

2m 11. 3181.1

Université de Montréal

CARACTÉRISATION D'UNE NOUVELLE POPULATION
D'INTERNEURONES SITUÉS AU SEIN DU NOYAU MOTEUR DU
TRIJUMEAU

Par

Sarah Meddahi
Département de Physiologie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.sc.)
en sciences neurologiques

Avril 2004

©Sarah Meddahi, 2004



W

4

U58

2004

V.078

Direction des bibliothèques

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**CARACTÉRISATION D'UNE NOUVELLE POPULATION
D'INTERNEURONES SITUÉS AU SEIN DU NOYAU MOTEUR DU
TRIJUMEAU**

Présenté par :

Sarah Meddahi

Évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Jean-Claude Lacaille

Dr Arlette Kolta

Dr James Lund

Président du jury

Directrice de recherche

Membre du jury

RÉSUMÉ

Le noyau moteur du système trigéminal (NVmot) contient de gros neurones multipolaires et de petits neurones fusiformes qu'on croyait jusqu'à récemment que tous étaient des motoneurones α et γ . Or certaines évidences suggèrent qu'il s'y trouve aussi d'autres neurones. La stimulation du NVmot évoque des potentiels postsynaptiques (PPS) dans la région péri-trigéminal (PeriV) qui sont médiés par le glutamate, le GABA et la glycine. Des fibres commissurales relient les NVmot des deux côtés. Ces données suggèrent que le NVmot renferme des interneurones dont les projections atteignent les noyaux adjacents et le NVmot contralatéral et qui pourraient jouer un rôle important dans la coordination bilatérale de la mâchoire.

Dans cette étude nous démontrons d'une façon non équivoque l'existence de ces interneurones et nous déterminons leur morphologie, leurs propriétés intrinsèques ainsi que leurs inputs synaptiques. Nos résultats montrent que ces interneurones sont caractérisés par certaines propriétés électrophysiologiques semblables à celles des pré-motoneurones dans PeriV et qui les distinguent des motoneurones. Comme les pré-motoneurones de PeriV, ces interneurones sont caractérisés par leur petite taille, un arbre dendritique simple, leur immuno-réactivité au GABA, à la glycine et au glutamate ainsi que par leurs projections commissurales au NVmot contralatéral. De plus, ces interneurones répondent par des PPS suite à la stimulation de PeriV et celle-ci constitue la principale cible de leurs projections axonales indiquant une connexion réciproque avec cette matrice de pré-motoneurones.

Mots Clés: Mastication, coordination bilatérale de la mâchoire, noyau moteur trigéminal, interneurones, motoneurones, électrophysiologie, morphologie, immunohistochimie, fibres commissurales.

ABSTRACT

The trigeminal motor nucleus (NVmot) contains big multipolar neurones and small fusiform neurons that was believed until recently that they were all α or γ motoneurons. However, certain evidence suggests that it includes also another type of neurons. The stimulation of the NVmot evokes postsynaptic potentials (PSPs) in the peri-trigeminal area (PeriV) which are mediated by glutamate, GABA and glycine. In addition commissural fibers connect the two NVmot on both sides of the jaw. These data suggest that NVmot contains a distinct population of interneurons projecting to adjacent nuclei and to the contralateral NVmot. The latter could play an important role in the bilateral coordination of the jaw.

In this study we demonstrated the existence of these interneurons, determined their morphology and their intrinsic properties, as well as their synaptic inputs. Our results show that these interneurons are characterized by electrophysiological properties which distinguishing them from motoneurons, and which are similar to those of the pre-motoneurons in PeriV. Like the pre-motoneurons of PeriV, these interneurons are characterized by their small size, the simple form of their dendritic trees, their immuno-reactivity to GABA, glycine and glutamate, as well as by their projections to the contralateral NVmot. Furthermore, PPSs are evoked in these interneurons by the stimulation of PeriV. The latter constitutes the main target of their axonal projections indicating a reciprocal connection with this matrix of pre-motoneurons.

Keywords: mastication, bilateral coordination of the jaw, the trigeminal motor nucleus, interneurons, motoneurons, electrophysiology, morphology, immunohistochemistry, commissural fibers.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ (français).....	III
RÉSUMÉ (anglais).....	IV
LISTE DES TABLEAUX.....	X
LISTE DES FIGURES.....	XI
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XIII
REMERCIEMENTS.....	XV

Premier Chapitre

(Introduction)

1. 1. Mise en contexte.....	2
1.2. La physiologie neuronale de la mastication.....	6
1.2.1. Générateur de Patron Central de la mastication	13
1.2.2. Contrôle par les centres supérieurs de la mastication	16
1.2.3. Information sensorielle provenant de la région oro-faciale.....	18
1.2.4. Réflexes de la mâchoire	22
1.2.5. Contrôle moteur des muscles masticateurs.....	26
1.2.5.1. Noyau moteur du trijumeau	26
1.2.5.2. Motoneurones alpha.....	29
1.2.5.3. Motoneurones gamma.....	30
1.2.5.4. Activité électrophysiologique des motoneurones.....	32
1.2.5.5. Inputs synaptiques	33
1.2.6. Les interneurones de la région péri-trigéminal	35
1.2.6.1. Inputs synaptiques	36
1.2.6.2. Outputs synaptiques.....	37
1.2.6.3. Morphologie et électrophysiologie.....	38
1.2.6.4. Nature neurochimique.....	40
1.2.6.4. Rôle fonctionnel	41
1.3. Évidences de l'existence des interneurones dans NVmot	43
1.4 Objectifs de l'étude	45

Deuxième chapitre

ELECTROPHYSIOLOGICAL PROPERTIES AND SYNAPTIC INPUTS OF INTERNEURONS LOCATED IN THE TRIGEMINAL MOTOR NUCLEUS.....	47
ABSTRACT.....	49
INTRODUCTION.....	50
MATERIALS AND METHODS.....	53
Labeling of the trigeminal motoneurons	53
Brainstem slices preparation.....	53
Recording from visualized neurons.....	53
Drug application.....	55
Biocytin labeling and tissue processing.....	55
RESULTS.....	56
Morphological features of the recorded neurons.....	56
Electrophysiological identification.....	57
Membrane passive and actives properties.....	57
Rectification.....	57
Firing properties.....	58
Synaptic activity at resting membrane potential.....	60
Spontaneous events observed at rest.....	60
Synaptic responses.....	61
DISCUSSION.....	63
General morphological features.....	64
Electrophysiological characteristics of interneurons and motoneurons.....	65
Synaptic activity.....	69
Synaptic response.....	69
Conclusions.....	72
TABLES AND LEGENDS.....	73
FIGURES AND LEGENDS.....	76
REFERENCE LIST.....	88

INTERNEURONS WITHIN THE TRIGEMINAL MOTOR NUCLEUS: MORPHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERIZATION	99
ABSTRACT.....	101
INTRODUCTION.....	102
MATERIALS AND METHODS.....	103
Labeling of the trigeminal motoneurons	103
Perfusion fixation and tissue processing.....	103
Nissl stainings.....	104
Immunohistochemistry examinations.....	105
DiI injection.....	105
Biocytin labeling and tissue processing.....	106
RESULTS.....	107
Nissl stainings.....	107
Immunohistochemistry.....	108
Commissural fibers.....	109
Morphological examination of biocytin-filled interneurons.....	109
Two types of interneurons classified on morphological basis.....	109
Extent of the dendritic arbors.....	110
Position and axonal projections of labeled interneurons.....	110
DISCUSSION.....	112
Biocytin filled neurons.....	113
Immunohistochemistry.....	117
Functional implications.....	118
TABLES AND LEGENDS.....	120
FIGURES AND LEGENDS.....	121
REFERENCE LIST.....	130

Troisième chapitre

(Discussion)

DISCUSSION GÉNÉRALE.....	139
3.1 DISCUSSION DES DEUX ARTICLES.....	140
3.1.1 Propriétés électrophysiologiques.....	140
3.1.2 Inputs synpatiques.....	143
3.1.3 Caractéristiques morphologiques.....	148
3.2 PARALLÈLE AVEC D'AUTRES NOYAUX CRÂNIENS.....	155
3.3 IMPLICATIONS FONCTIONNELLES ET NOUVELLES APPROCHES EXPÉRIMENTALES.....	157
3.4 CONCLUSIONS.....	162
 BIBLIOGRAPHIE.....	 163

LISTE DES TABLEAUX

Deuxième chapitre

« ELECTROPHYSIOLOGICAL PROPERTIES AND SYNAPTIC INPUTS OF INTERNEURONS LOCATED IN THE TRIGEMINAL MOTOR NUCLEUS »

Table I : Main morphological features of interneurons and motoneurons of NVmot.....	73
Table II : Electrophysiological characteristics of the neurons within NVmot.....	74
Table III : Synaptic responses of interneurons and motoneurons to stimulation of adjacent regions.....	75

« INTERNEURONS WITHIN THE TRIGEMINAL MOTOR NUCLEUS: MORPHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERIZATION »

Table I : Morphological characteristics of interneurons in the trigeminal motor nucleus.....	120
-----------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

LISTE DES FIGURES

Premier chapitre

Figure 1 : Schéma des différentes composantes de l'appareil masticateur.....	5
Figure 2 : Schéma des noyaux moteurs et sensoriels du tronc cérébral.....	11
Figure 3 : Schéma du modèle de GPC de la mastication.....	12
Figure 4 : Schéma des réflexes de la mâchoire.....	25
Figure 5 : Schéma de la région péri-trigéminal.....	42

Deuxième chapitre

« ELECTROPHYSIOLOGICAL PROPERTIES AND SYNAPTIC INPUTS OF INTERNEURONS LOCATED IN THE TRIGEMINAL MOTOR NUCLEUS »

Figure 1 : Image of an interneuron filled with biocytin superposed to the massteric trigeminal motoneuron pool.....	80
Figure 2 : Example of two labeled neurons within the NVmot.....	81
Figure 3 : Rectification in the recorded neurons.....	82
Figure 4 : Spike and AHP properties in recorded neurons.....	83
Figure 5 : Frequency-current relationship and accommodation.....	84
Figure 6 : Firing adaptation and hyperpolarization-induced discharge in interneurons	85
Figure 7 : Spontaneous synaptic activity recorded at rest.....	86
Figure 8 : Synaptic responses.....	87

**« INTERNEURONS WITHIN THE TRIGEMINAL MOTOR NUCLEUS:
MORPHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERIZATION »**

Figure 1: Nissl stainings of brain stem slices containing NVmot124

Figure 2: GABAergic, glutamatergic and glycinergic immunoreactive neurons within NVmot.....125

Figure 3: Commissural neurons revealed by DiI injections.....126

Figure 4: Representative photomicrographs of biocytin filled interneurons classified on a morphological basis.....127

Figure 5: Extent of dendritic arbors.....128

Figure 6: Position and axonal projections of biocytin-filed neurons within NVmot.....129

Troisième chapitre

Figure 1: Différences majeures entre les interneurones et les motoneurones d'après nos résultats.....147

Figure 2: Connexions synaptiques des interneurones.....154

Figure 3: Préparation de tranches horizontales du tronc cérébral.....161

LISTE DES ABRÉVIATIONS

5-HT :	sérotonine
ACM :	aire corticale de la mastication
ACSF :	liquide cérébro-spinal artificiel
ADP :	après-dépolarisation
AHP :	après-hyperpolarisation
AHPb :	après-hyperpolarisation biphasique
AMPA :	acide alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionique
ChAT:	choline acétyltransférase
Cl ⁻ :	chlore
DiI :	1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetra-methylindocarbo-cyanine
DNQX :	6,7-dinitro-quinoxaline
EMG :	électromyogramme
FRL :	formation réticulée latérale
FRM :	formation réticulée médiane
GABA :	acide gamma-aminobutyrique
GAD :	acide glutamique décarboxylase
GC :	noyau gigantocellulaire
GCP :	générateur central de patron
HRP :	« horseradish peroxidase »
INs :	interneurones au sein du noyau
IntV :	région inter-trigéminal
MesV :	noyau mésencéphalique trigéminal
mPeriV :	région peri-trigéminal médiane

NVII _{mot} :	noyau facial
NV _{mot} :	noyau moteur trigéminal
NV _{snpr} :	noyau trigéminal sensoriel principal
nV _{sp} :	noyau spinal du trijumeau
NXII _{mot} :	noyau hypoglosse
NMDA :	N-méthyl-D,L-aspartate
nPC :	noyau pontis caudalis
PCR _t :	formation réticulée parvocellulaire
PeriV :	région péri-trigéminal
PPSE :	potentiel post-synaptique excitateur
PPSI :	potentiel post-synaptique inhibiteur
SupV :	région supra-trigéminal
TMNs :	motoneurones trigéminaux
TMNs- α	motoneurones trigéminaux alpha
TMNs- γ	motoneurones trigéminaux gamma
TTX:	tétradotoxine

REMERCIEMENTS

Mes profonds remerciements à ma directrice de recherche, Dr Arlette Kolta, qui m'a si gentiment ouvert son laboratoire, qui m'a confié ce travail et m'a aidé à le mener à bon terme. Je la remercie pour ses conseils, ses critiques judicieuses et sa grande patience à mon égard;

Je remercie particulièrement Dorly Verdier dont la gentillesse et le dévouement m'ont souvent redonné courage;

Merci à Louise Grondin pour son excellente assistance technique qui a singulièrement facilité ma tâche;

Merci à François Auclair pour les travaux d'immunohistochimie;

Je remercie vivement Marie-Josée Bourque pour m'avoir appris la technique du patch-clamp.

