT induit bel et bien une diminution de la concentration en AMPc dans ces cellules neuroendocriniennes.

5.2.2 Activation de cascades moléculaires par les récepteurs 5-HT_{ap1-ap2}

Plusieurs récepteurs liant divers neurotransmetteurs peuvent également moduler l'activation de canaux ioniques par les protéines G. Les mécanismes impliqués dans cette activation sont mieux caractérisés pour les RCPG couplés à G_i. Le récepteur 5-HT_{1A} mammifère active spécifiquement des canaux induisant un courant entrant rectificateur de K⁺ dans les neurones (Ehrengruber et al., 1997), ou inhibe des canaux Ca²⁺ voltage dépendants (Lembo et al., 1997). Chez l'aplysie, il a été montré que la 5-HT module la réponse des canaux K⁺ et Ca²⁺ (Klein & Kandel, 1980; Siegelbaum et al., 1982, Benson & Levitan, 1983; Shuster et al., 1991; Braha et al., 1993; Sugita et al., 1994). Cette régulation semble être dépendante de l'activation de PKA et/ou PKC. Malgré ces observations, il est également probable que les récepteurs 5-HT_{ap1-ap2} puissent moduler directement des canaux ioniques, comme chez les mammifères, indépendamment de l'activation d'effecteurs en aval de son activation, et donc être

impliqués dans ces mécanismes de modulation de la régulation de la transmission synaptique qui se produit durant la modification de comportements chez l'aplysie.

Les RCPG ont longtemps été considérés comme des molécules activant des cascades parallèles dépendamment de la nature du couplage aux protéines G. De plus en plus d'évidences dans la littérature suggèrent que ces cascades ne sont pas indépendantes l'une de l'autre et qu'il existe plusieurs points d'interaction entre récepteurs et protéines, donc plusieurs niveaux de chevauchement entre ces cascades (Figure 5.2). Chez l'aplysie, on observe une activation des MAPK (ou ERK) durant la plasticité synaptique à long terme (Martin et al., 1997b; Zhang et al., 1997). Purcell et al. (2003) observèrent que l'activité tyrosine kinase est essentielle à l'induction de la facilitation à long terme par la 5-HT dans la synapse SN-MN et durant la sensibilisation à long terme induite par un choc sur la queue. De plus, Ormond et al. (2004) démontrèrent que la 5-HT active ApTrkl, un récepteur à tyrosine kinase (RTK), qui à son tour active la voie des ERK. L'inhibition de l'activation de ApTrkl avec un inhibiteur des récepteurs à tyrosine kinase ou en utilisant de l'ARN double brin (ARN interférence) contre ApTrkl bloque l'activation des ERK par la 5-HT appliquée au corps cellulaire et inhibe la facilitation dans le neurone en entier, soit à toutes les synapses. Ainsi, la 5-HT semble induire l'activation de RTK dans les neurones sensoriels de l'aplysie, comme l'avait suggéré Barbas et al. (2003) (Figure 5.2). Jusqu'à tout récemment, on pensait que l'activation des RCPG et des RTK par des messagers extracellulaires était indépendante. De plus en plus d'évidences démontrent qu'ils existent des interactions complexes entre ces protéines, c'est-à-dire une transactivation

des RTK par les RCPG (Linseman et al., 1995; Luttrell et al., 1997; Eguchi et al., 1998; Herrlich et al., 1998). Par conséquent, la convergence entre les RCPG et les RTK permet une intégration des signaux extracellulaires sur la cascade des MAPK. D'autres mécanismes impliquant une interaction entre la β -arrestine et les composantes de la cascade ERK suite à l'activation des RCPG et leur désensibilisation, peuvent également être impliqués (Lowes et al., 2002; Luttrell, 2002). Gutkind (1998) publia un article répertoriant la contribution de plusieurs sous unités $G\alpha$ ($G\alpha_s$, $G\alpha_i$ et $G\alpha_q$) et $G\beta\gamma$ dans l'activation des voies MAPK. Il est donc devenu apparent que les RCPG peuvent activer les ERK via plusieurs effecteurs intracellulaires (PKA, PKC, Ca^{2+} , phosphatidylinositol 3-kinase ou PI3K) ou via les protéines $G\alpha$ et $G\beta\gamma$. À la lumière de ces résultats répertoriés dans la littérature, il est tentant de suggérer que l'une des manières d'accroître l'intensité et de maintenir la formation de la mémoire chez l'aplysie est à travers l'activation des MAPK par la 5-HT suite à la liaison de ce neurotransmetteur à de multiples RCPG sérotoninergiques exprimés à la surface cellulaire (Figure 5.2). Ainsi, suite à une relâche suffisante de 5-HT pour induire une facilitation à long terme, il y aurait liaison et activation des récepteurs 5-HT_{ap2} et potentiellement de d'autres récepteurs à 5-HT exprimés à la surface du même neurone (5-HT_{ap1}, 5-HT_{apAC}, Ap5-HT_{B2}), ce qui provoquerait l'activation des cascades biochimiques convergentes vers l'activation des MAPK, étape limitante pour l'induction de la plasticité synaptique à long terme.

Également, la facilitation synaptique induite par une longue exposition à la 5-HT requiert une activation des voies PKA dépendantes à court et long terme et une

stimulation des voies PKC dépendantes à long terme (Braha et al., 1990; Hochner & Kandel, 1992; Sugita et al., 1992). En plus de l'activation des voies MAPK, il y a donc une contrainte PKC dépendante durant la facilitation à long terme et possiblement une inhibition ou une atténuation de l'importance des voies PKA dépendantes. Sugita et al. (1997) montrèrent que l'activation de PKC par le phorbol ester atténue spécifiquement certains aspects de l'activation par la 5-HT de la cascade AMPc/PKA. Nous proposons donc que l'activation de récepteurs comme 5-HT_{ap2}, couplés à G α_i , et de récepteurs couplés à G α_q , comme le récepteur Ap5-HT_{B2}, peut contribuer également à la diminution de l'efficacité de signalisation de la cascade AMPc/PKA et à l'augmentation des réponses PKC dépendantes.

Tous ces mécanismes d'action impliquent donc des interactions entre voies de signalisation. Un concept émergent de plus en plus dans la littérature est l'interaction possible entre divers RCPG au niveau des récepteurs mêmes et de la diversité de signalisation de ce type de protéines. Il a été démontré que la phosphorylation par PKA de certains RCPG changeait leur affinité pour certaines protéines G, donc modifiait leur couplage à certains seconds messagers. Par exemple, suite à la phosphorylation du récepteur β_2 -adrénergique, cette protéine change son couplage de G α_s à G α_i (Daaka et al., 1997; Zamah et al., 2002). Nous avons démontré que le récepteur 5-HT_{ap2} était capable de se coupler à G α_i et G α_s (Barbas et al., 2002). Il faudra déterminer si cette capacité de couplage multiple du récepteur 5-HT_{ap2} est retrouvée dans des conditions natives et déterminer si ce changement de couplage et d'activation de voies de

signalisation est modulé par l'état de phosphorylation du récepteur puisque celui-ci possède des sites potentiels de phosphorylation.

L'hétérodimérisation des RCPG ouvre également la porte à une multitude de possibilités quant à la diversité des profils pharmacologiques engendrés (pour une revue de la littérature, voir Bouvier, 2001; Angers et al., 2002). Les récepteurs à 5-HT sont capables de former des homodimères lorsque exprimés seuls ou des hétérodimères lorsque co-exprimés (Xie et al., 1999; Lee et al., 2000b). Cette possibilité d'association entre divers récepteurs à 5-HT entre eux et avec d'autres types de récepteurs exprimés dans les mêmes cellules (par exemple des récepteurs à DA) suggère la présence d'interactions non seulement au niveau des divers seconds messagers, mais également au niveau des récepteurs impliqués dans la modulation de la mémoire et de l'apprentissage. Pour l'instant, nous pouvons seulement affirmer que le récepteur 5-HT_{ap2} semble être capable d'homodimériser et possiblement d'oligodimériser lorsque exprimé dans des cellules HEK 293. Il sera donc intéressant d'observer la capacité de ce récepteur à interagir avec d'autres RCPG et comprendre sa diversité de fonctions induite par l'hétérodimérisation dans la modulation de la mémoire et de l'apprentissage chez l'aplysie.

5.2.3 Rôles physiologiques potentiels du récepteur Ap_{dop1}

Par son expression dans le SNC d'aplysie, le récepteur Ap_{dop1} représente donc un candidat intéressant pour la modulation des réflexes de défense. Quelques neurones,

dont LP1 et R2, furent identifiés sous la base de leurs réponses excitatrices observées suivant l'application de DA. Le récepteur Ap_{dop1} pourrait donc être impliqué dans ces cellules lors de la stimulation de l'adénylate cyclase par la DA. Un autre comportement physiologique intéressant est la prévention de l'habituation de la branchie par la dopamine. Étant donné son expression dans le SNC, l'activation du récepteur Ap_{dop1} pourrait permettre de maintenir une activité suffisante des neurones projetant vers la branchie, provenant notamment du ganglion abdominal, pour inhiber l'habituation du retrait de la branchie. Par exemple, le récepteur Ap_{dop1} pourrait permettre l'augmentation de l'efficacité de la transmission synaptique du neurone moteur L7 vers la branchie (Ruben & Lukowiak, 1983). Comme nous n'avons pas détecté la protéine dans la branchie, le récepteur Ap_{dop1} ne serait pas impliqué dans l'activation de la cyclase par la DA dans cet organe, qui normalement entraîne une contraction de ce tissu. Évidemment, il faudra déterminer spécifiquement la localisation de l'expression du récepteur Ap_{dop1} pour éventuellement vérifier ces hypothèses.

Sur des extraits de membranes plasmiques, nous avons détecté la protéine dans le ganglion buccal. De plus, par immunocytochimie, des collaborateurs ont non seulement montré que le récepteur Ap_{dop1} est bel et bien exprimé dans les ganglions buccaux, particulièrement au niveau de la neuropile (Figure 5.3; travaux du Dr.Habib Mohamed dans le laboratoire du Dr.John H. Byrne, W. M. Keck Center for the Neurobiology of Learning and Memory, Department of Neurobiology and Anatomy, The University of Texas Medical School at Houston, Houston, Texas), mais également dans le neurone B51. Par conséquent, nous pensons que le récepteur Ap_{dop1} serait impliqué dans la

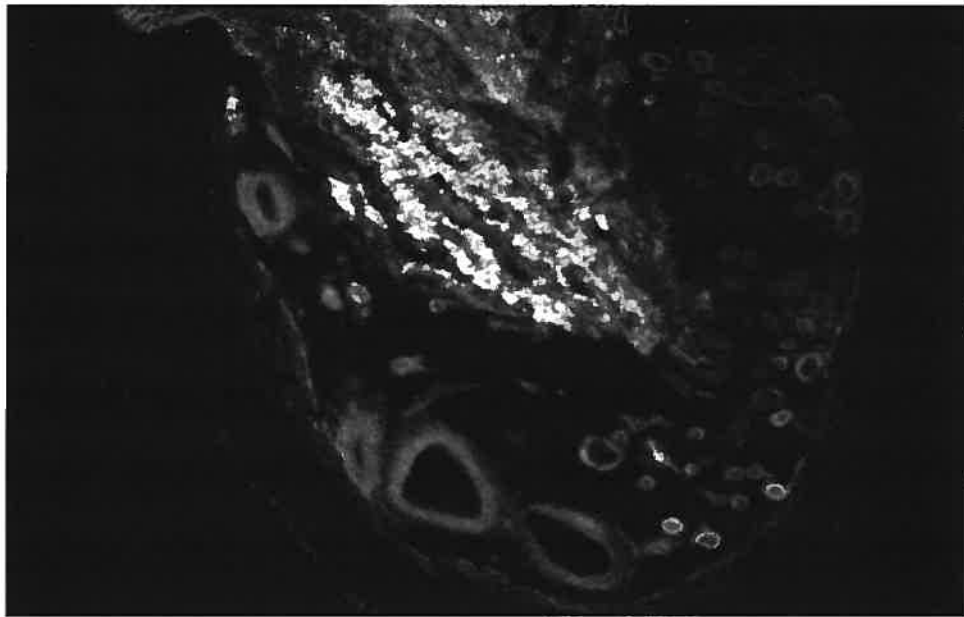


Figure 5.3- Expression du récepteur Ap_{dop1} dans la neuropile des ganglions buccaux de l'aphysie. Immunocytochimie à l'aide de l'anticorps anti-Ap_{dop1} sur des coupes d'un ganglion buccal. Forte expression du récepteur au niveau de la neuropile, suggérant une localisation préférentielle au niveau des axones. Travaux effectués par le Dr.Habib Mohamed dans le laboratoire du Dr. John H. Byrne (W. M. Keck Center for the Neurobiology of Learning and Memory, Department of Neurobiology and Anatomy, The University of Texas Medical School at Houston, Houston, Texas).

modulation du conditionnement instrumental au niveau du neurone B51. La caractérisation de cette protéine nous permettra d'explorer le rôle de la DA comme signal de renforcement général, notamment pour le passage de la mémoire court terme à long terme.

5.3 Perspectives

Le travail accompli et présenté dans cet ouvrage nous a permis d'identifier de nouveaux récepteurs et débiter leur caractérisation moléculaire, pharmacologique et physiologique. Plusieurs facettes des récepteurs identifiés jusqu'à maintenant restent à être étudiées. Les sections suivantes proposent une série d'expériences qui se résume en ces points :

- 1) Clonage du récepteur 5-HT_{apAC}
- 2) Caractérisation physiologique des neurones 5-HT_{ap1-ap2} et Ap_{dop1} positifs
- 3) Inhibition de l'expression de ces récepteurs dans le SNC
- 4) Participation au projet de séquençage du génome de l'aplysie.

5.3.1 Clonage de récepteurs à 5-HT couplés positivement à l'adénylate cyclase

L'objectif initial de ce projet de doctorat était de poursuivre le criblage de la banque d'ADNc du SNC d'aplysie dans le but de cloner un récepteur à 5-HT couplé à

G_s . Évidemment, tel que documenté précédemment, il semble que l'amplification par PCR avec les oligonucléotides utilisés favorisent l'identification de récepteurs à 5-HT couplés à G_i . Il reste que pour comprendre le rôle de la 5-HT dans la modulation de la plasticité synaptique, l'identification de ce type de récepteur activateur de l'adénylate cyclase reste une priorité. Grâce au clonage des récepteurs $5-HT_{ap1}$, $5-HT_{ap2}$ et Ap_{dop1} , nous pouvons éliminer ces séquences lors de nos criblages et se concentrer sur de nouveaux clones. De plus, nous pourrions également effectuer nos amplifications à partir de cellules où nous observons que la 5-HT active l'adénylate cyclase et augmente la concentration de l'AMPc. Nous suggérons par exemple les cellules sensorielles du ganglion pleural (les VC) qui par l'identification facile, le nombre important de neurones et leur accessibilité en font des candidates intéressantes. Il suffirait de reverse transcrire l'ARNm de ces cellules et ensuite d'utiliser nos amorces pour amplifier tous les récepteurs à 5-HT contenus dans ces cellules. Une fois les produits de PCR clonés, nous pourrions éliminer les clones correspondants aux récepteurs déjà identifiés, par buvardage de type Southern, pour se concentrer uniquement sur les nouvelles cibles. Il reste que cette approche n'est pas garante de succès et il faudra attendre le séquençage du génome de l'aplysie pour obtenir des clones rapidement.

5.3.2 Caractérisation des cellules $5-HT_{ap1}$, $5-HT_{ap2}$ et Ap_{dop1} positives

Le clonage du récepteur $5-HT_{ap2}$ et la cartographie d'expression des récepteurs $5-HT_{ap1}$ et $5-HT_{ap2}$ permettent de nous attaquer maintenant aux rôles physiologiques de ces deux protéines. L'une des premières étapes est tout simplement d'effectuer des

enregistrements électrophysiologiques pour déterminer dans des cellules exprimant ces protéines les effets produits par la 5-HT sur l'état d'excitabilité de ces cellules. Il sera également important de déterminer en parallèle, dans des neurones d'aplysie microinjectés avec des vecteurs permettant l'expression des récepteurs 5-HT_{ap1} et 5-HT_{ap2}, si les profils pharmacologiques observés en système hétérologue correspondent avec ce qu'on aura noté dans des conditions physiologiques. Il est connu que les conditions ioniques des sels utilisés pour constituer les milieux de culture de cellules d'aplysie affectent la liaison de certains ligands pour les divers récepteurs, le plus souvent en diminuant leur efficacité (Cohen et al., 2003). De plus, certaines de ces drogues ne peuvent être manipulées dans ces conditions puisqu'elles précipitent rapidement. Il faudra donc déterminer comment les données pharmacologiques obtenues dans des milieux de faibles forces ioniques reflètent l'efficacité des ligands sérotoninergiques dans des conditions de grandes forces ioniques des milieux salins physiologiques de l'aplysie.

Pour le récepteur Ap_{dop1}, il faudra déterminer sa localisation par immunocytochimie puisque la localisation de l'ARNm, soit par RT-PCR ou par hybridation *in situ*, semble pour l'instant impossible. Cette cartographie sera cruciale pour éventuellement pouvoir identifier ses rôles physiologiques. De plus il sera intéressant d'observer la présence de ce récepteur dans des neurones particuliers du SNC, comme R2 et LP1, pour pouvoir déterminer si ce récepteur est impliqué dans la modulation de la mémoire et l'apprentissage chez l'aplysie.

5.3.3 Inhibition de l'expression des RCPG clonés chez l'aplysie

Jusqu'à maintenant, nous ne pouvons qu'avancer des hypothèses quant à la fonction des récepteurs clonés chez l'aplysie. Nous ne possédons aucune indication directe concernant leurs rôles physiologiques ainsi que les cascades moléculaires activées par ces protéines. L'une des approches traditionnelles pour résoudre ces questions est l'inactivation de gène. Ainsi, en éliminant l'expression d'une protéine, on arrive à obtenir de l'information quant à ses fonctions physiologiques dans un contexte endogène. L'un des problèmes majeurs chez l'aplysie est la difficulté d'obtenir des mollusques déficients pour certains gènes en utilisant les techniques traditionnelles comme la recombinaison homologe. Cette difficulté provient de l'aspect polyploïde des noyaux (Kandel, 1979). Par conséquent, il serait difficile d'invalider toutes les copies du gène ciblé. Les chercheurs utilisant l'aplysie comme modèle d'étude se sont plutôt tournés vers l'utilisation d'oligonucléotides antisenses pour inhiber l'expression de protéines. La grande perméabilité des neurones d'aplysie à ce type de molécules permet par exemple simplement de mettre les cellules en culture dans un milieu contenant les oligonucléotides antisenses pour que ceux-ci pénètrent dans les cellules (Martin et al., 1995). La capacité de microinjecter facilement les neurones permet également d'invalider des gènes de cellules spécifiques dans un contexte où le circuit neuronal est maintenu directement dans un ganglion en culture. Par contre, de plus en plus de scientifiques utilisent des fragments d'ARN double-brin (ARNdb), technique appelée ARN interférence, pour venir interférer avec l'expression d'un gène. Cette technique

s'avère moins coûteuse et permet la dégradation de tous les messagers contenant la séquence ciblée. L'interférence par l'ARN (ARNi) est un processus post-transcriptionnel, déclenché par l'introduction d'ARN double-brin, qui mène à l'inactivation ou l'invalidation d'un gène de manière séquence spécifique. L'ARNi est un phénomène naturel qui a été décrit dans divers organismes tels que les nématodes, les trypanosomes, les plantes et les champignons (Carthew, 2001). Il sert probablement à protéger ces organismes des virus, à moduler l'activité des transposons et à éliminer des produits de transcription aberrants. Plus spécifiquement, des études sur le nématode *Caenorhabditis elegans* ont permis de mettre en évidence le phénomène d'ARNi par l'introduction d'ARNdb dans les cellules du ver, ce qui réduisait spécifiquement l'expression de protéines (Fire et al., 1998). L'ARNi est l'une des découvertes les plus excitantes de cette décennie en génomique fonctionnelle. Cette approche est en train de devenir rapidement une méthode de premier plan pour analyser la fonction des gènes chez les eucaryotes.

De plus en plus de chercheurs utilisent des fragments d'ARNdb pour invalider des gènes chez l'aplysie (Lee et al., 2001; Ormond et al., 2004). Lee et al. (2001) démontrèrent que l'efficacité d'inhibition est plus grande en utilisant des fragments d'ARNdb qu'en utilisant un oligonucléotide antisense classique sur des neurones d'aplysie en culture. Par conséquent, on peut envisager l'utilisation d'ARNi pour inhiber l'expression des divers récepteurs sérotoninergiques (5-HT_{ap1} , 5-HT_{ap2} et $\text{Ap}5\text{-HT}_{\text{B2}}$) et du récepteur Ap_{dop1} dans le SNC d'aplysie pour déterminer non seulement leur contribution à des phénomènes comme la plasticité synaptique, mais également

identifier les cascades moléculaires activées par ces protéines. L'une des techniques possibles, en plus de la microinjection, serait de faire baigner les neurones ciblés en culture dans un milieu contenant les ARNdb choisis et de déterminer si, comme les antisenses, ceux-ci pénètrent dans les cellules. De plus, nous pourrions déterminer si des petits fragments d'ARNdb fluorescents pourraient diffuser dans le SNC en injectant ceux-ci directement dans les connectifs ou divers nerfs reliant les ganglions. Évidemment, concernant les récepteurs 5-HT_{ap1} et 5-HT_{ap2}, maintenant que l'on connaît les neurones exprimant ces récepteurs, il est plus facile d'envisager ce type d'études et de combiner ces expériences d'ARNi avec des enregistrements électrophysiologiques.

Étant donné que nous possédons des résultats préliminaires concernant l'expression du récepteur Ap_{dop1} dans le neurone B51 des ganglions buccaux (Figure 5.4), il devient une priorité de tenter d'invalider l'expression de cette protéine par ARNi pour tenter de déterminer le rôle de ce récepteur dans cette cellule. Une alternative méthodologique serait également d'utiliser l'anticorps anti-Ap_{dop1} comme peptide antagoniste pour inhiber son activation. Nous savons que le conditionnement classique entraîne une augmentation du seuil d'excitabilité de B51 (Lorenzetti et al., 2004) et que dans le cas du conditionnement instrumental, on observe le phénomène inverse (Brembs et al., 2002; Brembs, 2003). Le neurone B51 devient donc une cellule sur laquelle on peut comparer directement la différence entre les mécanismes responsables du conditionnement classique et instrumental, mécanismes dépendants de la DA. Ainsi, le récepteur Ap_{dop1} pourrait moduler ces types de mémoire associative de manières différentes pour en conférer les propriétés particulières.

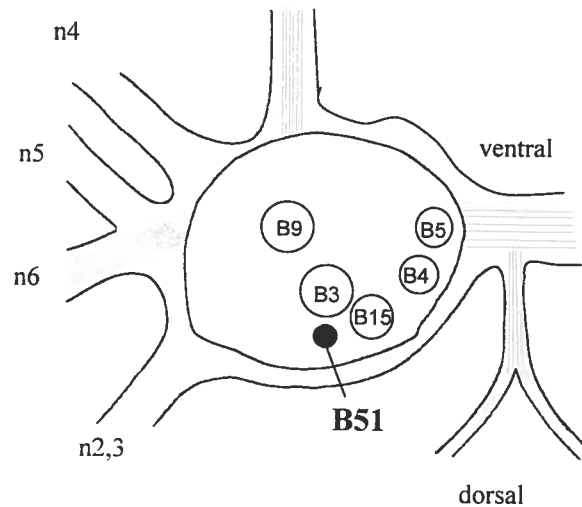
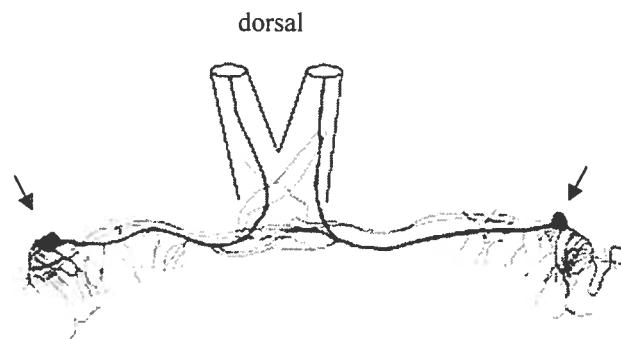
A**B**

Figure 5.4- **Localisation du neurone B51 dans le ganglion buccal.** (A) Représentation schématique d'un ganglion buccal. La position des neurones et de nerfs est indiquée. Illustration inspirée de Plummer & Kirk (1990). (B) Reconstruction des projections des neurones B51 (corps cellulaires en noir indiqués par les flèches) de chaque ganglion buccal. En gris pâle, on remarque la présence de projections de neurones faisant contact avec B51. Image adaptée de Evans & Cropper (1998).

5.3.4 Séquençage du génome de l'aplysie

L'avenir quant à l'utilisation de l'aplysie comme modèle d'étude sur la plasticité synaptique réside dans le séquençage du génome de cet invertébré. Ce projet d'envergure est en ce moment en cours (Moroz et al., 2004). Jusqu'à maintenant, l'élément limitant quant à l'utilisation de cet invertébré pour des études moléculaires est le manque d'information génomique. Ce consortium a pour l'instant séquencé 200 000 EST, soit environ 60 000 séquences uniques. Ils ont noté environ 4900 gènes avec des orthologues connus chez d'autres organismes. Ce projet permettra non seulement d'établir l'aplysie comme modèle d'étude cellulaire neurogénomique mais également d'accélérer le processus d'élucidation des cascades moléculaires impliquées dans la modulation de la mémoire et de l'apprentissage. Nous pourrons par la suite passer à des travaux de protéomiques d'envergure ce qui nous permettra de travailler avec une grande quantité de gènes simultanément. De plus, nous posséderons un outil essentiel nous permettant non seulement l'utilisation d'outils bioinformatiques d'analyse de séquences, mais également nous pourrons ainsi consulter cette base de données future pour connaître la structure primaire de protéines cibles. Nous n'aurons plus à cribler des banques d'ADNc, cloner des transcrits par RT-PCR ou directement du génomique, pour identifier de nouveaux récepteurs impliqués dans la mémoire. Ainsi, la faible abondance de certains ARNm ne sera plus un problème pour identifier les RCPG d'intérêt. Pour l'instant, nous pourrions vérifier si les séquences des récepteurs à 5-HT et DA connues jusqu'à maintenant se retrouvent bel et bien dans les 4900 gènes identifiés. De plus, nous pourrions chercher parmi ces 4900 gènes des séquences similaires pour tenter

d'identifier des gènes candidats codant potentiellement pour de nouveaux RCPG sérotoninergiques et dopaminergiques.

Nous n'avons pas complété la caractérisation moléculaire des clone 3 et 4 de notre criblage initial (Figure 5.1B). Pour l'instant, par comparaison de la séquence connue pour ces deux clones avec celle des récepteurs à 5-HT identifiés dans la littérature, il semble que ces clones soient similaires aux récepteurs 5-HT₁₋₅, soit des récepteurs de type inhibiteur de l'adénylate cyclase. Il serait intéressant d'analyser si, dans les 4900 gènes identifiés, ces deux fragments n'y sont pas présents et ainsi compléter leur séquence pour pouvoir en analyser leur structure primaire. La taille de la troisième boucle intracellulaire et de la queue C-terminal sont des éléments qui pourraient nous indiquer la nature du couplage à une protéine G de ces deux récepteurs potentiels.

5.4 Conclusions

L'étude du fonctionnement du cerveau est toujours aujourd'hui un sujet de recherche qui fascine un grand nombre de scientifiques. La capacité des animaux à modifier leurs comportements suivant un processus d'apprentissage, capacité atteignant son paroxysme chez l'être humain, est l'un des aspects les plus remarquables du fonctionnement du cerveau. La recherche en neuroscience commence à apporter des éléments de réponse sur le fonctionnement des mécanismes de stockage de l'information

des différents types de mémoire. L'utilisation des invertébrés pour comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires de la mémoire a grandement contribué à l'avancement de nos connaissances. Ces recherches montrent que les mécanismes moléculaires de base opérant dans le cerveau des mammifères pour modifier l'efficacité synaptique sont très similaires à ceux qui sont responsables de la formation de la mémoire chez les invertébrés. L'utilisation de la limace de mer appelée *Aplysia californica* a permis de démontrer que l'apprentissage produit des changements dans la force d'interaction des connections synaptiques, que le passage de la mémoire à court terme vers le long terme nécessite la transcription et la traduction de gènes, que la mémoire à long terme nécessite la croissance de nouvelles synapses et finalement l'identification de molécules essentielles dans l'activation, la régulation et la maintien de la mémoire.

La 5-HT déclenche une cascade d'événements, suite à la liaison sur des récepteurs membranaires, à la base de la modulation synaptique dans l'apprentissage et la mémoire chez l'aplysie. Du point de vue physiologique, l'identification de nouveaux récepteurs sérotoninergiques exprimés dans le SNC de l'aplysie permettra une progression énorme dans l'élucidation des mécanismes de régulation de la cascade AMPc dépendante. Également, par ces propriétés pharmacologiques et son expression dans le SNC, le clonage d'un récepteur dopaminergique vient rajouter un candidat intéressant potentiellement impliqué dans la modulation de la mémoire et de l'apprentissage de l'aplysie. Sa capacité à stimuler l'adénylate cyclase suite à la liaison de 5-HT ouvre la possibilité que se ne soit pas uniquement un récepteur sérotoninergique

qui soit l'élément déclencheur d'une cascade moléculaire à la base des modifications synaptiques dans les neurones sensoriels. De plus, il est assez évident que la dopamine est impliquée dans les systèmes de récompense et de renforcement du cerveau. De nouvelles évidences démontrent que la dopamine est également essentielle dans ces processus chez l'aplysie. L'identification d'un récepteur dopaminergique exprimé dans les ganglions et neurones impliqués dans ces phénomènes nous permettra d'établir un modèle plus précis des cascades moléculaires activées par la dopamine. Nos travaux permettront, aux scientifiques utilisant l'aplysie comme modèle, de posséder une meilleure connaissance des récepteurs exprimés à la surface des neurones, de connaître l'interaction entre les neurotransmetteurs qui activent les cascades moléculaires à la base de la mémoire et de l'apprentissage, mais également de posséder des outils pharmacologiques et moléculaires pouvant moduler l'activité de ces protéines pour comprendre comment ces neurotransmetteurs agissent.

Bibliographie

- Abrams TW, Castellucci VF, Camardo JS, Kandel ER, Lloyd PE (1984). Two endogenous neuropeptides modulate the gill and siphon withdrawal reflex in *Aplysia* by presynaptic facilitation involving cAMP-dependent closure of a serotonin-sensitive potassium channel. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 7956-7960.
- Adams WB, Parnas I, Levitan IB (1980). Mechanism of long-lasting synaptic inhibition in *Aplysia* neuron R15. *J Neurophysiol* **44**: 1148-1160.
- Adams WB, Levitan IB (1982). Intracellular injection of protein kinase inhibitor blocks the serotonin-induced increase in K⁺ conductance in *Aplysia* neuron R15. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 3877-3880.
- Adams WB, Benson JA (1985). The generation and modulation of endogenous rhythmicity in the *Aplysia* bursting pacemaker neurone R15. *Prog Biophys Mol Biol* **46**: 1-49.
- Ali DW, Orchard I (1994). Characterization of dopamine and serotonin receptors on the salivary glands of the locust, *Locusta migratoria*. *Biog Amines* **10**: 195-212.
- Angers A, Storozhuk MV, Duchaine T, Castellucci VF, DesGroseillers L (1998). Cloning and functional expression of an *Aplysia* 5-HT receptor negatively coupled to adenylate cyclase. *J Neurosci* **18**: 5586-5593.
- Angers S, Salahpour A, Bouvier M (2002). Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **42**: 409-435.
- Ansanay H, Sebben M, Bockaert J, Dumuis A (1992). Characterization of homologous 5-hydroxytryptamine₄ receptor desensitization in colliculi neurons. *Mol Pharmacol* **42**: 808-816.

