



**Eléments moléculaires, cellulaires et environnementaux
du contrôle de la locomotion chez *Caenorhabditis
elegans***

Juliette Ben Arous

► **To cite this version:**

Juliette Ben Arous. Eléments moléculaires, cellulaires et environnementaux du contrôle de la locomotion chez *Caenorhabditis elegans*. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2009. Français. <tel-00439366>

HAL Id: tel-00439366

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00439366>

Submitted on 7 Dec 2009

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

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



THÈSE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité Physique

présentée par

Juliette BEN AROUS

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

ÉLÉMENTS MOLÉCULAIRES, CELLULAIRES ET ENVIRONNEMENTAUX
DU CONTRÔLE DE LA LOCOMOTION CHEZ *Caenorhabditis elegans*

Thèse soutenue le 1er décembre 2009 devant le jury composé de :

M. Axel Buguin	Président du jury
M. Jean-Marc Di Meglio	Rapporteur
M. Michel Labouesse	Rapporteur
M. Jean-Louis Bessereau	Examineur
M. William R Schafer	Examineur
M. Didier Chatenay	Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Didier pour m'avoir conseillée quotidiennement durant cette thèse tout en me laissant une grande liberté, et pour m'avoir supportée avec patience et efficacité dans les moments clefs. Cela a été un grand plaisir de travailler avec lui durant ces trois années.

Je remercie les membres du jury, spécialement Michel Labouesse et Jean-Marc Di Meglio pour avoir accepté de rapporter ma thèse.

Je voudrais également remercier les membres de l'équipe de la D22 : Jérôme Robert notamment pour son soutien permanent au plan expérimental et technique, Georges et Alexis pour leurs conseils, Jérôme Wong et Stéphane pour leur aide et les longues discussions menant (ou pas) à de nouvelles idées. Et je les remercie tous également, ainsi que Sébastien et Julien, pour avoir rendu ces trois années de thèse agréables. Je voudrais remercier aussi ceux avec qui j'ai interagis au LPS durant ces trois années de thèse, spécialement Nora qui a réglé mes divers problèmes administratifs.

Je n'aurais peut être même pas commencé cette thèse sans l'année que j'ai passée à New York au laboratoire de Stanislas Leibler et qui m'a beaucoup appris. Pour cela, et ses conseils judicieux au début de ma thèse, je tiens à le remercier chaleureusement. J'ai également une pensée pour Clément Nizak qui m'a encadrée durant mon séjour à New York.

Jean-Louis Bessereau m'a beaucoup appris sur la biologie de *C. elegans* et donné d'excellents conseils tout au long de ma thèse. J'aimerais le remercier pour cela ainsi que certains membres de son équipe, Iskra Katic qui m'a donné des souches et Valérie Robert qui m'a aidée à réaliser des microinjections. Je remercie également Michel Labouesse pour ses commentaires motivants sur mon travail. Je tiens également à remercier Bill Schafer pour m'avoir conseillée et accueillie dans son laboratoire, ainsi que ses post-doctorants, Robyn Branicky et Marina Ezcurra pour m'avoir formée à l'imagerie calcique chez *C. elegans*, Yoshinori Tanizawa et Ithai Rabinowitch pour avoir construit les souches nécessaires à mon travail et collaboré très productivement à mon projet d'imagerie.

Je voudrais remercier également tous ceux qui m'ont rendu la vie plus douce pendant ces trois années de thèse, Mariam, Juliette, Laure, Marie, Stéphanie, Antonin, Leila, Lucie-anne, Pauline, Raphael, Gabriel, Jc, Thuriane et Yannick.

Et bien sur, je remercie aussi ma famille. Ceux qui sont près et qui ont été là pendant ces trois ans, mes grands-parents Georges et Gisèle, et spécialement ma soeur Alice pour son soutien permanent. Et ceux qui sont loin, mon frère Louis, et mes parents qui, connaissant bien ce qu'est une thèse, m'ont aidée à parvenir jusqu'ici. Je remercie ma mère qui m'a toujours rassurée et m'a offert des conditions de rédaction optimales, et mon père qui m'a donné le goût de la science et m'a conseillée tout au long de ma thèse.

Enfin, évidemment, il me reste à remercier Cyril. Pour tout.

Résumé

Caenorhabditis elegans est un organisme modèle bien adapté à l'analyse du fonctionnement de son réseau de neurones, de l'intégration des informations sensorielles qu'il reçoit à l'élaboration d'une réponse comportementale adéquate. Au cours de cette thèse, je me suis intéressée à l'étude de quelques paramètres cellulaires, moléculaires et environnementaux de la stratégie locomotrice de ce nématode. Pour cela, j'ai développé une méthode originale d'analyse quantitative de l'alternance des phases d'activité de *C. elegans* en présence de bactéries. J'ai montré que la phase inactive est induite par la perception interne de bactéries nutritives alors que la phase active est favorisée par la perception chemosensorielle du ver. Ce comportement bimodal est de plus contrôlé par la concentration en nourriture présente dans l'environnement de l'animal et est modulé par son état de satiété. On observe en effet une transition d'un état constamment actif à un comportement majoritairement inactif en une décade de concentrations en bactéries. J'ai également montré que ce comportement est régulé par les voies de signalisation de la sérotonine, de l'insuline et des TGF-beta.

J'ai par ailleurs développé un nouveau système d'imagerie permettant l'enregistrement simultané de l'activité calcique de neurones uniques et du comportement de vers se déplaçant librement en conditions standard de laboratoire. Grâce à ce système, j'ai pu montrer que les mouvements de recul spontanés de *C. elegans* reflètent précisément l'activité calcique des neurones de commande du système moteur AVA. Par ailleurs, j'ai pu détecter des pics d'activité calcique spontanés des neurones mécanosensoriels PLM lors du déplacement libre du ver. Ces pics sont corrélés à de courtes phases d'accélération de *C. elegans*.

Abstract

Caenorhabditis elegans is a model system well suited to analyze how neuronal circuit integrate sensory information to generate behavior. I focused my thesis on the study of the cellular, molecular and environmental basis of the locomotory behavior of the worm. I first developed a new quantitative method to analyze the locomotion of *C. elegans* on food. As in previous studies I could show that *C. elegans* exhibits two activity phases on food. I have established that internal sensing of food presence is necessary to induce the inactive phase and that chemosensory perception promotes the active phase. This behavior also depends on the concentration of food in the environment of the worm and on its previous food experience. *C. elegans* actually switch from an all-roaming phenotype to a mostly dwelling behavior in a decade of bacterial concentration. Moreover, I have shown that serotonin signaling and the insulin and TGF-beta pathways control this behavior.

I have also developed a new automated system for simultaneous recording of behavior and neuronal activity in freely moving *C. elegans* in standard laboratory conditions. Using this system, I could show that spontaneous reversals of the worm reflect precisely the activity of the AVA command interneurons. I could also evidence spontaneous activity transients in the PLM sensory neurons during free behavior of *C. elegans* in standard conditions. These activity transients are coupled to short spontaneous forward accelerations of the worm.

Table des matières

Remerciements	iii
Résumé	v
Préambule	1
I Eléments de neurobiologie du nématode <i>Caenorhabditis elegans</i>	3
1 Le nématode <i>C. elegans</i> : Généralités	5
1.1 Choix du modèle	5
1.2 Ecologie et phylogénie	6
1.3 Cycle de vie	7
2 Système nerveux de <i>C. elegans</i>	9
2.1 Structure du réseau de neurones de <i>C. elegans</i>	9
2.1.1 Structure sensorielle : les amphides	10
2.1.2 Mécanosensation et locomotion	11
2.1.3 Signalisation aminergique	12
2.1.4 Insuline et facteurs de croissance TGF-beta	13
2.2 Méthodes d'analyse fonctionnelle du système nerveux	14
2.2.1 Ablation de neurones	14
2.2.2 Imagerie calcique	14
3 Stratégies alimentaires	17
3.1 Recherche de nourriture	17
3.1.1 Chimiotactisme et thermotactisme	17
3.1.2 Adaptation aux périodes de famines : la larve Dauer	19
3.2 Adaptation à la présence de nourriture	20
3.2.1 Ralentissement en présence de nourriture	20
3.2.2 Comportement social	20
3.2.3 Quiescence	21
3.3 Dwelling et Roaming, un comportement à deux états	21

II Bases sensorielles et moléculaires d'un comportement alimentaire de <i>C. elegans</i>	25
4 Analyse du comportement de <i>C. elegans</i> en présence de nourriture	27
4.1 Premières observations	27
4.2 Méthode d'analyse quantitative	29
4.3 Comportement du ver sauvage en conditions standard	33
5 Effets des conditions environnementales et de l'expérience de l'animal	35
5.1 Influence de la concentration en nourriture	35
5.2 Effet de l'expérience alimentaire antérieure de l'animal	38
5.3 Influence de la température	39
5.4 Couplage avec la reproduction	39
5.4.1 Corrélation avec le comportement de ponte	39
5.4.2 Importance de l'état de fécondation de l'animal	40
6 Modes de perception et voies de signalisation impliquées	43
6.1 Influence de la perception sensorielle	43
6.1.1 La perception métabolique interne de la présence de bactéries nutritives est nécessaire pour déclencher la phase de dwelling	43
6.1.2 Comportement des mutants du développement ou du fonctionnement des neurones des amphides	45
6.2 Modulation par les voies de signalisation des amines	46
6.3 Modulation par les voies de signalisation de l'insuline et des TGF-beta	49
6.4 Conclusions	52
III Un nouveau système d'imagerie calcique pour la mesure simultanée de l'activité neuronale et du comportement de <i>C. elegans</i>	55
7 Méthode expérimentale	57
7.1 Motivation	57
7.2 Dispositif expérimental	58
8 Résultats	61
8.1 Circuit neuronal de contrôle de la locomotion de <i>C. elegans</i>	61
8.2 Corrélation de l'activité calcique des neurones AVA et du comportement de <i>C. elegans</i>	63
8.3 Les pics d'activité spontanée des neurones PLM corrélerent avec des pics d'accélération de <i>C. elegans</i>	67
8.4 Mesures d'activité calcique de l'interneurone AIY	70
8.5 Conclusions	71

IV	Conclusions et perspectives	73
V	Annexes	79
A	Protocoles de culture de <i>Caenorhabditis elegans</i>	81
A.1	Protocoles standard	81
A.1.1	Souches utilisées	81
A.1.2	Milieus de culture	82
A.1.3	Culture de <i>C. elegans</i>	83
A.1.4	Congélation	83
A.2	Préparation des expériences	84
A.2.1	Expériences standard	84
A.2.2	Expériences après une période de famine	84
A.2.3	Expériences à concentration de bactéries contrôlée	85
A.2.4	Expériences en présence de bactéries traitées à l'aztreonam	85
A.2.5	Tests en présence de microbilles	86
B	Biologie moléculaire et transformation par microinjection	87
B.1	Construction du plasmide pOHD3	87
B.2	Transformation par microinjection	88
C	Méthodes d'imagerie de <i>C. elegans</i>	91
C.1	Systèmes d'enregistrement de trajectoires	91
C.1.1	Système mono-ver	91
C.1.2	Système multi-vers	91
C.2	Imagerie calcique	94
C.2.1	Marqueurs de l'activité calcique	94
C.2.2	Système d'imagerie calcique	96
C.2.3	Analyse du signal	98
VI	Articles	101
D	Article 1	103
E	Article 2	113
	Bibliographie	128

Préambule

La détermination des motifs comportementaux d'un animal dans son environnement naturel est une question écologique fondamentale. En effet, la locomotion des animaux dans leur milieu naturel doit a priori être liée à une optimisation de leur stratégie alimentaire et reproductive.

Ainsi, l'optimisation de la stratégie de recherche de nourriture d'un animal soumis à une distribution aléatoire de patches de nourriture a été le sujet de plusieurs modèles théoriques. Ces modèles supposent soit que l'animal se déplace sans obtenir aucune information tant qu'il n'a pas atteint sa cible (Marches de Levy [Bartumeus et al., 2002], Recherche intermittente [Bénichou et al., 2006]), soit qu'il peut recueillir de l'information sur la position de la cible au cours de son déplacement (Infotaxie [Vergassola et al., 2007]). Le comportement de différentes espèces animales en recherche de nourriture sans information a été par ailleurs mesuré dans la nature. Les trajectoires d'albatros, d'abeilles ou de cerfs montrent ainsi des phases de déplacement rapide entrecoupées de réorientations. Les premiers résultats expérimentaux ont ainsi corroboré l'idée d'une stratégie fondée sur une marche de Levy [Viswanathan et al., 1999]. Cependant, il est difficile d'effectuer des mesures quantitatives dans la nature et une analyse plus fine des mêmes données a remis en cause ces premières conclusions [Edwards et al., 2007]. Il semble donc intéressant d'effectuer des mesures en laboratoire, dans un environnement bien contrôlé.

Plus généralement, en présence de nourriture accessible dans leur environnement naturel, la plupart des animaux possèdent deux modes d'activité, un mode actif et un mode de repos, et passent la majorité de leur temps dans la phase inactive [Herbers, 1981]. De même, dans sa cage en laboratoire, une souris sauvage ayant accès à une source de nourriture passe 66% de son temps en phase inactive [Goulding et al., 2008]. Ce comportement intermittent est lié à la stratégie alimentaire de l'animal, celui-ci devant adapter son comportement à la présence de nourriture dans son environnement. Pour la souris, l'allocation du temps passé dans chaque phase pourrait être cruciale pour la santé et la survie de l'animal. On observe en effet chez les souris mutantes d'un récepteur à la sérotonine ou de l'hormone leptine à la fois une mauvaise gestion du temps passé dans chaque phase d'activité et des problèmes d'obésité [Goulding et al., 2008].

Pour mon projet de thèse, j'ai ainsi choisi le nématode *Caenorhabditis elegans* pour étudier comment le réseau de neurones de l'animal intègre les informations sur l'état interne de satiété et celles provenant de l'environnement, et contrôle en conséquence le mode d'activité de l'animal. *C. elegans* est un organisme bien adapté pour cette étude (voir Partie 1). Tout d'abord, en présence des bactéries dont il se nourrit, ce ver alterne également entre deux phases d'activité, une phase de

déplacement rapide avec peu de changement de directions (roaming), et une phase inactive avec un grand nombre de réorientations et une vitesse très faible (dwelling) [Fujiwara et al., 2002]. Ce ver est de petite taille (à peu près 1mm à l'âge adulte), transparent, non pathogène et assez facile à cultiver en laboratoire [Brenner, 1974]. Cet organisme modèle permet ainsi d'étudier quantitativement et dans des délais raisonnables l'impact de différents paramètres environnementaux sur le comportement alimentaire bimodal de l'animal. *C. elegans* est de plus séquencé et bien annoté, et son système nerveux comporte seulement 302 neurones. Mieux encore, la structure de son réseau de neurones est complètement connue [White et al., 1986]. La connaissance bien développée de la génétique et du système nerveux de *C. elegans* rend donc ce système modèle bien adapté pour tester l'effet de nombreuses mutations affectant le système nerveux sur le comportement de l'animal. Ce système permet de plus de mesurer l'activité de neurones uniques in vivo et de corrélérer celle-ci au comportement de l'animal.

Durant ma thèse j'ai donc étudié chez *C. elegans*, un modèle " simple ", quels paramètres environnementaux sont cruciaux pour la régulation d'un comportement alimentaire et comment le réseau de neurones de l'animal les intègre pour prendre la bonne décision (voir Partie 2). Dans ce but j'ai également développé un système d'imagerie calcique pour mesurer l'activité de neurones uniques d'un ver pouvant se déplacer librement dans son environnement standard de laboratoire (voir Partie 3).

Première partie

Eléments de neurobiologie du nématode *Caenorhabditis elegans*

Chapitre 1

Le nématode *C. elegans* : Généralités

1.1 Choix du modèle

Au début des années 1960, Sydney Brenner, l'un des fondateurs de la biologie moléculaire, décida de s'intéresser aux bases génétiques du développement et du comportement. Pour cela, bien avant les débuts de la génomique, il chercha un organisme modèle qui lui permette de disséquer de manière exhaustive les fondements moléculaires de ces deux processus biologiques. Il choisit le nématode *Caenorhabditis elegans* qui, bien que très peu étudié à l'époque, lui sembla idéal. Ce ver est en effet de petite taille (1 mm), est hermaphrodite et a un cycle de vie court, ce qui permet de le faire croître rapidement en grande quantité en laboratoire. De plus, il est très adapté à l'étude génétique car l'hermaphrodite peut à la fois s'autoreproduire et être fertilisé par des mâles. Il possède seulement un millier de cellules, ce qui permet d'étudier précisément le lignage cellulaire au cours du développement. Et enfin, il est transparent et possède donc d'excellentes propriétés optiques pour la microscopie. Au cours des années 1970-80, Brenner et son équipe cherchèrent à comprendre de la manière la plus complète possible la génétique du comportement et du développement de ce nématode. Ainsi, John Sulston et Bob Horvitz définirent le lignage complet des cellules somatiques du ver, de la première cellule embryonnaire à l'animal complet. Ce lignage est conservé d'un animal à l'autre, et ils découvrirent ainsi la mort cellulaire programmée de certaines cellules au cours du développement, ce qui les mena au prix Nobel de Médecine en 2002. De même, John White reconstitua en 1986 la structure complète du réseau de neurones de *C. elegans*, qui est également conservée d'un animal à l'autre [White et al., 1986]. A ce jour, *C. elegans* est toujours le seul animal dont la structure du réseau de neurones est complètement connue.

Grâce à ces efforts, le nématode est devenu aujourd'hui un système modèle classique en biologie. *C. elegans* est en effet toujours un excellent système pour étudier les fondements moléculaires de la neurobiologie car, en plus des propriétés sélectionnées par Sydney Brenner, il est maintenant séquencé et bien annoté à la suite d'efforts de nombreux laboratoires. De plus, le génome de *C. elegans* est bien conservé par rapport aux génomes vertébrés. Les gènes dont le fonctionnement est décrypté chez *C. elegans* peuvent donc être étudiés par la suite chez les vertébrés par ho-

mologie de séquence. *C. elegans* possède par ailleurs de nombreux comportements relativement complexes, et malgré les nombreuses avancées dans l'étude de son comportement et son faible nombre de neurones, le but visionnaire de Sydney Brenner de comprendre exhaustivement le fonctionnement du système nerveux d'un animal "simple" à l'échelle moléculaire est encore loin d'être atteint.

1.2 Ecologie et phylogénie

L'écologie de *C. elegans* est assez mal connue, bien que ce nématode ait été isolé dans de nombreuses régions du monde. Dans son environnement naturel, *C. elegans* vit dans le sol et se nourrit de bactéries. La plupart des études génétiques réalisées ont été effectuées à partir de la souche Bristol N2 isolée en Angleterre et utilisée à l'origine dans le laboratoire de Sydney Brenner. Ce n'est que plus récemment que l'étude systématique d'isolats naturels a été entreprise.

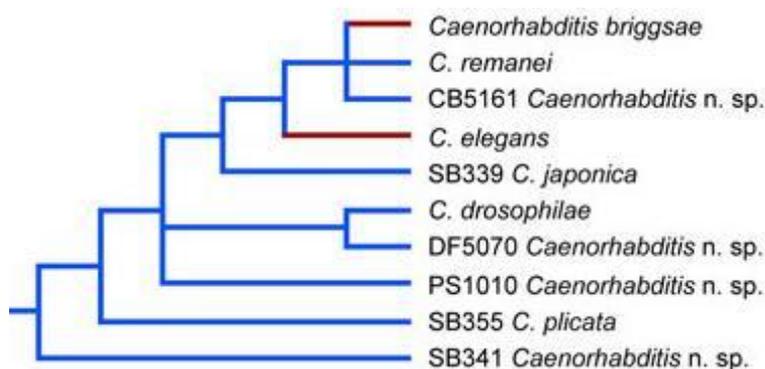


FIGURE 1.1 – Phylogénie des espèces *Caenorhabditis*. En rouge les espèces hermaphrodites, en bleu les espèces à reproduction sexuée mâle/femelle. (Image Wormbook : <http://www.wormbook.org>)

Par ailleurs, *C. elegans* fait partie de la famille *Caenorhabditis* qui comprend une dizaine d'espèces (Figure 1.1). Il est intéressant de noter que dans cette clade la plupart des espèces ont un mode de reproduction sexuée gonochoriste, c'est à dire nécessitant la reproduction d'un mâle et d'une femelle. Par exemple, les femelles de l'espèce *C. remanei* doivent être fertilisées par un mâle pour se reproduire. A l'inverse on peut observer l'évolution indépendante d'un mode de reproduction hermaphrodite chez *C. elegans* et *C. briggsae*. Chez ces deux espèces, il existe des hermaphrodites et des mâles. Les hermaphrodites de *C. elegans* produisent à la fois des ovocytes et des spermatozoïdes et peuvent donc s'autoreproduire sexuellement. Ils peuvent également être fécondés par un mâle. Les hermaphrodites possèdent deux chromosomes sexuels X alors que les mâles n'en possèdent qu'un seul. Au cours de sa période reproductive un hermaphrodite auto-fécondé produira 300 oeufs qui seront tous des hermaphrodites (XX) alors qu'un hermaphrodite fécondé par un mâle peut pondre jusqu'à 900 oeufs dont la moitié seront des mâles (XO). Dans la nature, on observe une fréquence très faible de mâles et il n'est pas clair que le maintien de

mâles dans la population soit sélectionné positivement. Il est en effet également possible que les mâles soient uniquement le produit d'erreurs de répartition des chromosomes au moment de la méiose [Chasnov and Chow, 2002].

1.3 Cycle de vie

Le cycle de vie de *C. elegans* dure à peu près trois jours à 20°C. Après éclosion de l'oeuf et en présence de conditions favorables, *C. elegans* passe par mues successives par quatre stades larvaires au cours de son développement (Figure 1.2). En situation défavorable (par exemple à faible concentration de nourriture, haute température, grand nombre de vers...), le développement du ver peut basculer avant le deuxième stade larvaire L2 vers un stade larvaire L3 alternatif appelé Dauer. La larve Dauer ne se nourrit pas, est extrêmement résistante et a un métabolisme totalement différent de l'animal normal [Cassada and Russell, 1975]. Bien que sa durée de vie en conditions normales soit de quelques semaines, le ver peut rester au stade Dauer jusqu'à plusieurs mois. Il en sort en présence de conditions favorables pour muer vers le stade larvaire L4 et continuer à se développer jusqu'au stade adulte.

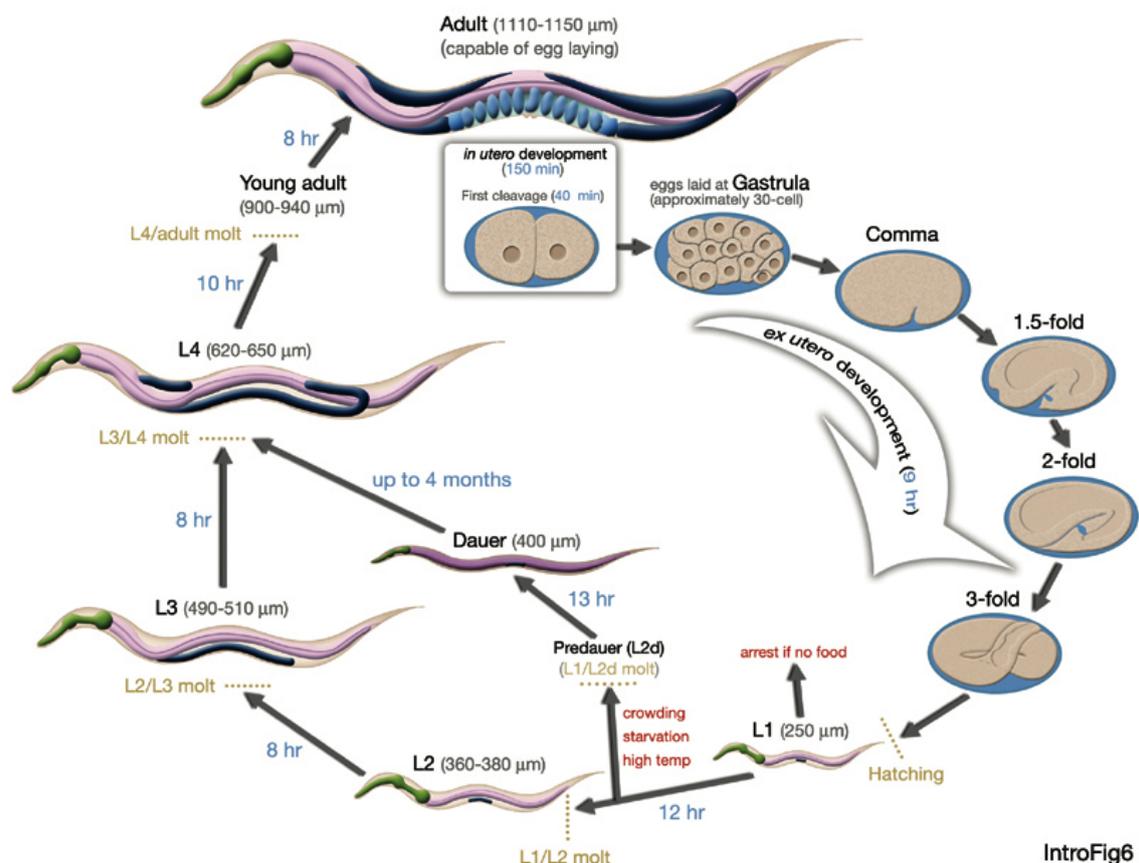


FIGURE 1.2 – Cycle de vie du nématode *C. elegans* à 22°C. (Image Wormatlas : <http://www.wormatlas.org>)

Chapitre 2

Système nerveux de *C. elegans*

2.1 Structure du réseau de neurones de *C. elegans*

Le réseau de neurones de l'hermaphrodite est composé chez *C. elegans* de 302 neurones répartis en 118 classes comportant des neurones de même morphologie. Le ver est globalement symétrique latéralement. Ainsi la plupart des neurones possèdent un neurone symétrique appartenant à la même classe qui remplit en première approximation les mêmes fonctions. Il a cependant été montré que deux neurones symétriques de la même classe pouvaient ne pas exprimer les mêmes gènes et avoir des propriétés différentes [Suzuki et al., 2008].

Ces neurones sont connectés par des synapses excitatrices et inhibitrices ainsi que par des jonctions gap. La structure du réseau a été complètement déterminée par l'observation de coupes du ver en microscopie électronique [White et al., 1986]. Il existe chez *C. elegans* comme dans les systèmes nerveux vertébrés des neurotransmetteurs synaptiques (Acétylcholine, GABA, glutamate) et des neuromodulateurs extrasynaptiques (amines telles que la sérotonine ou la dopamine, ou peptides comme l'insuline).

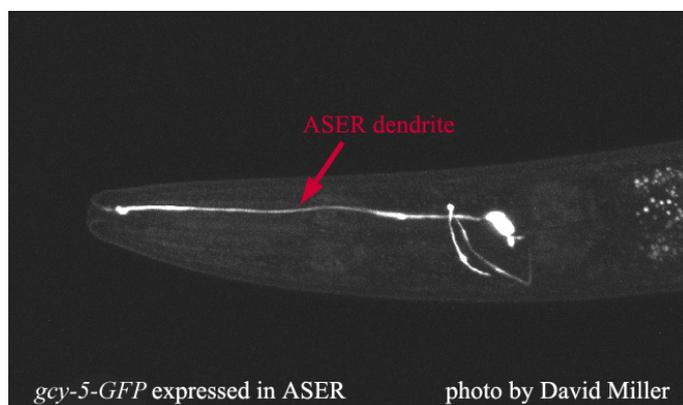


FIGURE 2.1 – Neurone gustatif ASER marqué en fluorescence (*gcy-5*-GFP).

2.1.1 Structure sensorielle : les amphides

C. elegans possède de nombreuses modalités sensorielles. Il perçoit une très grande variété de composés chimiques dans l'air et en solution, a un sens du toucher développé, perçoit la température et les phéromones émises par d'autres individus. Le nématode possède des organes sensoriels situés dans la tête (amphides) et au niveau de la queue (phasmides). Les amphides sont constitués d'une vingtaine de classes de neurones sensoriels et d'interneurones enchâssés dans des cellules gliales (Figure 2.2). Les neurones sensoriels sont ciliés et l'extrémité de ces cils peut être ouverte sur le milieu extérieur, notamment dans le cas des neurones olfactifs et gustatifs (Figure 2.1).

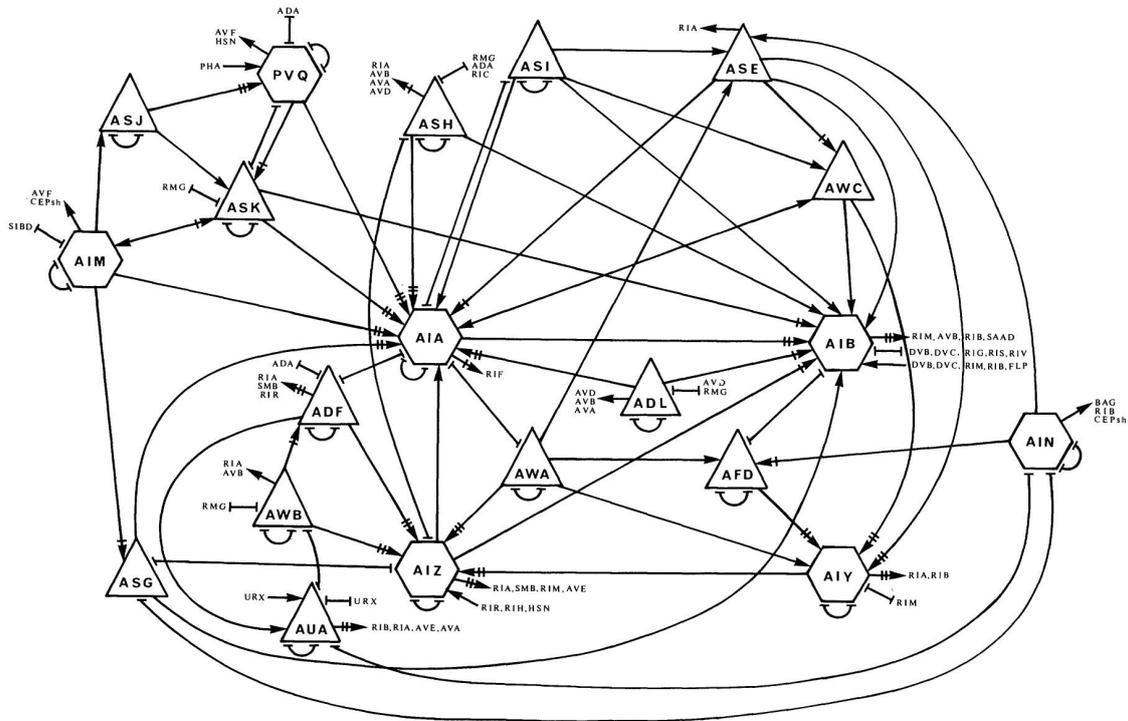


FIGURE 2.2 – Réseau de neurones des amphides. [White et al., 1986]

Il existe 13 classes de neurones sensoriels et la fonction de nombre d'entre eux a été déterminée par ablation laser. Par exemple, les neurones ASE perçoivent les composés chimiques en solution (gustatifs), les neurones AWA, AWB et AWC sont sensibles aux odeurs volatiles (olfactifs) [Bargmann and Horvitz, 1991], [Bargmann et al., 1993], les neurones AFD perçoivent la température [Mori and Ohshima, 1995], etc... La plupart des neurones sensoriels des amphides ont des connexions synaptiques avec les quatre classes d'interneurones AIY, AIZ, AIA et AIB [White et al., 1986]. Ces interneurones primaires sont un premier relais vers les neurones de commande du système moteur (Figure 2.3).

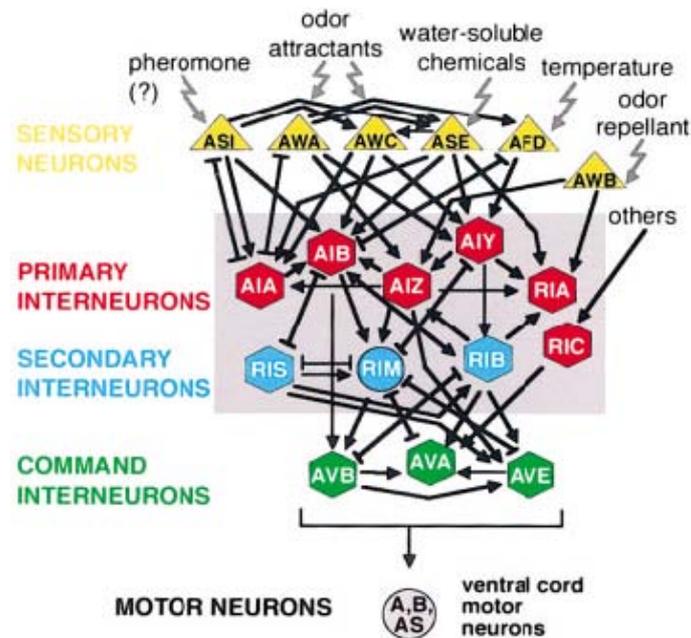


FIGURE 2.3 – Diagramme des connexions synaptiques et des fonctions sensorielles des neurones des amphides. Le système nerveux de *C. elegans* est constitué de couches fonctionnelles successives. [Tsalik and Hobert, 2003]

2.1.2 Mécanosensation et locomotion

C. elegans se déplace sur une surface plane en ondulant sur le flanc le long d'une trajectoire sinusoïdale. La génération de ce mouvement sinusoïdal est effectuée par la contraction corrélée de chaînes de muscles situés dorsalement et ventralement. Le ver peut se déplacer vers l'avant ou vers l'arrière, et effectuer un demi-tour (oméga-turn).

La coordination du mouvement est effectuée par les neurones moteurs répartis le long du corps de l'animal. Les neurones DA et VA contrôlent le mouvement vers l'arrière et les neurones DB et VB le mouvement vers l'avant (Figure 2.4). La coordination globale du mouvement et le processus de décision semblent être déterminés par les interneurones de commande du système moteur AVA, AVB, PVC et AVD [Chalfie et al., 1985], [Wicks and Rankin, 1995]. Notamment, l'ablation de AVA rend le mouvement vers l'arrière décoordonné alors que l'ablation de AVB empêche la coordination du mouvement vers l'avant. Ces neurones de commande reçoivent de nombreuses entrées synaptiques et intègrent diverses modalités sensorielles (Figures 2.3, 2.4).

Les neurones de commande sont notamment la cible synaptique du circuit du toucher comprenant les quatre classes de neurones mécanosensoriels ALM, PLM, AVM et PVM (Figure 2.4). Les deux neurones ALMs répondent à une stimulation mécanique légère sur la partie antérieure du corps de l'animal alors que les neurones PLMs répondent au même type de stimulation sur la partie postérieure [Chalfie et al., 1985]. L'activation de ALM inactive AVB et active AVA, et conduit à un recul du ver (Figure 2.4). Ainsi si le ver rencontre un obstacle devant lui, il montre un réflexe de recul. Symétriquement, l'activation de PLM active AVB et inactive AVA et induit

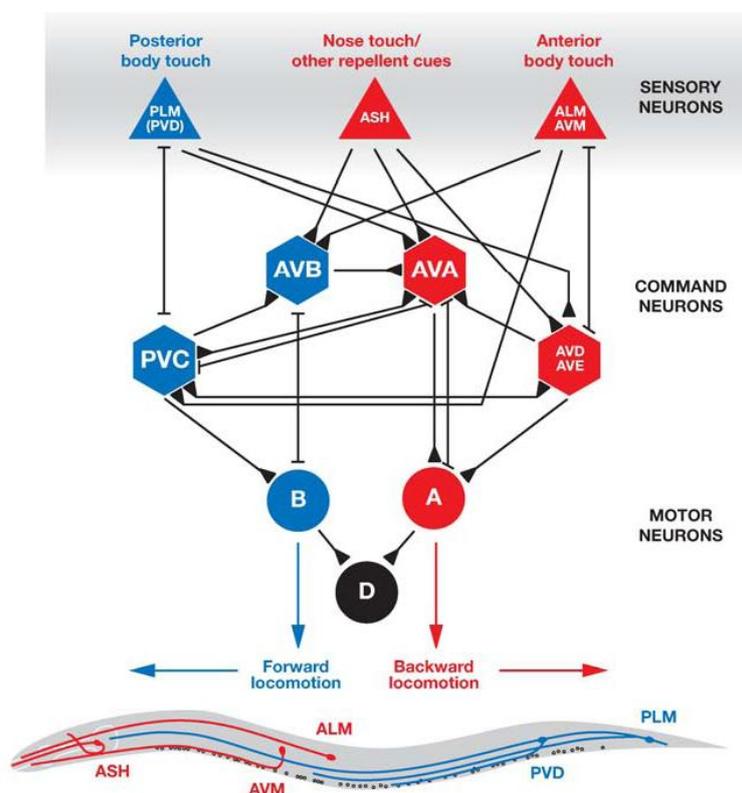


FIGURE 2.4 – Circuit neuronal liant la perception mécanique à la locomotion [de Bono and Maricq, 2005].

une accélération du ver quand il reçoit une stimulation mécanique sur la queue. Le circuit du toucher répond également à la vibration globale du substrat sur lequel se déplace le ver. Dans cette situation le ver répond dans la plupart des cas à la stimulation par un mouvement de recul. Des études par ablation de neurones suggèrent que dans ce cas la signalisation provenant des neurones ALM prédomine sur celle des neurones PLM [Wicks and Rankin, 1995].

2.1.3 Signalisation aminergique

Il existe chez *C. elegans* quatre neurotransmetteurs aminés qui modulent l'activité du système nerveux en fonction des caractéristiques environnementales rencontrées par l'animal : la sérotonine, la dopamine, l'octopamine et la tyramine [Horvitz et al., 1982], [Sulston et al., 1975]. Ces molécules sont synthétisées *in vivo* chez le ver à partir des acides aminés tryptophane et tyrosine (Figure 2.5). Elles agissent à la fois au niveau neuronal et musculaire et modulent de nombreux comportements tels que la ponte ou la locomotion.

L'hermaphrodite possède seulement six classes de neurones dopaminergiques et huit classes de neurones sérotoninergiques. L'octopamine est synthétisée à partir de la tyramine dans les neurones RIC et certaines cellules des gonades. La tyramine semble cependant fonctionner comme neuromodulateur indépendamment de l'octopamine et est exprimée dans les neurones RIM et les cellules endocrines uv1 [Alkema et al., 2005]. Il existe par ailleurs un grand nombre de récepteurs

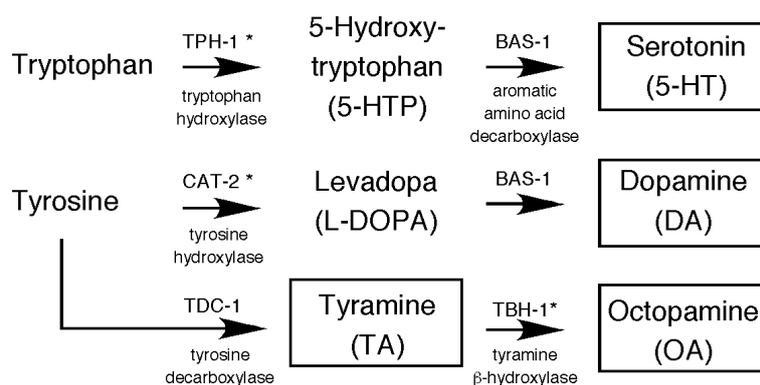


FIGURE 2.5 – Voies de synthèse des différentes amines (Image Wormbook : <http://www.wormbook.org>)

pour chacun de ces neuromodulateurs. Ces récepteurs sont exprimés dans de nombreux types cellulaires, ce qui donne une grande complexité à la signalisation transmise par ces amines. Les neurotransmetteurs aminergiques agissent en changeant les propriétés d'excitabilité neuronales ou musculaires, soit par l'ouverture directe de canaux ioniques, soit par l'activation de récepteurs GPCR couplés à des protéines G qui déclenchent des voies de signalisation intracellulaires non transcriptionnelles, et permettent donc une signalisation relativement rapide.

D'autre part, ces voies de signalisation ont été reliées à des comportements liés à la présence de nourriture [Kindt et al., 2007], [Sawin et al., 2000], [Srinivasan et al., 2008]. Par exemple, le mutant nul *tph-1* qui ne peut pas synthétiser la sérotonine montre des défauts liés à une mauvaise réponse à la présence de nourriture [Sze et al., 2000]. Ce mutant pond moins et la contraction rythmique du pharynx qui lui permet d'aspirer la nourriture est réduite, il possède des stocks de graisse beaucoup plus importants que le ver normal et a une plus grande probabilité de s'arrêter au stade Dauer. La sérotonine semble donc moduler la réponse du ver en fonction de la présence de nourriture dans l'environnement.

2.1.4 Insuline et facteurs de croissance TGF-beta

Il existe également des voies de signalisation peptidiques telles que les voies insuline et TGF-beta qui peuvent modifier les propriétés du système nerveux en réponse à des changements de l'environnement. Il existe une quarantaine de peptides de type insuline et un seul récepteur pour ces peptides : DAF-2. L'activation de DAF-2 a lieu en conditions favorables et active une voie de signalisation qui mène à la phosphorylation du facteur de transcription DAF-16/FOXO qui ne peut alors entrer dans le noyau. En conditions défavorables pour le ver, DAF-2 est inactif, DAF-16 peut pénétrer dans le noyau et déclencher l'expression de nombreux gènes. Le récepteur DAF-2 est exprimé dans de multiples cellules et régule un grand nombre de modalités biologiques, dont le passage au stade larvaire Dauer et le vieillissement de l'animal [Riddle and Albert, 1997], [Kenyon et al., 1993]. Il est également exprimé dans de nombreux neurones du nématode.

De même, les facteurs de croissance TGF-beta sont des peptides qui agissent dans de nom-

breuses cellules et notamment dans les neurones pour réguler transcriptionnellement les propriétés cellulaires. Il existe deux facteurs TGF-beta : DAF-7 et DBL-1. En conditions favorables pour l'animal, l'activation du récepteur par le peptide DAF-7 inhibe l'activité des facteurs de transcription DAF-5 et DAF-3. La signalisation TGF-beta régule également le passage au stade Dauer [Ren et al., 1996].

Les voies insuline et TGF-beta sont donc transcriptionnelles et doivent permettre d'adapter la réponse du système nerveux de l'animal à des modifications lentes de l'environnement.

2.2 Méthodes d'analyse fonctionnelle du système nerveux

La résolution complète de la structure du réseau de neurones [White et al., 1986] est une première étape dans la compréhension du fonctionnement du système nerveux de *C. elegans*. Pour approfondir celle-ci, de nouveaux outils ont été développés.

2.2.1 Ablation de neurones

Il est possible d'effectuer l'ablation d'une cellule unique bien définie à l'aide d'un laser. Avec le développement des marqueurs fluorescents et la découverte de promoteurs spécifiques à un type cellulaire, il est devenu plus facile de sélectionner sans ambiguïté la cellule que l'on veut supprimer. L'ablation est effectuée sur des larves L1 et les vers sont testés au stade adulte par comparaison avec des vers contrôles sur lesquels une cellule voisine de la cellule d'intérêt a été enlevée par ablation laser au stade L1. En se fondant sur la carte du réseau de neurones, cette méthode a permis de mieux comprendre le rôle de neurones spécifiques (voir 2.1.1, 2.1.2).

Il existe également des mutations de certains facteurs de transcription qui effectue l'ablation "génétique" de certains neurones. Ces gènes déterminent en effet entièrement l'identité d'une classe cellulaire donnée et ont peu d'effet sur les autres types cellulaires [Hobert, 2008]. Par exemple, le gène *ttx-3* détermine entièrement le développement des interneurones AIY et le gène *ttx-1* définit la fonctionnalité des neurones thermosensoriels AFD. De même, le gène *ceh-36* est nécessaire au développement des neurones olfactifs AWC et à l'asymétrie des neurones ASE alors que *che-1* détermine le développement des neurones gustatifs ASE. Un phénotype observé sur un tel mutant peut généralement être associé à la cellule dont le développement est déterminé par le gène muté.

2.2.2 Imagerie calcique

Pour comprendre finement le fonctionnement du réseau de neurones, il est nécessaire de pouvoir enregistrer dynamiquement l'activité électrique des cellules. Les méthodes électrophysiologiques sont très difficiles à mettre en oeuvre chez *C. elegans* du fait de la petite taille de ses neurones, et sont de plus très invasives.

Avec l'apparition de marqueurs de l'activité calcique fluorescents et encodés génétiquement [Miyawaki et al., 1997], une nouvelle méthode optique non invasive a été développée pour mesu-

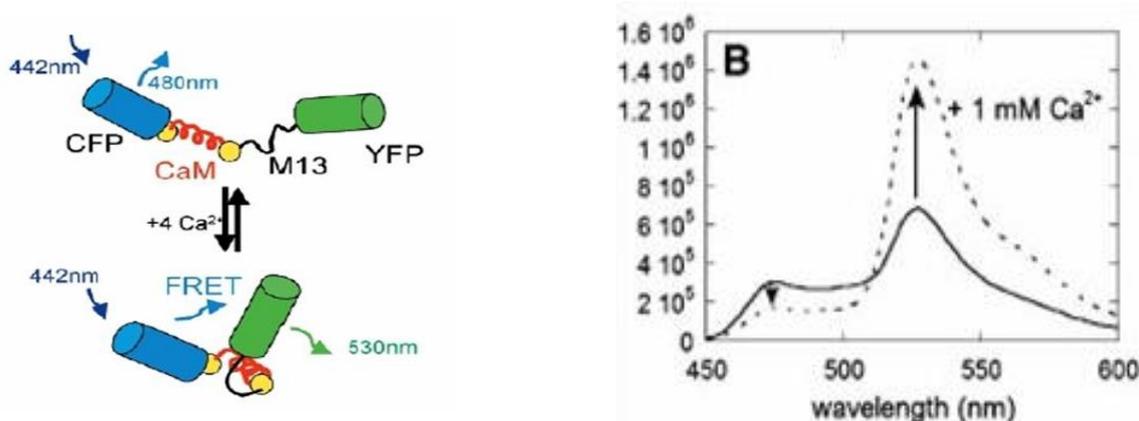


FIGURE 2.6 – Gauche : Fonctionnement de la protéine caméléon. Droite : Spectre de la protéine caméléon D3cpv en fonction de la concentration en calcium [Palmer et al., 2006].

rer l'activité calcique des neurones de *C. elegans* [Kerr et al., 2000]. Cette méthode d'imagerie calcique consiste tout d'abord à exprimer une protéine fluorescente sensible au calcium sous le contrôle d'un promoteur spécifique de la cellule dont on veut mesurer l'activité. Il existe deux types de marqueurs calciques génétiques, les marqueurs dont l'intensité de fluorescence change en fonction de la concentration en calcium (par exemple la protéine G-CaMP, [Nakai et al., 2001]) et les marqueurs ratiométriques (comme les protéines caméléon, [Miyawaki et al., 1997], voir Annexe C). Le principe des marqueurs ratiométriques est explicité Figure 2.6. Ces marqueurs sont constitués d'une protéine fluorescente bleue (CFP) fusionnée à une protéine calmoduline, qui change de conformation en fixant le calcium, et à une protéine fluorescente jaune (YFP). En absence de calcium, la protéine CFP est excitée à 440nm et réémet à 480nm. En présence de calcium, la protéine calmoduline fixe le calcium et change de conformation, rapprochant ainsi les deux protéines fluorescentes CFP et YFP. YFP est excitable à la longueur d'onde d'émission de CFP (480nm), et réémet à 530nm. En excitant à 440nm, en présence de calcium, on observe ainsi un transfert de fluorescence (FRET) entre les deux protéines CFP et YFP qui sont plus proches. On peut ainsi mesurer la concentration de calcium intracellulaire en mesurant le rapport de FRET entre la fluorescence émise par la protéine caméléon à 530nm et à 480nm (Figure 2.6).