Un gros merci à mes parents, leurs conseils avisés ne m'ont jamais fait défaut. Leur droiture et leur courage au travail ont été pour moi un exemple permanent. Qu'ils soient assurés de ma reconnaissance et de mon amour filial;

Et enfin, je remercie Chris McDavid pour son dévouement, sa compréhension, sa patience et son appui de chaque instant.

Premier Chapitre

INTRODUCTION

1. 1. Mise en contexte

La digestion débute par la mastication dès l'instant où les aliments pénètrent dans la cavité buccale. Ils vont donc subir des transformations progressives qui ont pour but de les réduire en substances absorbables et utilisables (les nutriments). Ces transformations sont de deux ordres: mécaniques par une action de broyage et de brassage, chimique par l'utilisation des enzymes digestives. L'action mécanique implique la bouche, la langue et les dents.

Chez les mammifères, la mastication est un acte complexe impliquant plusieurs groupes de muscles des deux côtés de la mâchoire (figure 1A). La musculature de la mâchoire a une organisation bilatérale unique puisqu'elle déplace un os en forme de U (la mandibule) avec deux articulations dans le plan transversal (figure 1B). Pour réaliser l'élévation ou la dépression de la mandibule, les muscles des deux côtés de la mâchoire doivent être coordonnés. Cela implique une organisation bilatérale du contrôle neural des mouvements de la mâchoire. Cependant, l'innervation motrice de la musculature de la mâchoire est strictement ipsilatérale (Batini *et al.* 1976, Limwongse et DeSantis 1977, Nomura *et al.* 1983): les muscles d'un côté de la mâchoire reçoivent leur innervation des motoneurones situés dans le noyau moteur du trijumeau (NVmot) du même côté. Aussi, au niveau des neurones sensoriels primaires, le système masticatoire est strictement organisé ipsilatéralement: 1) les afférences fusoriales primaires innervant les muscles de fermeture de la mâchoire ainsi qu'une proportion d'afférences périodontales ont leurs corps cellulaires dans le noyau mésencéphalique (MesV) du même côté et ne projettent qu'à ce côté-là; 2) les autres afférences primaires ayant leurs corps cellulaires dans le ganglion trigéminal ne projettent qu'à un seul côté du tronc cérébral. Cette organisation ipsilatérale des composantes motrices et sensorielles du système masticateur implique que d'autres

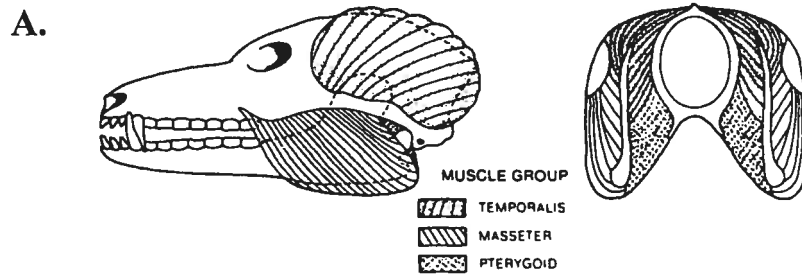
éléments neuronaux coordonnent l'activité bilatérale des muscles masticatoires. Une nouvelle population d'interneurones contenus dans NVmot, et qui semblent projeter au NVmot contralatéral, constitue un excellent candidat pour cette fonction.

Le but principal de ce mémoire est de caractériser cette population d'interneurones au sein du NVmot afin de mieux cerner leur rôle dans la coordination bilatérale de la mâchoire et de pouvoir les distinguer sans équivoque des motoneurones dans le même noyau. Pour se faire, une étude électrophysiologique décrivant leurs propriétés intrinsèques ainsi que leurs réponses synaptiques sera menée en parallèle à une caractérisation morphologique et immunohistochimique.

Premièrement, la revue de littérature sera entamée par une description des structures du tronc cérébral impliquées dans la mastication. Elle portera plus précisément sur l'implication, dans le processus masticatoire, des neurones du NVmot ainsi que de la région des pré-motoneurones entourant celui-ci communément appelée la région péri-trigéminal (PeriV) qui est subdivisée en quatre parties: dorsalement, la région supra-trigéminal (SupV); latéralement, la région inter-trigéminal (IntV); médialement, la région péri-trigéminal médiane (mPeriV) et ventralement, la formation réticulée parvocellulaire (PCRt). L'accent sera, toutefois, mis sur les évidences anatomiques et électrophysiologiques montrant l'existence des interneurones à l'intérieur du NVmot. Le corps du mémoire sera représenté par deux articles, sous la forme « prêt à être soumis ». Le premier article, qui a pour titre : « Electrophysiological properties and synaptic inputs of interneurons located in the trigeminal motor nucleus », portera surtout sur l'aspect

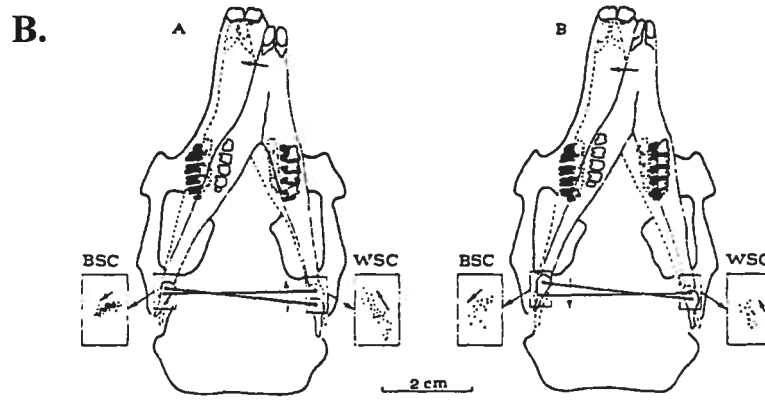
électrophysiologique (propriétés intrinsèques et réponses synaptiques) de ces interneurones alors que le deuxième article, intitulé : « Interneurons within the trigeminal motor nucleus: morphological and immunohistochemical characterization », adresse, quant à lui, l'aspect anatomique de ces interneurones. Finalement, afin d'élaborer encore plus le sujet, une discussion plus générale sera amenée dans la troisième partie du mémoire et sera suivie par d'éventuelles perspectives de recherche.

Figure 1



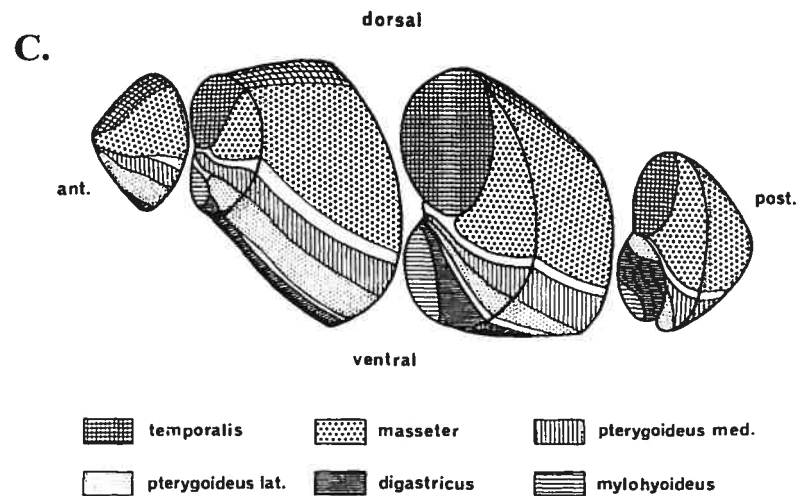
Un diagramme de l'appareil de la mastication: vue latérale et transverse. Les trois principaux muscles de fermeture de la mâchoire sont montrés.

Tiré de Lund et Enomoto 1988



Vues dorsoventrale de l'appareil mandibulaire

Tiré de Batini et al. 1976



Représentation des différents muscles de la mâchoire dans le noyau moteur du trijumeau

Tiré de Weijs et Dantuma 1981

1.2. La physiologie neuronale de la mastication

La mastication est la première étape de la digestion chez la plupart des mammifères. C'est un acte rythmique dans lequel la langue, les muscles faciaux et ceux de la mâchoire agissent en coordination (revu dans Bremer 1923). Tout en évoluant, les mâchoires des mammifères se sont développées pour profiter pleinement de la diversité des aliments qui existent sur notre planète. Les mouvements masticatoires diffèrent selon le type animal. Par exemple, les carnivores se sont adaptés pour manger de la viande avec peu de mâchement, tandis que les herbivores sont spécialisés pour un broyage presque continu d'aliments fibreux. Bien que les mouvements d'une vache, utilisés pour mâcher son foin, diffèrent de ceux d'un chien croquant sur un os, il semble y avoir quelques aspects de la mastication qui soient communs à tous les mammifères (revu dans Lund 1991). Comme tout autre système moteur ayant une fonction spécifique et des attributs particuliers, la présence de certains éléments, rend le système masticateur unique: les dents, la langue, une mâchoire unique contrôlée bilatéralement et des muscles de fermeture et d'ouverture. Les dents permettent l'application de pressions très fortes par l'entremise d'un ensemble de muscles de fermeture. Les dents sont ancrées dans la mâchoire grâce à un tissu conjonctif spécialisé qui constitue le ligament parodontal contenant des récepteurs sensoriels uniques. La deuxième structure d'importance est la langue, une masse complexe de muscles extrinsèques et intrinsèques qui, par ses mouvements associés et coordonnés à la mâchoire, contrôle le bol alimentaire. Autour de plusieurs articulations, il y a une ou plusieurs paires de muscles antagonistes qui sont généralement de puissance égale, mais les deux groupes de muscles antagonistes qui ferment et ouvrent la mâchoire ne sont pas équivalents à

plusieurs points de vue. En effet, les muscles de fermeture sont massifs et forts à cause des grandes forces qu'ils doivent exercer pour broyer les aliments et puisque les mouvements d'ouverture ne rencontrent presque pas de résistance, les muscles d'ouverture ne génèrent que peu de force et travaillent dans le même sens que la gravité (Lund et Rossignol 1980). Aussi, ces muscles diffèrent de façon saisissante dans leur contenu en fuseaux neuro-musculaires: ceux de la fermeture de la mâchoire en sont bien fournis, tandis que les muscles de l'ouverture n'en possèdent pas ou peu (Hosokawa 1961). Ces différences reflètent des aspects importants du contrôle moteur puisque les muscles mal fournis en fuseaux neuro-musculaires agissent comme de faibles effecteurs (Rokx *et al.* 1984). Chez les vertébrés, la mastication exige la contraction rythmique de ces muscles masticateurs. Chez les mammifères, il y a trois groupes principaux de muscles de fermeture de la mâchoire innervés par le nerf trigéminal: le temporalis, le masséter et les groupes ptérygoïdes; et un groupe d'ouverture de la mâchoire: le digastrique (revu dans Weijjs et Datuma 1981, figure 1A).

Les muscles de la mâchoire sont innervés par des motoneurones (TMNs) placés dans NVmot au niveau du pons et les corps cellulaires des afférences fusoriales acheminant l'information sensorielle en provenance des muscles de fermeture sont localisés au niveau pontique et dans le mésencéphale, dans le MesV (figure 2). Les neurones innervant les muscles de la mâchoire chez le rat ont été identifiés dans ces deux noyaux du trijumeau par des injections intramusculaires du traceur «Horseradish peroxidase» (HRP). Le marquage était toujours ipsilatéral au site d'injection indiquant une organisation ipsilatérale stricte des neurones fournissant l'information sensorielle et motrice des muscles masticateurs. (Rokx *et al.* 1985b).

Les mouvements masticateurs sont représentés kinésiotopiquement dans le cortex sensori-moteur. Néanmoins, les mouvements masticateurs de base sont contrôlés par un générateur de patron central (GPC) au niveau du tronc cérébral puisqu'on les retrouve chez des animaux décérébrés (revu dans Lund *et al.* 1998). Comme pour la locomotion et la respiration, le système contrôlant la mastication est basé sur un GPC (voir Lund et Enomoto 1988 pour revue, figure 3A). Notons que l'acte complet de la mastication qui consiste en la division des aliments solides et la formation d'un bol alimentaire est exécuté par un ensemble de mouvements coordonnés de la mâchoire, des lèvres, des joues et de la langue. Les muscles qui réalisent ces mouvements sont innervés par les V^{ème}, VII^{ème} et XII^{ème} paires de nerfs crâniens (revue de Bremer 1923, figure 2). Toutefois, même si ces différentes composantes sont coordonnées harmonieusement, les activités rythmiques dans les motoneurones des nerfs crâniens V, VII et XII sont générées par des GPC séparés, qui sont placés segmentairement au niveau des noyaux moteurs du V, VII et XII respectivement (revu dans Nakamura *et al.* 1999).