- Antonov I, Kandel ER, Hawkins RD (1999). The contribution of facilitation of monosynaptic PSPs to dishabituation and sensitization of the *Aplysia* siphon withdrawal reflex. *J Neurosci* **19**: 10438-10450.
- Arch S, Berry RW (1989). Molecular and cellular regulation of neuropeptide expression: the bag cell model system. *Brain Res Brain Res Rev* **14**: 181-201.
- Arvanitaki A, Cardot H (1941). Contribution à la morphologie du système nerveux des Gastéropodes. Isolement, à l'état vivant, de corps neuroniques. *CR. Séances Soc Biol Fil* **135**: 965-968.
- Ascher P (1972). Inhibitory and excitatory effects of dopamine on *Aplysia* neurones. *J Physiol* **225**: 173-209.
- Bacskai BJ, Hochner B, Mahaut-Smith M, Adams SR, Kaang BK, Kandel ER, Tsien RY (1993). Spatially resolved dynamics of cAMP and protein kinase A subunits in *Aplysia* sensory neurons. *Science* **260**: 222-226.
- Bailey CH, Kaang BK, Chen M, Martin KC, Lim CS, Casadio A, Kandel ER (1997). Mutation in the phosphorylation sites of MAP kinase blocks learning-related internalization of apCAM in *Aplysia* sensory neurons. *Neuron* **18**: 913-924.
- Bailey CH, Kandel ER, Si K (2004). The persistence of long-term memory: a molecular approach to self-sustaining changes in learning-induced synaptic growth. *Neuron* **44**: 49-57.
- Barbas D, Zappulla JP, Angers S, Bouvier M, Castellucci VF, DesGroseillers L (2002). Functional characterization of a novel serotonin receptor (5-HT_{ap2}) expressed in the CNS of *Aplysia californica*. *J Neurochem* **80**: 335-345.
- Barbas D, DesGroseillers L, Castellucci VF, Carew TJ, Marinesco S (2003). Multiple serotonergic mechanisms contributing to sensitization in *Aplysia*: evidence of diverse serotonin receptor subtypes. *Learn Mem* **10**: 373-386.

- Barbas D, Campbell A, Castellucci VF, DesGroseillers L (2005a). Comparative localization of two serotonin receptors and sensorin in the CNS of *Aplysia californica*. *J Comp Neurol*, **490**: 295-304.
- Barbas D, Zappulla JP, Angers S, Bouvier M, Mohamed H, Byrne JH, Castellucci VF, DesGroseillers L (2005b). An *Aplysia* dopamine 1-like receptor: molecular and functional characterization. Submitted to *J Neurochem*.
- Baxter DA, Byrne JH (1989). Serotonergic modulation of two potassium currents in the pleural sensory neurons of *Aplysia*. *J Neurophysiol* **62**: 665-679.
- Baxter DA, Byrne JH (1990). Differential effects of cAMP and serotonin on membrane current, action-potential duration, and excitability in somata of pleural sensory neurons of *Aplysia*. *J Neurophysiol* **64**: 978-990.
- Bear MF, Connors BW, Paradiso MA (1999). *Neurosciences à la découverte du cerveau*. Éditions Pradel, Paris, France.
- Benson JA, Levitan IB (1983). Serotonin increases an anomalously rectifying K⁺ current in the *Aplysia* neuron R15. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 3522-3525.
- Bergh R (1902). *Malacologische Untersuchungen, Band 7, Vierte Abteilung, Vierter Abschnitt: Ascoglossa, Aplysiidae*. In Archipel der Philippinen, edited by C. Semper, Wiesbaden: C.W. Kreidel.
- Bermak JC, Li M, Bullock C, Zhou QY (2001). Regulation of transport of the dopamine D1 receptor by a new membrane-associated ER protein. *Nature Cell Biol* **3**: 492-498.
- Bernier L, Castellucci VF, Kandel ER, Schwartz JH (1982). Facilitatory transmitter causes a selective and prolonged increase in adenosine 3':5'-monophosphate in sensory neurons mediating the gill and siphon withdrawal reflex in *Aplysia*. *J Neurosci* **2**: 1682-1691.

- Berke JD, Hyman SE (2000). Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. *Neuron* **25**: 515-532.
- Billy AJ, Walters ET (1989). Modulation of mechanosensory threshold in *Aplysia* by serotonin, small cardioactive peptideB (SCPB), FMRFamide, acetylcholine, and dopamine. *Neurosci Lett* **105**: 200-204.
- Bikker JA, Trumpp-Kallmeyer S, Humblet C (1998). G-protein coupled receptors: models, mutagenesis, and drug design. *J Med Chem* **41**: 2911-2927.
- Blenau W, Erber J, Baumann A (1998). Characterization of a dopamine D1 receptor from *Apis mellifera*: cloning, functional expression, pharmacology, and mRNA localization in the brain. *J Neurochem* **70**: 15-23.
- Blenau W, Baumann A (2001). Molecular and pharmacological properties of insect biogenic amine receptors: lessons from *Drosophila melanogaster* and *Apis mellifera*. *Arch Insect Biochem Physiol* **48**: 13-38.
- Blitzer RD, Connor JH, Brown GP, Wong T, Shenolikar S, Iyengar R, Landau EM (1998). Gating of CaMKII by cAMP-regulated protein phosphatase activity during LTP. *Science* **280**: 1940-1942.
- Bockaert J, Pin JP (1998). Use of a G-protein-coupled receptor to communicate. An evolutionary success. *CR Acad Sci III* **321**: 529-551.
- Bockaert J, Pin JP (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J* **18**: 1723-1729.
- Boess FG, Martin IL (1994). Molecular biology of 5-HT receptors. *Neuropharmacology* **33**: 275-317.
- Böhm SK, Grady EF, Bunnett NW (1997). Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors. *Biochem J* **322**: 1-18.

- Bourne HR, Sanders DA, McCormick F (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* **349**: 117-127.
- Bouvier M (2001). Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat Rev Neurosci* **2**: 274-286.
- Braha O, Dale N, Hochner B, Klein M, Abrams TW, Kandel ER (1990). Second messengers involved in the two processes of presynaptic facilitation that contribute to sensitization and dishabituation in *Aplysia* sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 2040-2044.
- Braha O, Edmonds B, Sacktor T, Kandel ER, Klein M (1993). The contributions of protein kinase A and protein kinase C to the actions of 5-HT on the L-type Ca^{2+} current of the sensory neurons in *Aplysia*. *J Neurosci* **13**: 1839-1851.
- Brembs B, Lorenzetti FD, Reyes FD, Baxter DA, Byrne JH (2002). Operant reward learning in *Aplysia*: neuronal correlates and mechanisms. *Science* **296**: 1706-1709.
- Brembs B (2003). Operant conditioning in invertebrates. *Curr Opin Neurobiol* **13**: 710-717.
- Bristol AS, Fischer TM, Carew TJ (2001). Combined effects of intrinsic facilitation and modulatory inhibition of identified interneurons in the siphon withdrawal circuitry of *Aplysia*. *J Neurosci* **21**: 8990-9000.
- Bristol AS, Marinesco S, Carew TJ (2004). The neural circuit of tail-elicited siphon withdrawal in *Aplysia*: II. Role of gated inhibition in differential lateralization of sensitization and dishabituation. *J Neurophysiol* **91**: 678-692.
- Bruehl CL, Berry RW (1985). Regulation of synthesis of the neurosecretory egg-laying hormone of *Aplysia*: antagonistic roles of calcium and cyclic adenosine 3':5'-monophosphate. *J Neurosci* **5**: 1233-1238.
- Brunelli M, Castellucci VF, Kandel ER (1976). Synaptic facilitation and behavioral sensitization in *Aplysia*: possible role of serotonin and cyclic AMP. *Science* **194**: 1178-1181.

- Brunet JF, Shapiro E, Foster SA, Kandel ER, Iino Y (1991). Identification of a peptide specific for *Aplysia* sensory neurons by PCR-based differential screening. *Science* **252**: 856-859.
- Budnik V, Wu CF, White K (1989). Altered branching of serotonin-containing neurons in *Drosophila* mutants unable to synthesize serotonin and dopamine. *J Neurosci* **9**: 2866-2877.
- Buhot MC, Patra SK, Naili S (1995). Spatial memory deficits following stimulation of hippocampal 5-HT_{1B} receptors in the rat. *Eur J Pharmacol* **285**: 221-228.
- Buhot MC (1997). Serotonin receptors in cognitive behaviors. *Curr Opin Neurobiol* **7**: 243-254.
- Buonomano DV, Cleary LJ, Byrne JH (1992). Inhibitory neuron produces heterosynaptic inhibition of the sensory-to-motor neuron synapse in *Aplysia*. *Brain Res* **577**: 147-150.
- Byrne JH (1983). Identification and initial characterization of a cluster of command and pattern-generating neurons underlying respiratory pumping in *Aplysia californica*. *J Neurophysiol* **49**: 491-508.
- Byrne JH (1987). Cellular analysis of associative learning. *Physiol Rev* **67**: 329-439.
- Byrne JH, Zwartjes R, Homayouni R, Critz SD, Eskin A (1993). Roles of second messenger pathways in neuronal plasticity and in learning and memory. Insights gained from *Aplysia*. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* **27**: 47-108.
- Byrne JH, Kandel ER (1996). Presynaptic facilitation revisited: state and time dependence. *J Neurosci*. **16**: 425-435.
- Carew TJ, Castellucci VF, Kandel ER (1971). An analysis of dishabituation and sensitization of the gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. *Int J Neurosci* **2**: 79-98.
- Carew TJ, Hawkins RD, Kandel ER (1983). Differential classical conditioning of a defensive withdrawal reflex in *Aplysia californica*. *Science* **219**: 397-400.

- Carpenter D, Breese G, Schanberg S, Kopin I (1971). Serotonin and dopamine: distribution and accumulation in *Aplysia* nervous and non-nervous tissues. *Int J Neurosci* **2**: 49-56.
- Carthew RW (2001). Gene silencing by double-stranded RNA. *Curr Opin Cell Biol* **13**: 244-248.
- Casadio A, Martin KC, Giustetto M, Zhu H, Chen M, Bartsch D, Bailey CH, Kandel ER (1999). A transient, neuron-wide form of CREB-mediated long-term facilitation can be stabilized at specific synapses by local protein synthesis. *Cell* **99**: 221-237.
- Cassel JC, Jeltsch H (1995). Serotonergic modulation of cholinergic function in the central nervous system: cognitive implications. *Neuroscience* **69**: 1-41.
- Castellucci VF, Kandel ER (1974). A quantal analysis of the synaptic depression underlying habituation of the gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. *Proc Natl Acad Sci USA* **71**: 5004-5008.
- Castellucci V, Kandel ER (1976). Presynaptic facilitation as a mechanism for behavioral sensitization in *Aplysia*. *Science* **194**: 1176-1178.
- Castellucci VF, Carew TJ, Kandel ER (1978). Cellular analysis of long-term habituation of the gill-withdrawal reflex of *Aplysia californica*. *Science* **202**: 1306-1308.
- Castellucci VF, Kandel ER, Schwartz JH, Wilson FD, Nairn AC, Greengard P (1980). Intracellular injection of the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase simulates facilitation of transmitter release underlying behavioral sensitization in *Aplysia*. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 7492-7496.
- Castellucci VF, Nairn AC, Greengard P, Schwartz JH, Kandel ER (1982). Inhibitor of adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase blocks presynaptic facilitation in *Aplysia*. *J Neurosci* **2**: 1673-1681.
- Castellucci VF, Frost WN, Goelet P, Montarolo PG, Schacher S, Morgan JA, Blumenfeld JH, Kandel ER (1986). Cell and molecular analysis of long-term sensitization in *Aplysia*. *J Physiol (Paris)* **81**: 349-357.

- Castellucci VF, Blumenfeld JH, Goelet P, Kandel ER (1989). Inhibitor of protein synthesis blocks long-term behavioral sensitization in the isolated gill-withdrawal reflex of *Aplysia*. *J Neurobiol* **20**: 1-9.
- Cawthorpe D, Lukowiak K (1990). Dopamine and FMRFamide act directly on isolated gill muscle fibers in culture. *Neurosci Lett* **113**: 345-348.
- Cedar H, Schwartz JH (1972). Cyclic adenosine monophosphate in the nervous system of *Aplysia californica*. II. Effect of serotonin and dopamine. *J Gen Physiol* **60**: 570-587.
- Cepeda C, Colwell CS, Itri JN, Chandler SH, Levine MS (1998). Dopaminergic modulation of NMDA-induced whole cell currents in neostriatal neurons slices: contribution of calcium conductances. *J Neurophysiol* **79**: 82-94.
- Chandhoke V, Southall M, Holt R, Flinn JM (2001). Dopamine receptor subtype density as a function of age in *Aplysia californica*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **130**: 461-466.
- Chang DJ, Li XC, Lee YS, Kim HK, Kim US, Cho NJ, Lo X, Weiss KR, Kandel ER, Kaang BK (2000). Activation of a heterologously expressed octopamine receptor coupled only to adenylyl cyclase produces all the features of presynaptic facilitation in *Aplysia* sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 1829-1834.
- Charpentier S, Jarvie KR, Severynse DM, Caron MG, Tiberi M (1996). Silencing of the constitutive activity of the dopamine D1B receptor. Reciprocal mutations between D1 receptor subtypes delineate residues underlying activation properties. *J Biol Chem* **271**: 28071-28076.
- Chase DL, Pepper JS, Koelle MR (2004). Mechanism of extrasynaptic dopamine signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Neurosci* **10**: 1096-1103.
- Chesnoy-Marchais D (1984). Effects of dopamine on the *Aplysia* burster R15. *Brain Res* **304**: 83-91.

- Chitwood RA, Li Q, Glanzman DL (2001). Serotonin facilitates AMPA-type responses in isolated siphon motor neurons of *Aplysia* in culture. *J Physiol* **534**: 501-510.
- Church PJ, Lloyd PE (1991). Expression of diverse neuropeptide cotransmitters by identified motor neurons in *Aplysia*. *J Neurosci* **11**: 618-625.
- Civelli O, Bunzow JR, Grandy DK (1993). Molecular diversity of the dopamine receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **33**: 281-307.
- Cleary LJ, Byrne JH (1993). Identification and characterization of a multifunction neuron contributing to defensive arousal in *Aplysia*. *J Neurophysiol* **70**: 1767-1776.
- Cleary LJ, Byrne JH, Frost WN (1995). Role of interneurons in defensive withdrawal reflexes in *Aplysia*. *Learn Mem* **2**: 133-151
- Cohen JE, Onyike CU, McElroy VL, Lin AH, Abrams TW (2003). Pharmacological characterization of an adenylyl cyclase-coupled 5-HT receptor in *Aplysia*: comparison with mammalian 5-HT receptors. *J Neurophysiol* **89**: 1440-1455.
- Cravchik A, Matus A (1993). A novel strategy for the immunological tagging of cDNA constructs. *Gene* **137**: 139-143.
- Daaka Y, Luttrell LM, Lefkowitz RJ (1997). Switching of the coupling of the β_2 -adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* **390**: 88-91.
- Davis RL (1993). Mushroom bodies and *Drosophila* learning. *Neuron* **11**: 1-14.
- Degols G, Leonetti JP, Mechti N, Lebleu B (1991). Antiproliferative effects of antisense oligonucleotides directed to the RNA of c-myc oncogene. *Nucleic Acids Res* **19**: 945-948.
- Demchyshyn LL, McConkey F, Niznik HB (2000). Dopamine D5 receptor agonist high affinity and constitutive activity profile conferred by carboxyl-terminal tail sequence. *J Biol Chem* **275**: 23446-23455.

- DesGroseillers L (1990). Molecular aspects of egg-laying behavior in *Aplysia californica*. *Behav Genet* **20**: 251-264.
- DesGroseillers L, Auclair D, Wickham L, Maalouf M (1994). A novel actin cDNA is expressed in the neurons of *Aplysia californica*. *Biochim Biophys Acta* **1217**: 322-324.
- Dixon RA, Sigal IS, Candelore MR, Register RB, Scattergood W, Rands E, Strader CD (1987). Structural features required for ligand binding to the beta-adrenergic receptor. *EMBO J* **6**: 3269-3275.
- Drummond AH, Bucher F, Levitan IB (1980). Distribution of serotonin and dopamine receptors in *Aplysia* tissues: analysis by [³H]LSD binding and adenylate cyclase stimulation. *Brain Res* **184**: 163-177.
- Dubuc B, Castellucci VF (1991). Receptive fields and properties of a new cluster of mechanoreceptor neurons innervating the mantle region and the branchial cavity of the marine mollusk *Aplysia californica*. *J Exp Biol* **156**: 315-334.
- Duerr JS, Frisby DL, Gaskin J, Duke A, Asermely K, Huddleston D, Eiden LE, Rand JB (1999). The *cat-1* gene of *Caenorhabditis elegans* encodes a vesicular monoamine transporter required for specific monoamine-dependent behaviors. *J Neurosci* **19**: 72-84.
- Eales NB (1921). *Aplysia*. Liverpool Marine Biology Committee, Proc Trans Liverpool Biol Soc, LMBC Mem. **35**: 183-266.
- Eason MG, Liggett SB (1995). Identification of a Gs coupling domain in the amino terminus of the third intracellular loop of the alpha 2A-adrenergic receptor. Evidence for distinct structural determinants that confer Gs versus Gi coupling. *J Biol Chem* **270**: 24753-24760.
- Eberly LB, Pinsker HM (1984). Neuroethological studies of reflex plasticity in intact *Aplysia*. *Behav Neurosci* **98**: 609-630.

- Eguchi, S, Numaguchi K, Iwasaki H, Matsumoto T, Yamakawa T, Utsunomiya H, Motley ED, Kawakatsu H, Owada KM, Hirata Y, Marumo F, Inagami T (1998). Calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation mediates the angiotensin II-induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **273**: 8890-8896.
- Ehrengruber MU, Doupnik CA, Xu Y, Garvey J, Jasek MC, Lester HA, Davidson N (1997). Activation of heteromeric G protein-gated inward rectifier K⁺ channels overexpressed by adenovirus gene transfer inhibits the excitability of hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 7070-7075.
- Emptage NJ, Carew TJ (1993). Long-term synaptic facilitation in the absence of short-term facilitation in *Aplysia* neurons. *Science* **262**: 253-256.
- Evans ML, Kadan MJ, Hartig PR, Carpenter DO (1991). Correlation of ¹²⁵I-LSD autoradiographic labeling with serotonin voltage clamp responses in *Aplysia* neurons. *Synapse* **8**: 22-29.
- Evans CG, Cropper EC (1998). Proprioceptive input to feeding motor programs in *Aplysia*. *J Neurosci* **18**: 8016-8031.
- Feldman RS (2004). *Essentials of Understanding Psychology*, 4th Edition. McGraw-Hill Higher Education, New York, NY.
- Feng G, Hannan F, Reale V, Hon YY, Kousky CT, Evans PD, Hall LM (1996). Cloning and functional characterization of a novel dopamine receptor from *Drosophila melanogaster*. *J Neurosci* **16**: 3925-3933.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806-811.

- Fischer TM, Carew TJ (1993). Activity-dependent potentiation of recurrent inhibition: a mechanism for dynamic gain control in the siphon withdrawal reflex of *Aplysia*. *J Neurosci* **13**: 1302-1314.
- Fischer TM, Carew TJ (1995). Cutaneous activation of the inhibitory L30 interneurons provides a mechanism for regulating adaptive gain control in the siphon withdrawal reflex of *Aplysia*. *J Neurosci* **15**: 762-773.
- Fischer TM, Blazis DE, Priver NA, Carew TJ (1997). Metaplasticity at identified inhibitory synapses in *Aplysia*. *Nature* **389**: 860-865.
- Fischer TM, Yuan JW, Carew TJ (2000). Dynamic regulation of the siphon withdrawal reflex of *Aplysia californica* in response to changes in the ambient tactile environment. *Behav Neurosci* **114**: 1209-1222.
- Fitzgerald K, Carew TJ (1991). Serotonin mimics tail shock in producing transient inhibition in the siphon withdrawal reflex of *Aplysia*. *J Neurosci* **11**: 2510-2518.
- Flinn JM, Gochman P, Wanschura P, Chandhoke V (2001). The effect of dopamine receptor blockade on motor behavior in *Aplysia californica*. *Pharmacol Biochem Behav* **69**: 425-430.
- Fox LE, Lloyd PE (1998). Serotonergic neurons differentially modulate the efficacy of two motor neurons innervating the same muscle fibers in *Aplysia*. *J Neurophysiol* **80**: 647-655.
- Fraser CM (1989). Site-directed mutagenesis of β -adrenergic receptors. Identification of conserved cysteine residues that independently affect ligand binding and receptor activation. *J Biol Chem* **264**: 9266-9270.
- Frazier WT, Kandel ER, Kupfermann I, Waziri R, Coggeshall RE (1967). Morphological and functional properties of identified neurons in the abdominal ganglion of *Aplysia californica*. *J Neurophysiol* **30**: 1288-1351.

- Freedman NJ, Lefkowitz RJ (1996). Desensitization of G protein-coupled receptors. *Recent Progr Horm Res* **51**: 319-351.
- Frost WN, Castellucci VF, Hawkins RD, Kandel ER (1985). Monosynaptic connections made by the sensory neurons of the gill- and siphon-withdrawal reflex in *Aplysia* participate in the storage of long-term memory for sensitization. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 8266-8269.
- Frost WN, Clark JA, Kandel ER (1988). Parallel processing of short-term memory for sensitization in *Aplysia*. *J Neurobiol* **19**: 297-334.
- Frost WN, Kandel ER (1995). Structure of the network mediating siphon-elicited siphon withdrawal in *Aplysia*. *J Neurophysiol* **73**: 2413-2427.
- Gardner D (1971). Bilateral symmetry and interneuronal organization in the buccal ganglia of *Aplysia*. *Science* **173**: 550-553.
- Gardner D, Kandel ER (1972). Diphasic post-synaptic potential: a chemical synapse capable of mediating conjoint excitation and inhibition. *Science* **176**: 675-678.
- Gardner D, Kandel ER (1977). Physiological and kinetic properties of cholinergic receptors activated by multi-action interneurons in buccal ganglia of *Aplysia*. *J Neurophysiol* **40**: 333-348.
- Gerald C, Adham N, Kao HT, Olsen MA, Laz TM, Schechter LE, Bard JA, Vaysse PJ, Hartig PR, Branchek TA (1995). The 5-HT₄ receptor: molecular cloning and pharmacological characterization of two splice variants. *EMBO J* **14**: 2806-2815.
- Gerhardt CC, van Heerikhuizen H (1997). Functional characteristics of heterologously expressed 5-HT receptors. *Eur J Pharmacol* **334**: 1-23.
- Gerschenfeld HM, Tauc L (1961). Pharmacological specificities of neurons in an elementary central nervous system. *Nature* **189**: 924-925.

- Gerschenfeld HM, Tauc L (1964). Différents aspects de la pharmacologie des synapses dans le système nerveux des Mollusques. *J Physiol (Paris)* **56**: 360-361.
- Gerschenfeld HM, Paupardin-Tritsch D (1974a). Ionic mechanisms and receptor properties underlying the responses of molluscan neurones to 5-hydroxytryptamine. *J Physiol* **243**: 427-456.
- Gerschenfeld HM, Paupardin-Tritsch D (1974b). On the transmitter function of 5-hydroxytryptamine at excitatory and inhibitory monosynaptic junctions. *J Physiol* **243**: 457-481.
- Ghirardi M, Braha O, Hochner B, Montarolo PG, Kandel ER, Dale N (1992). Roles of PKA and PKC in facilitation of evoked and spontaneous transmitter release at depressed and nondepressed synapses in *Aplysia* sensory neurons. *Neuron* **9**: 479-489.
- Ghirardi M, Montarolo PG, Kandel ER (1995). A novel intermediate stage in the transition between short- and long-term facilitation in the sensory to motor neuron synapse of *Aplysia*. *Neuron* **14**: 413-420.
- Giller E Jr, Schwartz JH (1971). Acetylcholinesterase in identified neurons of abdominal ganglion of *Aplysia californica*. *J Neurophysiol* **34**: 108-115.
- Glanzman DL, Mackey SL, Hawkins RD, Dyke AM, Lloyd PE, Kandel ER (1989). Depletion of serotonin in the nervous system of *Aplysia* reduces the behavioral enhancement of gill withdrawal as well as the heterosynaptic facilitation produced by tail shock. *J Neurosci* **9**: 4200-4213.
- Glanzman DL (1995). The cellular basis of classical conditioning in *Aplysia californica* – it's less simple than you think. *Trends Neurosci* **18**: 30-36.
- Goldsmith BA, Abrams TW (1991). Reversal of synaptic depression by serotonin at *Aplysia* sensory neuron synapses involves activation of adenylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 9021-9025.

- Goldsmith BA, Abrams TW (1992). cAMP modulates multiple K⁺ currents, increasing spike duration and excitability in *Aplysia* sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 11481-11485.
- Goldstein RS, Schwartz JH (1989). Catecholamine neurons in *Aplysia*: improved light-microscopic resolution and ultrastructural study using paraformaldehyde and glutaraldehyde (FaGlu) cytochemistry. *J Neurobiol* **20**: 203-218.
- Gospe SM Jr (1983). Studies of dopamine pharmacology in molluscs. *Life Sci* **33**: 1945-1957.
- Gotzes F, Balfanz S, Baumann A (1994). Primary structure and functional characterization of a *Drosophila* dopamine receptor with high homology to human D1/5 receptors. *Recept Chan* **2**: 131-141.
- Gotzes F, Baumann A (1996). Functional properties of *Drosophila* dopamine D1-receptors are not altered by the size of the N-terminus. *Biochem Biophys Res Commun* **222**: 121-126.
- Gregerson KA, Flagg TP, O'Neill TJ, Anderson M, Lauring O, Horel JS, Welling PA (2001). Identification of G protein-coupled, inward rectifier potassium channel gene products from the rat anterior pituitary gland. *Endocrinology* **142**: 2820-2832.
- Guan Z, Giustetto M, Lomvardas S, Kim JH, Miniaci MC, Schwartz JH, Thanos D, Kandel ER (2002). Integration of long-term-memory-related synaptic plasticity involves bidirectional regulation of gene expression and chromatin structure. *Cell* **111**: 483-493.
- Guan Z, Kim JH, Lomvardas S, Holick K, Xu S, Kandel ER, Schwartz JH (2004). p38 MAP kinase mediates both short-term and long-term synaptic depression in *Aplysia*. *J Neurosci* **23**: 7317-7325.
- Guarna M, Bartolini A, Ghelardini C, Galeotti N, Bracci L, Stefano GB, Bianchi E (2003). Anti-mu opioid antiserum against the third external loop of the cloned mu-opioid receptor acts as a mu receptor neutral antagonist. *Brain Res Mol Brain Res* **119**: 100-110.

- Gutkind JS (1998). The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem* **273**: 1839-1842.
- Hall H (1994). Dopamine receptors: radioligands for pharmacological and biochemical characterization. In: *Dopamine receptors and transporters*. Niznik HB, New-York, NY.
- Hall RA, Premont RT, Lefkowitz RJ (1999). Heptahelical receptor signaling: beyond the G protein paradigm. *J Cell Biol* **145**: 927-932.
- Han PL, Levin LR, Reed RR, Davis RL (1992). Preferential expression of the *Drosophila rutabaga* gene in mushroom bodies, neural centers for learning in insects. *Neuron* **9**: 619-627.
- Han KA, Millar NS, Grotewiel MS, Davis RL (1996). DAMB, a novel dopamine receptor expressed specifically in *Drosophila* mushroom bodies. *Neuron* **16**: 1127-1135.
- Hawkins RD, Abrams TW, Carew TJ, Kandel ER (1983). A cellular mechanism of classical conditioning in *Aplysia*: activity-dependent amplification of presynaptic facilitation. *Science* **219**: 400-405.
- Hawkins RD, Carew TJ, Kandel ER (1986). Effects of interstimulus interval and contingency on classical conditioning of the *Aplysia* siphon withdrawal reflex. *J Neuroscience* **6**: 1695-1701.
- Hawkins RD (1989). Localization of potential serotonergic facilitator neurons in *Aplysia* by glyoxylic acid histofluorescence combined with retrograde fluorescent labelling. *J Neurosci* **9**: 4214-4226.
- Hebert TE, Moffett S, Morello JP, Loisel TP, Bichet DG, Barret C, Bouvier M (1996). A peptide derived from a β_2 -adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation. *J Biol Chem* **271**: 16384-16392.
- Hemmings HC Jr, Greengard P, Tung HY, Cohen P (1984). DARP-32, a dopamine-regulated neuronal phosphoprotein, is a potent inhibitor of protein phosphatase-1. *Nature* **310**: 503-505.

- Hen R (1993). Structural and functional conservation of serotonin receptors throughout evolution. In: *Comparative molecular neurobiology* (Pichon Y, ed), pp. 266-278. Basel: Birkhäuser.
- Herrlich A, Daub H, Knebel A, Herrlich P, Ullrich A, Schultz G, Gudermann T (1998). Ligand-independent activation of platelet-derived growth factor receptor is a necessary intermediate in lysophosphatidic, acid-stimulated mitogenic activity in L cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 8985-8990.
- Hibert MF, Trumpp-Kallmeyer S, Bruinvels A, Hoflack J (1991). Three-dimensional models of neurotransmitter G-binding protein-coupled receptors. *Mol Pharmacol* **40**: 8-15.
- Hills T, Broclie PJ, Maricq AV (2002). Dopamine and glutamate control area-restricted search behaviour in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* **24**: 1217-1225.
- Hochner B, Klein M, Schacher S, Kandel ER (1986). Additional component in the cellular mechanism of presynaptic facilitation contributes to behavioral dishabituation in *Aplysia*. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 8794-8798.
- Hochner B, Kandel ER (1992). Modulation of a transient K⁺ current in the pleural sensory neurons of *Aplysia* by serotonin and cAMP: implications for spike broadening. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 11476-11480.
- Houk JC, Adams JL, Barto AG (1995). A model of how the basal ganglia generate and use neural signals that predict reinforcement. In *Models of information processing in the basal ganglia*. MIT Press. Cambridge, MA.
- Hoyer D., Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PP (1994). International union of pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). *Pharmacol Rev* **46**: 157-203.

- Huang YY, Kandel ER (1995). D1/D5 receptor agonists induce a protein synthesis-dependent late potentiation in the CA1 region of the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 2446-2450.
- Hughes GM, Tauc L (1963). An electrophysiological study of the anatomical relations of two giant nerve cells in *Aplysia depilans*. *J Exp Biol* **40**: 469-486.
- Iwasiow RM, Nantel MF, Tiberi M (1999). Delineation of the structural basis for the activation properties of the dopamine D1 receptor subtypes. *J Biol Chem* **274**: 31882-31890.
- Jackson A, Iwasiow RM, Tiberi M (2000). Distinct function of the cytoplasmic tail in human D1-like receptor ligand binding and coupling. *FEBS Lett* **470**: 183-188.
- Jahan-Parwar B, Fredman SM (1978). Control of pedal and parapodial movements in *Aplysia*. I. Proprioceptive and tactile reflexes. *J Neurophysiol* **41**: 600-608.
- Jan LY, Jan YN (1997). Receptor-regulated ion channels. *Curr Opin Cell Biol* **9**: 155-160.
- Jay TM (2003). Dopamine: a potential substrate for synaptic plasticity and memory mechanisms. *Prog Neurobiol* **69**: 375-390.
- Jennings KR, Host JJ, Kaczmarek LK, Strumwasser F (1981). Serotonergic inhibition of afterdischarge in peptidergic bag cells. *J Neurobiol* **12**: 579-590.
- Jin LQ, Wang HY, Friedman E (2001). Stimulated D(1) dopamine receptors couple to multiple G α proteins in different brain regions. *J Neurochem* **78**: 981-990.
- Jockers R, Da Silva A, Strosberg AD, Bouvier M, Marullo S (1996). New molecular and structural determinants involved in β_2 -adrenergic receptor desensitization and sequestration. Delineation using chimeric β_3/β_2 -adrenergic receptors. *J Biol Chem* **271**: 9355-9362.
- Kaang BK (1996). Parameters influencing ectopic gene expression in *Aplysia* neurons. *Neurosci Lett* **221**: 29-32.