L'activité calcique reflète l'activité électrique des neurones. En effet quand le neurone s'active, la concentration de calcium intracellulaire augmente. Cependant, la dynamique du calcium lui-même semble être plus lente que celle de l'activité électrique. Le calcium entre rapidement dans le milieu intracellulaire quand le neurone s'active, puis doit être pompé à l'extérieur de la cellule lorsque le neurone s'inactive. La dynamique d'expulsion du calcium est relativement lente comparée à l'activité électrique. L'activité nerveuse peut ainsi être considérée comme la dérivée de l'activité calcique. Par ailleurs, il ne semble pas y avoir chez *C. elegans* de canaux sodiques responsables de l'activité neuronale. Il n'est pas clair non plus que les neurones du nématode génèrent des potentiels d'action similaires à ceux que l'on peut mesurer sur des neurones de mammifères. L'activité nerveuse dans la plupart des neurones de *C. elegans* semble varier linéairement

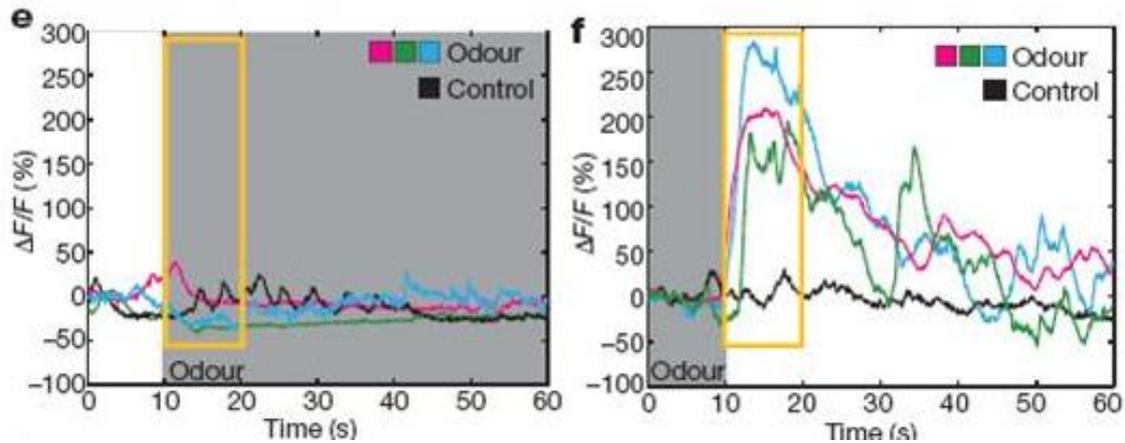


FIGURE 2.7 – Activité calcique du neurone olfactif AWC sur présentation ou retrait d’une molécule odorante [Chalasanani et al., 2007]

selon un procédé passif. On observe donc chez le ver des changements relativement lents de l’activité neuronale (Figure 2.7). Les sondes caméléon utilisées ayant une dynamique rapide, elles ne sont donc a priori pas limitantes pour l’imagerie de l’activité du neurone [Wallace et al., 2008].

Les premières expériences d’imagerie calcique sur le nématode ont été effectuées sur des vers immobilisés à l’aide d’une colle spécifique. Le ver est ensuite immergé dans un tampon salin et l’imagerie de fluorescence est effectuée à fort grossissement (60x). Ces études ont permis de mesurer l’activité calcique dans les muscles du pharynx [Kerr et al., 2000] et de corrélérer l’activité de neurones avec la présence de stimuli sensoriels [Suzuki et al., 2003], [Hilliard et al., 2005], [Kimura et al., 2004]. Cependant la présence de colle est tout de même toxique et il est impossible de mesurer le comportement d’un ver immobilisé, et donc notamment d’étudier avec ce système le circuit neuronal du contrôle moteur de *C. elegans*. De nouvelles méthodes d’imagerie sur des vers semi-restreints ont donc été développées pour corrélérer l’activité neuronale avec le comportement de l’animal. Un système à deux objectifs a été monté pour mesurer simultanément sur un ver collé seulement par la tête l’activité de neurones dans la tête et le mouvement du corps libre de l’animal [Faumont and Lockery, 2006]. D’autres systèmes microfluidiques ont également été développés dans le but de contrôler précisément l’environnement de l’animal pendant l’enregistrement (Figure 2.7) [Chronis et al., 2007], [Chalasanani et al., 2007]. Enfin, un autre système à plus faible grossissement (20X) a été décrit pour suivre manuellement un nématode se déplaçant dans un gradient de température et mesurer simultanément l’activité du neurone thermosensoriel AFD [Clark et al., 2007].

Par ailleurs, le développement récent des canaux ioniques inhibiteurs et activateurs de type channelrhodopsin activables à la lumière ouvre également de nouvelles perspectives pour la compréhension du fonctionnement du réseau de neurones de *C. elegans* [Zhang et al., 2007].

Chapitre 3

Stratégies alimentaires

La présence de nourriture est un paramètre environnemental fondamental pour *C. elegans* et un grand nombre de ses comportements sont affectés par la présence de nourriture et l'état métabolique de l'animal. Les événements de ponte sont par exemple inhibés en absence de nourriture, ce qui permet d'éviter que les larves se développent en conditions défavorables à l'éclosion des oeufs [Trent et al., 1983]. De plus, certaines modalités de comportement sont entièrement dédiées à la nutrition ou à la recherche de nourriture. Le ver est même capable de mémoire associative. Par exemple, le conditionnement d'un ver en présence d'un composé chimique pendant une période de famine diminue ainsi fortement l'attractivité de ce composé pour le ver [Saeki et al., 2001].

C. elegans se nourrit de bactéries. Pour la culture en laboratoire, Sydney Brenner a choisi la souche OP50 de la bactérie de la flore intestinale *Escherichia coli* comme source de nourriture standard pour le ver. Bien qu'il soit peu probable que *C. elegans* puisse se trouver en présence de cette bactérie dans le sol, elle présente l'avantage d'être facile à cultiver, de soutenir la croissance du ver et de croître en couche fine et homogène sur boîte de Petri à la température de culture du ver ($\sim 20^\circ\text{C}$).

3.1 Recherche de nourriture

3.1.1 Chimiotactisme et thermotactisme

Quand un ver bien nourri est isolé dans une zone sans nourriture, celui-ci change de direction fréquemment pendant une dizaine de minutes [Hills et al., 2004]. *C. elegans* peut se réorienter soit par un mouvement de recul (reversal) suivi d'un changement d'orientation marqué, soit par un demi-tour complet (omega-turn). Ce comportement favorise la recherche locale et semble être optimisé pour explorer la zone juste autour de l'animal et retrouver la zone de nourriture que le ver vient de quitter.

Après un temps supérieur à 30 minutes en absence des bactéries dont il se nourrit, *C. elegans* change de comportement et adopte un mouvement constitué de longues courses (runs) entrecoupées de réorientations rapides (pirouettes) [Pierce-Shimomura et al., 1999]. Ce comportement lui

permet de couvrir une zone plus étendue et de rechercher une nouvelle source de nourriture. Ce comportement peut de plus être biaisé pour remonter un gradient chimique ou de température (Figure 3.1).

En effet, de nombreux odorants sont naturellement attractifs pour *C. elegans* car liés à la présence de bactéries nutritives [Bargmann and Horvitz, 1991]. Le ver cherche donc à remonter un gradient d'attractant dans le but de trouver une source de nourriture. *C. elegans* perçoit les odeurs grâce aux amphides situés dans la tête et les phasmides situés dans la queue. Cependant, les phasmides ne sont pas nécessaires pour le chimiotactisme du ver. Le ver ne perçoit donc l'odorant qu'en un point et ne peut mesurer le gradient que temporellement au cours de son mouvement.

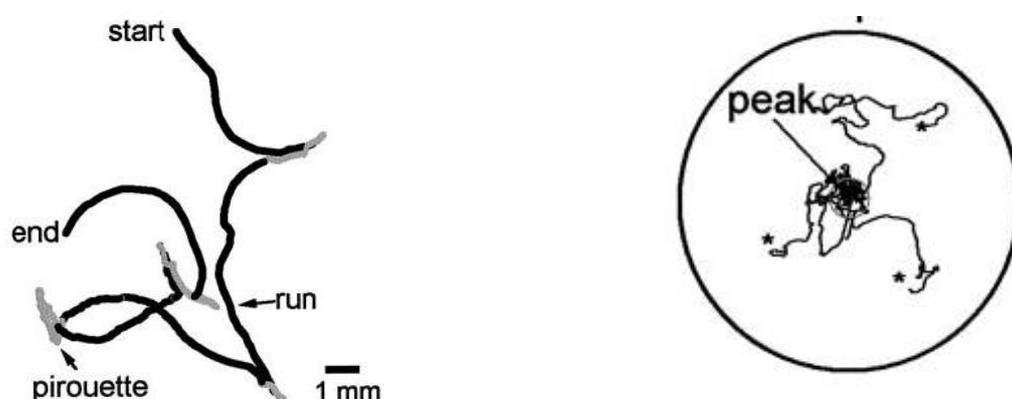


FIGURE 3.1 – Gauche : Alternance de runs et de pirouettes. Droite : Trajectoires de trois vers dans un gradient circulaire de NH_4Cl [Pierce-Shimomura et al., 1999].

De manière similaire au chimiotactisme bactérien [Berg and Brown, 1972], *C. elegans* biaise la fréquence des pirouettes pour remonter un gradient d'attractant chimique ou fuir une odeur répulsive. La probabilité de réorientation augmente ainsi quand le ver perçoit une diminution de la concentration d'attractant au cours de son mouvement et diminue quand le ver se déplace dans la direction du gradient [Pierce-Shimomura et al., 1999]. Plus récemment, il a été montré qu'un comportement plus fin se superpose à l'alternance de pirouettes et de runs au cours du chimiotactisme du ver. Pendant les périodes de runs, en plus d'ajuster la probabilité d'effectuer une pirouette, le ver ajuste également progressivement la direction de son mouvement vers le sommet du gradient [Iino and Yoshida, 2009].

Par ailleurs, *C. elegans* vit dans le sol et est ectotherme. Il peut vivre sans problèmes de croissance et de reproduction entre 15°C et 25°C. Le ver fuit les hautes températures, auxquelles son taux de fécondité décroît [Wittenburg and Baumeister, 1999]. De plus, *C. elegans* survit à la congélation si celle-ci est lente. Dans sa gamme de température physiologique (15-25°C), le ver garde une mémoire de la température qu'il a expérimentée au cours des 2h précédentes [Mohri et al., 2005]. Par la suite, en absence de bactéries, le ver est attiré par la température mémorisée si il a été en présence de nourriture durant le conditionnement, et est repoussé par cette température si celle-ci a été associée à une période de famine. Ainsi, dans un gradient de

température sans bactéries, un ver qui a été cultivé en présence de nourriture à la température T_c biaise l'alternance de runs et de pirouettes pour se placer dans le gradient au point de température T_c [Hedgecock and Russell, 1975]. Le ver se déplace ensuite très précisément le long de la courbe isotherme (Figure 3.2). Cette stratégie de thermotactisme pourrait être un mécanisme robuste de régulation de la température pour le ver dans son environnement naturel [Ramot et al., 2008]. Le thermotactisme est contrôlé par certains neurones des amphides : le neurone AFD qui répond à l'augmentation de la température et les interneurones AIY et AIZ [Mori and Ohshima, 1995], [Kimura et al., 2004], [Clark et al., 2006]. Les neurones olfactifs AWC répondent également à des changements de température [Kuhara et al., 2008], [Biron et al., 2008]. Le seuil d'activation des neurones AWC et AFD dépend de plus de la température de culture et ces neurones seraient donc le site de mémorisation de la température.

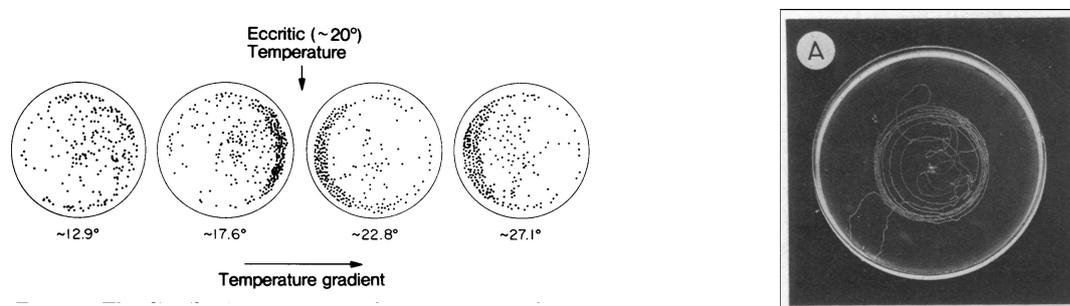


FIGURE 3.2 – Thermotactisme de *C. elegans*. Gauche : une population de nématodes est attirée par sa température de culture (20°C). Droite : tracking isotherme dans un gradient circulaire de température (ver élevé à 20°C) [Hedgecock and Russell, 1975].

En conclusion, en absence de nourriture *C. elegans* adopte après une période de recherche locale une stratégie de recherche de nourriture à plus longue distance basée sur des périodes de déplacements rapides entrecoupées de réorientations aléatoires. Le ver peut de plus moduler sa fréquence de réorientation en fonction de ses perceptions sensorielles pour se déplacer le long d'un gradient d'odorant ou de température associé à la présence de nourriture.

3.1.2 Adaptation aux périodes de famines : la larve Dauer

Dans la nature, la nourriture est répartie en patches assez éloignés les uns des autres. Quand une population de *C. elegans* épuise les ressources de nourriture accessibles, les nématodes se retrouvent donc très concentrés dans une zone défavorable. Ainsi, à grande concentration de vers (donc de phéromone) et faible concentration de nourriture, les vers aux premiers stades larvaires peuvent arrêter leur développement. Cet arrêt du développement peut se produire soit au stade larvaire L1, soit, si la période de famine se prolonge, en basculant à partir du stade larvaire L2 vers le stade alternatif Dauer [Cassada and Russell, 1975] (voir 1.3). Le passage au stade Dauer est également favorisé à haute température. La transition est contrôlée par les voies de signalisation insuline, TGF-beta et guanylate cyclase par les neurones des amphides ASI et ASJ notamment. Si la larve Dauer retrouve des conditions de croissance favorable, elle mue vers

le stade larvaire L4 puis se développe normalement en animal adulte.

La larve Dauer est très différente morphologiquement de la larve L3, son rayon est beaucoup plus fin, son pharynx est fermé et compressé et ne peut pas pomper de nourriture. Cette larve ne se nourrit donc pas et possède un métabolisme complètement différent de la larve L3. Au stade Dauer, *C. elegans* est extrêmement résistant aux attaques environnementales telles que les chocs osmotiques par exemple et sur-exprime certaines protéines de résistance au stress. La larve Dauer est très peu mobile, mais peut se déplacer à grande vitesse en cas de stimulation tactile. Sa durée de vie est par ailleurs très allongée et ce stade semble donc être un état résistant dans lequel le ver entre en attente d'une situation plus favorable.

3.2 Adaptation à la présence de nourriture

3.2.1 Ralentissement en présence de nourriture

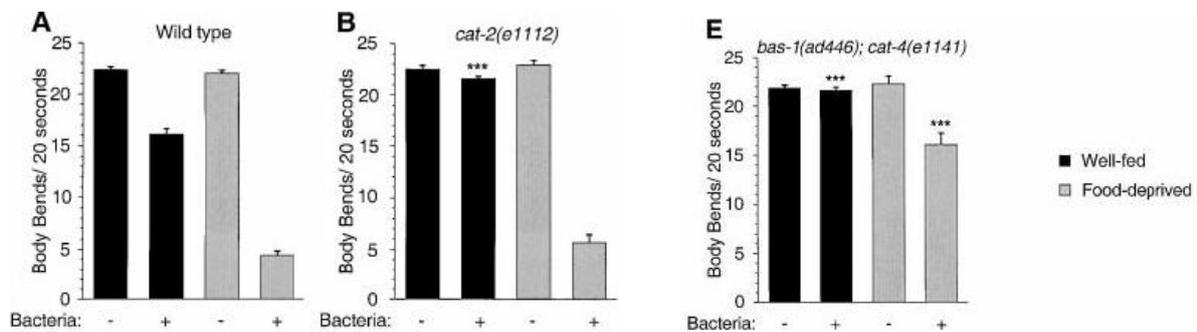


FIGURE 3.3 – Ralentissement de *C. elegans* en présence de nourriture. en noir : ver bien nourri, en gris : ver affamé [Sawin et al., 2000]. Le mutant *cat-2* possède un défaut dans la synthèse de la dopamine alors que le double mutant *bas-1,cat-4* est déficient à la fois pour la synthèse de la dopamine et de la sérotonine.

C. elegans ralentit en présence de nourriture. La vitesse de déplacement du ver est alors plus faible qu'en absence de nourriture [Sawin et al., 2000]. De plus si le ver a traversé une période de famine avant de retrouver une source de nourriture, le ralentissement est renforcé [Sawin et al., 2000] (Figure 3.3A). Le ralentissement basal ("basal slowing response") est contrôlé par la dopamine alors que l'augmentation du ralentissement après une période de famine ("enhanced slowing response") est contrôlé par la sérotonine (Figure 3.3 B-E). On peut supposer que ce ralentissement permet au nématode de ne pas quitter les zones où il peut se nourrir, et cela d'autant plus après une période de famine.

3.2.2 Comportement social

En présence de nourriture, certains isolats naturels de *C. elegans* démontrent un comportement dit "social". Ces vers sociaux s'agrègent au bord du patch de bactéries contrairement aux vers N2 qui se déplacent solitairement (Figure 3.4). Il existe certaines mutations qui déclenchent

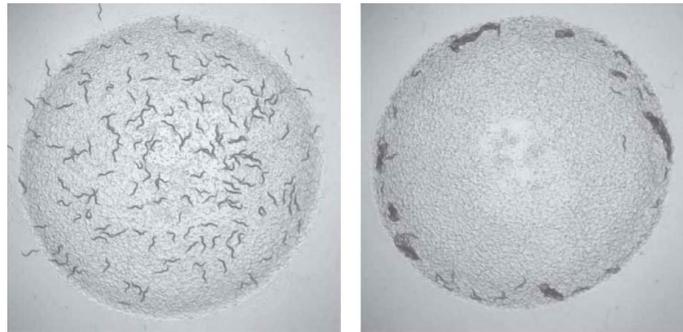


FIGURE 3.4 – Gauche : ver sauvage N2, comportement solitaire. Droite : mutant *npr-1* de N2, comportement social

le comportement social chez le ver N2 (mutations du gène *npr-1* par exemple). Il a été montré que cette agrégation était contrôlée par les neurones sensoriels qui contrôlent les comportements d'aversion [de Bono et al., 2002]. Plus précisément, les souches sociales ont une aversion pour les hautes concentrations d'oxygène (qui doivent correspondre à la surface du sol) et s'agrègent pour maintenir une faible concentration d'oxygène au milieu de l'agrégat [Cheung et al., 2005]. Ce comportement n'a lieu qu'en présence de nourriture. Les vers de souches sociales maintenus seuls et ne pouvant donc pas s'agréger sont par ailleurs beaucoup plus actifs que les vers N2 en présence de nourriture.

3.2.3 Quiescence

On peut observer chez *C. elegans* des périodes de quiescence en présence de bactéries de forte qualité nutritive [You et al., 2008]. Une période de quiescence est définie comme une période durant laquelle le ver est complètement immobile musculairement et ne se nourrit pas. De manière similaire à ce que l'on peut observer chez les mammifères, ces périodes semblent résulter de la satiété du ver. La quiescence est contrôlée par les voies de signalisation de l'insuline et des TGF-beta [You et al., 2008]. On peut également observer ces périodes de quiescence en présence de nourriture standard juste avant les quatre mues du ver. Elles pourraient donc avoir un rôle lors du développement [Raizen et al., 2008].

3.3 Dwelling et Roaming, un comportement à deux états

En présence de nourriture, *C. elegans* adopte un comportement d'alternance entre deux phases d'activité locomotrice [Fujiwara et al., 2002]. En présence d'une grande quantité de bactéries *E. coli* OP50, les vers sauvages se trouvent durant à peu près 80% du temps dans une phase de faible activité (appelée dwelling) avec une vitesse moyenne très faible et de nombreuses réorientations (Figure 3.5). A peu près 20% du temps, ils se déplacent au contraire à vitesse élevée avec peu de réorientations. Cette seconde phase d'activité est appelée roaming [Fujiwara et al., 2002].

D'autre part, Fujiwara *et al* ont observé que les mutants de gènes nécessaires à la perception

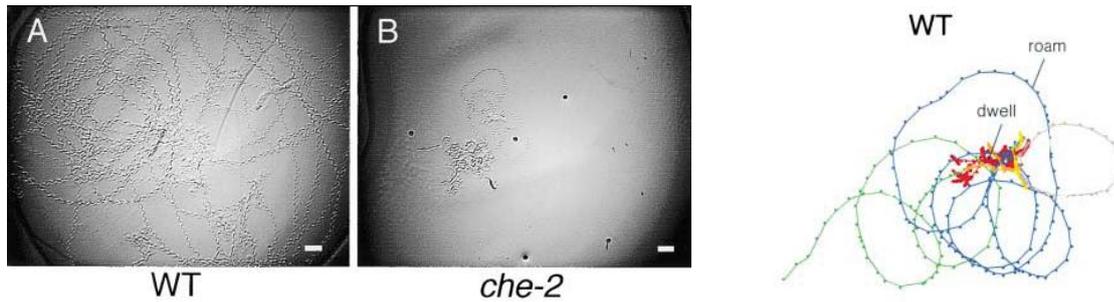


FIGURE 3.5 – Comportement à deux états de *C. elegans* en présence de bactéries. [Fujiwara et al., 2002]

sensorielle *che-2*, *che-3* et *osm-6* passent beaucoup moins de temps dans la phase active que le ver sauvage (Figure 3.5). Ces mutants possèdent une structure des cils sensoriels anormale et ont donc une perception chemosensorielle et thermosensorielle altérée, ainsi qu'une réponse diminuée aux phéromones (notamment à la phéromone Dauer). Le défaut de comportement de ces mutants impliquerait que la proportion de temps passée dans chaque phase d'activité est modulée par les perceptions sensorielles du ver. Cette idée est étayée par le fait que l'expression du gène sauvage de *che-2* sous le contrôle de promoteurs spécifiques des amphides permet de restaurer le phénotype du mutant *che-2* [Fujiwara et al., 2002].

L'existence de mutants sensoriels ayant une proportion de roaming et de dwelling différente du ver sauvage laisse penser que ce comportement est contrôlé par le système neuronal du ver. On pourrait alors imaginer qu'il soit optimisé pour répondre au mieux aux contraintes environnementales. Ainsi, Shtonda & Avery (2006) ont montré que la proportion de dwelling d'un ver N2 sauvage augmente avec la qualité nutritionnelle des bactéries en présence [Shtonda and Avery, 2006]. Le ver module donc l'alternance des deux phases en fonction de la qualité de son environnement.

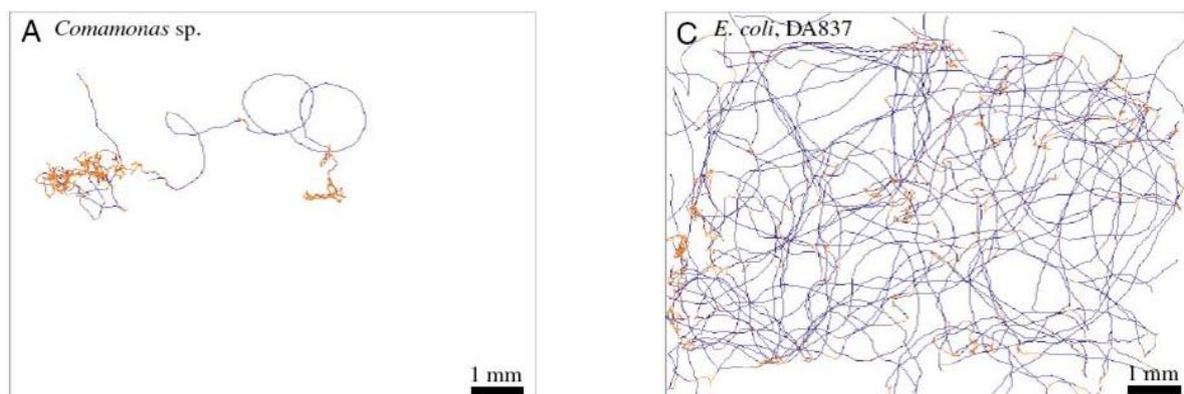


FIGURE 3.6 – *C. elegans* module le pourcentage de temps passé dans chaque phase d'activité en fonction la qualité nutritionnelle des bactéries consommées. Trajectoire d'une larve L1 pendant 8h sur un tapis bactérien Droite : *Comamonas* sp. Gauche : *E. coli* DA837. [Shtonda and Avery, 2006]

La qualité nutritionnelle d'une souche bactérienne est définie dans ce cas par la durée du cycle de vie d'un ver se nourrissant de bactéries de la souche en question. Plus l'animal se développe vite, plus la valeur nutritive de la souche consommée est élevée. On observe que certaines bactéries ont une moins grande valeur nutritive que d'autres sans pour autant être pathogènes pour le ver. Et donc, plus la valeur nutritive de la souche en présence est élevée, plus le ver passe de temps dans la phase inactive de dwelling (Figure 3.6, 3.7). Par ailleurs, l'ablation des neurones des amphides AIY et ASI entraîne une forte diminution de la longueur des phases de roaming [Shtonda and Avery, 2006]. La mutation du gène *ttx-3* nécessaire pour le développement du neurone AIY [Hobert et al., 1997] a également un effet équivalent à l'ablation laser du neurone. Par ailleurs, l'interneurone AIY semble plus généralement être nécessaire pour supprimer les réorientations lors du mouvement du ver [Tsalik and Hobert, 2003].

L'alternance des phases de roaming et de dwelling chez *C. elegans* semble donc être un comportement fortement lié à la présence de nourriture et contrôlé par le système neuronal du ver pour optimiser sa stratégie en fonction de son environnement. De plus, la perception sensorielle semble avoir un rôle important dans la modulation de ce comportement.

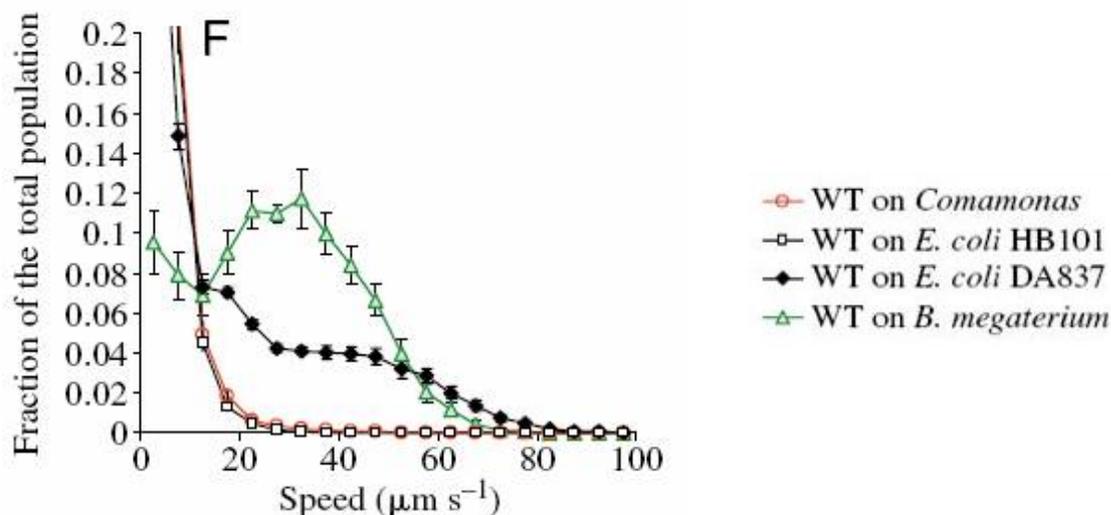


FIGURE 3.7 – Histogramme de vitesse de *C. elegans* se nourrissant de différentes souches bactériennes [Shtonda and Avery, 2006].

Deuxième partie

Bases sensorielles et moléculaires d'un comportement alimentaire de *C. elegans*

Chapitre 4

Analyse du comportement de *C. elegans* en présence de nourriture

4.1 Premières observations

Lorsque l'on observe la locomotion de *C. elegans* sur une boîte de Petri NGM-Agar recouverte uniformément de bactéries *E. coli* OP50, on peut discerner deux modes d'activité du ver (voir 3.3, [Fujiwara et al., 2002]). On observe d'une part des phases de mouvement sinusoïdal rapide et dirigé durant lesquelles le ver peut parcourir de grandes distances (\sim cm), et d'autre part des phases de faible mobilité durant lesquelles le ver effectue de nombreux aller-retours et possède au final un déplacement moyen quasi nul (Figure 4.1). La phase active a été appelée phase de "roaming" par Fujiwara *et al* alors que la phase inactive a été nommée "dwelling". Durant la phase de dwelling, le ver semble se nourrir, il n'est pas immobile, effectue de nombreux mouvements saccadés de la tête et aucune phase de quiescence n'est observable. Aux sites de dwelling on observe généralement également la présence d'œufs.

Ce comportement semble donc être couplé avec d'autres comportements fondamentaux pour l'animal (prise de nourriture, ponte). Fujiwara *et al* ont par ailleurs montré que ce comportement biphasique était régulé par la perception sensorielle de l'animal [Fujiwara et al., 2002]. De



FIGURE 4.1 – Comportement biphasique de *C. elegans*. Gauche : Roaming, pas de traces de réorientations. Droite : Dwelling, multiples traces et position biaisée de l'animal.

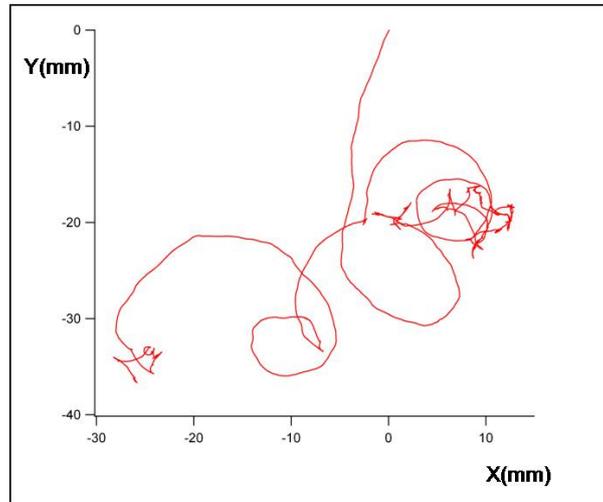


FIGURE 4.2 – Trajectoire d’un ver N2 sur une boîte NGM recouverte de façon homogène de bactéries OP50 (2h d’enregistrement).

plus, la proportion de temps passé dans chaque phase dépend de la qualité nutritionnelle des bactéries en présence (voir 3.3, [Shtonda and Avery, 2006]). L’alternance des phases actives et inactives semble donc être contrôlée finement par l’animal et pourrait avoir un rôle écologique important. Pour comprendre plus précisément quels paramètres environnementaux sont intégrés par le nématode pour contrôler ce comportement et quelles voies sensorielles et neuronales sont en jeu, j’ai développé une méthode de mesure quantitative de la proportion du temps passé dans chacune de ces phases d’activité.

Pour quantifier ce comportement, j’ai tout d’abord utilisé un premier système permettant le suivi d’un ver unique se déplaçant sur une boîte NGM recouverte des bactéries OP50 dont le ver se nourrit. Ce système est constitué d’une platine motorisée et d’un objectif de faible grossissement (1X) couplé à une caméra. La boîte de Petri est illuminée de façon homogène par une diode électroluminescente (LED) recouverte d’un diffuseur. Le centre de masse du ver est maintenu en temps réel au centre de l’image grâce au mouvement de la platine motorisée (voir Annexe C). L’ensemble est par ailleurs contrôlé en température. Grâce à ce système, j’ai pu enregistrer les trajectoires de vers sauvages de la souche N2 à 5Hz pendant plusieurs heures. On observe sur une trajectoire de 2 heures les deux phases d’activité du ver (Figure 4.2). Ce système mono-ver permet l’analyse fine du comportement car le ver traqué est imagé avec une bonne résolution spatiale (Figure 4.1). Cette méthode permet notamment la détection précise des évènements de pontes ou de demi-tours du type oméga-turns.

Cependant, dans le but de pouvoir obtenir rapidement un ensemble de données statistiquement significatif dans un grand nombre de conditions, j’ai développé un second système de tracking permettant de suivre la trajectoire d’une dizaine de nématodes sur une boîte de Petri (Figure 4.3).

Cette méthode consiste à éclairer de façon très homogène la boîte de Petri à l’aide d’un

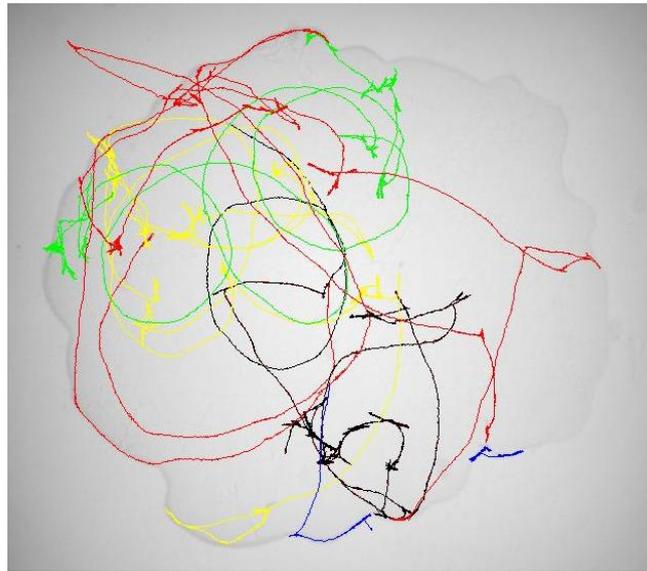


FIGURE 4.3 – Enregistrement de trajectoires de 7 vers N2 sur une boîte NGM recouverte de façon homogène de bactéries OP50 (2h d'enregistrement).

système diffusant composé de multiples LEDs et d'enregistrer à la fréquence voulue l'image de l'ensemble de la boîte contenant plusieurs individus, à l'aide d'un objectif macro d'appareil photographique projetant sur une caméra CCD. La trajectoire de chacun des vers est extraite a posteriori par un programme sous MATLAB (voir Annexe C). Pour minimiser les temps d'analyse, j'ai limité la fréquence d'acquisition dans le système multi-vers à une image toutes les 400ms. Ce système est également contrôlé en température et permet des enregistrements de quelques heures. Cette seconde méthode permet donc le suivi de plusieurs vers en même temps et offre donc l'intérêt de générer des données plus rapidement que le système mono-ver. J'ai donc essentiellement utilisé cette méthode par la suite bien que sa résolution spatiale soit bien plus faible. En effet, bien que la méthode multi-vers soit suffisante pour discriminer les deux phases d'activité de *C. elegans*, elle ne permet pas d'observer de paramètres du mouvement du ver différents de la trajectoire du centre de masse (tels que la posture du ver par exemple, ou l'amplitude de la sinusoïde de son mouvement), et ne permet pas non plus de détecter les événements de ponte.

4.2 Méthode d'analyse quantitative

La vitesse semble être un des paramètres de la trajectoire déterminant pour pouvoir quantifier la proportion de temps passé dans chaque phase d'activité. J'ai donc calculé pour chaque trajectoire la vitesse du ver en fonction du temps (Figure 4.4). Bien que la distribution des vitesses paraisse bimodale, il est difficile de définir un critère permettant de discriminer les deux phases dans ces conditions en utilisant uniquement la mesure de vitesse (voir l'histogramme Figure 4.4). J'ai donc choisi d'utiliser deux paramètres du mouvement pour discriminer les deux phases d'activité : la vitesse et un paramètre représentatif du taux de réorientation.

En effet, dans la phase de dwelling, le ver possède une vitesse faible et un fort taux de réorientation alors que dans la phase de roaming, le ver a une vitesse élevée et se réoriente très peu. J'ai ainsi défini le paramètre de courbure Theta comme la variation d'angle entre 3 points successifs de la trajectoire, donc 3 positions successives du centre de masse du ver (Figure 4.5). Ce paramètre représente bien la réorientation du ver au cours de son mouvement. Si à un instant t le ver effectue un demi-tour, $\text{Theta}(t)$ sera égal à 180° , si au contraire il se déplace en ligne droite, $\text{Theta}(t)$ sera égal à zéro. L'histogramme du paramètre de réorientation Theta laisse clairement apparaître deux pics correspondant aux deux phases d'activité du ver (Figure 4.5).

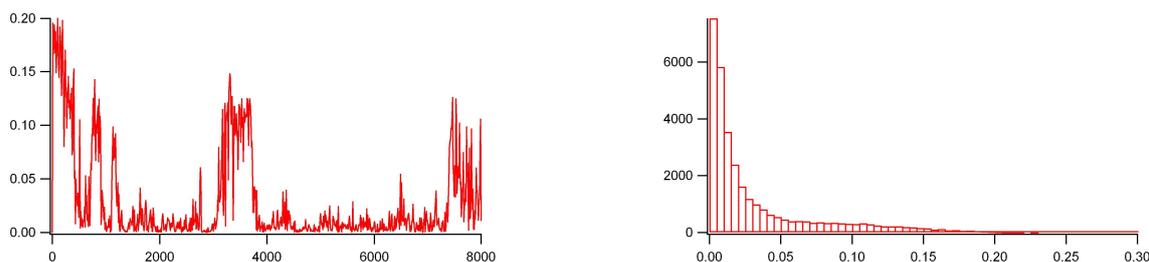


FIGURE 4.4 – Mesure de la vitesse de *C. elegans* en présence de bactéries. Gauche : Vitesse $V(t)$ (mm/s) lissée sur 10s d'un ver sauvage pendant 2h. Droite : histogramme de vitesse pour l'ensemble des trajectoires de vers N2 enregistrées en conditions standard (mm/s, lissée avec une fenêtre de 10s).

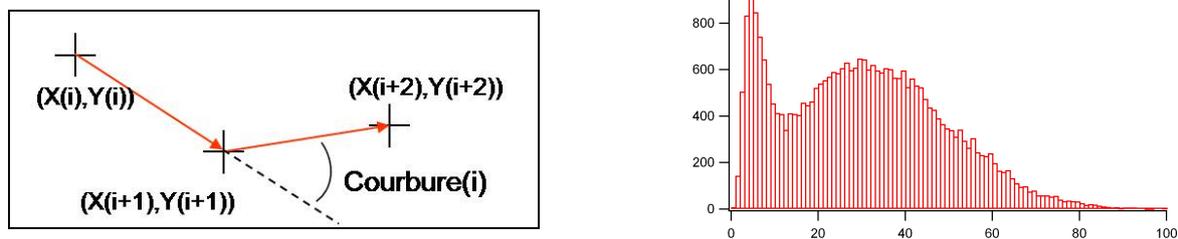


FIGURE 4.5 – Mesure d'un paramètre de réorientation de la trajectoire de *C. elegans* en présence de bactéries. Gauche : Définition du paramètre de courbure Theta. Droite : histogramme de Theta pour l'ensemble des trajectoires de vers N2 enregistrées en conditions standard ($^\circ$, lissé avec une fenêtre de 10s).

Les phases d'activité de roaming et de dwelling ont des temps caractéristiques de l'ordre de la minute. J'ai donc lissé les variations rapides de la trajectoire, tels que les mouvements dus au déplacement sinusoïdal ou les événements de réorientations uniques au milieu d'une longue phase de course. Pour cela, j'ai coupé chaque trajectoire en intervalles de 10s et calculé la vitesse V et le paramètre de courbure Theta moyens pour chacun de ces intervalles. Pour comparaison, dans ces conditions la période de la sinusoïde est à peu près de 4s. Par ailleurs, la résolution temporelle de l'enregistrement est de 200ms pour le système mono-ver et de 400ms pour le système multi-vers.

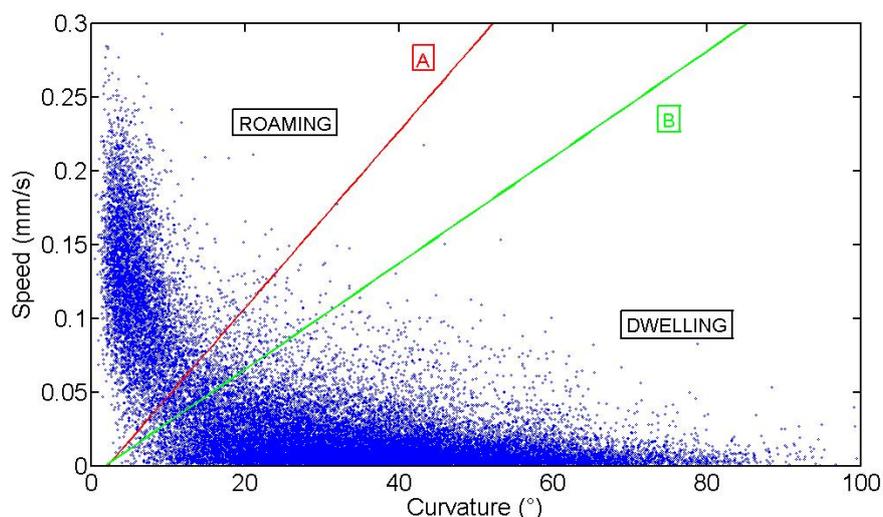


FIGURE 4.6 – Représentation de l'ensemble des points (V, Θ) provenant des enregistrements de vers N2 en conditions standard (40 vers, 80h d'enregistrement au total). Au dessus de la droite A, phase de roaming, au dessous de la droite B, phase de dwelling, entre les deux droites, zone d'incertitude d'attribution.

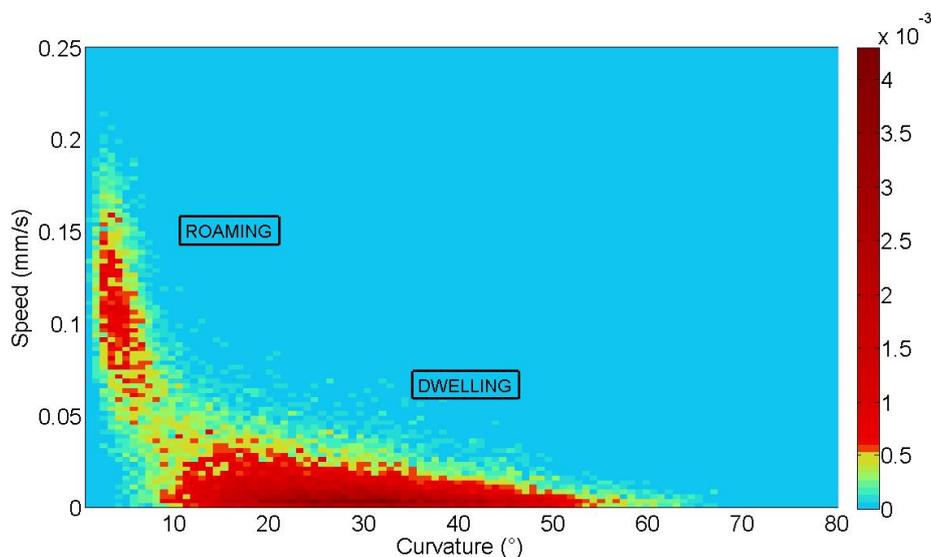


FIGURE 4.7 – Carte de densité de l'ensemble des points (V, Θ) provenant des enregistrements de vers N2 en conditions standard (40 vers, 80h d'enregistrement au total).

Finalement, la représentation dans le plan (V, Θ) de l'ensemble des données lissées provenant des trajectoires enregistrées de vers sauvages N2 (40 vers, système multi-vers) en conditions standard (20°C , boîtes standard, voir Annexe A) fait apparaître distinctement deux clusters correspondant aux deux phases d'activité attendues (Figures 4.6, 4.7). Les points du cluster de vitesse élevée et de courbure faible correspondent à des événements de la phase de roaming. A

l'inverse, les points du cluster de faible vitesse et forte courbure appartiennent à la phase de dwelling. Pour obtenir quantitativement la proportion du temps passé dans chaque phase d'activité, il faut pouvoir attribuer chaque point à l'un des deux clusters et déterminer l'erreur d'attribution.

J'ai observé empiriquement que la méthode la plus reproductible pour séparer les deux clusters est de tracer à la main à partir de l'ensemble des données obtenues pour le ver sauvage deux droites séparant le plan (V,Theta) en trois parties (Figure 4.6). Au dessus de la droite A, les points sont attribués à la phase de roaming (haute vitesse et faible fréquence de réorientation), en dessous de la droite B à la phase de dwelling (faible vitesse et haute fréquence de réorientation). La zone située entre les deux droites A et B correspond à l'incertitude de la mesure. Ces droites déterminées à partir des mesures effectuées sur le ver sauvage sont ensuite utilisées pour tous les mutants dans toutes les conditions. Les autres méthodes de segmentation automatique a priori plus objectives que j'ai essayées peuvent être optimisées pour le ver sauvage mais donnent ensuite des résultats incohérents lors de l'analyse des trajectoires de certains mutants, notamment lorsque l'un des deux clusters devient négligeable.

On calcule donc la proportion du temps passé en phase de roaming P_r :

$$P_r = \frac{\text{Nombre de points au dessus de A} + 1/2 \times \text{Nombre de points entre A et B}}{\text{Nombre total de points}}$$

Et l'erreur de segmentation entre les deux clusters ΔP_r comme :

$$\Delta P_r = \frac{1/2 \times \text{Nombre de points entre A et B}}{\text{Nombre total de points}}$$

Pour prendre en compte l'erreur statistique liée au faible nombre de vers, j'ai répété 5 à 10 fois l'enregistrement des trajectoires de 5 à 7 vers pendant deux heures pour chaque condition expérimentale. J'ai ensuite effectué l'analyse précédente pour chaque enregistrement avec les droites A et B définies pour l'ensemble des données du ver sauvage. Le pourcentage de roaming pour chaque condition est donc défini comme la moyenne des résultats obtenus pour les différents enregistrements correspondant à cette condition.