Si nous créons des conditions comparables à la marche sur un tapis roulant où le patron moteur est constant, la mastication d'une substance comme la gomme, qui ne change pas de grosseur ou de texture, impliquerait alors un patron central de mouvements réguliers (Weijs et Dantuma 1975). Cependant, de la même façon que le patron locomoteur dépend du terrain sur lequel on marche, des changements du type d'aliment ont des effets significatifs sur certains paramètres des mouvements masticateurs (Peyron *et al.* 1997). Par exemple, chez le chat le nombre de cycles ainsi que leur durée nécessaires pour préparer le bol alimentaire augmente avec la taille et la dureté de la nourriture (Thexton *et al.* 1980). En plus, le patron des mouvements masticateurs diffère entre le début et la fin de la séquence masticatoire

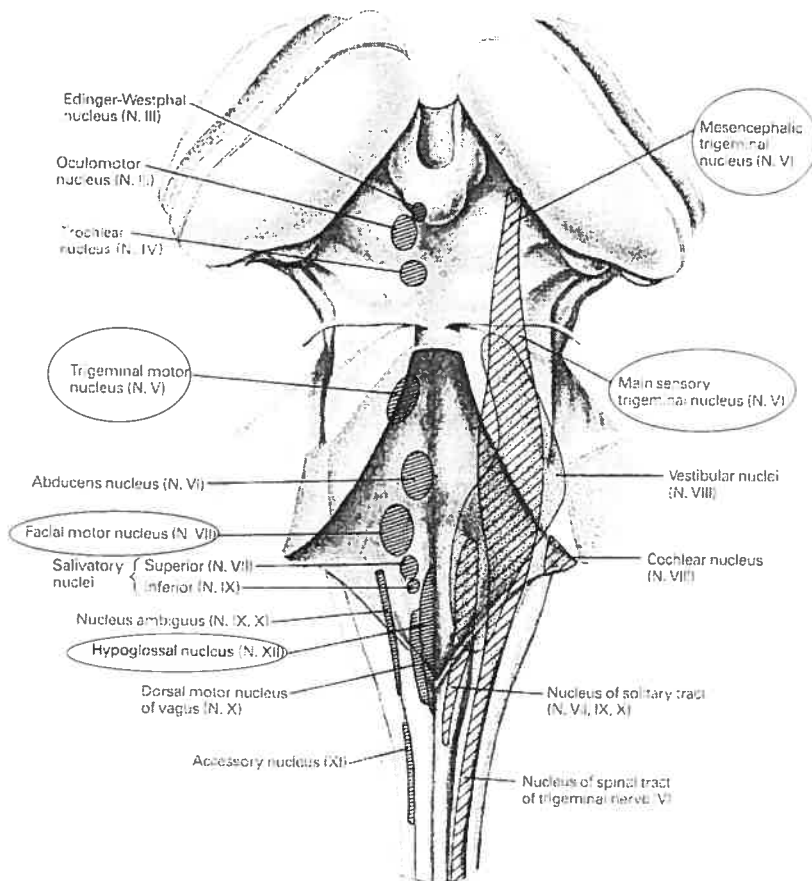
(Schwartz *et al.* 1989). Il devient donc évident que, pour être utiles, les mouvements masticateurs doivent être adaptés aux circonstances au moment de leur exécution. Les informations qui renseignent sur ces circonstances sont fournies par les afférences périphériques.

Les aliments sont transportés d'un côté à l'autre de la bouche par des mouvements de la langue. Toutefois, il est intéressant de noter que certaines espèces comme le rat peuvent mastiquer des deux côtés en même temps (Weijjs et Dantuma 1975). Les systèmes moteurs spinaux de la locomotion sont généralement organisés de façon à pouvoir alterner et opposer le patron d'activité des groupes de muscles dans les membres de droite et de gauche. Plus encore, les parties droite et gauche du système locomoteur peuvent être contrôlées indépendamment. Ceci n'est pas le cas dans le système moteur bucco-facial où les deux côtés sont unis par un élément osseux avec deux joints dans le plan transversal, l'arc mandibulaire. Cette distinction anatomique implique une organisation bilatérale du mécanisme de contrôle nerveux. Cependant, comme nous l'avons déjà mentionné, l'innervation motrice de la musculature de mâchoire aussi bien que ses neurones sensoriels primaires sont organisés ipsilatéralement. Donc, l'activité bilatérale des muscles bucco-faciaux doit être coordonnée par un ensemble d'interneurones.

Il faut donc conclure que, premièrement, le patron de base des mouvements rythmiques de la mastication peut être évoqué en l'absence des centres supérieurs et que l'essentiel de ce patron peut être généré par des circuits neuronaux intrinsèques au tronc cérébral. Deuxièmement, pour être utiles, ces mouvements doivent être adaptés aux circonstances au moment de leur exécution. Les informations qui

renseignement sur ces circonstances sont fournies par les afférences périphériques et sont intégrées au programme moteur. En cas de perturbation, le programme moteur doit être modifié de façon spécifique selon le moment du cycle où la correction est requise. Finalement, une coordination bilatérale du système masticateur est nécessaire et impliquerait un substrat d'interneurones liant les deux côtés du tronc cérébral. En somme, les centres supérieurs, les afférences périphériques, les interneurones trigéminaux et les générateurs centraux de patrons rythmiques masticateurs forment un ensemble interactif qui génère, contrôle et ajuste les mouvements rythmiques lors de la mastication.

Figure 2



Les noyaux moteurs (côté gauche) et les noyaux afférents (côté droit) des nerfs crâniens dans une vue dorsale du tronc cérébral.

Tiré de Kandel & Schwartz, deuxième édition

Figure 3

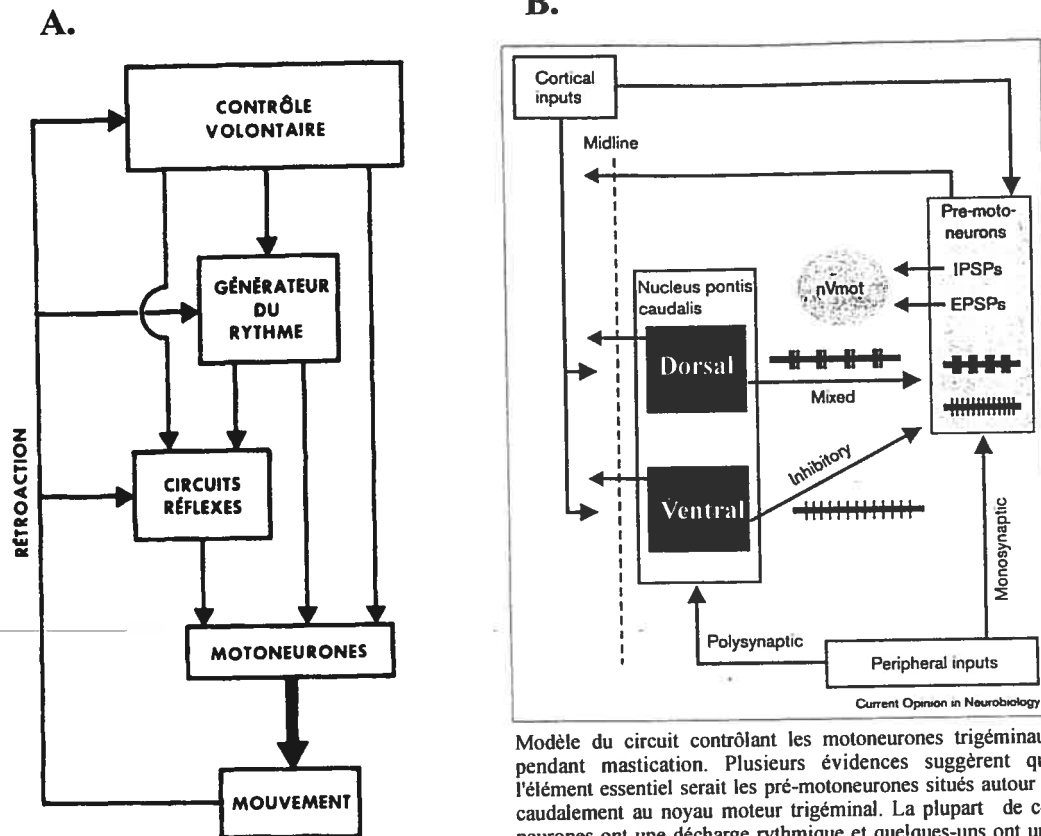


Fig. 6 — Schéma d'organisation d'un système moteur avec les différents niveaux hiérarchiques.

Tiré de Lund et Rossignol 1980

Modèle du circuit contrôlant les motoneurones trigéminaux pendant mastication. Plusieurs évidences suggèrent que l'élément essentiel serait les pré-motoneurones situés autour et caudalement au noyau moteur trigéminal. La plupart de ces neurones ont une décharge rythmique et quelques-uns ont une décharge tonique pendant la mastication fictive. Certains d'entre eux reçoivent des inputs de courte latence des afférences primaires et de l'aire masticatrice corticale. Il y a deux populations de neurones dans le noyau pontis caudalis qui semblent aussi participer à la génération du patron de la mastication : les neurones dorsaux qui sont rythmiquement actifs et un groupe ventral qui contient des neurones actifs de façon tonique. Les deux groupes reçoivent des inputs du cortex cérébral avec une même latence que celle des pré-motoneurons et répondent avec une longue latence à la stimulation bucco-faciale. Les neurones ventraux semblent inhiber la décharge en bouffée alors que les neurones dorsaux exercent des effets mixtes inhibiteurs et excitateurs sur les pré-motoneurons.

Tiré de Lund et *al.* 1998

1.2.1. Générateur de Patron Central de la mastication

La mastication est une série de mouvements rythmiques ayant beaucoup de ressemblance avec la respiration, la locomotion et d'autres rythmes innés. Les patrons de base de tous ces mouvements sont produits aux niveaux bas du système nerveux par des circuits qui sont devenus connus comme des générateurs de patrons centraux (GPC). La commande motrice pour le patron de base des mouvements rythmiques oraux-faciaux est produite par une population neuronale dans le tronc cérébral et Bazett et Penfield (1922) étaient les premiers à le prouver. Après avoir décérébré des chats au-dessus du pons, ces animaux étaient en mesure non seulement d'avaler, mais de mâcher leur aliment s'il été inséré au fond de la bouche. Chez le lapin, Dellow et Lund (1971) ont trouvé que les mouvements fondamentaux de la mastication sont programmés par des circuits dans le tronc cérébral en l'absence d'action réflexe périphérique. Cette réalité est maintenant confirmée dans plusieurs systèmes tel que la locomotion (Lund et Rossignol 1980). Par exemple, même spinalisé le poisson peut nager et des chats, avec des sections complètes de la moelle épinière, marcheront sur un tapis roulant (Andersson *et al.* 1981).

Une place importante est donc allouée au GPC dans le processus masticateur. Le GPC activera dans un ordre adéquat les motoneurones qui commandent le mouvement désiré et contrôle aussi l'excitabilité d'interneurones faisant partie des voies réflexes ou descendantes. Les informations en provenance de la périphérie ou des centres supérieurs peuvent être contrôlées par le GCP lui même, de façon à ce que les réponses à une perturbation ou les corrections faites au programme moteur soient appropriées pour la phase du mouvement en cours (voir Lund et Olsson 1983

pour revue). Le cortex exerce son action sur le GPC via les voies corticobulbaires avec des projections qui sont principalement contralatérales (revu dans Lund 1991).

Dans le passé, il a été accepté que le patron de la mastication soit produit en deux étapes (revu dans Lund 1991 et Lund *et al.* 1998) : 1) genèse du rythme de base produit par la formation réticulée médiane (FRM) à la jonction pontobulbaire et 2) genèse du patron spatio-temporel des bouffées des motoneurones trigéminaux (TMNs) produit par des neurones pré-moteurs près du NVmot dans la formation réticulée latérale (FL). Ainsi les TMNs sont considérés comme des relais passifs aux muscles de la mâchoire.

De nombreuses recherches ont été menées pour identifier le circuit neuronal minimal composant le GPC. Un premier modèle de GPC basé sur l'activation d'un réseau neuronal localisé dans la FRM fut proposé par Nozaki et ses collègues (1986a, b). Selon ces auteurs, les fibres corticobulbaires induisent une activité tonique dans le GPC qui active des neurones localisés dans le noyau gigantocellulaire (GC) qui deviennent rythmiques (Nozaki *et al.* 1986b). La stimulation des fibres pyramidales rostrales n'induisait plus aucune activité masticatoire dans les muscles digastriques ou masséters lorsque la partie médiane du tronc cérébral était sectionnée au niveau de la jonction ponto-bulbaire. Nozaki et ses collègues concluaient que les neurones du GC formeraient le rythme masticatoire qu'ils transmettraient à NVmot (Nozaki *et al.* 1986a, b), via un groupe d'interneurones pré-moteurs de dernier-ordre de la formation parvocellulaire situés caudalement à NVmot et qui sont responsables de la génération de bouffées.

Cependant, des données plus récentes suggèrent que la région de la FRM qui participe dans la programmation de la mastication soit située au niveau du NVmot. Westberg et ses collaborateurs (2001) ont enregistré des neurones du noyau pontis

caudalis (nPC) déchargeant toniquement dont l'activité augmentait avec la mastication dans le nPC ventral et d'autres déchargeant rythmiquement pendant la mastication dans le nPC dorsal (figure 3B). Les neurones du nPC projettent aux régions latérales du tronc cérébral qui contiennent des pré-motoneurones, mais pas à NVmot lui-même (revu dans Lund *et al.* 1998).

La FRL comprend le noyau trigéminal sensoriel principal (NVsnpr), le noyau spinal (nVsp) et PeriV. Toutes ces régions contiennent des neurones pré-moteurs qui déchargent en bouffées phasiques au même rythme que la mastication provoquée par la stimulation corticale (Nozaki *et al.* 1983, Moriyama 1987, Westberg *et al.* 2001, Tsuboi *et al.* 2003).

Les motoneurones de fermeture de la mâchoire subissent une hyperpolarisation pendant l'ouverture de la mâchoire, mais les motoneurones d'ouverture ne sont pas inhibés pendant la fermeture de la mâchoire (Goldberg et Chandler 1981, Kubo *et al.* 1981, Goldberg *et al.* 1982). Donc, pour produire l'ouverture et la fermeture rythmique de la mâchoire seulement trois types de commande sont nécessaires: (1) Inhibition des motoneurones des muscles de fermeture pendant l'ouverture, (2) Excitation des motoneurones des muscles d'ouverture de la mâchoire concurremment et (3) Excitation des motoneurones des muscles de fermeture pendant la phase de fermeture. Le patron le plus simple du GPC exigerait donc deux groupes de pré-motoneuroens (inhibiteurs et excitateurs) pour décharger pendant l'ouverture de la mâchoire et un autre groupe d'interneurones excitateurs pour décharger pendant la fermeture de la mâchoire. C'est probablement la raison pour laquelle Inoue *et al.* (1994) ont regroupé les neurones actifs de façon rythmique dans seulement deux types: ceux associés à l'ouverture de la mâchoire et ceux associés à sa fermeture. Comme nous l'exposerons plus bas, PeriV est une

région composée de populations mixtes de neurones inhibiteurs et excitateurs projetant à NVmot.