- Kabotyanski EA, Baxter DA, Cushman SJ, Byrne JH (2000). Modulation of fictive feeding by dopamine and serotonin in *Aplysia*. *J Neurophysiol* **83**: 374-392.
- Kaczmarek LK, Jennings K, Strumwasser F (1978). Neurotransmitter modulation, phosphodiesterase inhibitor effects, and cyclic AMP correlates of afterdischarge in peptidergic neurites. *Proc Natl Acad Sci USA* **75**: 5200-5204.
- Kadan MJ, Hartig PR (1988). Autoradiographic localization and characterization of [¹²⁵I]lysergic acid diethylamide binding to serotonin receptors in *Aplysia*. *Neuroscience* **24**: 1089-1102.
- Kandel ER (1976). *Cellular basis of behavior*. Eds Freeman WH and Company, San Francisco, CA.
- Kandel ER (1979). *Behavioral biology of Aplysia. A contribution to the comparative study of opisthobranch mollusks*. Eds Freeman WH and Company, San Francisco, CA.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM (1991). *Principles of neural science, 3rd ed*. Appleton & Lange, Norwalk, CO.
- Kandel ER (2001). The molecular biology of memory storage: a dialog between genes and synapses. *Science* **294**: 1030-1038.
- Kanz JE, Eberly LB, Cobbs JS, Pinsker HM (1979). Neuronal correlates of siphon withdrawal in freely behaving *Aplysia*. *J Neurophysiol* **42**: 1538-1556.
- Kauer JA, Kaczmarek LK (1985). Peptidergic neurons of *Aplysia* lose their response to cyclic adenosine 3':5'-monophosphate during a prolonged refractory period. *J Neurosci* **5**: 1339-1345.
- Kauer JA, Fisher TE, Kaczmarek LK (1987). Alpha bag cell peptide directly modulates the excitability of the neurons that release it. *J Neurosci* **7**: 3623-3632.

- Keating CD, Kriek N, Daniels M, Aschcroft NR, Hopper NA, Siney EJ, Holden-Dye L, Burke JF (2003). Whole-genome analysis of 60 G protein-coupled receptors in *Caenorhabditis elegans* by gene knockout with RNAi. *Curr Biol* **13**: 1715-1720.
- Kebabian PR, Kebabian JW, Carpenter DO (1979). Regulation of cyclic AMP in heart and gill of *Aplysia* by putative neurotransmitters dopamine and serotonin. *Life Sci* **24**: 1757-1764.
- Klein M, Kandel ER (1980). Mechanism of calcium current modulation underlying presynaptic facilitation and behavioral sensitization in *Aplysia*. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 6912-6916.
- Klein M, Camardo J, Kandel ER (1982). Serotonin modulates a specific potassium current in the sensory neurons that show presynaptic facilitation in *Aplysia*. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 5713-5717.
- Klein M (1993). Differential cyclic AMP dependence of facilitation at *Aplysia* sensorimotor synapses as a function of prior stimulation: augmentation versus restoration of transmitter release. *J Neurosci* **13**: 3793-801.
- Klein M (1994). Synaptic augmentation by 5-HT at rested *Aplysia* sensorimotor synapses: independence of action potential prolongation. *Neuron* **13**: 159-166.
- Kobilka BK, Kobilka TS, Daniel K, Regan JW, Caron MG, Lefkowitz RJ (1988). Chimeric α_2 - β_2 -adrenergic receptors: delineation of domains involved in effector coupling and ligand binding specificity. *Science* **240**: 1310-1316.
- Koch WJ, Hawes BE, Allen LF, Lefkowitz RJ (1994). Direct evidence that Gi-coupled receptor stimulation of mitogen-activated protein kinase is mediated by $G_{\beta\gamma}$ activation of p21^{ras}. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 12706-12710.
- Koester J, Mayeri E, Liebeswar G, Kandel ER (1973). Cellular regulation of homeostasis: neuronal control of the circulation in *Aplysia*. *Fed Proc* **32**: 2179-2187.

- Koester J, Kandel ER (1977). Further identification of neurons in the abdominal ganglion of *Aplysia* using behavioral criteria. *Brain Research* **121**: 1-20.
- Kokay IC, Ebert PR, Kirchhof BS, Mercer AR (1999). Distribution of dopamine receptors and dopamine receptor homologs in the brain of the honey bee, *Apis mellifera*. *Microsc Res Tech* **44**: 179-189.
- Kozasa T, Jiang X, Hart MJ, Sternweis PM, Singer WD, Gilman AG, Bollag G, Sternweis PC (1998). p115 RhoGEF, a GTPase activating protein for $G\alpha_{12}$ and $G\alpha_{13}$. *Science* **280**: 2109-2111.
- Kriegstein AR, Castellucci V, Kandel ER (1974). Metamorphosis of *Aplysia Californica* in laboratory culture. *Proc Natl Acad Sci USA* **71**: 3654-3658.
- Kruger KE, Sossin WS, Sacktor TC, Bergold PJ, Beushausen S, Schwartz JH (1991). Cloning and characterization of Ca^{2+} -dependent and Ca^{2+} -independent PKCs expressed in *Aplysia* sensory cells. *J Neurosci* **11**: 2303-13.
- Kupfermann I, Cohen JL, Mandelbaum DE, Schonberg M, Susswein AJ, Weiss KR (1979). Functional role of serotonergic neuromodulation in *Aplysia*. *Fed Proc* **38**: 2095-2102.
- Kyte J, Doolittle RF (1982). A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J Mol Biol* **157**: 105-132.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR,

Chisoe SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzner M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Raymond C, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la Bastide M, Dedhia N, Blocker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglou S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowski J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ, Szustakowski J, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S, Chen YJ (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**: 860-921.

Lavine N, Ethier N, Oak JN, Pei L, Liu F, Trieu P, Rebois RV, Bouvier M, Hebert TE, Van Tol HH (2002). G protein-coupled receptors form stable complexes with inwardly rectifying potassium channels and adenylyl cyclase. *J Biol Chem* **277**: 46010-46019

Lechner HA, Baxter DA, Byrne JH (2000a). Classical conditioning of feeding in *Aplysia*: II. Neurophysiological correlates. *J Neurosci* **20**: 3377-3386.

- Lechner HA, Baxter DA, Byrne JH (2000b). Classical conditioning of feeding in *Aplysia*: I. Behavioral analysis. *J Neurosci* **20**: 3369-3376.
- Lee HK, Barbarosie M, Kameyama K, Bear MF, Huganir RL (2000a). Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity. *Nature* **405**: 955-959.
- Lee SP, Xie Z, Varghese G, Nguyen T, O'Dowd BF, George SR (2000b). Oligomerization of dopamine and serotonin receptors. *Neuropsychopharmacology* **23**: S32-S40.
- Lee JA, Kim HK, Kim KH, Han JH, Lee YS, Lim CS, Chang DJ, Kubo T, Kaang BK (2001). Overexpression of and RNA interference with the CCAAT enhancer-binding protein on long-term facilitation of *Aplysia* sensory to motor synapses. *Learn Mem* **8**: 220-226.
- Lee SP, O'Dowd BF, George SR (2003). Homo- and hetero-oligomerization of G protein-coupled receptors. *Life Sci* **74**: 173-180.
- Lefkowitz RJ, Cotecchia S, Samama P, Costa T (1993). Constitutive activity of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Trends Pharmacol Sci* **14**: 303-307.
- Lembo PM, Ghahremani MH, Morris SJ, Albert PR (1997). A conserved threonine residue in the second intracellular loop of the 5-hydroxytryptamine 1A receptor directs signaling specificity. *Mol Pharmacol* **52**: 164-171.
- Levenson J, Byrne JH, Eskin A (1999). Levels of serotonin in the hemolymph of *Aplysia* are modulated by light/dark cycles and sensitization training. *J Neurosci* **19**: 8094-103.
- Levitan ES, Levitan IB (1988). Serotonin acting via cyclic AMP enhances both the hyperpolarizing and depolarizing phases of bursting pacemaker activity in the *Aplysia* neuron R15. *J Neurosci* **8**: 1152-1161.
- Lewis DV, Evans GB, Wilson WA (1984). Dopamine reduces slow outward current and calcium influx in burst-firing neuron R15 of *Aplysia*. *J Neurosci* **4**: 3014-3020.

- Lezcano N, Bergson C (2002). D1/D5 dopamine receptors stimulate intracellular calcium release in primary cultures of neocortical and hippocampal neurons. *J Neurophysiol* **87**: 2167-2175.
- Li XC, Giot JF, Kuhl D, Hen R, Kandel ER (1995). Cloning and characterization of two related serotonergic receptors from the brain and the reproductive system of *Aplysia* that activate phospholipase C. *J Neurosci* **15**: 7585-7591.
- Linseman DA, Benjamin CW, Jones DA (1995). Convergence of angiotensin II and platelet-derived growth factor receptor signaling cascades in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **270**: 12563-12568.
- Lisman J, Schulman H, Cline H (2002). The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat Rev Neurosci* **3**: 175-190.
- Longley RD, Longley AJ (1986). Serotonin immunoreactivity of neurons in the gastropod *Aplysia californica*. *J Neurobiol* **17**: 339-358.
- Lorenzetti FD, Mozzachiodi R, Baxter DA, Byrne JH (2004). Both *in vivo* and *in vitro* classical conditioning of feeding enhance CS-evoked excitatory drive to B51 in *Aplysia*. Program #778.7. 2004 Abstract Viewer/Itinerary Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience.
- Lotshaw DP, Levitan IB (1987). Serotonin and forskolin modulation of a chloride conductance in cultured identified *Aplysia* neurons. *J Neurophysiol* **58**: 922-9239.
- Lowes VL, Ip NY, Wong YH (2002). Integration of signals from receptor tyrosine kinases and G protein-coupled receptors. *Neurosignals* **11**: 5-19.
- Luborsky-Moore JL, Jacklet JW (1976). Localization of catecholamines in the eyes and other tissues of *Aplysia*. *J Histochem Cytochem* **24**: 1150-1158.

- Lukowiak K, Peretz B (1977). The interaction between the central and peripheral nervous systems in the mediation of the gill withdrawal reflex behavior in *Aplysia*. *J Comp Physiol* **117**: 219-244.
- Luttrell LM, Della Rocca GJ, van Biesen T, Luttrell DK, Lefkowitz RJ (1997). G $\beta\gamma$ subunits mediate Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. A scaffold for G protein-coupled receptor-mediated Ras activation. *J Biol Chem* **272**: 4637-4644.
- Luttrell LM, Roudabush FL, Choy EW, Miller WE, Field ME, Pierce KL, Lefkowitz RJ (2001). Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by β -arrestin scaffolds. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 2449-2454.
- Luttrell LM (2002). Activation and targeting of mitogen-activated protein kinases by G-protein-coupled receptors. *Can J Physiol Pharmacol* **80**: 375-382.
- Mackey SL, Kandel ER, Hawkins RD (1989). Identified serotonergic neurons LCB1 and RCB1 in the cerebral ganglia of *Aplysia* produce presynaptic facilitation of siphon sensory neurons. *J Neurosci* **9**: 4227-4335.
- Manseau, F, Fan X, Hueftlein T, Sossin W, Castellucci VF (2001). Ca²⁺-independent protein kinase C Apl II mediates the serotonin-induced facilitation at depressed *Aplysia* sensorimotor synapses. *J Neurosci* **21**: 1247-1256.
- Mansuy I (2004). A constraint on cAMP signaling. *Neuron* **41**: 4-6.
- Marinesco S, Carew TJ (2002). Serotonin release evoked by tail nerve stimulation in the CNS of *Aplysia*: characterization and relationship to heterosynaptic plasticity. *J Neurosci* **22**: 2299-2312.
- Martin KC, Hu Y, Armitage BA, Siegelbaum SA, Kandel ER, Kaang BK (1995). Evidence for synaptotagmin as an inhibitory clamp on synaptic vesicle release in *Aplysia* neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 11307-11311.

- Martin KC, Casadio A, Zhu H, Yaping E, Rose JC, Chen M, Bailey CH, Kandel ER (1997a). Synapse-specific, long-term facilitation of *Aplysia* sensory to motor synapses: a function for local protein synthesis in memory storage. *Cell* **91**: 927-938.
- Martin KC, Michael D, Rose JC, Barad M, Casadio A, Zhu H, Kandel ER (1997b). MAP kinase translocates into the nucleus of the presynaptic cell and is required for long-term facilitation in *Aplysia*. *Neuron* **18**: 899-912.
- Mathies H, Becker A, Schroeder H, Kraus J, Holtt V, Krug M (1997). Dopamine D1-deficient mutant mice do not express the late phase of hippocampal long-term potentiation. *Neuroreport* **8**: 3533-3535.
- Mayeri E, Rothman BS, Brownell PH, Branton WD, Padgett L (1985). Nonsynaptic characteristics of neurotransmission mediated by egg-laying hormone in the abdominal ganglion of *Aplysia*. *J Neurosci* **5**: 2060-2077.
- Mazzarelli G (1893). Monographie delle *Aplysiidae* del Golfo di Napoli. *Mem. Mat. Fis. Soc. Ital. Sci. (Rome)*, 3rd serie. **9**: 1-22.
- McCaman MW, Weinreich D, McCaman RE (1973). The determination of picomole levels of 5-hydroxytryptamine and dopamine in *Aplysia*, *Tritonia* and leech nervous tissues. *Brain Res* **53**: 129-137.
- McDonald PH, Lefkowitz RJ (2001). β -Arrestins: new roles in regulating heptahelical receptors functions. *Cell Signal* **13**: 683-689.
- McGuire SE, Le PT, Osborn AJ, Matsumoto K, Davis RL (2003). Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*. *Science* **302**: 1765-1768.
- McPherson DR, Blankenship JE (1991). Neural control of swimming in *Aplysia brasiliana* III. Serotonergic modulatory neurons. *J Neurophysiol* **66**: 1366-1379.
- Meneses A (1998). Physiological, pathophysiological and therapeutic roles of 5-HT systems in learning and memory. *Rev Neurosci* **9**: 275-289.

- Menzel R, Michelsen B, Ruffer P, Sugawa M (1988). Neuropharmacology of learning and memory in honey bees. In: Hertting, G. and Spatz, H.-C., Editors, 1988. *NATO ASI series H19, Modulation of Synaptic Plasticity in Nervous Systems*, Springer Verlag, Berlin, pp. 332–350.
- Menzel R, Wittstock S, Sugawa M (1990). Chemical codes of learning and memory in honey bees. In: Squire, L.R. and Lindenlaub, E., Editors, 1990. *The Biology of Memory*, Schattauer Verlag, Stuttgart, pp. 335–358.
- Michael D, Martin KC, Seger R, Ning MM, Baston R, Kandel ER (1998). Repeated pulses of serotonin required for long-term facilitation activate mitogen-activated protein kinase in sensory neurons of *Aplysia*. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 1864-1869.
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* **78**: 189-225.
- Montarolo PG, Goelet P, Castellucci VF, Morgan J, Kandel ER, Schacher S (1986). A critical period for macromolecular synthesis in long-term heterosynaptic facilitation in *Aplysia*. *Science* **234**: 1249-1254.
- Moroz LL, Edwards J, Sathyanarayanan PV, Sahni A, Kohn A, Iannuccilli W, Si K, Jezzini S, Ha T, Matz M, Panchin Y, Shaw R, Lee J, Kalachikov S, Li J, Russo J, Farmerie W, Ju J, Kandel ER (2004). Characterization and annotation of the neuronal transcriptome in *Aplysia californica*. Program #553.12. *2004 Abstract Viewer/Itinerary Planner*. Washington, DC: Society for Neuroscience.
- Mouillac B, Caron M, Bonin H, Dennis M, Bouvier M (1992). Agonist-modulated palmitoylation of β_2 -adrenergic receptor in Sf9 cells. *J Biol Chem* **267**: 21733-21737.
- Müller U, Carew TJ (1998). Serotonin induces temporally and mechanistically distinct phases of persistent PKA activity in *Aplysia* sensory neurons. *Neuron* **21**: 1423-1434.

- Mustard JA, Blenau W, Hamilton IS, Ward VK, Ebert PR, Mercer AR (2003). Analysis of two D1-like dopamine receptors from the honey bee *Apis mellifera* reveals agonist-independent activity. *Brain Res Mol Brain Res* **113**: 67-77.
- Nargeot R, Baxter DA, Byrne JH (1997). Contingent-dependent enhancement of rhythmic motor patterns: an in vitro analog of operant conditioning. *J Neurosci* **17**: 8093-8105.
- Nargeot R, Baxter DA, Byrne JH (1999a). In vitro analog of operant conditioning in *Aplysia*. I. Contingent reinforcement modifies the functional dynamics of an identified neuron. *J Neurosci* **19**: 2247-2260.
- Nargeot R, Baxter DA, Byrne JH (1999b). In vitro analog of operant conditioning in *Aplysia*. II. Modifications of the functional dynamics of an identified neuron contribute to motor pattern selection. *J Neurosci* **19**: 2261-2272.
- Nargeot R, Baxter DA, Patterson GW, Byrne JH (1999c). Dopaminergic synapses mediate neuronal changes in an analogue of operant conditioning. *J Neurophysiol* **81**: 1983-1987.
- Nass R, Hall DH, Miller DM 3rd, Blakely RD (2002). Neurotoxin-induced degeneration of dopamine neurons in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 3264-3269.
- Newlin SA, Schlapfer WT, Barondes SH (1980). Separate serotonin and dopamine receptors modulate the duration of post-tetanic potentiation at an *Aplysia* synapse without affecting other aspects of synaptic transmission. *Brain Res* **181**: 89-106.
- Ng GY, Mouillac B, George SR, Caron M, Dennis M, Bouvier M, O'Dowd BF (1994). Desensitization, phosphorylation and palmitoylation of the human dopamine D1 receptor. *Eur J Pharmacol* **267**: 7-19.
- Ocorr KA, Byrne JH (1985). Membrane responses and changes in cAMP levels in *Aplysia* sensory neurons produced by serotonin, tryptamine, FMRFamide and small cardioactive peptideB (SCPB). *Neurosci Lett* **55**: 113-118.
- Ocorr KA, Tabata M, Byrne JH (1986). Stimuli that produce sensitization lead to elevation of cyclic AMP levels in tail sensory neurons of *Aplysia*. *Brain Res* **371**: 190-192.

- O'Dowd BF, Lefkowitz RJ, Caron MG (1989a). Structure of the adrenergic and related receptors. *Ann Rev Neurosci* **12**: 67-83.
- O'Dowd BF, Hnatowich M, Caron MG, Lefkowitz RJ, Bouvier M (1989b). Palmitoylation of the human β_2 -adrenergic receptor. Mutation of CYS341 in the carboxyl tail leads to an uncoupled nonpalmitoylated form of the receptor. *J Biol Chem* **264**: 7564-7569.
- Oliveira L, Paiva AC, Sander C, Vriend G (1994). A common step for signal transduction in G protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* **15**: 170-172.
- Ormond J, Hislop J, Zhao Y, Webb N, Vaillancourt F, Dyer JR, Ferraro G, Barker P, Martin KC, Sossin WS (2004). ApTrkl, a Trk-like receptor, mediates serotonin-dependent ERK activation and long-term facilitation in *Aplysia* sensory neurons. *Neuron* **44**: 715-728.
- Ovchinnikov YuA, Abdulaev NG, Bogachuk AS (1988). Two adjacent cysteine residues in the C-terminal cytoplasmic fragment of bovine rhodopsin are palmitylated. *FEBS Lett* **230**: 1-5.
- Pauwels PJ (2000). Diverse signalling by 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptors. *Biochem Pharmacol* **60**: 1743-1750.
- Pellmar TC, Carpenter DO (1980). Serotonin induces a voltage-sensitive calcium current in neurons of *Aplysia californica*. *J Neurophysiol* **44**: 423-439.
- Peretz B, Estes J (1974). Histology and histochemistry of the peripheral neural plexus in the *Aplysia* gill. *J Neurobiol* **5**: 3-19.
- Peroutka SJ, Howell TA (1994). The molecular evolution of G protein-coupled receptors: focus on 5-hydroxytryptamine receptors. *Neuropharmacology* **33**: 319-324.
- Peroutka SJ (1995). 5-HT receptors: past, present, and future. *Trends Neurosci* **18**: 68-69.

- Pineda VV, Athos JI, Wang H, Celver J, Ippolito D, Boulay G, Birnbaumer L, Storm DR (2004). Removal of G_{1α1} constraints on adenylyl cyclase in the hippocampus enhances LTP and impairs memory formation. *Neuron* **41**: 153-163.
- Pinsker HM, Hening WA, Carew TJ, Kandel ER (1973). Long-term sensitization of a defensive withdrawal reflex in *Aplysia*. *Science* **182**: 1039-1042.
- Pittenger C, Kandel E (1998). A genetic switch for long-term memory. *CR Acad Sci III* **321**: 91-96.
- Plummer MR, Kirk MD (1990). Premotor neurons B51 and B52 in the buccal ganglia of *Aplysia californica*: synaptic connections, effects on ongoing motor rhythms, and peptide modulation. *J Neurophysiol* **63**: 539-558.
- Pollock JD, Bernier L, Camardo JS (1985). Serotonin and cyclic adenosine 3':5'-monophosphate modulate the potassium current in tail sensory neurons in the pleural ganglion of *Aplysia*. *J Neurosci* **5**: 1862-71.
- Pollock NJ, Manelli AM, Hutchins CW, Steffey ME, MacKenzie RG, Frail DE (1992). Serine mutations in transmembrane V of the dopamine D1 receptor affect ligand interactions and receptor activation. *J Biol Chem* **267**: 17780-17786.
- Purcell AL, Sharma SK, Bagnall MW, Sutton MA, Carew TJ (2003). Activation of a tyrosine kinase-MAPK cascade enhances the induction of long-term synaptic facilitation and long-term memory in *Aplysia*. *Neuron* **37**: 473-484.
- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Katz LC, LaMantia A-S, McNamara JO, Williams SM (2001). *Neuroscience 2nd Edition*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA.
- Ram JL, Judge K, Jednak MA (1994). Antagonists of cholinergic and serotonergic responses of *Aplysia* buccal muscle. *Comp Biochem Physiol Pharmacol Toxicol Endocrinol* **107**: 235-242.
- Rankin CH (2002). Neuroscience. A bite to remember. *Science* **296**: 1624-1625.

- Reale V, Hannan F, Hall LM, Evans PD (1997). Agonist-specific coupling of a cloned *Drosophila melanogaster* D1-like dopamine receptor to multiple second messenger pathways by synthetic agonists. *J Neurosci* **17**: 6545–6553.
- Redman RS, Berry RW (1990). Alpha-bag cell peptide inhibits bag cell adenylate cyclase via a GTP-dependent mechanism. *Brain Res Mol Brain Res* **8**: 99-103.
- Reyes FD, Mozzachiodi R, Baxter DA, Byrne JH (2004). Dopamine mediates reinforcement during *in vitro* classical conditioning of fictive feeding in *Aplysia*. Program #778.8. 2004 *Abstract Viewer/Itinerary Planner*. Washington, DC: Society for Neuroscience.
- Rittenhouse AR, Price CH (1986). Electrophysiological and anatomical identification of the peripheral axons and target tissues of *Aplysia* neurons R3-14 and their status as multifunctional, multimessenger neurons. *J Neurosci* **16**: 2071–2084.
- Roeder T (1999). Octopamine in invertebrates. *Prog Neurobiol* **59**: 533-561.
- Ruben P, Lukowiak K (1979). Dopamine modulation of gill reflex behavior in *Aplysia*. *Can J Physiol Pharmacol* **57**: 329-332.
- Ruben P, Lukowiak K (1983). Modulation of the *Aplysia* gill withdrawal reflex by dopamine. *J Neurobiol* **14**: 271-284.
- Ruchon AF, Marcinkiewicz M, Siegfried G, Tenenhouse HS, DesGroseillers L, Crine P, Boileau G (1998). Pex mRNA is localized in developing mouse osteoblasts and odontoblasts. *J Histochem Cytochem* **46**: 459–468.
- Saavedra JM, Brownstein MJ, Carpenter DO, Axelrod J (1974). Octopamine: presence in single neurons of *Aplysia* suggests neurotransmitter function. *Science* **185**: 363–365.
- Sacktor TC, Schwartz JH (1990). Sensitizing stimuli cause translocation of protein kinase C in *Aplysia* sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 2036-2039.

- Saitoh T, Shih JC (1987). Photoaffinity labeling of adenylyate cyclase-linked serotonin receptors in *Aplysia* neurons. *J Neurochem* **49**: 1361-1366.
- Salomon Y, Londos C, Rodbell M (1974). A highly sensitive adenylyate cyclase assay. *Anal Biochem* **58**: 541-548.
- Sanyal S, Wintle RF, Kindt KS, Nuttley WM, Arvan R, Fitzmaurice P, Bigras E, Merz DC, Hebert TE, van der Kooy D, Schafer WR, Culotti JG, Van Tol HHM (2004). Dopamine modulates the plasticity of mechanosensory responses in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J* **23**: 473-482.
- Sasaki K, Sato M (1987). A single GTP-binding protein regulates K⁺-channels coupled with dopamine, histamine and acetylcholine receptor. *Nature* **325**: 259-262.
- Sawin ER, Ranganathan R, Horvitz HR (2000). *C. elegans* locomotory rate is modulated by the environment through a dopaminergic pathway and by experience through a serotonergic pathway. *Neuron* **26**: 619-631.
- Schacher S, Proshansky E (1983). Neurite regeneration by *Aplysia* neurons in dissociated cell culture: modulation by *Aplysia* hemolymph and the presence of the initial axonal segment. *J Neurosci* **3**: 2403-2413.
- Schafer WR, Kenyon CJ (1995). A calcium-channel homologue required for adaptation to dopamine and serotonin in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **375**: 73-78.
- Schneider T, Igelmund P, Hescheler J (1997). G protein interaction with K⁺ and Ca²⁺ channels. *Trends Pharmacol Sci* **18**: 8-11.
- Scholz KP, Byrne JH (1987). Long-term sensitization in *Aplysia*: biophysical correlates in tail sensory neurons. *Science* **235**: 685-687.
- Schultz W (1998). The phasic reward signal of primate dopamine neurons. *Adv Pharmacol* **42**: 686-690.

- Sharma SK, Sherff CM, Shobe J, Bagnall MW, Sutton MA, Carew TJ (2003). Differential role of mitogen-activated protein kinase in three distinct phases of memory for sensitization in *Aplysia*. *J Neurosci* **23**: 3899-3907.
- Shuster MJ, Camardo JS, Siegelbaum SA (1991). Comparison of the serotonin-sensitive and Ca^{2+} -activated K^+ channels in *Aplysia* sensory neurons. *J Physiol* **440**: 601-621.
- Si K, Giustetto M, Etkin A, Hsu R, Janisiewicz AM, Miniaci MC, Kim JH, Zhu H, Kandel ER (2003a). A neuronal isoform of CPEB regulates local protein synthesis and stabilizes synapse-specific long-term facilitation in *Aplysia*. *Cell* **115**: 893-904.
- Si K, Lindquist S, Kandel ER (2003b). A neuronal isoform of the *Aplysia* CPEB has prion-like properties. *Cell* **115**: 879-891.
- Siegelbaum SA, Camardo JS, Kandel ER (1982). Serotonin and cyclic AMP close single K^+ channels in *Aplysia* sensory neurones. *Nature* **30**: 413-417.
- Sonetti D, Biondi C, Ferretti ME, Portolan A, Brunelli M (1987). Effects of serotonin, dopamine and prostaglandin- E_2 on adenylate-cyclase activity and cyclic AMP levels in different ganglia of the fresh water snail *Planorbis corneus* L. *Neurochem Int* **11**: 119-126.
- Sossin WS, Schwartz JH (1992). Selective activation of Ca^{2+} -activated PKCs in *Aplysia* neurons by 5-HT. *J Neurosci* **12**: 1160-1168.
- Sossin WS, Diaz-Arrastia R, Schwartz JH (1993). Characterization of two isoforms of protein kinase C in the nervous system of *Aplysia californica*. *J Biol Chem* **268**: 5763-5768.
- Sossin WS, Sacktor TC, Schwartz JH (1994). Persistent activation of protein kinase C during the development of long-term facilitation in *Aplysia*. *Learn Mem* **1**: 189-202.
- Squire LR, Kandel ER (1999). *Memory from mind to molecules*. Scientific American Library, New York, NY.

- Storozhuk MV, Castellucci VF (1999a). Modulation of cholinergic transmission in the neuronal network of the gill and siphon withdrawal reflex in *Aplysia*. *Neuroscience* **90**: 291-301.
- Storozhuk MV, Castellucci VF (1999b). The synaptic junctions of LE and RF cluster sensory neurones of *Aplysia californica* are differentially modulated by serotonin. *J Exp Biol* **202**: 115-120.
- Strader CD, Sigal IS, Candelore MR, Rands E, Hill WS, Dixon RA (1988). Conserved aspartic acid residues 79 and 113 of the β -adrenergic receptor have different roles in receptor function. *J Biol Chem* **263**: 10267-10271.
- Strader CD, Candelore MR, Hill WS, Sigal IS, Dixon RA (1989). Identification of two serine residues involved in agonist activation of the β -adrenergic receptor. *J Biol Chem* **264**: 13572-13578.
- Stuart DK, Strumwasser F (1980). Neuronal sites of action of a neurosecretory peptide, egg-laying hormone, in *Aplysia californica*. *J Neurophysiol* **43**: 499-519.
- Sugamori KS, Sunahara RK, Guan HC, Bulloch AG, Tensen CP, Seeman P, Niznik HB, Van Tol HH (1993). Serotonin receptor cDNA cloned from *Lymnaea stagnalis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 11-15.
- Sugamori KS, Van Tol HHM, Niznik HB (1994). *Dopamine receptors and transporters: pharmacology, structure, and function*. Ed. Niznik HB (Dekker, New York). pp.103-132.
- Sugamori KS, Demchyshyn LL, McConkey F, Forte MA, Niznik HB (1995). A primordial dopamine D1-like adenylyl cyclase-linked receptor from *Drosophila melanogaster* displaying poor affinity for benzazepines. *FEBS Lett* **362**: 131-138.
- Sugita S, Goldsmith JR, Baxter DA, Byrne JH (1992). Involvement of protein kinase C in serotonin-induced spike broadening and synaptic facilitation in sensorimotor connections of *Aplysia*. *J Neurophysiol* **68**: 643-51.