L'erreur de segmentation et l'erreur statistique (erreur standard de la moyenne des différents enregistrements) sont du même ordre de grandeur dans la plupart des conditions et l'erreur statistique est généralement plus élevée. Le pourcentage de temps passé dans la phase de roaming pour une condition donnée sera représenté par la suite comme la moyenne des différentes expériences plus ou moins l'erreur standard de la moyenne. Pour deux conditions expérimentales différentes, la significativité statistique de la différence du pourcentage de temps passé dans la phase de roaming est vérifiée par un test statistique (t-test de Student, bilatéral).

4.3 Comportement du ver sauvage en conditions standard

On obtient le pourcentage de temps passé dans la phase de roaming P_r par la méthode précédente appliquée aux différents enregistrements effectués pour la souche sauvage N2 dans les conditions standard (boîte NGM recouverte de bactéries OP50 en grande quantité, 20°C).

Pour le système mono-ver : $P_r = 19 \pm 2\%$ (107h de suivi, ~ 50 vers)

Pour le système multi-vers : $P_r = 21 \pm 2\%$ (88h de suivi, ~ 40 vers)

Pour le ver sauvage, les résultats obtenus par les deux méthodes de suivi sont donc cohérents et les deux systèmes peuvent donc être utilisés indifféremment. Les résultats sont également cohérents avec les mesures des études précédentes [Fujiwara et al., 2002]. Bien qu'il soit dans des conditions quasi optimales (grande quantité de nourriture, température adéquate, etc...), il faut noter que *C. elegans* attribue tout de même une proportion non négligeable de son temps à l'exploration de son environnement.

Par ailleurs on peut également analyser plus précisément la distribution des intervalles de temps passé dans chaque phase d'activité (Figures 4.8, 4.9). En supposant une décroissance exponentielle de la distribution en $\exp(-t/\tau)$, on observe un temps caractéristique τ de l'ordre de 300s pour les phases de dwelling et de 60s pour les phases de roaming pour le ver sauvage en conditions standard.

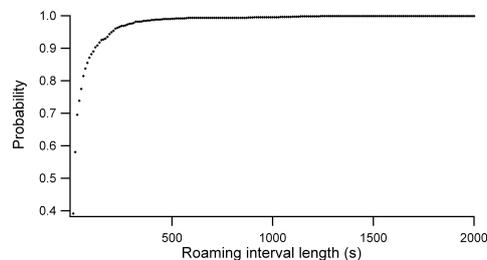


FIGURE 4.8 – Probabilité d'observer un événement de roaming de durée inférieure à t pour un ver N2 en conditions standard (Intégrale normalisée de la distribution d'intervalles de roaming).

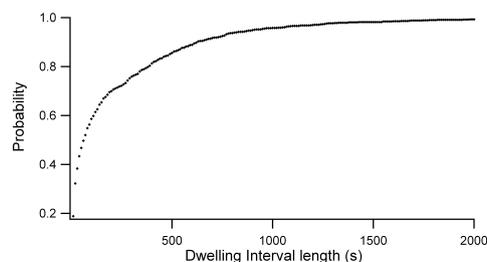


FIGURE 4.9 – Probabilité d'observer un événement de dwelling de durée inférieure à t pour un ver N2 en conditions standard (Intégrale normalisée de la distribution d'intervalles de dwelling).

De même, un calcul d'auto-corrélation de la vitesse du ver montre une décroissance exponentielle et donne un temps caractéristique d'auto-corrélation de l'ordre de 2 minutes (Figure 4.10). Le calcul d'auto-corrélation ne discrimine pas les deux phases d'activité et ces résultats sont donc cohérents.

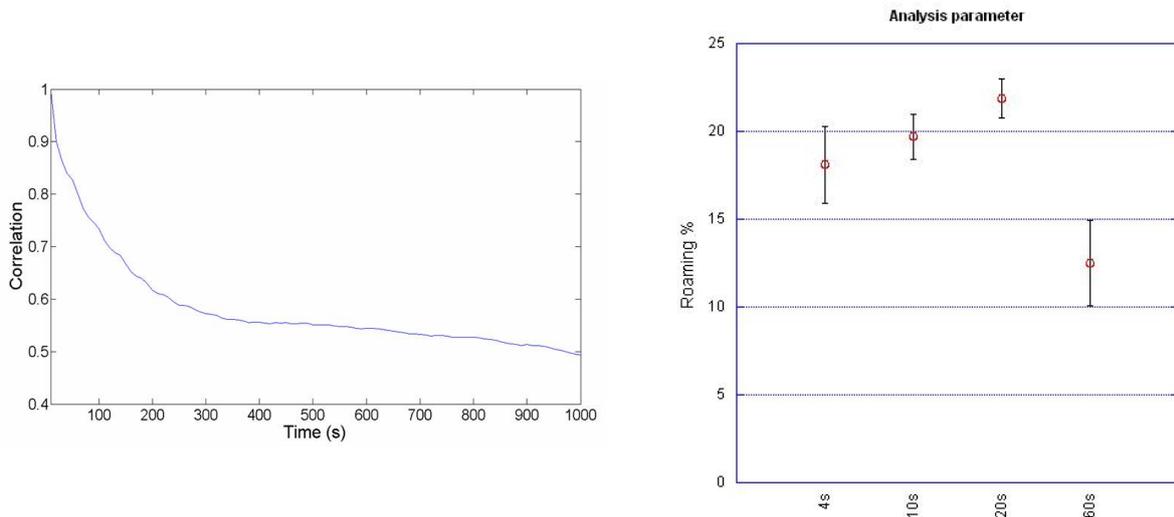


FIGURE 4.10 – Gauche : Coefficient d'auto-corrélation de la vitesse de la souche N2. Droite : Dépendance de P_r avec le paramètre de lissage

Par ailleurs, le pourcentage de temps passé dans la phase de roaming dépend assez peu du paramètre de lissage que j'avais arbitrairement choisi à 10s tant que celui-ci est inférieur à une minute (Figure 4.10). Il est en effet normal que l'analyse soit biaisée si on lisse les données sur un temps plus long que la durée caractéristique d'une phase (de l'ordre de la minute).

Finalement, ces résultats permettent de valider la méthode d'analyse et de montrer que les deux systèmes de suivi sont équivalents.

Chapitre 5

Effets des conditions environnementales et de l'expérience de l'animal

L'alternance des phases d'activité de *C. elegans* est contrôlée par les perceptions sensorielles de l'animal [Fujiwara et al., 2002]. Ce comportement est donc régulé par le système nerveux du ver et dépend a priori des conditions environnementales. J'ai donc choisi d'étudier tout d'abord l'influence de paramètres critiques de l'environnement de *C. elegans*, la concentration en bactéries et la température, sur ce comportement biphasique. J'ai également quantifié l'impact des expériences nutritionnelles antérieures du ver et le couplage entre ce comportement et la reproduction.

5.1 Influence de la concentration en nourriture

En présence d'une grande quantité de bactéries OP50 (en conditions standard), *C. elegans* passe 20% de son temps dans la phase active et 80% dans la phase inactive. Au contraire, en absence de bactéries, la phase de dwelling n'est pas observée et le ver est constamment actif. On observe ainsi une phase inactive en présence de bactéries qui semble inexistante en l'absence de nourriture. On peut donc se demander quelle concentration de bactéries est nécessaire pour initier ce comportement, et si celui-ci est modulé par la concentration en bactéries de l'environnement. J'ai donc mesuré la proportion du temps passé en phase de roaming de vers sauvages pour une large gamme de concentrations en bactéries.

Pour cela, il est nécessaire d'enregistrer la trajectoire de vers N2 sur des boîtes NGM ensemencées avec une quantité contrôlée de bactéries qui ne varie pas dans le temps. J'ai utilisé des bactéries traitées à la streptomycine, un antibiotique de la famille des aminosides qui bloque la traduction en se fixant sur les ribosomes. La concentration de streptomycine utilisée ici (50 μ g/ml) bloque la multiplication des bactéries mais ne les lysent pas. Les bactéries traitées sont ensuite comptées et étalées sur des boîtes NGM-streptomycine. On obtient ainsi des boîtes NGM recou-

vertes d'une concentration contrôlée de bactéries (de 0 à 10^8 bactéries par cm^2 , voir Annexe A). La mesure de la proportion du temps passé en phase de roaming pour des vers de la souche N2 sur ces boîtes à 20°C donne les résultats suivants (Figure 5.1).

Concentration en bactéries (bactéries par cm^2)	Pourcentage de roaming	Nombre de vers
0	$92 \pm 4 \%$	10h, ~ 20 vers
$5 \cdot 10^3$	$95 \pm 3 \%$	2h, ~ 5 vers
$5 \cdot 10^4$	$88 \pm 3 \%$	18h, ~ 20 vers
$1,5 \cdot 10^5$	$62 \pm 7 \%$	16h, ~ 20 vers
$3 \cdot 10^5$	$58 \pm 5 \%$	18h, ~ 20 vers
$5 \cdot 10^5$	$23 \pm 3 \%$	21h, ~ 10 vers
$5 \cdot 10^6$	$25 \pm 8 \%$	18h, ~ 10 vers
$5 \cdot 10^7$	$10 \pm 2 \%$	20h, ~ 10 vers
$2 \cdot 10^8$	$16 \pm 3 \%$	17h, ~ 10 vers

TABLE 5.1 – Variation du pourcentage de roaming de vers sauvages N2 avec la concentration en bactéries (Barres d'erreur : s.e.m. des valeurs obtenues pour différentes expériences à une même concentration).

On observe que le ver passe la majorité de son temps dans la phase inactive sur plusieurs ordres de grandeur de concentration en bactéries (de $5 \cdot 10^5$ à 10^8 bactéries par cm^2 , Figure 5.1). Ces valeurs sont par ailleurs comparables avec celle obtenue pour des vers sauvages sur des boîtes standardensemencées avec des bactéries OP50 non traitées à la streptomycine ($P_r = 20\%$). On peut donc supposer que le traitement avec cet antibiotique n'affecte pas significativement le comportement du ver. En absence de bactéries, la proportion de dwelling est négligeable, et cela jusqu'à une concentration de $5 \cdot 10^4$ bactéries par cm^2 . On observe donc un basculement entre $5 \cdot 10^4$ et $5 \cdot 10^5$ bactéries par cm^2 d'un état où le ver se comporte comme si il était en absence de bactéries à un état où le ver déclenche le comportement de dwelling et alterne entre deux phases d'activité. Pour les concentrations correspondant à la transition, on observe une assez forte variabilité de ver à ver. A ces concentrations critiques, certains vers passent la majorité de leur temps en phase de dwelling alors que d'autres sont actifs la plupart du temps. Leur comportement vers la concentration critique semble de plus beaucoup plus sensible aux variations fines de l'environnement qu'aux concentrations situées au dessus ou au dessous de la transition.

En analysant les histogrammes de vitesses en fonction de la concentration en bactéries (Figure 5.1), on observe d'autre part un second effet : la vitesse du ver dans la phase de roaming diminue

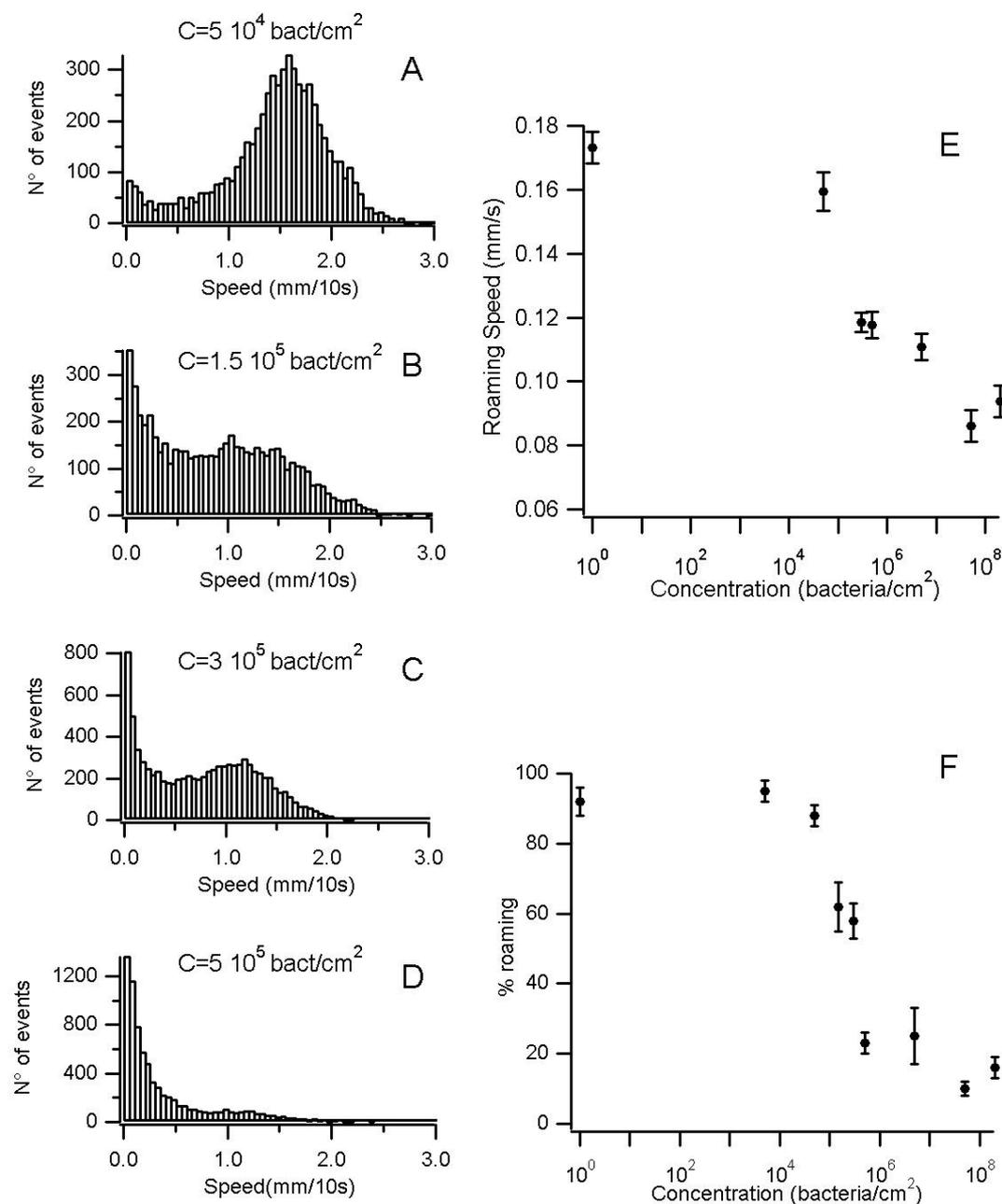


FIGURE 5.1 – Influence de la concentration en bactéries sur le comportement de dwelling/roaming. A-D : Histogrammes de vitesse de vers N2 à 20°C en présence de différentes concentrations en bactéries. E : Variation de la vitesse dans la phase de roaming en fonction de la concentration en bactéries. F : Variation du pourcentage de roaming avec la concentration en bactéries.

lorsque la concentration en bactéries augmente. Ainsi, *C. elegans* a d'une part une plus grande probabilité de quitter une zone si il n'y a pas assez de nourriture, et augmente d'autre part sa vitesse de déplacement dans la phase de roaming lorsque la concentration en nourriture diminue.

5.2 Effet de l'expérience alimentaire antérieure de l'animal

Après une période de famine, *C. elegans* ralentit fortement lorsqu'il retrouve une zone de nourriture (voir 3.2.1, [Sawin et al., 2000]) et ce comportement est contrôlé par la sérotonine. L'expérience alimentaire passée du ver peut donc moduler son comportement en présence de nourriture.

Pour mesurer le rôle de l'état de satiété de *C. elegans* sur l'alternance des phases d'activité, j'ai enregistré la trajectoire de vers sauvages N2 en présence de bactéries après une période d'une heure sans nourriture. Les vers sont donc affamés pendant une heure sur une boîte NGM sans bactéries puis transférés juste avant l'enregistrement sur une boîte NGM contenant des bactéries OP50. Les vers affamés sont suivis à 20°C pendant une heure seulement. En effet, comme leur état de satiété évolue au cours de l'expérience, les vers commencent à perdre la "mémoire" de la période de famine au bout d'une durée de l'ordre de l'heure.

On observe que *C. elegans* divise par deux la probabilité d'être dans la phase active s'il a vécu une période de famine dans son passé récent (Figure 5.2).

$$P_r(\text{N2 affamés}) = 10 \pm 2\% \text{ (34h de suivi, } \sim 30 \text{ vers)}$$

$$P_r(\text{N2 bien nourris}) = 21 \pm 2\% \text{ (88h de suivi, } \sim 40 \text{ vers)}$$

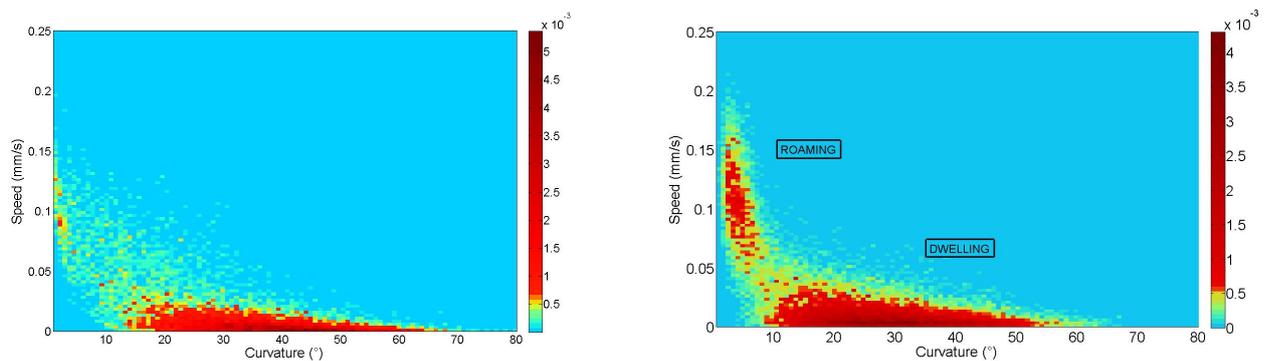


FIGURE 5.2 – Carte de densité de l'ensemble des points (V,Theta). Gauche : Vers N2 affamés ($P_r=10\%$, 30 vers, 34h d'enregistrement au total). Droite : Vers N2 bien nourris ($P_r=20\%$, 40 vers, 88h d'enregistrement au total).

Il est clair qu'il est avantageux pour un ver affamé de supprimer les phases de roaming lorsqu'il se retrouve en présence de bactéries après une période de famine. Sa priorité est de se nourrir et il évite ainsi de quitter une zone favorable à ce moment là. On voit aussi que le ralentissement du type "enhanced slowing response" [Sawin et al., 2000] dure au moins une

heure après la découverte de la source de nourriture, et correspond à la suppression de la phase de roaming.

5.3 Influence de la température

De nombreux comportements de *C. elegans* sont affectés par la température, notamment la durée du cycle de vie du ver et le choix du passage dans la forme dauer. Ce ver est adapté pour une gamme de température comprise entre 15°C et 25°C. Au dessus de 25°C, des défauts de reproduction apparaissent, et l'environnement devient fortement néfaste pour le ver. *C. elegans* est capable de mesurer la température de son environnement par les neurones des amphides AFD et AWC [Mori and Ohshima, 1995], [Kuhara et al., 2008], [Biron et al., 2008]. *C. elegans* garde également une mémoire associative de sa température de culture [Mohri et al., 2005]. La température est donc un paramètre important de la qualité de l'environnement du ver (voir 3.1.1).

J'ai donc mesuré le pourcentage de temps passé dans chaque phase d'activité de vers N2 cultivés à 20°C en fonction de la température. On obtient les résultats suivants :

Température	Pourcentage de roaming	Nombre de vers
20°C	20 ± 2 %	88h, ~ 40 vers
23°C	25 ± 3 %	30h, ~ 20 vers
26°C	28 ± 3 %	30h, ~ 20 vers

TABLE 5.2 – Variation du pourcentage de roaming de vers sauvages N2 avec la température en présence de bactéries (Boîtes standard, barres d'erreur : s.e.m. des valeurs obtenues pour différentes expériences à une même température).

On observe donc que le pourcentage de temps passé dans la phase de roaming augmente avec la température. Cependant, dans cette gamme de température l'effet est relativement faible. Les températures testées se trouve dans la gamme physiologique de *C. elegans* et on peut supposer qu'à plus haute température, si celle-ci devient néfaste pour la survie et la reproduction de l'animal, le comportement change. Il a par exemple été montré que *C. elegans* a un réflexe de fuite si il est stimulé à l'aide d'un laser à haute température [Wittenburg and Baumeister, 1999].

5.4 Couplage avec la reproduction

5.4.1 Corrélation avec le comportement de ponte

Il est surprenant que *C. elegans* consacre 20% de son temps à des déplacements rapides possiblement coûteux en énergie alors qu'il se trouve en environnement très favorable (grande

quantité de nourriture, température physiologique). Une des hypothèses pourrait reposer sur l'intérêt du ver à répartir ses oeufs à différents endroits pour que ses descendants ne soient pas en compétition.

C. elegans pond des oeufs par clusters. Il alterne des périodes d'à peu près 20 minutes pendant lesquelles il ne pond pas et des périodes durant lesquelles il pond des oeufs avec une constante de temps courte de l'ordre de 20s entre deux oeufs [Waggoner et al., 1998]. Il a été montré par ailleurs qu'une accélération précédait chaque évènement de ponte [Hardaker et al., 2001]. La ponte et le comportement locomoteur semblent donc liés. Avec le système de tracking mono-ver il est possible de mesurer à quels moments ont lieu les évènements de ponte par rapport à l'alternance des deux phases. J'ai observé qualitativement que les évènements de ponte coïncident avec la fin des périodes de roaming. Le circuit neuronal de la ponte pourrait donc avoir un rôle dans le contrôle de l'alternance des phases de roaming et de dwelling.

Pour tester cette hypothèse, j'ai enregistré la trajectoire de mutants *egl-1(n487)*. La mutation *egl-1(n487)* entraîne un dysfonctionnement des neurones HSN qui contrôlent la ponte. Ces vers ont un pattern temporel de ponte très perturbé et sont anormalement remplis d'oeufs (phénotype Egl) [Desai et al., 1988]. On observe cependant que la proportion de temps passée en phase de course n'est pas significativement différente du ver sauvage.

$$P_r(\textit{egl-1}(n487), 20^\circ\text{C}) = 16 \pm 4\% \text{ (30h de suivi, } \sim 20 \text{ vers)}$$

Il semble donc que le pattern temporel de ponte n'influence pas significativement la proportion de temps passée dans chaque phase d'activité locomotrice.

5.4.2 Importance de l'état de fécondation de l'animal

Il est possible également que la probabilité de se déplacer dans un environnement donné dépende du besoin de trouver un partenaire reproducteur. *C. elegans* est hermaphrodite et n'a donc pas besoin de trouver un partenaire. On observe cependant que les mâles de *C. elegans*, qui doivent trouver un individu hermaphrodite pour se reproduire, sont bien plus mobiles que les hermaphrodites. La probabilité de quitter un patch de bactéries est notamment bien plus élevée pour un mâle que pour un hermaphrodite [Lipton et al., 2004].

Pour tester l'importance de la reproduction sur l'alternance des phases de courses et d'arrêts, j'ai enregistré la trajectoire de femelles de l'espèce *Caenorhabditis remanei* phylogénétiquement proche de *Caenorhabditis elegans* à 20°C en présence de bactéries. Les femelles *C. remanei* doivent en effet trouver un partenaire mâle pour se reproduire (voir 1.2). On observe que les femelles *C. remanei* fécondées ont un comportement similaire à celui des hermaphrodites *C. elegans* (Figure 5.3). A l'inverse, les femelles *C. remanei* isolées la veille de l'expérience au stade larvaire L4 sans mâles ne sont pas fécondées et sont beaucoup plus mobiles. La proportion du temps passé en phase de roaming pour ces femelles vierges est multipliée par 2 par rapport aux femelles fécondées (Figure 5.3, Table 5.3). Il semble donc bien que l'état de fécondation de l'animal module l'alternance des deux phases d'activité.

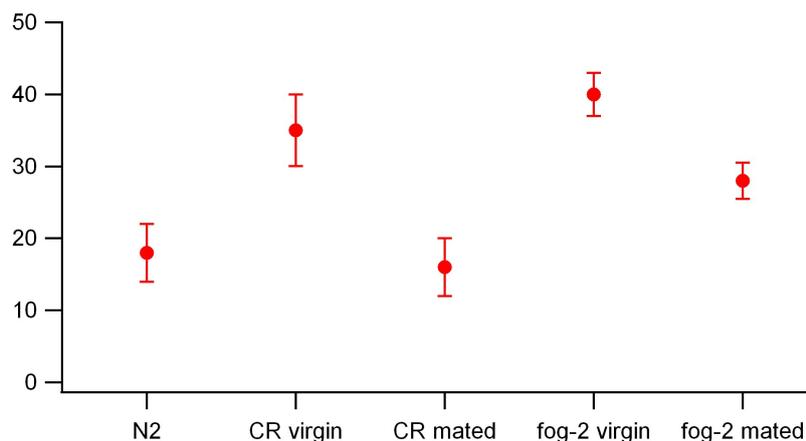


FIGURE 5.3 – Couplage entre la reproduction et le comportement de dwelling/roaming. Pourcentage du temps passé dans la phase de roaming pour des femelles *C. remanei* fécondées ou non, et les hermaphrodites *C. elegans fog-2(q71)V* fécondées ou non.

Pour tester cette conclusion directement sur *C. elegans*, j'ai analysé le comportement de mutants *fog-2(q71)* fécondés ou non. En effet cette mutation empêche la spermatogenèse chez l'hermaphrodite [Schedl and Kimble, 1988], et les "hermaphrodites" *fog-2* ont besoin d'être fécondés par un mâle pour pouvoir se reproduire. De même que pour *C. remanei*, on observe que les mutants *fog-2* fécondés passent moins de temps dans la phase de roaming que les vers *fog-2* vierges. Cette observation est surprenante car il n'y a pas de pression de sélection sur les vers *C. elegans* sauvages qui sont hermaphrodites pour maintenir ce mécanisme de contrôle de la locomotion par l'état de fécondation. On peut supposer que ce contrôle est une réminiscence de l'état mâle/femelle de l'ancêtre commun de *C. remanei* et *C. elegans*. Il faut par ailleurs noter que les mutants *fog-2* fécondés sont également plus mobiles que les vers *C. elegans* de la souche N2 sauvage, et donc que cette mutation semble en elle-même influencer le comportement du ver.

Mutant	Pourcentage de roaming	Nombre de vers
N2	20 ± 2 %	88h, ~ 40 vers
<i>C. remanei</i> vierges	37 ± 3 %	30h, ~ 20 vers
<i>C. remanei</i> fécondés	17 ± 2 %	30h, ~ 20 vers
<i>fog-2(q71)</i> vierges	40 ± 2 %	30h, ~ 20 vers
<i>fog-2(q71)</i> fécondés	28 ± 2 %	30h, ~ 20 vers

TABLE 5.3 – Influence de l'état de fécondation du nématode sur le comportement de dwelling/roaming (Barres d'erreur : s.e.m. des valeurs obtenues pour chaque condition).

La durée des phases de courses et d'arrêts est donc modulée par l'expérience du ver et par les caractéristiques environnementales, notamment par la présence de nourriture. Plus l'environnement est favorable, moins *C. elegans* passe de temps dans la phase active. Cependant, même en conditions très favorables le ver consacre tout de même 20% de son temps à se déplacer. Un ver affamé diminue la probabilité de déplacement quand il se retrouve en présence de bactéries, ce qui lui permet de ne pas quitter une zone de nourriture après une période de famine. Un ver non fécondé à l'inverse augmente le temps passé en déplacement, probablement pour optimiser ses chances de rencontrer un partenaire.

Chapitre 6

Modes de perception et voies de signalisation impliquées

La présence de nourriture joue ainsi un rôle crucial lors du contrôle de l'alternance des phases d'activité de *C. elegans*. Le ver perçoit la présence de nourriture par différentes modalités sensorielles : olfactives, gustatives, mécanosensorielles mais également par la signalisation métabolique de son état de satiété. J'ai donc cherché à comprendre quels modes de perception des bactéries étaient utilisés par le ver pour induire le comportement de dwelling qui n'existe pas en absence de nourriture. J'ai également étudié le rôle de neurones des amphides et de certaines voies de signalisation liées à d'autres comportements alimentaires pour la modulation de ce comportement.

6.1 Influence de la perception sensorielle

6.1.1 La perception métabolique interne de la présence de bactéries nutritives est nécessaire pour déclencher la phase de dwelling

C. elegans perçoit la présence de nourriture par la détection de signaux olfactifs et gustatifs [Colbert and Bargmann, 1997], mécaniques [Kindt et al., 2007], [Sawin et al., 2000], et par la signalisation interne de son état de satiété [Kang and Avery, 2009]. Cette perception de la présence de nourriture est de plus nécessaire pour l'apparition du comportement de dwelling. En effet, en absence de nourriture, le ver est constamment actif. J'ai donc cherché à déterminer quels modes de perception de la nourriture étaient nécessaires pour induire le comportement de dwelling.

[Shtonda and Avery, 2006] ont montré précédemment que *C. elegans* adapte le temps passé dans chaque phase d'activité à la valeur nutritionnelle de la souche bactérienne à laquelle il a accès. Les propriétés mécaniques de ces différentes souches sont probablement assez similaires et il semble du coup peu probable que la perception mécanosensorielle soit cruciale pour le contrôle du comportement biphasique. Pour vérifier cette hypothèse, j'ai observé le comportement de *C. elegans* sur des microbilles d' $1\mu\text{m}$ de rayon que le nématode peut avaler. Le contraste optique étant très mauvais au travers de ces microbilles, il ne m'a pas été possible d'analyser quantitativement ces trajectoires. Cependant, j'ai pu observer à l'oeil que le ver passait bien

plus de temps dans la phase de roaming sur ces microbilles que dans les conditions standard. La perception mécanique via la cuticule ou l'intérieur du pharynx et de l'intestin ne semble donc pas suffisante pour induire la phase de dwelling.

Pour déterminer plus précisément le mode de perception le plus important pour la régulation de ce comportement, j'ai utilisé une méthode développée par [Gruninger et al., 2008]. Leur idée consiste à traiter les bactéries avec de l'aztreonam, un antibiotique qui en faible quantité empêche la fermeture du septum lors de la croissance d'*Escherichia Coli* et donc la dernière étape de la division des bactéries. En présence de cet antibiotique on obtient donc de longues chaînes de bactéries non divisées qui peuvent faire jusqu'à $50\mu\text{m}$ de long. Gruninger *et al* ont montré que les vers ne pouvaient pas se nourrir de ces chaînes bactériennes car ils ne peuvent pas les avaler. Cette méthode permet ainsi d'obtenir des bactéries OP50 qui ont une valeur nutritionnelle très faible, mais qui par contre émettent un signal chimique et mécanique comparable à celui des bactéries OP50 normales (voir Annexe A.2).

$$P_r(\text{N2, aztreonam, } 20^\circ\text{C}) = 76 \pm 3\% \text{ (20h de suivi, } \sim 30 \text{ vers)}$$

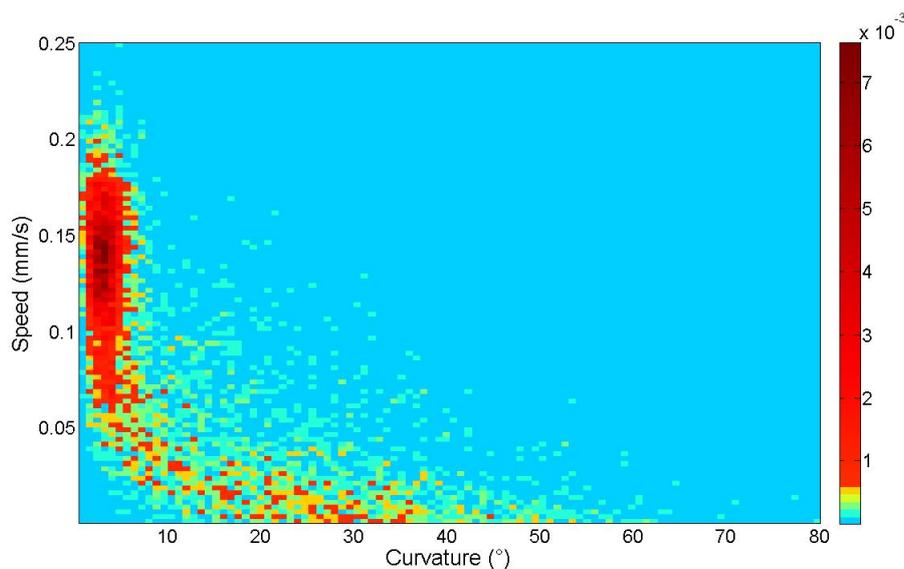


FIGURE 6.1 – Comportement de *C. elegans* à 20° en présence de bactéries OP50 traitées à l'aztreonam

En présence de bactéries traitées à l'aztreonam, *C. elegans* passe 75% de son temps dans la phase de roaming (Figures 6.1, 6.2). Dans ces conditions, les vers qui sont pourtant en présence d'un très grande quantité de bactéries (non contrôlé mais de l'ordre de 10^7 ou 10^8 bactéries par cm^2) se comportent comme si ils étaient en présence de 10^5 bactéries par cm^2 . Les vers ne parviennent donc pas à détecter efficacement la présence des bactéries traitées a l'aztreonam bien que le signalement olfactif et mécanique transmis par ces bactéries traitées soit probablement similaire à celui de bactéries en conditions standard [Gruninger et al., 2008].

Le signal nécessaire pour induire la phase de dwelling doit donc être une signalisation interne déclenchée lors de la digestion. La perception sensorielle externe n'est pas suffisante pour induire la phase de dwelling et la signalisation métabolique interne de la présence de nourriture est nécessaire pour déclencher ce comportement. Ce résultat est par ailleurs cohérent avec la corrélation de la proportion de dwelling de vers N2 en présence de différentes souches bactériennes avec la qualité nutritionnelle de ces souches [Shtonda and Avery, 2006].

6.1.2 Comportement des mutants du développement ou du fonctionnement des neurones des amphides

La perception olfactive et gustative de la présence de bactéries n'est donc pas suffisante pour induire le comportement de dwelling. Il a cependant été montré que l'information sensorielle perçue par les amphides du ver est nécessaire pour réguler l'alternance des phases d'activité de *C. elegans* [Fujiwara et al., 2002]. En effet les mutants *che-2(e1033)*, *osm-6(p811)* et *che-3(e1124)* chez qui la structure des cils des neurones des amphides est défectueuse passent beaucoup plus de temps dans la phase de dwelling que le ver sauvage. De plus, l'expression de l'allèle sauvage de *che-2* sous le contrôle des promoteurs *gpa-3* et *tax-4* chez le mutant *che-2(e1033)* est suffisante pour supprimer l'effet de la mutation [Fujiwara et al., 2002]. Les gènes *gpa-3* et *tax-4* sont exprimés dans les neurones des amphides AWC, ASE, ASK, ASI, ASJ et AFD notamment et un sous-ensemble de ces neurones doit donc participer au contrôle du comportement biphasique du ver. De plus, Shtonda et Avery ont montré que l'interneurone AIY et le neurone sensoriel ASI était importants pour réguler ce comportement, et que notamment AIY était nécessaire pour allonger les périodes de roaming [Shtonda and Avery, 2006].

Pour étudier le rôle de la perception sensorielle, j'ai tout d'abord quantifié le comportement du mutant *che-2(e1033)* en conditions standard. Ces mesures montrent une absence quasi-totale de la phase de roaming pour ce mutant. La perception sensorielle semble bien être nécessaire pour induire la phase de roaming en présence de nourriture.

$$P_r(\textit{che-2(e1033)}, 20^\circ\text{C}) = 1.3 \pm 0.3\% \text{ (30h de suivi, } \sim 20 \text{ vers)}$$

$$P_r(\textit{che-2(e1033)}, \textit{aztreonam}, 20^\circ\text{C}) = 42.5 \pm 8\% \text{ (20h de suivi, } \sim 30 \text{ vers)}$$

J'ai ensuite quantifié le comportement du mutant *che-2(e1033)* en présence de bactéries traitées à l'aztreonam. Dans ces conditions le mutant *che-2* passe 42% du temps dans la phase de roaming. On observe donc que les mutants ayant une perception sensorielle altérée sont d'une part capables de percevoir la présence de bactéries nutritives et n'ont par ailleurs pas de défauts locomoteurs basiques. Le phénotype de ce mutant est donc lié au contrôle de l'alternance des phases d'activité et non à un défaut de mobilité. Ceci dit, le comportement du mutant *che-2* est tout de même significativement différent du ver sauvage même en présence de bactéries non nutritives. Il semble donc que la perception sensorielle soit nécessaire pour induire la phase de roaming en présence et en absence de bactéries nutritives.

Pour déterminer le rôle de neurones sensoriels spécifiques, j'ai par la suite enregistré la trajectoire de mutants spécifiques du développement de certains neurones des amphides en conditions standard à 20°C (voir 2.2.1, [Hobert, 2008]). Les mutants *ceh-36* (qui ont une perte de fonction de AWC et un défaut de l'asymétrie des neurones ASE) et les mutants *ttx-3* (ablation de AIY) passent deux fois moins de temps que les vers sauvages dans la phase active. Ces mutants n'ont cependant pas de défauts de locomotion car ils peuvent se déplacer normalement quand ils sont stimulés mécaniquement. A l'inverse, les mutants *ttx-1* (perte de fonction de AFD) et *che-1* (perte de fonction de ASE) n'ont pas de phénotype significatif pour ce comportement (Figure 6.2).

La perception chemosensorielle est donc nécessaire pour induire la phase active. En présence de bactéries ayant une valeur nutritionnelle suffisante, la perception interne de la présence de nourriture augmente par ailleurs le temps passé dans la phase inactive.

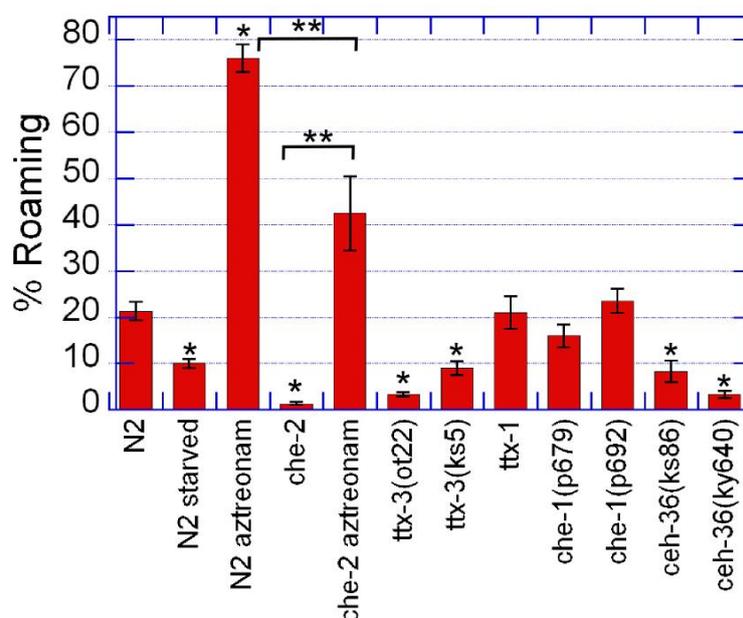


FIGURE 6.2 – Rôle des neurones sensoriels. Les résultats sont présentés comme la moyenne \pm l'erreur standard. *Différent du ver sauvage, t-test du Student $p < 0.005$. **Différents entre eux $p < 0.001$.

6.2 Modulation par les voies de signalisation des amines

Il a été montré précédemment que les voies de signalisation de la sérotonine, de l'octopamine, de la tyramine et de la dopamine sont impliquées dans le contrôle de comportements alimentaires ou liés à la présence de nourriture chez *C. elegans* (voir 2.1.3). L'alternance des phases d'activité chez *C. elegans* dépendant fortement de la présence de nourriture, il m'a semblé intéressant de tester l'implication de ces voies de signalisation dans le contrôle de ce comportement.

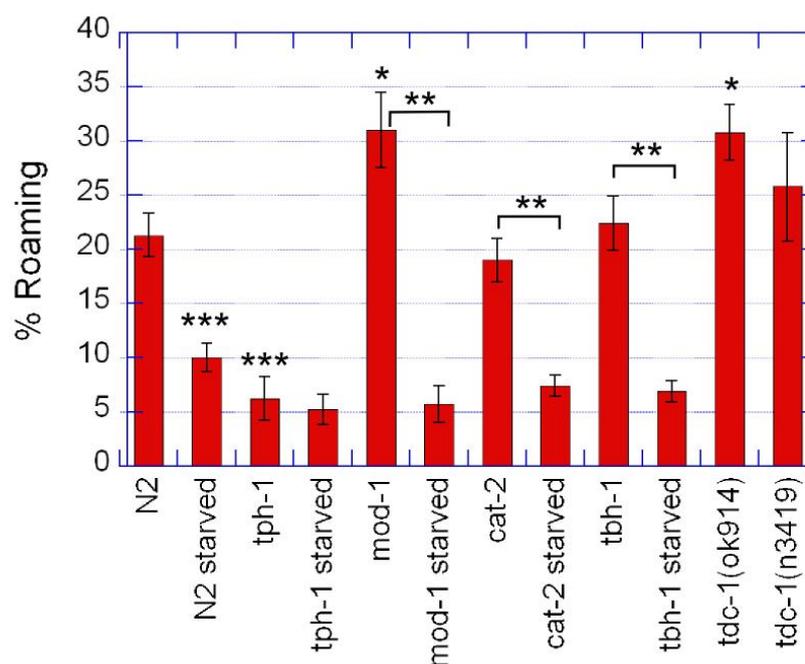


FIGURE 6.3 – Implication des voies de signalisation aminergiques dans le contrôle du comportement de dwelling/roaming. Les résultats sont présentés comme la moyenne \pm l'erreur standard. *Différent du ver sauvage, t-test du Student $p < 0.05$. **Différents entre eux $p < 0.001$. ***Différent du ver sauvage $p < 0.001$.

Les mutants déficients dans la synthèse de ces différentes amines ont des phénotypes très différents (voir Table 6.1, Figure 6.3). Les mutants *cat-2* déficients dans la synthèse de la dopamine et les mutants *tbh-1* déficients dans la synthèse de l'octopamine n'ont pas un comportement significativement différent du ver sauvage dans ces conditions. Les mutants *tdc-1* déficients dans la synthèse de la tyramine et donc de l'octopamine ont une probabilité légèrement plus élevée que le ver sauvage de se trouver dans la phase active (l'effet n'est cependant significatif que pour l'un des deux allèles testés). Les mutants *tph-1* déficients pour la synthèse de la sérotonine ont par contre un défaut marqué et passent beaucoup plus de temps dans la phase de dwelling que le ver sauvage. On peut donc en conclure que ce comportement est contrôlé fortement par la signalisation sérotoninergique.

Pour déterminer si cette voie de signalisation est nécessaire à la perception de la présence de nourriture par *C. elegans*, j'ai analysé le comportement de mutants *tph-1* en présence de bactéries traitées à l'aztreonam. Le mutant *tph-1* présente un phénotype sauvage dans ces conditions (Figure 6.5), bien que sa vitesse dans la phase de roaming soit plus faible que pour le ver sauvage. La voie sérotonine n'est donc pas nécessaire à la perception de la présence de bactéries nutritives, et semble donc moduler l'alternance des phases d'activité du ver. Ce résultat montre par ailleurs que ce mutant est capable de se déplacer, et que le défaut observé en présence de bactéries OP50 standard n'est pas dû à un défaut locomoteur.

Mutant	Pourcentage de roaming	Nombre de vers
<i>tph-1(mg280)</i>	6 ± 2 %	40h, \sim 20 vers
<i>tph-1(mg280)</i> affamés	5 ± 2 %	30h, \sim 30 vers
<i>tph-1(mg280)</i> aztreonam	79 ± 2 %	15h, \sim 30 vers
<i>mod-1(ok103)</i>	31 ± 4 %	40h, \sim 20 vers
<i>mod-1(ok103)</i> affamés	6 ± 2 %	30h, \sim 30 vers
<i>cat-2(e1112)</i>	19 ± 2 %	55h, \sim 30 vers
<i>cat-2(e1112)</i> affamés	7 ± 1 %	30h, \sim 30 vers
<i>tbh-1(ok1196)</i>	22 ± 3 %	50h, \sim 25 vers
<i>tbh-1(ok1196)</i> affamés	7 ± 1 %	28h, \sim 30 vers
<i>tdc-1(ok914)</i>	31 ± 3 %	33h, \sim 20 vers
<i>tdc-1(n3419)</i>	26 ± 6 %	28h, \sim 20 vers

TABLE 6.1 – Importance des voies de signalisation aminergiques sur le comportement de dwelling/roaming de *C. elegans*. (Barres d'erreur : s.e.m. des valeurs obtenues pour différentes expériences pour chaque génotype.)

Par ailleurs, il a été montré que la dopamine contrôle le ralentissement basal en présence de nourriture et que la sérotonine contrôle l'accentuation de ce ralentissement en présence de nourriture après une période de famine [Sawin et al., 2000]. J'ai donc voulu mettre en évidence le rôle des voies de signalisation aminergiques sur la diminution du temps passé en phase active en présence de nourriture après une période de famine (voir 5.2). J'ai mesuré la proportion de temps passé en phase de roaming des mutants *tph-1*, *tbh-1* et *cat-2* après une heure de famine. Les mutants *tbh-1* et *cat-2* répondent à la présence de nourriture après une heure de famine de la même manière que le ver sauvage. Le comportement des mutants *tph-1* n'est par contre pas significativement différent pour des vers affamés et bien nourris. La voie de signalisation sérotoninergique module ainsi le comportement de dwelling/roaming notamment en fonction des expériences alimentaires antérieures du ver. Il semble donc que les mutants de la synthèse de la sérotonine se comportent comme si ils étaient affamés en toute condition.

De plus, la signalisation par la sérotonine est transmise par le récepteur MOD-1 lors du contrôle de l'"enhanced slowing response" du ver [Ranganathan et al., 2000]. Ce comportement étant similaire à celui observé ici, j'ai testé le comportement de mutants de ce récepteur de la

sérotonine, bien nourris et affamés. On observe pour le mutant *mod-1* bien nourri un phénotype inverse de celui des mutants *tph-1*. La sérotonine semble avoir des effets antagonistes sur l'alternance des phases d'activité de *C. elegans*, probablement à travers des récepteurs différents et donc des cellules différentes. Les mutants *mod-1* affamés ont de plus un comportement semblable à celui de vers sauvages affamés. La diminution du temps passé en phase de roaming après une heure de famine n'est pas contrôlée par le récepteur MOD-1 et ce comportement est donc différent de l'"enhanced slowing response".

6.3 Modulation par les voies de signalisation de l'insuline et des TGF-beta

Les voies de signalisation de l'insuline et des TGF-beta sont impliquées dans le choix du passage au stade larvaire Dauer en conditions défavorables, notamment en absence de nourriture prolongée (voir 2.1.4, 3.1.2). Elles sont par ailleurs importantes dans la régulation du métabolisme du ver et sont liées à la signalisation de la présence de nourriture.