1.2.2. Contrôle par les centres supérieurs de la mastication

La stimulation électrique du cortex sensorimoteur évoque des mouvements rythmiques de la mâchoire chez plusieurs espèces; incluant le lapin (Sumi 1969, Dellow et Lund 1971), le chat (Nakamura et al. 1976, Nakamura et Kubo 1978), le cochon d'inde (Goldberg et Tal 1978, Nozaki *et al.* 1986a) et le rat (Sasamoto *et al.* 1990, Zhang et Sasamoto 1990). Ces mouvements de la mâchoire sont accompagnés par un mouvement rythmique coordonné de la langue ainsi que par une sécrétion de salive. Ainsi, le comportement oro-facial induit par la stimulation corticale ressemble fortement à la mastication naturelle. En conséquence, la région corticale dont la stimulation produit ce résultat a été appelée l'aire corticale de la mastication (ACM). Elle est adjacente au cortex moteur primaire dans la partie la plus inférieure du gyrus précentral chez l'homme et le singe et dans le gyrus orbital chez le chat (revu dans Lund 1991).

La connexion entre l'ACM et les TMNs a été analysée au moyen de méthodes d'enregistrements de réponses neuronales suite à la stimulation de cette aire chez le lapin (Lund *et al.* 1984) et aussi au moyen d'une méthode de traçage rétrograde d'HRP chez le cochon d'Inde (Nozaki *et al.* 1986a,b). Ces études montrent que les outputs de l'ACM descendent au tronc cérébral via des fibres corticobulbaires. Cette aire corticale exerce des contrôles directs et indirects sur les TMNs. Pour déclencher la mastication, elle activerait le GPC alors que pour effectuer des mouvements plus raffinés des projections directes monosynaptiques aux TMNs seraient utilisées (Lund

et Rossignol 1980). Électrophysiologiquement, les projections de l'ACM aux TMNs semblent former deux systèmes séparés. Un, peut être activé par une seule stimulation qui excite ou inhibe les TMNs oligosynaptiquement. L'autre peut être activé seulement par la stimulation répétitive de l'ACM, suggérant qu'une certaine sommation soit requise pour l'activation de cette voie. On a montré anatomiquement que l'ACM a des projections descendantes à la formation réticulée pontobulbaire médiale et latérale chez le chat (Mizuno *et al.* 1968) et le singe (Kuypers 1958b). De plus, le collicule supérieur reçoit une convergence d'outputs de l'ACM et des noyaux gris centraux et projette vers la formation réticulée médiane et vers PCRt (Yasui *et al.* 1994). Ainsi, le collicule est en position d'intégrer les inputs de l'ACM, des ganglions basaux et de les envoyer aux deux fractions du GPC.

Ceci étant dit, l'importante place allouée au GPC dans la mastication, ne signifie pas que le cortex cérébral n'a aucun rôle dans les mouvements de ce processus. D'abord, par ses actions sur le GPC, il est capable d'initier et de maintenir de tels mouvements. De plus, les changements dans le niveau de l'activité corticale semblent être capables de changer les composantes spécifiques du patron, comme la durée du cycle, la durée et l'amplitude de la bouffée de l'électromyogramme (EMG) des muscles de la mâchoire (Lund *et al.* 1984). Donc ces changements de l'activité neuronale corticale peuvent refléter des réactions sensorielles favorisant vraisemblablement le choix d'un patron par rapport à un autre.

La mastication fictive aussi bien que naturelle peut aussi être induite par la stimulation d'une variété de structures sous-corticales, y compris l'amygdale (Lapin : Kawamura et Tsukamoto 1960, Lund et Dellow 1971 ; chat : Nakamura et Kubo

1978), le putamen, le globus pallidus, la substance noire, l'hypothalamus latéral, le noyau réticulé thalamique, la formation réticulée mésencéphalique et la voie pyramidale au niveau du pons (Lapin : Lund et Dellow 1971). Le cervelet qui reçoit l'information sensorielle oro-faciale est une autre région impliquée dans une variété de mouvements faciaux et de la mâchoire. Il a des effets inhibiteurs sur NVmot (Sessle et al. 1977a).

1.2.3. Information sensorielle provenant de la région oro-faciale

Les mécanismes neuronaux responsables de la modulation de la commande motrice par des inputs sensoriels de la région oro-faciale constituent une question importante dans l'étude de la mastication. Il est maintenant généralement admis que la commande centrale motrice est modulée par l'information sensorielle provenant de la bouche pour mieux adapter le mouvement à la nourriture (revu dans Lund 1991). L'analyse des mouvements masticatoires suggère que le contrôle de la mastication soit dépendant en grande mesure du feedback sensoriel. D'ailleurs, il n'y a aucune autre façon d'expliquer les effets sur le patron masticateur des différents produits alimentaires ainsi que la coordination de la langue, des lèvres et de la mâchoire pour déplacer les aliments. Même si les aspects de base de la mastication peuvent être programmés par le tronc cérébral en absence d'inputs sensoriels, de tels mouvements seraient fortement inefficaces et même dangereux à l'organisme. C'est pourquoi le système trigéminal est muni d'une gamme d'organes sensoriels qui agissent à plusieurs niveaux afin d'adapter le programme moteur masticateur aux caractéristiques des aliments. Au niveau spinal, les corps cellulaires des afférences sensorielles et proprioceptives sont mélangés dans les ganglions des racines dorsales. Alors que, dans le système trigéminal, les somas de la grande majorité des afférences

sensorielles sont situés dans le ganglion trigéminal tandis que ceux des afférences innervant les fuseaux neuromusculaires des muscles de fermeture de la mâchoire et une sous-population de mécanorécepteurs périodontaux innervant les racines dentaires sont groupés dans le MesV au niveau du tronc cérébral (Nomura *et al.* 1985).

Les différentes afférences sensorielles du V^{ème} nerf crânien ont été revues par Lund (1991). Des mécanorécepteurs épithéliaux et en particulier les afférences primaires des poils ont été enregistrés dans les ganglions du V^{ème} nerf crânien chez le lapin. Ces afférences sont excitées pendant la mastication et ont tendance à décharger durant tout le cycle avec une fréquence proportionnelle à la vitesse du mouvement.

Les afférences périodontales mécanosensitives sont sensibles à la force ou au taux de changement de la force appliquée à la couronne de la dent. Les corps cellulaires d'environ la moitié de ces afférences se trouvent dans le ganglion trigéminal alors que l'autre est dans MesV. Elles ne projettent au periodontium qu'après la naissance (Widmer *et al.* 1998). La sensibilité de ces mécanorécepteurs dépend de leur degré d'étirement lorsqu'une pression est exercée sur les dents; c'est-à-dire, les seuils diminuent progressivement du point d'appui à l'apex (Cash et Linden 1982). Les récepteurs innervés par les afférences périodontales du MesV sont concentrés à la base des racines, tandis que ceux innervés par les afférences du ganglion sont plus nombreux au milieu des racines (Byers et Dong 1989), indiquant que le seuil d'activation des afférences du MesV est inférieur à celui des ganglions.

Des afférences innervant présumément les articulations temporomandibulaires ont été marquées dans le ganglion trigeminal suite à

l'injection d'HRP dans l'espace des joints temporomandibulaires de chats (Romfh *et al.* 1979). Ces afférences déchargent lors du déplacement de la mâchoire. Certaines codent le déplacement alors que d'autres codent la vitesse du déplacement (Lund et Matthews 1979).

Les afférences musculaires renseignent sur l'état du muscle en étant sensibles à la longueur des fibres musculaires, le taux de changement de celle-ci (afférences fusoriales) ainsi que leur niveau de tension (organes tendineux de Golgi). Elles constituent deux classes:

1. Les afférences fusoriales qui transmettent l'information potentiellement importante sur l'emplacement et le mouvement de la mandibule. Des études anatomiques (chat : Alvarado-Mallart *et al.* 1975, Nomura et Mizuno 1985, Shigenaga *et al.* 1988a; rat : Jacquin *et al.* 1983, Dessem et Taylor 1989) et électrophysiologiques (Chat: Jerge 1963b, Kidokoro *et al.* 1968a, Shigenaga *et al.* 1988a; rat : Appenteng *et al.* 1978, 1985) ont confirmé que les corps cellulaires des afférences fusoriales innervant les muscles de fermeture de la mâchoire sont placés dans le MesV. Elles sont très actives pendant la morsure volontaire, atteignant des taux de décharge de 300 Hz pendant la phase dynamique. Leur taux de décharge diminue mais est plus constant pendant la phase statique et s'élève de nouveau lorsqu'elles sont étirées pendant l'ouverture de la mâchoire.

2. Les organes tendineux de Golgi sont des récepteurs placés en série avec les fibres musculaires et leur fréquence de décharge reflète la tension musculaire. Quelques-unes de ces afférences ont été enregistrées dans le ganglion trigéminal du lapin par Lund et Matthews (1979) alors que d'autres ont été trouvées dans MesV par Larson *et al.* (1980). Elles augmentent leur fréquence de décharge pendant la fermeture de la mâchoire.

Pendant la mastication, des feedbacks positifs des fuseaux neuromusculaires des muscles de fermeture de la mâchoire ainsi que les récepteurs périodontaux augmentent la durée de décharge en bouffée des TMNs de fermeture (Lavigne *et al.* 1987, Morimoto *et al.* 1989, Hidaka *et al.* 1997) indiquant que ces deux types d'afférences projettent au NVmot. Dans une étude de double marquage impliquant l'injection d'un traceur rétrograde dans NVmot en combinaison avec l'immunohistochimie contre le glutamate et la glutaminase (l'enzyme impliquée dans la synthèse du glutamate), des cellules doublement marquées dans MesV étaient retrouvées (Turman et Chandler 1994a). Ces résultats peuvent être considérés comme un appui anatomique à des évidences électrophysiologiques d'une transmission monosynaptique excitatrice par l'entremise des récepteurs NMDA et non NMDA (Chandler 1989, Lingenhohl et Friauf 1991, Trueblood *et al.* 1996). Cependant, d'autres transmetteurs peuvent aussi jouer un rôle incluant l'acide aspartique (Coprav *et al.* 1990) et certains neuropeptides (Arvidsson *et al.* 1994, Larsen *et al.* 1997).

Pour confirmer les connexions monosynaptiques des afférences fusoriales primaires avec NVmot, des cellules dans MesV innervant les fuseaux neuromusculaires du muscle massétérin ont été identifiées électrophysiologiquement et remplies intracellulairement avec l'HRP. Leurs terminaisons axonales projetaient à la division dorsolatérale ipsilatérale du NVmot. Les terminaisons marquées ont été vues sous microscopie électronique faisant des contacts monosynaptiques avec les motoneurons de fermeture de la mâchoire (Luo *et al.* 1991, Bae *et al.* 1996). Les projections des cellules du MesV à d'autres structures du tronc cérébral ont été étudiées en les marquant antérogradement. En plus de projeter à NVmot, le

marquage était dense ipsilatéralement dans SupV, IntV, PCRt et NVsnpr (Luschei 1987, Ruggiero *et al.* 1982, Nomura et Mizuno 1985, Shigenaga *et al.* 1989, Lingenhohl et Friauf 1991).

En plus de leurs projections à NVmot et à PeriV, les afférences du MesV (fusoriales et périodontales) transfèrent leur information au cortex cérébral via le thalamus, NVsnpr, NVsp et le cervelet (Jerge 1963b; Alvarado-Mallart *et al.* 1975; Appenteng *et al.* 1978; Ruggiero *et al.* 1982; Appenteng *et al.* 1985; Rokx *et al.* 1985b, 1988; Luschei 1987; Shigenaga *et al.* 1988b; Arvidsson et Raappana 1989; Capra et Wax 1989; Dessem et Taylor 1989; Zhang *et al.* 1991; Raappana et Arvidsson 1993; Billig *et al.* 1995).

1.2.4. Réflexes de la mâchoire

Des rétroactions sensorielles faisant suite à la production d'un mouvement ont souvent tendance à déclencher des réponses réflexes. Bien que certains de ces réajustements réflexes soient potentiellement utiles, d'autres pourraient empêcher une performance motrice normale. En conséquence, les systèmes de commande motrice doivent résoudre le problème d'intégrer les réflexes utiles dans le patron de mouvement en supprimant ceux qui sont potentiellement perturbateurs. Le système masticateur est un modèle où cela arrive constamment (Lund et Olsson 1983). Les ajustements rapides du système masticateur peuvent être assurés par certains réflexes sans l'intervention des centres supérieurs (Lund et Rossignol 1980). En effet, la contraction musculaire commandée par le système de contrôle est basée sur une prédiction de la consistance de l'aliment qui n'est pas nécessairement appropriée, et, à ce moment, les mécanismes réflexes d'autorégulation doivent intervenir pour réajuster le programme masticateur (Lund et Rossignol 1980). Plus encore, les

particularités anatomiques du système bucco-facial impliquent une organisation bilatérale de ses réflexes masticateurs comme le révèlent les données neurophysiologiques (Sherrington 1927, Weijs-Boët et Van Willigen 1978) même si l'innervation motrice de la musculature orale est organisée ipsilatéralement (Batini *et al.* 1976, Limwongse et De Santis 1977, Sasamoto 1979, Rokx *et al.* 1985b).