- Sugita S, Baxter DA, Byrne JH (1994). Activators of protein kinase C mimic serotonin-induced modulation of a voltage-dependent potassium current in pleural sensory neurons of *Aplysia*. *J Neurophysiol* **72**: 1240-1249.
- Sugita S, Baxter DA, Byrne JH (1997). Modulation of a cAMP/protein kinase A cascade by protein kinase C in sensory neurons of *Aplysia*. *J Neurosci* **17**: 7237-7244.
- Sulston J, Dew M, Brenner S (1975). Dopaminergic neurons in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Comp Neurol* **163**: 215-226.
- Sun ZY, Kauderer B, Schacher S (1996). Differential distribution of functional receptors for neuromodulators evoking short-term heterosynaptic plasticity in *Aplysia* sensory neurons. *J Neurosci* **16**: 7540-7549.
- Sunahara RK, Dessauer CW, Gilman AG (1996). Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **36**: 461-480.
- Suo S, Sasagawa N, Ishiura S (2002). Identification of a dopamine receptor from *Caenorhabditis elegans*. *Neurosci Lett* **319**: 13-16.
- Suo S, Sasagawa N, Ishiura S (2003). Cloning and characterization of a *Caenorhabditis elegans* D2-like dopamine receptor. *J Neurochem* **86**: 869-878.
- Suo S, Ishiura S, Van Tol HH (2004). Dopamine receptors in *C. elegans*. *Eur J Pharmacol* **500**: 159-166.
- Sutton MA, Carew TJ (2000). Parallel molecular pathways mediate expression of distinct forms of intermediate-term facilitation at tail sensory-motor synapses in *Aplysia*. *Neuron* **26**: 219-231.
- Sutton MA, Masters SE, Bagnall MW, Carew TJ (2001). Molecular mechanisms underlying a unique intermediate phase of memory in *Aplysia*. *Neuron* **31**: 143-154.

- Sutton MA, Ide J, Masters SE, Carew TJ (2002). Interaction between amount and pattern of training in the induction of intermediate- and long-term memory for sensitization in *Aplysia*. *Learn Mem* **9**: 29-40.
- Swann JW, Sinback CN, Pierson MG, Carpenter DO (1982a). Dopamine produces muscle contractions and modulates motoneuron-induced contractions in *Aplysia* gill. *Cell Mol Neurobiol* **2**: 291-308.
- Swann JW, Pierson MG, Dalhstrom A (1982b). Dopaminergic innervation of *Aplysia* gill muscle. *Cell Mol Neurobiol* **2**: 325-331.
- Swanson-Park JL, Coussens CM, Mason-Parker SE, Raymond CR, Hargreaves EL, Dragunow M, Cohen AS, Abraham WC (1999). A double dissociation within the hippocampus of dopamine D1/D5 receptor and β -adrenergic receptor contributions to the persistence of long-term potentiation. *Neuroscience* **92**: 485-497.
- Swayze RD, Lise MF, Levinson JN, Phillips A, El-Husseini A (2004). Modulation of dopamine mediated phosphorylation of AMPA receptors by PSD-95 and AKAP79/150. *Neuropharmacology* **47**: 764-778.
- Tempel BL, Livingstone MS, Quinn WG (1984). Mutations in the dopa decarboxylase gene affect learning in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 3577-3581.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-4680.
- Tiberi M, Caron MG (1994). High agonist-independent activity is a distinguishing feature of the dopamine D1B receptor subtype. *J Biol Chem* **269**: 27925-27931.
- Tierney AJ (2001). Structure and function of invertebrate 5-HT receptors: a review. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **128**: 791-804.

- Tremblay JP, Woodson PB, Schlapfer WT, Barondes SH (1976). Dopamine, serotonin and related compounds: presynaptic effects on synaptic depression, frequency facilitation, and post-tetanic potentiation at a synapse in *Aplysia californica*. *Brain Res* **109**: 61-81.
- Tritt SH, Byrne JH (1982). Neurotransmitters producing and modulating opaline gland contraction in *Aplysia californica*. *J Neurophysiol* **48**: 1347-1361.
- Trudeau LE, Castellucci VF (1992). Contribution of polysynaptic pathways in the mediation and plasticity of *Aplysia* gill and siphon withdrawal reflex: evidence for differential modulation. *J Neurosci* **12**: 3838-3848.
- Trudeau LE, Castellucci VF (1993). Sensitization of the gill and siphon withdrawal reflex of *Aplysia*: multiple sites of change in the neuronal network. *J Neurophysiol* **70**: 1210-1220.
- Vargas GA, von Zastrow M (2004). Identification of a novel endocytic recycling signal in the D1 dopamine receptor. *J Biol Chem* **279**: 37461-37469.
- Vernier P, Cardinaud B, Valdenaire O, Philippe H, Vincent JD (1995). An evolutionary view of drug-receptor interaction: the bioamine receptor family. *Trends Pharmacol Sci* **16**: 375-381.
- Walker RJ, Holden-Dye L (1989). Commentary on the evolution of transmitters, receptors and ion channels in invertebrates. *Comp Biochem Physiol A* **93**: 25-39.
- Walters ET, Byrne JH, Carew TJ, Kandel ER (1983). Mechanoafferent neurons innervating tail of *Aplysia*. I. Response properties and synaptic connections. *J Neurophysiol* **50**: 1522-1542.
- Walters ET, Ambron RT (1995). Long-term alterations induced by injury and by 5-HT in *Aplysia* sensory neurons: convergent pathways and common signals? *Trends Neurosci* **18**: 137-142.

- Walters ET, Bodnarova M, Billy AJ, Dulin MF, Diaz-Rios M, Miller MW, Moroz LL. (2004). Somatotopic organization and functional properties of mechanosensory neurons expressing sensorin-A mRNA in *Aplysia californica*. *J Comp Neurol* **471**: 219-240.
- Wang J, O'Donnel P (2001). D(1) dopamine receptors potentiate NMDA-mediated excitability increase in rat prefrontal cortical pyramidal neurons. *Cereb Cortex* **11**: 452-462.
- Weinreich D, Dewhurst SA, McCaman RE (1972). Metabolism of putative transmitters in individual neurons of *Aplysia californica*: aromatic amino acid decarboxylase. *J Neurochem* **91**: 1125-1130.
- Weinshenker D, Garriga G, Thomas JH (1995). Genetic and pharmacological analysis of neurotransmitters controlling egg laying in *C. elegans*. *J Neurosci* **15**: 6975-6985.
- Weiss S, Drummond GI (1981). Dopamine- and serotonin-sensitive adenylate-cyclase in the gill of *Aplysia californica*. *Mol Pharmacol* **20**: 592-597.
- White JA, Ziv I, Cleary LJ, Baxter DA, Byrne JH (1993). The role of interneurons in controlling the tail-withdrawal reflex in *Aplysia*: a network model. *J Neurophysiol* **70**: 1777-1786.
- Wickens JR, Reynolds JN, Hyland BI (2003). Neural mechanisms of reward-related motor learning. *Curr Opin Neurobiol* **13**: 685-690.
- Wickham L, DesGroseillers (1991). A bradykinin-like neuropeptide precursor gene is expressed in neuron L5 of *Aplysia californica*. *DNA Cell Biol* **10**: 249-258.
- Winlow W, Kandel ER (1976). The morphology of identified neurons in the abdominal ganglion of *Aplysia californica*. *Brain Res* **112**: 221-249.
- Wong YH, Federman A, Pace AM, Zachary I, Evans T, Pouyssegur J, Bourne HR (1991). Mutant α subunits of G_{i2} inhibit cyclic AMP accumulation. *Nature* **351**: 63-65.
- Wright WG, Jones K, Sharp P, Maynard B (1995). Widespread anatomical projections of the serotonergic modulatory neuron, CB1, in *Aplysia*. *Invert Neurosci* **1**: 173-183.

- Xiao RP, Ji X, Lakatta EG (1995). Functional coupling of the β_2 -adrenoceptor to a pertussis toxin-sensitive G protein in cardiac myocytes. *Mol Pharmacol* **47**: 322-329.
- Xie Z, Lee SP, O'Dowd BF, George SR (1999). Serotonin 5-HT1B and 5-HT1D receptors form homodimers when expressed alone and heterodimers when co-expressed. *FEBS Lett* **456**: 63-67.
- Xin Y, Koester J, Jing J, Weiss KR, Kupfermann I (2001). Cerebral-abdominal interganglionic coordinating neurons in *Aplysia*. *J Neurophysiol* **85**: 174-186.
- Xu Y, Cleary LJ, Byrne JH (1994). Identification and characterization of pleural neurons that inhibit tail sensory neurons and motor neurons in *Aplysia*: correlation with FMRFamide immunoreactivity. *J Neurosci* **14**: 3565-3577.
- Xu Y, Pieroni JP, Cleary LJ, Byrne JH (1995). Modulation of an inhibitory interneuron in the neural circuitry for the tail withdrawal reflex of *Aplysia*. *J Neurophysiol* **73**: 1313-1318.
- Yanaura M, Nakashima M, Yamada S, Shiono S (1993). Characterization of slow postsynaptic K^+ current of *Aplysia* LUQ neurons in culture. *Brain Res* **629**: 88-94.
- Yovell Y, Kandel ER, Dudai Y, Abrams TW (1987). Biochemical correlates of short-term sensitization in *Aplysia*: temporal analysis of adenylate cyclase stimulation in a perfused-membrane preparation. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 9285-9289.
- Zamah AM, Delahunty M, Luttrell LM, Lefkowitz RJ (2002). Protein kinase A-mediated phosphorylation of the β_2 -adrenergic receptor regulates its coupling to Gs and Gi. Demonstration in a reconstituted system. *J Biol Chem* **277**: 31249-31256.
- Zhang F, Endo S, Cleary LJ, Eskin A, Byrne JH. (1997). Role of transforming growth factor-beta in long-term synaptic facilitation in *Aplysia*. *Science* **275**: 1318-1320.

Autorisation des coauteurs

Demian Barbas

Étudiant au Ph.D en Biochimie, Faculté de Médecine

Université de Montréal

Article: *Functional characterization of a novel serotonin receptor (5-HT_{ap2}) expressed in the CNS of Aplysia californica.*

Auteurs: Demian Barbas, Jacques P. Zappulla, Stéphane Angers, Michel Bouvier, Vincent F. Castellucci, Luc DesGroseillers.

Publié dans : Journal of Neurochemistry (2002), vol. **80**: 335-345.

En tant que coauteur de l'article mentionné précédemment, j'autorise Demian Barbas à inclure cet article dans sa thèse intitulée: *Étude de la caractérisation de récepteurs à la sérotonine et dopamine potentiellement impliqués dans la mémoire et l'apprentissage d'Aplysia californica.*

Contributions: Demian Barbas- Écriture et participation à toutes les expériences.

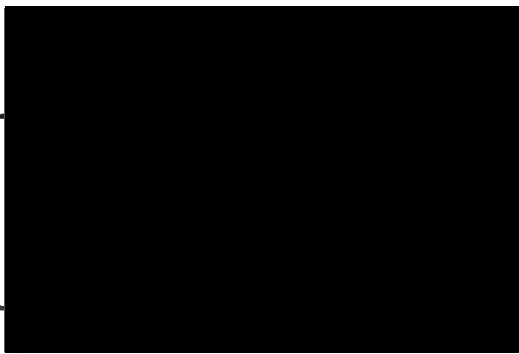
Jacques P. Zappulla- Clonage du récepteur, écriture et révision du manuscrit.

Stéphane Angers- Expériences de liaisons et révision du manuscrit.

Michel Bouvier- Conseils pour la pharmacologie et révision du manuscrit.

Vincent F. Castellucci- Conseils techniques, écriture et révision du manuscrit.

Luc DesGroseillers- Conseils techniques, écriture et révision du manuscrit, auteur pour correspondance.



Jacques P. Zappulla

Coauteur

30/05/05

Date

Stéphane Angers

Coauteur

24/5/05

Date

Michel Bouvier

Coauteur

20/05/05

Date

Vincent F. Castellucci

Coauteur

24/5/05

Date

Luc DesGroseillers

Coauteur

24/5/05

Date

Autorisation des coauteurs

Demian Barbas
 Étudiant au Ph.D en Biochimie, Faculté de Médecine
 Université de Montréal

Article: *Comparative localization of two serotonin receptors and sensorin in the CNS of Aplysia californica.*

Auteurs: Demian Barbas, Annie Campbell, Vincent F. Castellucci, Luc DesGroseillers.

Publié dans : Journal of Comparative Neurology (2005), vol. 490: 295-304.

En tant que coauteur de l'article mentionné précédemment, j'autorise Demian Barbas à inclure cet article dans sa thèse intitulée: *Étude de la caractérisation de récepteurs à la sérotonine et dopamine potentiellement impliqués dans la mémoire et l'apprentissage d'Aplysia californica.*

Contributions: Demian Barbas- Écriture et participation à toutes les expériences.
 Annie Campbell- Expériences d'hybridation *in situ* et révision du manuscrit.
 Vincent F. Castellucci- Conseils techniques, écriture et révision du manuscrit.
 Luc DesGroseillers- Conseils techniques, écriture et révision du manuscrit, auteur pour correspondance.

Annie Campbell

Coauteur

24/05/05

Date

Vincent F. Castellucci

Coauteur

24/05/05

Date

Luc DesGroseillers

Coauteur

24/05/05

Date

Coauthors authorization

Demian Barbas
 Étudiant au Ph.D en Biochimie, Faculté de Médecine
 Université de Montréal

Article: *An Aplysia dopamine 1-like receptor: molecular and fonctionnal characterization.*

Authors: Demian Barbas, Jacques P. Zappulla, Stéphane Angers, Michel Bouvier, Habib A. Mohamed, John H. Byrne, Vincent F. Castellucci, Luc DesGroseillers.

Submitted to Journal of Biological Chemistry.

As coauthor on the article mentioned above, I authorize Demian Barbas to include this article in his thesis entitle: *Étude de la caractérisation de récepteurs à la sérotonine et dopamine potentiellement impliqués dans la mémoire et l'apprentissage d'Aplysia californica.*

Contributions: Demian Barbas- Writing and participation in all experiments.

Jacques P. Zappulla- Cloning of the receptor and revision of the manuscript.

Stéphane Angers- Binding experiments and revision of the manuscript.

Michel Bouvier- Pharmacological expertise and revision of the manuscript.

Habib A. Mohamed- Antibody production and revision of the manuscript.

John H. Byrne- Antibody production and revision of the manuscript.

Vincent F. Castellucci- Technical advises and revision of the manuscript.

Luc DesGroseillers- Technical advises, revision of the manuscript and corresponding author.

Jacques P. Zappulla

Coauthor

30/05/05

Date

Stéphane Angers

Coauthor

27/05/05

Date

Michel Bouvier

Coauthor

25/05/05

Date

Habib A. Mohamed

Coauthor

31-05-05

John H. Byrne

Coauthor

31/05/05

Date

Vincent F. Castellucci

Coauthor

4/05/05

Date

Luc DesGroseillers

Coauthor

28/5/05

Date

Serotonin & Memory/Review

Multiple Serotonergic Mechanisms Contributing to Sensitization in *Aplysia*: Evidence of Diverse Serotonin Receptor Subtypes

Demian Barbas,¹ Luc DesGroseillers,^{1,2} Vincent F. Castellucci,^{2,3} Thomas J. Carew,^{4,5} and Stéphane Marinesco⁴

¹Département de biochimie, ²Centre de Recherche en Sciences Neurologiques, and ³Département de physiologie, Université de Montréal, Québec H3C 3J7, Canada; ⁴Department of Neurobiology and Behavior, CNLM, University of California-Irvine, Irvine, California 92697, USA

The neurotransmitter serotonin (5-HT) plays an important role in memory encoding in *Aplysia*. Early evidence showed that during sensitization, 5-HT activates a cyclic AMP-protein kinase A (cAMP-PKA)-dependent pathway within specific sensory neurons (SNs), which increases their excitability and facilitates synaptic transmission onto their follower motor neurons (MNs). However, recent data suggest that serotonergic modulation during sensitization is more complex and diverse. The neuronal circuits mediating defensive reflexes contain a number of interneurons that respond to 5-HT in ways opposite to those of the SNs, showing a decrease in excitability and/or synaptic depression. Moreover, in addition to acting through a cAMP-PKA pathway within SNs, 5-HT is also capable of activating a variety of other protein kinases such as protein kinase C, extracellular signal-regulated kinases, and tyrosine kinases. This diversity of 5-HT responses during sensitization suggests the presence of multiple 5-HT receptor subtypes within the *Aplysia* central nervous system. Four 5-HT receptors have been cloned and characterized to date. Although several others probably remain to be characterized in molecular terms, especially the Gs-coupled 5-HT receptor capable of activating cAMP-PKA pathways, the multiplicity of serotonergic mechanisms recruited into action during learning in *Aplysia* can now be addressed from a molecular point of view.

The marine mollusk *Aplysia* has proven to be a powerful model system for the study of learning and memory. This animal displays several simple forms of nonassociative learning, such as habituation, dishabituation, and sensitization (Pinsker et al. 1970, 1973; Carew et al. 1971), but also more complex forms of associative learning such as classical, operant, and fear conditioning (Carew et al. 1981, 1983; Walters et al. 1981; Lechner et al. 2000a,b; Brems et al. 2002). The strength of this model system arises from the relative simplicity of its central nervous system (CNS), which contains a small number of neurons, some of which are well characterized both morphologically and electrophysiologically. Thus, one can study a specific synaptic connection in different animals subjected to a wide variety of behavioral training protocols. For this reason, it has been possible to discover many of the mechanisms of learning and memory in this animal at the behavioral, cellular, and molecular levels, and provide direct evidence that certain forms of learning rely on the plasticity of individual synaptic connections (for review, see Kandel 2001).

One of the best characterized forms of learning in *Aplysia* is sensitization, in which a noxious stimulus facilitates an animal's pre-existing response to the presentation of another innocuous stimulus. It has been most thoroughly studied in the defensive reflex responses of *Aplysia*. For example, a mild tactile stimulus applied to the tail evokes the retraction of respiratory organs (gill and siphon) inside the mantle cavity situated on the back of the animal. The strength and duration of this reflex can be enhanced by a noxious electrical stimulation applied to the tail, the head,

or the body wall. Memory for this form of sensitization relies at least in part on the strengthening of sensory neuron (SN) to motor neuron (MN) transmission, namely, increase in SN excitability and facilitation of SN-MN synapses. A large amount of experimental data suggests that SN-MN synaptic plasticity depends on the release of the neurotransmitter 5-HT within the *Aplysia* CNS during sensitization training (Brunelli et al. 1976; Mackey et al. 1989; Marinesco and Carew 2002). It is believed that 5-HT activates cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-protein kinase A (cAMP-PKA)-dependent biochemical cascades within SNs, leading to enhanced SN-MN transmission (Brunelli et al. 1976; Castellucci et al. 1980, 1982; Bernier et al. 1982; Abrams et al. 1984; Ocorr and Byrne 1985; Ocorr et al. 1986; Ghirardi et al. 1992; Klein 1993). However, it has become clear that memory processes in *Aplysia* involve more than the activation of cAMP-PKA pathways within SNs. In particular, it has been demonstrated that in addition to modulating SN-MN transmission, 5-HT also acts on several other neuronal cell types within the defensive reflex circuits, and that these actions may involve multiple 5-HT receptor subtypes. In this review, we first summarize the experimental evidence supporting the existence of several serotonergic processes during sensitization. We then review the available data on the different 5-HT receptor subtypes expressed in *Aplysia* tissues and discuss their possible involvement in learning and memory.

The Role of 5-HT in Memory and Synaptic Facilitation in *Aplysia*

The role of 5-HT in sensitization was first suggested in a series of papers by Brunelli et al. (1976) and Castellucci and Kandel (1976), who showed that sensitization of the gill-withdrawal reflex was correlated with an increase in the amount of transmitter

*Corresponding author.

Article and publication are at <http://www.learnmem.org/cgi/doi/10.1101/lm.66103>.

released by sensory neurons (SNs) at their synapses with motor neurons (MNs), a phenomenon termed presynaptic facilitation (Castellucci and Kandel 1976). This phenomenon could be mimicked by exogenous application of 5-HT or intracellular injection of cAMP, and blocked by the 5-HT antagonist cinanserin (5-HT₂ antagonist; Brunelli et al. 1976), and was later shown to be blocked by cyproheptadine (5-HT_{1,2} antagonist; Mercer et al. 1991). Although the specificity of these drugs for *Aplysia* 5-HT receptors has not been fully characterized, these data suggest that 5-HT is responsible for the presynaptic facilitation observed during sensitization.

Considerable experimental work was then devoted to identifying the serotonergic neurons responsible for presynaptic facilitation, and determining whether 5-HT was indeed released in the *Aplysia* CNS during sensitization training. Mackey et al. (1989) showed that a pair of symmetrical 5-HT neurons in the cerebral ganglion, the CC3 (CB1) cells (see Xin et al. 2001 for change in nomenclature) were activated by noxious electrical stimulation of the tail. Moreover, activation of one CC3 (CB1) cell by intracellular current injection was sufficient to produce facilitation of SN-MN synapses as well as spike broadening in SNs in the abdominal ganglion (Mackey et al. 1989; see also Wright et al. 1995). However, as Mackey and colleagues point out, CC3 (CB1) modulation of SN-MN transmission was modest and short-lived compared to modulation by exogenously applied 5-HT. Moreover, it is not known whether the effects of CC3 (CB1) stimulation can be blocked by specific 5-HT receptor antagonists. Thus, the precise role of CC3 (CB1) during sensitization and the respective effects exerted by 5-HT or by possible cotransmitters that could be released by this neuron remain to be determined. Using direct electrochemical methods, Marinesco and Carew (2002) were able to detect a transient release of 5-HT in the *Aplysia* CNS in response to electrical stimulation of the tail-nerve P9, an analog of the noxious stimulation of the tail used to produce sensitization. This release lasted about 30–40 sec and peaked around 100–200 nM in the neuropil surrounding tail SN-MN synapses or SN cell bodies (Marinesco and Carew 2002). Increased 5-HT levels in the hemolymph have also been detected during long-term sensitization (Levenson et al. 1999).

For many years, the receptors mediating the actions of 5-HT during learning remained unknown. The lack of information on the 5-HT receptors expressed in the *Aplysia* CNS has made it difficult to investigate the role of 5-HT in memory at the behavioral level. Indeed, few pharmacological tools are available for accurate manipulation of 5-HT pathways in freely moving animals. The first and only behavioral study to date was performed by Glanzman et al. (1989). These authors chemically lesioned the serotonergic system in *Aplysia* using high doses of the neuronal toxin 5,7-dihydroxytryptamine (5,7-DHT). They point out that lesioned animals showed major behavioral impairment such as inability to produce locomotion or attach to a substrate. The animals nonetheless displayed defensive reflexes susceptible to habituation. Glanzman and colleagues (1989) observed that dishabituation and synaptic facilitation were greatly decreased in lesioned animals, suggesting that 5-HT release during training is necessary for this form of memory. The effects of this drug on sensitization were not determined (Glanzman et al. 1989). As we will discuss below, designing ways to interfere with specific *Aplysia* 5-HT receptor subtypes in freely moving animals would allow confirmation and further exploration of this important finding.

Modulation of Defensive Reflex Circuits by 5-HT During Sensitization

The *Aplysia* CNS, with its relatively small number of neurons, is a useful model system for mapping neuronal circuits controlling

specific aspects of behavior. In this regard, the neuronal circuits mediating defensive reflexes have been extensively studied. Specifically, these include the tail-induced and siphon-induced tail/siphon withdrawal reflexes (Fig. 1). These reflexes involve three central ganglia: the pleural, pedal, and abdominal ganglia. A tactile stimulus applied to the tail or siphon activates tail or siphon SNs, which excite MNs through monosynaptic (SN-MN synapses) and polysynaptic pathways (for a more detailed review, see Cleary et al. 1995; Frost and Kandel 1995). More than 10 types of interneurons are known to participate in these polysynaptic pathways between SNs and MNs: (1) L25, R25, L26, and L33 are recruited during siphon withdrawal reflex and respiratory pumping (Kanz et al. 1979; Byrne 1983; Eberly and Pinsker 1984; Frost and Kandel 1995), (2) L16, L29, L30, L33, and L34 mediate siphon withdrawal reflex only, and (3) PI 4 and PI 17 are involved in reflex tail withdrawal (Buonomano et al. 1992; Cleary and Byrne 1993; Xu et al. 1994). Moreover, PI 17 is viewed as possibly providing a linkage between pleural and abdominal reflex circuits (Cleary and Byrne 1993). Four types of interneurons are excitatory (L25, R25, L29, and L34), five are inhibitory (L16, L26, L30, L33, and PI 4), and PI 17 seems to be excitatory to tail MNs and inhibitory to tail SNs (Fig. 1; Cleary et al. 1995). When excitatory and inhibitory interneurons are recruited during siphon reflex retraction, their synaptic potentials sum at the level of MNs and various interneurons. Although inhibitory interneurons (L16, L30, PI 4; see Fig. 1) are present within the circuit, activation of this polysynaptic pathway usually results in a stronger and longer excitation of siphon MNs. Therefore, the role of polysynaptic pathways is usually viewed as amplifying and prolonging the monosynaptic excitation coming from SNs (Trudeau and Castellucci 1992; White et al. 1993; Antonov et al. 1999).

Many neurons within this circuit are modulated by both sensitization training and by 5-HT application. Interestingly, 5-HT release in response to tail-nerve shock has been directly demonstrated in the pleural, pedal, and abdominal ganglia, which are the sites of the neuronal circuits for reflex tail or siphon withdrawal (Marinesco and Carew 2002; Bristol et al. 2003). 5-HT is therefore in a position to modulate virtually all of the neuronal elements involved in this circuit during sensitization training.

Fitzgerald and Carew (1991) and Trudeau and Castellucci (1992, 1993) sought to distinguish the modulation of mono- and polysynaptic pathways during sensitization. They determined that, whereas monosynaptic SN-MN connections were facilitated by 5-HT, polysynaptic pathways were usually inhibited (Fitzgerald and Carew 1991; Trudeau and Castellucci 1992, 1993). At least four sets of synapses have been shown to be inhibited by 5-HT (Fig. 1): L16 → LE (Storozhuk and Castellucci 1999a), L29 → LFS (Frost et al. 1988; Bristol et al. 2001), L30 → L29 (Frost et al. 1988; Fisher and Carew 1993), and PI 4 → tail SNs and MNs (Xu et al. 1995). Some of these synapses (L29 → LFS, L30 → L29) can undergo the same type of modulation during sensitization training (Frost et al. 1988; Fischer and Carew 1993; Bristol et al. 2001). Moreover, 5-HT decreases the excitability of PI 4, whereas it usually enhances excitability in tail and siphon SNs. Finally, the siphon is innervated by at least four populations of SNs (LE, rLE, RE, and RF; Frost and Kandel 1995), that can be differentially modulated by 5-HT. For example, 5-HT increases LEs' excitability and facilitates their synapses onto follower neurons, whereas it depresses RF synapses (Fig. 1; Storozhuk and Castellucci 1999b).

5-HT modulation in interneurons is not limited to synaptic plasticity or excitability changes. The synapses from the inhibitory L30 interneurons onto L29 excitatory interneurons provide an example of complex modulation that is mediated both by 5-HT and by sensitization training. These inhibitory synapses undergo a form of activity-dependent short-term synaptic en-

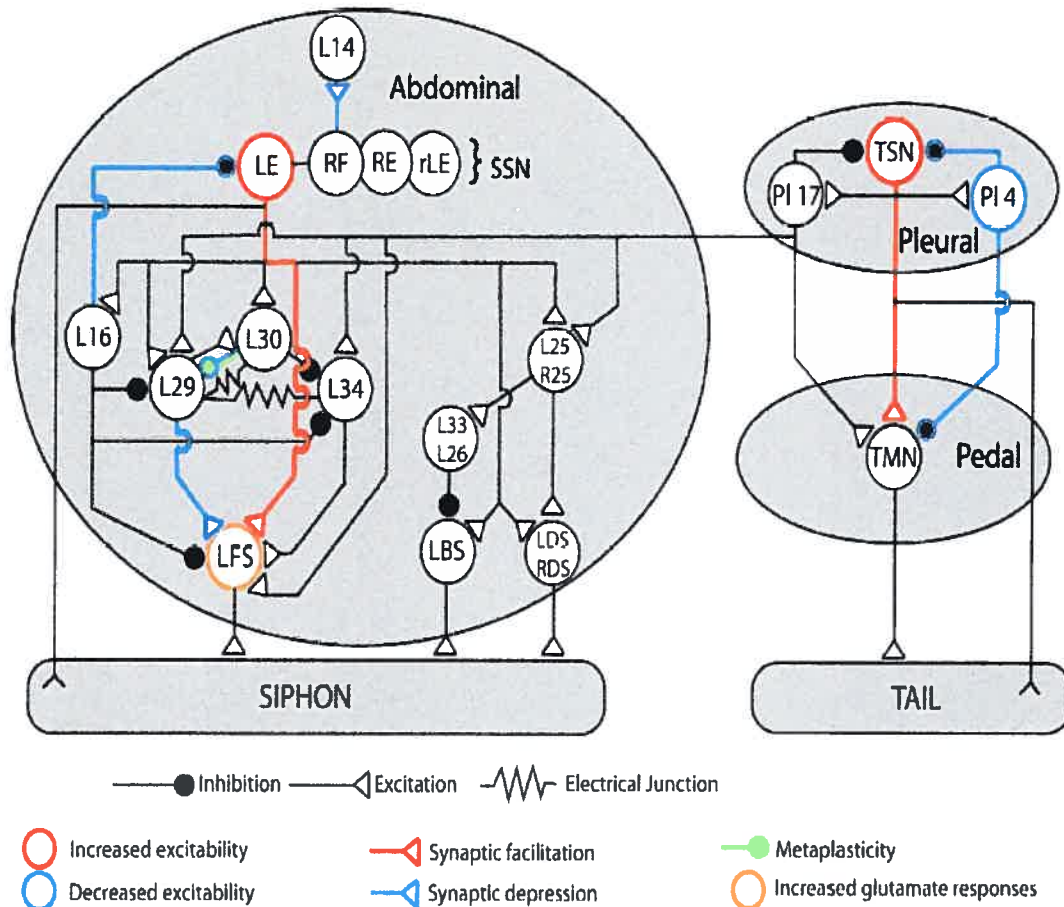


Figure 1 Schematic diagram of the neuronal circuit mediating tail and siphon withdrawal reflex. Neuronal cell bodies are located in three central ganglia (pleural, pedal, and abdominal). A tactile stimulus applied to the tail or siphon activates tail (TSN) or siphon sensory neurons (SSN), which excite MNs through monosynaptic (SN–MN synapses) and polysynaptic pathways depending on interneurons. 5-HT exerts multiple actions on the circuit: It usually induces synaptic depression and/or decreases in excitability in interneurons (blue) and synaptic facilitation and increase in excitability in SNs (red). L14, an ink gland MN, illustrates 5-HT-induced synaptic depression in RF SNs. 5-HT also induces metaplasticity at L30–L29 synapses (green) and increases glutamate responses in LFS MNs (orange). Adapted from Cleary et al. 1995.

hancement induced by the activation of the L30 neurons (Fischer and Carew 1993, 1995). For example, when L30 interneurons fire in response to a mild tactile stimulation, synaptic efficacy at the L30–L29 synapses is enhanced, thus contributing to inhibition of the siphon-withdrawal reflex circuit (Fischer and Carew 1995; Fischer et al. 2000). Both 5-HT and sensitization training block the expression of this form of synaptic plasticity, thereby reducing the potential for inhibition within the circuit. This higher-order form of plasticity reflects an example of “metaplasticity” (Fischer et al. 1997).

In addition to SN and interneuron modulation, a direct action of 5-HT on MNs has also been described. It involves facilitation of AMPA-type responses to glutamate, the putative neurotransmitter released by SNs, in cultured LFS neurons (Chitwood et al. 2001), and could possibly take place during sensitization training.

We should note that the neuronal circuits mediating defensive reflexes can also be modulated through a variety of nonserotonergic mechanisms. For example, small cardioactive peptide B (SCP_B) facilitates SN–MN synapses (Abrams et al. 1984; Pieroni and Byrne 1992) and L16 → LE connections (Storozhuk and Castellucci 1999a), and has excitatory effects on PI 4 (Xu et al. 1995).