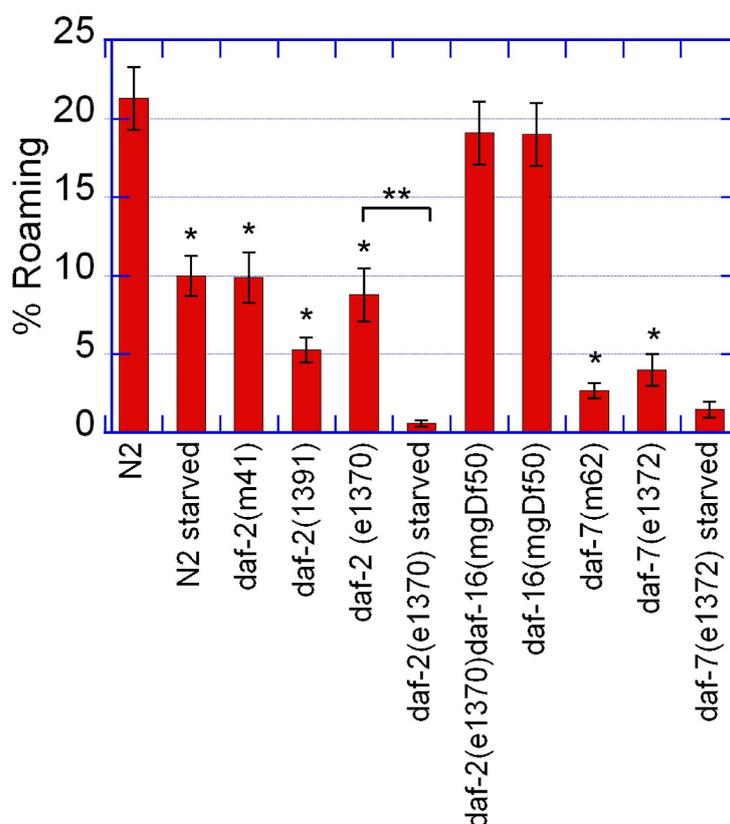


FIGURE 6.4 – Implication des voies de signalisation insuline et TGF-beta dans le contrôle du comportement de dwelling/roaming. Les résultats sont présentés comme la moyenne \pm l'erreur standard. *Différent du ver sauvage, t-test du Student $p < 0.001$. **Différents entre eux $p < 0.001$.

Pour mesurer l'importance de ces voies de signalisation dans le contrôle du comportement de dwelling/roaming, j'ai analysé la trajectoire de mutants du récepteur DAF-2 de l'insuline et du gène DAF-7 codant pour le peptide TGF-beta impliqué dans le contrôle du passage au stade Dauer. On observe que différents mutants des gènes *daf-2* et *daf-7* passent significativement moins de temps dans la phase de roaming que le ver sauvage (voir Figure 6.4, Table 6.2). Il est intéressant de noter que ce défaut de comportement de *daf-2* augmente de l'allèle *m41* à l'allèle *e1391*, l'allèle *e1370* ayant un phénotype intermédiaire. Cet ordre correspond bien à l'importance de la perte de fonction du gène *daf-2* mesurée par d'autres méthodes pour ces allèles [Gems et al., 1998].

Le récepteur DAF-2 est exprimé dans de nombreux types cellulaires et est très pléiotropique. Il agit essentiellement par la voie transcriptionnelle inhibant la localisation du facteur de transcription DAF-16 dans le noyau. Lorsque DAF-2 est inactif, DAF-16 se localise dans le noyau et entraîne la transcription de nombreux gènes effecteurs. Pour vérifier que l'effet observé est bien dépendant de la voie transcriptionnelle DAF-2/DAF-16, j'ai donc quantifié le comportement de mutants *daf-16* et de double mutants *daf-2/daf-16*. On observe que le défaut du mutant *daf-2* disparaît quand *daf-16* est muté également. Par ailleurs, le mutant *daf-16* a un phénotype sauvage pour ce comportement. L'alternance des phases d'activité de *C. elegans* est donc contrôlée par la voie de signalisation DAF-2/DAF-16.

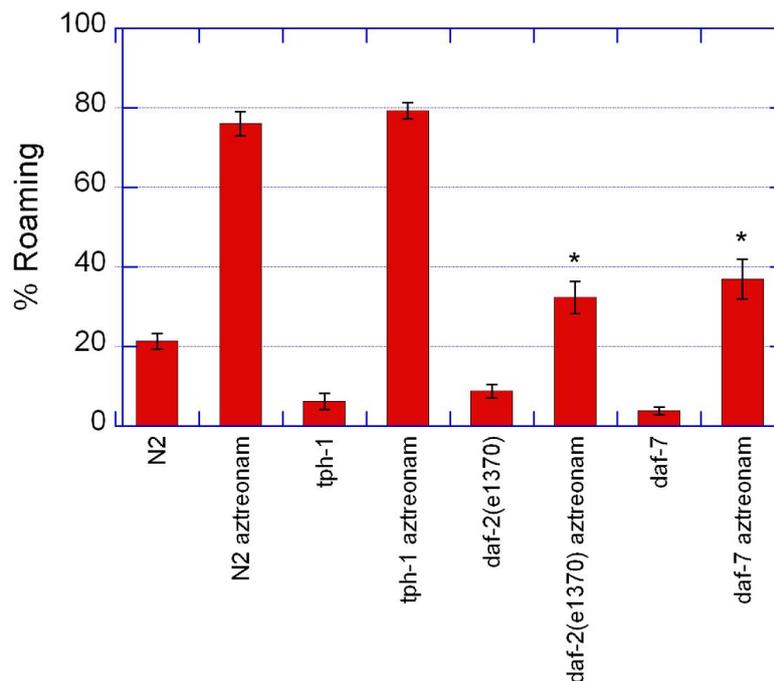


FIGURE 6.5 – Comportement de mutants des voies de signalisation en présence de bactéries traitées à l'aztreonam. Les résultats sont présentés comme la moyenne \pm l'erreur standard. *Différent du ver sauvage en présence de bactéries traitées à l'aztreonam, t-test du Student $p < 0.001$.

Contrairement au mutant *tph-1*, le mutant *daf-2(e1370)* répond après une période de famine de manière similaire au ver sauvage, et la proportion du temps passé en phase de roaming du mutant *daf-2(e1370)* décroît encore de manière significative si il a été affamé pendant une heure avant l'enregistrement (Figure 6.4). Cette expérience n'est par contre pas concluante pour le mutant *daf-7(e1372)*, la différence observée entre des mutants bien nourris et affamés n'est pas significative, ce qui est probablement dû au fait que $P_r(daf-7)$ est déjà très faible.

De plus, en présence de bactéries traitées à l'aztreonam que le ver peut percevoir mais pas avaler, le comportement des mutants *daf-2(e1370)* et *daf-7(e1372)* est significativement différent de celui du ver sauvage (Figure 6.5, Table 6.2). Dans ces conditions, bien qu'ils passent beaucoup plus de temps dans la phase de roaming qu'en présence de bactéries nutritives, ces mutants sont tout de même inactifs la plus grande partie de leur temps. Ces mutants possèdent une vitesse comparable au ver sauvage dans la phase de roaming et ce défaut est donc dû à une diminution du temps passé dans la phase de roaming et non à un problème locomoteur. Les mutants des voies insuline et TGF-beta répondent donc de manière différente du ver sauvage au manque de nourriture consommable.

Mutant	Pourcentage de roaming	Nombre de vers
<i>daf-2(e1370)</i>	9 ± 2 %	40h, ~ 20 vers
<i>daf-2(e1370)</i> affamés	0.6 ± 0.2 %	30h, ~ 30 vers
<i>daf-2(e1370)</i> aztreonam	32 ± 4 %	20h, ~ 30 vers
<i>daf-2(e1391)</i>	5 ± 1 %	40h, ~ 20 vers
<i>daf-2(m41)</i>	10 ± 2 %	40h, ~ 30 vers
<i>daf-2(e1370)/daf-16(mgDf50)</i>	19 ± 2 %	45h, ~ 25 vers
<i>daf-16(mgDf50)</i>	19 ± 2 %	30h, ~ 30 vers
<i>daf-7(m62)</i>	2.7 ± 0.5 %	30h, ~ 20 vers
<i>daf-7(e1372)</i>	4 ± 1 %	50h, ~ 25 vers
<i>daf-7(e1372)</i> affamés	1.5 ± 0.5 %	22h, ~ 25 vers
<i>daf-7(e1372)</i> aztreonam	37 ± 5 %	15h, ~ 20 vers

TABLE 6.2 – Importance des voies de signalisation insuline et TGF-beta sur le comportement de dwelling/roaming de *C. elegans*. (Barres d'erreur : s.e.m. des valeurs obtenues pour différentes expériences pour chaque génotype.)

On peut donc conclure que les voies de signalisation de l'insuline DAF-2/DAF-16 et des TGF-beta contrôlent l'alternance des phases d'activité de *C. elegans*.

6.4 Conclusions

Grâce à une méthode d'analyse quantitative de la trajectoire de *C. elegans*, j'ai pu déterminer de nouvelles caractéristiques du comportement locomoteur du ver en présence de nourriture. En conditions standard j'ai obtenu des résultats cohérents avec les expériences effectuées par d'autres [Fujiwara et al., 2002]. J'ai pu observer l'alternance de phases actives et inactives, et mesurer la proportion du temps passé dans chaque phase en fonction de paramètres environnementaux.

La proportion de temps passée dans la phase de roaming dépend fortement de la concentration en nourriture, et de l'expérience alimentaire de l'animal. La phase de dwelling n'est ainsi pas observée en absence de bactéries nutritives. J'ai également montré que le comportement de dwelling est induit par la perception interne de bactéries nutritives et que le comportement de roaming est favorisé par la perception chemosensorielle du ver. L'alternance des phases de roaming et de dwelling est donc contrôlée finement par le système nerveux de *C. elegans* en fonction des paramètres environnementaux et de son expérience. Ce comportement très lié à l'alimentation du ver pourrait donc être une stratégie alimentaire optimisant la proportion du temps passé à un endroit donné en fonction de l'état interne de l'animal et de la qualité de son environnement. Un ver bien nourri a par exemple une probabilité non nulle de quitter une zone favorable, ce qui pourrait lui permettre de ne pas pondre tous ses oeufs au même endroit et de ne pas mettre en concurrence ses descendants pour les mêmes ressources. Pour la population, il semble favorable qu'une certaine proportion des individus explorent l'environnement pour trouver de nouvelles ressources.

Au contraire, un animal affamé qui retrouve une zone favorable a pendant quelques heures une moins grande probabilité de la quitter qu'un animal bien nourri. Cette adaptation dure au moins une heure, et probablement de l'ordre de quelques heures d'après les observations qualitatives que j'ai pu faire, ce qui pourrait correspondre au temps nécessaire à l'animal pour renouveler ses réserves de nourriture. Il serait intéressant de s'intéresser plus en détail à ce phénomène d'adaptation, en regardant l'effet de périodes de famine de durée supérieure ou inférieure à une heure. De même, il serait intéressant de mesurer si *C. elegans* s'adapte à la concentration de nourriture en présence. Ainsi, après le transfert d'une haute concentration en bactéries à une faible concentration, le ver pourrait s'adapter à la concentration faible et diminuer progressivement le pourcentage du temps passé dans la phase de roaming. On peut aussi supposer que la présence de stimuli non alimentaires nocifs (haute température, molécules répulsives, haute concentration d'oxygène...) puissent biaiser également l'alternance des deux phases d'activité. Ainsi, certaines souches naturelles sensibles à l'oxygène sont bien plus actives que la souche N2 en présence de nourriture à 20% d'oxygène mais ont un comportement normal si la concentration d'oxygène baisse à 1% [de Bono et al., 2002], [Cheung et al., 2005].

J'ai également pu montrer l'importance des voies de signalisation de la sérotonine, de l'insuline

et des TGF-beta dans le contrôle de l'alternance des phases d'activité de *C. elegans*.

Les voies insuline et TGF-beta régulent également le passage au stade alternatif Dauer et le comportement de quiescence chez *C. elegans* [You et al., 2008]. La quiescence et le dwelling sont des comportements différents, un animal quiescent ne bouge pas du tout alors qu'on observe de l'activité musculaire durant la phase de dwelling, notamment des mouvements rapides de la tête du ver. Lors de mes expériences, je n'ai observé aucun événement de quiescence, ce qui est probablement dû à la qualité nutritionnelle moyenne des bactéries OP50. En effet, la quiescence est observée en présence de bactéries de très haute qualité nutritionnelle après une période de dwelling, et est supposée être une manifestation de satiété du ver [You et al., 2008]. Comme le dwelling et la quiescence sont contrôlés par les mêmes voies de signalisation, il est possible que ces deux comportements soient des réponses graduelles à des niveaux de satiété différents.

Par ailleurs, les mutants des voies insuline et TGF-beta passent beaucoup plus de temps que le ver sauvage dans la phase de dwelling, à la fois en conditions standard favorables et en présence de bactéries perceptibles mais non consommables. En présence d'aztreonam, il est probable qu'il reste tout de même une très faible concentration de bactéries libres et donc nutritives pour le ver. Ces mutants semblent donc être hypersensibles à la présence de nourriture et se comporter comme si ils percevaient une concentration supérieure à la concentration réellement présente.

Le défaut des mutants de la sérotonine n'est observé à l'inverse qu'en présence de bactéries nutritives, et la signalisation sérotonine n'est pas nécessaire à la perception adéquate de la présence de nourriture. En effet, le mutant *tph-1* a un comportement normal en présence de bactéries traitées à l'aztreonam. Par contre, la signalisation à la sérotonine contrôle la modulation du comportement du ver après une période de famine. Cependant, contrairement au ralentissement accentué observé précédemment [Sawin et al., 2000], [Ranganathan et al., 2000], cette modulation par la sérotonine n'est pas transmise par le récepteur MOD-1. Plus étonnamment, la perte de fonction de MOD-1 a l'effet inverse de la suppression de la synthèse de la sérotonine. Il semblerait donc que la sérotonine ait des effets contradictoires sur ce comportement. Ce type de régulation antagoniste par la sérotonine a par ailleurs déjà été observé pour le contrôle de la ponte chez *C. elegans* [Hapiak et al., 2009]. Il serait donc intéressant à ce stade de comprendre le rôle des différents récepteurs de la sérotonine pour la modulation de l'alternance des phases d'activité de *C. elegans*, ce qui permettrait également de définir le réseau cellulaire qui régule ce comportement.

Il faut également noter que la signalisation insuline et TGF-beta est réduite par rapport au ver sauvage chez le mutant *tph-1*. Les défauts de ce mutant pourraient donc être liés à la régulation des voies DAF-2 et DAF-7. Cependant, le phénotype des mutants *tph-1* est différent de celui des mutants *daf-2* et *daf-7*, notamment après une période de famine ou en présence de bactéries traitées à l'aztreonam. Il semble donc peu probable que le phénotype du mutant *tph-1* soit uniquement lié aux voies insuline et TGF-beta. De plus, ces voies de signalisation sont transcriptionnelles et doivent donc répondre à des modulations lentes de l'environnement, alors que la signalisation sérotonine peut transmettre des réponses plus rapides. On peut ainsi imaginer que le comportement des mutants *daf-2* et *daf-7* corresponde à la réponse à une longue

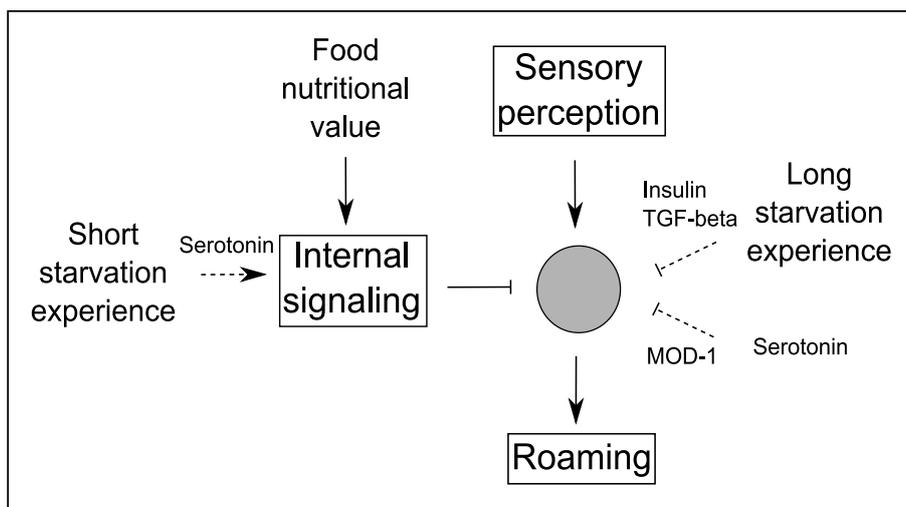


FIGURE 6.6 – Représentation schématique de la régulation du comportement de dwelling et roaming.

période de famine alors que le mutant *tph-1* se comporte comme un ver sauvage ayant traversé une période courte sans nourriture.

Finalement, je propose la représentation suivante du contrôle de l’alternance des phases d’activité du ver (Figure 6.6). La perception chemosensorielle promeut la phase de roaming en toute condition et, en présence de bactéries nutritives, la perception interne de la présence de nourriture induit la phase de dwelling. Après une période courte de famine, en présence de bactéries nutritives, la signalisation sérotonine est nécessaire pour augmenter la proportion du temps passé dans la phase de dwelling. Cependant, en l’absence de signalisation interne de la présence de bactéries nutritives, le comportement n’est pas affecté par une période courte de famine. De plus, après une période longue en absence de nourriture, les voies insuline et TGF-beta pourraient moduler la sensibilité du ver à la présence de nourriture, et inhiber en conséquence le roaming. A ce stade, il serait intéressant de tester ces hypothèses plus précisément, et de déterminer le réseau de cellules qui contrôle ce comportement.

Troisième partie

Un nouveau système d'imagerie
calcique pour la mesure simultanée
de l'activité neuronale et du
comportement de *C. elegans*

Chapitre 7

Méthode expérimentale

7.1 Motivation

Pour comprendre plus précisément le rôle des neurones sensoriels et des interneurons des amphides lors de l'alternance des phases d'activité de *C. elegans* en présence de nourriture, j'ai voulu mesurer l'activité de ces neurones au cours du comportement du ver. Pour cela, j'ai choisi la technique d'imagerie calcique déjà bien développée chez *C. elegans*. Cette méthode nécessite d'une part la construction d'une lignée de *C. elegans* exprimant le marqueur de l'activité calcique dans le neurone d'intérêt, et d'autre part de choisir le système optique adéquat. Pour étudier l'activité de neurones uniques et la corrélérer avec l'alternance des phases de dwelling et de roaming, j'ai donc construit un nouveau système d'imagerie calcique permettant de suivre l'activité calcique d'un neurone et le comportement d'un ver libre pendant au moins une dizaine de minutes sur une boîte NGM standard en présence de bactéries. En effet, bien que quelques systèmes d'imagerie aient été développés récemment pour corrélérer l'activité de neurones et le comportement de *C. elegans*, aucun d'entre eux n'offre la possibilité de suivre automatiquement un ver totalement libre de se déplacer dans son environnement standard de laboratoire pendant dix minutes (voir 2.2.2). Pour développer le système optique, je me suis tout d'abord intéressée aux interneurons de commande AVA qui ont un rôle dans le contrôle du mouvement de recul (voir 2.1.2). Ce comportement est facile à détecter, et la fréquence des reculs est relativement élevée, ce qui est bien adapté pour le développement du système d'imagerie. Je me suis également intéressée à la corrélation entre le comportement du ver et l'activité des neurones mécanosensoriels PLM. Les lignées fluorescentes utilisées pour l'imagerie de l'activité calcique des neurones AVA et PLM m'ont été fournies par le laboratoire de W.R. Schafer.

J'ai par ailleurs construit une souche exprimant la protéine caméléon D3cpv spécifiquement dans les interneurons AIY (voir Annexes B, C.2) mais au final, il ne m'a pas été possible jusqu'ici d'obtenir de résultats pour l'étude de l'alternance des phases de dwelling et de roaming. A l'inverse, j'ai pu obtenir des résultats intéressants pour la compréhension du contrôle moteur du ver à partir des mesures d'activité des interneurons de commande AVA et des neurones mécanosensoriels PLM.

7.2 Dispositif expérimental

Pour pouvoir enregistrer simultanément le comportement du ver et l'activité d'un neurone de l'animal, j'ai construit un système comprenant deux objectifs de grossissements différents (Figure 7.2, voir Annexe C.2). L'expérience est réalisée sur une boîte NGM standard de 9 cm de diamètre recouverte uniformément de bactéries OP50 et maintenue ouverte à l'envers sur une platine X-Y motorisée reliée à un ordinateur. Le ver est illuminé à la longueur d'onde d'excitation de la protéine caméléon (440nm) à travers d'un objectif de fluorescence 20X d'ouverture numérique 0.45 utilisé également pour l'enregistrement de l'image de fluorescence. L'illumination de fluorescence est également utilisée pour enregistrer l'image du ver entier. L'image de fluorescence du neurone est séparée à l'aide d'un système commercial en deux composantes aux deux longueurs d'onde d'émission de la protéine caméléon (485nm et 535nm), et les deux images sont projetées sur les deux moitiés de la CCD d'une caméra intensifiée. L'image du ver entier est enregistrée à travers la boîte NGM par un objectif de faible grossissement et une caméra CMOS (Figure 7.1).

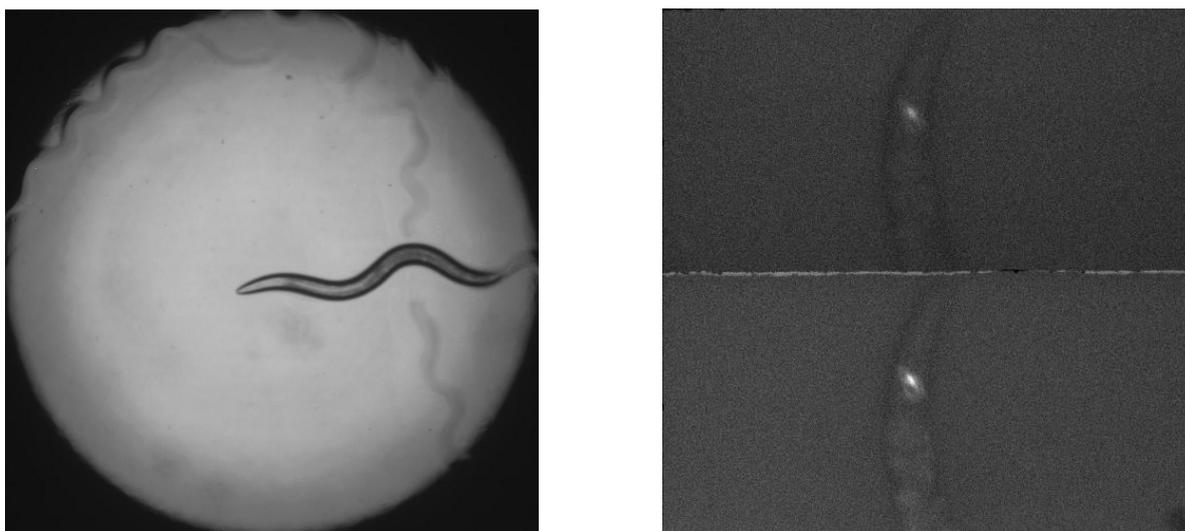


FIGURE 7.1 – Images simultanées du ver entier en transmission (Gauche) et du neurone de commande AVA en fluorescence (Droite), en haut à 485nm et en bas à 535nm.

Au cours de l'expérience, le ver peut se déplacer librement sur la boîte. Le système est contrôlé par un programme Labview qui acquiert une image toute les 150ms et maintient le neurone au centre de l'image de fluorescence. Pour cela, la position du pixel d'intensité maximum est déterminée dans l'image d'émission de fluorescence à 535nm pour chaque pas de temps, et la platine motorisée est déplacée en temps réel de manière à maintenir ce maximum d'intensité à la position dans l'image de fluorescence indiquée par l'expérimentateur au début de l'enregistrement. La trajectoire du neurone (et donc du ver en première approximation) est ainsi également enregistrée. Ce système de suivi est très robuste si le ver ne possède pas d'autres cellules marquées en fluorescence proches du neurone d'intérêt. De plus, grâce à cette méthode le neurone est fixe

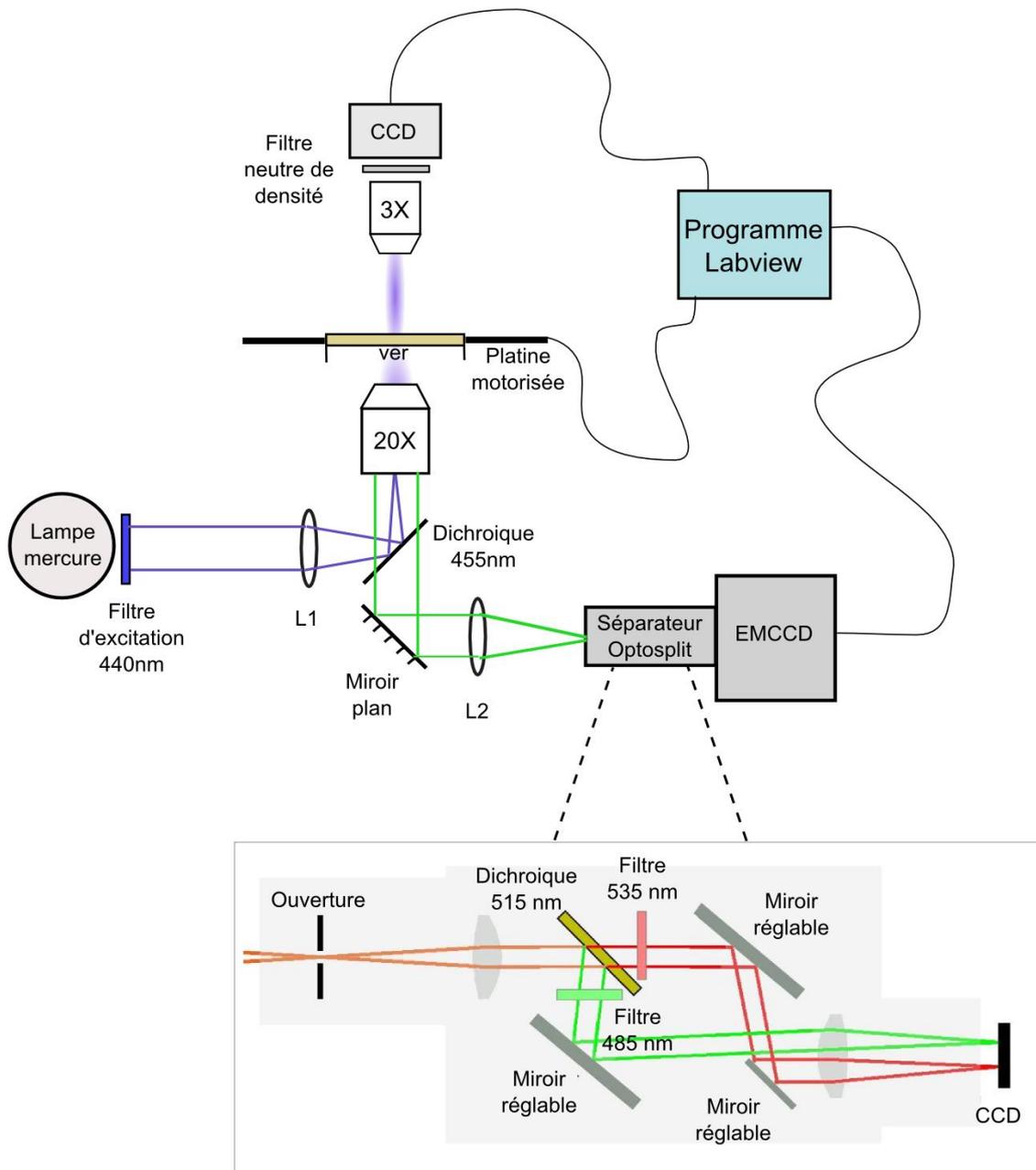


FIGURE 7.2 – Dispositif expérimental.

par rapport au système d'imagerie et donc éclairé de manière homogène durant toute la durée de l'enregistrement.

Le temps d'exposition de la caméra intensifiée est fixé à 30 ms pour obtenir un signal de fluorescence suffisant et une image nette malgré le mouvement du ver. L'intensité de l'illumination doit être maintenue au minimum possible car celle-ci est toxique pour le ver à forte intensité à la longueur d'onde utilisée qui est proche de l'ultraviolet. De plus, *C. elegans* perçoit et fuit la lumière bleue et ultraviolette [Edwards et al., 2008], [Ward et al., 2008]. Le comportement du ver sauvage est donc très perturbé quand il est illuminé à 440nm, et dans ce cas on n'observe notamment aucune phase de dwelling. Pour supprimer cette sensibilité à la lumière bleue, j'ai utilisé des mutants *lite-1* pour les expériences d'imagerie calcique. En effet, ces mutants ne perçoivent pas la lumière et se comportent donc normalement quand ils sont illuminés à 440nm. Ils ne semblent par ailleurs pas avoir d'autres défauts comportementaux [Edwards et al., 2008]. Pour obtenir les lignées de *C. elegans* pour les expériences d'imagerie calcique, les transgènes permettant l'expression de la protéine caméléon dans le neurone désiré ont donc été transférés par croisement dans un fond génétique *lite-1(ce314)X* (voir Annexe B).

Le comportement du ver est analysé à partir des images en transmission et de la trajectoire. La position temporelle et la durée des événements de recul ont été ainsi déterminées à l'oeil à partir du film du comportement du ver, sans connaissance du signal calcique du neurone AVA correspondant. Par ailleurs, l'activité calcique du neurone imagé est extraite des images simultanées d'émission de fluorescence à 485nm et 535nm à l'aide d'un programme MATLAB. A chaque pas de temps et pour chacune des deux images, le système d'analyse calcule la moyenne des valeurs des 100 pixels d'intensités maximales. On obtient ainsi l'intensité de la fluorescence du neurone M_Y à 535nm et M_C à 485nm, après soustraction des valeurs respectives du fond de l'image pour chaque voie. Le rapport de FRET M_Y/M_C représente alors l'activité calcique du neurone (voir 2.2.2). Les sondes calciques utilisées sont suffisamment rapides pour les processus observés ici [Wallace et al., 2008]. Par contre, le signal d'activité calcique est une mesure indirecte de l'activité électrique du neurone et possède une dynamique plus lente. En effet, bien que lorsque le neurone s'active, le calcium entre rapidement dans le milieu intracellulaire, la dynamique d'expulsion du calcium est par contre plus lente que la désactivation du neurone. Au final, l'activité électrique du neurone peut être approximativement visualisée comme la dérivée du signal calcique.

La durée totale de l'enregistrement n'est a priori limitée que par la toxicité de l'illumination et le blanchissement de la protéine fluorescente. J'ai ainsi pu effectuer des enregistrements de 10 minutes sans observer de défauts de comportement évidents ou de baisse de la qualité de l'enregistrement.

Chapitre 8

Résultats

8.1 Circuit neuronal de contrôle de la locomotion de *C. elegans*

La locomotion de *C. elegans* est constituée de phases de déplacement rapide entrecoupées de réorientations. Ces réorientations sont la plupart du temps déclenchées par un mouvement de recul du ver. La stratégie de recherche de nourriture du ver est de plus fondée sur un contrôle précis de la fréquence de ces réorientations en fonction des caractéristiques environnementales et de l'expérience antérieure de l'animal (voir 3.1.1, [Pierce-Shimomura et al., 1999], [Gray et al., 2005]).

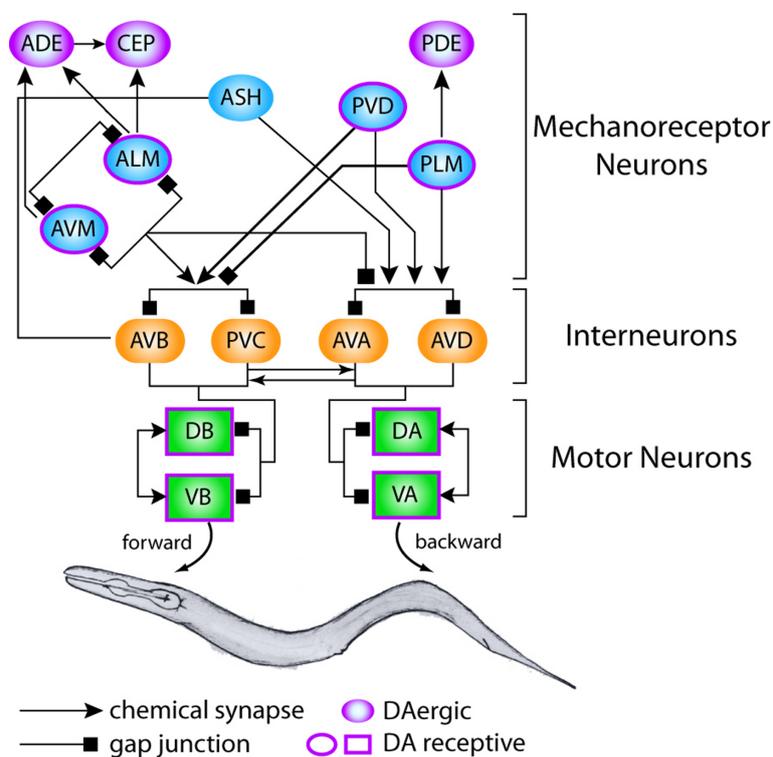


FIGURE 8.1 – Circuit neuronal de la réponse au toucher. (Image Wormbook : <http://www.wormbook.org>)

Il a été montré que les interneurons AVA et AVD sont impliqués dans la coordination des mouvements de recul du ver, et les deux neurones AVA sont considérés comme les neurones de commande principaux de la locomotion vers l'arrière ([Chalfie et al., 1985], Figure 8.1). En effet, après ablation de ces neurones, le ver est incapable d'effectuer un mouvement de recul coordonné. Il a également été montré que la modification des propriétés d'excitabilité de membrane des neurones AVA par mutation des canaux NMDA NMR-1 modifiait la probabilité de recul, et donc de réorientation du ver. Les mutants *nmr-1* ont ainsi une probabilité de recul plus faible que le ver sauvage et sont notamment incapables de se déplacer efficacement dans un environnement complexe [Brockie et al., 2001]. Plus récemment, des mesures de l'activité calcique des neurones AVA ont été réalisées sur des vers partiellement contraints dans un canal microfluidique [Chronis et al., 2007]. Le ver pouvant légèrement se déplacer dans le canal, cette étude a pu montrer que l'activation des neurones AVA était corrélée à la propagation d'une onde sinusoïdale se propageant vers l'avant le long du corps du ver et correspondant donc à un mouvement de recul (Figure 8.2). Symétriquement, les interneurons AVB et PVC ont été impliqués dans le contrôle du mouvement vers l'avant de l'animal [Chalfie et al., 1985].

Les neurones de commande AVA, AVB, AVD et PVC intègrent de nombreuses entrées synaptiques et sont notamment la cible des neurones mécanosensoriels du toucher. Quand le ver perçoit un stimulus sur la queue, il a un réflexe de fuite vers l'avant, alors qu'il recule si il est stimulé sur la tête. Des résultats d'imagerie calcique sur des vers fixes montrent que les neurones PLM répondent à une stimulation mécanique légère sur la partie postérieure de l'animal alors que les neurones ALM et AVM répondent à une stimulation sur la partie antérieure du ver [Suzuki et al., 2003]. Les neurones ALM et AVM sont ainsi supposés déclencher le recul par activation des neurones de commande AVA et AVD et inhibition des neurones AVB et PVC. A l'inverse, les neurones PLM déclencheraient une accélération de l'animal par activation de AVB et PVC et inhibition de AVA et AVD (Figure 8.1).

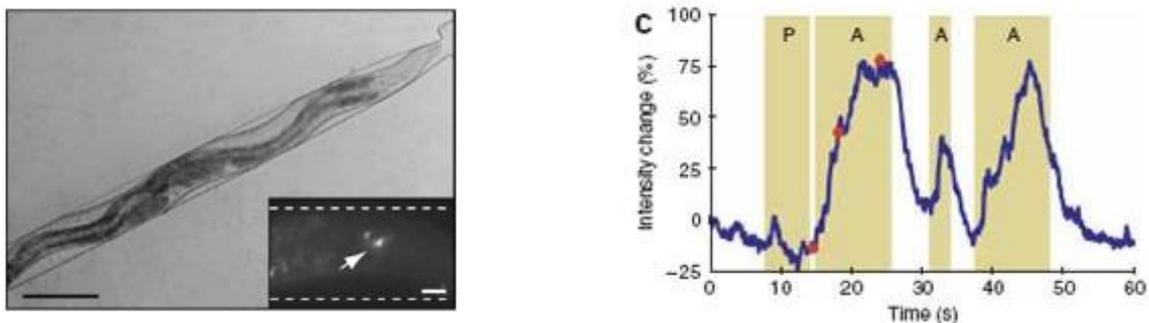


FIGURE 8.2 – Mesure de l'activité calcique des neurones AVA dans une puce microfluidique. (Gauche) *C. elegans* adulte dans un canal microfluidique. (Droite) Activité calcique de AVA (Variation de fluorescence de la protéine G-CaMP) et corrélation avec le comportement du ver dans le canal, plus précisément avec la propagation d'une onde le long du corps du ver vers l'avant (A) ou vers l'arrière (P). [Chronis et al., 2007]

8.2 Corrélation de l'activité calcique des neurones AVA et du comportement de *C. elegans*

De nombreux résultats antérieurs indiquent donc que les neurones de commande AVA contrôlent le comportement de recul du ver. Cependant, il n'existe pas d'enregistrement direct de l'activité de ces neurones au cours du comportement libre de *C. elegans*. En utilisant le système développé ici, j'ai donc enregistré l'activité calcique des neurones AVA au cours du mouvement de vers se déplaçant librement sur une boîte NGM standard recouverte de bactéries durant une dizaine de minutes. Pour cela, j'ai utilisé la souche AQ2139 construite au laboratoire de WR Schafer et exprimant la protéine caméléon D3cpv essentiellement dans les neurones AVA sous le contrôle du promoteur *pnmr-1*. Cette souche possède également la mutation *lite-1* et est donc peu sensible à la lumière bleue d'excitation de fluorescence.

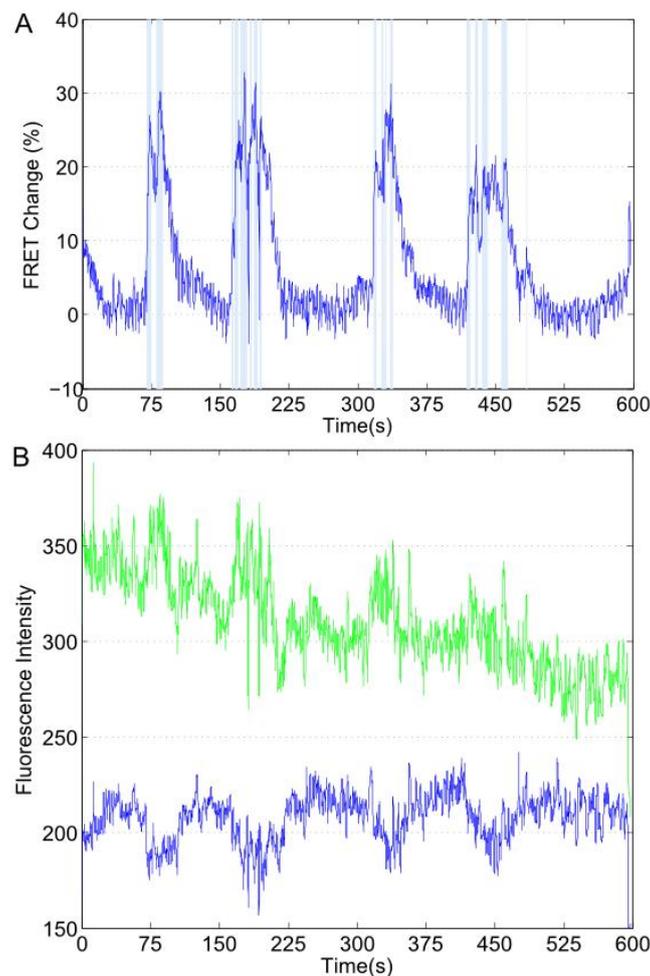


FIGURE 8.3 – Activité calcique des neurones AVA. (A) Signal de FRET de la protéine caméléon D3cpv exprimée dans les neurones AVA au cours du mouvement d'un ver libre (bleu foncé) et évènements de recul du ver (bleu clair). (B) Variations de fluorescence réciproques dans les canaux d'émission de fluorescence à 485nm (bleu) et à 535nm (vert).

On observe la présence de signaux d'activité calcique des neurones AVA lors du mouvement du ver. Ces signaux reflètent effectivement l'activité neuronale et ne sont pas des artefacts liés au mouvement du ver. En effet, on peut observer l'inversion des signaux de fluorescence dans les deux canaux d'enregistrement à 535nm et à 485nm caractéristique du transfert de fluorescence (Figure 8.3).

Pour corrélérer l'activité des neurones AVA au comportement du ver, j'ai relevé en aveugle à partir du film en transmission du comportement du ver la position temporelle des événements de recul. J'ai considéré qu'un ver recule quand sa tête recule par rapport à l'orientation définie par le corps de l'animal. Deux images sont donc suffisantes pour définir le recul et la durée des événements de recul est donc définie avec une résolution de 150ms (une image). Les oméga-turns et les phases d'arrêt ne sont par ailleurs pas comptées comme événements de recul. J'ai ainsi pu montrer que les mouvements de reculs spontanés de *C. elegans* lors de son déplacement sur une boîte standard étaient extrêmement bien corrélés aux signaux d'activité calcique dans les neurones AVA (15 vers, 200 événements de recul, Figures 8.3, 8.5).

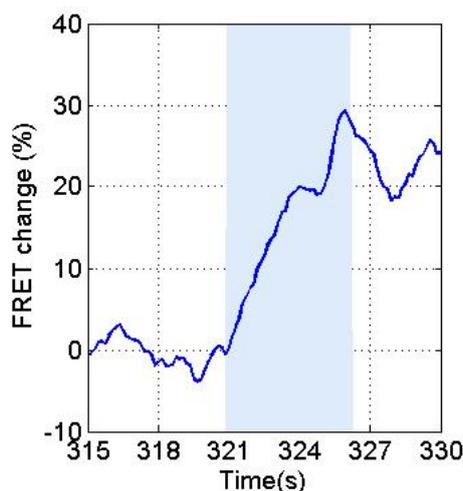


FIGURE 8.4 – Pic d'activité calcique de AVA, extrait du dernier graphique de la Figure 8.5. (Bleu foncé) Signal de FRET (Bleu clair) Evènements de recul.

Les neurones AVA sont censés déclencher le mouvement de recul. Cependant, on n'observe pas ici de délai entre le début de l'augmentation du signal de FRET et le début du mouvement de recul (par exemple, Figure 8.4). Il semblerait donc que les deux événements se produisent simultanément. Il est cependant possible que la résolution temporelle de l'enregistrement (150ms) ou le rapport de signal sur bruit ne soient pas suffisants pour observer ce délai.

Par ailleurs, à titre de contrôle, ces expériences ont été répétées au laboratoire de WR Schafer en conditions similaires (souche AQ2139, 10 minutes d'enregistrement, une image toutes les 150ms en présence de bactéries) sur des vers maintenus dans un canal microfluidique. On observe également dans ces conditions une excellente corrélation entre les pics d'activité des neurones AVA et le comportement de recul du ver ([Chronis et al., 2007], Figure 8.6).

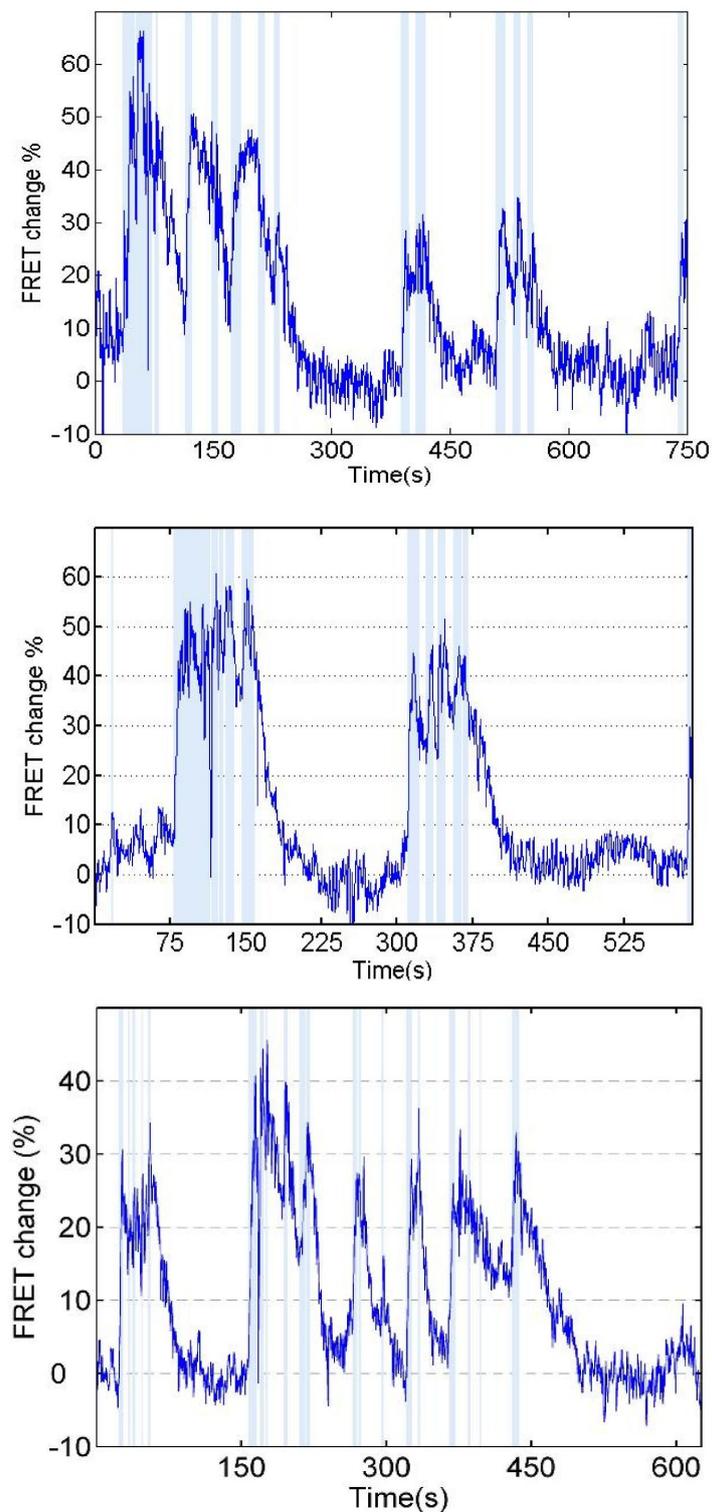


FIGURE 8.5 – L'activité calcique des neurones AVA de vers libres de se déplacer corrèle avec les évènements de recul. (Bleu foncé) Signal de FRET (Bleu clair) Evènements de recul.