Il existe deux principaux réflexes de la mâchoire (figure 4) : celui d'ouverture et celui de fermeture. Le réflexe d'ouverture de la mâchoire intervient surtout pour la protection des tissus mous. Pendant la phase de fermeture de la mâchoire, le ligament parodontal, la langue, les lèvres et les joues doivent être protégés contre les forces massives qui peuvent être générées. Toute stimulation douloureuse de ces tissus engendrera un réflexe d'ouverture de la bouche (Kidokoro *et al.* 1968a). Ce même réflexe peut être déclenché également par une augmentation de la pression sur une dent. Par exemple, un morceau d'os dans la nourriture qui serait pris entre deux dents peut augmenter significativement la pression exercée localement. Par son rôle protecteur, ce réflexe d'ouverture s'apparente au réflexe de retrait des membres. (Lund et Rossignol 1980).

Une voie fondamentale impliquée dans la mastication a été identifiée par Sherrington (1927) qui a montré que les muscles de la fermeture de la mâchoire montrent un réflexe d'étirement et aussi par Harrison et Corbin (1942) qui ont interrompu ce réflexe avec des lésions des axones des cellules du MesV. Ce réflexe d'étirement a été identifié anatomiquement par Szentagothai (1948) et physiologiquement par Hugelin et Bonvallet (1957) comme étant le réflexe monosynaptique de fermeture de la mâchoire. Ce réflexe myotatique d'étirement existe seulement pour les muscles de fermeture puisqu'ils sont les seuls à contenir

des fuseaux neuromusculaires. Comme pour les réflexes myotatiques des membres, ce circuit est monosynaptique car la stimulation des terminaisons primaires des fuseaux neuromusculaires excite directement les motoneurones des muscles de fermeture de la mâchoire (Kidokoro *et al.* 1968a). Si la mâchoire est ouverte brusquement en tapant le menton, on enregistre une décharge synchrone dans les muscles de fermeture ce qui entraîne une augmentation de la tension et une fermeture rapide de la mâchoire. Le rôle principal d'un tel réflexe peut être la régulation de la position de repos de la mâchoire en position fermée (Lund et Rossignol 1980, Lund et Olsson 1983). Une autre implication envisagée sera d'assister la force de morsure.

Donc, les rôles des réflexes de la mâchoire changent avec les buts de l'organisme afin d'aider dans l'ajustement de la commande motrice en fonction de la consistance des aliments. Ces réflexes jouent aussi un rôle protecteur des tissus mous.

Tiré de Lund et Olsson 1983

Réflexe monosynaptique de fermeture de la mâchoire

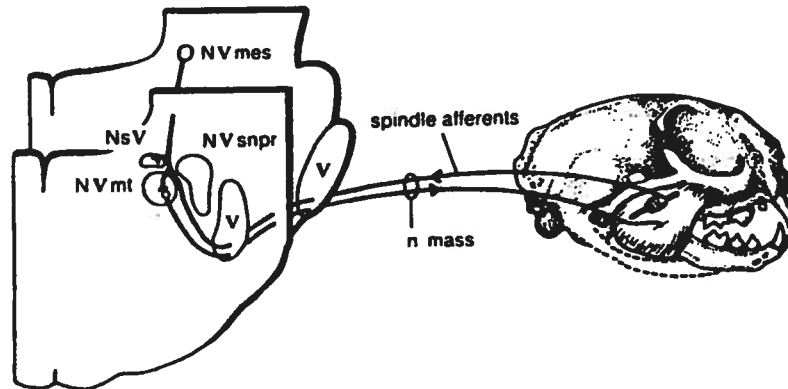
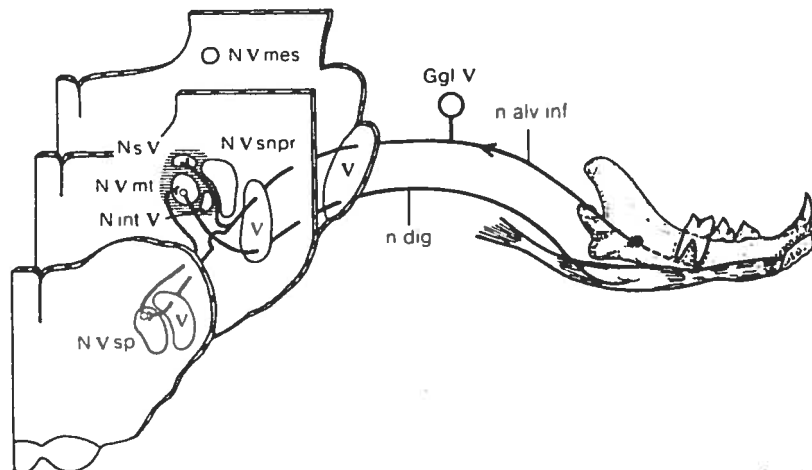


Diagramme illustrant le réflexe myotatique de fermeture de la mâchoire. À gauche, deux sections transversales du tronc cérébral prises au niveau du noyau muencephalique (NV mes) et le noyaux moteur trigéminal (NV mt), respectivement. Le nerf trigéminal (V) et le noyau trigéminal sensoriel principal (NV snpr) sont indiqués. À droite, les afférences (groupes I et II) des fuseaux musculaires du masséter voyagent dans la racine motrice. Ils forment des collatérales axonales qui se terminent sur les motoneurones massétéris dans la partie ventrolatérale de NV mt. Une autre collatérale fait contact avec les interneurones dans la région juste rostro-dorsale de NVmt, c'est-à-dire le noyau supratrigéminal (NsV). L'axone efférent (moteur) innerve le muscle en voyageant par la racine motrice et le nerf massétérin (n mass). Notez que les corps cellulaires des afférences fusoriales ont leurs corps cellulaires dans NV mes.

Réflexe disynaptique d'ouverture de la mâchoire



Organisation du réflexe d'ouverture de la mâchoire. Une section du tronc cérébral au niveau du noyau spinal trigéminal (NV sp) a été ajoutée au diagramme précédent. La région d'interneurones entourant le noyau moteur trigéminal (NV mt) inclut les noyaux supratrigéminal (NsV) et intertrigéminal (NintV). Le réflexe est évoqué par la stimulation des récepteurs dans le ligament periodontal. Les fibres afférentes qui voyagent dans le nerf dentaire inférieur (n alv inf) ont leurs corps cellulaires dans le ganglion trigéminal (GglV). Le prolongement central voyage dans le tractus spinal trigéminal (V) pour faire synapse sur un interneurone de NVsp qui va activer, à son tour, les motoneurones innervant le digastrique. Les axones efférents (moteurs) voyagent dans le nerf digastrique (n dig). Notez la branche collatérale afférente qui va activer les interneurones dans NsV qui causent l'inhibition disynaptique des motoneurones des muscles de fermeture de la mâchoire.

1.2.5. Contrôle moteur des muscles masticateurs

1.2.5.1. Noyau moteur du trijumeau

Les motoneurones crâniens ne sont pas organisés dans une colonne continue comme dans la moelle épinière, mais sous forme de noyaux distincts dans le tronc cérébral (figure 2) avec une organisation somatotopique intrinsèque. Chez le chat (Batini *et al.* 1976) et le rat (Card *et al.* 1986), le NVmot du V^{ème} nerf crânien s'étend de la partie extrêmement caudale du locus coeruleus au pôle rostral du noyau abducens. Il est médian au NVsnpr et ventrolatéral au locus coeruleus et au MesV. Le noyau est grossièrement de forme ovoïde, ayant un volume total d'un peu plus que 1 mm³. Le premier marquage rétrograde des motoneurones massétéris apparaît au dixième jour de gestation chez la souris (Widmer *et al.* 1998). Les axones trigéminaux sont présents avant tout signe détectable de formation des dents (Norsrat *et al.* 2001). Par la suite, la différenciation des éléments du nerf trigéminal liés à la mastication est accélérée après la naissance (Kubota *et al.* 1988).

Il est maintenant bien établi, grâce aux injections du traceur rétrograde HRP dans différents muscles de la mâchoire, que ces muscles sont représentés d'une façon musculotopique qui est considérablement conservée à travers plusieurs espèces: chat (Batini *et al.* 1976, Landgren et Olsson 1976), lapin (Matsuda *et al.* 1978), rat (Limwongse et DeSantis 1977; Mizuno *et al.* 1975, 1980) et cochon d'inde (Uemura-Sumi *et al.* 1982). Les motoneurones innervant les muscles de fermeture de mâchoire sont localisés dans la division dorsolatérale et occupent les deux tiers les plus rostraux du NVmot; alors que les motoneurones des muscles d'ouverture sont ventromédiaux dans les deux tiers les plus caudaux de NVmot (figure 1C).

La trajectoire axonale des motoneurones innervant les muscles de la mâchoire a été examinée par des études de traçage neuronale (Nomura et Mizuno 1983, Friauf 1986, Shigenaga *et al.* 1988a, Lingenhohl et Friauf 1991) qui démontrent une différence dans le parcours axonal des deux populations des TMNs. Les axones des TMNs d'ouverture forment une longue boucle d'abord dorsalement et un genou près de la ligne médiane sous le quatrième ventricule avant de courber ventrolatéralement vers le V^{ème} nerf crânien, alors que les axones des TMNs de fermeture passent immédiatement ventrolatéralement suivant des lignes presque droites pour aller rejoindre la racine motrice par la voie la plus courte. Contrairement à d'autres motoneurones crâniens (Friauf et Baker 1985, Highstein *et al.* 1982, Mosfeldt Laursen et Reckling 1989) et aux motoneurones alpha spinaux qui montrent une vaste collatéralisation de leurs axones (Cullheim *et al.* 1978), aucune collatérale n'a été vue émanant des axones des TMNs (Shigenaga *et al.* 1988a).

Comme tous les motoneurones, les TMNs sont cholinergiques. Ceci était bien démontré dans trois études anatomiques: la première où la distribution cellulaire de l'ARNm de la choline acétyltransferase (ChAT) dans le système nerveux central du rat a été évaluée en utilisant l'hybridation *in situ* (Lauterborn *et al.* 1993); les deux autres où les structures cholinergiques dans les noyaux moteurs des nerfs crâniens du singe ainsi que dans NVmot chez le lapin ont été examinées immunohistochimiquement avec un anticorps contre la ChAT (Ichikawa et Shimizu 1998, Saad *et al.* 1999). Les trois études montraient des réactions positives très denses dans NVmot.

Il existe deux types majeurs de motoneurones: les fusimoteurs (γ) innervant les parties contractiles des fibres intrafusales des muscles et les motoneurones alpha (α) innervant les fibres musculaires extrafusales et qui, donc contrôlent directement la contraction du muscle. On présume que les motoneurones α et γ sont co-activés pendant des contractions musculaires, permettant ainsi aux fuseaux neuromusculaires de maintenir leur sensibilité suite à l'application de perturbations. Si l'output γ est assez grand pour maintenir ou augmenter l'activité des afférences fusoriales, le motoneurone α peut être contrôlé par un mécanisme de servoassistance (Stein 1974). La coactivation α - γ se produit pendant la locomotion (Severin *et al.* 1967, Sjostrom et Zangger 1975) et la respiration (Sears 1964) chez le chat.

En utilisant l'imprégnation de Golgi et la microscopie électronique chez le rat, deux types de neurones morphologiquement distincts sont évidents dans NVmot: de grands neurones multipolaires et de petits neurones fusiformes correspondant aux motoneurones α et γ respectivement (Card *et al.* 1986). Chez le rat, une distribution de taille bimodale des TMNs massétéris permet la distinction des grands motoneurones α des petits motoneurones γ (Limwongse et De Santis 1977, Rokx *et al.* 1987) conformément aux données sur les motoneurones spinaux chez le chat (Bryan *et al.* 1972, Strick *et al.* 1976, Burke *et al.* 1977, Johnson 1986, Horcholle-Bossavit *et al.* 1988, Hoover et Burkovic 1991, Destombes *et al.* 1992). Cependant, cette distinction bimodale ne semble pas être présente dans d'autres espèces que chez le rat. Par exemple, la taille somatique des TMNs de fermeture de la mâchoire ne montre pas une nette distribution bimodale chez le chat (Yoshida *et al.* 2001). De même que la taille neuronale dans NVmot de l'opossum varie sur un grand intervalle sans séparations définissables (Hamos et King 1980). Dans tous les cas, les petits

motoneurones semblent être associés aux fibres musculaires à conduction lente (Mizuno *et al.* 1975, Strick *et al.* 1976). Le masséter contient seulement très peu de fibres de ce type (Rokx *et al.* 1984). Les tailles des motoneurones digastriques chez le rat sont unimodalement distribués à l'intérieur d'un petit intervalle (Jacquin *et al.* 1983, Limwongse et DeSantis 1977, Rokx *et al.* 1984). Donc, il semble plus probable que les petits motoneurones sont ceux qui innervent les fibres intrafusales des muscles masticateurs. Cet argument est soutenu par la corrélation observée entre les petits motoneurones dans la moelle épinière lombaire et les fuseaux neuromusculaires dans les muscles gastrocnemius et soleus du chat (Bryan *et al.* 1972). De plus, cette hypothèse est soutenue par l'observation d'une corrélation positive entre le nombre des neurones mésencéphaliques trigéminaux et le nombre des petits motoneurones (Rokx *et al.* 1987).