Phe-Met-Arg-Phe-amide (FMRFamide) has been shown to inhibit SN–MN transmission (Mackey et al. 1987; Dale and Kandel 1990; Critz et al. 1991; Pieroni and Byrne 1992; Sun et al. 1996), increase the SN firing threshold (Billy and Walters 1989), and modulate specific postsynaptic MNs involved in defensive reflexes (Belkin and Abrams 1993). However, it is not known whether these peptides are released in the CNS during sensitization training. Facilitation of SN–MN transmission can also be induced by intracellular stimulation of interneurons L29 and L28 (Hawkins 1981a,b). These interneurons act directly on siphon SNs using an unknown transmitter: it has been determined that the transmitter is not 5-HT (Kistler Jr. et al. 1985; Hawkins and Schacher 1989). Finally, an increasing amount of evidence indicates that, in addition to heterosynaptic processes involving the release of modulatory transmitters onto the neuronal circuit, homosynaptic activity-dependent plasticity also occurs during learning, namely posttetanic potentiation (Walters and Byrne 1984; Frost et al. 1988; Schacher et al. 1990; Bristol et al. 2001) and long-term potentiation (Murphy and Glanzman 1996, 1997; Antonov et al. 2001, 2003). These types of synaptic plasticity are beyond the scope of this review.

Overall, these data indicate that modulation of defensive

reflex circuits by 5-HT involves a variety of different cell types that respond differently to 5-HT. As we will discuss below, it is likely that, when released in the *Aplysia* CNS during sensitization training, 5-HT acts on several subtypes of receptors that are differentially expressed by SNs, interneurons, and MNs and modulate synaptic transmission and excitability in different ways.

Biochemical Pathways Activated by 5-HT in SNs

Although the neuronal circuit mediating siphon reflex retraction involves many different cell types, most of which can be modulated by 5-HT, most experimental studies on synaptic plasticity in *Aplysia* have focused on SNs and SN-MN synapses. Indeed, the SN-MN synapses have provided a valuable locus where the cellular and molecular mechanisms underlying memory have been studied. SN-MN synapses are activated during tail or siphon reflex retraction, and their plasticity contributes significantly to simple forms of memory such as sensitization, dishabituation, and classical conditioning (Trudeau and Castellucci 1992; Antonov et al. 1999, 2001, 2003). For example, LE → LFS synapses account for about 30% of the siphon-induced siphon withdrawal reflex efficacy (Antonov et al. 1999). Moreover, behavioral sensitization and SN-MN facilitation display similar temporal profiles and molecular mechanisms. For example, a single noxious stimulus usually gives rise to short-term sensitization lasting 20–30 min, whereas four or five spaced shocks induce intermediate-term and long-term sensitization lasting 90 min and several days, respectively (Pinsker et al. 1973; Castellucci and Kandel 1976; Sholz and Byrne 1987; Sutton et al. 2001, 2002). Similarly, a single exogenous 5-HT application gives rise to short-term facilitation, whereas five applications produce intermediate-term and long-term facilitation at SN-MN synapses (Frost et al. 1985; Montarolo et al. 1986; Sholz and Byrne 1987; Ghirardi et al. 1995; Mauelshagen et al. 1996; Sutton and Carew 2000). In addition, sensitization and facilitation of SN-MN synapses share common molecular requirements: (1) short-term sensitization and facilitation rely on covalent modification of proteins, (2) intermediate-term, on synthesis of new proteins, and (3) long-term, on RNA and protein synthesis (Castellucci et al. 1986, 1989; Montarolo et al. 1986; Ghirardi et al. 1995; Sutton et al. 2001). Finally, a detailed analysis of various neuronal loci during long-term sensitization revealed that, although short-term sensitization is correlated with synaptic plasticity at multiple cell types (SNs, interneurons, etc.), the neuronal correlates of long-term sensitization appear more restricted to SNs (Cleary et al. 1998). For these reasons, most of the studies aimed at understanding the mechanisms of synaptic plasticity in *Aplysia* have used facilitation of SN-MN connections as a model system, leaving 5-HT inhibition in interneurons almost completely unexplored.

Considerable evidence indicates that a single application of 5-HT onto SNs can activate both PKA and protein kinase C (PKC; for review, see Byrne and Kandel 1996). For example, elevation of intracellular cAMP levels and increased PKA activity can be detected following a single pulse of 5-HT (Bernier et al. 1982; Castellucci et al. 1982; Abrams et al. 1984; Ocorr and Byrne 1985; Ocorr et al. 1986; Müller and Carew 1998). Similarly, 5-HT leads to the translocation to the membrane of the Ca²⁺-dependent isoform of PKC (Saktor and Schwartz 1990; Kruger et al. 1991; Sossin and Schwartz 1992; Braha et al. 1993; Sossin et al. 1993) and an increase in PKC activity (Sossin et al. 1994). Interestingly, recent studies by Manseau et al. (2001) indicated that blocking a Ca²⁺-independent PKC isoform disrupted facilitation induced by 5-HT at depressed SN-MN synapses, whereas blocking the Ca²⁺-dependent isoform had no effect. Both PKA and PKC are thought to (1) phosphorylate specific ion channels that increase mem-

brane excitability and induce spike broadening, and (2) modulate vesicle mobilization and exocytosis to increase transmitter release. For example, PKA, by phosphorylating S-type K⁺ channels, reduces their open time (Siegelbaum et al. 1982). This effect contributes to the increase in membrane excitability and spike broadening following 5-HT application (Klein et al. 1982; Pollock et al. 1985; Baxter and Byrne 1989). Voltage-dependent K⁺ channels (K_v) can also be phosphorylated by both PKA and PKC, and seem to be involved specifically in spike broadening (Baxter and Byrne 1989, 1990; Goldsmith and Abrams 1992; Sugita et al. 1992). Spike broadening is an important mechanism for enhancing synaptic transmission through increased Ca²⁺ influx in nerve terminals. However, 5-HT can increase transmitter release independently of spike broadening, by enhancing the mobilization of transmitter vesicles to the active zone (Klein 1993, 1994). Both PKA and PKC seem capable of producing this effect (Hochner et al. 1986; Braha et al. 1990; Sugita et al. 1992).

Interestingly, PKA and PKC are differentially recruited depending on the duration of 5-HT application and on the state of the synapse. For example, PKA blockers are more effective in preventing synaptic facilitation after short 5-HT applications, whereas PKC blockers are more effective after long exposures (Braha et al. 1990; Hochner and Kandel 1992; Sugita et al. 1992). Similarly, facilitation of depressed synapses is blocked by inhibitors of PKC but not PKA, whereas the converse has been shown for nondepressed synapses (Braha et al. 1990; Goldsmith and Abrams 1991; Ghirardi et al. 1992). This state- and time-dependence of PKA and PKC recruitment by 5-HT (Byrne and Kandel 1996) remains unexplained. It is possible that 5-HT activates two different receptor subtypes coupled to diacylglycerol (DAG) and cAMP, respectively, or that a single receptor subtype could bind to two different G proteins. This question will remain unanswered until 5-HT receptors expressed by SNs have been fully characterized.

In addition to PKA and PKC, repeated pulses of 5-HT, which give rise to long-term facilitation, are able to recruit another set of protein kinases that are not activated by a single application. For example, the mitogen-activated protein kinase (MAPK), also called extracellular-signal-regulated kinase (ERK), is activated in response to repeated pulses of 5-HT and translocates to the nucleus, where it modulates gene expression necessary for long-term facilitation (Martin et al. 1997; Michael et al. 1998; Sharma et al. 2003). Moreover, 5-HT-induced ERK activation and long-term synaptic facilitation both require activation of tyrosine kinases (presumably receptor tyrosine kinases or RTKs; Purcell et al. 2003). What makes repeated 5-HT pulses capable of activating ERK and tyrosine kinases, when a single application is unable to do so? Again, it is likely that a better knowledge of *Aplysia* 5-HT receptors will help elucidate this important question.

Because of their central role in memory processes and synaptic plasticity, considerable effort has been devoted to characterizing *Aplysia* 5-HT receptors, from as early as the 1960s. The most striking progress, however, has been obtained within the last 10 years. During this time, the cloning and characterization of four different 5-HT receptors has been reported. We will now turn our attention to a discussion of the properties of these receptors as well as their potential implication in memory processes.

Evolutionary Divergence of 5-HT Receptors

In general, 5-HT receptors are classified and grouped into seven families on the basis of sequence identity and on the nature of the second-messenger systems to which they are coupled. Six of these families are composed of G-protein-coupled metabotropic receptors (or GPCRs). The 5-HT₁ and 5-HT₂ (G_i-coupled recep-

tors) inhibit adenylyl cyclase, whereas 5-HT₄, 5-HT₆, and 5-HT₇ (Gs-coupled receptors) subtypes activate its activity. Only two subtypes are not linked to the adenylyl cyclase pathway: (1) 5-HT₂ receptors are coupled to phospholipase C (Gq-coupled receptors) and stimulate phosphoinositide metabolism, and (2) 5-HT₃ subtypes are ionotropic receptors and thus are not composed of GPCRs (Hoyer et al. 1994; Peroutka 1995). Previous phylogenetic studies suggested that mammalian 5-HT receptor subtypes emerged from gene duplication, followed by mutations and sequence drift (Vernier et al. 1995; Tierney 2001). Early molecular events first led to the divergence of three major classes of paralogous 5-HT receptors: the 5-HT₁ (5-HT_{1,3,7} receptors), the 5-HT₂, and 5-HT₆ classes which existed about 750 million years ago (Mya). Further division within the 5-HT₁ class occurred 600 Mya, when 5-HT₃ and 5-HT₇ subtypes diverged from the 5-HT₁ subtype. These divergences predate the evolution of vertebrates from invertebrates, which also occurred about 600 Mya. Therefore, members of the three major classes are likely to be found in invertebrate species. However during evolution, subsequent independent differentiation of each subtype within each class of vertebrate and invertebrate receptors makes it difficult to classify invertebrate 5-HT receptors into specific vertebrate subtypes (Peroutka 1994; Peroutka and Howell 1994; Tierney 2001).

Early Characterization of 5-HT Receptors Expressed by *Aplysia* Neurons

5-HT mediates a great variety of functions in *Aplysia* neurons, probably through multiple G-protein coupled receptors. Serotonergic effects were first reported on neurons (Gerschenfeld and Tauc 1961; Cedar and Schwartz 1972), heart (Koester et al. 1973), and gill (Kebabian et al. 1979). In 1974, Gerschenfeld and Paupardin-Tritsch described six different types of responses following application of 5-HT to *Aplysia* neurons: four of the responses (named A, A', B, and C) involved an increase in membrane conductance, whereas the other two (named α and β) involved a decrease in membrane conductance (Gerschenfeld and Paupardin-Tritsch 1974). Pellmar and Carpenter (1980) identified a seventh type of response to 5-HT: a voltage- and calcium-dependent response. These different responses were distinguished by voltage clamp experiments in terms of their time course, ionic selectivity, and whether they were mediated by an increase or decrease in membrane conductance. Although these electrophysiological responses could in principle be mediated by a single 5-HT receptor coupled to different intracellular cascades, these experiments are regarded as the first indications of a variety of potential 5-HT receptor subtypes in the CNS of *Aplysia*.

The presence of multiple 5-HT receptors was confirmed by biochemical techniques. Saitoh and Shih (1987) found that an agonist of 5-HT_{1A} receptors, 1-[2-(4-azidophenylethyl)-4-(3-trifluoromethylphenyl)piperazine (azido-PAPP)], is a suitable photoaffinity labeling probe for 5-HT receptors in *Aplysia*. They found that five labeled polypeptides were separated by SDS-PAGE upon incubation of [³H]azido-PAPP with total neuronal membranes and UV irradiation. The labeling was abolished by 5-HT, which competes for binding on the same receptors. These results suggested the existence of at least five 5-HT receptor subtypes.

As there is increasing interest in characterizing the role of 5-HT as a neurotransmitter in *Aplysia*, it is important to identify the pharmacological properties of 5-HT receptors in this animal. In vertebrate nervous tissues, receptor binding techniques have proven to be valuable for the identification and pharmacological characterization of 5-HT receptors. In *Aplysia*, Drummond et al. (1980), using [³H]LSD (lysergic acid diethylamide, a nonselective 5-HT receptor agonist) binding assays and 5-HT-induced modulation of adenylyl cyclase activity, reported the first detailed dis-

tribution of 5-HT receptors in various neuronal and nonneuronal tissues. Specific 5-HT-sensitive [³H]LSD binding was found in the gill, heart, buccal muscles, and in all ganglia of the CNS of *Aplysia*. After localization of 5-HT receptors, stimulation of adenylyl cyclase by 5-HT in membranes of *Aplysia* ganglia, muscles, and connective nerves was measured, indicating the presence of 5-HT Gs-coupled receptors. Increase in 5-HT-sensitive adenylyl cyclase activity correlated well with the amount of 5-HT-sensitive [³H]LSD binding sites in most tissues. High density of 5-HT receptors in pleuro-abdominal connective nerves and their presence in the connective tissue sheath surrounding the ganglia suggest that not all 5-HT receptors are located at cell bodies and synapses.

Kadan and Hartig (1988) then took advantage of the improved sensitivity of ¹²⁵I-isotope labeling to pursue the mapping of 5-HT receptors in *Aplysia*. They found that ¹²⁵I-LSD labeled a population of high-affinity serotonergic sites in *Aplysia* ganglia. 5-HT receptors were primarily located within the neuropil, although a subset of neuronal somata was also labeled. Those authors next determined the potency of various pharmacological compounds to compete for ¹²⁵I-LSD binding sites on sections from pedal or abdominal ganglia. The order of potency was: methysergide (5-HT_{1,2,7} antagonist) > cyproheptadine (5-HT_{1,2} antagonist) > mianserin (antagonist/inverse agonist of 5-HT₂ receptors) > cinanserin (effective antagonist of 5-HT responses in *Aplysia*; Brunelli et al. 1976; Newlin et al. 1980) > 5-HT > ketanserin (5-HT₂ antagonist) > bufotenine (5-HT_{1,2} agonist) > 8-OH-DPAT (5-HT_{1A} agonist). Kadan and Hartig (1988) observed a decrease in the affinity of 5-HT for ¹²⁵I-LSD binding sites in the presence of Gpp(NH)p (5'-guanylimidodiphosphate), a poorly metabolized analog of guanine nucleotide triphosphate (GTP), suggesting a coupling of 5-HT receptors to G-proteins in *Aplysia* CNS. These data indicated that ¹²⁵I-LSD binding sites in the *Aplysia* nervous system are regionally distributed, exhibit specific pharmacological binding properties, and are coupled to G-proteins. This is consistent with labeling of functional heterogeneous 5-HT receptors. By comparing the pharmacological properties of the ¹²⁵I-LSD labeled sites with the properties of the six distinct serotonergic receptor types identified by Gerschenfeld and Paupardin-Tritsch (1974), Kadan and Hartig (1988) suggested that LSD antagonizes the neuronal responses mediated by three of the six electrophysiologically characterized 5-HT receptors (the A, B, and C types). However, the pharmacological profiles for each of these three types differ to some degree from the profile they observed for ¹²⁵I-LSD binding. For example, compounds used by Gerschenfeld and Paupardin-Tritsch (1974) to inhibit the A and C responses did not block ¹²⁵I-LSD binding, even at 10 times the concentrations previously used by Gerschenfeld and Paupardin-Tritsch (1974).

Evans et al. (1991), also using ¹²⁵I-LSD, provided further characterization of the localization of 5-HT receptors, focusing on the five major neurons which constitute the abdominal ganglion left upper quadrant (L1, L2, L3, L4, and L6). They also investigated in more detail the electrophysiological properties of the responses they produced following activation by 5-HT. First, intense labeling was only observed on the soma of a symmetrically located pair of cells in the abdominal ganglion of *Aplysia californica*: L1 and R1. This binding was blocked by micromolar concentrations of 5-HT and lower concentrations of the serotonergic antagonists cyproheptadine and mianserin, confirming Kadan and Hartig's (1988) results. Second, electrophysiological investigation of 5-HT responses of the neurons in the left upper quadrant revealed a range of 5-HT responses. Cells L3 and L6 showed an increased K⁺ conductance in response to 5-HT that is not blocked by cyproheptadine or mianserin. Cells L2 and L4 displayed a biphasic response to 5-HT: an increase in Na⁺ con-

ductance, which could be blocked by cyproheptadine or mianserin, followed by a voltage-dependent Ca^{2+} conductance which was blocked by Co^{2+} but not the serotonergic antagonists. Cell L1 and its symmetrical partner, R1, in addition to the Na^+ and Ca^{2+} responses observed in L2 and L4, displayed an increase in Cl^- conductance that can be inhibited by LSD, cyproheptadine, and mianserin.

These early studies were the first attempts to identify the distribution and pharmacological properties of diverse 5-HT receptors in *Aplysia*. They demonstrated the presence of 5-HT receptors in virtually all *Aplysia* tissue types and especially in the CNS. They also suggested the existence of at least six receptor subtypes. The development of molecular biological techniques and the possibility of cloning and expressing individual 5-HT receptor subtypes in cell lines allowed further elucidation of the electrophysiological and pharmacological properties of the serotonergic pathways in *Aplysia*.

Structural and Pharmacological Characterizations and Tissue Distribution of Cloned 5-HT Receptors

Cloning of 5-HT Receptors in *Aplysia*

Four 5-HT receptors have been characterized in *Aplysia* to date. Li et al. (1995) isolated potential genes that encode *Aplysia* 5-HT receptors by performing a PCR analysis of *Aplysia* genomic DNA. In order to amplify potential 5-HT receptors, they used degenerate PCR primers whose sequences were based on conserved peptide sequences found in the sixth and the seventh transmembrane domains of all known serotonergic GPCRs. Two different genomic clones, *Ap5-HT_{B1}* and *Ap5-HT_{B2}*, were isolated. The *Ap5-HT_{B1}* gene codes for a protein of 453 amino acids (GenBank accession no. L43557) containing seven hydrophobic putative transmembrane domains, a relatively short third intracellular loop, and a long C-terminal tail. Genomic analysis further demonstrates that the gene is intronless. The *Ap5-HT_{B2}* gene is also intronless and codes for a closely related protein of 422 aa (GenBank accession no. L43558) which shares 90% amino acid sequence identity with the *Ap5-HT_{B1}* within the transmembrane domains and adjacent regions. The N-terminal extracellular domain and the extracellular loops I and II are less conserved. More divergence occurs within the third intracellular loop and the C-terminal tail. It is possible that other related receptors are present in the *Aplysia* genome, because a Southern blot analysis of genomic DNA, probed with the coding region of *Ap5-HT_{B1}*, revealed five distinct bands. Dendrogram analysis of the amino acid sequences of cloned 5-HT receptors indicated that *Ap5-HT_{B1}* and *Ap5-HT_{B2}* are only distantly related to the rest of the known 5-HT receptors (Fig. 2). They could not be readily grouped within any of the mammalian subgroups based on amino acid sequence identity.

A third 5-HT receptor gene was cloned and characterized from *Aplysia* and named *5-HT_{ap1}* (Angers et al. 1998). Degenerate primers and PCR amplification were used to screen CNS and kidney cDNA libraries. A cDNA coding for a putative protein of 492 aa containing seven stretches of hydrophobic residues, a relatively large third cytoplasmic loop, and a short C-terminal tail, features common to several 5-HT₁ receptors, was isolated (GenBank accession no. AF041039; Boess and Martin 1994; Gerhardt and van Heerikhuizen 1997). Southern blot analysis of genomic DNA revealed that the *5-HT_{ap1}* gene is probably intronless and does not have a close homolog in the *Aplysia* genome. Dendrogram analysis of amino acid sequence within the transmembrane domains also suggests that *5-HT_{ap1}* is associated with the mammalian 5-HT₁ receptor family (Fig. 2).

The same cloning strategy was used to obtain the sequence

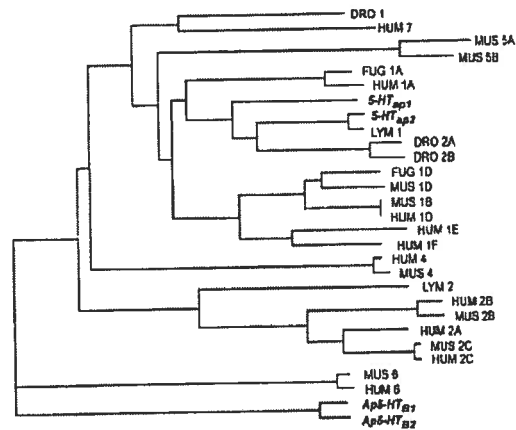


Figure 2 Dendrogram analysis of different members of the 5-HT receptor superfamily. Sequences that were used for phylogenetic analysis were retrieved from the GenBank database. The sequences of serotonin receptors were compared and aligned using ClustalW (Thompson et al. 1994), which was executed from GDE (Genetic Data Environment; J. Felsenstein 1993, PHYLIP, Phylogeny Inference Package, version 3.5.1c and 3.6, University of Washington, Seattle, WA). Only amino acid positions that could be aligned without ambiguity were used for the analysis. The alignment was then used for phylogenetic comparisons using the PHYLIP package. Analysis was performed with a bootstrap procedure that computes the probability of occurrence of the branches for 1000 possible trees. Branching order was determined using the Fitch-Margoliash algorithm included in the PHYLIP package. Only branches occurring in >800 trees are represented. DRO, *Drosophila*; FUG, *Fugu rubripes* (pufferfish); LYM, *Lymnaea*; HUM, human; MUS, mouse.

of a fourth *Aplysia* 5-HT receptor gene, named *5-HT_{ap2}* (GenBank accession no. AF372526; Barbas et al. 2002). The cDNA contains an open reading frame encoding a protein of 567 aa with a predicted molecular mass of 63 kD. Hydrophobicity analysis reveals the presence of the seven transmembrane domains characteristic of GPCRs. Its large third cytoplasmic loop, its short C-terminal tail, and the observation that the *5-HT_{ap2}* gene is probably intronless and does not have a close homolog in the *Aplysia* genome are reminiscent of members of the vertebrate 5-HT₁ receptor family and similar to the 5-HT₁-like *Aplysia* receptor *5-HT_{ap1}*. Amino acid sequence comparisons between the *5-HT_{ap2}* receptor and other 5-HT receptors show significant sequence identity to the 5-HT₁-like receptors, and a dendrogram analysis places *5-HT_{ap2}* within the family of mammalian 5-HT₁ receptors (Fig. 2). Sequence analysis also reveals that *5-HT_{ap2}* has close amino acid identity (68%) with the *Lymnaea stagnalis* 5-HT receptor *5-HT_{lym}* (Sugamori et al. 1993), suggesting that they may be orthologous.

Ap5-HT_{B1} and *Ap5-HT_{B2}* Receptors Activate Phospholipase C and Have Different Expression Patterns

To identify their pharmacological profiles, *Ap5-HT_{B1}* and *Ap5-HT_{B2}* receptors were stably expressed in HEK 293 cells (Li et al. 1995). In response to 5-HT, both receptors stimulate phospholipase C activity, reaching a plateau at 100 nM. Therefore, the stimulation of these two receptors might lead to the activation of PKC. The estimated EC_{50} for 5-HT was 1.8 nM for *Ap5-HT_{B1}* and 1.5 nM for *Ap5-HT_{B2}*. Methioheptin and spiperone, which are respectively nonselective 5-HT and 5-HT_{2A/1} antagonists, both prevent the 5-HT-dependent stimulation of phospholipase C at 10 μ M concentration. However, cyproheptadine (10 μ M), another 5-HT_{1,2} antagonist, has no effect. Thus, although *Ap5-HT_{B1}* and *Ap5-HT_{B2}* do not appear to be the invertebrate homologs of

the mammalian 5-HT₂ receptors, they do have similar coupling to phospholipase C.

RT-PCR experiments on mRNA isolated from various tissues of *Aplysia* showed that Ap5-HT_{B1} mRNA is expressed in spermatheca and ovotestis, whereas Ap5-HT_{B2} mRNA is detected only in the CNS. As Ap5-HT_{B1} and Ap5-HT_{B2} have similar pharmacological profiles but different expression patterns, Li et al. (1995) suggested that these two receptors might result from the recent duplication of an ancestral gene, which placed the coding sequence of the ancestral gene under the control of totally different promoter sequences.

The 5-HT_{ap1} Receptor Is Negatively Coupled to Adenylyl Cyclase

The pharmacological profile and expression pattern of the 5-HT_{ap1} receptor were also characterized (Angers et al. 1998). This receptor, fused to a c-myc epitope at its N terminus, was expressed in mammalian HEK 293 cells. Isolated membranes bind [³H]LSD in a saturable and dose-dependent manner with an estimated K_d of 0.56 nM. The rank order of potency of various serotonergic agonists and antagonists for inhibition of [³H]LSD binding is given in Table 1. 5-HT_{ap1} shows high-affinity binding to 5-HT which is comparable to that of the mammalian 5-HT_{1A,B,D,F} and 5-HT₇ receptors. From these results, Angers et al. (1998) concluded that the pharmacological profile of 5-HT_{ap1} seems to be related to the mammalian 5-HT₁ and 5-HT₇ receptor profiles. The structure and function of the 5-HT_{ap1} receptor are probably closely related to those of an ancestral receptor, which existed before the divergence of the 5-HT receptor subtypes in vertebrates. It appears to have kept the characteristics of more than one receptor subtype, possibly related to a prototype of the early 5-HT₁-receptors.

As expected from the structure and pharmacological profile of 5-HT_{ap1}, stimulation of the receptor with 5-HT in HEK 293 cells inhibits forskolin-induced cAMP accumulation in a dose-dependent manner (Angers et al. 1998). This inhibition is blocked in the presence of 100 nM of the antagonist methiothepin. These experiments indicate that 5-HT_{ap1} is functionally coupled to the mammalian G_i subunit and inhibits adenylyl cyclase and cAMP accumulation (Angers et al. 1998).

Table 1. Comparison of the Affinities of Various Compounds That Compete With the Binding of [³H]LSD to the Membranes of Cells Transfected With the 5-HT_{ap1} and 5-HT_{ap2} cDNA

Drug	Specificity	K _i (nM)	
		5-HT _{ap1} ^a	5-HT _{ap2} ^b
5-CT	5-HT ₁ agonist	1.04	162
Methiothepin	Nonselective 5-HT antagonist	2.62	0.3
PAPP	5-HT _{1A} agonist/5-HT _{1D} antagonist	9.50	182
5-HT		13.23	241
Clozapine	5-HT ₂ antagonist	56.63	2124
8-OH-DPAT	5-HT _{1A} -specific agonist	73.96	2089
Metergoline	5-HT _{1,2,7} antagonist	90.66	36
Ketanserin	5-HT ₂ antagonist	288.18	561
NAN-190	5-HT _{1A} -specific antagonist	>1000	1030
Dopamine		>1000	>10,000

Affinity estimates are given as K_i values in nanomolar concentrations and were determined by a computer-assisted nonlinear curve analysis (GraphPad PRISM 3.0 computer program). ^aAdapted from Angers et al. (1998); ^badapted from Barbas et al. (2002).

To determine the distribution of 5-HT_{ap1} protein, Angers et al. (1998) performed a Western blot analysis of plasma membrane extracts and RT-PCR amplification of mRNA isolated from various *Aplysia* tissues and found that both the protein and mRNA could be detected in the gill, heart, hermaphroditic duct, kidney, and ovotestis extracts. It is also present in all ganglia of the CNS (Angers et al. 1998). Because 5-HT_{ap1} is present in most *Aplysia* tissue membranes, this receptor might play a role in multiple physiological functions of 5-HT such as reproduction, circadian rhythms, feeding, and modulation of defensive behavior.

The 5-HT_{ap2} Receptor Is Negatively Coupled to Adenylyl Cyclase and Is Exclusively Expressed in the CNS

Membranes isolated from transiently transfected HEK 293 cells with 5-HT_{ap2} receptor bind [³H]LSD in a saturable and dose-dependent manner with an estimated K_d of 4.37 nM (Barbas et al. 2002). The rank order of affinity of various serotonergic agonist and antagonists is given in Table 1. As expected for a 5-HT receptor, 5-HT_{ap2} displayed a higher affinity for 5-HT than for dopamine or octopamine. Its pharmacological profile revealed important differences when compared to those of the mammalian members of the 5-HT₁ subfamily. Methiothepin, a nonselective 5-HT antagonist, showed the strongest affinity (Table 1). The affinity of 5-HT_{ap2} for methiothepin is higher than for any of the cloned mammalian 5-HT receptors. These results suggest that the functions of 5-HT_{ap2} receptor are probably related to those of an ancestral receptor, which existed before the divergence of the 5-HT receptor subtypes in vertebrates, and that it kept characteristics of more than one receptor subtype (5-HT_{1,5,7} receptors). The pharmacological profile of 5-HT_{ap2} is distinct from that of 5-HT_{ap1} (Table 1). It will now be possible to discriminate between these 5HT₁-like receptors in 5-HT-induced physiological responses using appropriate agonists and/or antagonists.

Stimulation of the 5-HT_{ap2} receptor by 5-HT in HEK 293 cells inhibits forskolin-induced cAMP accumulation in a dose-dependent manner (Barbas et al. 2002). The same result was obtained with the agonist 5-CT. In addition, 5-HT produces no inhibition of cAMP accumulation in the presence of 1 nM of the antagonist methiothepin. Pertussis toxin, a known G_i-protein inhibitor, at a concentration of 50 ng/mL, completely blocks the effect of 5-HT, indicating that 5-HT_{ap2} receptor interacts with a pertussis toxin-insensitive G_o-protein. Interestingly, treatment with pertussis toxin not only inhibits the G_i-dependent decrease of cAMP level, but also seems to reveal a functional coupling between 5-HT_{ap2} and G_s-protein that produces an increase in the cAMP level. Examples of such dual coupling to G_s and G_i pathways have been reported for the α_{2A}- and β₂-adrenergic receptors in mammalian cells (Eason and Liggett 1995; Xiao et al. 1995). Stimulation of the 5-HT_{ap2} receptor can modulate overlapping but distinct sets of signal transduction mechanisms by its interaction with G_i and G_s.

The expression of 5-HT_{ap2} mRNA in various tissues of *Aplysia* was screened by RT-PCR and was found only in the CNS. 5-HT_{ap2} mRNA could be detected in the abdominal ganglion (without the bag cells), in the bag cells, and also weakly in the cerebral and pleural-pedal ganglia (Barbas et al. 2002). The finding that its expression is restricted to the CNS suggests a potential role for the 5-HT_{ap2} receptor in modulating synaptic transmission and neuronal excitability.

5-HT Receptor(s) Coupled to G_s or 5-HT_{apAC}

5-HT receptors that activate adenylyl cyclase or G_s-coupled receptors, have not yet been cloned in *Aplysia*. One hypothesis would be that, although one or several specific G_s-coupled 5-HT receptors might be expressed in the CNS, the amount of mRNA coding for these receptors is lower than that coding for receptors

that have already been cloned. Therefore the techniques used to preferentially amplify the most abundant cDNA might not be an effective strategy. PCR amplification of SN libraries would help resolve this problem. Another hypothesis would be that the G_i or G_q 5-HT receptors also fulfill coupling to G_s under different conditions of stimulation by 5-HT. This possibility seems unlikely, however, because Cohen et al. (2003) found distinct pharmacological properties for an adenylyl cyclase-coupled 5-HT receptor.