Cependant, la longueur des évènements de recul ainsi que celle des pics d'activité calcique de AVA est bien plus élevée dans ces conditions qu'en conditions de déplacement libre. En effet, en présence de bactéries, la durée d'un évènement de recul est égale à $9.9 \pm 0.6s$ en moyenne pour un ver maintenu dans un canal contre $5.5 \pm 0.3s$ pour un ver libre (l'erreur présentée est l'erreur standard de la moyenne, la différence a été vérifiée statistiquement à l'aide d'un t-test du Student : $p < 0.001$). Le signal calcique semble également saturer. Le comportement du ver est donc perturbé par le dispositif microfluidique. Notamment, lorsque le ver est libre de se déplacer, les évènements de recul longs se terminent fréquemment par un oméga-turn. Dans le canal, ce type de réorientation est de fait empêché et il est possible que l'allongement des phases de recul dans ces conditions soit dû à l'absence de terminaison du mouvement par un oméga-turn.

De plus, la taille du dispositif microfluidique doit être adaptée précisément à l'âge du ver. En effet, les vers les plus gros observés étaient pratiquement incapables de bouger dans le canal microfluidique utilisé. La perturbation induite par le canal varie donc de plus d'un ver à l'autre en fonction de la taille de l'animal. Il est donc intéressant de pouvoir enregistrer l'activité de neurones de vers de déplaçant librement dans le but de minimiser les perturbations influant sur le comportement de *C. elegans*.

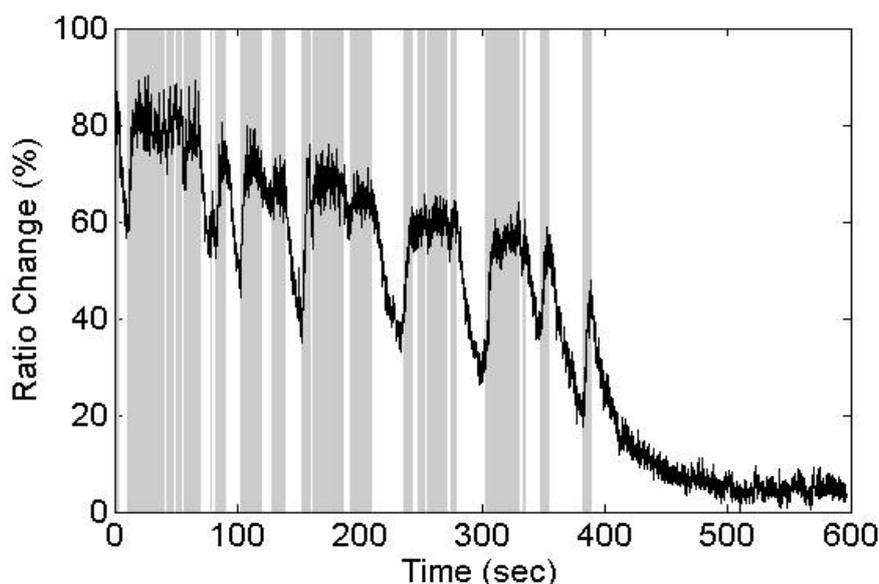


FIGURE 8.6 – Mesure d'activité calcique des neurones AVA sur un ver semi-restreint dans un canal microfluidique. (Noir) Signal de FRET (Gris) Evènements de recul (Résultats Yoshinori Tanizawa, MRC, Cambridge).

Finalement, en utilisant un système d'imagerie simultanée du comportement de vers libres et de l'activité calcique de neurones uniques, j'ai pu montrer que les mouvements de recul spontanés de *C. elegans* reflètent très précisément les pics d'activité des interneurones de commande AVA en conditions standard de laboratoire.

8.3 Les pics d'activité spontanée des neurones PLM corrént avec des pics d'accélération de *C. elegans*

C. elegans possède six neurones mécanosensoriels du toucher répartis le long du corps de l'animal. Les deux neurones PLM sont situés dans la queue de l'animal et projettent de longs cils sensoriels positionnés le long de la cuticule dans la partie postérieure du ver. Ces neurones répondent à une stimulation mécanique sur la queue de l'animal [Suzuki et al., 2003] et sont impliqués dans le réflexe de fuite en avant qui s'ensuit [Chalfie et al., 1985].

A l'aide du système d'imagerie développé ici, j'ai enregistré l'activité des neurones PLM au cours du déplacement libre de *C. elegans* sur une boîte ensemencée avec des bactéries. Pour cela, j'ai utilisé une souche construite au laboratoire de WR Schafer exprimant la protéine caméléon YC3.6 sous le contrôle du promoteur *p_{mec-4}* dans les six neurones du toucher (2 ALM, 2 PLM, 1 AVM, 1 PVM). Ces neurones sont éloignés les uns des autres et il est donc possible d'enregistrer l'activité spécifique des neurones PLM dans la queue de l'animal. J'ai croisé cette souche dans un fond génétique *lite-1* pour les expériences suivantes.

Au cours du mouvement d'un nématode libre sur une boîte NGM standard ensemencée avec des bactéries OP50, on observe des pics d'activité calcique des neurones PLM (Figure 8.8). Les neurones PLM semblent s'activer spontanément au cours du déplacement du ver. En effet, on n'observe aucune irrégularité sur la boîte lors de l'activation des neurones PLM qui serait susceptible de transmettre un stimulus mécanique. Il est cependant possible que ce signal corresponde à la détection de la présence des bactéries. Pour tester cette hypothèse, j'ai enregistré l'activité calcique des neurones PLM de vers se déplaçant sur une boîte sans bactéries. On observe également dans ce cas la présence de pics d'activité calcique (Figure 8.7).

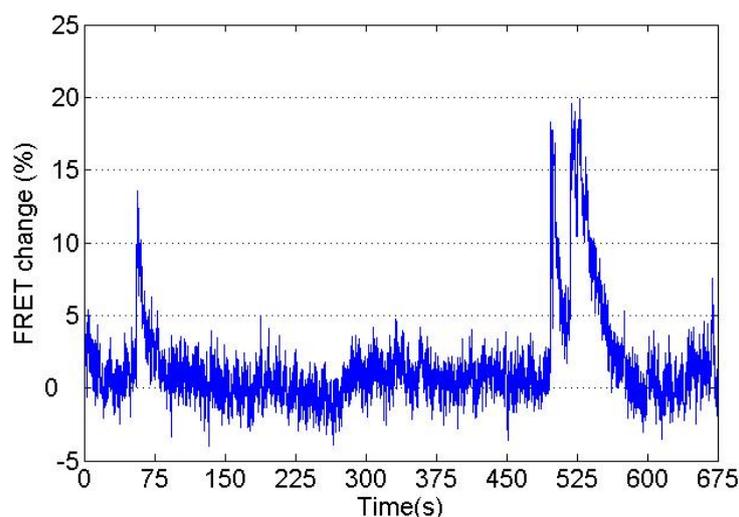


FIGURE 8.7 – Mesure d'activité calcique des neurones PLM au cours du mouvement libre de *C. elegans* en absence de bactéries.

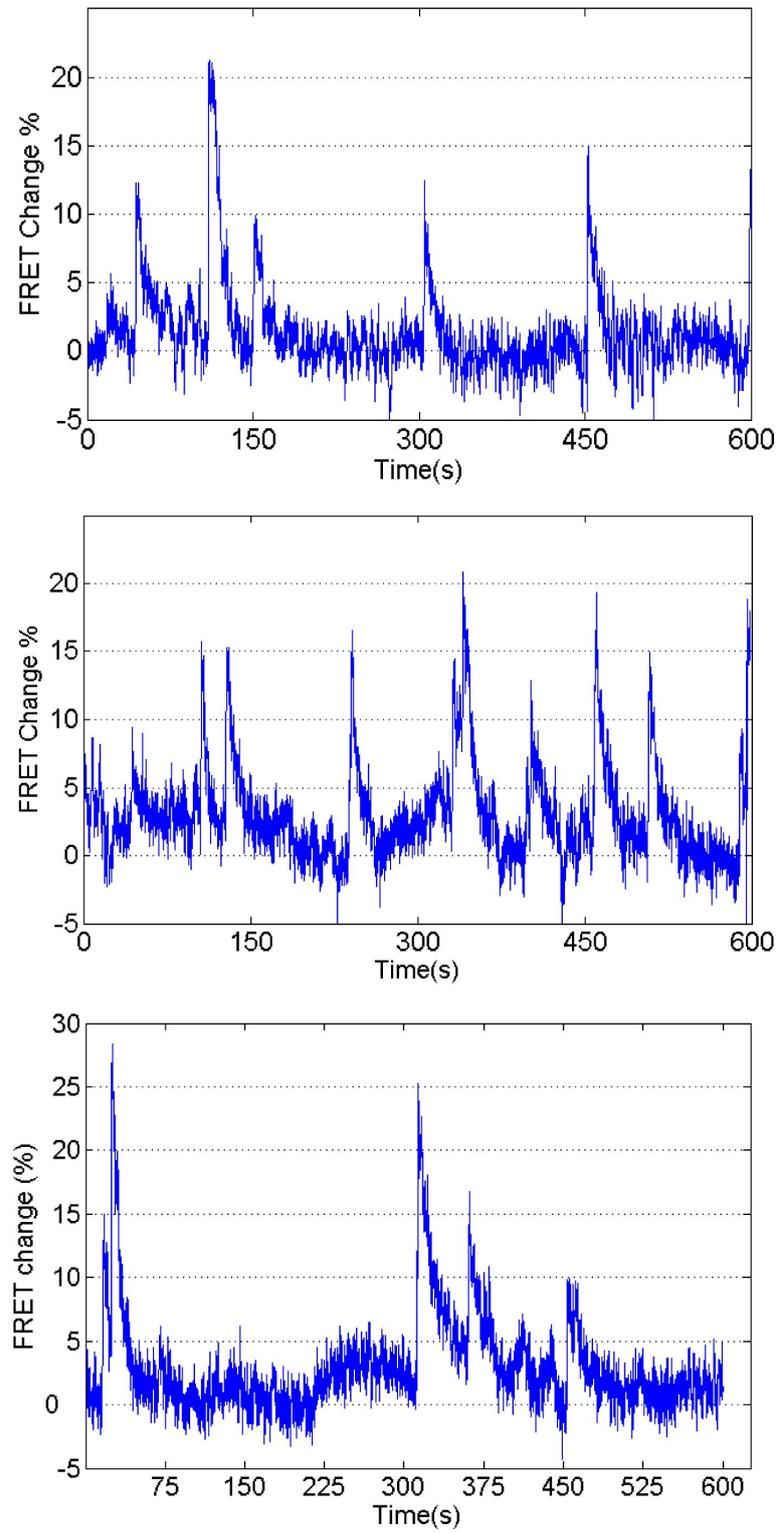


FIGURE 8.8 – Mesure d'activité calcique des neurones PLM au cours du mouvement libre de *C. elegans* en présence de bactéries OP50.

Les pics d'activité "spontanée" des neurones PLM ne sont donc pas exclusivement déclenchés par la présence de bactéries, et pourraient être générés par le mouvement du ver et agir comme feed-back pour la modulation de la locomotion.

Par ailleurs, en observant le film en transmission du comportement du ver, on peut détecter qualitativement de brèves accélérations spontanées du ver aux positions temporelles des pics d'activité des neurones PLM, un comportement qui n'est pas décrit dans la littérature. Pour quantifier cette observation, j'ai utilisé l'enregistrement de la trajectoire du ver pour calculer sa vitesse au cours du temps. J'ai comparé la vitesse moyenne pendant les pics d'activité des neurones PLM (signal de FRET croissant) et la vitesse moyenne globale du ver. On observe une augmentation significative de la vitesse lorsque les neurones PLM sont actifs (Figure 8.9).

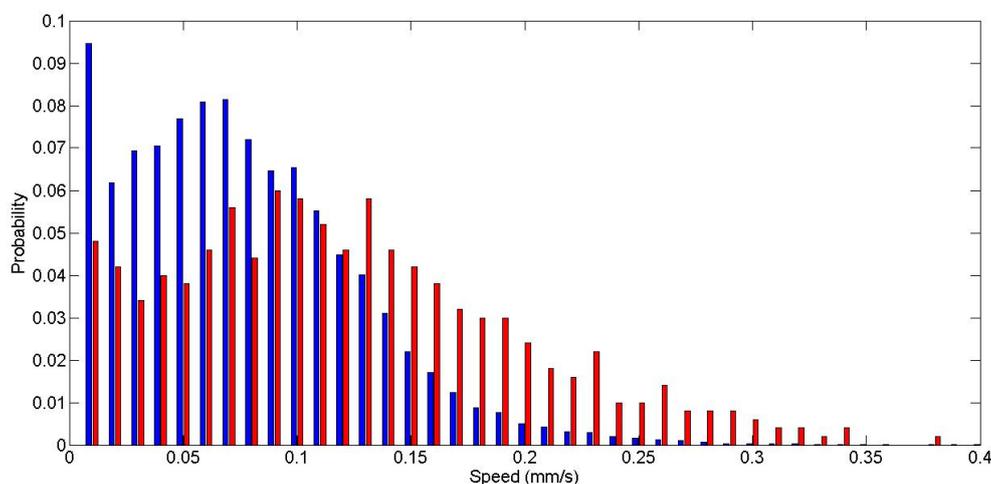


FIGURE 8.9 – Histogrammes de vitesse de *C. elegans* en présence de bactéries durant les pics d'activité des neurones PLM (Rouge) et globale (Bleu). Vitesse moyenne globale : $V_{tot} = 0.0769 \pm 0.0002$, Vitesse moyenne durant les pics d'activité des neurones PLM : $V_{pics} = 0.121 \pm 0.003$, t-test du Student $p < 0.001$.

On peut également obtenir un résultat plus précis en moyennant le profil de vitesse du ver autour du pic d'activité calcique pour 60 pics. Ceci permet de s'abstraire du bruit et on observe ainsi clairement le maximum de vitesse du ver 600ms après le début du pic d'activité calcique des neurones PLM (Figure 8.10). On observe également une légère diminution de la vitesse juste avant le pic d'activité des neurones PLM qui pourrait être une cause du déclenchement du pic d'activité calcique.

J'ai ainsi pu montrer de manière quantitative que l'activité spontanée des neurones mécanosensoriels PLM corrèle avec une accélération du ver se produisant 600 ms après le déclenchement du signal calcique. Des études par ablation de neurones ont montré que les neurones PLM sont impliqués dans l'accélération de fuite évoquée par un stimulus mécanosensoriel. Les résultats obtenus sont cohérents et le système développé ici permet une observation directe et dynamique de la corrélation du comportement et de l'activité calcique, dans des conditions standard et en

absence de stimulation. Pour obtenir ce type de résultat il faut noter qu'il est nécessaire de pouvoir enregistrer l'activité neuronale de vers complètement libres de se déplacer.

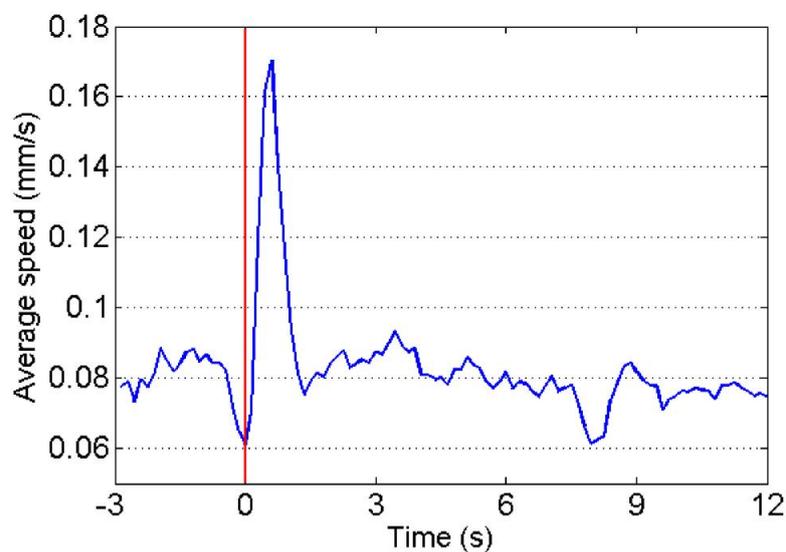


FIGURE 8.10 – Moyenne des profils de vitesse du ver à proximité des pics d'activité des neurones PLM. Les traces de vitesse correspondant à 61 pics d'activité calcique des neurones PLM ont été alignées et moyennées (11 vers). L'origine $t=0s$ correspond à la première image où l'on peut détecter une augmentation du signal de FRET (ligne rouge).

8.4 Mesures d'activité calcique de l'interneurone AIY

J'ai également cherché à mesurer l'activité calcique des interneurones des amphides AIY, dans le but de la corrélérer à l'alternance des phases d'activité du ver en présence de bactéries.

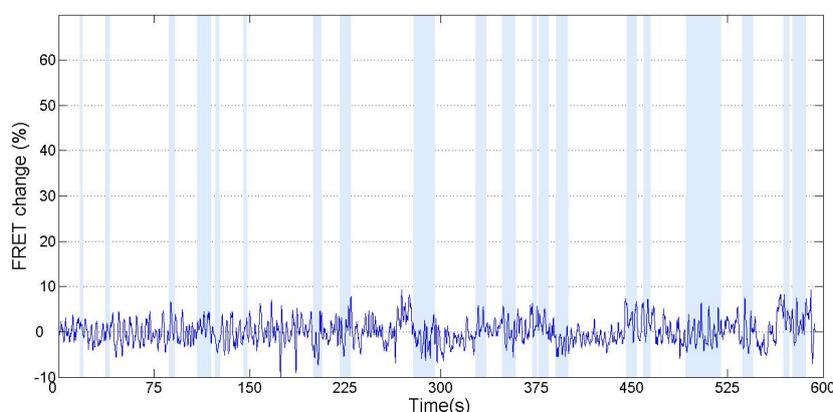


FIGURE 8.11 – Mesure d'activité calcique des neurones AIY au cours du mouvement libre de *C. elegans* en présence de bactéries. (Bleu foncé) Signal de FRET (Bleu clair) Evènements de recul.

Pour cela, j'ai construit la souche OHD3 exprimant spécifiquement la protéine caméléon D3cpv dans les neurones AIY sous le contrôle du promoteur pttx-3 (voir Annexe B). Je n'ai pas pu observer de pics d'activité calcique des neurones AIY dans ces conditions (Figure 8.11). Ceci est probablement dû au fait que l'activité calcique des neurones AIY semble restreinte aux projections de ces neurones [Chalasan et al., 2007]. Le système utilisé ici n'a de fait pas la résolution suffisante pour discriminer les projections neuronales du soma du neurone.

Cette expérience n'est donc pas concluante mais l'absence de signal donne une preuve supplémentaire que les signaux de FRET observés pour les neurones AVA et PLM sont bien des signaux d'activité neuronale et non des artefacts du mouvement.

8.5 Conclusions

Pour cette étude j'ai donc développé un nouveau système automatique d'imagerie permettant l'enregistrement simultané de l'activité calcique de neurones uniques et du comportement de vers se déplaçant librement dans leur environnement standard de laboratoire. Ce système m'a permis de montrer que les mouvements de recul spontanés de *C. elegans* reflètent parfaitement les pics d'activité calcique des interneurons de commande AVA pour un ver libre en présence de bactéries. De plus, j'ai pu montrer que les pics d'activité des neurones mécanosensoriels PLM étaient corrélés avec des pics de vitesse du ver se produisant 600ms après le déclenchement du pic d'activité calcique.

Ce système permet des enregistrements longs et ne perturbe pas le comportement du ver, contrairement aux systèmes où le ver est partiellement contraint. L'imagerie étant effectuée dans l'air, il permet de plus d'accéder au ver pour le stimuler chimiquement ou mécaniquement. Enfin, l'enregistrement étant effectué dans des conditions standard de laboratoire, les tests comportementaux développés précédemment pour des études génétiques ou d'ablation de neurones peuvent être utilisés et les résultats peuvent être comparés directement. Ce système permet ainsi a priori l'enregistrement de l'activité calcique de n'importe quel neurone pour lequel il existe un promoteur spécifique pour l'étude de la plupart des comportements de *C. elegans*.

Quatrième partie

Conclusions et perspectives

Conclusions et perspectives

Au cours de cette thèse, je me suis intéressée à quelques paramètres cellulaires, moléculaires et environnementaux de la stratégie locomotrice de *Caenorhabditis elegans*.

Dans un premier temps (Partie II), à l'aide d'une nouvelle méthode d'analyse quantitative de la trajectoire de *C. elegans*, j'ai déterminé de nouvelles caractéristiques du comportement locomoteur du ver en présence de bactéries. J'ai pu montrer les résultats suivants.

- Le comportement biphasique de *C. elegans* d'alternance entre des phases actives de roaming et des phases inactives de dwelling dépend fortement de la concentration en bactéries présentes dans son environnement. En dessous d'une concentration critique, le ver passe 100% de son temps dans la phase active alors qu'au dessus de cette concentration il passe approximativement 80% de son temps dans la phase inactive.
- Le pourcentage de temps passé dans chaque phase est modulé par l'expérience alimentaire et reproductive antérieure du ver.
- Le comportement de dwelling est induit par la perception interne de bactéries nutritives et le comportement de roaming est favorisé par la perception chemosensorielle du ver.
- Les voies de signalisation de la sérotonine, de l'insuline et des TGF-beta contrôlent l'alternance des phases d'activité de *C. elegans*. La signalisation sérotonine pourrait permettre au ver de s'adapter aux fluctuations rapides de l'environnement alors que les voies de signalisation transcriptionnelles insuline et TGF-beta lui permettrait de s'adapter aux variations plus lentes.

Ce comportement est donc très lié à l'alimentation du ver et pourrait être une stratégie locomotrice contrôlée optimisant le temps passé dans un environnement donné en fonction des caractéristiques environnementales et de l'expérience passée de l'animal. Pour mieux comprendre la fonction écologique de ce comportement, il serait également intéressant de quantifier le comportement de *C. elegans* dans un gradient de concentration de bactéries et de le comparer à ce que l'on attendrait connaissant le pourcentage du temps passé dans chaque phase en fonction de la concentration.

L'expérience alimentaire passée de *C. elegans* module fortement son comportement, et il serait donc intéressant de mesurer comment varie la réponse comportementale du ver à la concentration en bactéries en fonction de la concentration en nourriture à laquelle l'animal a été cultivé avant

l'expérience. La fonction de réponse obtenue ici concerne en effet des vers qui ont été cultivés en présence d'une forte concentration de bactéries. De même, pour mieux comprendre l'impact des expériences de famine sur le comportement du ver, il serait utile de mesurer le pourcentage de temps passé dans la phase active lorsque que le ver retrouve une zone favorable en fonction de la durée de la période de famine expérimentée précédemment. Pour cette étude je n'ai en effet mesuré que l'effet d'une période sans nourriture d'une heure.

Par ailleurs, des observations qualitatives semblent montrer que le ver peut s'adapter à un nouvel environnement moins favorable. Par exemple, à concentration en bactéries inférieure à la concentration critique, le ver passe tout son temps dans la phase de roaming pendant au moins deux heures après le transfert mais il semble que le pourcentage de dwelling augmente après 4-5 heures dans ces nouvelles conditions. Il serait également intéressant de mesurer la dynamique de cette adaptation.

Cette étude apporte quelques éléments du contrôle moléculaire et cellulaire de ce comportement, mais est loin d'être exhaustive et entre autres, ne donne pas d'indices concernant l'intégration des différentes voies de signalisation. Il serait notamment vraiment intéressant de disséquer le réseau cellulaire sous-jacent permettant l'intégration des diverses modalités sensorielles (perception interne de la nourriture, perception chemosensorielle, etc) et des informations sur l'expérience passée de l'animal. En première approche, l'étude systématique du comportement de mutants des différents récepteurs de la sérotonine donnerait sûrement des résultats utiles dans ce sens.

Dans un second temps (Partie III), dans le but de disséquer les bases cellulaires du comportement locomoteur du ver, j'ai développé un nouveau système d'imagerie permettant l'enregistrement simultané du comportement de nématodes libres de se déplacer sur une boîte NGM standard et de l'activité calcique de neurones uniques. Ce système permet ainsi la corrélation de l'activité neuronale et du comportement non perturbé du ver pendant une durée de l'ordre de la dizaine de minutes. Grâce à ce système, j'ai pu obtenir les résultats suivants.

- Les mouvements de recul spontanés de *C. elegans* en conditions standard de laboratoire reflètent précisément l'activité des interneurons de commande AVA.
- Les neurones mécanosensoriels postérieurs PLM s'activent spontanément lors du déplacement de *C. elegans* en présence ou en absence de bactéries. Ces pics d'activité calcique des neurones PLM corrélaient avec de courtes accélérations du ver se produisant 600 ms après le début du pic d'activité neuronale.

Pour compléter ces résultats, il serait intéressant dans un premier temps de mesurer l'activité calcique des neurones AVA et PLM évoquée après stimulation mécanique. Le système d'imagerie est assez robuste pour que l'on puisse appliquer pendant l'enregistrement une vibration intense et courte à la boîte entière ("tap response"). Des études par ablation de neurones ont en effet montré que le circuit neuronal du toucher répondait également à ce type de stimulation. Lors de

la vibration du substrat, le ver possède dans la plupart des cas un réflexe de recul mais a parfois un réflexe d'accélération. En utilisant ce test comportemental, il serait tout d'abord intéressant de vérifier que l'activité calcique des neurones AVA corrèle également avec les événements de recul stimulés.

Par ailleurs, les neurones mécanosensoriels PLM et les neurones ALM sont supposés s'activer à la vibration de la boîte et les deux signaux seraient alors en compétition lors de la "décision" de reculer ou d'accélérer [Wicks and Rankin, 1995]. Les premières mesures d'activité des neurones PLM que j'ai effectuées ne montrent jusqu'ici pas d'activation de ces neurones après ce type de stimulation. Cette observation préliminaire nécessite une vérification et il serait alors également intéressant de mesurer l'activité spontanée et stimulée des neurones ALM lors du mouvement du ver. La souche utilisée ici pour l'imagerie des neurones PLM exprime aussi la protéine caméléon dans les neurones ALM mais le niveau d'expression y est trop faible et le rapport signal sur bruit obtenu pour le rapport de FRET n'a pas été suffisant pour pouvoir en extraire des résultats.

Le suivi de l'animal s'effectuant par l'analyse des images de fluorescence, le système développé permet également d'enregistrer l'activité d'un ver se déplaçant dans un environnement complexe ou structuré, possédant des caractéristiques plus similaires à celles du sol, l'environnement naturel du ver. Il a été montré récemment que *C. elegans* peut multiplier sa vitesse par dix dans un réseau périodique de plots et que les mutants de la perception mécanosensorielle sont incapables d'utiliser efficacement la structure de l'environnement pour se déplacer [Park et al., 2008]. Il semble donc que le ver utilise les informations mécanosensorielles qu'il perçoit pour optimiser sa locomotion. Il serait ainsi intéressant de mesurer le comportement et l'activité des neurones mécanosensoriels lors du déplacement de *C. elegans* dans un tapis de plots ou de microbilles et de corrélérer l'activité des neurones sensoriels aux contacts du ver avec les plots lors de son déplacement. Ainsi, il serait possible de mieux comprendre comment les informations mécanosensorielles perçues permettent au ver d'optimiser son déplacement dans un environnement complexe.

Ce système peut par ailleurs a priori être adapté à l'étude de l'implication d'autres neurones dans d'autres types de comportements. Par exemple, il serait utile d'observer l'activité des neurones HSN lors du mouvement du ver et de la corrélérer aux événements de ponte. En effet, les expériences sur vers immobilisés ne permettent pas d'obtenir la distribution temporelle des événements de ponte observée en condition standard, et les résultats d'imagerie obtenus ainsi sont donc plus difficiles à comparer aux expériences précédentes. Enfin, il serait intéressant de corrélérer l'activité des neurones des amphides à l'alternance des phases d'activité du ver en présence de nourriture. Il ne m'a pas été possible de mesurer de signaux calciques dans les interneurons AIY. D'après les résultats obtenus dans la partie II, les neurones olfactifs AWC constitueraient une autre cible intéressante pour cette étude, ainsi probablement que les autres interneurons des amphides AIA, AIB et AIZ.

Le système développé ici permet ainsi d'utiliser les tests comportementaux développés précédemment et de comparer directement les résultats obtenus aux connaissances actuelles. J'espère donc qu'il permettra une nouvelle approche pour la compréhension du contrôle du comportement par le système nerveux de *C. elegans*.

Cinquième partie

Annexes

Annexe A

Protocoles de culture de *Caenorhabditis elegans*

A.1 Protocoles standard

A.1.1 Souches utilisées

J'ai utilisé les souches de *C. elegans* suivantes pour réaliser cette étude.

Pour la quantification du comportement :

- N2 sauvage
- *cat-2(e1112)II*
- *ceh-36(ks86)X*, *ceh-36(ky640)X*
- *che-1(p679)I*, *che-1(p692)I*
- *che-2(e1033)X*
- *daf-16(mgDf50)I*
- *daf-2(e1370)III*, *daf-2(e1391)III*, *daf-2(m41)III*
- *daf-2(e1370)III daf-16(mgDf50)I*
- *daf-7(e1372)III*, *daf-7(m62)III*
- *eql-1(n487)V*
- *fog-2(q71)V*
- *mod-1(ok103)V*
- *tbb-1(ok1196)X*
- *tdc1(n3419)II*, *tdc1(ok914)II*
- *tph-1(mg280)II*
- *ttx-1(p767)V*
- *ttx-3(ot22)X*, *ttx-3(ks5)X*

- la souche sauvage de *C. Remanei* EM464

Toutes ces souches proviennent du Caenorhabditis Genetics Center.

Pour l'imagerie calcique :

- AQ2139 (*lite-1(ce314)X, ljlIs109[pnmr-1 :D3cpv]*) construite au laboratoire de W.R. Schafer à Cambridge.
 - (*lite-1(ce314)X, Ex[pmec-4 :YC3.6]*) construite au laboratoire de W.R. Schafer à Cambridge.
 - OHD3 (*lite-1(ce314)X, Ex[pttx-3 : :D3cpv]*) que j'ai construite (voir Annexe B).
- La souche *lite-1(ce314)X* a été donnée par K. Miller.

A.1.2 Milieux de culture

Pour le maintien de *C. elegans* en laboratoire, on utilise couramment les milieux de culture suivants [Hope, 1999] :

Tampon KPO_4

Pour un litre :

Mélanger 108.3g de KH_2PO_4 et 35.6g de K_2HPO_4 , ajouter un litre d'eau distillée et ajuster si besoin le pH à 6. Stériliser à l'autoclave.

NGM-Agar

Pour un litre :

- Mélanger 17g d'Agar, 3g de NaCl, et 2.5g de bactopeptone dans un Erlenmeyer de 2l. Ajouter 975ml d'eau distillée. Couvrir d'aluminium et autoclaver pendant 40 min.
- Laisser refroidir l'Erlenmeyer dans un bain à 55°C pendant 15 min.
- Sous conditions stériles, ajouter 25 ml de tampon KPO_4 , 1ml de $CaCl_2$ 1M autoclavé, 1ml de $MgSO_4$ 1M autoclavé et 1ml de cholestérol dilué dans l'éthanol à 5mg/ml. Bien mélanger.
- Transférer sous conditions stériles 20ml de NGM-Agar par boîte de 9cm de diamètre et 10ml par boîte de 6cm de diamètre.
- Laisser sécher les boîtes pendant 24h à température ambiante avant utilisation et conserver à 4°C.

M9

Pour un litre :

Dans un litre d'eau distillée, mélanger 3g de KH_2PO_4 , 6g de Na_2HPO_4 , 5g de NaCl, 1ml de $MgSO_4$ 1M et stériliser à l'autoclave.

S-Basal

Pour un litre :

Dans un litre d'eau distillée, mélanger 5.85g de NaCl, 1g de K_2HPO_4 , 6g de KH_2PO_4 et 1ml de cholestérol (5mg/ml dans l'éthanol). Stériliser à l'autoclave.

LB

Pour un litre :

Diluer 25g de Luria broth (extraits de levure + NaCl) dans 1L d'eau distillée et autoclaver.

Soft Agar Freezing Solution

Pour 100ml :

Mélanger 0.58g de NaCl, 0.68g de KH_2PO_4 , 0.87g de K_2HPO_4 , 30ml de glycérol, 70ml d'eau distillée et 0.4g d'Agar. Ajuster le pH à 6 et autoclaver.

A.1.3 Culture de *C. elegans*

C. elegans est maintenu en laboratoire par passages successifs sur des boîtes NGMensemencées avec des bactéries *Escherichia coli* OP50 [Brenner, 1974]. Les bactéries OP50 sont cultivées jusqu'à saturation dans du milieu LB (une nuit à 37°C sous agitation à 200rpm). Pour préparer les boîtes standard, une goutte de bactéries saturées est étalée de manière homogène sur une boîte NGM de 6cm de diamètre (3 gouttes pour les boîtes de 9cm de diamètre). Après séchage, les boîtesensemencées sont maintenues à 20°C et sont utilisées au minimum 24h plus tard. Ceci permet la croissance du tapis bactérien et on obtient donc une boîte recouverte d'un tapis homogène de bactéries OP50.

Pour le maintien des souches, un ver de chaque souche est transféré au stade L4 d'une boîte à l'autre à l'aide d'un fil de platine stérilisé à la flamme. Les souches utilisées pour les expériences sont cultivées à 20°C et transférées tous les 3 jours. Les souches qui ne sont pas utilisées mais maintenues pour des expériences ultérieures sont cultivées à 16°C pour augmenter la durée de leur cycle de vie et sont transférées toutes les semaines.

A.1.4 Congélation

C. elegans survit également à la congélation lente, et il est donc possible de maintenir des stocks à -80°C. Ces stocks ne varient pas génétiquement et il est conseillé de décongeler chaque souche utilisée régulièrement pour les expériences de comportement tous les 3 à 6 mois, pour éviter l'apparition de mutations. Pour congeler les vers, on utilise le protocole suivant.

Protocole :

Toutes les étapes doivent être effectuées en conditions stériles.

- Faire croître la souche à congeler sur une grande boîte (9cm) jusqu'à disparition complète de la nourriture. Les vers doivent être majoritairement arrêtés au stade larvaire L1. La présence de bactéries empêche la survie des vers après congélation, il est donc important d'attendre suffisamment.
- Faire fondre la solution de Soft Agar au four micro-ondes puis la laisser refroidir dans un bain à 50°C pendant au moins 15min.
- Verser 3ml de S-Basal dans la boîte pour resuspendre les vers, et transférer dans un tube de 15ml. Répéter jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de vers sur la boîte.
- Laisser les vers sur glace pendant au moins 10min.
- Centrifuger à 1500 rpm pendant 2 min puis aspirer le supernageant pour ne laisser que 1,5 ml de liquide contenant les vers.
- Ajouter 1,5 ml de Soft Agar, bien mélanger et remplir 3 tubes de congélation stériles (1ml par tube, Nunc Cryotubes).
- Congeler lentement les 3 tubes dans une boîte en polystyrène bien fermée placée à -80°C.
- Le lendemain, transférer deux des tubes dans un lieu de stockage permanent. le 3eme tube est utilisé comme test. Laisser fondre le 3eme tube à température ambiante, et transférer sur une boîte NGMensemencée avec des bactéries. Si la congélation est réussie, on observe le mouvement de certains vers après quelques minutes.
- Pour décongeler une souche conservée à -80°C, récupérer à l'aide d'une pipette Pasteur stérilisée à la flamme un morceau d'agar contenant des vers congelés et le transférer sur une boîte ensemencée, sans décongeler tout le tube. Le tube est ensuite remis à -80°C. Le lendemain, récupérer des vers vivants et les transférer sur une nouvelle boîte.

A.2 Préparation des expériences

A.2.1 Expériences standard

Pour les enregistrements de trajectoires effectués en condition standard et l'imagerie calcique, les vers sont isolés à 20°C la veille de l'expérience au stade L4 sur une boîte NGMensemencée avec des bactéries. Dans le but de supprimer les perturbations du comportement liées au transfert, les vers sont transférés dix minutes avant le début de l'enregistrement sur une nouvelle boîte standard étalée la veille. Un seul ver est transféré par boîte de 9cm de diamètre lors des expériences réalisées à l'aide du système de suivi mono-ver et pour l'imagerie calcique. Pour le système multi-vers, 5 à 10 individus sont transférés sur la boîte d'enregistrement (6cm de diamètre).

A.2.2 Expériences après une période de famine

Pour les expériences effectuées après une période de famine, les vers sont isolés la veille au stade L4 en présence de nourriture comme dans le cas standard. Une heure avant l'enregistrement,

les vers sont lavés de multiples fois dans une goutte de M9 puis transférés sur une boîte NGM sans bactéries. Au bout d'une heure, les vers sont transférés sur une boîte standardensemencée avec des bactéries pour l'enregistrement. Dans ce cas, l'enregistrement ne dure qu'une heure. En effet, l'état de satiété des vers varie au cours de l'expérience et l'effet de la période de famine disparaît au bout de quelques heures.

A.2.3 Expériences à concentration de bactéries contrôlée

Pour contrôler la concentration de bactéries par boîte, il ne faut pas que les bactéries puissent croître et se diviser une fois qu'elles ont été étalées sur la boîte. Pour cela, j'ai utilisé des bactéries traitées à la streptomycine. Deux jours avant l'enregistrement, des bactéries OP50 sont cultivées une nuit à 37°C jusqu'à saturation. La veille de l'enregistrement, ces bactéries à saturation sont traitées à la streptomycine pendant 40 minutes à 37°C sous agitation. La concentration de streptomycine utilisée (50µg/ml) bloque la multiplication des bactéries mais ne les lysent pas. Le nombre de bactéries en solution est ensuite déterminé par mesure de densité optique (OD). La mesure d'OD a été calibrée en étalant des séries de dilution sur des boîtes LB-Agar et en comptant le nombre de colonies après une nuit à 37°C (ce nombre correspond au nombre de bactéries étalées la veille). La mesure d'OD donne donc une quantification du nombre de bactéries en solution. Après la mesure d'OD, un nombre précis de bactéries est étalé uniformément sur une boîte NGM-streptomycine (50µg/ml). On obtient ainsi des boîtesensemencées avec une concentration surfacique en bactéries contrôlée, qui ne change pas au cours du temps.

La préparation des vers est effectuée de façon standard. Au moment du transfert, les vers qui ont été cultivés sur des boîtes standard sont nettoyés dans une goutte de M9 pour éviter le transfert de bactéries supplémentaires et non traitées à la streptomycine sur la boîte d'enregistrement.

A.2.4 Expériences en présence de bactéries traitées à l'aztreonam

Pour préparer les boîtes pour les expériences en présence de bactéries traitées à l'aztreonam, j'ai suivi le protocole développé par [Gruninger et al., 2008]. La veille de l'expérience, les bactéries sont cultivées dans du LB à 37°C sous agitation normale (200 rpm) jusqu'à OD 0.2 puis traitées avec de l'aztreonam à 10µg/ml. Les bactéries continuent ensuite à croître mais ne peuvent plus se diviser. Elles sont ainsi maintenues à 37°C en présence d'antibiotique jusqu'à saturation sous faible agitation (60rpm) pour ne pas briser les chaînes bactériennes. Après vérification de la présence de longues chaînes de bactéries au microscope, celles-ci sont étalées uniformément sur des boîtes NGM-aztreonam (10µg/ml).

De même que précédemment, les vers sont lavés dans une goutte de M9 avant d'être transférés pour enregistrement sur la boîte NGM-aztreonam de l'expérience, dans le but d'éviter de transférer des bactéries non traitées.

A.2.5 Tests en présence de microbilles

Des microbilles de latex de 1 micron de diamètre non traitées en surface sont diluées dans du S-Basal puis étalées uniformément sur des boîtes NGM pour observer la trajectoire de vers N2 sauvages en présence de microbilles. Après séchage des boîtes, les vers sont lavés dans une goutte de M9 pour supprimer toute trace de bactéries et transférés sur les microbilles. On observe bien le passage des billes dans le pharynx et l'intestin des vers, ce qui montre que les vers peuvent bien les avaler.

Annexe B

Biologie moléculaire et transformation par microinjection

Les souches de *C. elegans* utilisées pour l'imagerie calcique des neurones AVA et PLM ont été construites au laboratoire de W.R. Schafer par Y. Tanizawa et I. Rabinowitch (MRC, Cambridge). M'étant intéressée tout d'abord aux interneurons des amphides AIY impliqués dans le contrôle de l'alternance des phases d'activité de *C. elegans*, j'avais cependant construit la souche OHD3 exprimant la protéine caméléon D3cpv sous le contrôle du promoteur pttx-3 induisant spécifiquement l'expression de la protéine dans les deux neurones AIY. Je n'ai pas pu observer de signal calcique dans ces neurones, ce qui est possiblement dû au fait que l'activité calcique des neurones AIY semble restreinte aux projections de ces neurones ([Chalasan et al., 2007], informations confirmées par D. Clark du laboratoire d'A. Samuel, Harvard University). Le système optique que j'utilise n'a de fait pas la résolution spatiale suffisante pour imager les projections neuronales, et enregistre la moyenne du signal émis par le soma et les projections. La construction de la souche OHD3 est tout de même décrite ici.

B.1 Construction du plasmide pOHD3

J'ai tout d'abord construit le plasmide pOHD3 selon des méthodes classiques de biologie moléculaire, à partir du plasmide pOH111 donné par O. Hobert (Columbia University) contenant la protéine GFP sous le contrôle du promoteur pttx-3 [Wenick and Hobert, 2004] et d'un plasmide provenant du laboratoire de R. Tsien (UCSD) construit à partir du plasmide pcDNA3 et contenant le gène codant pour la protéine D3cpv [Palmer et al., 2006]. Au final, le plasmide pOHD3 que j'ai construit contient le gène de la protéine D3cpv sous le contrôle du promoteur de *C. elegans* pttx-3.

La séquence codant pour le promoteur pttx-3 a été amplifiée à partir du plasmide pOH111 par PCR avec deux amorces contenant respectivement le site de restriction de l'enzyme AgeI et celui de l'enzyme PstI. La séquence codant pour la protéine D3cpv a été extraite du plasmide pcDNA3-D3cpv par PCR avec deux amorces contenant respectivement le site de restriction de

AgeI et celui de EcoRI. Après restriction par les enzymes AgeI/PstI pour pttx-3 et AgeI/EcoRI pour D3cpv, les deux fragments d'ADN ont été ligués au site AgeI pour former l'insert pttx-3 :D3cpv. Après ouverture du plasmide pOH111 par les enzymes de restriction PstI et EcoRI, celui-ci a été recircularisé par ligation avec l'insert pttx-3 :D3cpv pour former le plasmide pOHD3.

La transformation du plasmide recircularisé dans des bactéries *E. Coli* DH5 α a été effectuée par transformation au $CaCl_2$.

Protocole :

- Après croissance à 37°C dans du milieu LB jusqu'à OD 0.4-0.5, centrifuger les bactéries à 2700 RCF pendant 10 minutes.
- Resuspendre les bactéries dans 1 ml de $CaCl_2$ 0.1 M froid puis centrifuger une seconde fois à 2700 RCF pendant 10 minutes.
- Resuspendre les bactéries dans 200 μ l de $CaCl_2$ 0.1 M puis ajouter l'ensemble au tube contenant le plasmide recircularisé par ligation dans le tampon de ligation, sans inactiver précédemment la ligase.
- Maintenir 30min sur glace, puis 1min30 précises à 42°C. Remettre immédiatement sur glace.
- Ajouter 800 μ l de LB à la suspension de bactéries et agiter une heure à 37°C.
- Etaler 400 μ l sur une boîte LB-agar ampicilline et laisser pousser une nuit à 37°C.
- Le lendemain, récupérer les colonies qui ont poussé pour tester la présence de l'insert par PCR.

Après vérification par PCR puis séquençage, j'ai pu isoler ainsi deux clones de bactéries DH5 α contenant le plasmide pOHD3.

B.2 Transformation par microinjection

La transformation du plasmide dans *C. elegans* a été effectuée par des méthodes de microinjection classiques [Mello and Fire, 1995]. Pour cela, le plasmide pOHD3 a tout d'abord été extrait des bactéries à l'aide d'un kit d'extraction Qiagen.

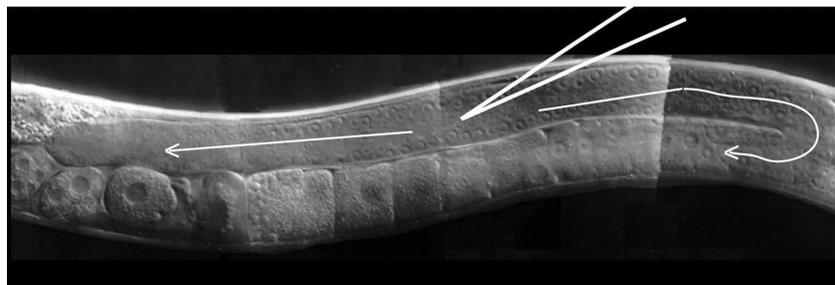


FIGURE B.1 – Microinjection dans les gonades de *C. elegans*. Image Wormbook : <http://www.wormbook.org>

J'ai effectué la transformation dans le laboratoire de J.L. Bessereau (ENS) selon le protocole suivant.

Protocole :

- Préparer une solution de l'ADN d'intérêt à $100 \mu\text{g}/\text{ml}$. (Ici il n'y a pas besoin de marqueur d'injection, le transgène est fluorescent).
- Préparer des pads d'agarose à 2% entre deux lamelles de microscope.
- Ajouter le mélange d'ADN dans l'aiguille d'injection et monter l'aiguille sur l'injecteur du microscope.
- Poser un ver (au stade de jeune adulte) dans une goutte d'huile halocarbone qui le maintiendra immobile sur le pad d'agarose. A ce stade tout doit être assez rapide, l'huile étant toxique.
- Sous microscope, injecter l'ADN dans les gonades du ver (Figure B.1).
- Après injection, ajouter à la pipette une goutte de M9 sur le ver pour le décoller de l'huile et le déposer sur une boîte NGMensemencée avec des bactéries.
- Répéter pour une dizaine de vers.
- Quelques jour plus tard, isoler les larves de la génération suivante exprimant le marqueur fluorescent.

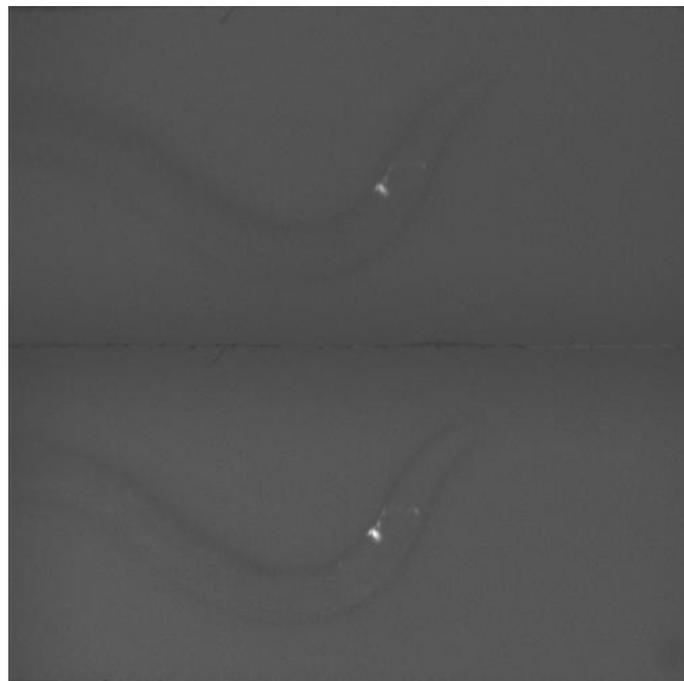


FIGURE B.2 – OHD3 exprime spécifiquement la protéine D3cpv dans les neurones AIY. En haut : émission à 480nm, en bas : émission à 540nm.