1.2.5.2. Motoneurones alpha

Les TMNs- α , constituent le type cellulaire le plus commun dans NVmot et sont distribués uniformément partout dans le noyau (Card *et al.* 1986). Lorsque remplis par des traceurs, ces TMNs- α dévoilent une morphologie très élaborée. Ce sont de grands neurones multipolaires de forme polygonale pyramidale, ou ellipsoïde (Rokx *et al.* 1985b, Lingenhohl et Friauf 1991, Bae *et al.* 2002). Ils sont les plus grands des motoneurones crâniens puisque leur taille dépasse celle des motoneurones faciaux (Friauf 1986), des motoneurones innervant les muscles de l'oreille moyenne (Friauf *et al.* 1985) ou celle des motoneurones innervant la langue (Mosfeldt Laursen et Reckling 1989). Indépendamment de l'espèce, le nombre de dendrites primaires varie entre 6 et 11. Ces derniers bifurquent plusieurs fois formant un arbre dendritique circulaire très développé (Yoshida *et al.* 1987, Lingenhohl et Friauf

1991, Bae *et al.* 2002). Les dendrites de ces motoneurones s'étendent sur une vaste étendue pour atteindre MesV, PeriV, NVsnpr et la racine motrice du nerf facial. Comme nous l'exposerons plus loin, les TMNs- α reçoivent des inputs synaptiques de diverses régions et leur arbre dendritique étendue donne une surface énorme pour recevoir ces contacts (Mong *et al.* 1988). Il est donc possible qu'une vaste distribution dendritique soit nécessaire pour collecter les inputs synaptiques indispensables pour les fonctions de NVmot.

1.2.5.3. Motoneurones gamma

La deuxième classe principale de neurones dans le pool massétéren de NVmot, les TMNs- γ , consiste en de petites cellules fusiformes qui sont significativement plus petites que les autres motoneurones dans le noyau (Mizuno *et al.* 1975; Rokx *et al.* 1984, 1985b; Card *et al.* 1986; Bae *et al.* 2002) et comme c'est le cas dans les noyaux moteurs spinaux (Bryan *et al.* 1972, Strick *et al.* 1976). Ces TMNs- γ ont peu de dendrites primaires (Bae *et al.* 2002). Ceci est compréhensible puisqu'il y a une corrélation entre le nombre de dendrites principaux et le diamètre cellulaire des motoneurones α et γ spinaux (Ulfake et Kellerth 1981).

Chez le rat (Rokx *et al.* 1985b) et le chat (Sessle *et al.* 1977a), les TMNs- γ constituent environ 30 % des motoneurones dans NVmot. Comme c'est le cas au niveau spinal où les motoneurones α et γ sont mélangés dans les noyaux moteurs de leurs muscles spécifiques (Bryan *et al.* 1972), les TMNs- α et TMNs- γ sont généralement mélangés dans NVmot (Sessle *et al.* 1977a, Rokx *et al.* 1985b). Cependant, on a aussi rapporté l'existence d'amas de TMNs- γ regroupés ensemble chez le chat (Sessle *et al.* 1977) et placés principalement à la périphérie du NVmot chez le rat (Card *et al.* 1986). Chez le lapin, de petits motoneurones fusiformes

placés ventrolatéralement au NVmot, dans le groupe de cellules k innervent aussi le masséter et peuvent constituer des TMNs- γ (Saad *et al.* 1997, Donga *et al.* 1992). Ces neurones du groupe de cellules k sont cholinergiques parce qu'ils réagissent fortement aux anticorps contre la ChAT (Saad *et al.* 1999). De plus, le tenseur tympani (muscle de l'oreille) est innervé par les neurones du groupe k chez le chat, le porc (Mizuno *et al.* 1982a), le rat (Spangler *et al.* 1982), le lapin (Takahashi *et al.* 1984) et le singe (Gannon et Eden 1987).

Chez le rat, les TMNs- γ reçoivent seulement quelques contacts axosomatiques contrairement aux TMNs- α (Card *et al.* 1986). Le même phénomène se produit au niveau spinal chez le chat où très peu de boutons synaptiques sont vus en contact avec les motoneurones γ et où la fréquence synaptique sur les compartiments somatiques des motoneurones α était trois fois celle des motoneurones γ (Destombes *et al.* 1992). D'ailleurs, on a réussi à démontrer la présence moins fréquente des boutons glycinergiques sur les TMNs- γ par rapport aux TMNs- α chez le rat (Bae *et al.* 2002) ce qui est compatible avec des données immunocytochimiques sur la distribution de la gephyrin, la protéine associée au récepteur de la glycine (Kirsch *et al.* 1991, 1993). Cette protéine est plus abondante à la surface des motoneurones α que γ dans la moelle épinière lombaire du chat (Alvarez *et al.* 1997).

Les TMNs- γ massétéris se distinguent des TMNs- α également par l'absence d'un lien monosynaptique avec les afférences primaires fusoriales dans MesV (Eccles *et al.* 1960, Sessle 1977a). Comme leurs homologues spinaux (Bryan *et al.* 1972), les TMNs- γ et TMNs- α diffèrent qualitativement aussi par d'autres points: une vitesse de conduction plus lente (ainsi une latence antidromique plus longue) et un

seuil plus haut pour l'activation antidromique des TMNs- γ (Sessle 1977a, Lund *et al.* 1979). Il n'y a eu, malheureusement, aucune étude d'enregistrement intracellulaire des TMNs- γ . Cependant des enregistrements extracellulaires effectués chez le chat (Sessle 1977a) et le singe (Lund *et al.* 1979) montraient souvent des périodes d'activité tonique dans ces neurones.

1.2.5.4. Activité électrophysiologique des motoneurones

Des enregistrements intracellulaires de l'activité rythmique des TMNs chez le chat (Nakamura et Kubo 1978, Kubo *et al.* 1981) et le cochon d'Inde (Chandler et Goldberg 1982) démontrent d'importantes différences dans les inputs du GPC aux motoneurones de fermeture et d'ouverture de la mâchoire pendant la mastication fictive évoquée par la stimulation corticale. Dans les TMNs de fermeture, une alternance rythmique de potentiels postsynaptiques dépolarisants (PPSEs) et hyperpolarisants (PPSIs) coïncidant avec les phases de fermeture et d'ouverture de la mâchoire respectivement est observée. Les PPSEs rythmiques sont d'habitude trop petits pour causer une décharge. Néanmoins, quand les TMNs massétéris déchargent, ils le font à des fréquences pouvant aller jusqu'à 60 Hz (Nakamura et Kubo 1978, Kubo *et al.* 1981) et, quand des rétroactions sensorielles sont ajoutées, ils semblent être capable de décharger à des taux plus élevés (Goldberg et Tal 1978). Les PPSIs, quant à eux, sont axo-somatiques parce qu'ils sont facilement renversés par des injections intracellulaires de Cl^- (Nakamura et Kubo 1978, Chandler et Goldberg 1982). Au contraire, les TMNs d'ouverture de la mâchoire ne montrent que des potentiels dépolarisants rythmiques (Sessle *et al.* 1977b) chevauchés de bouffées de potentiels d'action qui coïncident avec la phase d'ouverture de la mâchoire.

1.2.5.5. Inputs synaptiques

La majorité des animaux utilisent leur mâchoire aussi bien pour des mouvements délicats comme le simple geste de prendre soin de leurs corps ou bien comme un organe de préhension pour transporter leurs bébés que pour des comportements agressifs pour combattre ou mordre. Pour effectuer cette gamme de comportements radicalement différents, l'excitabilité des TMNs est modulée par une variété de neuromodulateurs qui sont le sujet de nombreuses études morphologiques et électrophysiologiques. La liste des substances neuroactives dans des synapses en contact avec les TMNs inclut des acides aminés, des amines biogènes, de l'acétylcholine et des neuropeptides (Bae *et al.* 1999; Del Negro et Chandler 1998; Hsiao *et al.* 1997; Yang *et al.* 1997a,b).

NVmot reçoit des inputs synaptiques de diverses régions : du cortex (Travers et Norgren 1983, Vornov et Sutin 1983), de l'aire tegmentaire latérale (Vornov et Sutin 1983), du noyau rouge (Travers et Norgren 1983), du noyau subcoeruleus (Fay et Norgren 1997a), du MesV (Mizuno *et al.* 1983, Travers et Norgren 1983, Kamogawa *et al.* 1998, Yabuta *et al.* 1996), du NVmot contralatéral (Mizuno *et al.* 1983, Travers et Norgren 1983, Ter Horst *et al.* 1990, Jüch *et al.* 1993, Kolta 1997, Petropoulos *et al.* 1999, Kolta *et al.* 2000), de la division pallidus-obscurus du raphé (Vornov et Sutin 1983, Nagase *et al.* 1997), du NVsnpr (Mizuno *et al.* 1983, Fay et Norgren 1997a, Kolta *et al.* 2000), de SupV bilatéralement (Mizuno *et al.* 1978), du PCRt bilatéralement (Mizuno *et al.* 1983), d'IntV, de mPeriV, et du nVsp (Mizuno *et al.* 1983, Travers et Norgren 1983, Vornov et Sutin 1983, Li *et al.* 1996, Fay et Norgren 1997a).

Un sous-groupe de neurones du raphé dorsal décharge pendant la mastication (Fornal *et al.* 1996) et, chez le chat, la stimulation électrique de ce noyau produit des PPSEs à une latence monosynaptique dans les TMNs masséterins (Nagase *et al.* 1997). Ce noyau contient des neurones 5-HT projetant aux NVmot (Li *et al.* 1993). En effet, les TMNs reçoivent un input sérotoninergique dense et expriment plusieurs sous-types de récepteurs de la 5-HT (Saha *et al.* 1991a, Kolta *et al.* 1993, Manaker *et al.* 1998, Nagase *et al.* 1997). Lorsque appliquée dans le bain in vitro, la 5-HT augmente l'excitabilité des TMNs (Hsiao *et al.* 1997, 1998) et cause une dépolarisation membranaire, une résistance d'entrée accrue et une suppression de l'amplitude de l'après-hyperpolarisation (AHP) dans la plus part de ces cellules (Inoue *et al.* 1999). Également, l'application de la sérotonine conduit à une bistabilité membranaire qui favorise une décharge en bouffée des TMNs (Hsiao *et al.* 1998). Dans ces derniers, (Hsiao *et al.* 1998) ainsi que dans les motoneurones spinaux (Hounsgaard 1988, Kiehn 1991, Kiehn *et al.* 1996), ce type de décharge est important puisqu'il peut amplifier l'output motoneuronal en absence d'excitation synaptique maintenue.

Le noyau du raphé contient aussi des pré-motoneurones qui sont immunoréactifs à la substance P ou à la Met-enkephaline et qui projettent à NVmot (Fort *et al.* 1990).

Les TMNs expriment sur leur surface des récepteurs glutamatergiques (Turman *et al.* 2000, 2001) et reçoivent des inputs glutamatergiques (Turman et Chandler 1994a). Chandler (1989) a effectué des expériences visant à examiner le rôle d'acides aminés excitateurs dans la transmission synaptique entre les afférences de MesV et les motoneurones de fermeture de la mâchoire. Ses résultats démontrent que le potentiel de champs enregistré dans NVmot, induit monosynaptiquement par

la stimulation de MesV, était bloqué par des antagonistes des récepteurs glutamatergiques ionotropiques NMDA et non-NMDA.

Des synapses inhibitrices sur le soma des TMNs peuvent être divisées en trois populations selon qu'elles contiennent la glycine, du GABA ou les deux (Bae *et al.* 2002). La glycine et le GABA sont fréquemment co-localisés dans des terminaisons axonales sur les TMNs (Yang *et al.* 1997a; Bae *et al.* 1999, 2002; Shigenaga *et al.* 2000). Ces données corroborent des observations précédentes sur des motoneurones spinaux (Örnung *et al.* 1996).

Des boutons synaptiques glycinergiques semblent être plus fréquents sur les TMNs que les boutons GABAergiques (Bae *et al.* 2002, Yang *et al.* 1997a, Shigenaga *et al.* 2000). Les récepteurs à la glycine ont été localisés par Araki *et al.* (1988) dans tous les noyaux moteurs crâniens; parmi ceux-ci, les TMNs avaient la plus haute densité de récepteurs. Des expériences d'hybridation in situ démontrent que les neurones de NVmot expriment fortement la sous-unité alpha du récepteur à la glycine, suggérant que le récepteur soit présent pour la neurotransmission (Sato *et al.* 1991).

Une étude combinant une réaction immunohistochimique contre le GABA avec un traçage rétrograde des TMNs de fermeture de la mâchoire montre que 28% de toutes les synapses dans le NVmot implique des boutons GABA-immunoréactifs (Saha *et al.* 1991b). Des expériences d'hybridation in situ ont localisé la sous-unité alpha1 du récepteur GABA_A sur les TMNs (Hironaka *et al.* 1990).

1.2.6. Les interneurones de la région péri-trigéminal

La région péri-trigéminal (PeriV) située dans la formation réticulée latérale et entourant NVmot regroupe quatre subdivisions (figure 5A): dorsalement, la région

supra-trigéminal (SupV); latéralement, la région inter-trigéminal (IntV); médialement, la région péri-trigéminal médiane (mPeriV) et ventralement, la formation réticulée parvocellulaire (PCRt). Il faut noter, cependant, que ces régions constituent un système continu d'interneurones intercalé entre NVmot et le noyau moteur facial (Kuypers 1958a, Mizuno 1970, Torvik 1956), qui ne diffèrent pas entre eux de façon cytoarchitecturale (Mizuno 1970). Les ressemblances entre ces régions s'étendent au-delà de leur cytoarchitecture. Leurs caractéristiques électrophysiologiques de base et leurs propriétés intrinsèques sont relativement uniformes et, par leurs interconnexions monosynaptiques, ils forment un réseau robuste où les inputs entrants sont rapidement distribués (Bourque et Kolta 2001, figure 5B). La fiabilité de la transmission dans ce réseau assure, donc, que certains inputs parvenant à un sous-groupe d'interneurones atteindront rapidement toutes les autres fractions.