Cohen et al. (2003) recently used biochemical assays to pharmacologically characterize the 5-HT receptor(s) that activates adenylyl cyclase in the *Aplysia* CNS. They also examined the 5-HT-induced cAMP-dependent modulation of the electrophysiological properties of SNs. They identified compounds that are effective in blocking the G_s-coupled 5-HT receptor(s) in *Aplysia* CNS and called this class of receptor 5-HT_{apAC}. Eight of the 14 tested antagonists were effective against 5-HT_{apAC} in CNS membranes. The rank order of potency of these antagonists is given in Table 2, with methiothepin being the antagonist with the highest potency. Comparison of the pharmacological profile of the 5-HT_{apAC} receptor with those of mammalian 5-HT receptor subtypes suggests that it most closely resembles the 5-HT₆ receptor subtype, although two specific 5-HT₆ antagonists (olanzapine and Ro-04-6790) were not effective against 5-HT_{apAC}.

Of the 14 compounds tested, methiothepin was also the most effective in inhibiting 5-HT stimulation of adenylyl cyclase. Methiothepin substantially inhibited two effects of 5-HT on SN firing properties: spike broadening in tetraethylammonium/nifedipine and increased excitability. Consistent with cyproheptadine blocking 5-HT stimulation of adenylyl cyclase, cyproheptadine also blocked the 5-HT-induced increase in SN excitability. In conjunction with other pharmacological probes, Cohen et al. (2003) proposed that the antagonist methiothepin should be useful in analyzing the role of 5-HT in various forms of neuromodulation in *Aplysia*.

Thus far, none of these four cloned *Aplysia* 5-HT receptors have been formally implicated in the molecular processes underlying synaptic facilitation or memory encoding. However, because we know the G-proteins that are potentially coupled to these receptors, the wealth of information on biochemical cascades activated by G-proteins in this and other systems can now help us infer their possible roles in sensitization. These possibilities will now be discussed.

Table 2. Antagonists Tested for Inhibition of 5-HT Stimulation of Adenylyl Cyclase in *Aplysia* CNS

Antagonists ^a	Specificity
Methiothepin	Nonselective 5-HT antagonist
Metergoline	5-HT _{1,2,7} antagonist
Fluphenazine	D ₁ /D ₂ dopamine receptor antagonist
Clozapine	5-HT ₂ antagonist
Cyproheptadine	5-HT _{1,2} antagonist
Risperidone	5-HT ₂ antagonist/D ₂ dopamine receptor antagonist
Ritanserin	5-HT _{2A} antagonist/inverse agonist
NAN-190	Selective 5-HT _{1A} antagonist
<i>Inactive antagonists</i>	
GR-113808	Selective 5-HT ₁ antagonist
SB-204070	Selective 5-HT ₄ antagonist
Olanzapine	5-HT _{2A} antagonist
Ro-04-6790	Selective 5-HT ₆ antagonist
RS-102221	Selective 5-HT _{2C} antagonist
Spiperone	5-HT _{2A/1} antagonist/D ₂ dopamine receptor antagonist

^aAdapted from Cohen et al. (2003).

Possible Physiological Roles of *Aplysia* 5-HT Receptors

Activation of 5-HT G_s-coupled Receptor(s)

The modulatory effects of activation of a potential 5-HT G_s-coupled receptor in the *Aplysia* nervous system have been studied in considerable detail. Following binding of 5-HT, these receptors activate adenylyl cyclase (AC) and increase the concentration of cAMP in SNs (Fig. 3). In turn, cAMP activates PKA by causing its two regulatory subunits to dissociate from the catalytic subunits, which then phosphorylate and covalently modify a number of target proteins (Ghirardi et al. 1992; Braha et al. 1993; Byrne and Kandel 1996; Angers et al. 2002a). The switch from short- and intermediate-term to long-term synaptic facilitation is initiated by multiple exposures to 5-HT, which induce PKA to translocate to the nucleus where it stimulates gene transcription. There, PKA is thought to lead to removal of the inhibitory action of the repressor cyclic AMP response element binding protein-2 (CREB-2). Some of these nuclear PKA effects could rely on its ability to recruit ERK, which is also translocated to the nucleus, where it is thought to phosphorylate CREB-2 and contribute to the activation of a transcriptional cascade. PKA phosphorylation of a transcriptional activator cyclic AMP response element binding protein-1 (CREB-1) is necessary for its binding to cyclic AMP regulatory elements (CREs), located in the promoter region of cAMP-inducible genes (for review, see Alberini 1999). Because binding of 5-HT to a receptor that engages a G-protein increasing the activity of AC (G_s) is the initial step in this cascade of molecular events, cloning of the 5-HT_{apAC} receptor(s) would give us important information about the molecular mechanisms underlying synaptic facilitation. Expression of these receptors in cell lines would then help identify their functional properties and their possible mechanisms of regulation (binding, time of expression to the membranes, desensitization of the receptor, cross-talk with other pathways, heterodimerization, etc.). It could also allow the synthesis of specific drugs or antibodies capable of blocking their action during sensitization training.

Activation of Two 5-HT G_i-coupled Receptors

Application of 5-HT has generally been associated with an increase in cAMP levels in *Aplysia*. Nevertheless, application of 5-HT also triggers inhibitory responses in *Aplysia* (Jennings et al. 1981; Frost et al. 1988; Fisher and Carew 1993; Ram et al. 1994; Xu et al. 1995; Storozhuk and Castellucci 1999a,b; Bristol et al. 2001). In these cases, binding of 5-HT to G_i-coupled 5-HT receptors in the CNS could be involved. G_i-coupled 5-HT receptors can interfere, by their negative coupling to AC, with pathways that are dependent on cAMP. They might also be involved in modulating PKC or ERK pathways, perhaps by cross-talk between receptors. This phenomenon could be implicated in behavioral plasticity and learning in *Aplysia*.

5-HT receptors that inhibit AC have been implicated in learning and memory processes in mammals. Depending on their cellular localization, they can act by inhibiting the firing rate and/or by decreasing neurotransmitter release (Buhot et al. 1995; Buhot 1997). In mammalian systems, a subset of 5-HT_{1A} receptors, the somatodendritic autoreceptors, reduce cell firing and curtail the synthesis and release of 5-HT (Buhot 1997). Activation of serotonergic autoreceptors in the presynaptic nerve terminal (5-HT_{1D} receptors in human or 5-HT_{1B} receptors in rodents) decreases the local synthesis and release of transmitter (Buhot et al. 1995). Further investigation of the detailed localization of the 5-HT_{ap1} and 5-HT_{ap2} receptors in the *Aplysia* CNS is necessary to determine whether these receptors are also autoreceptors. Identification of the expression patterns at the cellular and subcellular levels should provide additional clues about their role in the modulation of synaptic transmission that occurs dur-

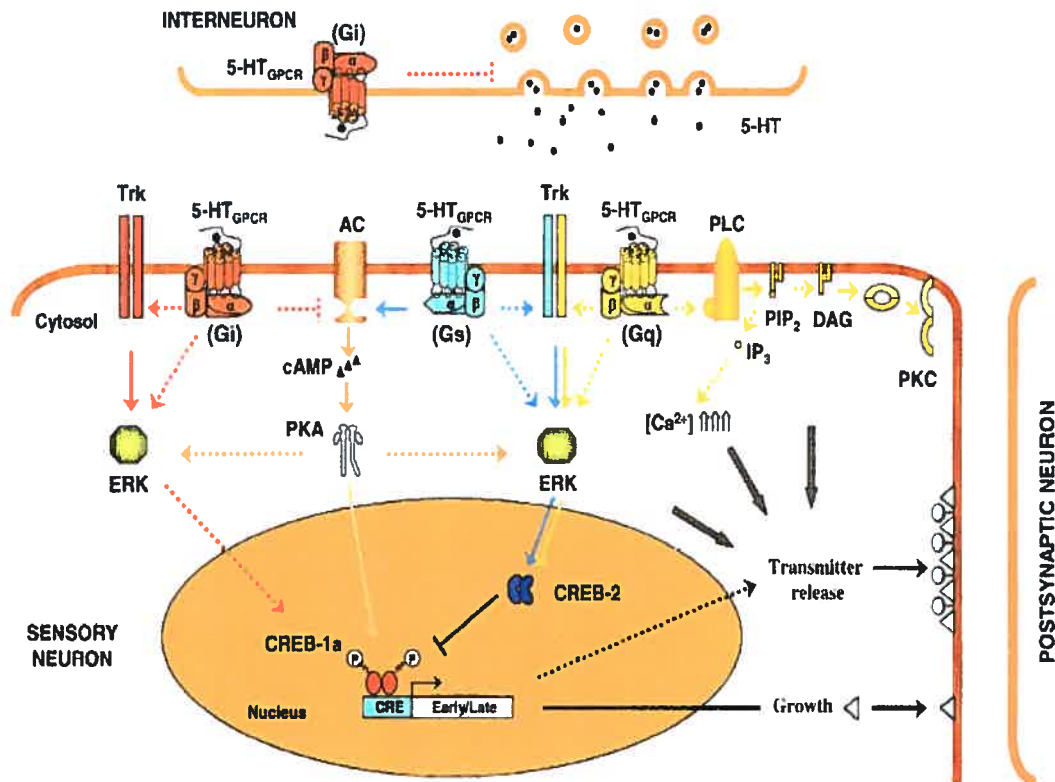


Figure 3 Schematic representation of putative roles of 5-HT receptor modulation of neuronal properties in *Aplysia californica*. The sensory neuron to motor neuron synapse involved in withdrawal reflexes is used as an example. After stimulation, facilitatory serotonergic interneurons release 5-HT that binds 5-HT receptors (5-HT_{GPCR}). The final effect of 5-HT may depend on the specific expression patterns of 5-HT receptors and signaling molecules within different cells. Binding of 5-HT to a Gs-coupled receptor stimulates adenylyl cyclase (AC; pink pathway). Activation of the cyclase increases the cAMP concentration and induces activation of the cyclic AMP-dependent protein kinase A (PKA; activation is indicated by an arrow). Activation of PKA can phosphorylate and covalently modify a number of target proteins, including components of the exocytotic machinery of release, to enhance transmitter availability and release. With repeated stimulation, PKA can recruit the extracellular signal-regulated kinase (ERK, MAPK), and can translocate to the nucleus where it phosphorylates the cyclic AMP response element binding proteins (CREBs). Phosphorylation by ERK of the repressor isoform CREB-2 removes its inhibition on CREB-1a. Phosphorylation of CREB-1a induces transcription of early/late genes containing cyclic AMP response elements, leading to growth of new synaptic connections and potentially transmitter release. Gs-coupled receptor might also activate ERK (blue pathway) by transactivation of receptor tyrosine kinases (e.g., Trk, which can be activated by neurotrophins), or by direct activation of the ERK cascade. To turn down the release of 5-HT from interneurons, Gi-coupled receptors might act as presynaptic autoreceptors (inhibition is indicated by -). When expressed at the surface of sensory neurons, Gi-coupled receptors can inhibit the Gs-dependent activation of the cyclase and turn down the cascade (red pathway). Under sustained release of 5-HT, Gi-coupled receptors might complement the activation of the ERK pathway by transactivation of Trks or direct activation of ERK components. Besides the PKA-signal pathway, there is a phospholipase C-PKC signaling pathway activated by 5-HT receptors (beige pathway). Gq-coupled receptor-activated phospholipase C (PLC) produces diacylglycerol (DAG) and inositol triphosphate (IP₃) by cleaving the phosphatidyl inositol PIP₂. IP₃ is water-soluble, and can diffuse into the cytoplasm. There it binds to a receptor on the endoplasmic reticulum to release Ca²⁺ from internal stores. DAG remains in the membrane, where it activates the protein kinase C (PKC). Gq-coupled receptors might also be capable of enhancing the activation of the ERKs. For clarity only, two different sets of Trk receptors and ERK appear on the figure; there is no evidence that Gi-, Gs-, or Gq-activated pathways modulate distinct pools of ERK. Transmitter availability and release can also be dependent on activation of other signaling molecules (e.g., PKC, Ca²⁺) as shown by gray arrows. Speculative interactions are represented by (- - -). The molecular mechanisms underlying serotonergic modulation of MNs are still poorly understood and were omitted on this diagram.

ing learning and memory. Although, in principle, Gs- or Gq-coupled 5-HT receptors could also decrease transmitter release in *Aplysia*, data from mammalian systems suggest that 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} are more likely to be involved in these inhibitory actions, either in serotonergic neurons, where they would act as autoreceptors, or in interneurons, where they could be implicated in the inhibitory action of 5-HT in polysynaptic pathways (Trudeau and Castellucci 1992, 1993).

Activation of Gq-coupled Receptors

Besides the PKA-signal pathway, a phospholipase C-PKC-signal pathway can also be activated by 5-HT receptors. Binding of 5-HT to Gq-coupled receptors activates phospholipase C

(PLC). PLC then cleaves phosphatidyl inositol PIP₂ to produce diacylglycerol (DAG) and inositol triphosphate (IP₃). IP₃ is water-soluble and diffuses into the cytoplasm, where it binds to a receptor on the endoplasmic reticulum to release Ca²⁺ from internal stores. DAG remains in the membrane where it activates PKC, which is active only when translocated from the cytoplasm to the membrane. Binding of 5-HT to Gq-coupled receptors can activate a Ca²⁺-dependent PKC in SNs of *Aplysia* (Fig. 3; Sacktor and Schwartz 1990; Sossin and Schwartz 1992). There is no evidence of 5-HT-mediated IP₃ production or release of Ca²⁺ from internal stores in sensory neurons after activation of 5-HT receptors. Interestingly, Manseau et al. (2001) demonstrated that the Ca²⁺-independent form of PKC is very important for facilitation

at depressed synapses. The link between a 5-HT Gq-coupled receptor and the activation of the Ca^{2+} -independent form of PKC is unclear. Because PKC activity contributes to facilitation of neurotransmitter release, modulates K^+ currents, and contributes to spike broadening, the Ap5-HT_{1c} receptor might therefore be involved in modulation of synaptic plasticity (Ghirardi et al. 1992; Sessin et al. 1994; Sugita et al. 1994).

G-protein Regulation of Ion Channels

Many types of neurotransmitter receptors regulate ion channels through activation of G-proteins. The process by which this regulation occurs is best established for Gi-coupled receptors. The 5-HT_{1A} receptors, when coupled to G-protein, activate specific inwardly rectifying K^+ channels in mammalian neurons (Ehrengruber et al. 1997), or inhibit voltage-gated Ca^{2+} channels (Lembo et al. 1997). Regulation of both types of channel most likely occurs primarily through the $\beta\gamma$ subunits of G-proteins, which directly open the K^+ channels and limit the opening of Ca^{2+} channels in response to membrane depolarization (Mark and Herlitze 2000; Zamponi 2001). Some evidence also suggests that G α s-coupled receptors (Drolet et al. 1997) and G α q-coupled receptors (Simen et al. 2001; Zamponi 2001) modulate the voltage-dependent gating of certain Ca^{2+} channels. In *Aplysia*, 5-HT modulates K^+ and Ca^{2+} channel responses (Klein and Kandel 1980; Siegelbaum et al. 1982; Benson and Levitan 1983; Shuster et al. 1991; Braha et al. 1993; Sugita et al. 1994). This regulation is thought to rely on the activation of PKA and/or PKC pathways. However, it is also possible that direct modulation of ion channels by 5-HT receptors, independently from the activation of downstream messenger cascades, might be involved in the regulation of synaptic transmission that occurs during behavioral modifications in *Aplysia*.

Cross-Talk Between 5-HT Receptors in *Aplysia*

GPCRs have long been viewed as acting through parallel biochemical pathways. However, a growing amount of evidence now suggests that these pathways are not always independent and that significant interactions can occur between receptors or G-proteins. This phenomenon is usually referred to as "cross-talk." In *Aplysia*, ERK, a downstream substrate of many tyrosine kinase signaling cascades, has been implicated in the induction of long-term synaptic plasticity (Martin et al. 1997; Zhang et al. 1997). Purcell et al. (2003) recently demonstrated that tyrosine kinase activity is required for both 5-HT-induced long-term synaptic facilitation of SN-MN synapses and tail-shock-induced long-term sensitization. Moreover, both effects of tyrosine kinase activity are mediated, at least in part, through ERK activation. Most importantly, these results suggest that tyrosine kinase activation occurs downstream of the 5-HT receptor, but upstream of ERK activation (Fig. 3). A variety of biochemical mechanisms through which GPCRs activate ERK have been demonstrated (for review, see Lowes et al. 2002; Luttrell 2002). Potential mechanisms for ERK activation are signals initiated by classical G-protein effectors leading to a PKA- and/or PKC-dependent phosphorylation of proteins involved in ERK activation. GPCRs can potentially activate ERK via cAMP (Stork and Schmitt 2002) and DAG (Puente et al. 2000) via a PKA- and/or PKC-independent mechanism. Activation of ERK has typically been attributed to the activation of receptor tyrosine kinase (RTK) in neurons, for example by the epidermal growth factor (EGF) receptors, by the nerve growth factor (NGF) receptors, or by Trk receptors which are activated by neurotrophins (Lowes et al. 2002). Originally, activation of GPCRs and RTKs by extracellular messages was thought to occur independently. Increasing evidence demonstrates that there are complex interactions between each of these pathways. At least two RTKs, platelet-derived growth factor

(PDGF) receptors (Linseman et al. 1995; Herrlich et al. 1998) and EGF receptors (Luttrell et al. 1997; Eguchi et al. 1998) can be "transactivated" by GPCRs. Cross-talk between GPCRs and RTKs allows integration of extracellular signals on the ERK cascade. For example, many GPCR agonists have been shown to trigger activation of the ERK cascade through tyrosine phosphorylation of RTKs, leading to a transactivation of these receptors. Direct interaction between β -arrestin and components of the ERK cascade might also be involved in ERK activation (for review, see Lowes et al. 2002; Luttrell 2002). The contribution of various G α (G α s, G α q, and G α i) and G $\beta\gamma$ subunits for activation of ERK has been reviewed by Gutkind (1998). It is now apparent that GPCRs can activate ERK via intracellular intermediates such as calcium PKC, cAMP, PKA, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), or via G α and G $\beta\gamma$ subunits. It is attractive to think that one way of strengthening the induction and maintenance of memory in *Aplysia* might be through the activation of diverse 5-HT receptors that modulate the ERK pathway, which is involved in the induction of transcription (Fig. 3). One can then imagine a situation where robust stimulation would cause a large release of 5-HT, which would bind to Gi-, Gq-, and Gs-coupled receptors. Activation of these receptors would activate several signaling cascades that would converge on ERK, an essential step for the induction of long-term synaptic plasticity.

The two protein kinase cascades activated by 5-HT, PKA and PKC, are also capable of interacting in *Aplysia* (Byrne and Kandel 1996). For example, Sugita et al. (1997) showed that activation of PKC by phorbol esters specifically attenuated aspects of the 5-HT activation of the cAMP/PKA cascade. Previous studies have demonstrated that PKC interacts with a cAMP/PKA cascade at the level of AC by increasing its activity and consequently the level of cAMP (for review, see Pieroni et al. 1993; Cooper et al. 1995). PKC can also interact with the PKA cascade at the level of the receptor. PKC can phosphorylate various types of receptors bound to ligands, resulting in desensitization and inhibition of the ligand-induced increases in intracellular messengers in mammals (Zhang et al. 1996; Dale et al. 2002). In *Aplysia* neurons, 5-HT binding to Gq- and Gs-coupled receptors could mediate PKC inhibition of 5-HT-induced activation of the PKA pathway, thereby leading to the suppression of 5-HT-induced facilitation at the transition between short- and long-term memory (Sugita et al. 1997). This mechanism would explain why synaptic facilitation induced by long 5-HT exposure requires PKC, whereas short 5-HT pulses necessitate PKA (Braha et al. 1990; Hochner and Kandel 1992; Sugita et al. 1992).

Cross-talk can also occur at the level of the receptors. It was demonstrated that phosphorylation by PKA of some GPCRs switches the coupling of the β_2 adrenoreceptor from Gs to Gi (Daaka et al. 1997; Zamah et al. 2002). Barbas et al. (2002) showed that treatment with pertussis toxin not only inhibits a Gi-dependent decrease of cAMP level by the 5-HT_{1A} receptor, but also seems to reveal a functional coupling between 5-HT_{1A} and Gs-protein that produces an increase in the cAMP level. These findings indicate that stimulation of 5-HT_{1A} can modulate overlapping but distinct sets of signal transduction mechanisms, and can give rise to distinct (or even opposing) physiological functions in *Aplysia* neurons by its dual coupling properties. Thus, 5-HT_{1A} might be capable of complementing the activation of 5-HT_{1B} receptors in modulating short-term and long-term memory.

The discovery that GPCRs may form heterodimers that display distinct pharmacological properties raises fascinating possibilities concerning the plasticity and diversity of these signaling systems (for review, see Bouvier 2001; Angers et al. 2002b). 5-HT receptors are capable of forming homodimers when expressed alone and heterodimers when co-expressed (Xie et al. 1999; Lee

et al. 2000). This type of association between different 5-HT receptors suggests the novel possibility that cross-talk may be possible not only at the level of second-messenger cascades, but even at the level of the receptors, adding increasing diversity to the cross-talk at the second-messenger/protein kinase cascade levels. 5-HT receptors might also be capable of interacting with receptors from other neurotransmitters (e.g., dopamine receptors) and thus allow for an unexpected level of functional diversity, by providing a point of interaction between transmission systems.

Overview and Future Directions

In order to understand the specific role of cloned 5-HT receptors in modulation of behaviors and physiological properties in *Aplysia*, localization of the expression of these proteins is necessary. Recently, using *in situ* hybridization, Barbas et al. (2003) mapped the site of expression of the two Gi-coupled receptors, 5-HT_{1A} and 5-HT_{2C}, in the CNS of *Aplysia*. Localization of expression of 5-HT receptors in neurons can also be accomplished by single-cell RT-PCR (Schacher et al. 2000; Vilim et al. 2001) or using antibodies to detect the presence of these proteins at the cell surface. Mapping of the sites of expression for all cloned 5-HT receptors will provide critical information concerning the heterogeneity of 5-HT receptor populations at the surface of presynaptic and postsynaptic neurons, and thus will ultimately allow us to study their roles in memory formation in *Aplysia*. These roles can be further confirmed by using RNAi and/or antisense approaches to abolish expression of specific receptors in identified neurons. For example, the neuronal circuit mediating siphon withdrawal reflex is now rather well understood, and a number of neurons within this circuit are modulated in response to 5-HT or sensitization training. It will now be possible to investigate which 5-HT receptor subtypes are expressed by SNs, interneurons, and MNs and clarify their role in memory processes.

Although exciting progress has been made in the characterization of 5-HT receptors in *Aplysia*, a number of subtypes likely still remain to be characterized. Early pharmacological and electrophysiological studies revealed the presence of at least six 5-HT receptor subtypes. Only four receptors, representing three different subtypes, have been cloned thus far. In particular, the molecular cascades underlying facilitation of SN-MN synapses during sensitization seem to depend on the activation of a cAMP/PKA pathway by a specific Gs-coupled 5-HT receptor (Cohen et al. 2003). This receptor is certainly one important missing link in our knowledge of memory processes in *Aplysia*. The rapid and striking developments of molecular biological techniques that we are witnessing now will provide us with exciting new tools for further characterizing *Aplysia* 5-HT receptors, and thus help us further understand the complexity of the 5-HT neuromodulatory processes set in motion during memory formation.

ACKNOWLEDGMENTS

D.B. received studentships from Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). V.F. and L.D.G. are supported by the Canadian Institute of Health Research (CIHR) grants MOP-14142 and MGC-57079. T.J.C. and S.M. are supported by NIH grant RO1 MH14-10183 to T.J.C. We thank C.S. Sherff and K.J. Reissner for helpful comments on an earlier version of this manuscript.

REFERENCES

Abrams, T.W., Castellucci, V.F., Camardo, J.S., Kandel, E.R., and Lloyd, P.E. 1984. Two endogenous neuropeptides modulate the gill and siphon withdrawal reflex in *Aplysia* by presynaptic facilitation involving cAMP-dependent closure of a serotonin-sensitive potassium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 7956-7960.

Alberini, C.M. 1999. Genes to remember. *J. Exp. Biol.* 202: 2887-2891.

Angers, A., Storozhuk, M.V., Duchaine, T., Castellucci, V.F., and DesGroselliers, L. 1998. Cloning and functional expression of an *Aplysia* 5-HT receptor negatively coupled to adenylate cyclase. *J. Neurosci.* 18: 5586-5593.

Angers, A., Fioravante, D., Chin, J., Cleary, L.J., Bean, A.I., and Byrne, J.H. 2002a. Serotonin stimulates phosphorylation of *Aplysia* synapsin and alters its subcellular distribution in sensory neurons. *J. Neurosci.* 22: 5412-5422.

Angers, S., Salahpour, A., and Bouvier, M. 2002b. Dimerization: An emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42: 409-435.

Antonov, I., Kandel, E.R., and Hawkins, R.D. 1999. The contribution of facilitation of monosynaptic PSPs to dishabituation and sensitization of the *Aplysia* siphon withdrawal reflex. *J. Neurosci.* 19: 10438-10450.

Antonov, I., Antonova, I., Kandel, E.R., and Hawkins, R.D. 2001. The contribution of activity-dependent synaptic plasticity to classical conditioning in *Aplysia*. *J. Neurosci.* 21: 6413-6422.

———. 2003. Activity-dependent presynaptic facilitation and hebbian LTP are both required and interact during classical conditioning in *Aplysia*. *Neuron* 37: 135-147.

Barbas, D., Zappulla, J.P., Angers, S., Bouvier, M., Castellucci, V.F., and DesGroselliers, L. 2002. Functional characterization of a novel serotonin receptor (5-HT_{2C}) expressed in the CNS of *Aplysia californica*. *J. Neurochem.* 81k: 335-345.

Barbas, D., Castellucci, V.F., and DesGroselliers, L. 2003. Serotonin receptors in *Aplysia* CNS: Role in learning and memory. *Learning & Memory* meeting, abstract #16.

Baxter, D.A. and Byrne, J.H. 1989. Serotonergic modulation of two potassium currents in the pleural sensory neurons of *Aplysia*. *J. Neurophysiol.* 62: 665-679.

———. 1990. Differential effects of cAMP and serotonin on membrane current, action-potential duration, and excitability in somata of pleural sensory neurons of *Aplysia*. *J. Neurophysiol.* 64: 978-990.

Belkin, K. and Abrams, T. 1993. FMRFamide produces biphasic modulation of the LFS motor neurons in the neural circuit of the siphon withdrawal reflex of *Aplysia* by activating Na⁺ and K⁺ currents. *J. Neurosci.* 13: 5139-5152.

Benson, J.A. and Levitan, I.B. 1983. Serotonin increases an anomalously rectifying K⁺ current in the *Aplysia* neuron R15. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 3522-3525.

Bernier, L., Castellucci, V.F., Kandel, E.R., and Schwartz, J.H. 1982. Facilitatory transmitter causes a selective and prolonged increase in adenosine 3':5'-monophosphate in sensory neurons mediating the gill and siphon withdrawal reflex in *Aplysia*. *J. Neurosci.* 2: 1682-1691.

Billy, A. and Walters, E. 1989. Modulation of mechanosensory threshold in *Aplysia* by serotonin, small cardioactive peptide B (SCP_B), FMRFamide, acetylcholine and dopamine. *Neurosci. Lett.* 105: 200-204.

Boess, F.G. and Martin, I.L. 1994. Molecular biology of 5-HT receptors. *Neuropharmacology* 33: 275-317.

Bouvier, M. 2001. Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* 2: 274-286.

Braha, O., Dale, N., Hochner, B., Klein, M., Abrams, T.W., and Kandel, E.R. 1990. Second messengers involved in the two processes of presynaptic facilitation that contribute to sensitization and dishabituation in *Aplysia* sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 2040-2044.

Braha, O., Edmonds, B., Sacktor, T., Kandel, E.R., and Klein, M. 1993. The contributions of protein kinase A and protein kinase C to the actions of 5-HT on the L-type Ca²⁺ current of the sensory neurons in *Aplysia*. *J. Neurosci.* 13: 1839-1851.

Brembs, B., Lorenzetti, F.D., Reyes, F.D., Baxter, D.A., and Byrne, J.H. 2002. Operant reward learning in *Aplysia*: Neuronal correlates and mechanisms. *Science* 296: 1706-1709.

Bristol, A.S., Fischer, T.M., and Carew, T.J. 2001. Combined effects of intrinsic facilitation and modulatory inhibition of identified interneurons in the siphon withdrawal circuitry of *Aplysia*. *J. Neurosci.* 21: 8990-9000.

Bristol, A.S., Marinisco, S., and Carew, T.J. 2003. The neural circuit of tail-elicited siphon withdrawal in *Aplysia*: II. The role of gated inhibition in differential lateralization of sensitization and dishabituation. *J. Neurophysiol.* (in press).

Brunelli, M., Castellucci, V.F., and Kandel, E.R. 1976. Synaptic facilitation and behavioral sensitization in *Aplysia*: Possible role of serotonin and cyclic AMP. *Science* 194: 1178-1181.

Buhot, M.C. 1997. Serotonin receptors in cognitive behaviors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7:243-254.

Buhot, M.C., Patai, S.K., and Nalli, S. 1995. Spatial memory deficits following stimulation of hippocampal 5-HT_{1B} receptors in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 285: 221-228.