J'ai obtenu ainsi deux lignées contenant le transgène extrachromosomal pOHD3, et exprimant toutes les deux la protéine D3cpv spécifiquement dans les neurones AIY (Figure B.2).

La lignée transmettant le transgène avec la plus grande fréquence d'une génération à la suivante a été utilisée pour l'imagerie calcique après croisement avec la souche *lite-1(ce314)X* [Edwards et al., 2008]. La mutation *lite-1* étant portée par le chromosome X, il est facile d'effectuer les croisements. Des hermaphrodites portant le plasmide OHD3 ont été croisés avec des mâles N2. J'ai ensuite sélectionné les mâles (F1) issus de ce croisement exprimant le marqueur fluorescent. Les mâles (F1) issus de ce croisement ont donc un génotype (WT/-) pour le gène *lite-1*. Ces mâles (F1) ont été croisés avec des hermaphrodites (*lite-1/lite-1*). J'ai ensuite sélectionné les mâles (F2, génotype *lite-1/-*) issus de ce second croisement et exprimant le marqueur fluorescent. Enfin j'ai croisé ces mâles F2 avec des hermaphrodites (*lite-1/lite-1*) et j'ai sélectionné des hermaphrodites (F3) issus de ce dernier croisement exprimant le marqueur fluorescent. Ces hermaphrodites F3 possèdent le génotype (*lite-1/lite-1*). Par la suite, en sélectionnant des hermaphrodites exprimant le marqueur fluorescent à chaque transfert d'une boîte à la suivante, il est possible de maintenir la lignée OHD3 (*lite-1(ce314)X, Ex[pttx-3 : :D3cpv]*).

Annexe C

Méthodes d'imagerie de *C. elegans*

C.1 Systèmes d'enregistrement de trajectoires

C.1.1 Système mono-ver

Le système mono-ver est constitué d'une platine x-y (Marzhauser) contrôlée par ordinateur et d'un objectif à grossissement réglable (1-3X, Edmund Optics) couplé à une caméra CMOS (Prosilica 1300x1000). L'objectif est utilisé au grossissement 1X. La boîte (9cm de diamètre) est illuminée par dessous de manière homogène à l'aide d'une diode électroluminescente (LED) recouverte d'un diffuseur et d'une lentille de Fresnel (Figure C.1). L'ensemble est maintenu par une structure métallique fabriquée au laboratoire et est confiné dans une enceinte permettant le contrôle de la température.

Le système enregistre une image toutes les 200ms. Les images sont traitées en temps réel à l'aide d'un programme Labview (National instruments). Dans chaque image, le programme détermine la position du ver et déplace la platine de façon à maintenir le centre de masse de l'animal au centre d'une région d'intérêt de l'image (ROI) de taille égale à 300x300 pixels. Le ver est reconnu dans l'image par seuillage global, puis application de filtres de taille et de forme sur l'image binaire obtenue. L'objet ainsi défini est ensuite soumis à des filtres morphologiques permettant de remplir les pixels manquants à l'intérieur de l'objet, et le centre de masse de l'objet ainsi traité est calculé. A chaque pas de temps, l'image du ver est enregistrée (voir Figure 4.1) et sa position est inscrite dans un fichier annexe. L'origine de la trajectoire est déterminé par la position du ver au début de l'enregistrement.

C.1.2 Système multi-vers

Le système multi-vers est constitué d'un objectif d'appareil photographique en mode macro couplé à une caméra CCD (Hamamatsu, 1300x1000) (Figure C.1). Dans le but d'obtenir une image de la boîte entière, les expériences sont réalisées sur des boîtes de 6cm de diamètre. La boîte contenant entre 5 et 10 vers est éclairée de manière très homogène à l'aide d'un système d'illumination constitué de multiples LEDs (Schott Easyled). L'image de la boîte entière est

enregistrée à l'aide d'un programme Labview à la fréquence d'une image toutes les 400ms seulement pour limiter le temps d'analyse d'image. Les composants optiques sont maintenus par une structure métallique et le système est placé dans une enceinte contrôlée en température.

Les images enregistrées sont ensuite traitées à l'aide d'un programme MATLAB. Dans la première image, l'utilisateur définit tout d'abord un ROI contenant les vers. Un seuillage local (fenêtre de 15x15 pixels) est ensuite appliqué à cette première image, suivi d'un filtre de taille et d'élongation sur les objets obtenus après seuillage. Après ces opérations, seuls les objets situés dans le ROI prédéfini sont conservés. Cette analyse permet de déterminer la position des vers dans la première image (Figures C.2, C.3).

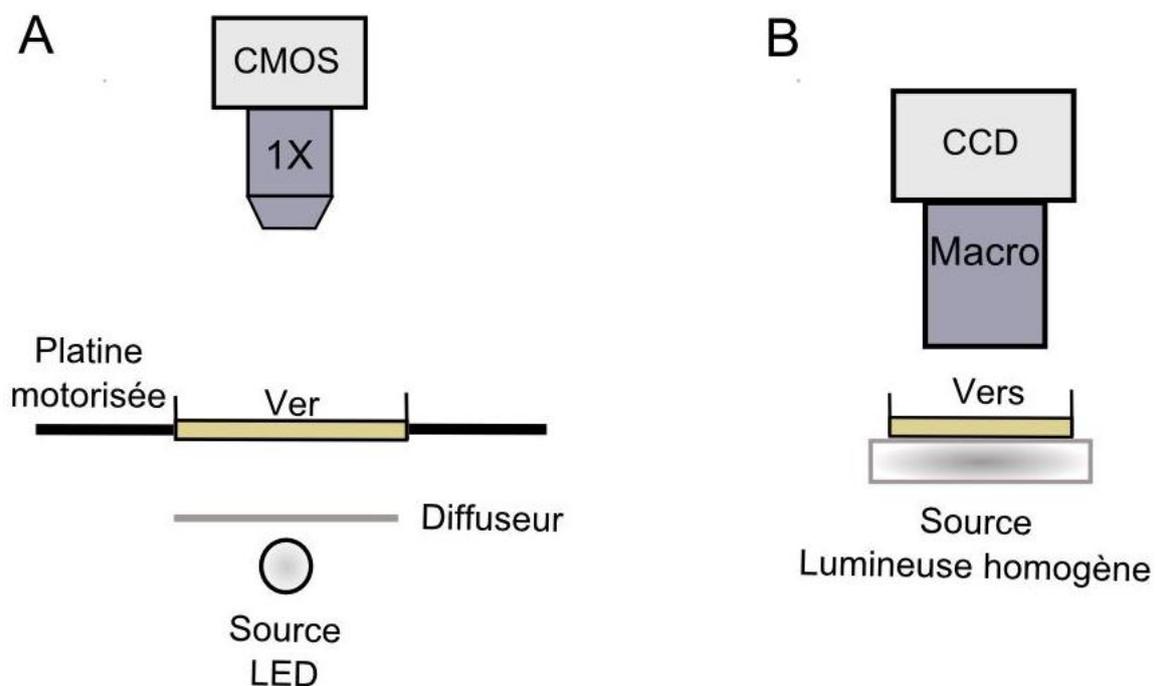


FIGURE C.1 – Système de tracking. A : mono-ver, B : multi-vers

Lors de l'analyse des images suivantes, pour l'image i , un ROI de 40x40 pixels est défini pour chaque ver autour du centre de masse de l'objet défini à l'image $i-1$. Pour chacun de ces ROIs, la position du ver dans le ROI est déterminée par seuillage local, application de filtres de taille et de forme puis traitement morphologique. Bien que cela soit peu courant du fait du faible nombre de vers par boîte, il arrive que deux vers se croisent. Dans ce cas, les deux ROIs correspondant aux deux vers se superposent et deux objets sont détectés. Pour palier en partie à ce problème, chaque ROI suit l'objet dont le centre de masse est le plus proche de son centre. Ainsi chaque ROI suit généralement un seul ver, même si deux vers se croisent. Il faut tout de même préciser qu'il arrive que lors d'un croisement, l'un des deux vers soit perdu. Enfin, si un ver s'approche à moins de 20 pixels du bord de l'image totale, le programme arrête le calcul de la trajectoire de ce ver.

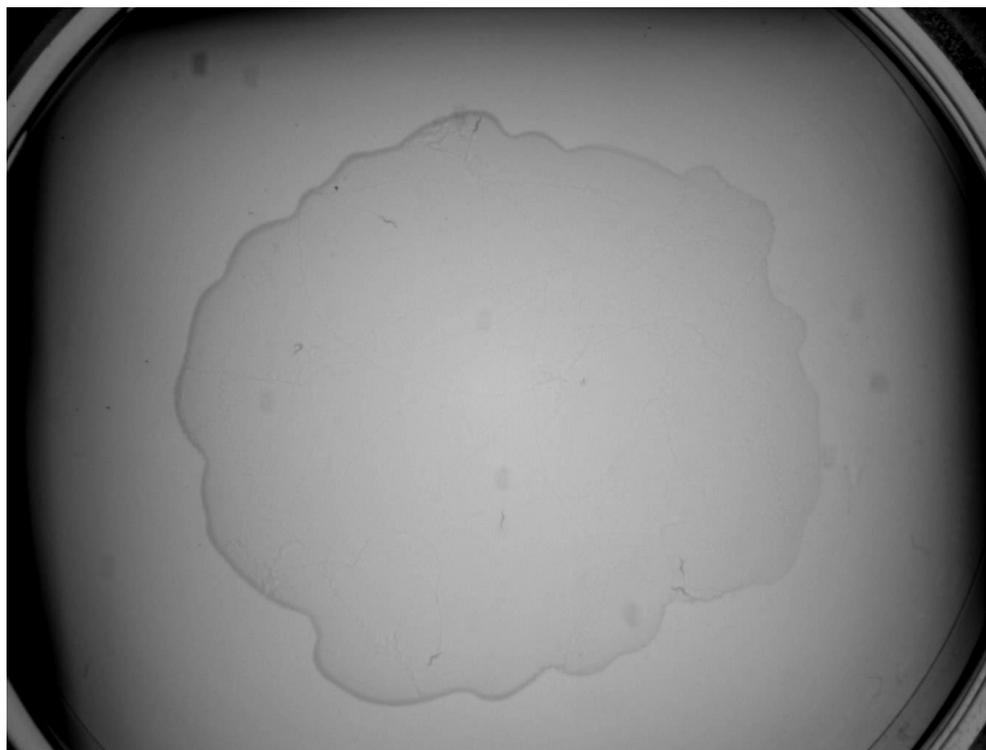


FIGURE C.2 – Image de la boîte entière avant traitement.

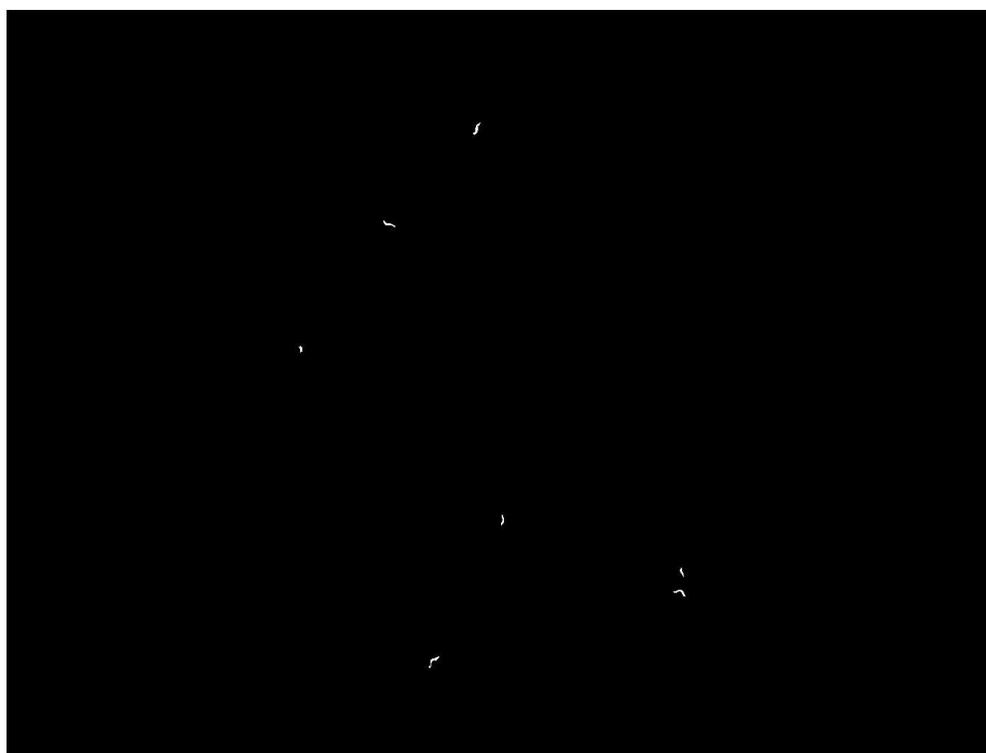


FIGURE C.3 – Image de la boîte entière après traitement.

C.2 Imagerie calcique

C.2.1 Marqueurs de l'activité calcique

Pour mesurer l'activité calcique intracellulaire, il existe des marqueurs calciques synthétiques qu'il faut injecter dans la cellule d'intérêt et des marqueurs calciques encodés génétiquement. Ces derniers peuvent être exprimés de manière très spécifique dans la cellule à imager, mais ont généralement une sensibilité bien moins forte que les marqueurs synthétiques [Pologruto et al., 2004]. Pour l'imagerie calcique de neurones chez *C. elegans*, ils sont cependant choisis préférentiellement. Il n'est en effet pas possible d'injecter dans les cellules de *C. elegans* sans percer la cuticule du ver, ce qui est extrêmement invasif. Par ailleurs de nombreux promoteurs spécifiques de certaines cellules ont été découverts chez le ver, ce qui permet l'expression spécifique de marqueurs génétiques dans le neurone d'intérêt.

Il existe différents marqueurs de l'activité calcique encodés génétiquement. Certains marqueurs sont fondés sur la variation d'intensité d'une protéine fluorescente en fonction de la concentration en calcium. Les protéines G-CaMP et Camgaroo2 sont par exemple fondées sur ce principe (Figure C.4, [Griesbeck et al., 2001], [Nakai et al., 2001]). La protéine G-CaMP est constituée d'une protéine cpGFP liée en C-terminus à une protéine calmoduline sensible au calcium, alors que la protéine Camgaroo2 est fondée sur une cpYFP couplée à une protéine calmoduline. La liaison du calcium sur la partie calmoduline de la construction change la conformation de la protéine fluorescente, ce qui fait varier l'intensité de l'émission de fluorescence.

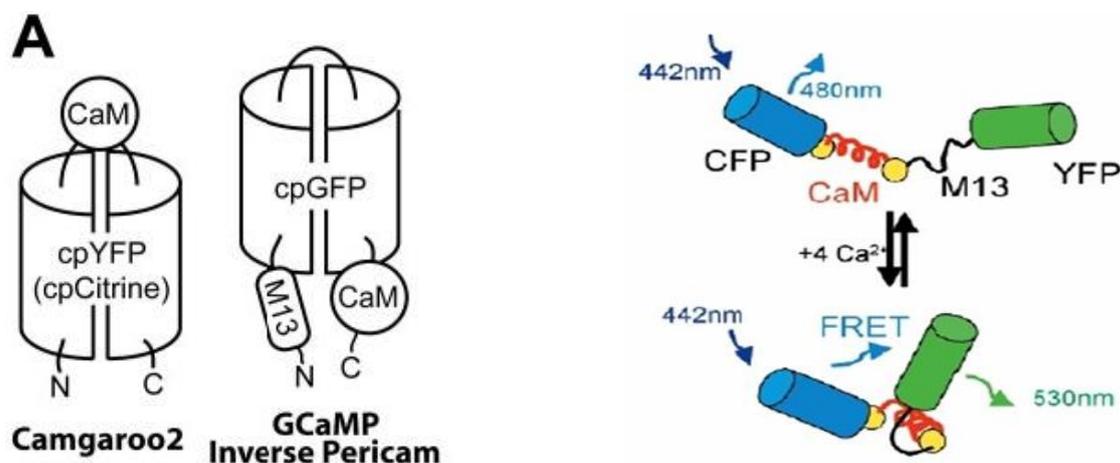


FIGURE C.4 – Gauche : Structure des protéines G-CaMP et Camgaroo2 [Pologruto et al., 2004]. Droite : Principe de fonctionnement de la protéine caméléon.

Il existe également des marqueurs ratiométriques qui sont fondés sur la variation du transfert de fluorescence entre deux protéines fluorescentes en fonction de la concentration en calcium [Miyawaki et al., 1997]. Les protéines caméléon sont constituées d'une protéine fluorescente bleue fusionnée à une protéine qui lie le calcium et à une protéine fluorescente jaune (Figure C.4, voir 2.2.2). Il existe différentes variantes de protéines caméléon de dynamique et sensibilité différentes.

La protéine YC2.1 a été la première protéine caméléon utilisée pour l'imagerie calcique de neurones chez *C. elegans* [Kerr et al., 2000]. Des variantes de caméléon beaucoup plus sensibles, par exemple les protéines YC3.6 et D3cpv, ont été développées depuis et permettent d'observer des signaux plus rapides et d'intensité plus faible [Palmer et al., 2006]. La mesure de l'activité calcique des neurones thermosensoriels AFD a ainsi pu être effectuée sur des vers mobiles pendant quelques minutes grâce à l'amélioration du signal obtenue par l'utilisation de YC3.6 en remplacement de YC2.1 ([Clark et al., 2007], Figure C.5).

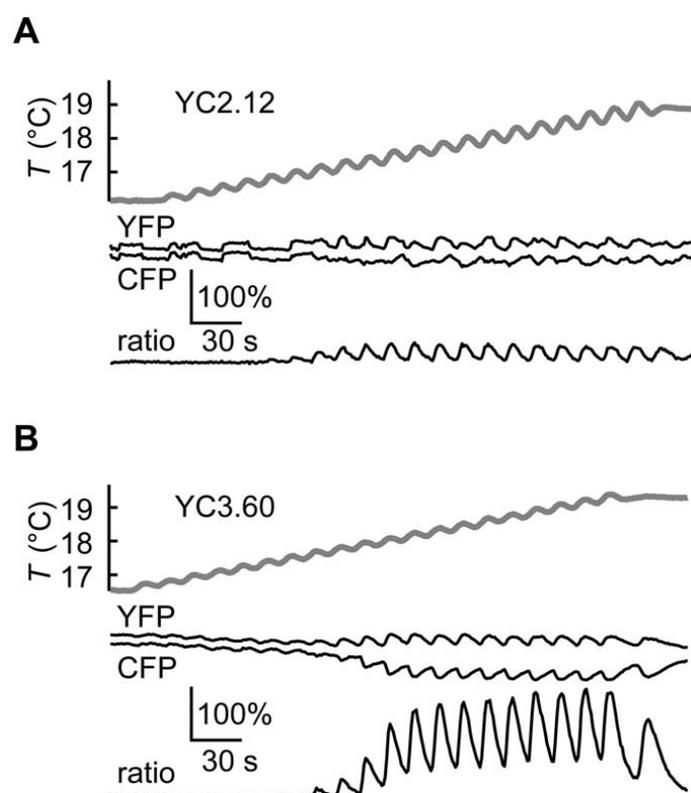


FIGURE C.5 – Les variations du ratio reflétant la réponse du neurone AFD à des oscillations de température sont largement amplifiées par l'utilisation de la protéine caméléon YC3.6 (B) par rapport à la protéine YC2.12 (A) [Clark et al., 2007].

Pour mesurer l'activité de neurones de vers se déplaçant librement sur une boîte, j'ai décidé d'utiliser un marqueur ratiométrique, dans le but de filtrer les variations de fluorescence liées au mouvement du ver. En effet, les artefacts liés au mouvement sont corrélés dans les deux voies d'émission de la protéine caméléon alors que les variations liées à l'activité calcique du neurone sont anticorrélées. En calculant le rapport d'intensité entre les deux voies d'émission, on peut donc retirer les artefacts de mouvement. Pour maximiser le signal, j'ai utilisé les protéines YC3.6 (dans les neurones PLM) et D3cpv (dans les neurones AVA et AIY).

C.2.2 Système d'imagerie calcique

Le système d'imagerie calcique permet d'enregistrer le comportement du ver et l'activité calcique neuronale d'un neurone marqué par deux voies optiques différentes (Figure C.6).

Le ver est libre de se déplacer sur une boîte de 9cm de diamètre maintenue ouverte à l'envers sur une platine X-Y motorisée et contrôlée par ordinateur (Marzhauser, $v = 10\text{mm/s}$, $a = 1\text{m/s}^2$). Le système d'illumination (Prior Lumen) est constitué d'une lampe métal-halide 200W couplée à une fibre optique et comporte un shutter et une roue à filtres motorisés. L'intensité de l'illumination est donc précisément contrôlée et toutes les expériences ont été effectuées à 20% de l'intensité de la lampe. La longueur d'onde d'excitation (440nm) est sélectionnée grâce à un filtre passe-bande placé dans la roue à filtres internes de la lampe (440/20, Chroma). Le faisceau d'illumination est focalisé à l'arrière d'un objectif 20X (ON : 0.45, WD : 0.5cm, Nikon) qui permet à la fois l'illumination et l'imagerie d'épifluorescence du neurone en réflexion. La position de l'objectif en X-Y-Z est réglable manuellement par une vis micrométrique. Un filtre dichroïque à 455nm (455DCLP, Chroma) permet la séparation de l'illumination et de l'image de fluorescence qui est ensuite séparée en deux images aux deux longueurs d'onde d'émission de la protéine par un système optique Optosplit (Cairn Technology). Ce système est équipé d'un cube de fluorescence comportant un filtre dichroïque à 515nm et deux filtres d'émission passe-bandes centrés à 485nm et 535nm (515DCLP, 485/40, 535/30, Chroma). Les deux images de fluorescence sont projetées sur les deux moitiés d'une caméra EMCCD (Andor Ixon). L'image en transmission du ver entier est enregistrée sur une caméra CMOS (Prosilica, 1000x1300 pixels) au travers d'un objectif 3X (objectif réglable 1-3x, Edmund Optics) et d'un filtre neutre de densité ($D=1.3$, Thorlabs) pour éviter la saturation de la caméra. Les différents composants optiques sont montés de manière compacte à l'aide de pièces optomécaniques (Thorlabs) sur une structure métallique fabriquée au laboratoire. L'ensemble est fixé sur une table optique.

La platine motorisée et les deux caméras sont contrôlées par un programme Labview (National Instruments). Le système enregistre simultanément une image en transmission et la double image de fluorescence toutes les 150ms. La caméra EMCCD est réglée avec un temps d'exposition de 30ms, un gain fixé à 4 et un binning 2X2, à la vitesse de lecture et au gain de préamplification maximaux. L'expérimentateur clique au début de l'enregistrement sur le neurone dans l'image à 535nm. Le neurone est ensuite détecté à chaque pas de temps par le maximum d'intensité dans l'image à 535nm. La platine est déplacée en temps réel de manière à maintenir ce maximum d'intensité à sa position d'origine dans l'image. A chaque pas de temps, la position réelle du neurone sur la boîte par rapport à sa position au début de l'enregistrement est calculée et inscrite dans un fichier, ainsi que la valeur de l'horloge de l'ordinateur. Le neurone est focalisé en Z dans la voie de fluorescence au début de l'enregistrement. Au cours de l'expérience, le ver se déplace sur la boîte et si celle-ci n'est pas parfaitement plate, il peut y avoir une perte de focus lente. La position en Z est donc corrigée manuellement si nécessaire pendant l'enregistrement par déplacement de l'objectif de fluorescence. La profondeur de champ de l'objectif 3X est suffisante pour qu'il n'y ait pas de perte de focus dans cette voie pendant l'enregistrement. A chaque pas

de temps, le système enregistre donc la position du neurone (donc du ver) sur la boîte, l'image du ver entier en transmission et les deux images d'émission de fluorescence du neurone d'intérêt à 485nm et 535nm.

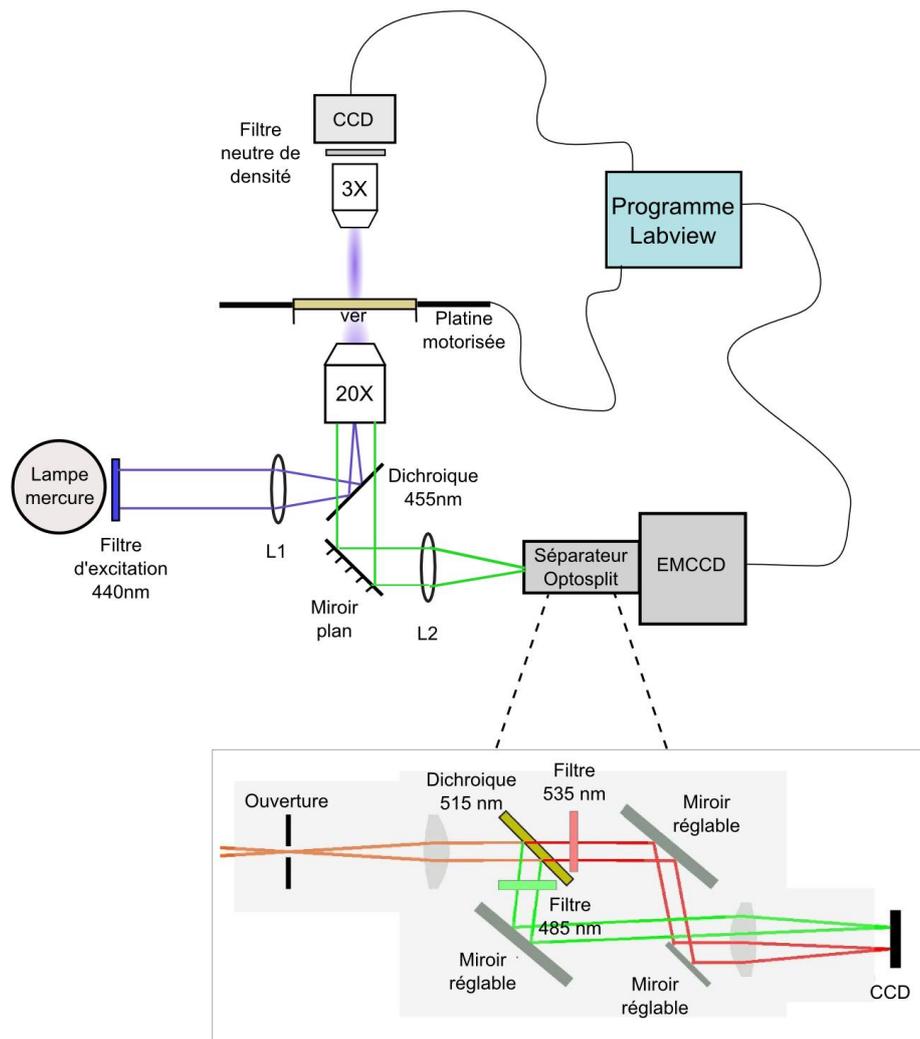


FIGURE C.6 – Dispositif expérimental d'imagerie calcique.

C.2.3 Analyse du signal

Le signal de FRET est extrait des images d'émission de fluorescence à 535nm et 485nm. Pour chaque image, les 100 pixels d'intensité maximum sont moyennés pour donner M_Y à 535nm et M_C à 485nm. A chaque pas de temps le rapport de FRET F est calculé comme le rapport M_Y/M_X . Quand le neurone s'active, la concentration en calcium intracellulaire augmente et est fixé par la protéine caméléon. Celle-ci change alors de conformation et on observe un transfert de fluorescence de la partie fluorescente bleue CFP de la protéine vers la partie fluorescente jaune YFP (voir 2.2.2). Quand la concentration en calcium augmente, l'émission de fluorescence de la protéine caméléon diminue à 485nm et augmente à 535nm. Le rapport de FRET F augmente donc lorsque le neurone s'active.

Les deux protéines CFP et YFP peuvent blanchir sous l'effet de l'illumination à 440nm. Je n'ai pas observé de décroissance de la ligne de base dans la voie CFP à 485nm. Par contre, on observe une décroissance progressive à 535nm, et donc dans le rapport de FRET. Le signal a été traité de la manière suivante (Figure C.7).

$$F_{final}(t) = \frac{F(t)}{F_0(t)} - 1$$

où F est le rapport M_Y/M_X et F_0 la valeur de la ligne de base de F interpolée à l'instant t .

Ainsi F_{final} représente le pourcentage de variation du rapport de FRET au cours du temps. L'intérêt essentiel des mesures effectuées est de déterminer la position temporelle des pics d'activité du neurone imagé pour la corrélérer au comportement de l'animal et ce traitement n'a aucune incidence sur la position des pics d'activité.

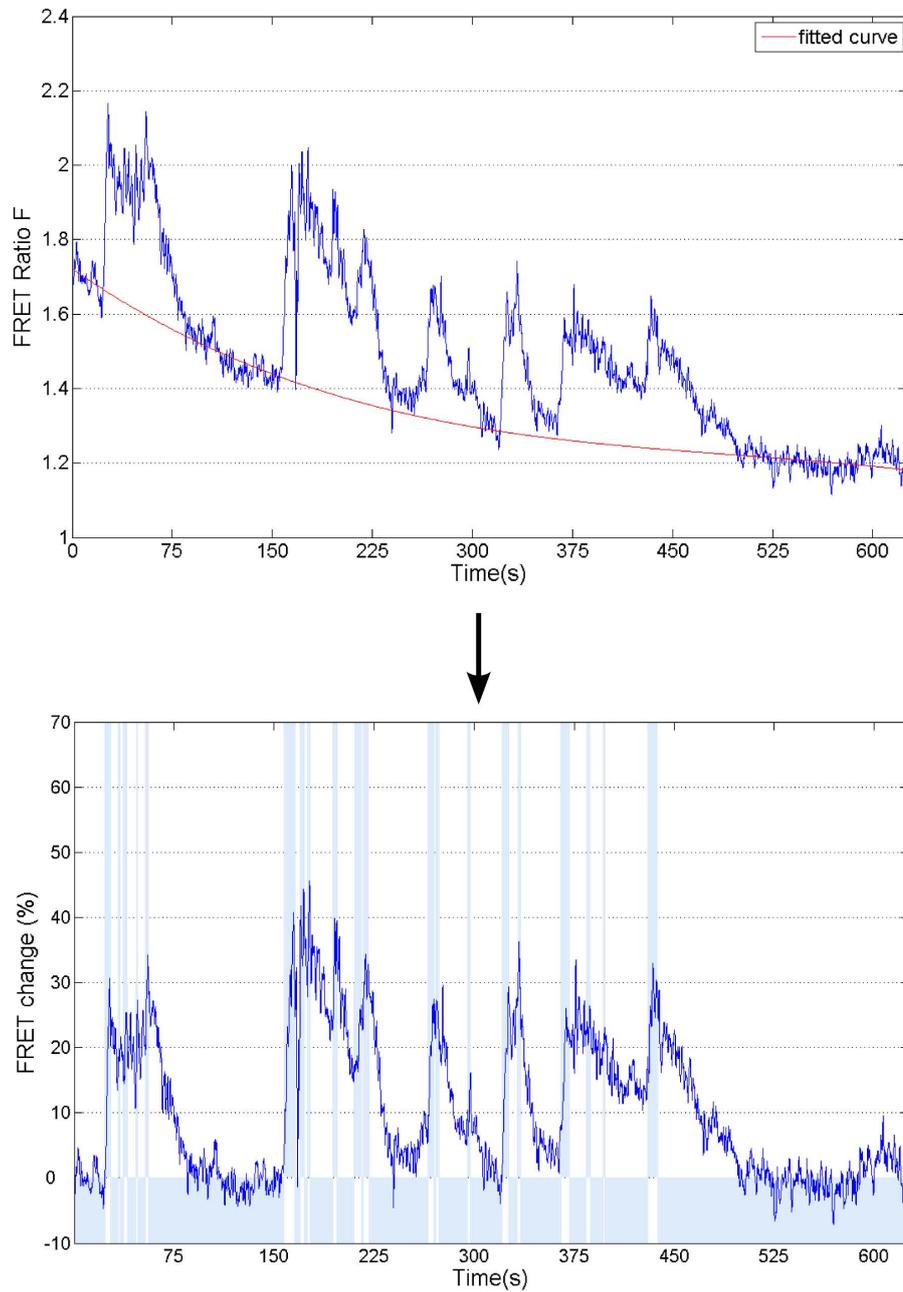


FIGURE C.7 – Traitement du rapport de FRET. En haut : F (bleu) et F_0 (rouge), en bas : F_{final}

Sixième partie

Articles

Annexe D

Article 1

Le premier article reprend essentiellement les résultats de la Partie [II](#) de cette thèse. Il a été publié dans la revue "PLoS ONE".

Molecular and Sensory Basis of a Food Related Two-State Behavior in *C. elegans*

Juliette Ben Arous^{1*}, Sophie Laffont¹, Didier Chatenay²

¹ Laboratoire de Physique Statistique de l'École Normale Supérieure, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université Pierre et Marie Curie, Paris, France, ² Laboratoire Jean Perrin, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

Abstract

Most animals display multiple behavioral states and control the time allocation to each of their activity phases depending on their environment. Here we develop a new quantitative method to analyze *Caenorhabditis elegans* behavioral states. We show that the dwelling and roaming two-state behavior of *C. elegans* is tightly controlled by the concentration of food in the environment of the animal. Sensory perception through the amphid neurons is necessary to extend roaming phases while internal metabolic perception of food nutritional value is needed to induce dwelling. Our analysis also shows that the proportion of time spent in each state is modulated by past nutritional experiences of the animal. This two-state behavior is regulated through serotonin as well as insulin and TGF-beta signaling pathways. We propose a model where food nutritional value is assessed through internal metabolic signaling. Biogenic amines signaling could allow the worm to adapt to fast changes in the environment when peptide transcriptional pathways may mediate slower adaptive changes.

Citation: Ben Arous J, Laffont S, Chatenay D (2009) Molecular and Sensory Basis of a Food Related Two-State Behavior in *C. elegans*. PLoS ONE 4(10): e7584. doi:10.1371/journal.pone.0007584

Editor: Vladimir Brezina, Mount Sinai School of Medicine, United States of America

Received: May 29, 2009; **Accepted:** October 1, 2009; **Published:** October 23, 2009

Copyright: © 2009 Ben Arous et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was funded by CNRS (www.cnrs.fr) and Université Pierre et Marie Curie (www.upmc.fr). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: juliette.benarous@lps.ens.fr

Introduction

Most animals in their natural environment usually divide their time into two major states, an active moving state and an inactive resting state. Interestingly, across a large range of species the time spent in the inactive phase is usually much larger than the time spent moving actively [1]. In the laboratory, mice also alternate between two activity states even when there is no food shortage. In their home cages, wild type mice spend 66% of their time in inactivity [2]. Moreover, this time allocation is biologically regulated and may be crucial for the animal survival. For example mice mutants of the adipocyte hormone leptin or the 5-HT_{2C} serotonin receptor display altered time budgets and obesity problems [2]. This type of intermittent behavior seems tightly linked to foraging and food consumption. Animals may therefore have to adapt their time allocation according to the availability of food in their environment.

We chose the soil nematode *Caenorhabditis elegans* as a model organism to study the molecular and environmental basis of this behavior. Its short life span and small size make it a tractable model to measure quantitatively long time scale behaviors such as time allocation in a range of different controlled environments. *C. elegans* is also a good model to study molecular basis of such behaviors, as the genetics of many worm behaviors have been studied in great details [3–5]. Moreover, *C. elegans* alternates between inactive and active phases on its standard food, the *Escherichia coli* strain OP50. In standard conditions Fujiwara et al estimated that *C. elegans* spends 80% of its time in an inactive mode called dwelling and 20% in an active mode called roaming [6]. During dwelling worms keep a low speed, alternate frequently

between backward and forward movement and do not show much overall displacement. On the contrary roaming consists of straight displacements of sustained sinusoidal forward movement with few changes of direction. Moreover *C. elegans* modulates its time budget depending of the nutritional quality of the food present in its environment. The time allocated to roaming is smaller when the growth of the animal is favored by the quality of the food available [7]. This may be a strategy to select the best food environments and to leave areas where the quality of food is not sufficient for a sustainable population growth.

Here we show that *C. elegans* time allocation changes in response to the concentration of available food. Ultimately, upon food shortage, worms allocate all their time to the active phase. We provide evidence that internal signaling of food presence is necessary to induce the dwelling state and that, in presence of food, external sensory perception and previous starvation experiences modulate the time allocated to each phase. Finally, we show that serotonin, TGF-beta and insulin signaling control the time allocation in *C. elegans*.

Results

Wild type *C. elegans* exhibits two activity phases on food

To characterize *C. elegans* locomotory behavior on food, we used a custom automatic tracking system. We recorded multiple animals trajectories at 20°C for two hours with a 400 ms time resolution, on standard NGM plates evenly spread with the *E. coli* strain OP50 (Fig. 1A). The same method was used for all the following conditions and genotypes.

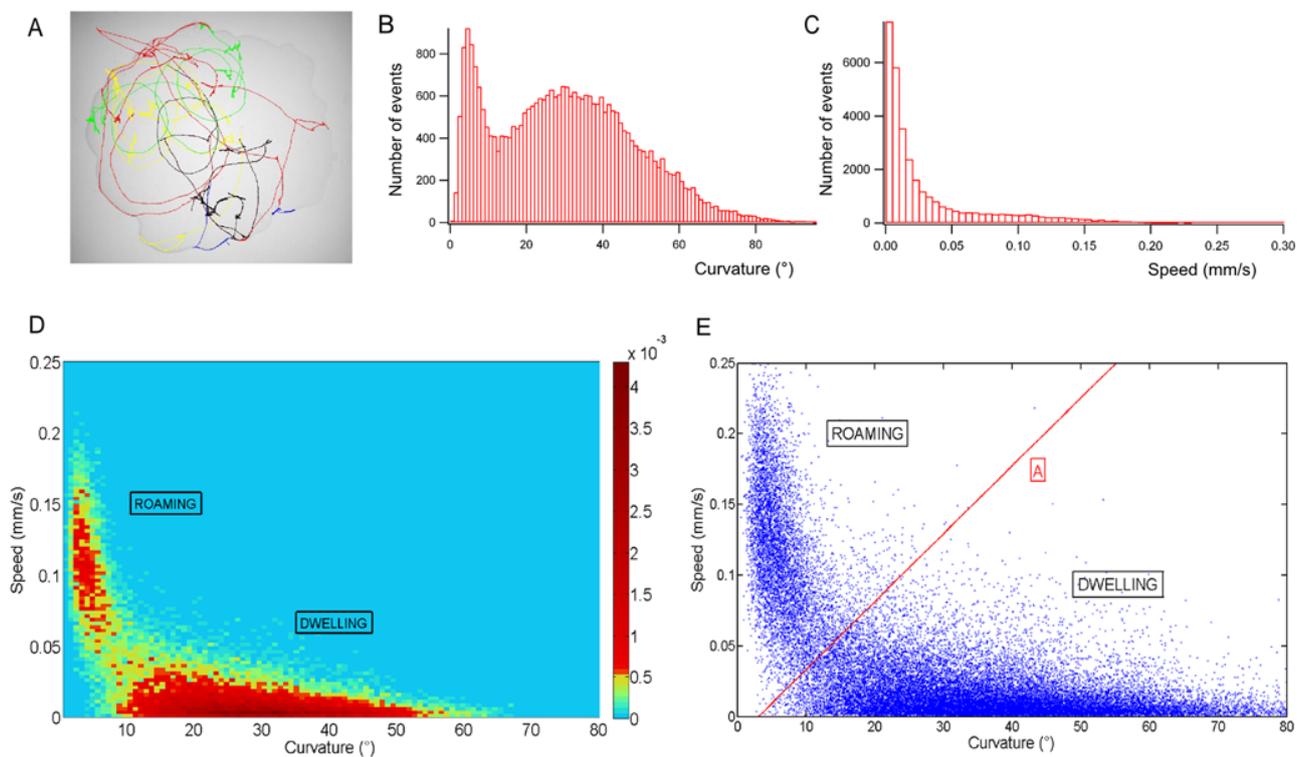


Figure 1. Two-state behavior of wild type *C. elegans* on food. (A) Trajectories of multiple WT *C. elegans* on OP50 (60 mm plate) (B) Curvature histogram for all the wild type worms (1bin = 1°) (C) Speed histogram for all the wild type worms (1bin = 0.05 mm/s) (D) Data points density map in the (Speed, curvature) plane. Two clusters can be observed (Data from 38 worms) (E) Clustering method. Data points over line A are attributed to the roaming phase, data points under line A to the dwelling phase. Line A has been determined on total WT data and is used for analysis of all the experiments in all the conditions.

doi:10.1371/journal.pone.0007584.g001

We were interested in long time scale locomotory behavior of the worm on food to determine whether we could quantify distinct activity phases. In order to filter out the sinusoidal and other short time scale features of the worm locomotion we split each worm trajectory in 10 seconds intervals and we calculated averaged speed and curvature for each of these short trajectory sections. The time period of the worm sinusoid on food lasts for about 4 seconds in our experiments. Thus, we used 10 s long sections as a trade off between keeping enough time resolution and erasing short-term features of the worm locomotion. We combined all the data points of the wild type worms, which allowed us to cluster quantitatively two behavioral states in the plane defined by speed and average curvature (Fig. 1).

Despite a quite different analysis method, we observed as in previous studies that wild type *C. elegans* display two different activity phases on food [6,7]. We could observe a first cluster defined by trajectory sections of high speed and low average curvature. This cluster corresponds to the previously proposed definition of roaming as long slightly curvy movement with a few reorientations, and represents 20% of the events [6]. The roaming percentage for a given experiment was calculated as the number of points in the roaming cluster divided by the total number of points. We also observed another cluster defined by low speed and high average curvature events. This cluster corresponds to the inactive dwelling phase that is a succession of very short runs and many reversals. In our conditions N2 worms spent 80% of their time dwelling and did not show any quiescence events, which may be due to the quite low quality of the OP50 bacteria [8].

C. elegans adapts its roaming behavior to food concentration

At high food concentration worms dwell most of their time. Besides, dwelling has not been observed off food and the proportion of time spent dwelling depends on food quality [7]. Thus, *C. elegans* seems to activate roaming in bad nutritional conditions. We wondered how the worm would behave at intermediate food concentrations and which concentration of bacteria was necessary to initiate the dwelling behavior. We analyzed trajectories of wild type worms without food and on a large range of food concentrations (from 0 to 10^8 bacteria per cm^2). Off food and at low bacteria concentration (up to 10^4 bacteria per cm^2) we found only one cluster corresponding to the roaming behavior. Above $5 \cdot 10^5$ bacteria per cm^2 worms behaved mostly as if they were in standard conditions and dwelled most of their time. Worm behavior switched from fully roaming to mostly dwelling over a range of bacterial concentrations (Fig. 2A–D, 2F). We could also detect a second effect of food concentration. Average speed in the roaming phase decreased when food concentration increased (Fig. 2E). Thus *C. elegans* roams less and at a lower speed as food concentration increases.

Dwelling is not induced by external sensory perception

Worms can sense different food features, through chemosensory and mechanosensory circuits, but also through internal metabolic signaling reflecting their satiation state [9–13]. As a high food concentration is necessary to induce dwelling, we wanted to assess

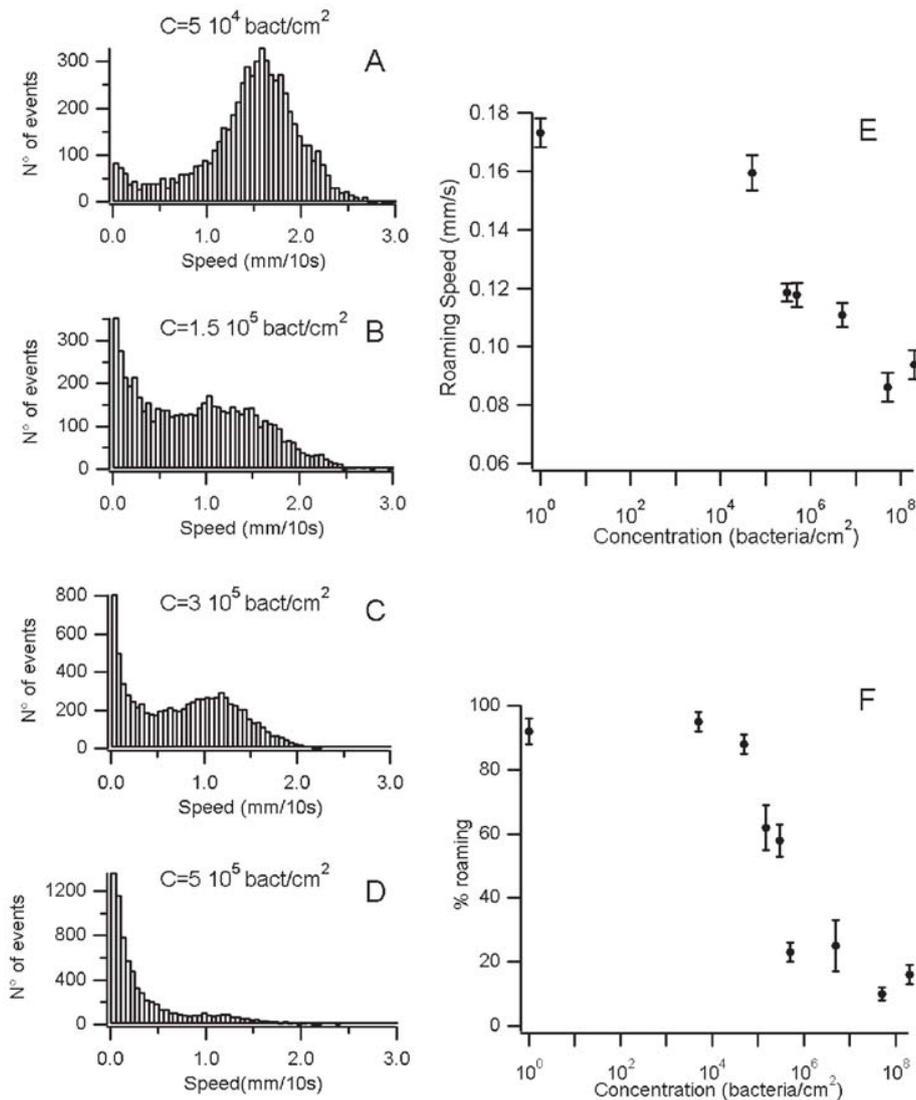


Figure 2. *C. elegans* adapts its roaming behavior to food concentration, both by changing the dwelling/roaming percentage and the speed during the roaming phase. (A–D) Speed histograms of WT *C. elegans* on different concentration of bacteria (A: 5×10^4 B: 1.5×10^5 C: 3×10^5 D: 5×10^5 bacteria per cm², at least 15 worms have been recorded per condition, results are presented as mean \pm s.e.m.) (E) Speed in the roaming phase decreases with food concentration (F) The percentage of time spent in the roaming phase is a function of food concentration (logarithm scale). Worms switch from an all-roaming to mostly dwelling in one decade of food concentration. doi:10.1371/journal.pone.0007584.g002

which components of food perception were needed, using a method developed by Gruninger & al [14]. They use bacteria treated with a low concentration of aztreonam, which is an antibiotic that prevents the septum closure during the division of *Escherichia Coli*. The last step of bacterial division is then blocked and *E. coli* that have been treated grow in long chains of undivided bacteria (up to 50 μ m long). Gruninger & al have shown that the treated OP50 bacteria transmit mechanosensory and chemosensory clues comparable to regular OP50 signals but are of very low nutritional value to *C. elegans*. Worms can actually not swallow these bacteria because of their size [14].