1.2.6.1. Inputs synaptiques

Les neurones de PeriV et de NVsnpr reçoivent des inputs directs des cortex sensoriel et moteur (Kuypers 1958a, b; Wold et Brodal 1973; Mizuno *et al.* 1968; Travers et Norgren 1983; Yasui *et al.* 1985). Les neurones de ces régions répondent avec de courtes latences à la stimulation corticale (Darian-Smith et Yokota 1966, Nakamura *et al.* 1973, Nozaki *et al.* 1983, Olsson *et al.* 1986, Donga *et al.* 1991). Aussi, chez le rat, des injections d'HRP faites dans l'amygdala indiquent que SupV reçoit ipsilatéralement des fibres de cette région (Takeuchi *et al.* 1988).

En plus des inputs centraux, NVsnpr et PeriV reçoivent des inputs périphériques (Fay et Norgren 1997a,b,c). Des enregistrements extracellulaires et intracellulaires des neurones de ces régions montrent un afflux afférent suite à la

stimulation des nerfs alvéolaire, lingual, hypoglosse, masséter et digastrique (Minkels *et al.* 1995, Gura *et al.* 1972, Kamogawa *et al.* 1988). Des champs récepteurs périphériques ont été trouvés dans la cavité buccale, les ligaments périodontaux, la langue et les vibrisses (Olsson *et al.* 1986, Inoue *et al.* 2002).

De nombreuses études de traçage intracellulaire (Appenteng *et al.* 1985, Rokx *et al.* 1986, Luschei *et al.* 1987, Takemura *et al.* 1987, Dessem et Taylor 1989, Lingenhohl et Friauf 1991, Luo et Dessem 1995, Yabuta *et al.* 1996) ont démontré que les afférences primaires fusoriales ont aussi des terminaisons dans PeriV et NVsnpr. Les afférences périodontales du MesV ont aussi une projection à PeriV et NVsnpr qui a été démontrée par des injections de traceurs rétrogrades dans les ligaments périodontaux (Gottlieb *et al.* 1984, Takemura *et al.* 1987, Shigenaga *et al.* 1989, Bae *et al.* 1997).

De plus, les neurones enregistrés dans PeriV répondent par des PPSIs et PPSEs à courte latence à la stimulation des zones adjacentes de PeriV et de NVmot (Bourque et Kolta 2001).

1.2.6.2. Outputs synaptiques

Les interneurones trigéminaux projettent aux noyaux moteurs du V, VII et XII (Holstege et Kuypers 1977, Holstege *et al.* 1977, Mizuno *et al.* 1983, Landgren *et al.* 1986, Nozaki *et al.* 1983, Travers et Norgren 1983, Rokx *et al.* 1986). En effet, les pré-motoneurones de PeriV et de NVsnpr fournissent un input monosynaptique direct au noyau facial (NVIIImot; Minkels *et al.* 1991, Fay et Norgren 1997b) et au noyau hypoglosse (NXIIImot; Fay et Norgren 1997c, Luo *et al.* 2001) comme le montrent des études de traçage rétrograde à partir des muscles faciaux et de la langue ainsi qu'antérograde à partir de ces noyaux réticulés.

De nombreuses études anatomiques et physiologiques montrent que beaucoup de cellules de PeriV projettent au NVmot ipsilatéral et un certain nombre au noyau contralatéral (Jerge *et al.* 1963a, Goldberg et Nakamura 1968, Kidokoro *et al.* 1968b, Takata *et al.* 1970, Desmond *et al.* 1983, Ohta *et al.* 1986, Rokx *et al.* 1986, Appenteng *et al.* 1990, Donga et Lund 1991, Li *et al.* 1995, Minkels *et al.* 1995, Kolta *et al.* 2000). Des études combinant le traçage rétrograde des TMNs au marquage antérograde des neurones de PeriV ont démontré que la connexion entre les deux est monosynaptique chez plusieurs espèces (Mogoseanu *et al.* 1993; Minkels *et al.* 1991; Takeuchi *et al.* 1988; Travers et Norgren 1983; Kamogawa *et al.* 1988; Mizuno *et al.* 1983; Rokx *et al.* 1986, 1988). Ceci est corroboré par les études électrophysiologiques rapportant l'activation antidromique des différentes parties de PeriV suite à la stimulation de NVmot et aussi l'obtention de réponses synaptiques à courte latence dans les TMNs suite à la stimulation électrique de ces pré-motoneurones (Kidokoro *et al.* 1968b, Gura *et al.* 1972, Kamogawa *et al.* 1988, Donga et Lund 1991, Minkels *et al.* 1995, Kolta 1997, Bourque et Kolta 2001).

D'autres études neuroanatomiques nous indiquent que PCRt et SupV ont des connexions efférentes vers le MesV (Rokx *et al.* 1986, 1988; Minkels *et al.* 1991; Ter Horst *et al.* 1991), vers le NVII mot et le NXII mot (Rokx *et al.* 1986, Luo *et al.* 2001a, Popratiloff *et al.* 2001). PCRt projette également au nPC (Fort *et al.* 1994), au cervelet et au thalamus (Minkels *et al.* 1991)

1.2.6.3. Morphologie et électrophysiologie

Les interneurones de dernier ordre semblent former une colonne entourant NVmot et le longeant latéralement. On les retrouve principalement dans la région péri-trigeminale et les noyaux sensoriels principal et spinal (Mizuno *et al.* 1983,

Travers et Norgren 1983, Vornov et Sutin 1983, Appenteng *et al.* 1987). Les pré-motoneurones dans PeriV, lorsque marqués rétrogradement par des injections d'HRP dans le NVmot chez le chat (Mizuno *et al.* 1983) ou remplis intracellulairement avec de la neurobiotine chez le rat (Bourque et Kolta 2001) étaient de taille petite à moyenne, fusiformes ou triangulaires, avec des dendrites qui s'étendent horizontalement mais généralement limités dans leur subdivision.

L'examen des propriétés intrinsèques des neurones de PeriV indique qu'ils forment un réseau assez uniforme. Trois types de neurones ont été identifiés sur la base de leurs propriétés d'adaptation et seulement 5 % des neurones de PeriV semblent capables de générer une activité rythmique par leurs propriétés intrinsèques (Bourque et Kolta 2001). Par contre, environ la moitié des neurones du NVsnpr ont de telles propriétés chez la gerbille (Sandler *et al.* 1998). Un tel comportement est plus compatible avec un rôle de génération du rythme masticatoire qu'avec la transmission passive d'information sensorielle. De plus, les neurones du NVsnpr changent leur patron de décharge pendant la mastication fictive induite par la stimulation répétitive du cortex sensorimoteur chez le lapin: la décharge était augmentée toniquement dans certains tandis que d'autres déchargeaient en bouffée en phase avec l'ouverture ou la fermeture de la mâchoire durant la mastication fictive (Tsuboi *et al.* 2003). Ces faits suggèrent que les neurones du NVsnpr, via leurs propriétés de décharge en bouffée, peuvent former le cœur du GPC de la mastication responsable tant pour la génération du rythme que pour la décharge en bouffée des TMNs (Tsuboi *et al.* 2003).

1.2.6.4. Nature neurochimique

La distribution des pré-motoneurones inhibiteurs et excitateurs a été examinée par une série d'expériences de double marquage combinant une injection d'un traceur axonal rétrograde dans NVmot avec des méthodes immunohistochimiques contre la glycine, le GABA, la GAD (acide glutamique décarboxylase, l'enzyme impliquée dans la synthèse du GABA), la glutaminase ou le glutamate. Le NVsnpr ainsi que les différentes parties de PeriV contenaient des pré-motoneurones marqués de façon rétrograde et immunoréactifs au glutamate, à la glutaminase, à la glycine, au GABA et à la GAD (Turman et Chandler 1994a, b; Kolta *et al.* 2000, Li *et al.* 1996, Rampon *et al.* 1996a). La distribution des neurones GABAergiques dans les noyaux trigéminaux chez le rat a également été confirmée par une simple étude immunohistochimique en utilisant un anticorps spécifique au GABA (Ginestal *et al.* 1993). De plus, Li et ses collaborateurs (2002) ont trouvé des terminaisons axonales où sont co-localisés le GABA et la glycine qui proviennent de quelques pré-motoneurones dans SupV.

Toutes ces études neuroanatomiques sont en accord parfait avec certaines données électrophysiologiques. Par exemple, la stimulation de PeriV a évoqué des potentiels post-synaptiques excitateurs et inhibiteurs sensibles à des antagonistes des récepteurs glutamatergiques, GABAergiques et glycinergiques dans les TMNs et les interneurones des régions adjacentes (Kolta 1997, Bourque et Kolta 2001). Des évidences indirectes indiquaient aussi que les neurones dans ces régions ont des effets inhibiteurs sur l'activité des TMNs du masséter (Kidokoro *et al.* 1968b, Nakamura et Kubo 1978).

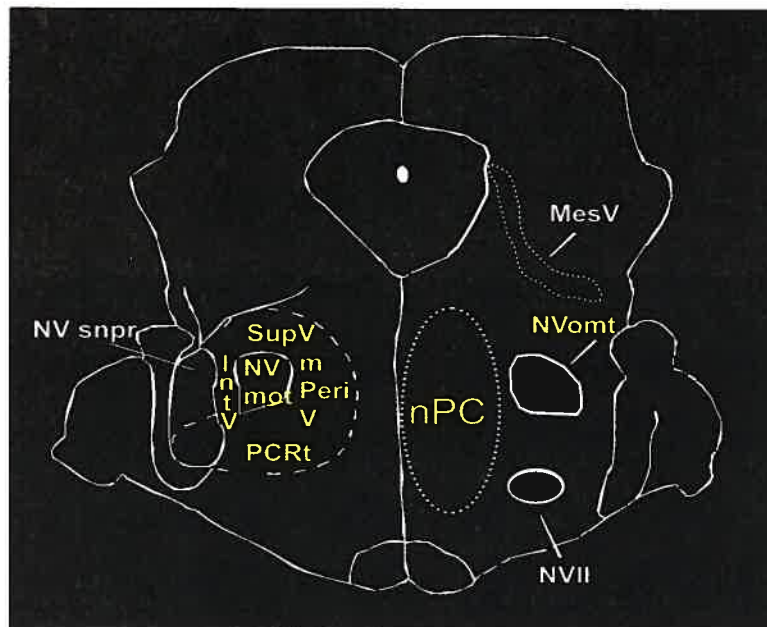
1.2.6.4. Rôle fonctionnel

Les interneurones de dernier ordre situés dans la région entourant NVmot semblent jouer un rôle clef dans la circuiterie neuronale du tronc cérébral produisant les mouvements et les réflexes de la mâchoire. Ces interneurones reçoivent une variété d'inputs périphériques et projettent aux TMNs. Certains d'entre eux sont impliqués dans le réflexe disynaptique d'ouverture de la mâchoire et inhibent les motoneurones de fermeture (Goldberg et Nakamura 1968, Nakamura *et al.* 1973, Kamogawa *et al.* 1988, Kidokoro *et al.* 1968a, Minkels *et al.* 1995). Des études électrophysiologiques ont également suggéré que l'inhibition des TMNs de fermeture pendant le réflexe d'ouverture de la mâchoire est obtenue par l'intermédiaire des pré-motoneurones utilisant le GABA et la glycine (Chandler *et al.* 1985, Enomoto *et al.* 1987, Goldberg et Nakamura 1968, Kidokoro *et al.* 1968b, Nakamura *et al.* 1978). Une preuve anatomique de l'implication de ces pré-motoneurones dans les réflexes de la mâchoire était obtenue lors d'injection d'HRP dans le muscle du masséter. Les interneurones étaient marqués d'une façon transneuronal à la fois rétrogradement à partir des motoneurones dans NVmot et antérogradement à partir des afférences primaires dans MesV (Appenteng *et al.* 1987).

Finalement, ces interneurones pré-moteurs semblent jouer un rôle important dans la genèse de la mastication. Des neurones actifs de façon rythmique, en phase avec le patron moteur de la mastication ont été trouvés dans PeriV et NVsnpr pendant la mastication fictive par Westberg *et al.* (1998). Ces auteurs ont postulé que le patron masticatoire serait réorganisé en ajoutant et éliminant certains éléments neuronaux afin de moduler l'output des TMNs.

Figure 5

A.