Buonomano, D.V., Cleary, L.J., and Byrne, J.H. 1992. Inhibitory neuron

- produces heterosynaptic inhibition of the sensory-to-motor neuron synapse in *Aplysia*. *Brain Res.* 577: 147-150.
- Byrne, J.H. 1983. Identification and initial characterization of a cluster of command and pattern-generating neurons underlying respiratory pumping in *Aplysia californica*. *J. Neurophysiol.* 49: 491-508.
- Byrne, J.H. and Kandel, E.R. 1996. Presynaptic facilitation revisited: State and time dependence. *J. Neurosci.* 16: 425-435.
- Carew, T.J., Castellucci, V.F., and Kandel, E.R. 1971. An analysis of dishabituation and sensitization of the gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. *Int. J. Neurosci.* 2: 79-98.
- Carew, R.D., Hawkins, R.D., and Kandel, E.R. 1983. Differential classical conditioning of a defensive withdrawal reflex in *Aplysia californica*. *Science* 219: 397-400.
- Carew, T.J., Walters, E.T., and Kandel, E.R. 1981. Associative learning in *Aplysia*: Cellular correlates supporting a conditioned fear hypothesis. *Science* 211: 501-504.
- Castellucci, V.F. and Kandel, E.R. 1976. Presynaptic facilitation as a mechanism for behavioral sensitization in *Aplysia*. *Science* 194: 1176-1178.
- Castellucci, V.F., Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Wilson, F.D., Nairn, A.C., and Greengard, P. 1980. Intracellular injection of the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase stimulates facilitation of transmitter release underlying behavioral sensitization in *Aplysia*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77: 7492-7496.
- Castellucci, V.F., Nairn, A.C., Greengard, P., Schwartz, J.H., and Kandel, E.R. 1982. Inhibitor of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase blocks presynaptic facilitation in *Aplysia*. *J. Neurosci.* 2: 1673-1681.
- Castellucci, V.F., Frost, W.N., Goebel, P., Montarolo, P.G., Schacher, S., Moigan, J.A., Blumenfeld, J.H., and Kandel, E.R. 1986. Cell and molecular analysis of long-term sensitization in *Aplysia*. *J. Physiol. (Paris)* 81: 349-357.
- Castellucci, V.F., Blumenfeld, J.H., Goebel, P., and Kandel, E.R. 1989. Inhibitor of protein synthesis blocks long-term behavioral sensitization in the isolated gill-withdrawal reflex of *Aplysia*. *J. Neurobiol.* 20: 1-9.
- Ceda, H. and Schwartz, J.H. 1972. Cyclic adenosine monophosphate in the nervous system of *Aplysia californica*. II. Effect of serotonin and dopamine. *J. Gen. Physiol.* 60: 570-587.
- Chitwood, R.A., Li, Q., and Glanzman, D.L. 2001. Serotonin facilitates AMPA-type responses in isolated siphon motor neurons of *Aplysia* in culture. *J. Physiol.* 534: 501-510.
- Cleary, L.J. and Byrne, J.H. 1993. Identification and characterization of a multifunction neuron contributing to defensive arousal in *Aplysia*. *J. Neurophysiol.* 70: 1767-1776.
- Cleary, L.J., Byrne, J.H., and Frost, W.N. 1995. Role of interneurons in defensive withdrawal reflexes in *Aplysia*. *Learn. Mem.* 2: 133-151.
- Cleary, L.J., Lee, W.L., and Byrne, J.H. 1998. Cellular correlates of long-term sensitization in *Aplysia*. *J. Neurosci.* 18: 5988-5998.
- Cohen, J.E., Onyiah, C.U., McElroy, V.L., Lin, A.H., and Abrams, T.W. 2003. Pharmacological characterization of an adenylyl cyclase-coupled 5-HT receptor in *Aplysia*: Comparison with mammalian 5-HT receptors. *J. Neurophysiol.* 89: 1440-1455.
- Cooper, D.M., Mons, N., and Karpen, J.W. 1995. Adenylyl cyclases and the interaction between calcium and cAMP signalling. *Nature* 374: 421-424.
- Critz, S., Baxter, D., and Byrne, J. 1991. Modulatory effects of serotonin, FMRFamide, and myomodulin on the duration of action potentials, excitability, and membrane currents in tail sensory neurons of *Aplysia*. *J. Neurophysiol.* 66: 1912-1926.
- Daaka, Y., Luttrell, L.M., and Lefkowitz, R.J. 1997. Switching of the coupling of the β_2 -adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* 390: 88-91.
- Dale, L.B., Babwah, A.V., and Ferguson, S.S. 2002. Mechanisms of metabotropic glutamate receptor desensitization: Role in the patterning of effector enzyme activation. *Neurochem. Int.* 41: 319-326.
- Dale, N. and Kandel, E. 1990. Facilitatory and inhibitory transmitters modulate spontaneous transmitter release at cultured *Aplysia* serotonergic synapses. *J. Physiol.* 421: 203-222.
- Drolet, P., Bilodeau, L., Choivatoa, A., Laflamme, L., Gallo-Payet, N., and Payet, M.D. 1997. Inhibition of the T-type Ca^{2+} current by the dopamine D1 receptor in rat adrenal glomerulosa cells: Requirement of the combined action of the G $\beta\gamma$ protein subunit and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. *Mol. Endocrinol.* 11: 503-514.
- Drummond, A.H., Bucher, F., and Levitan, I.B. 1980. Distribution of serotonin and dopamine receptors in *Aplysia* tissues: Analysis by [³H]LSD binding and adenylyl cyclase stimulation. *Brain Res.* 184: 163-177.
- Eason, M.G. and Liggett, S.B. 1995. Identification of a G β coupling domain in the amino terminus of the third intracellular loop of the α_{2A} -adrenergic receptor. Evidence for distinct structural determinants that confer G β versus G β_1 coupling. *J. Biol. Chem.* 270: 24753-24760.
- Eberly, L.B. and Pinsker, H.M. 1984. Neuroethological studies of reflex plasticity in intact *Aplysia*. *Behav. Neurosci.* 98: 609-630.
- Eguchi, S., Numaguchi, K., Iwasaki, H., Matsumoto, T., Yamakawa, T., Urtsunomiya, H., Morley, E.D., Owada, K.M., Hatai, Y., Marumo, F., et al. 1998. Calcium-dependent epidermal growth factor receptor inactivation mediates the angiotensin II-induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 273: 8890-8896.
- Ehrengruber, M.U., Doupmik, C.A., Xu, Y., Garvey, J., Jasek, M.C., Lester, H.A., and Davidson, N. 1997. Activation of heteromeric G protein-gated inward rectifier K $^{+}$ channels overexpressed by adenovirus gene transfer inhibits the excitability of hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 7070-7075.
- Evans, M.L., Kadan, M.J., Hartig, P.R., and Carpenter, D.O. 1991. Correlation of [¹²⁵I]-LSD autoradiographic labeling with serotonin voltage clamp responses in *Aplysia* neurons. *Synapse* 8: 22-29.
- Fischer, T.M. and Carew, T.J. 1993. Activity-dependent potentiation of recurrent inhibition: A mechanism for dynamic gain control in the siphon withdrawal reflex of *Aplysia*. *J. Neurosci.* 13: 1302-1314.
- . 1995. Cutaneous activation of the inhibitory L30 interneurons provides a mechanism for regulating adaptive gain control in the siphon withdrawal reflex of *Aplysia*. *J. Neurosci.* 15: 762-773.
- Fischer, T.M., Blazit, D.E., Priver, N.A., and Carew, T.J. 1997. Metaplasticity at identified inhibitory synapses in *Aplysia*. *Nature* 389: 860-865.
- Fischer, T.M., Yuan, J.W., and Carew, T.J. 2000. Dynamic regulation of the siphon withdrawal reflex of *Aplysia californica* in response to changes in the ambient tactile environment. *Behav. Neurosci.* 114: 1209-1222.
- Fitzgerald, K. and Carew, T.J. 1991. Serotonin mimics tail shock in producing transient inhibition in the siphon withdrawal reflex of *Aplysia*. *J. Neurosci.* 11: 2510-2518.
- Frost, W.N. and Kandel, E.R. 1995. Structure of the network mediating siphon-elicited siphon withdrawal in *Aplysia*. *J. Neurophysiol.* 73: 2413-2427.
- Frost, W.N., Castellucci, V.F., Hawkins, R.D., and Kandel, E.R. 1985. Monosynaptic connections made by the sensory neurons of the gill and siphon withdrawal reflex in *Aplysia* participate in the storage of long-term memory for sensitization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 8266-8269.
- Frost, W.N., Clark, J.A., and Kandel, E.R. 1988. Parallel processing of short-term memory for sensitization in *Aplysia*. *J. Neurobiol.* 19: 297-334.
- Gerhardt, C.C., and van Heenkhuizen, H. 1997. Functional characteristics of heterologously expressed 5-HT receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 334: 1-23.
- Gerschenfeld, H.M. and Paupardin-Tritsch, D. 1974. Ionic mechanisms and receptor properties underlying the responses of molluscan neurons to 5-hydroxytryptamine. *J. Physiol.* 243: 427-456.
- Gerschenfeld, H.M. and Tauc, L. 1961. Pharmacological specificities of neurons in an elementary central nervous system. *Nature* 189: 924-925.
- Ghirardi, M., Braha, O., Hochner, B., Montarolo, P.G., Kandel, E.R., and Dale, N. 1992. Roles of PKA and PKC in facilitation of evoked and spontaneous transmitter release at depressed and nondepressed synapses in *Aplysia* sensory neurons. *Neuron* 9: 479-489.
- Ghirardi, M., Montarolo, P.G., and Kandel, E.R. 1995. A novel intermediate stage in the transition between short- and long-term facilitation in the sensory to motor neuron synapse of *Aplysia*. *Neuron* 14: 413-420.
- Glanzman, D.L., Mackey, S.L., Hawkins, R.D., Dyke, A.M., Lloyd, P.E., and Kandel, E.R. 1989. Depletion of serotonin in the nervous system of *Aplysia* reduces the behavioral enhancement of gill withdrawal as well as the heterosynaptic facilitation produced by tail shock. *J. Neurosci.* 9: 4200-4213.
- Goldsmith, B.A. and Abrams, T.W. 1991. Reversal of synaptic depression by serotonin in *Aplysia* sensory neuron synapses involves activation of adenylyl cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 9021-9025.
- Goldsmith, D.A. and Abrams, T.W. 1992. cAMP modulates multiple K $^{+}$ currents, increasing spike duration and excitability in *Aplysia* sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 11461-11465.
- Gutkind, J.S. 1998. The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades. *J. Biol. Chem.* 273: 1839-1842.
- Hawkins, R.D. 1981a. Interneurons involved in mediation and modulation of gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. II. Identified neurons produce heterosynaptic facilitation contributing to behavioral sensitization. *J. Neurophysiol.* 45: 315-328.
- . 1981b. Interneurons involved in mediation and modulation of gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. III. Identified facilitating neurons increase Ca $^{2+}$ current in sensory neurons. *J. Neurophysiol.* 45: 327-339.

- Hawkins, R.D. and Schacher, S. 1989. Identified facilitator neurons L29 and L25 are excited by cutaneous stimuli used in dishabituation, sensitization, and classical conditioning of *Aplysia*. *J. Neurosci.* 9: 4236-4245.
- Herrlich, A., Daut, H., Knebel, A., Herrlich, P., Ullrich, A., Schulz, G., and Guderermann, T. 1998. Ligand-independent activation of platelet-derived growth factor receptor is a necessary intermediate in tyrosine phosphatase-stimulated mitogenic activity in L cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 8985-8990.
- Hochner, B. and Kandel, E.R. 1992. Modulation of a transient K⁺ current in the pleural sensory neurons of *Aplysia* by serotonin and cAMP: Implications for spike broadening. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 11476-11480.
- Hochner, B., Klein, M., Schacher, S., and Kandel, E.R. 1986. Additional component in the cellular mechanism of presynaptic facilitation contributes to behavioral dishabituation in *Aplysia*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 8794-8798.
- Hover, D., Clarke, D.E., Fozard, J.R., Hartig, P.R., Martin, G.R., Mylechare, E.J., Saxena, P.R., and Humphrey, P.P. 1994. International union of pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). *Pharmacol. Rev.* 46: 157-203.
- Jennings, K.R., Host, J.J., Kaczmarek, L.K., and Strumwasser, F. 1981. Serotonergic inhibition of afterdischarge in peptidergic bag cells. *J. Neurobiol.* 12: 579-590.
- Kadan, M.J. and Hartig, P.R. 1988. Autoradiographic localization and characterization of [¹²⁵I]lysergic acid diethylamide binding to serotonin receptors in *Aplysia*. *Neuroscience* 24: 1089-1102.
- Kandel, E.R. 2001. The molecular biology of memory storage: A dialog between genes and synapses. *BioEssays* 23: 565-611.
- Kanz, J.E., Eberly, L.B., Cobbs, J.S., and Pinsker, H.M. 1979. Neuronal correlates of siphon withdrawal in freely behaving *Aplysia*. *J. Neurophysiol.* 42: 1538-1556.
- Kebabian, P.R., Kebabian, J.W., and Carpenter, D.O. 1979. Regulation of cyclic AMP in heart and gill of *Aplysia* by putative neurotransmitters dopamine and serotonin. *Life Sci.* 24: 1757-1764.
- Kistler Jr., H.B., Hawkins, R.D., Koester, J., Steinbush, H.W., Kandel, E.R., and Schwartz, J.H. 1985. Distribution of serotonin-immunoreactive cell bodies and processes in the abdominal ganglion of mature *Aplysia*. *J. Neurosci.* 5: 72-80.
- Klein, M. 1993. Differential cyclic AMP dependence of facilitation at *Aplysia* sensorimotor synapses as a function of prior stimulation: Augmentation versus restoration of transmitter release. *J. Neurosci.* 13: 3793-3801.
- . 1994. Synaptic augmentation by 5-HT at rested *Aplysia* sensorimotor synapses: Independence of action potential prolongation. *Neuron* 13: 159-166.
- Klein, M. and Kandel, E.R. 1980. Mechanism of calcium current modulation underlying presynaptic facilitation and behavioral sensitization in *Aplysia*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77: 6912-6916.
- Klein, M., Camardo, J., and Kandel, E.R. 1982. Serotonin modulates a specific potassium current in the sensory neurons that show presynaptic facilitation in *Aplysia*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 5713-5717.
- Koester, J., Mayer, E., Liebeswar, G., and Kandel, E.R. 1973. Cellular regulation of homeostasis: Neuronal control of the circulation in *Aplysia*. *Fed. Proc.* 32: 2179-2187.
- Kruger, K.E., Sossin, W.S., Sakur, T.C., Bergold, P.J., Beushausen, S., and Schwartz, J.H. 1991. Cloning and characterization of Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent PKCs expressed in *Aplysia* sensory cells. *J. Neurosci.* 11: 2303-2313.
- Lechner, H.A., Baxter, D.A., and Byrne, J.H. 2000a. Classical conditioning of feeding in *Aplysia*: I. Behavioral analysis. *J. Neurosci.* 20: 3369-3376.
- . 2000b. Classical conditioning of feeding in *Aplysia*: II. Neurophysiological correlates. *J. Neurosci.* 20: 3377-3386.
- Lee, S.P., Xie, Z., Vaighese, G., Nguyen, T., O'Dowd, B.F., and George, S.R. 2000. Oligomerization of dopamine and serotonin receptors. *Neuropharmacology* 23: 532-540.
- Lembo, P.M., Ghahremani, M.H., Morris, S.J., and Albert, P.R. 1997. A conserved threonine residue in the second intracellular loop of the 5-hydroxytryptamine 1A receptor directs signaling specificity. *Mol. Pharmacol.* 52: 164-171.
- Levenson, J., Byrne, J.H., and Eskin, A. 1999. Levels of serotonin in the hemolymph of *Aplysia* are modulated by light/dark cycles and sensitization training. *J. Neurosci.* 19: 8094-8103.
- Li, X.-C., Gies, J.F., Kuhl, D., Hen, R., and Kandel, E.R. 1995. Cloning and characterization of two related serotonergic receptors from the brain and the reproductive system of *Aplysia* that activate phospholipase C. *J. Neurosci.* 15: 7585-7591.
- Linsman, D.A., Benjamin, C.W., and Jones, D.A. 1995. Convergence of angiotensin II and platelet-derived growth factor receptor signaling cascades in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 270: 12563-12568.
- Lowes, V.L., Ip, N.Y., and Wong, Y.H. 2002. Integration of signals from receptor tyrosine kinases and G protein-coupled receptors. *Neurosignals* 11: 5-19.
- Luttrell, L.M. 2002. Activation and targeting of mitogen-activated protein kinases by G-protein-coupled receptors. *Curr. J. Physiol. Pharmacol.* 80: 375-382.
- Luttrell, L.M., Della Rocca, G.J., van Biesen, T., Luttrell, D.K., and Lefkowitz, R.J. 1997. Gβγ subunits mediate Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* 272: 4637-4644.
- Mackey, S., Glanzman, D., Small, S., Dyke, A., Kandel, E., and Hawkins, R. 1987. Tail-shock produces inhibition as well as sensitization of the siphon-withdrawal reflex of *Aplysia*: Possible behavioral role for presynaptic inhibition mediated by the peptide Phe-Met-Arg-Phe-NH₂. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 8730-8734.
- Mackey, S.L., Kandel, E.R., and Hawkins, R.D. 1989. Identified serotonergic neurons LCB1 and RCB1 in the cerebral ganglia of *Aplysia* produce presynaptic facilitation of siphon sensory neurons. *J. Neurosci.* 9: 4227-4335.
- Manseau, F., Fan, X., Hueflein, T., Sossin, W., and Castellucci, V.F. 2001. Ca²⁺-independent protein kinase C Apl II mediates the serotonin-induced facilitation at depressed *Aplysia* sensorimotor synapses. *J. Neurosci.* 21: 1247-1256.
- Martinesco, S. and Carew, T.J. 2002. Serotonin release evoked by tail nerve stimulation in the CNS of *Aplysia*: Characterization and relationship to heterosynaptic plasticity. *J. Neurosci.* 22: 2299-2312.
- Mark, M.D. and Heititz, S. 2000. G-protein mediated gating of inward-rectifier K⁺ channels. *Em. J. Biochem.* 267: 5830-5836.
- Martin, K.C., Michael, D., Rose, J.C., Barad, M., Casadio, A., Zhu, H., and Kandel, E.R. 1997. MAP kinase translocates into the nucleus of the presynaptic cell and is required for long-term facilitation in *Aplysia*. *Neuron* 18: 899-912.
- Mauelshagen, J., Parker, G.R., and Carew, T.J. 1996. Dynamics of induction and expression of long-term synaptic facilitation in *Aplysia*. *J. Neurosci.* 16: 7099-7108.
- Mencel, A.R., Emptage, N.J., and Carew, T.J. 1991. Pharmacological dissociation of modulatory effects of serotonin in *Aplysia* sensory neurons. *Science* 254: 1811-1813.
- Michael, D., Martin, K.C., Seger, R., Ning, M.M., Baxton, R., and Kandel, E.R. 1998. Repeated pulses of serotonin required for long-term facilitation activate mitogen-activated protein kinase in sensory neurons of *Aplysia*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 1864-1869.
- Montarolo, P.G., Goeter, P., Castellucci, V.F., Morgan, J., Kandel, E.R., and Schacher, S. 1986. A critical period for macromolecular synthesis in long-term heterosynaptic facilitation in *Aplysia*. *Science* 234: 1249-1254.
- Müller, U. and Carew, T.J. 1998. Serotonin induces temporally and mechanistically distinct phases of persistent PKA activity in *Aplysia* sensory neurons. *Neuron* 21: 1423-1434.
- Murphy, G.G. and Glanzman, D.L. 1996. Enhancement of sensorimotor connections by conditioning-related stimulation in *Aplysia* depends upon postsynaptic Ca²⁺. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 9931-9936.
- . 1997. Mediation of classical conditioning in *Aplysia californica* by long-term potentiation of sensorimotor synapses. *Science* 278: 467-471.
- Newlin, S.A., Schlapfer, W.T., and Barondes, S.H. 1980. Separate serotonin and dopamine receptors modulate the duration of posttetanic potentiation at an *Aplysia* synapse without affecting other aspects of synaptic transmission. *Brain Res.* 181: 89-106.
- O'Connor, K.A. and Byrne, J.H. 1985. Membrane responses and changes in cAMP levels in *Aplysia* sensory neurons produced by serotonin, tryptamine, FMRFamide and small cardioactive peptide (SCAP). *Neurosci. Lett.* 55: 113-118.
- O'Connor, K.A., Tabata, M., and Byrne, J.H. 1986. Stimuli that produce sensitization lead to elevation of cyclic AMP levels in tail sensory neurons of *Aplysia*. *Brain Res.* 371: 190-192.
- Pellmar, T.C. and Carpenter, D.O. 1980. Serotonin induces a voltage-sensitive calcium current in neurons of *Aplysia californica*. *J. Neurophysiol.* 44: 423-439.
- Peroutka, S.J. 1994. 5-Hydroxytryptamine receptors in vertebrates and invertebrates: Why is there so many? *Neurochem. Int.* 25: 533-536.
- . 1995. 5-HT receptors: Past, present, and future. *Trends Neurosci.* 18: 68-69.
- Peroutka, S.J. and Howell, T.A. 1994. The molecular evolution of G protein-coupled receptors: Focus on 5-hydroxytryptamine receptors. *Neuropharmacology* 33: 319-324.
- Pieroni, J. and Byrne, J. 1992. Differential effects of serotonin, FMRFamide and small cardioactive peptide on multiple, distributed processes modulating sensorimotor synaptic transmission in *Aplysia*. *J. Neurosci.* 12: 2633-2647.
- Pieroni, J.P., Jacobowitz, O., Chen, J., and Ivengat, R. 1993. Signal recognition and integration by Gs-stimulated adenylyl cyclases. *Curr. Opin. Neurobiol.* 3: 345-351.

- Pinsker, H.M., Kupfermann, I., Castellucci, V.F., and Kandel, E.R. 1970. Habituation and dishabituation of the gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. *Science* 167: 1740-1742.
- Pinsker, H.M., Hening, W.A., Carew, T.J., and Kandel, E.R. 1973. Long-term sensitization of a defensive withdrawal reflex in *Aplysia*. *Science* 182: 1039-1042.
- Pollock, J.D., Bernier, L., and Camardo, J.S. 1985. Serotonin and cyclic adenosine 3':5'-monophosphate modulate the potassium current in tail sensory neurons in the pleural ganglion of *Aplysia*. *J. Neurosci.* 5: 1862-1871.
- Puente, L.G., Stone, J.C., and Ostergaard, H.L. 2006. Evidence for protein kinase C-dependent and -independent activation of mitogen-activated protein kinase in T cells. Potential role of additional diacylglycerol binding proteins. *J. Immunol.* 176: 6865-6871.
- Purcell, A.L., Sharma, S.K., Bagnall, M.W., Sutton, M.A., and Carew, T.J. 2003. Activation of a tyrosine kinase-MAPK cascade enhances the induction of long-term synaptic facilitation and long-term memory in *Aplysia*. *Neuron* 37: 473-484.
- Ram, J.L., Judge, K., and Jednak, M.A. 1994. Antagonists of cholinergic and serotonergic responses of *Aplysia* buccal muscle. *Comp. Biochem. Physiol. Pharmacol. Toxicol. Environ. Biol.* 107: 235-242.
- Sacktor, T.C. and Schwartz, J.H. 1990. Sensitizing stimuli cause translocation of protein kinase C in *Aplysia* sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 2036-2039.
- Saroh, T. and Shih, J.C. 1987. Photoaffinity labeling of adenylate cyclase-linked serotonin receptors in *Aplysia* neurons. *J. Neurochem.* 49: 1361-1366.
- Schacher, S., Montarolo, P., and Kandel, E.R. 1990. Selective short- and long-term effects of serotonin, small cardioactive peptide, and tetanic stimulation on sensorimotor synapses of *Aplysia* in culture. *J. Neurosci.* 10: 3286-3294.
- Schacher, S., Wu, F., Sun, Z.Y., and Wang, D. 2000. Cell-specific changes in expression of mRNAs encoding splice variants of *Aplysia* cell adhesion molecule accompany long-term synaptic plasticity. *J. Neurobiol.* 45: 152-161.
- Sharma, S.K., Sherff, C.M., Shobe, J., Bagnall, M.W., Sutton, M.A., and Carew, T.J. 2003. Differential role of mitogen-activated protein kinase in three distinct phases of memory for sensitization in *Aplysia*. *J. Neurosci.* 23: 3899-3907.
- Sholz, K.P. and Byrne, J.H. 1987. Long-term sensitization in *Aplysia*: Biophysical correlates in tail sensory neurons. *Science* 235: 685-687.
- Shuster, M.J., Camardo, J.S., and Siegelbaum, S.A. 1991. Comparison of the serotonin-sensitive and Ca²⁺-activated K⁺ channels in *Aplysia* sensory neurons. *J. Physiol.* 440: 601-621.
- Siegelbaum, S.A., Camardo, J.S., and Kandel, E.R. 1982. Serotonin and cyclic AMP close single K⁺ channels in *Aplysia* sensory neurons. *Nature* 30: 413-417.
- Simen, A.A., Lee, C.C., Simen, B.B., Bindokas, V.P., and Miller, R.J. 2001. The C terminus of the Ca channel β_2 subunit mediates selective inhibition by G-protein-coupled receptors. *J. Neurosci.* 21: 7587-7597.
- Sossin, W.S. and Schwartz, J.H. 1992. Selective activation of Ca²⁺-activated PKCs in *Aplysia* neurons by 5-HT. *J. Neurosci.* 12: 1160-1168.
- Sossin, W.S., Diaz-Arastia, R., and Schwartz, J.H. 1993. Characterization of two isoforms of protein kinase C in the nervous system of *Aplysia californica*. *J. Biol. Chem.* 268: 5763-5768.
- Sossin, W.S., Sacktor, T.C., and Schwartz, J.H. 1994. Persistent activation of protein kinase C during the development of long-term facilitation in *Aplysia*. *Learn. Mem.* 1: 189-202.
- Stork, P.J. and Schmitt, J.M. 2002. Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. *Trends Cell Biol.* 12: 258-266.
- Storozhuk, M. and Castellucci, V.F. 1999a. Modulation of cholinergic transmission in the neuronal network of the gill and siphon withdrawal reflex in *Aplysia*. *Neuroscience* 90: 291-301.
- . 1999b. The synaptic junctions of LF and RF cluster sensory neurons of *Aplysia californica* are differentially modulated by serotonin. *J. Exp. Biol.* 202: 115-120.
- Sugamori, K.S., Sunahara, R.K., Guan, H.C., Bulloch, A.G., Tensen, C.P., Seeman, P., Niznik, H.B., and Van Tol, H.H. 1993. Serotonin receptor cDNA cloned from *Lymnaea stagnalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 11-15.
- Sugra, S., Goksmith, J.R., Baxter, D.A., and Byrne, J.H. 1992. Involvement of protein kinase C in serotonin-induced spike broadening and synaptic facilitation in sensorimotor connections of *Aplysia*. *J. Neurophysiol.* 68: 643-651.
- Sugita, S., Baxter, D.A., and Byrne, J.H. 1994. Activators of protein kinase C mimics serotonin-induced modulation of a voltage-dependent potassium current in pleural sensory neurons of *Aplysia*. *J. Neurophysiol.* 72: 1240-1249.
- . 1997. Modulation of a cAMP/protein kinase A cascade by protein kinase C in sensory neurons of *Aplysia*. *J. Neurosci.* 17: 7237-7244.
- Sun, Z., Kauderer, B., and Schacher, S. 1996. Differential distribution of functional receptors for neuromodulators evoking short-term heterosynaptic plasticity in *Aplysia californica* sensory neurons. *J. Neurosci.* 16: 7540-7549.
- Sutton, M.A. and Carew, T.J. 2000. Parallel molecular pathways mediate expression of distinct forms of intermediate-term facilitation at tail sensory-motor synapses in *Aplysia*. *Neuron* 26: 219-231.
- Sutton, M.A., Masters, S.E., Bagnall, M.W., and Carew, T.J. 2001. Molecular mechanisms underlying a unique intermediate phase of memory in *Aplysia*. *Neuron* 31: 143-154.
- Sutton, M.A., Ide, J., Masters, S.E., and Carew, T.J. 2002. Interaction between amount and pattern of training in the induction of intermediate- and long-term memory for sensitization in *Aplysia*. *Learn. Mem.* 9: 29-40.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Tierney, A.J. 2001. Structure and function of invertebrate 5-HT receptors: A review. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 128: 791-804.
- Trudeau, L.E. and Castellucci, V.F. 1992. Contribution of polysynaptic pathways in the mediation and plasticity of *Aplysia* gill and siphon withdrawal reflex: Evidence for differential modulation. *J. Neurosci.* 12: 3838-3848.
- . 1993. Sensitization of the gill and siphon withdrawal reflex of *Aplysia*: Multiple sites of change in the neuronal network. *J. Neurophysiol.* 70: 1210-1220.
- Vernier, P., Cardinaud, B., Valdenaire, O., Philippe, H., and Vincent, J.D. 1995. An evolutionary view of drug-receptor interaction: The bicomine receptor family. *Trends Pharmacol. Sci.* 16: 375-381.
- Vilim, F.S., Alexeeva, V., Moroz, L.L., Li, L., Moroz, T.P., Sweedler, J.V., and Weiss, K.R. 2001. Cloning, expression and processing of the CP2 neuropeptide precursor of *Aplysia*. *Peptides* 22: 2027-2038.
- Walters, E.T. and Byrne, J.H. 1984. Posttetanic potentiation in *Aplysia* sensory neurons. *Brain Res.* 293: 377-380.
- Walters, E.T., Carew, T.J., and Kandel, E.R. 1981. Associative learning in *Aplysia*: Evidence for conditioned fear in an invertebrate. *Science* 211: 504-506.
- White, J.A., Ziv, I., Cleary, L.J., Baxter, D.A., and Byrne, J.H. 1993. The role of interneurons in controlling the tail-withdrawal reflex in *Aplysia*: A network model. *J. Neurophysiol.* 70: 1777-1786.
- Wright, W.G., Jones, K., Sharp, P., and Maynard, B. 1995. Widespread anatomical projections of the serotonergic modulatory neuron, CB1, in *Aplysia*. *Invert. Neurosci.* 1: 173-183.
- Xiao, R.P., Ji, X., and Lakatta, E.G. 1995. Functional coupling of the β_2 -adrenoceptor to a pertussis toxin-sensitive G protein in cardiac myocytes. *Mol. Pharmacol.* 47: 322-329.
- Xie, Z., Lee, S.P., O'Dowd, B.F., and George, S.R. 1999. Serotonin 5-HT_{1B} and 5-HT_{1D} receptors form homodimers when expressed alone and heterodimers when coexpressed. *FEBS Lett.* 456: 63-67.
- Xin, Y., Koester, J., Jing, J., Weiss, K.R., and Kupfermann, I. 2001. Cerebral-abdominal interganglionic coordinating neurons in *Aplysia*. *J. Neurophysiol.* 85: 174-186.
- Xu, Y., Cleary, L.J., Byrne, J.H. 1994. Identification and characterization of pleural neurons that inhibit tail sensory neurons and motor neurons in *Aplysia*: Correlation with FMRFamide immunoreactivity. *J. Neurosci.* 14: 3565-3577.
- Xu, Y., Pieroni, J.P., Cleary, L.J., and Byrne, J.H. 1995. Modulation of an inhibitory interneuron in the neural circuitry for the tail withdrawal reflex of *Aplysia*. *J. Neurophysiol.* 73: 1313-1318.
- Zamah, A.M., DeLahunty, M., Luttrell, L.M., and Lefkowitz, R.J. 2002. Protein kinase A-mediated phosphorylation of the β_2 -adrenergic receptor regulates its coupling to Gs and Gi. Demonstration in a reconstituted system. *J. Biol. Chem.* 277: 31249-31256.
- Zamponi, G.W. 2001. Determinants of G protein inhibition of presynaptic calcium channels. *Cell Biochem. Biophys.* 34: 79-94.
- Zhang, F., Endo, S., Cleary, L.J., Eskin, A., and Byrne, J.H. 1997. Role of transforming growth factor- β in long-term synaptic facilitation in *Aplysia*. *Science* 275: 1318-1320.
- Zhang, L., Yu, Y., Mackin, S., Weight, F.F., Uhl, G.R., and Wang, J.B. 1996. Differential μ opiate receptor phosphorylation and desensitization induced by agonists and phorbol esters. *J. Biol. Chem.* 271: 11449-11454.



Comparative Biochemistry and Physiology, Part B 140 (2005) 403–409

www.elsevier.com/locate/cbpb

A novel actin isoform is expressed in the ovotestis of *Aplysia californica*Jacques P. Zappulla^{a,1,2}, Annie Angers^{b,2,3}, Demian Barbas^a,
Vincent F. Castellucci^{b,c}, Luc DesGroseillers^{a,b,*}^aDépartement de Biochimie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7^bCentre de Recherches en Sciences Neurologiques, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7^cDépartement de Physiologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

Received 17 September 2004; received in revised form 2 November 2004; accepted 7 November 2004

Abstract

The actin family encodes a large number of protein isoforms with quasi-identical primary structure but distinct function and localization. In oocytes, actin is known to play important roles in different processes such as those leading to fertilization or to mRNA localization during oogenesis. In this paper, we report the characterization of a novel actin isoform (apACTov) in *Aplysia californica* that is specifically expressed in ovotestis. The apACTov cDNA codes for a putative protein of 376 amino acids that shows 96% and 94% sequence identity with two other actin isoforms previously characterized in *Aplysia*. In situ hybridization experiments showed that the apACTov transcript is not uniformly distributed but is found in crescent or filipodia-like structures at the surface of the oocyte. Our results suggest that apACTov may contribute to the differential distribution of critical material during egg division and/or cell differentiation.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Actin; *Aplysia*; Oocyte; mRNA localization; In situ hybridization; Molecular cloning; Filipodia; Gene expression; Invertebrate

1. Introduction

Actin is a ubiquitous eukaryotic protein that plays important roles in diverse physiological processes such as muscle contraction, cytoplasmic streaming, phagocytosis, morphogenetic movements, amoeboid motion, cytokinesis and mitosis (Pollard and Cooper, 1986; Rubenstein, 1990; Valentijn et al., 1999; Goode et al., 2000). In many organisms, several actin isoforms, or isoactins, are expressed (Garrels and Gibson, 1976; McKeown et al.,

1978; Vandekerckhove and Weber, 1978; Herman, 1993). They are encoded by different genes that probably evolved from a common ancestor and are expressed in a tissue specific manner, suggesting that this gene multiplicity has a functional significance for the organism (Rubenstein, 1990). Actin isoform-specific transcripts display high sequence similarity within their coding region, but highly divergent 5'- and 3'-untranslated regions. This latter domain contains cis-acting sequences responsible for the differential localization of the transcript within the cell (Hill and Gunning, 1993; Kislauskis et al., 1993; Bassell et al., 1999).