Wild type *C. elegans* spend 75% of their time roaming on aztreonam treated bacteria (Fig. 3A, 3C). On a standard bacterial lawn worms would show this phenotype on low concentrations of bacteria ($\sim 10^5$ bacteria per cm²) (Fig. 2F). On aztreonam plates worms roam most of the time even though there is a high

concentration of growing bacteria ($\sim 10^7$ bacteria per cm², similar to standard conditions). Thus, worms behave as if they could not perceive food presence correctly when they cannot swallow that food, even when they sense food chemosensory signaling. Thus, the signal needed for dwelling is probably a metabolic signal arising after digestion. External sensory perception of food is then not sufficient to stimulate dwelling and internal metabolic signaling is the major component of food perception necessary to induce this behavior.

This finding is also consistent with the behavior of cilium defective *che-2* mutants. These mutants have altered sensory perception and are mostly unable to roam on food. These mutants show normal locomotory behavior when stimulated and do not have basic locomotory defects [6]. On aztreonam treated bacteria, they roam much more than on regular food but still spend significantly less time in the roaming phase than wild type worms

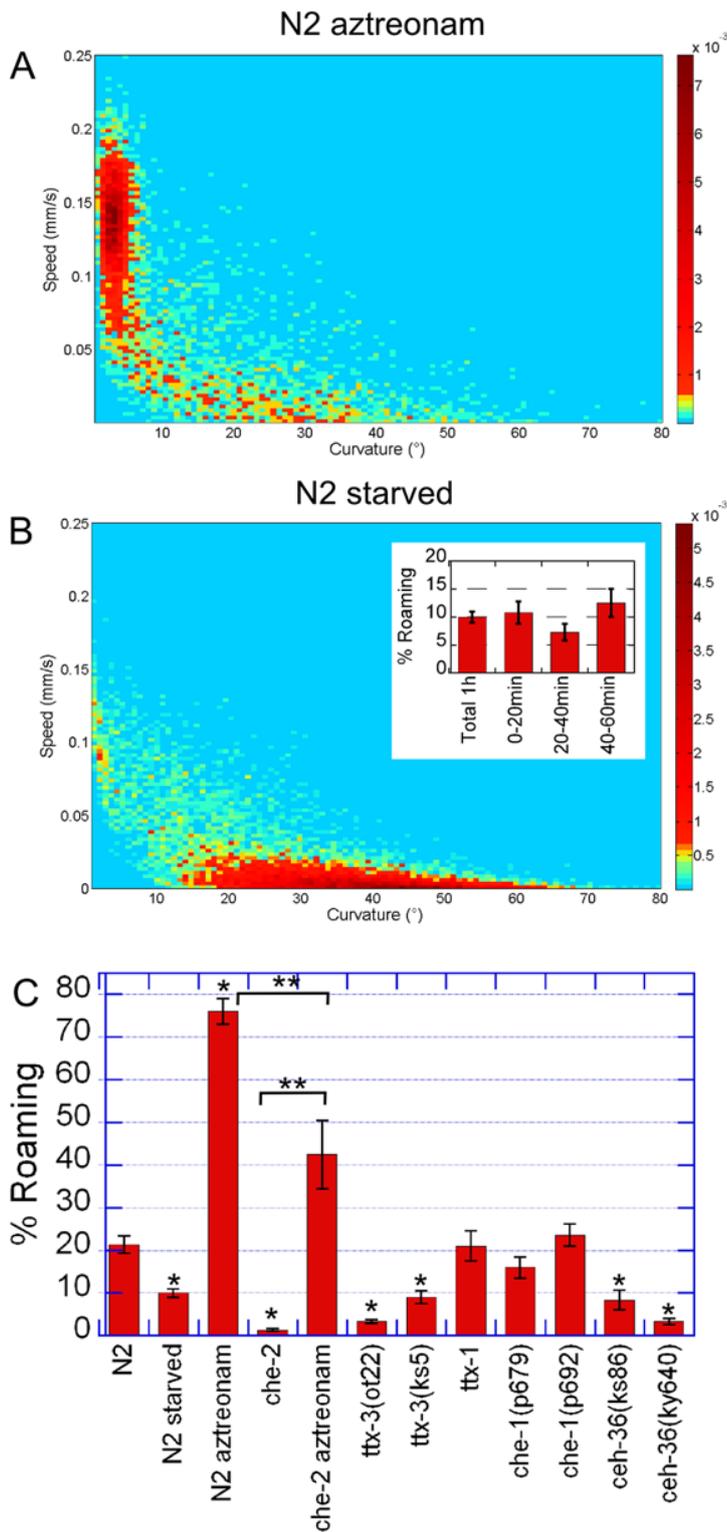


Figure 3. Influence of food perception and experience. (A–B) Data density maps for (A) N2 worms feeding on aztreonam treated bacteria. Compared to N2 worms in standard conditions (Fig 1-D) the dwelling cluster is suppressed (B) N2 worms feeding on standard OP50 bacteria after a 1 h fasting period. The roaming cluster is suppressed. Inset: Proportion of time spent roaming during the 0–20 min, 20–40 min and 40–60 min time intervals after a one-hour starvation period. (C) Quantitative measurements of the percentage of time spent roaming of N2 worms in aztreonam (A) and fasting (B) conditions and of mutants that have sensory perception defects. At least 20 worms were recorded per condition. Results are presented as mean \pm s.e.m. *Different from wild type, $p < 0.01$ **Different from each other $p < 0.01$. doi:10.1371/journal.pone.0007584.g003

(Fig. 3C). These worms are then still able to respond to the presence of nutritional food but are defective in roaming in both conditions. Thus, external sensory perception seems to promote roaming in favorable and unfavorable food conditions.

Some specific amphid neurons mutants also show altered roaming behavior on food (Fig. 3C). AIY and ASI amphid neurons have been shown to extend roaming periods on food [7]. We checked mutants of neuronal terminal selector genes, which are transcription factors necessary for the development of specific sensory neurons [15]. We analyzed the behavior of worms with defects in the AWC olfactory neurons, the AFD thermosensory neurons or the gustative ASE neurons. All of these neurons have projections on the AIY interneurons. *ceh-36* (AWC+ASE) and *ttx-3* (AIY) mutants roamed twice less than wild type worms on food, even though they were able to move when stimulated. On the contrary *ttx-1* (AFD) and *che-1* (ASE) did not show any significant phenotype for this behavior (Fig. 3C). Therefore chemosensory perception through the AWC neurons seems to be necessary to maintain roaming phases on food. However, the behavior of wild type *C. elegans* on aztreonam treated bacteria shows that sensory perception is not sufficient to induce the transition from an all-roaming phenotype to a two-state behavior when worms encounter food.

Previous starvation experience enhances dwelling behavior

After a starvation period, *C. elegans* displays an “enhanced slowing response” when entering a bacterial lawn. This behavior is mediated by the neuromodulator serotonin [11]. The worm previous experience can then modulate its feeding behavior when it reencounters a food source.

In order to investigate how starvation affects the dwelling and roaming behavior, we starved wild type animals for an hour then transferred them to standard seeded plates. We recorded and analyzed one hour-long trajectories of these fasted animals on bacteria.

Starved worms roam twice less than well-fed worms. The proportion of time spent dwelling is mostly constant through the one-hour recording (Fig. 3B–C). This result shows that the enhanced slowing response can last for at least an hour after reencountering food.

Serotonin mutants are defective in roaming behavior and do not respond to starvation

As biogenic amines signaling pathways have been previously implicated in food related behaviors of *C. elegans* [10,11,13,16], it appeared interesting to test the importance of these signaling pathways on the roaming and dwelling behavior. Therefore, we analyzed the trajectories of different mutants defective in these pathways in standard conditions.

Different biogenic amines mutants had very different phenotypes (Fig. 4). Dopamine deficient *cat-2*, octopamine deficient *tbh-1* and tyramine deficient *tdc-1* mutants did not have significant defects. On the contrary, serotonin deficient *tph-1* mutants were strongly defective in roaming.

As serotonin and dopamine are involved in enhanced and basic slowing behavior on food [11], we also analyzed the behavior of fasted biogenic amines mutants. Fasted *cat-2*, *tbh-1* and *tdc-1* mutants exhibited a wild type starvation response and decreased strongly the time they spent roaming when they reencountered food (Fig. 4). On the contrary, well-fed and fasted *tph-1* mutants did not show significantly different behaviors. Serotonin deficient worms may then behave as if they were starved in all conditions.

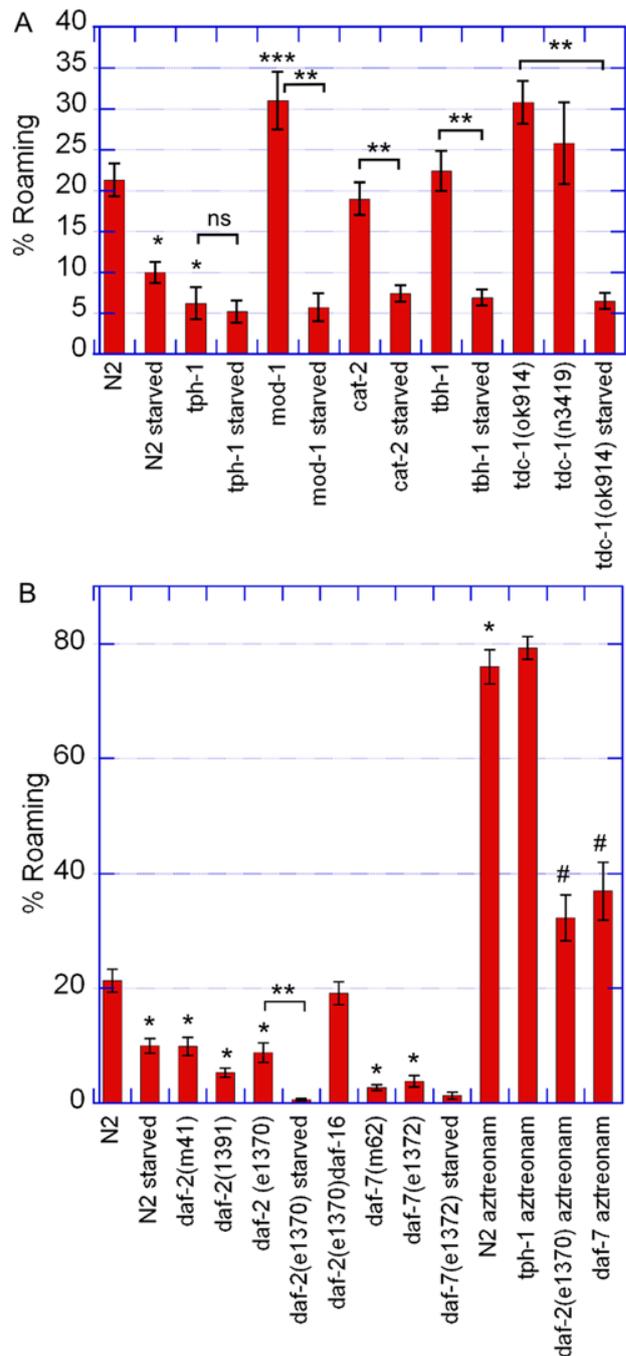


Figure 4. Biogenic amines, insulin and TGF-beta signaling mutants. (A) Percentage of time spent roaming for well-fed and fasted biogenic amines mutants in standard conditions. (B) Percentage of time spent roaming for well-fed and fasted insulin and TGF beta signaling mutants in standard conditions and on aztreonam-treated OP50. At least 20 worms were recorded per condition. Results are presented as mean \pm s.e.m. *Different from wild type, Student's t-test $p < 0.01$. ***Different from wild type $p < 0.05$. **Different from each other $p < 0.01$. #Different from wild type on atreonam treated bacteria $p < 0.01$. doi:10.1371/journal.pone.0007584.g004

To define if the serotonin deficient mutants were still able to assess correctly the presence of nutritional food we analyzed the behavior of *tph-1* mutants on aztreonam treated bacteria. *tph-1*

mutants displayed a wild type phenotype on non-eatable food, although they had a lower average speed in the active phase (Fig. 4). This result shows that these mutants are able to move and that their defect is restricted to high quality food and is not linked to a basic locomotory defect.

MOD-1 is a serotonin receptor involved in the enhanced slowing response [17]. We hypothesized that this chloride channel could also mediate serotonin effect on roaming behavior. We measured roaming time proportion of well-fed and fasted *mod-1* mutants. We observed that well-fed *mod-1* mutants roamed more than *tph-1* mutants and even slightly more than wild type worms. This effect is weak but significant. Thus, serotonin could have antagonistic effects on this locomotory behavior through different receptors. Moreover, *mod-1* mutant animals do not show a defective response to starvation (Fig. 4). Therefore, MOD-1 does not mediate the enhanced dwelling after starvation that is controlled by serotonin and this behavior may then be different from the “enhanced slowing response” [11].

Insulin and TGF-beta signaling are necessary to induce roaming

Upon starvation, *C. elegans* larvae undergo developmental arrest at an alternative resistant dauer larval stage. Insulin and TGF-beta signaling pathways are involved in dauer formation, quiescence behavior and metabolism regulation and are then related to food signaling [18,19]. Mutants of the insulin receptor *daf-2* and of the TGF-beta peptide gene *daf-7* were deficient roamers in standard conditions. The *daf-2(e1391)* allele showed a stronger defect than the *daf-2(e1370)* and the *daf-2(m41)* alleles as expected from previous studies focusing on different behaviors [20]. *daf-2* mutants responded to a fasting experience like wild type animals by decreasing even more the time they spent in the active phase (Fig. 4).

More interestingly, *daf-7* and *daf-2* mutants behavior on aztreonam-treated bacteria was altered compared to wild type (Fig. 4). These mutants roamed much more on non-eatable bacteria than on regular food but still dwelled most of their time even in unfavorable food conditions. Therefore, even though these mutants are able to respond to the presence of nutritional food, they are defective in roaming in both food conditions. Some *daf-2* mutants have been shown to have temperature sensitive reduced motility [20]. Here in the roaming phase *daf-2* mutants had a normal sinusoidal movement and speed at 20°C and the defect was due to enhanced time spent in the dwelling phase and not uncoordinated movement (Speed (N2, aztreonam) = 0.158 ± 0.008 mm/s, Speed (*daf-2(e1370)*, aztreonam) = 0.148 ± 0.004 mm/s, the difference is not significant, Student's t-test $p = 0.3$).

In favorable food conditions different insulin peptides activate the DAF-2 insulin receptor. DAF-2 acts through a signaling pathway to inactivate the FoxO transcription factor DAF-16 and prevent dauer entry [18]. In order to check if the roaming behavior was also regulated through the DAF-2/DAF-16 pathway we recorded the trajectories of *daf-2 daf-16* double mutants. The *daf-16* mutation was enough to rescue the *daf-2* defect and the double mutants showed a wild-type phenotype for the roaming/dwelling behavior (Fig. 4).

Insulin signaling through the DAF-2/DAF-16 pathway and TGF-beta signaling are then required for the animal to balance its time appropriately between dwelling and roaming for all food conditions.

Discussion

Here we describe new characteristics of *C. elegans* locomotory behavior on its standard laboratory food *Escherichia coli*. We used a

new quantitative method of analysis using two parameters of the worm trajectory. As in previous studies we could show that *C. elegans* exhibits two activity phases on food [6]. We show that this behavior depends on the concentration of food and previous food experience. We have established that internal sensing of food presence is necessary to induce dwelling and that chemosensory perception promotes roaming. We have also shown that serotonin signaling and the insulin and TGF-beta pathways control this behavior.

We show that *C. elegans* can vary the time allocated to each phase depending on the food concentration available and that the two-state behavior does not occur in absence of food. Comparably, foraging strategies of *Drosophila melanogaster* have also been shown to vary depending on the food quantity present in the environment [21]. We have also shown that internal perception of food presence is necessary to induce the dwelling state. On the contrary, external sensory perception is not sufficient to induce dwelling on food and even promotes roaming. More precisely, the olfactory neuron AWC seems to promote roaming on food.

These results and the fact that worms modulate the proportion of time spent roaming depending on food nutritional quality [7] show that this behavior is strongly food-related. However, other sensory modalities could be integrated in the regulation of this behavior. It has been shown that some *C. elegans* natural strains that display social behavior are sensitive to high concentration of oxygen. They are hyperactive at 20% of oxygen on food compared to non-social strains but do not behave differently off food [22,23]. For these social strains oxygen perception could dramatically switch the dwelling/roaming balance. High temperatures or repulsive odors could have the same consequences. Thus, the dwelling and roaming balance must be a subtle and very integrated foraging strategy that is environmentally controlled.

We also show that this behavior depends on previous food experiences of the worm. If the worm has experienced bad conditions before finding a favorable environment it will reduce its probability to roam, maybe in order to stay longer in the best area. This reduced roaming lasts for at least one hour after refeeding. The worm foraging strategy may then be a memory dependent behavior that relies on both its current environment and the environments it has experienced previously.

We have also shown that the time allocation between dwelling and roaming is regulated through the insulin DAF-2/DAF-16 pathway and the TGF-beta DAF-7 pathway. These two pathways are key regulators of dauer transition and of quiescence behavior on high-quality food after fasting [8,18]. Quiescence and dwelling are different behaviors and we did not see any quiescence events in our experiments on OP50 bacteria. On high quality food, wild type worms actually exhibit a first phase of dwelling and then become quiescent [8]. Then, as insulin and TGF-beta signaling control both behaviors, they could be different responses to different levels of satiety.

Besides, insulin and TGF-beta signaling pathways do not mediate response to short term fasting and are necessary to observe a wild type dwelling behavior in favorable and unfavorable environments. On aztreonam-treated bacteria, wild type worms seem to perceive a very low concentration of eatable bacteria that could correspond to a very low percentage of bacteria that are small enough to be eaten. Insulin and TGF-beta deficient worms are then hypersensitive to food perception even at very low food concentration. As the two pathways act in part in the amphid neurons, TGF-beta and insulin deficient mutants could then have reduced sensory signaling promoting roaming which would change the dwelling/roaming balance to increase the dwelling time proportion.

We have also shown that serotonin mutants are very defective in their time allocation. However, serotonin is not required for food perception as *tph-1* mutants exhibit a wild type phenotype on non-eatable food. We also show that serotonin regulates the modulation of behavior after a short starvation experience, as could be expected from results on the enhanced slowing response behavior [11]. However, the *mod-1* serotonin receptor that has been shown to mediate the enhanced slowing response does not promote the one-hour dwelling starvation response (Fig. 4). Therefore, these two changes of behavior after starvation do not seem to be mediated by the same serotonin pathways [17]. Unexpectedly, well-fed mutants of the serotonin receptor *mod-1* showed a weak phenotype opposite to serotonin biosynthesis *tph-1* mutants on regular food. Serotonin signaling controlling this behavior may be mediated by different receptors and serotonin could have antagonistic effects on this behavior. Therefore it would be interesting to understand which receptors mediate serotonin signaling for this behavior in order to gain insight into the neuronal circuits involved. Similarly, serotonin has been shown recently to have antagonistic effects on *C. elegans* egg-laying behavior through different receptors [24].

Besides, *tph-1* mutants have reduced insulin and TGF-beta signaling [16]. One of the effects of serotonin on the dwelling and roaming behavior could then be linked to regulation of the DAF-2 and DAF-7 pathways. However, serotonin role cannot be reduced to this effect, since *tph-1* mutants do not respond to a short starvation period whereas *daf-2* and *daf-7* mutants do. Insulin and TGF-beta signaling pathways are transcriptional pathways. Thus, they must mediate slow metabolic changes, whereas serotonin and other biogenic amines signaling can occur fast and allow the worm to adapt its behavior to faster changes in the environment. Insulin and TGF-beta signaling may then mediate response to long-term environmental changes, such as long starvation periods, whereas serotonin could also control responses to short fasting intervals.

Finally we propose the following representation of our findings (Fig. 5). Food nutritional value is assessed through internal metabolic signaling. The dwelling/roaming time allocation then results from the integration of sensory signals promoting roaming and internal food signals suppressing roaming. Short-term starvation memory mediated by serotonin would enhance suppression of roaming when reentering food. TGF-beta and insulin signaling could define the metabolic state of the worm and allow the animal to adapt to slow changing feeding states. The animal would then get more responsive to food as levels of insulin and TGF-beta signaling gets lower. It would now be interesting to define in which cells these different signaling pathways are

integrated and to characterize more precisely the role of serotonin by studying the receptors and the cellular circuits involved.

Materials and Methods

C. elegans maintenance

Nematodes were cultured on OP50 bacterial lawns on nematode growth medium (NGM) plates at 20°C. N2 Bristol was used as the wild type reference. The following strains were analyzed: *cat-2(e1112)II*, *ceh-36(ks86)X*, *ceh-36(ky640)X*, *che-1(p679)I*, *che-1(p692)I*, *che-2(e1033)X*, *daf-2(e1370)III*, *daf-2(m41)III*, *daf-2(e1391)III*, *daf-2(e1370)III*, *daf-16(mgDf50)I*, *daf-7(e1372)III*, *daf-7(m62)III*, *mod-1(ok103)V*, *ibh-1(ok1196)X*, *tdc-1(n3419)II*, *tdc-1(ok914)II*, *tph-1(mg280)II*, *ttx-1(p767)V*, *ttx-3(ot22)X*, *ttx-3(ks5)X*.

Video Analysis

On average 7 worms were transferred to a 60 mm NGM plate spread with bacteria and the whole plate was recorded for up to 2 hours on a custom set-up consisting of a camera macro-objective and a 700x1300 pixels Hamamatsu camera controlled via Labview. For each experiment we recorded 20000 images taken every 400 ms. We used no more than 10 worms per plate to prevent too many possible interactions between them and to track them easily for a long time. The plate was illuminated homogeneously from below with a multi-LED device and the whole set-up was included in a temperature-controlled enclosure. All experiments were performed at 20°C. Worms trajectories were extracted from the recordings via a custom-written code in Matlab. We applied an adaptive threshold method to the first image. The resulting objects in the image were filtered for size and shape in order to find the worms. Each worm-object was then tracked during the 20000 images. Here we recorded the coordinates of the center of mass of each worm in each image during the recording. Each worm trajectory was then automatically truncated into 10 s intervals. The average speed (S) and curvature (C) along the trajectory during each of these intervals were also calculated with Matlab. Speed was defined as the distance between two consecutive points in the trajectory divided by 400 ms. Curvature was defined as the complementary of the angle defined by three consecutive points in the trajectory, which is equivalent to the change in direction.

(S, C) values for all the worms in a given experiment were plotted in the (S, C) plane (Fig. 1E). We repeated each experiment on 5 to 10 different plates. In each condition we recorded the trajectories of at least 20 worms, for a total length of at least 20 hours. We could define two clusters and the (S, C) plane was divided in 2 areas: the roaming zone and the dwelling zone. The clustering boundary (Line A (Fig. 1E)) was defined for wild type worms in standard conditions and was then used for all genotypes and conditions. The roaming percentage for a given experiment was calculated as the number of points in the roaming cluster divided by the total number of points. Data for a given genotype are presented as the mean of the results of the different experiments and the error bars represent the standard error of the mean. Significance was determined using Student's two tailed *t*-test for comparison of the behavior of one mutant strain with wild type behavior. One-way ANOVA followed by a Bonferroni post-hoc test was used for multiple comparisons, such as for comparison of wild type behavior with two different alleles of the same gene.

For visualization, we used data density maps corresponding through a color map to normalized 2D histograms of all the data for a given genotype using 100 bins in each direction.

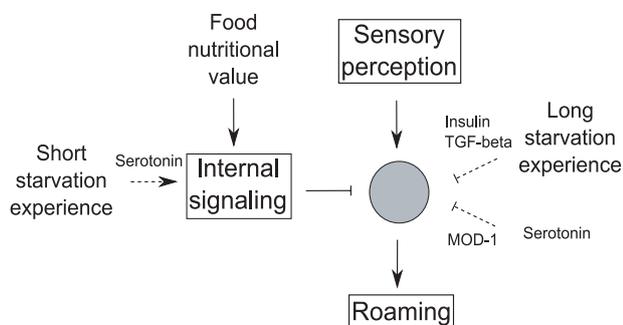


Figure 5. Proposed schematic representation of the control of the dwelling and roaming behavior by sensory perception and internal signaling.

doi:10.1371/journal.pone.0007584.g005

Worm handling

L4 larvae were isolated on seeded NGM plates the day before recording. Except for recordings on controlled concentration of bacteria or with aztreonam treatment, experiments were done on NGM plates on which fresh OP50 had been uniformly spread the day before the experiment. The worms were transferred on the experiment plates 10 minutes before the start of recording to cut off the first minutes during which the worm may have responded to perturbations that could have occurred during transfer. For each condition at least 20 worms' trajectories were recorded. The experiments on controlled concentration of OP50 were performed on NGM-streptomycin plates (antibiotic concentration: 50 µg/ml). The day before the recording, OP50 were grown to saturation then blocked for 40 minutes at 37°C with streptomycin at 50 µg/ml. At this concentration, bacteria cannot grow but are not lysed. The concentration of bacteria was derived from optical density (OD) measurements. OD measurements were calibrated by spreading diluted cultures of known OD on LB plates and counting the number of colonies that had grown on the plate. A controlled number of bacteria was then evenly spread on NGM-streptomycin plates. These plates were then seeded with a controlled concentration of bacteria that did not change in time.

Experiments with aztreonam were prepared following Gruninger & al protocol [14]. The day before the experiment, OP50 were grown in LB+aztreonam (10 µg/ml) to saturation, and then spread on NGM-aztreonam (10 µg/ml) plates. The day of the recording, the plates were checked for the presence of long "snakes" of *E. coli*. The normal bacteria were washed off the worms by transferring the worms in M9 and then on the recording plate prior to recording.

Acknowledgments

We thank Jean-Louis Bessereau, Michel Labouesse, Stanislas Leibler and William R Schafer for helpful comments on this work; Jean-Louis Bessereau and Iskra Katic for providing strains. Some nematode strains used in this work were provided by the Caenorhabditis Genetics Center, which is funded by the NIH National Center for Research Resources.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JBA DC. Performed the experiments: JBA SL. Analyzed the data: JBA SL. Contributed reagents/materials/analysis tools: JBA. Wrote the paper: JBA.

References

- Herbers JM (1981) Time resources and laziness in animals. *Oecologia* 49: 252–262.
- Goulding EH, Schenk AK, Juneja P, MacKay AW, Wade JM, et al. (2008) A robust automated system elucidates mouse home cage behavioral structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 20575–20582.
- Bargmann CI (1993) Genetic and cellular analysis of behavior in *C. elegans*. *Annu Rev Neurosci* 16: 47–71.
- Schafer WR (2005) Deciphering the neural and molecular mechanisms of *C. elegans* behavior. *Curr Biol* 15: R723–R729.
- de Bono M, Maricq AV (2005) Neuronal substrates of complex behaviors in *C. elegans*. *Annu Rev Neurosci* 28: 451–501.
- Fujiwara M, Sengupta P, McIntire SL (2002) Regulation of body size and behavioral state of *C. elegans* by sensory perception and the EGL-4 cGMP-dependent protein kinase. *Neuron* 36: 1091–1102.
- Shtonda BB, Avery L (2006) Dietary choice behavior in *Caenorhabditis elegans*. *J Exp Biol* 209: 89–102.
- You Y, Kim J, Raizen DM, Avery L (2008) Insulin, cGMP, and TGF-beta signals regulate food intake and quiescence in *C. elegans*: A model for satiety. *Cell Metab* 7: 249–257.
- Colbert HA, Bargmann CI (1997) Environmental signals modulate olfactory acuity, discrimination, and memory in *Caenorhabditis elegans*. *Learn Mem* 4: 179–191.
- Kindt KS, Quast KB, Giles AC, De S, Hendrey D, et al. (2007) Dopamine mediates context-dependent modulation of sensory plasticity in *C. elegans*. *Neuron* 55: 662–676.
- 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.
- Kang C, Avery L (2009) Systemic regulation of starvation response in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev* 23: 12–17.
- Srinivasan S, Sadegh L, Elle IC, Christensen AGL, Faergeman NJ, et al. (2008) Serotonin regulates *C. elegans* fat and feeding through independent molecular mechanisms. *Cell Metab* 7: 533–544.
- Gruninger TR, Gualberto DG, Garcia LR (2008) Sensory perception of food and insulin-like signals influence seizure susceptibility. *PLoS Genet* 4: e1000117.
- Hobert O (2008) Regulatory logic of neuronal diversity: terminal selector genes and selector motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 20067–20071.
- Sze JY, Victor M, Loer C, Shi Y, Ruvkun G (2000) Food and metabolic signalling defects in a *Caenorhabditis elegans* serotonin-synthesis mutant. *Nature* 403: 560–564.
- Ranganathan R, Cannon SC, Horvitz HR (2000) MOD-1 is a serotonin-gated chloride channel that modulates locomotory behaviour in *C. elegans*. *Nature* 408: 470–475.
- Riddle DL, Albert PS (1997) Genetic and Environmental Regulation of Dauer Larva Development. In *C. elegans II*, eds Riddle DL, Blumenthal T, Meyer BJ, Priess JR (Plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press). pp 739–768.
- Greer ER, Pérez CL, Gilst MRV, Lee BH, Ashrafi K (2008) Neural and molecular dissection of a *C. elegans* sensory circuit that regulates fat and feeding. *Cell Metab* 8: 118–131.
- Gems D, Sutton AJ, Sundermeyer ML, Albert PS, King KV, et al. (1998) Two pleiotropic classes of *daf-2* mutation affect larval arrest, adult behavior, reproduction and longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 150: 129–155.
- Kaun KR, Riedl CAL, Chakaborty-Chatterjee M, Belay AT, Douglas SJ, et al. (2007) Natural variation in food acquisition mediated via a *Drosophila* cGMP-dependent protein kinase. *J Exp Biol* 210: 3547–3558.
- de Bono M, Tobin DM, Davis MW, Avery L, Bargmann CI (2002) Social feeding in *Caenorhabditis elegans* is induced by neurons that detect aversive stimuli. *Nature* 419: 899–903.
- Cheung BHH, Cohen M, Rogers C, Albayram O, de Bono M (2005) Experience-dependent modulation of *C. elegans* behavior by ambient oxygen. *Curr Biol* 15: 905–917.
- Hapiak VM, Hobson RJ, Hughes L, Smith K, Harris G, et al. (2009) Dual excitatory and inhibitory serotonergic inputs modulate egg laying in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 181: 153–163.

Annexe E

Article 2

Le second article reprend les résultats de la Partie [III](#) de cette thèse. Il a été soumis à la revue "Journal of Neuroscience Methods".

1 **Title**
2 Automated imaging of neuronal activity in freely behaving *Caenorhabditis elegans*
3
4 **Abbreviated Title**
5 Neuronal activity of behaving *C. elegans*
6
7 **Authors**
8 Juliette Ben Arous¹, Yoshinori Tanizawa², Ithai Rabinowitch², Didier Chatenay³, William R.
9 Schafer²

- 10
11 1. Laboratoire de Physique Statistique de l'Ecole Normale Supérieure, CNRS, UPMC
12 24, rue Lhomond, 75005 Paris, France
13 2. Cell biology division, MRC Laboratory of Molecular Biology,
14 Hills road, Cambridge CB2 0QH, UK
15 3. Laboratoire Jean Perrin, FRE 3231, CNRS, UPMC
16 24, rue Lhomond, 75005 Paris, France
17

18 **Corresponding author:**
19 Juliette Ben Arous
20 Laboratoire de Physique Statistique de l'Ecole Normale Supérieure, CNRS, UPMC
21 24, rue Lhomond, 75005 Paris, France
22 Email: juliette.benarous@lps.ens.fr
23 Tel: +33 1 44 32 35 90
24

25 4 Figures
26 Supplementary material: 2 Movies, 1 pdf file.
27 Number of pages: 19
28

29 **Key words:** behavior, calcium imaging, *C. elegans*, tracking system, mechanosensory
30 neurons.
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42

1 **Abstract**

2 In order to understand how neuronal circuits control locomotory patterns it is necessary to
3 record neuronal activity of freely behaving animals. Here, using a new automated system for
4 simultaneous recording of behavior and neuronal activity in freely moving *Caenorhabditis*
5 *elegans* on standard agar plates, we show that spontaneous reversals from forward to
6 backward locomotion reflect precisely the activity of the AVA command interneurons. We
7 also witness spontaneous activity transients in the PLM sensory neurons during free behavior
8 of the worm in standard conditions. We show that these activity transients are coupled to short
9 spontaneous forward accelerations of the worm.

10 **Introduction**

11 Monitoring neuronal activity of freely moving animals in a controlled environment is a
12 crucial issue in neuroscience in order to understand how neuronal circuits integrate sensory
13 signals to generate behavior. Recently, genetically encoded calcium indicators have allowed
14 the development of non-invasive neuronal activity recording techniques in live animals
15 (Miyawaki et al, 1997; Pologruto et al, 2004), especially in small and transparent animals like
16 the nematode *Caenorhabditis elegans*. This nematode has a compact and well described
17 nervous system, the molecular basis of its behavior has been studied in great details and its
18 genome is significantly conserved with vertebrates. These features have made *C. elegans* a
19 useful model system in neuroscience.

20
21 In immobilized *C. elegans*, fluorescent calcium indicators have allowed the recording
22 of calcium transients in neurons and muscles (Kerr et al, 2000) and the correlation of sensory
23 stimuli and neuronal activity in sensory neurons (Suzuki et al, 2003; Kimura et al, 2004;
24 Hilliard et al, 2005). Semi-restrained worm imaging systems have then been developed in
25 order to correlate calcium activity to the behavior of the worm. A two-objective system has
26 been designed to record neuronal activity of a worm glued at its head while recording the
27 behavior of the free body (Faumont and Lockery, 2006). Behavior chips have also been
28 developed to record neuronal activity and behavior of *C. elegans* in a microfluidic channel.
29 These devices allow a precise control of the environment of the worm (Chronis et al, 2007;
30 Chalasani et al, 2007). In both systems the animal is constrained, and therefore many
31 behavioral tests can not be implemented. Moreover, recording is frequently done in liquid
32 medium, whereas most behavioral and genetic studies have been done previously on solid
33 agar plates.

34 Another system has been described for manual tracking of freely moving worms in a
35 thermal gradient and simultaneous recording of calcium activity in a thermosensory neuron
36 (Clark et al, 2007). In this system the worm can move freely but is under a coverslip, which
37 prevents access to the worm to apply mechanosensory or chemical stimuli. The tracking has
38 to be done manually and lasts only for 2 minutes.

39 Here we report the development of a new custom-made tracking system for long-term
40 automated recording of neuronal activity and behavior of freely behaving worms in their
41 standard laboratory environment. We could show that spontaneous reversals from forward to
42 backward locomotion on standard plates reflect the activity of the AVA command
43 interneurons. We also demonstrate that spontaneous activity of the PLM mechanosensory
44 neurons correlates with forward accelerations.

45 **Materials and Methods**

46 **Strains generation and *C. elegans* maintenance.**

47
48 We constructed the transgenic strain AQ2139 for AVA imaging. This strain expresses
49 the D3cpv cameleon protein (Palmer et al, 2006) under the control of the *nmr-1* promoter in a
50

1 *lite-1* background (Edwards et al, 2008). For D3cpv expression in AVA interneurons, *Pnmr-*
2 *I::D3cpv* plasmid was made by an LR reaction in the Gateway System (Invitrogen) from the
3 following two plasmids. A 4.9kb upstream sequence of the *nmr-1* gene was amplified and
4 cloned into NheI-XhoI sites of pDEST. The D3cpv gene was amplified and cloned into
5 pDONR by BP reaction. An integrated transgene was obtained by biolistic transformation
6 (Praitis et al, 2001) of the *Pnmr-I::D3cpv* plasmid together with the *unc-119* gene into *unc-*
7 *119(ed3)* animals followed by UV irradiation (Mello et al, 1991). The resultant transgene
8 *ljIs109* was outcrossed eight times, and crossed with *lite-1(ce314)* to make AQ2139. *Pnmr-1*
9 promotes expression in the AVA neurons and a few other classes of neurons. However,
10 expression of D3cpv in AQ2139 is much stronger in AVA and to a lesser extent in AVE than
11 in other cells. In fact, in control experiments that we performed in the locomotion chip
12 (Chronis et al, 2007) using much higher magnification (e.g. 63x), we were only able to detect
13 a signal in the AVA/AVE neurons, and not in any of the other weakly expressing neurons
14 (data not shown). The measured signal then comes principally from the AVA neurons but
15 could also have a component arising from the AVE neurons, which are also supposed to
16 control backward movement and to be strongly connected to the AVA neurons.

17 For *yc3.60* expression in PLM interneurons, a *Pmec-4::yc3.60* plasmid was made by
18 an LR reaction in the Multisite Gateway System (Invitrogen) from the following three
19 plasmids and pDEST R4-R3. A 1kb upstream sequence of the *mec-4* gene, the *yc3.60* gene
20 and 3'UTR of the *unc-54* gene were amplified and cloned into pDONR P4-P1R, pDONR 221
21 and pDONR P2R-P3, respectively by BP reactions. The *Pmec-4::yc3.60* plasmid was
22 microinjected to N2 animals (Evans, 2006) that were then crossed into *lite-1(ce314)*. *Pmec-4*
23 promotes expression in the six touch receptors. However, as these cells are far apart, the PLM
24 neurons were identified and tracked unambiguously at 20x magnification.

25 We used *lite-1* mutants in our experiment because they are insensitive to blue light
26 (Edwards et al, 2008). We could then minimize the behavioral perturbation induced by the
27 fluorescence excitation illumination. Ratiometric calcium imaging using cameleon proteins
28 was chosen in order to lower noise due to the movement of the worm. Movement artifacts are
29 actually correlated in the CFP and the citrine channels and are then filtered out when taking
30 the ratio of the two channels to calculate the FRET signal.

31 Nematodes were cultured on OP50 bacterial lawns on nematode growth medium
32 (NGM) plates at 20°C. We picked L4s the day before the experiment and performed all the
33 experiments using young adults.

34 35 **Imaging system.**

36 For the imaging system, we used an automated x-y stage (Marzhauser, speed 10mm/s)
37 holding a large 90mm open NGM-agar plate upside-down (Fig. 1A). The plate could be
38 seeded with OP50 bacteria. We illuminated and recorded fluorescence images of the worm's
39 neuron under the plate through a Nikon 20x objective (working distance 5mm, numerical
40 aperture 0.45). The 440nm illumination was provided by a mercury lamp (Prior) through
41 standard excitation filters (Chroma) and an optical fiber. The fluorescence image was split by
42 a two-wavelength splitting system (Cairn technology) equipped with dichroics and emission
43 filters (Chroma). The two images (at 480nm and 540nm) were then projected on the two
44 halves of a megapixel EMCCD camera (Andor Ixon). Above the plate a CCD camera
45 (Prosilica, 1000x1300 pixels) was used to image the behavior of the worm through the agar
46 with a 3x objective (Edmund). The field depth of this objective was large enough to prevent
47 defocusing during the experiment. Optomechanical parts (custom-made and Thorlabs) were
48 used to mount the optical parts in a compact microscopy system optimizing imaging
49 efficiency.

50

1 **Image acquisition and analysis.**

2 We transferred a worm to the experiment plate a few minutes before the experiment.
3 The neuron of interest was then manually centered in the fluorescent image and image
4 acquisition was started by the user. The motorized stage and both cameras were controlled via
5 a custom-written Labview program. This program consists of a succession of 150ms-long
6 loops. During each loop one image is recorded on each camera, the neuron position is
7 determined as the pixel of maximum intensity in the 540nm emission image and the
8 motorized stage is then moved in order to bring back the neuron to its original position in the
9 540nm image. The x-y trajectory of the imaged neuron is also recorded during the whole
10 experiment as the position of the stage at the end of each 150ms loop.

11 Exposure time of the fluorescence images was set to 30ms to avoid smearing due to
12 the movement of the worm and the images were binned in 2x2 pixels. As we programmed the
13 tracking system to keep the pixel of maximum intensity in the center of the 540 nm image via
14 displacement of the stage at each 150ms step, the neuron of interest was then mostly kept in
15 the same point of the field of view of the camera during the whole experiment. Worms move
16 mostly on an x-y plane, but slow z-defocusing due to unevenness of the plate was controlled
17 by occasional manual refocusing (~ once per minute).

18 Fluorescence images at each of both emission wavelengths were analyzed using a
19 MATLAB routine by averaging the 100 most intense pixels in each image. Signal to noise
20 was high enough to confirm that these pixels actually corresponded to the neuron of interest.
21 This method diminishes artifacts linked to slight defocusing during the worm's movement.
22 Calcium activity was calculated as the FRET ratio of the fluorescence emissions at 540nm
23 and 480nm. As we were only interested in the timing of the peaks, all the FRET recordings
24 were corrected for bleaching of the yellow protein by dividing by the baseline of the signal.
25 PLM unambiguous activity peaks were scored by eye using their shape (fast rise, slow
26 decrease) and amplitude (signal to noise ratio higher than 2). Unclear peaks were not used for
27 speed analysis.

28 Reversal timings were measured by eye using the behavior movie, independently from
29 analysis of the FRET signal in the AVA neurons. A worm was considered reversing while its
30 head was moving backward compared to the forward orientation defined by its body. Omega
31 turns were not scored as reversals. Two frames were sufficient to define backward movement
32 and reversals are thus defined with a one-frame precision. The speed of the worm was
33 calculated a posteriori from the recorded trajectories. Average speed during the PLM activity
34 transients was compared to total average speed by a statistical Student's t-test.

35 **Results**

36 **Imaging calcium dynamics in neurons of freely behaving worms.**

37
38 We have developed a new automated tracking system for spontaneous imaging of
39 neuronal activity and behavior of freely moving *C. elegans* on standard laboratory plates (Fig.
40 1A). We image a single animal in air on NGM-agar plates seeded with bacteria and we use a
41 two-objective system to simultaneously record behavior and neuronal activity. The tracking
42 system maintains the neuron at the same position during the whole recording and records the
43 trajectory of the worm. We have chosen to express ratiometric cameleon proteins as indicators
44 of calcium activity (Miyawaki et al, 1997) in selected neurons in order to filter out motion
45 artifacts. The sample is illuminated at 440nm to excite the cameleon protein and this
46 illumination is used for both calcium and behavioral imaging. The brightfield image of the
47 worm is recorded in the behavior channel through the agar plate and projected on a CCD
48 camera (Fig. 1B). The fluorescence image of the neuron is recorded through a 20x air
49 objective and then split into two images at 480nm and 540nm, which are projected
50

1 simultaneously on the two halves of a high sensitivity camera (Fig. 1C). There is no time
2 limitation in this set-up except for protein photobleaching or possibly light toxicity and
3 recordings of up to 10 minutes in duration did not have obvious deleterious effects on
4 behavior or recording quality.

5 As compared to standard calcium imaging set-ups our system uses a low
6 magnification, low numerical aperture objective for fluorescence collection and imaging; still
7 a FRET signal reflecting calcium activity can be extracted from fluorescence images and
8 correlated to behavior. Indeed using this method we were able to witness reciprocal changes
9 of fluorescence intensity in the 480nm CFP channel and the 540nm citrine channel (Fig. 2)
10 from which we were able to calculate FRET activity transients in the AVA interneurons and
11 the PLM sensory neurons using a standard ratiometric method. The anticorrelations observed
12 in the two fluorescence channels indicate that the ratio increase was a result of FRET rather
13 than a motion artifact (Fig. 2B).

14 **Calcium activity in the AVA interneurons reflects spontaneous reversals of *C. elegans*.**

15 *C. elegans* crawls on surfaces and its locomotory behavior consists of forward
16 sinusoidal movement interrupted by turns and reversals. The foraging strategy of the worm
17 relies on a precise control of its reversal frequency depending on environmental conditions
18 and previous experience (Pierce-Shimomura et al, 1999; Gray et al, 2005). The AVA and
19 AVB interneurons have been shown to be major command neurons regulating respectively
20 backward and forward locomotion (Chalfie et al, 1985).

21 In microfluidic chambers, calcium activity of the AVA neurons is correlated with the
22 propagation of an anterior-traveling body wave (Chronis et al, 2007). We expressed the
23 D3cpv cameleon protein in AVA and recorded calcium activity and spontaneous behavior of
24 worms on plates seeded with bacteria. We could observe large calcium activity transients
25 arising in AVA during backward behavior of the worm (Fig. 2A, 3A, Supplementary Movie
26 S1).

27 Recordings made using the unrestrained system correlated closely with what can be
28 observed in the microfluidic system in the same food conditions (Supplementary Fig. S1). In
29 both cases, similar ratio changes in AVA were observed in temporal correlation with the onset
30 of backward locomotion. However, in the microfluidic chamber, the reversals were much
31 longer than on NGM plates, as were the signals in AVA. Mean duration of reversals was $9.9 \pm$
32 0.6 s in the microfluidic chamber (s.e.m., 7 worms) and 5.5 ± 0.3 s when imaging on plates
33 (s.e.m., 13 worms, Student's two-tailed t-test $P < 0.001$). This can be compared to previous
34 behavioral results obtained in standard laboratory conditions on plates seeded with OP50
35 bacteria (mean reversal duration : 3.5 ± 0.5 s (Shingai, 2000)). Reversal frequency was also
36 similar to previous measurements : 1.9 ± 0.2 reversals /min on food, which is comparable to 3
37 reversals / 3min (Tsalik et al, 2003) and 3 reversal/min (Gray et al, 2005). Thus, the behavior
38 of the worm does not seem to be perturbed when imaging is performed in freely moving
39 conditions.

40 AVA neurons are thought to induce reversals, but as in previous experiments (Chronis
41 et al, 2007) each rise in AVA calcium activity and the correspondent reversal started in the
42 same frame. We did not see calcium transients rise in AVA before the initiation of the
43 behavior, perhaps because our time resolution (150ms) was not fine enough to detect a short
44 delay (Fig. 3B).