Actin isoforms present a highly conserved peptidic structure that reflects the constraints imposed by the large number of interactions between actin and other cell components (Rubenstein, 1990). They nevertheless can be grouped into two classes according to the sequence of their N-terminal part (Hightower and Meagher, 1986; Herman, 1993). Actins of class I, which are non-muscle isoforms, have a Met-X-terminus sequence where X is an acidic residue. Actins of class II, or muscle actins, usually have a

* Corresponding author. Département de biochimie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale "Centre-Ville", Montréal, Québec, Canada H3C 3J7. Tel.: +1 514 343 5802; fax: +1 514 343 2210.

¹ Present address: INSERM U563, Purpan University Hospital, Dr Baylac, Toulouse 31000, France.

² The first two authors contributed equally to this work.

³ Present address: Département de Sciences biologiques, Université de Montréal, Montréal, Canada, H3C 3J7.

Met-Cys-X sequence where X is any amino acid. Cys is sometimes replaced by Gly or Ala (Pollard and Cooper, 1986; Sheterline and Sparrow, 1994).

During oogenesis, a functional actin network is required for proper localization and sequestering of specific materials crucial for further development. For example, this network is essential for the differential transport and localization of specific transcripts at the poles and the temporal and spatial control of their translation (Mowry and Cote, 1999). The actin network is highly concentrated in the cortex of oocytes (Wong et al., 1997), a postulated site for storage of morphogenetic substances (Wilson, 1904). Then, actin is involved in the various morphological changes that occur after fertilization. In particular, bundles and meshwork of actin filaments are present in the fertilization cone, the microvilli and in the cortical layer, suggesting an important role for this protein in the sperm reception mechanism of the egg and in proper distribution of materials in dividing blastomeres (Hamaguchi and Mabuchi, 1988).

In this paper we report the cloning of an *Aplysia* actin cDNA specifically expressed in the ovotestis. The sequence of the putative protein is highly similar to those of two other previously characterized *Aplysia* isoactins (DesGroseillers et al., 1990, 1994). Interestingly, using *in situ* hybridization, we localized its transcript in immature oocytes. Our results show that an isoactin is specifically expressed in the *Aplysia* oocytes, suggesting an important role for this molecule in the developmental processes that occur in the eggs of this mollusk.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Aplysia californica (200–250 g) were purchased from Marine Specimen Unlimited (Pacific Palisades, CA, USA) or from the *Aplysia* Resource Facility (Miami, FL, USA). They were maintained in a large, aerated recirculating seawater tank at 15 °C and fed every other day ad libitum.

2.2. Molecular cloning of *apACT_{ov}* cDNA

Filter triplicates of a λ gt10 ovotestis cDNA library were hybridized at high stringency with either one of the following probes: (1) the *Bcl*II/*Sph*I fragment of the sheath actin cDNA (position 310–999; GenBank accession no. X52868), situated in the actin coding region (DesGroseillers et al., 1990); (2) the *Xho*I/*Eco*RI 3'UTR fragment of the sheath actin cDNA (position 1269–2330; GenBank accession no. X52868) (DesGroseillers et al., 1990); and (3) the *Bcl*I/*Eco*RI fragment 3'UTR fragment of the neuronal actin cDNA (position 1230–1596; GenBank accession no. U01352) (DesGroseillers et al., 1994), as described previously (Wickham and DesGroseillers, 1991). Clones positive for probe #1, but not for probes #2 and #3 were isolated. PCR amplified, subcloned in pBluescript (Stratagene, La Jolla, CA, USA) and sequenced according to the T7 sequencing kit protocol (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC, Canada).

2.3. Northern blot analysis

Total RNA was extracted by the guanidine-isothiocyanate procedure (DesGroseillers et al., 1987), and poly(A)⁺ RNA isolated on oligo(dI)-cellulose (type 7 columns (Amersham Biosciences). Ten micrograms of poly(A)⁺ RNA were separated by electrophoresis on a 1% agarose-formaldehyde gel, and blotted onto Hybond-N⁺ filters (Amersham Biosciences). Hybridizations were performed at 68 °C for 16 h in 5 \times SSC, 5 \times Denhardt solution, 0.3% SDS, and 100 μ g/mL denatured salmon sperm DNA. Following hybridization, filter blots were washed in 0.1 \times SSC, 0.1% SDS at 68 °C and exposed to Kodak X-ray film (Amersham Biosciences) at –80 °C for either 16 h or a week.

2.4. cRNA probes and *in situ* hybridization

apACT_{ov} cDNA was digested at the *Hind*III–*Eco*RI restriction sites (nucleotides 1392 and 1570 in the 3'UTR)

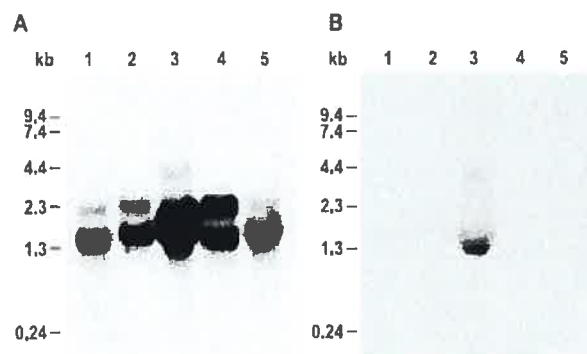


Fig. 1. Expression of actin isoforms in *Aplysia* tissues. Northern blot analysis of RNAs isolated from *Aplysia* tissues using cDNA sequences corresponding to the *apACT_{ov}* coding region (A) or *apACT_{ov}* 3'-UTR (B) as probes. Lane 1, gill; lane 2, heart; lane 3, ovotestis; lane 4, kidney; lane 5, CNS.

5' CGGAAGAGGGCTGGTGTGTTTCGATTCTACCGTAAGAGTAAGGAGATATAGATTTTATAATCTAGATCTAAATAGTA 75
Met Ala Asp Glu Asp Val 6
GTTATATTACTTCAGTAACACTTGTGTTGGGTGTGACAAATTCATACAACTTATG ATG GCC GAT GAG GAT GTT 148
Ala Ala Leu Val Val Asp Asn Gly Ser Gly Met Cys Lys Ala Gly Phe Ala Gly Asp Asp 26
GCT GCT CTT GTT GTG GAC AAT GGA TCT GGC ATG TGC AAA GCT GGA TTT GCA GGG GAC GAT 208
Ala Pro Arg Ala Val Phe Pro Ser Ile Val Gly Arg Pro Arg His Gln Gly Val Met Val 46
GCT CCA CGT GCT GTA TTT CCG TCC ATT GTT GGA CGA CCT CGT CAT CAG GGT GTG ATG GTT 268
Gly Met Gly Gln Lys Asp Ser Tyr Val Gly Asp Glu Ala Gln Ser Lys Arg Gly Ile Leu 66
GGT ATG GGC CAG AAG GAC AGC TAT GTC GGA GAC GAG GCT CAG TCC AAG AGA GGT ATC CTC 328
Thr Leu Lys Tyr Pro Ile Glu His Gly Ile Val Thr Asn Trp Asp Asp Met Glu Lys Ile 86
ACT CTC AAG TAC CCC ATT GAG CAC GGT ATT GTC ACC AAC TGG GAT GAC ATG GAG AAG ATC 388
Trp His His Thr Phe Tyr Asn Glu Leu Arg Val Ala Pro Glu Glu His Pro Val Leu Leu 106
TGG CAC CAC ACC TTC TAC AAT GAG CTG CGT GTT GCC CCT GAA GAG CAC CCT GTC CTT CTT 448
Thr Glu Ala Pro Leu Asn Pro Lys Ala Asn Arg Glu Lys Met Thr Gln Ile Met Phe Glu 126
ACA GAG GCT CCC CTC AAC CCC AAA GCC AAC AGA GAG AAG ATG ACA CAG ATT ATG TTC GAA 508
Thr Phe Asn Ser Pro Ala Met Tyr Val Ala Ile Gln Ala Val Leu Ser Leu Tyr Ala Ser 146
ACT TTC AAC TCA CCA GCC ATG TAC GTG GCT ATT CAG GCT GTC CTG TCC CTG TAC GCC TCT 568
Gly Arg Thr Thr Gly Ile Val Leu Asp Ser Gly Asp Gly Val Thr His Thr Val Pro Ile 166
GGT CGT ACT ACT GST ATT GTS ITG GAC TCT GGT GAT GGT GTC ACC CAC ACT GTC CCC ATC 628
Tyr Glu Gly Tyr Ala Leu Pro His Ala Ile Met Arg Leu Asp Leu Ala Gly Arg Asp Leu 186
TAC GAG GGT TAT GCC CTT CCC CAT GCC ATC ATG AGA CTG GAC CTC GCT GGC CGT GAT CTC 688
Thr Asp Tyr Leu Met Lys Ile Leu Thr Glu Arg Gly Tyr Ser Phe Thr Thr Thr Ala Glu 206
ACC GAC TAC CTC ATG AAG ATA CTG ACT GAG AGG GGC TAC AGC TTC ACA ACA ACT GCT GAG 748
Arg Glu Ile Val Arg Asp Ile Lys Glu Lys Leu Cys Tyr Val Ala Leu Asp Phe Glu Gln 226
AGA GAA ATT GTG CAG GAC ATC AAG GAG AAG CTG TGC TAC GTC GCC CTT GAC TTC GAA CAA 808
Glu Met Gly Thr Ala Ala Ser Ser Ser Thr Leu Glu Lys Ser Tyr Glu Leu Pro Asp Gly 246
GAA ATG GGT ACT GCT GCT TCG TCT TCA ACT CTA GAA AAG AGT TAT GAA TTA CCT GAT GGA 868
Gln Val Ile Thr Ile Gly Asn Glu Arg Phe Arg Thr Ser Glu Ala Met Phe Gln Pro Ser 266
CAG GTA ATT ACC ATT GGC AAT GAG ASG TTT CGT ACG TCC GAG GCT ATG TTT CAA CCA TCC 928
Phe Leu Gly Met Glu Ser Ala Gly Val His Glu Thr Thr Tyr Asn Ser Ile Met Lys Cys 286
TTC CTA GGT ATG GAA TCT GCA GGT GTC CAC GAG ACC ACG TAC AAC TCC ATC ATG AAG TGC 988
Asp Val Asp Ile Arg Lys Asp Leu Tyr Ala Asn Thr Val Leu Ser Gly Gly Ser Thr Met 306
GAC GTG GAC ATC CGT AAG GAC CTC TAC GCC AAC ACT GTC CTC TCA GGA GGA TCC ACC ATG 1048
Tyr Pro Gly Ile Ala Asp Arg Met Gln Lys Glu Ile Thr Arg Leu Ala Pro Ser Thr Met 326
TAT CCT GGC ATT GCT GAC CGA ATG CAA AAA GAG ATC ACA CGT CTC GCT CCA AGC ACA ATG 1108
Lys Ile Lys Ile Ile Ala Pro Pro Glu Arg Lys Tyr Ser Val Trp Ile Gly Gly Ser Ile 346
AAA ATC AAA ATC ATA GCA CCA CCG GAG CGG AAG TAT TCT GTC TGG ATT GGA GGT TCT ATC 1168
Leu Ala Ser Leu Ser Thr Phe Gln Gln Met Trp Ile Ser Lys Gln Glu Tyr Asp Glu Ser 366
TTG GCG TCT TTG TCC ACT TTT CAG CAG ATG TGG ATC TCG AAA CAA GAG TAC GAT GAG TCG 1228
Gly Pro Ala Ile Val His Arg Lys Cys Phe *** 376
GGC CCG GCC ATT GTG CAC AGG AAA TGT TTT TAA CTGTAACAGTACTCAGTCTGTTCCTGTTTTCGCAC 1296
TTGCAATAGATAAACCAATAACAGTATTTCCTTATTCCTGCATGTAATGACTTTTGTGCACIGTTGTTTAGTTCCTTACT 1375
TTATGTGATCTTTCAGAAAGCTTTCGTTTCAAGTTCACCAACAATGTTTGTATCATTATAGTGATAATGTGCAGGC 1454
TTTTGGCTTTTCCATGTCGGTTTGTATCATCTTCCATTTCAGTTCAGGGGTTTCTCTTATGCCCATTTTCTGTGTA 1533
TAATTTTAAAAAATTAATTTTGTGTTTGTGTC 3' 1570

Fig. 2. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the *Aplysia* apACT_{ov} cDNA. Amino acids are numbered starting at the first ATG of the open reading frame. GenBank accession no. AY703989.

and the resulting fragment was subcloned in PGEM-7Z vector (Promega, Madison, WI, USA). cRNA probes were obtained by in vitro transcription using T7 (anti-sense probe) and Sp6 (sense probe) RNA polymerases (Pharmacia Biotech., Baie d'Urlié, QC, Canada) in the presence of digoxigenin-UTP (Boehringer Mannheim, Laval, QC, Canada), according to the manufacturer's instructions. The size and amounts of labelled RNAs were evaluated by Northern blotting after separation on a formaldehyde-agarose gel. Probes were aliquoted and stored at -80°C until use. In situ hybridization was performed on paraffin tissue sections, as described previously (Zappulla et al., 1999).

3. Results

3.1. Molecular cloning of a novel actin cDNA (*apACT_{ov}*) specifically expressed in *Aplysia* ovotestis

Northern blot experiments using an actin open reading frame sequence as a probe were done to study the differential distribution of actin isoforms among *Aplysia* tissues. Transcripts of 1.6 and 2.3 kb, likely coding for the actin neuronal and sheath isoforms, respectively

(DesGroscliers et al., 1990, 1994), were widely observed among tissues although their level of expression varied (Fig. 1A). In all the tissues analyzed, the neuronal isoactin appeared the most abundantly expressed isoform. This isoform is particularly abundant in the ovotestis, whereas the sheath isoactin is barely detectable in this tissue. Interestingly, an additional band of 3 kb was specifically observed in RNA isolated from ovotestis (Fig. 1A). In order to characterize this transcript, we screened replicates of a λ gt10 *Aplysia* ovotestis cDNA library with probes derived from either the actin coding region or from the 3'-untranslated region (3'-UTR) of the two cloned actin cDNAs. We hypothesized that clones that hybridize with the probe in the common coding region, but not with those in the 3'UTRs are likely to code for a new actin isoform. By adopting this strategy, we were able to clone a full length cDNA coding for a novel actin isoform that we named *apACT_{ov}* (Fig. 2). The cDNA is 1570 nucleotides long and the initiator ATG found at position 131 is followed by an open reading frame of 1128 nucleotides. A potential polyadenylation signal site is found at position 1547. While the coding region of *apACT_{ov}* is similar to those of the other actin isoforms, no sequence similarity is observed in the 5'- and the 3'-UTRs, of respectively 131 and 309 bp.

A

Sheath	MCD E MAALVYVQNGS E PKRAGPAGDPAFRAYFESIVGRPHHQVVMQSQKESVYVDEA Q SKR F IIILK Y Y F EGIVIN D
CNS	MCD D VAAALVYVQNGS E PKRAGPAGDPAFRAYFESIVGRPHHQVVMQSQKESVYVDEA Q SKR F IIILK Y Y F EGIVIN D
Ovot	M D E DVAALVYVQNGS E PKRAGPAGDPAFRAYFESIVGRPHHQVVMQSQKESVYVDEA Q SKR F IIILK Y Y F EGIVIN D
Sheath	DYK E K W HHTFYNELRV E PEEHPVLLTEAPLNPKAKREKNTQ I ME T F A YMYVAIQAVLELYAS G PT I IVLDSG D SV T H
CNS	DYK E K W HHTFYNELRV E PEEHPVLLTEAPLNPKAKREKNTQ I ME T F A YMYVAIQAVLELYAS G PT I IVLDSG D SV T H
Ovot	DYK E K W HHTFYNELRV E PEEHPVLLTEAPLNPKAKREKNTQ I ME T F A YMYVAIQAVLELYAS G PT I IVLDSG D SV T H
Sheath	TVPIYEGVALP H A I MDLAC R DL D Y L SK I LTERGYSFTTAAER E IVRDIKENLCYVALDFEG E MA S SSS L EK S Y E L
CNS	TVPIYEGVALP H A I MDLAC R DL D Y L SK I LTERGYSFTTAAER E IVRDIKENLCYVALDFEG E MA S SSS L EK S Y E L
Ovot	TVPIYEGVALP H A I MDLAC R DL D Y L SK I LTERGYSFTTAAER E IVRDIKENLCYVALDFEG E MA S SSS L EK S Y E L
Sheath	PEQGVIT I C K ER F RC P F S T Y G H L AG S FR A I FTTY N S I ME C D V D I R R D I Y A N T V L S G F T M F P G I A D R V Q E K E T S L A P S
CNS	PEQGVIT I C K ER F RC P F S T Y G H L AG S FR A I FTTY N S I ME C D V D I R R D I Y A N T V L S G F T M F P G I A D R V Q E K E T S L A P S
Ovot	PEQGVIT I C K ER F RC P F S T Y G H L AG S FR A I FTTY N S I ME C D V D I R R D I Y A N T V L S G F T M F P G I A D R V Q E K E T S L A P S
Sheath	TM X IK I I A F P ER K Y S W I Q S IL A S L ST F Q Q W I SK Q Y D ES G PS I V H R K C F
CNS	TM X IK I I A F P ER K Y S W I Q S IL A S L ST F Q Q W I SK Q Y D ES G PS I V H R K C F
Ovot	TM X IK I I A F P ER K Y S W I Q S IL A S L ST F Q Q W I SK Q Y D ES G PS I V H R K C F

B

Acta human	M-C-D-D-E-E-T-T-A-I-V-C-D-N-G-S-G-L-V-K
Actb human	M-C-D-E-D-E-T-T-A-L-V-C-D-N-G-S-G-L-V-K
Acta human	M-C-E-E-E-D-S-T-A-L-V-C-D-N-G-S-G-L-C-K
Actb human	M-C-E-E-E-T-T-A-L-V-C-D-N-G-S-G-L-C-K
Actb human	M-D-D-D-I-A-A-L-V-V-D-N-G-S-G-M-C-K
Actg human	M-E-E-E-I-A-A-L-V-I-D-N-G-S-G-M-C-K
ApACT _{ov}	M-A-D-E-D-V-A-A-I-V-V-D-N-G-S-G-M-C-K

Fig. 3. Conserved amino acid sequence between *apACT_{ov}* and other actin isoforms. (A) Comparison of the peptidic sequences of the *Aplysia* isoactins. The one letter code is used. Variable amino acids are shown in white on a dark box. (B) Comparison of the N-terminus sequence of *apACT_{ov}* with corresponding sequences of human actin proteins. Acta human, cardiac muscle α -actin (GenBank accession no. P04270); Actb human, skeletal muscle α -actin (GenBank accession no. P02568); Acta human, vascular smooth muscle α -actin (GenBank accession no. P03996); Actb human, enteric smooth muscle γ -actin (GenBank accession no. P12718); Actb human, β -non-muscle actin (GenBank accession no. P00709); Actg human, γ -non-muscle actin (GenBank accession no. P02571).

To determine its tissue distribution, a Northern blot was hybridized with a probe corresponding to the 3'UTR of apACTov (Fig. 1B). Two bands were specifically detected in RNAs isolated from ovotestis, demonstrating the tissue-specificity of this gene. The major band was observed at around 1.6 kb, which is very close to the size of the isolated cDNA. A minor band was also visible at around 3 kb. Since the 3 kb band hybridizes with the apACTov 3'UTR probe, it likely derives from alternative splicing or a differential choice of polyadenylation sites, generating longer 5'UTR and/or 3'UTR.

3.2. Primary structure of apACTov

Translation of the coding region generates a putative apACTov protein of 376 amino acids that shows 96% and 94% sequence identity with the neuronal (DesGroseillers et al., 1994) and the sheath (DesGroseillers et al., 1990) actin isoforms, respectively (Fig. 3A). This high sequence identity is consistent with the observed high similarity of actin isoforms in keeping with their primary sequences and their physical and chemical properties (Sheterline and Sparrow, 1994). As for all actin isoforms, the N-terminus of apACTov is acidic. Conservation of this site is important since it is involved in myosin activation and is close to or part of the binding site for a number of actin binding proteins (Sheterline and Sparrow, 1994). In apACTov, an Ala and a Met residue are found respectively upstream and downstream of the N-terminal conserved sequence Ala-Leu-Val-Val-Asp-Asn-Gly-Ser-Gly¹⁶, sug-

gesting that apACTov is more closely related to cytoplasmic isoactins (Fig. 3B) (Pollard and Cooper, 1986; Rubenstein, 1990). However, the presence of an Ala following the initial Met residue is reminiscent of muscle isoactins (Fig. 3B) (Pollard and Cooper, 1986; Sheterline and Sparrow, 1994).

3.3. apACTov mRNA is highly concentrated in the *Aplysia* oocytes cortical layer

In situ hybridization experiments were then performed to investigate the site(s) of expression of apACTov in the *Aplysia* ovotestis. Using the antisense probe, specific signals were observed in many immature oocytes (Fig. 4A). Other structures were negative. At the sub-cellular level, the apACTov transcript was not uniformly distributed within oocytes but was localized in a crescent-like structure at the cortical layer (Fig. 4B) or to large microvilli at the surface of the egg (Fig. 4C and 4D). The signal specificity was confirmed by the absence of any signal when adjacent sections were hybridized with the sense probe (data not shown).

4. Discussion

In this paper, we characterized an *A. californica* actin isoform specifically expressed in the ovotestis. Differential tissue-specific expression of the three *Aplysia actin* genes is likely dependent on promoter sequences and tissue-

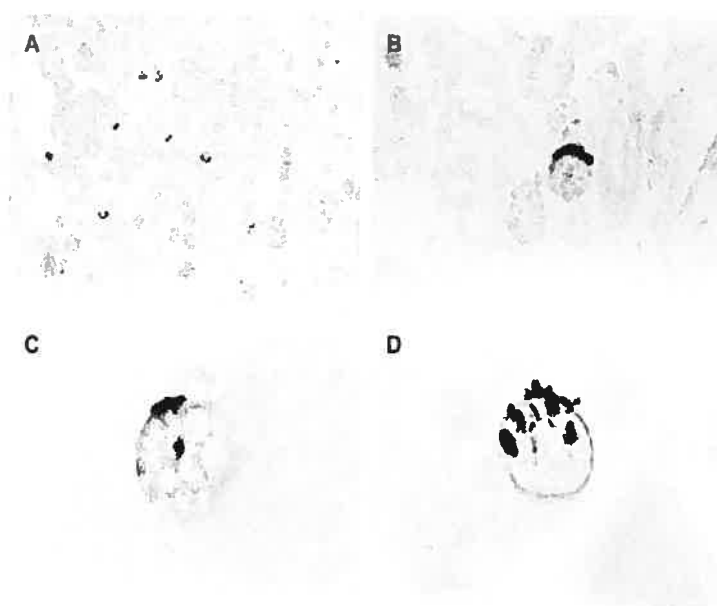


Fig. 4. In situ hybridization of apACTov on paraffined sections of *Aplysia* ovotestis. (A) mRNA distribution of the apACTov transcript in several oocytes. Magnification: 10 \times . (B) Positive signals are restricted to crescent-like structures in the cortical layer of the oocytes. Magnification: 40 \times . (C) (D) The apACTov transcript is also present in microvilli at the surface of the eggs. Magnification: 100 \times .

specific transcriptional regulation. The coding region of *apACTov* is highly identical to those of the two previously isolated *Aplysia* actin isoforms (DesGroseillers et al., 1990, 1994) and displays several key features common to eukaryotic actins: in particular, Cys286 and Cys375, Tyr71 and Lys239, thought to be involved in myosin binding, actin polymerization and interaction with tropomyosin, respectively, are well conserved (Hightower and Meagher, 1986). Sequence analysis of the N-terminal extremity, which provides a simple classification criterion, places *apACTov* within non-muscle isoactins (actins of Class I). This is consistent with the more general observation that invertebrates only express cytoplasmic-like actins, being the evolutionary archetypes of actins (Sheterline and Sparrow, 1994).

In contrast, the nucleotide sequences of the 5'- and 3'-untranslated regions are different from those of the other *Aplysia* actin isoforms. It is now well documented that specific sequences in the 3'-untranslated region regulate the sub-cellular transport and localization of several mRNAs (Hill and Gunning, 1993; Kislauskis et al., 1993; Bassell et al., 1999). Among them, isoactin mRNAs are differentially localized in sub-cellular compartments in many cell types and species. In mammals, a cis-acting zipcode sequence in the 3'-UTR of β -actin mRNA (Kislauskis et al., 1994) and trans-acting zipcode-binding proteins have been identified and allow regulated localization of the transcript (Ross et al., 1997).

4.1. Possible physiological roles of *apACTov*

The sub-cellular localization of *apACTov* mRNA to the cortex of immature oocytes is consistent with previous reports in several species showing that this structure is particularly rich in poly(A)⁺ and more specifically in actin RNAs (Watson et al., 1993). This RNA organization may regulate appropriate translation of mRNA in time and space during oogenesis and proper segregation of mRNAs in dividing blastomeres. However and in contrast to published data showing uniform cortical distribution of RNAs all around the oocytes, *apACTov* RNA was observed in crescent-like structures or in microvilli at one pole of the egg. The highly specific localization of this actin mRNA suggests that it may play specialized role(s) during oogenesis and/or in fertilized eggs. The presence of *apACTov* mRNA in crescent-like structures and microvilli may be important to maintain a high level of the *apACTov* protein at specific site of the cortex as a result of regulated local translation. The cortical cytoskeleton is thought to participate in a number of events in early development, including the incorporation of the sperm nucleus by the egg (Tilney and Jaffe, 1980), the migration of intracellular vesicles to the cell cortex (Allen et al., 1992) and the formation of the contractile apparatus for cytokinesis (Mabuchi, 1994). Some of these functions may be regulated by a restricted oocyte actin gene. It will be

interesting to investigate the mechanisms involved in the temporal and spatial transport of *apACTov* mRNA to sub-cellular domains.

Acknowledgment

We thank Jeanne Lavoie for skilled technical support in obtaining tissues. This work was supported in part by Medical Research Council of Canada (MRC), Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche du Québec (FCAR) grants to LDG. AA received a scholarship from the FCAR. DB received studentships from Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

References

- Allen, P.G., Baltz, J.M., Begg, D.A., 1992. Fertilization alters the orientation of pigment granule saltations in *Arhacia* eggs. *Cell Motil. Cytoskeleton* 21, 223–234.
- Bassell, G.J., Oleynikov, Y., Singer, R.H., 1999. The travels of mRNAs through all cells large and small. *FASEB J.* 13, 447–454.
- DesGroseillers, L., Cowan, D., Miles, M., Sweet, A., Scheller, R.H., 1987. *Aplysia californica* neurons express microinjected neuropeptide genes. *Mol. Cell Biol.* 7, 2762–2771.
- DesGroseillers, L., Auclair, D., Wickham, L., 1990. Nucleotide sequence of an actin cDNA gene from *Aplysia californica*. *Nucleic Acids Res.* 18, 3654.
- DesGroseillers, L., Auclair, D., Wickham, L., Maalouf, M., 1994. A novel actin cDNA is expressed in the neurons of *Aplysia californica*. *Biochim. Biophys. Acta* 1217, 322–324.
- Garrels, J.I., Gibson, W., 1976. Identification and characterization of multiple forms of actin. *Cell* 9, 793–805.
- Goode, B.L., Drubin, D.G., Barnes, G., 2000. Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 63–71.
- Hamaguchi, Y., Mabuchi, I., 1988. Accumulation of fluorescently labeled actin in the cortical layer in sea urchin eggs after fertilization. *Cell Motil. Cytoskeleton* 9, 153–163.
- Herman, I.M., 1993. Actin isoforms. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5, 48–55.
- Hightower, R.C., Meagher, R.B., 1986. The molecular evolution of actin. *Genetics* 114, 315–332.
- Hill, M.A., Gunning, P., 1993. Beta and gamma actin mRNAs are differentially located within myoblasts. *J. Cell Biol.* 122, 825–832.
- Kislauskis, E.H., Li, Z., Singer, R.H., Taneja, K.L., 1993. Isoform-specific 3'-untranslated sequences sort α -cardiac and β -cytoplasmic actin messenger RNAs to different cytoplasmic compartments. *J. Cell Biol.* 123, 165–172.
- Kislauskis, E.H., Zhu, X., Singer, R.H., 1994. Sequences responsible for intracellular localization of β -actin messenger RNA also affect cell phenotype. *J. Cell Biol.* 127, 441–451.
- Mabuchi, I., 1994. Cleavage furrow: timing of emergence of contractile ring actin filaments and establishment of the contractile ring by filament bundling in sea urchin eggs. *J. Cell. Sci.* 107, 1853–1862.
- McKeown, M., Taylor, W.C., Kindle, K.L., Firtel, R.A., Bender, W., Davidson, N., 1978. Multiple, heterogeneous actin genes in *Drosophila*. *Cell* 15, 789–800.
- Mowry, K.L., Cote, C.A., 1999. RNA sorting in *Xenopus* oocytes and embryos. *FASEB J.* 13, 435–445.

- Pollard, T.D., Cooper, J.A., 1986. Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 987–1035.
- Ross, A.F., Oleynikov, Y., Kislauskis, E.H., Taneja, K.L., Singer, R.H., 1997. Characterization of a β -actin mRNA zipcode-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* 17, 2158–2165.
- Rubenstein, P.A., 1990. The functional importance of multiple actin isoforms. *Bioessays* 12, 309–315.
- Sheterline, P., Sparrow, J.C., 1994. Actin. *Protein Profile* 1, 1–121.
- Tilney, L.G., Jaffe, L.A., 1980. Actin, microvilli, and the fertilization cone of sea urchin eggs. *J. Cell Biol.* 87, 771–782.
- Valentijn, K., Valentijn, J.A., Jamieson, J.D., 1999. Role of actin in regulated exocytosis and compensatory membrane retrieval: insights from an old acquaintance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266, 652–661.
- Vandekerckhove, J., Weber, K., 1978. At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide. *J. Mol. Biol.* 126, 783–802.
- Watson, C.A., Sauman, I., Berry, S.J., 1993. Actin is a major structural and functional element of the egg cortex of giant silkworms during oogenesis. *Dev. Biol.* 155, 315–323.
- Wickham, L., DesGroseillers, L., 1991. A bradykinin-like neuropeptide precursor gene is expressed in neuron L5 of *Aplysia californica*. *DNA Cell Biol.* 10, 249–258.
- Wilson, E.B., 1904. Experimental studies in germinal localization. II: experiments on the cleavage-mosaic in *Patella* and *Dentalium*. *J. Exp. Zool.* 1, 197–268.
- Wong, G.K., Allen, P.G., Begg, D.A., 1997. Dynamics of filamentous actin organization in the sea urchin egg cortex during early cleavage divisions: implications for the mechanism of cytokinesis. *Cell Motil. Cytoskeleton* 36, 30–42.
- Zappulla, J.P., Wickham, L., Bawab, W., Yang, X.F., Storozhuk, M.V., Castelhucco, V.F., DesGroseillers, L., 1999. Cloning and characterization of *Aplysia* neutral endopeptidase, a metallo-endopeptidase involved in the extracellular metabolism of neuropeptides in *Aplysia californica*. *J. Neurosci.* 19, 4280–4292.