45 More importantly, with this system we observed that on NGM plates all spontaneous
46 backward events were correlated with transients in AVA, determined as time points at which
47 the time derivative of the FRET ratio was significantly positive. Symmetrically, every
48 unambiguous fast rise in calcium signaling that we could detect in AVA correlated to a
49 reversal of the worm (13 worms, ~250 reversals, Fig. 2A, 3A, Supplementary Movie S1).

1 However, some activity peaks were difficult to extract from the noise and these peaks were
2 not always correlated to a reversal. These findings indicate that spontaneous reversal behavior
3 mirrors precisely AVA activity.
4

5 **Activity in the PLM mechanosensory neurons correlates with forward accelerations.**

6 We also recorded activity of the tail mechanosensory neurons PLM during
7 spontaneous behavior of *C. elegans* on food. Immobilized imaging experiments have shown
8 that these neurons respond to touch on the posterior part of the worm (Kindt et al, 2007).
9 Laser ablations have also shown that these neurons mediate acceleration following posterior
10 touch (Chalfie et al, 1985). We expressed the YC3.6 cameleon protein in the PLM neurons,
11 and we could record short transients in these neurons in behaving worms (11 worms, Fig.
12 4A). Interestingly, we could observe spontaneous acceleration of the worm at the time of
13 PLM activity peaks, a phenomenon which to our knowledge has not been described
14 elsewhere. To quantify this finding, we used trajectory recordings to calculate speed and
15 compared average speed at the time of PLM transients to the total average speed of the
16 worms. We could show that worms indeed accelerated when PLM calcium activity increased
17 (Fig. 4B, Supplementary Movie S2). The speed maximum was reached 600ms after the
18 beginning of the rise in PLM activity (Fig. 4B). It is not clear from our recordings what
19 stimulus, if any, was responsible for PLM activity, as we could not detect any specific
20 irregularity on the plate at the time of PLM transients. Since these experiments were
21 conducted on food, it is possible that the measured transients might represent a
22 mechanosensory response to food. However, when we recorded from PLM on plates lacking
23 food, we could still detect some calcium activity in these neurons (5 animals, Supplementary
24 Fig. S2).

25 Activity in the PLM neurons may be truly spontaneous, but it is also possible that
26 small movements of the stage during tracking or movement of the cuticle against the agar
27 plate may be sufficient to induce some signal. Finally, a drop in speed can be detected just
28 before the rise in PLM activity and could also be a cause of the activation of the
29 mechanosensory neurons (Fig. 4B).
30

31 **Discussion**

32 Here we demonstrate the use of a new tracking system to automatically record long-
33 term activity of any neuron during free behavior of *C. elegans* on a standard plate. The
34 animals are totally free to move on the plate and can be accessed for chemical or mechanical
35 stimulation. This system could then be used to study evoked behavior. This system can also
36 be directly extended to study most types of behavior in *C. elegans* or other small animals and
37 could allow the detection of new subtle behaviors elicited by specific neurons. This method
38 could also be coupled to microfluidic systems to record neuronal activity of worms crawling
39 through complex structured environments that are more similar to the natural environment of
40 the worm (Lockery et al, 2008; Park et al, 2008). Finally it could be used to measure other
41 type of fluorescent signaling like calcium activity in muscle or pH measurements in intestine
42 cells.

43 Previous experiments have shown that AVA activity correlates with the backward
44 behavior of semi-restrained worms in microfluidic chambers (Chronis et al, 2007). Here we
45 quantitatively measured neuronal activity in the AVA command interneuron and the behavior
46 of worms in both semi-restrained and free conditions on bacterial food. We could demonstrate
47 that spontaneous reversals and activity in AVA are also extremely well-correlated in
48 unperturbed worms behaving in standard laboratory conditions. We show that the reversal
49 behavior of the worms on the new imaging system is comparable to their behavior in standard
50 laboratory conditions, whereas it is significantly different in the microfluidic chambers.

1 Reversals are indeed shorter on regular plates than in the chambers. This may be due to the
2 fact that most reversals end with an omega turn on plates, whereas this behavior is prevented
3 when the worm is restrained in the microfluidic channel. It will now be interesting to
4 determine whether evoked reversals are also correlated to neuronal activity peaks in the AVA
5 interneurons (Wicks and Rankin, 1995).

6 We also measured spontaneous mechanosensory neuron activity during free
7 movement of *C. elegans*, and we were able to detect activity transients in the PLM neurons.
8 We could not detect any defect that may be responsible for this activation and it seems that
9 spontaneous activity transients actually arise in the PLM neurons during movement of the
10 worm. Ablation of the PLM neurons prevents the acceleration escape reflex that occurs after
11 mechanical stimulation of the tail (Chalfie et al, 1985). We show that the spontaneous activity
12 peaks in the PLM neurons also correlate with short accelerations of the worm arising 600ms
13 after the initiation of PLM activity. The mechanosensory signals transmitted by the PLM
14 neurons during movement may act as a feed-back to modulate the movement. Ablation
15 experiments also suggest that mechanosensory neurons respond to non-localized mechanical
16 stimuli. Signaling from the ALM and PLM mechanosensory neurons are thought to compete
17 to produce the behavioral response to tap (Wicks and Rankin, 1995). It would then be
18 interesting to record PLM and ALM activity during free movement of *C. elegans* after tap
19 stimulation.

20 Free movement of the worm during neuronal imaging was actually crucial for the
21 observation of the correlation of PLM activity and acceleration behavior. Such an approach
22 offers a new way to dissect neuronal circuit function during unconstrained behavior using the
23 behavioral tests that have already been developed for genetic and cell ablation studies,
24 allowing direct comparison to previous results and new insight into function of the *C. elegans*
25 nervous system. In particular it would now be interesting to use this system to investigate the
26 role of other neurons of the mechanosensory circuit during locomotory behavior of *C. elegans*
27 and to study the integration of sensory inputs during evoked behavior.

28 29 **Acknowledgements**

30
31 We would like to thank N. Chronis for assistance with the microfluidic chambers and K.
32 Miller for the *lite-1(ce314)* strain. Y.T. is funded by the European Commission's Marie Curie
33 Actions. I.R. is funded by an Israel Science Foundation Bikura postdoctoral fellowship.

References

- Chalasanani SH, Chronis N, Tsunozaki M, Gray JM, Ramot D, Goodman MB, Bargmann CI. Dissecting a circuit for olfactory behaviour in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2007, 450:63-70.
- Chalfie M, Sulston JE, White JG, Southgate E, Thomson JN, Brenner S. The neural circuit for touch sensitivity in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.*, 1985, 5:956-964.
- Chronis N, Zimmer M, Bargmann CI. Microfluidics for in vivo imaging of neuronal and behavioral activity in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Methods*, 2007, 4:727-731.
- Clark DA, Gabel CV, Gabel H, Samuel ADT. Temporal activity patterns in thermosensory neurons of freely moving *Caenorhabditis elegans* encode spatial thermal gradients. *J. Neurosci.*, 2007, 27:6083-6090.
- Edwards SL, Charlie NK, Milfort MC, Brown BS, Gravlin CN, Knecht JE, Miller KG. A novel molecular solution for ultraviolet light detection in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biol.*, 2008, 6:e198.
- Evans, T. C., Transformation and microinjection. ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, 2006.
- Faumont S, Lockery SR. The awake behaving worm: simultaneous imaging of neuronal activity and behavior in intact animals at millimeter scale. *J. Neurophysiol.*, 2006, 95:1976-1981.
- Gray JM, Hill JJ, Bargmann CI. A circuit for navigation in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102:3184-3191.
- Hilliard MA, Apicella AJ, Kerr R, Suzuki H, Bazzicalupo P, Schafer WR. In vivo imaging of *C. elegans* ASH neurons: cellular response and adaptation to chemical repellents. *EMBO J.*, 2005, 24:63-72.
- Kimura KD, Miyawaki A, Matsumoto K, Mori I. The *C. elegans* thermosensory neuron AFD responds to warming. *Curr. Biol.*, 2004, 14:1291-1295.
- Kindt KS, Quast KB, Giles AC, De S, Hendrey D, Nicastro I, Rankin CH, Schafer WR. Dopamine mediates context-dependent modulation of sensory plasticity in *C. elegans*. *Neuron*, 2007, 55:662-676.
- Kerr R, Lev-Ram V, Baird G, Vincent P, Tsien RY, Schafer WR. Optical imaging of calcium transients in neurons and pharyngeal muscle of *C. elegans*. *Neuron*, 2000, 26:583-594.
- Lockery SR, Lawton KJ, Doll JC, Faumont S, Coulthard SM, Thiele TR, Chronis N, McCormick KE, Goodman MB, Pruitt BL. Artificial dirt: microfluidic substrates for nematode neurobiology and behavior. *J. Neurophysiol.*, 2008, 99:3136-3143

1 Mello CC, Kramer JM, Stinchcomb D, and Ambros V. Efficient gene transfer in *C.elegans*:
2 extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *EMBO J.*, 1991,
3 10:3959–3970.
4
5 Miyawaki A, Llopis J, Heim R, McCaffery JM, Adams JA, Ikura M, Tsien RY. Fluorescent
6 indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*, 1997,
7 388:882-887.
8
9 Palmer AE, Giacomello M, Kortemme T, Hires SA, Lev-Ram V, Baker D, Tsien RY. Ca²⁺
10 indicators based on computationally redesigned calmodulin-peptide pairs. *Chem. Biol.*, 2006,
11 13:521-530.
12
13 Park S, Hwang H, Nam S, Martinez F, Austin RH, Ryu WS. Enhanced *Caenorhabditis*
14 *elegans* locomotion in a structured microfluidic environment. *PLoS One*, 2008, 3:e2550
15
16 Pierce-Shimomura JT, Morse TM, Lockery SR. The fundamental role of pirouettes in
17 *Caenorhabditis elegans* chemotaxis. *J. Neurosci.*, 1999, 19:9557-9569.
18
19 Pologruto TA, Yasuda R, Svoboda K. Monitoring neural activity and [Ca²⁺] with genetically
20 encoded Ca²⁺ indicators. *J. Neurosci.*, 2004, 24:9572-9579.
21
22 Praitis V, Casey E, Collar D, Austin J. Creation of low-copy integrated transgenic lines in
23 *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 2001, 157:1217–1226.
24
25 Ramot D, Johnson BE, Berry TL, Carnell L, Goodman MB. The Parallel Worm Tracker: a
26 platform for measuring average speed and drug-induced paralysis in nematodes. *PLoS One*,
27 2008, 3:e2208.
28
29 Shingai R. Durations and frequencies of free locomotion in wild type and GABAergic
30 mutants of *Caenorhabditis elegans*. *Neurosci. Res.*, 2000, 38:71-83.
31
32 Suzuki H, Kerr R, Bianchi L, Frøkjær-Jensen C, Slone D, Xue J, Gerstbrein B, Driscoll M,
33 Schafer WR. In vivo imaging of *C. elegans* mechanosensory neurons demonstrates a specific
34 role for the MEC-4 channel in the process of gentle touch sensation. *Neuron*, 2003, 39:1005-
35 1017.
36
37 Tsalik EL, Hobert O. Functional mapping of neurons that control locomotory behavior in
38 *Caenorhabditis elegans*. *J Neurobiol*, 2003, 56:178-197
39
40 Wicks SR, Rankin CH. Integration of mechanosensory stimuli in *Caenorhabditis elegans*. *J.*
41 *Neurosci.*, 1995, 15:2434-2444.
42
43
44
45
46
47
48
49
50

1 **Figure legends**

2

3 **Figure 1.** Tracking system. (A) Schematic diagram of the imaging system. (B) Full worm
4 image for behavior analysis. (C) Fluorescence ratiometric calcium imaging of AVA neurons
5 (up: 480nm emission, down: 540nm emission).

6

7 **Figure2.** Calcium imaging of the AVA interneurons. (A) FRET signal in the AVA
8 interneurons of a freely moving worm on food (black) and reversal events timings (gray bars).
9 (B) Reciprocal changes of fluorescence intensity in the 480nm (bottom) and the 540nm (top)
10 channels.

11

12 **Figure 3.** Calcium signaling of AVA command neurons correlates with backward movement.
13 (A) FRET signal in AVA interneurons (black) and timing of reversals (gray bars) during free
14 movement of *C. elegans* on NGM plates seeded with *Escherichia Coli* OP50. (B) A single
15 activity transient in the AVA interneurons. There is no detectable delay between the rise of
16 the signal and initiation of backward movement.

17

18 **Figure 4.** PLM mechanosensory neurons activity. (A) FRET signal in the PLM neurons of a
19 freely moving worm on OP50 bacteria. (B-C) PLM activity peaks correlate with short
20 acceleration events. (B) FRET ratio and FRET time derivative at PLM activity peaks (61
21 traces around PLM transients from 11 worms have been aligned and averaged, the origin of
22 time (0s) is the first frame where a rise in activity in the PLM neurons can be detected.) (C)
23 Average speed and FRET time derivative at PLM activity peaks. Speed maximum occurs 600
24 ms after the beginning of the activity transient, and 300ms after the maximum of the FRET
25 derivative. Average total speed: 0.0769 ± 0.0002 mm/s (s.e.m), average speed during PLM
26 activity transients: 0.121 ± 0.003 mm/s (s.e.m), Student's two-tailed t-test $P < 0.001$. Total
27 average speed was comparable to previous results obtained with N2 worms on food (Ramot et
28 al, 2008).

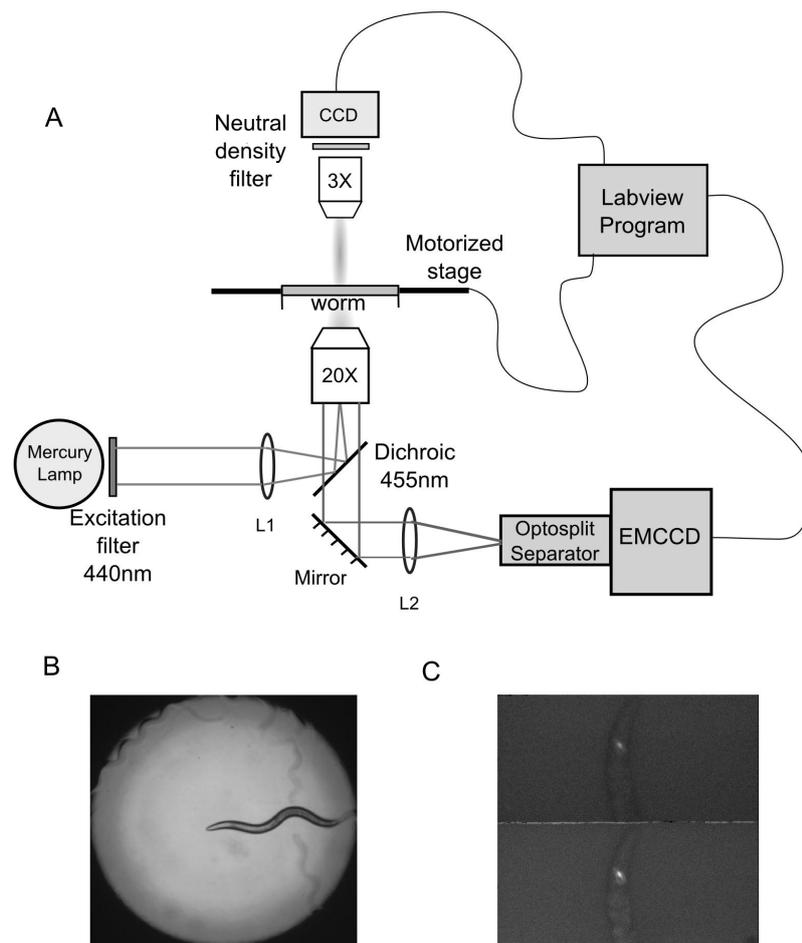


FIGURE E.1

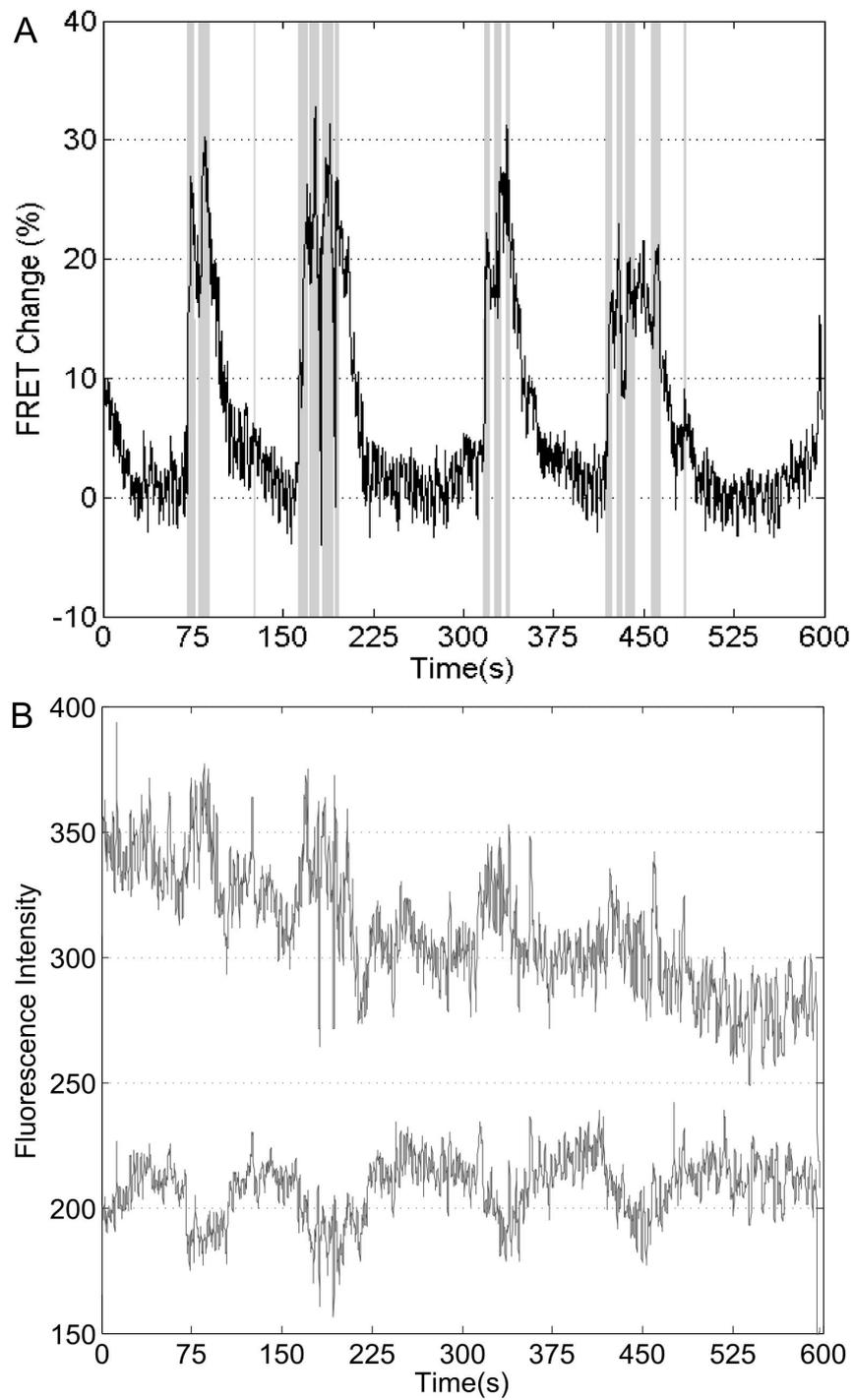


FIGURE E.2

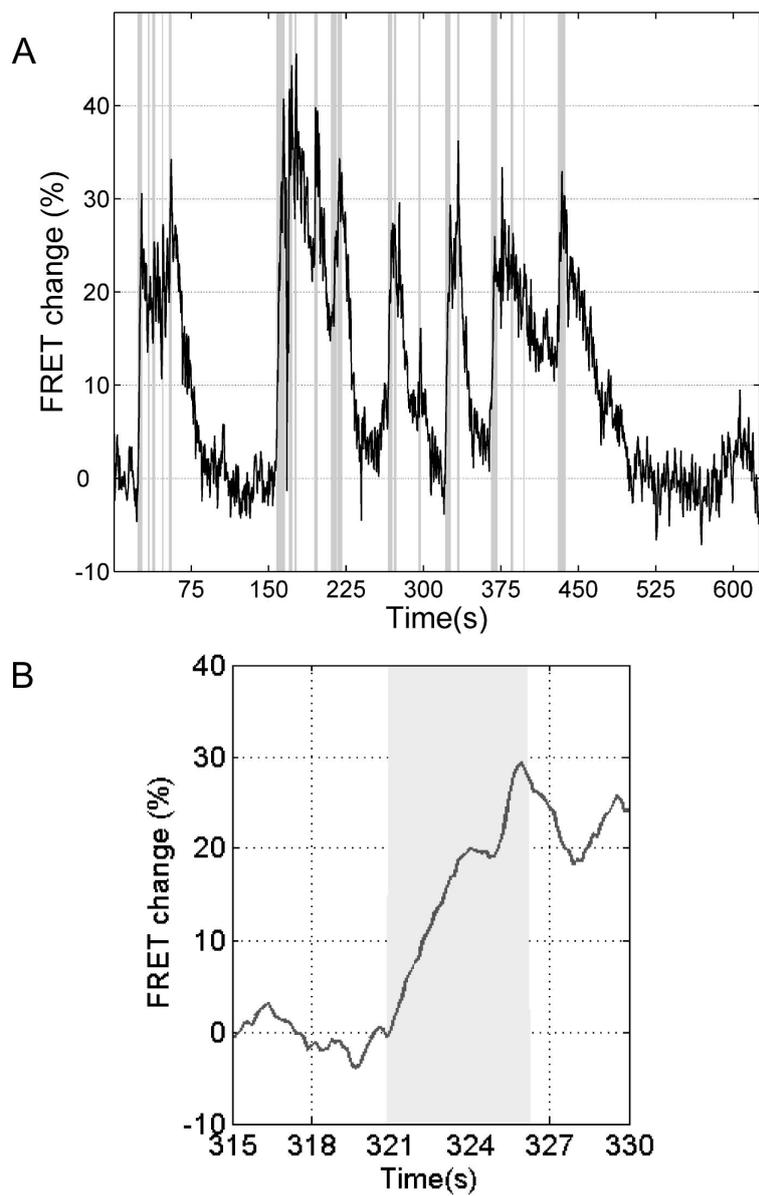


FIGURE E.3

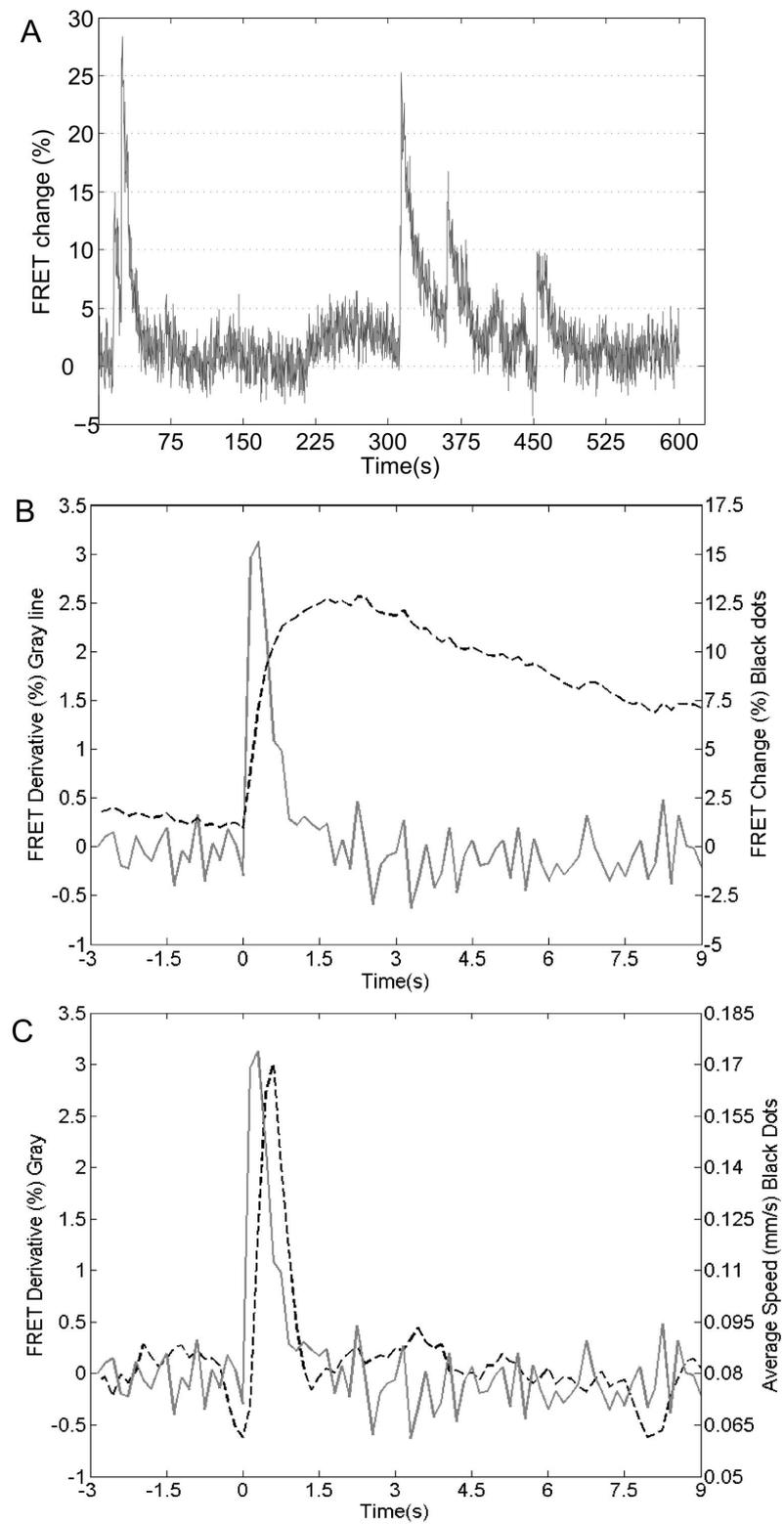


FIGURE E.4

Bibliographie

- [Alkema et al., 2005] Alkema, M. J., Hunter-Ensor, M., Ringstad, N., and Horvitz, H. R. (2005). Tyramine functions independently of octopamine in the caenorhabditis elegans nervous system. *Neuron*, 46(2) :247–260.
- [Bargmann et al., 1993] Bargmann, C. I., Hartweg, E., and Horvitz, H. R. (1993). Odorant-selective genes and neurons mediate olfaction in *c. elegans*. *Cell*, 74(3) :515–527.
- [Bargmann and Horvitz, 1991] Bargmann, C. I. and Horvitz, H. R. (1991). Chemosensory neurons with overlapping functions direct chemotaxis to multiple chemicals in *c. elegans*. *Neuron*, 7(5) :729–742.
- [Bartumeus et al., 2002] Bartumeus, F., Catalan, J., Fulco, U. L., Lyra, M. L., and Viswanathan, G. M. (2002). Optimizing the encounter rate in biological interactions : Lévy versus brownian strategies. *Phys Rev Lett*, 88(9) :097901.
- [Berg and Brown, 1972] Berg, H. C. and Brown, D. A. (1972). Chemotaxis in escherichia coli analysed by three-dimensional tracking. *Nature*, 239(5374) :500–504.
- [Biron et al., 2008] Biron, D., Wasserman, S., Thomas, J. H., Samuel, A. D. T., and Sengupta, P. (2008). An olfactory neuron responds stochastically to temperature and modulates caenorhabditis elegans thermotactic behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(31) :11002–11007.
- [Bénichou et al., 2006] Bénichou, O., Loverdo, C., Moreau, M., and Voituriez, R. (2006). Two-dimensional intermittent search processes : An alternative to lévy flight strategies. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 74(2 Pt 1) :020102.
- [Brenner, 1974] Brenner, S. (1974). The genetics of caenorhabditis elegans. *Genetics*, 77(1) :71–94.
- [Brockie et al., 2001] Brockie, P. J., Mellem, J. E., Hills, T., Madsen, D. M., and Maricq, A. V. (2001). The *c. elegans* glutamate receptor subunit *nmr-1* is required for slow nmda-activated currents that regulate reversal frequency during locomotion. *Neuron*, 31(4) :617–630.
- [Cassada and Russell, 1975] Cassada, R. C. and Russell, R. L. (1975). The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode caenorhabditis elegans. *Dev Biol*, 46(2) :326–342.
- [Chalasani et al., 2007] Chalasani, S. H., Chronis, N., Tsunozaki, M., Gray, J. M., Ramot, D., Goodman, M. B., and Bargmann, C. I. (2007). Dissecting a circuit for olfactory behaviour in caenorhabditis elegans. *Nature*, 450(7166) :63–70.
- [Chalfie et al., 1985] Chalfie, M., Sulston, J. E., White, J. G., Southgate, E., Thomson, J. N., and Brenner, S. (1985). The neural circuit for touch sensitivity in caenorhabditis elegans. *J Neurosci*, 5(4) :956–964.
- [Chasnov and Chow, 2002] Chasnov, J. R. and Chow, K. L. (2002). Why are there males in the hermaphroditic species caenorhabditis elegans? *Genetics*, 160(3) :983–994.

- [Cheung et al., 2005] Cheung, B. H. H., Cohen, M., Rogers, C., Albayram, O., and de Bono, M. (2005). Experience-dependent modulation of *c. elegans* behavior by ambient oxygen. *Curr Biol*, 15(10) :905–917.
- [Chronis et al., 2007] Chronis, N., Zimmer, M., and Bargmann, C. I. (2007). Microfluidics for in vivo imaging of neuronal and behavioral activity in *caenorhabditis elegans*. *Nat Methods*, 4(9) :727–731.
- [Clark et al., 2006] Clark, D. A., Biron, D., Sengupta, P., and Samuel, A. D. T. (2006). The *afd* sensory neurons encode multiple functions underlying thermotactic behavior in *caenorhabditis elegans*. *J Neurosci*, 26(28) :7444–7451.
- [Clark et al., 2007] Clark, D. A., Gabel, C. V., Gabel, H., and Samuel, A. D. T. (2007). Temporal activity patterns in thermosensory neurons of freely moving *caenorhabditis elegans* encode spatial thermal gradients. *J Neurosci*, 27(23) :6083–6090.
- [Colbert and Bargmann, 1997] Colbert, H. A. and Bargmann, C. I. (1997). Environmental signals modulate olfactory acuity, discrimination, and memory in *caenorhabditis elegans*. *Learn Mem*, 4(2) :179–191.
- [de Bono and Maricq, 2005] de Bono, M. and Maricq, A. V. (2005). Neuronal substrates of complex behaviors in *c. elegans*. *Annu Rev Neurosci*, 28 :451–501.
- [de Bono et al., 2002] de Bono, M., Tobin, D. M., Davis, M. W., Avery, L., and Bargmann, C. I. (2002). Social feeding in *caenorhabditis elegans* is induced by neurons that detect aversive stimuli. *Nature*, 419(6910) :899–903.
- [Desai et al., 1988] Desai, C., Garriga, G., McIntire, S. L., and Horvitz, H. R. (1988). A genetic pathway for the development of the *caenorhabditis elegans* hsn motor neurons. *Nature*, 336(6200) :638–646.
- [Edwards et al., 2007] Edwards, A. M., Phillips, R. A., Watkins, N. W., Freeman, M. P., Murphy, E. J., Afanasyev, V., Buldyrev, S. V., da Luz, M. G. E., Raposo, E. P., Stanley, H. E., and Viswanathan, G. M. (2007). Revisiting lévy flight search patterns of wandering albatrosses, bumblebees and deer. *Nature*, 449(7165) :1044–1048.
- [Edwards et al., 2008] Edwards, S. L., Charlie, N. K., Milfort, M. C., Brown, B. S., Gravlin, C. N., Knecht, J. E., and Miller, K. G. (2008). A novel molecular solution for ultraviolet light detection in *caenorhabditis elegans*. *PLoS Biol*, 6(8) :e198.
- [Faumont and Lockery, 2006] Faumont, S. and Lockery, S. R. (2006). The awake behaving worm : simultaneous imaging of neuronal activity and behavior in intact animals at millimeter scale. *J Neurophysiol*, 95(3) :1976–1981.
- [Fujiwara et al., 2002] Fujiwara, M., Sengupta, P., and McIntire, S. L. (2002). Regulation of body size and behavioral state of *c. elegans* by sensory perception and the *egl-4* cgmp-dependent protein kinase. *Neuron*, 36(6) :1091–1102.
- [Gems et al., 1998] Gems, D., Sutton, A. J., Sundermeyer, M. L., Albert, P. S., King, K. V., Edgley, M. L., Larsen, P. L., and Riddle, D. L. (1998). Two pleiotropic classes of *daf-2* mutation affect larval arrest, adult behavior, reproduction and longevity in *caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 150(1) :129–155.
- [Goulding et al., 2008] Goulding, E. H., Schenk, A. K., Juneja, P., MacKay, A. W., Wade, J. M., and Tecott, L. H. (2008). A robust automated system elucidates mouse home cage behavioral structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(52) :20575–20582.
- [Gray et al., 2005] Gray, J. M., Hill, J. J., and Bargmann, C. I. (2005). A circuit for navigation in *caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(9) :3184–3191.

- [Griesbeck et al., 2001] Griesbeck, O., Baird, G. S., Campbell, R. E., Zacharias, D. A., and Tsien, R. Y. (2001). Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein. mechanism and applications. *J Biol Chem*, 276(31) :29188–29194.
- [Gruninger et al., 2008] Gruninger, T. R., Gualberto, D. G., and Garcia, L. R. (2008). Sensory perception of food and insulin-like signals influence seizure susceptibility. *PLoS Genet*, 4(7) :e1000117.
- [Hapiak et al., 2009] Hapiak, V. M., Hobson, R. J., Hughes, L., Smith, K., Harris, G., Condon, C., Komuniecki, P., and Komuniecki, R. W. (2009). Dual excitatory and inhibitory serotonergic inputs modulate egg laying in *caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 181(1) :153–163.
- [Hardaker et al., 2001] Hardaker, L. A., Singer, E., Kerr, R., Zhou, G., and Schafer, W. R. (2001). Serotonin modulates locomotory behavior and coordinates egg-laying and movement in *caenorhabditis elegans*. *J Neurobiol*, 49(4) :303–313.
- [Hedgecock and Russell, 1975] Hedgecock, E. M. and Russell, R. L. (1975). Normal and mutant thermotaxis in the nematode *caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72(10) :4061–4065.
- [Herbers, 1981] Herbers, J. (1981). Time resources and laziness in animals. *Oecologia*, 49 :252 :262.
- [Hilliard et al., 2005] Hilliard, M. A., Apicella, A. J., Kerr, R., Suzuki, H., Bazzicalupo, P., and Schafer, W. R. (2005). In vivo imaging of *c. elegans* ash neurons : cellular response and adaptation to chemical repellents. *EMBO J*, 24(1) :63–72.
- [Hills et al., 2004] Hills, T., Brockie, P. J., and Maricq, A. V. (2004). Dopamine and glutamate control area-restricted search behavior in *caenorhabditis elegans*. *J Neurosci*, 24(5) :1217–1225.
- [Hobert, 2008] Hobert, O. (2008). Regulatory logic of neuronal diversity : terminal selector genes and selector motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(51) :20067–20071.
- [Hobert et al., 1997] Hobert, O., Mori, I., Yamashita, Y., Honda, H., Ohshima, Y., Liu, Y., and Ruvkun, G. (1997). Regulation of interneuron function in the *c. elegans* thermoregulatory pathway by the *ttx-3* *lim* homeobox gene. *Neuron*, 19(2) :345–357.
- [Hope, 1999] Hope, I. (1999). *C. elegans, a practical approach*. Oxford University Press.
- [Horvitz et al., 1982] Horvitz, H. R., Chalfie, M., Trent, C., Sulston, J. E., and Evans, P. D. (1982). Serotonin and octopamine in the nematode *caenorhabditis elegans*. *Science*, 216(4549) :1012–1014.
- [Iino and Yoshida, 2009] Iino, Y. and Yoshida, K. (2009). Parallel use of two behavioral mechanisms for chemotaxis in *caenorhabditis elegans*. *J Neurosci*, 29(17) :5370–5380.
- [Kang and Avery, 2009] Kang, C. and Avery, L. (2009). Systemic regulation of starvation response in *caenorhabditis elegans*. *Genes Dev*, 23(1) :12–17.
- [Kenyon et al., 1993] Kenyon, C., Chang, J., Gensch, E., Rudner, A., and Tabtiang, R. (1993). A *c. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature*, 366(6454) :461–464.
- [Kerr et al., 2000] Kerr, R., Lev-Ram, V., Baird, G., Vincent, P., Tsien, R. Y., and Schafer, W. R. (2000). Optical imaging of calcium transients in neurons and pharyngeal muscle of *c. elegans*. *Neuron*, 26(3) :583–594.
- [Kimura et al., 2004] Kimura, K. D., Miyawaki, A., Matsumoto, K., and Mori, I. (2004). The *c. elegans* thermosensory neuron *afd* responds to warming. *Curr Biol*, 14(14) :1291–1295.
- [Kindt et al., 2007] Kindt, K. S., Quast, K. B., Giles, A. C., De, S., Hendrey, D., Nicastro, I., Rankin, C. H., and Schafer, W. R. (2007). Dopamine mediates context-dependent modulation of sensory plasticity in *c. elegans*. *Neuron*, 55(4) :662–676.

- [Kuhara et al., 2008] Kuhara, A., Okumura, M., Kimata, T., Tanizawa, Y., Takano, R., Kimura, K. D., Inada, H., Matsumoto, K., and Mori, I. (2008). Temperature sensing by an olfactory neuron in a circuit controlling behavior of *c. elegans*. *Science*, 320(5877) :803–807.
- [Lipton et al., 2004] Lipton, J., Kleemann, G., Ghosh, R., Lints, R., and Emmons, S. W. (2004). Mate searching in *caenorhabditis elegans* : a genetic model for sex drive in a simple invertebrate. *J Neurosci*, 24(34) :7427–7434.
- [Mello and Fire, 1995] Mello, C. and Fire, A. (1995). Dna transformation. *Methods Cell Biol*, 48 :451–482.
- [Miyawaki et al., 1997] Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J. M., Adams, J. A., Ikura, M., and Tsien, R. Y. (1997). Fluorescent indicators for ca^{2+} based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*, 388(6645) :882–887.
- [Mohri et al., 2005] Mohri, A., Kodama, E., Kimura, K. D., Koike, M., Mizuno, T., and Mori, I. (2005). Genetic control of temperature preference in the nematode *caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 169(3) :1437–1450.
- [Mori and Ohshima, 1995] Mori, I. and Ohshima, Y. (1995). Neural regulation of thermotaxis in *caenorhabditis elegans*. *Nature*, 376(6538) :344–348.
- [Nakai et al., 2001] Nakai, J., Ohkura, M., and Imoto, K. (2001). A high signal-to-noise ca^{2+} probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat Biotechnol*, 19(2) :137–141.
- [Palmer et al., 2006] Palmer, A. E., Giacomello, M., Kortemme, T., Hires, S. A., Lev-Ram, V., Baker, D., and Tsien, R. Y. (2006). Ca^{2+} indicators based on computationally redesigned calmodulin-peptide pairs. *Chem Biol*, 13(5) :521–530.
- [Park et al., 2008] Park, S., Hwang, H., Nam, S.-W., Martinez, F., Austin, R. H., and Ryu, W. S. (2008). Enhanced *caenorhabditis elegans* locomotion in a structured microfluidic environment. *PLoS One*, 3(6) :e2550.
- [Pierce-Shimomura et al., 1999] Pierce-Shimomura, J. T., Morse, T. M., and Lockery, S. R. (1999). The fundamental role of pirouettes in *caenorhabditis elegans* chemotaxis. *J Neurosci*, 19(21) :9557–9569.
- [Pologruto et al., 2004] Pologruto, T. A., Yasuda, R., and Svoboda, K. (2004). Monitoring neural activity and $[ca^{2+}]$ with genetically encoded ca^{2+} indicators. *J Neurosci*, 24(43) :9572–9579.
- [Raizen et al., 2008] Raizen, D. M., Zimmerman, J. E., Maycock, M. H., Ta, U. D., jai You, Y., Sundaram, M. V., and Pack, A. I. (2008). Lethargus is a *caenorhabditis elegans* sleep-like state. *Nature*, 451(7178) :569–572.
- [Ramot et al., 2008] Ramot, D., Macinnis, B. L., Lee, H.-C., and Goodman, M. B. (2008). Thermotaxis is a robust mechanism for thermoregulation in *caenorhabditis elegans* nematodes. *J Neurosci*, 28(47) :12546–12557.
- [Ranganathan et al., 2000] Ranganathan, R., Cannon, S. C., and Horvitz, H. R. (2000). Mod-1 is a serotonin-gated chloride channel that modulates locomotory behaviour in *c. elegans*. *Nature*, 408(6811) :470–475.
- [Ren et al., 1996] Ren, P., Lim, C. S., Johnsen, R., Albert, P. S., Pilgrim, D., and Riddle, D. L. (1996). Control of *c. elegans* larval development by neuronal expression of a tgf -beta homolog. *Science*, 274(5291) :1389–1391.
- [Riddle and Albert, 1997] Riddle, D. and Albert, P. (1997). *C. elegans II*, chapter Genetic and Environmental Regulation of Dauer Larva Development, pages 739–768. Plainview, New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- [Saeki et al., 2001] Saeki, S., Yamamoto, M., and Iino, Y. (2001). Plasticity of chemotaxis revealed by paired presentation of a chemoattractant and starvation in the nematode *caenorhabditis elegans*. *J Exp Biol*, 204(Pt 10) :1757–1764.
- [Sawin et al., 2000] Sawin, E. R., Ranganathan, R., and Horvitz, H. R. (2000). *C. elegans* locomotory rate is modulated by the environment through a dopaminergic pathway and by experience through a serotonergic pathway. *Neuron*, 26(3) :619–631.
- [Schedl and Kimble, 1988] Schedl, T. and Kimble, J. (1988). *fog-2*, a germ-line-specific sex determination gene required for hermaphrodite spermatogenesis in *caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 119(1) :43–61.
- [Shtonda and Avery, 2006] Shtonda, B. B. and Avery, L. (2006). Dietary choice behavior in *caenorhabditis elegans*. *J Exp Biol*, 209(Pt 1) :89–102.
- [Srinivasan et al., 2008] Srinivasan, S., Sadegh, L., Elle, I. C., Christensen, A. G. L., Faergeman, N. J., and Ashrafi, K. (2008). Serotonin regulates *c. elegans* fat and feeding through independent molecular mechanisms. *Cell Metab*, 7(6) :533–544.
- [Sulston et al., 1975] Sulston, J., Dew, M., and Brenner, S. (1975). Dopaminergic neurons in the nematode *caenorhabditis elegans*. *J Comp Neurol*, 163(2) :215–226.
- [Suzuki et al., 2003] Suzuki, H., Kerr, R., Bianchi, L., Frøkjær-Jensen, C., Slone, D., Xue, J., Gerstbrein, B., Driscoll, M., and Schafer, W. R. (2003). In vivo imaging of *c. elegans* mechanosensory neurons demonstrates a specific role for the *mec-4* channel in the process of gentle touch sensation. *Neuron*, 39(6) :1005–1017.
- [Suzuki et al., 2008] Suzuki, H., Thiele, T. R., Faumont, S., Ezcurra, M., Lockery, S. R., and Schafer, W. R. (2008). Functional asymmetry in *caenorhabditis elegans* taste neurons and its computational role in chemotaxis. *Nature*, 454(7200) :114–117.
- [Sze et al., 2000] Sze, J. Y., Victor, M., Loer, C., Shi, Y., and Ruvkun, G. (2000). Food and metabolic signalling defects in a *caenorhabditis elegans* serotonin-synthesis mutant. *Nature*, 403(6769) :560–564.
- [Trent et al., 1983] Trent, C., Tsuing, N., and Horvitz, H. R. (1983). Egg-laying defective mutants of the nematode *caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 104(4) :619–647.
- [Tsalik and Hobert, 2003] Tsalik, E. L. and Hobert, O. (2003). Functional mapping of neurons that control locomotory behavior in *caenorhabditis elegans*. *J Neurobiol*, 56(2) :178–197.
- [Vergassola et al., 2007] Vergassola, M., Villermaux, E., and Shraiman, B. I. (2007). ‘infotaxis’ as a strategy for searching without gradients. *Nature*, 445(7126) :406–409.
- [Viswanathan et al., 1999] Viswanathan, G. M., Buldyrev, S. V., Havlin, S., da Luz, M. G., Raposo, E. P., and Stanley, H. E. (1999). Optimizing the success of random searches. *Nature*, 401(6756) :911–914.
- [Waggoner et al., 1998] Waggoner, L. E., Zhou, G. T., Schafer, R. W., and Schafer, W. R. (1998). Control of alternative behavioral states by serotonin in *caenorhabditis elegans*. *Neuron*, 21(1) :203–214.
- [Wallace et al., 2008] Wallace, D. J., zum Alten Borgloh, S. M., Astori, S., Yang, Y., Bausen, M., Kügler, S., Palmer, A. E., Tsien, R. Y., Sprengel, R., Kerr, J. N. D., Denk, W., and Hasan, M. T. (2008). Single-spike detection in vitro and in vivo with a genetic ca_2^+ sensor. *Nat Methods*, 5(9) :797–804.
- [Ward et al., 2008] Ward, A., Liu, J., Feng, Z., and Xu, X. Z. S. (2008). Light-sensitive neurons and channels mediate phototaxis in *c. elegans*. *Nat Neurosci*, 11(8) :916–922.
- [Wenick and Hobert, 2004] Wenick, A. S. and Hobert, O. (2004). Genomic cis-regulatory architecture and trans-acting regulators of a single interneuron-specific gene battery in *c. elegans*. *Dev Cell*, 6(6) :757–770.

- [White et al., 1986] White, J., Southgate, E., Thomson, J., and Brenner, S. (1986). The structure of the nervous system of the nematode *caenorhabditis elegans*. *Phil. Trans. Royal Soc. London. Series B, Biol. Sci.*, 314, Issue 1165 :1–340.
- [Wicks and Rankin, 1995] Wicks, S. R. and Rankin, C. H. (1995). Integration of mechanosensory stimuli in *caenorhabditis elegans*. *J Neurosci*, 15(3 Pt 2) :2434–2444.
- [Wittenburg and Baumeister, 1999] Wittenburg, N. and Baumeister, R. (1999). Thermal avoidance in *caenorhabditis elegans* : an approach to the study of nociception. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(18) :10477–10482.
- [You et al., 2008] You, Y.-J., Kim, J., Raizen, D. M., and Avery, L. (2008). Insulin, cgmp, and tgf-beta signals regulate food intake and quiescence in *c. elegans* : A model for satiety. *Cell Metab*, 7(3) :249–257.
- [Zhang et al., 2007] Zhang, F., Wang, L.-P., Brauner, M., Liewald, J. F., Kay, K., Watzke, N., Wood, P. G., Bamberg, E., Nagel, G., Gottschalk, A., and Deisseroth, K. (2007). Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature*, 446(7136) :633–639.