Légende:

NVmot: noyau moteur trigéminale

MesV: noyau mésencéphalique du trijumeau

SupV: région supra-trigéminal

PCRt: formation réticulée parvocellulaire

IntV: région intertrigéminal

mPeriV: région péri-trigéminal médiane

NVsnpr: noyau principal sensoriel

NVII: noyau facial

nPC: noyau pontis caudalis

Représentation d'une tranche transverse du tronc cérébral au niveau du noyau moteur du trijumeau

B. Tiré de Bourque et Kolta 2001

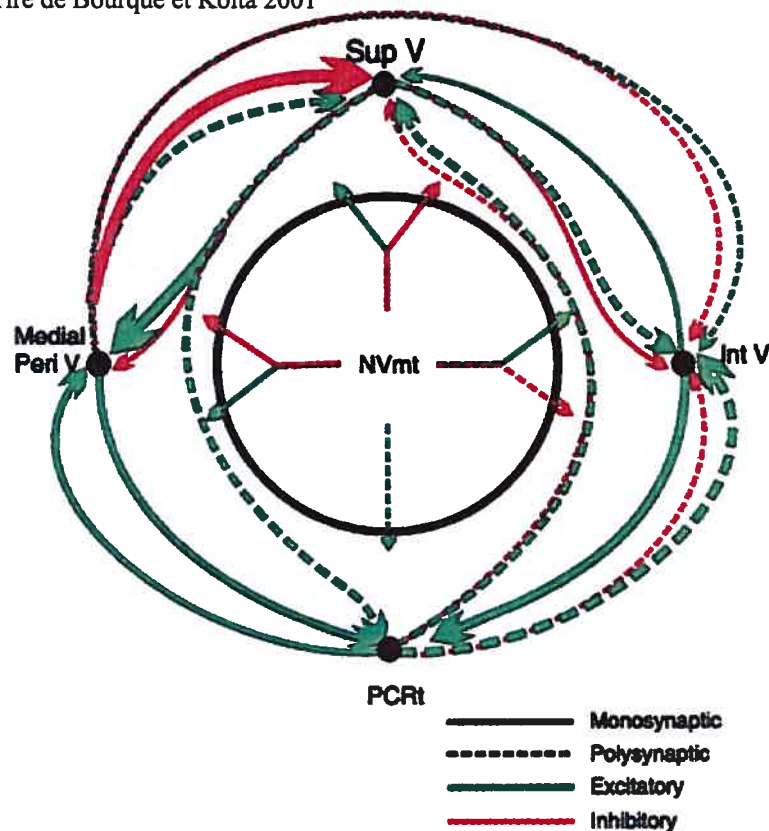


Schéma des connexions entre les différents neurones formant PeriV. Des flèches solides représentent des connexions monosynaptiques, tandis que les flèches pointillées représentent des connexions disynaptiques et oligosynaptiques. En rouge, les inputs excitateurs alors qu'en vert les inhibiteurs.

1.3. Évidences de l'existence des interneurons dans NVmot

Des études anatomiques et électrophysiologiques antérieures ont suggéré l'existence d'une population d'interneurones dans NVmot. D'abord, chez l'homme, la coloration au crésyl de violet de tranches du tronc cérébral révèle deux populations morphologiquement distinctes de neurones dans le NVmot : de grandes cellules multipolaires, vraisemblablement des TMNs- α , et de petites cellules fusiformes qui pourraient être des interneurons ou des TMNs- γ (Marani et *al.* 1998).

En 1983, Mizuno et ses collaborateurs ainsi que Travers et Norgren avaient observé des neurones marqués dans le NVmot contralatéral suite à l'injection d'un traceur rétrograde dans un seul NVmot chez le rat. Ces observations anecdotiques furent ultérieurement confirmées par celles de Ter Horst (1990) et Kolta (1997) qui utilisèrent des injections d'HRP dans la première étude et de DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetra-methylindocarbocyanine perchlorate: un traceur carbocyanine) dans la deuxième. Ces auteurs ont rapporté l'existence de fibres commissurales connectant les parties dorsales des deux noyaux moteurs contenant les motoneurons massétéris et originant de petits neurones bipolaires ou fusiformes. Ces résultats sont compatibles avec trois études électrophysiologiques. Une première menée par Petropoulos et ses collègues (1999) qui ont obtenu des PPSEs dans le NVmot de lamproies en stimulant le NVmot contralatéral suggérant une activation directe de ces interneurons. De la même façon, une deuxième étude effectuée par Jüch et *al.* (1993) a donné des résultats similaires sauf que les réponses synaptiques obtenues étaient, cette fois-ci, inhibitrices au lieu d'excitatrices. Finalement, dans une troisième étude effectuée dans notre laboratoire, la stimulation du NVmot a évoqué, dans quelques cas, des potentiels antidromiques dans le NVmot contralatéral (Kolta

1997). Basé sur toutes ces observations anatomiques et électrophysiologiques, il devient évident que les fibres commissurales liant les deux NVmot proviennent du NVmot lui-même au moyen des projections axonales d'interneurones situés à l'intérieur de ce noyau. Par conséquent, ces interneurones pourraient participer à la coordination bilatérale des muscles de fermeture de la mâchoire et/ou participer à la circuiterie responsable des mouvements de la mastication.

Des études immunohistochimiques ont également rapporté à l'occasion l'existence de neurones immuno-réactifs au GABA (Ginestal *et al.* 1993, Li *et al.* 1996) ou à la glycine (Li *et al.* 1996, Rampon *et al.* 1996) au sein même du NVmot. Aussi, des expériences de double marquage chez le lapin où des injections d'un traceur rétrograde dans un seul NVmot étaient combinées à des réactions immunohistochimiques contre le GABA et le glutamate ont révélé des cellules doublement marquées dans le NVmot contralatéral (Kolta *et al.* 2000).

Des études électrophysiologiques portant sur cette population d'interneurones sont très rares. D'ailleurs, les seules investigations de ce genre étaient obtenues, assez souvent, accidentellement lors d'enregistrements des motoneurones dans NVmot. Par exemple, Sessle (1977a), lors d'enregistrements extracellulaires dans NVmot *in vivo* chez le chat, a rencontré occasionnellement des neurones qui n'étaient pas activés d'une façon antidromique suite à la stimulation de la racine motrice et qui étaient considérés comme des interneurones. Toujours, *in vivo* et chez le chat, l'activité spontanée de ces interneurones captée via des enregistrements unitaires dans NVmot n'était pas synchronisée avec l'activité enregistrée dans le nerf trigéminal (Denauvit-Saubie *et al.* 1972). La plus grande évidence suggérant l'existence de cette population d'interneurones provient d'une étude sur des tranches

in vitro du tronc cérébral chez le rat où des potentiels postsynaptiques excitateurs et inhibiteurs étaient obtenus dans les neurones de PeriV suite à la stimulation de NVmot (Bourque et Kolta 2001). Ces potentiels postsynaptiques pouvaient être reproduits par une application locale de glutamate indiquant qu'ils ne résultaient pas de l'activation de fibres de passage à travers NVmot. De plus, ces réponses étaient bloquées par le DNQX, la bicuculline ou la strychnine suggérant qu'il ne s'agit pas là d'un effet de stimulation des motoneurones cholinergiques.

En somme, toutes ces études préliminaires indiquent l'existence d'une population mixte d'interneurones inhibiteurs et excitateurs au sein même du NVmot projetant au NVmot contralatéral ainsi qu'à PeriV. Ces interneurones sont dans une position idéale pour coordonner les mouvements bilatéraux de la mâchoire.

1.4 Objectifs de l'étude

Malgré la somme d'évidences indiquant la présence d'interneurones à l'intérieur du NVmot, aucune étude ne fût menée sur ces neurones afin d'en mieux comprendre la fonction. Le but de cette étude est donc de décrire leurs caractéristiques électrophysiologiques et morphologiques pour essayer d'établir leur fonction. Ceci se fera d'abord au moyen d'enregistrements en mode « cellule-entière » avec des électrodes de patch remplies avec de la biocytine sur des tranches du tronc cérébral chez des rats néonataux. Ceci permettra en premier lieu de bien documenter leurs propriétés passives et actives membranaires ainsi que leurs relations synaptiques avec la région péri-trigéminal entourant NVmot tout en permettant une description détaillée de leur morphologie et de leurs projections axonales. Dans une seconde étude, nous examinerons leur distribution dans le

noyau, leurs projections commissurales ainsi que leur nature histochimique. Des comparaisons seront faites avec les TMNs afin d'établir des critères permettant de distinguer ces derniers des interneurones sur une base électrophysiologique. Ces données permettront d'en arriver à une meilleure compréhension des circuits et mécanismes contrôlant les mouvements oro-faciaux et la mastication.

Deuxième chapitre

**« ELECTROPHYSIOLOGICAL PROPERTIES AND
SYNAPTIC INPUTS OF INTERNEURONS LOCATED IN
THE TRIGEMINAL MOTOR NUCLEUS »**

(sous la forme « prêt à être soumis » à la revue European

Journal of Neuroscience)

**Electrophysiological properties and synaptic inputs of interneurons
located in the trigeminal motor nucleus.**

S. MEDDAHI¹ and A. KOLTA^{1,2}

¹Centre de recherche en sciences neurologiques, Université de Montréal, Montréal,
Québec H3C 3J7, CANADA.

² Faculté de Médecine dentaire, Université de Montréal, Montréal, Québec H3C
3J7, CANADA.

Keywords: trigeminal motor nucleus, motoneurons, interneurons, rat, patch-clamp recordings

Correspondence:

Dr A. Kolta,
Université de Montréal,
CRSN, Pavillon Paul-G. Desmarais
C.P. 6128, Succ. Centre-Ville
Montréal, Québec, CANADA
H3C 3J7.

Tel: (514)-343-7112
Fax: (514)-343-2111
e-mail: arlette.kolta@umontreal.ca

SUMMARY

The trigeminal motor nucleus (NVmot) contains the somata of motoneurons innervating the jaw muscles (TMNs), but also contains interneurons (INs). This study describes the basic physiological characteristics and the synaptic inputs from the peritrigeminal area (PeriV) of these INs. Whole cell recordings made with patch pipettes filled with biocytin were performed in rat brainstem slices. The TMNs were labeled by injection of cholera toxin-Alexa 488 into the masseter muscle. Biocytin-filled INs were fusiform, ovoid, triangular or round with small somata with 2 to 4 stem dendrites. Their simple dendritic branches extended into PeriV which constituted the major target of INs axons along with NVmot, the principal sensory nucleus and the facial motor nucleus. TMNs had large multipolar or ellipsoid somata with 6 to 10 primary dendrites. Their radial dendritic tree was complex reaching out of NVmot and their axons were found to enter the trigeminal motor tract.

The INs had greater values for input resistance, spike and AHP duration than TMNs. Some INs and TMNs had an outward rectification during depolarization. Depolarization-induced inward rectification was unique to TMNs, while hyperpolarization-induced inward rectification was seen only in INs. Nearly half of INs and TMNs displayed accommodation, a depolarization and time changes in the interspike interval. Firing adaptation also occurred in 42% of INs. Both populations of neurons received synaptic inputs from PeriV, but TMNs received proportionally higher incidence of inhibitory potentials than INs. Transmission failure were much more common for TMNs, while miniature events occurring spontaneously were a trademark of INs.

INTRODUCTION

The motor nucleus of the trigeminal system (NVmot) contains the somata of the motoneurons (TMNs) innervating the jaw muscles (Mizuno et al. 1975, Batini et al. 1976, Sasamoto et al. 1979, Rokx et al. 1985, Lingenhohl et al. 1991, Lund et al. 1991, Luo et al. 1991, Saad et al. 1997, Widmer et al. 1998). Several lines of evidence suggest that it also contains a distinct population of interneurons (INs). Denauvit-Saubie (1972) and Sessle (1977) were the first to report the existence of these INs when recording them occasionally within NVmot that could not be antidromically activated by stimulation of the motor root or had a spontaneous activity with a periodicity different from that of the trigeminal nerve.

At present very little is known about this population of INs though several studies have provided indirect evidence of their existence. First, Nissl stainings reveal two morphologically distinct populations of neurons, large multipolar cells presumably α motoneurons and small fusiform cells that could be INs or γ motoneurons (Marani et al. 1998 in man, Meddahi et al. companion paper in rat). Second, in the rabbit, injections of retrograde tracers (dextran amines) in the supratrigeminal area, intertrigeminal area and the dorsal cap of the main sensory nucleus label bilaterally a few GABA and glutamate immuno-reactive neurons in NVmot (Kolta et al. 2000). Third, the strongest evidence for the existence of these INs is provided by the observation that electrical stimulation in NVmot elicits excitatory and inhibitory post-synaptic potentials (EPSPs and IPSPs respectively) in interneurons surrounding it (Bourque and Kolta 2001). These PSPs can be reproduced by local application of glutamate indicating that they do not result from

activation of fibers crossing the nucleus and are blocked by DNQX, bicuculline or strychnine suggesting that they are not produced by collaterals of the cholinergic TMNs. Finally, Kolta (1997) and Ter Horst et al. (1990) reported the existence of commissural fibers connecting the left and right masseteric pools of TMNs and originating from small bipolar or fusiform neurons located within NVmot. These results are consistent with those of Petropoulos et al. (1999) that obtained EPSPs in NVmot of lampreys by stimulating the contralateral NVmot. A number of other electrophysiological studies have also shown that these presumably INs are commissural neurons linking the two NVmot. Jüch et al. (1993) have occasionally recorded small IPSPs in the contralateral pool of jaw closing TMNs following the stimulation of NVmot. In addition, few neurons in NVmot were anti-dromically activated by stimulation of the contralateral NVmot (Kolta 1997). Moreover, morphological experiments further support this idea where retrograde tracer injection in NVmot labeled neurons in the contralateral NVmot that are GABA and glutamate immunoreactive (Kolta et al. 2000). This was in agreement with an earlier report of Li et al. (1996) observing small GAD and glycine immunoreactive neurons in NVmot near the border of the nucleus. More interestingly, Manaker et al. (1992) reported that NVmot contains neurons that project to the hypoglossal nucleus and that are not retrogradely labeled from the periphery while Roste (1989) provided a similar evidence for a projection to the cerebellum.

Thus, an increasing body of evidence suggest the TMNs are intermingled with INs in the NVmot, but there is virtually no information about the electrophysiological properties of these neurons and their inputs. These were investigated here using whole-cell recordings guided by infra-red microscopy. The recorded neurons were

filled with biocytin to further document their morphology. Recordings from TMNs were also performed to help establishing electrophysiological criteria that distinguishes the two populations. These data will serve for further assessment of the role of these INs in the mechanisms controlling jaw movements.

MATERIAL AND METHODS

Labeling of the trigeminal motoneurons:

The procedure to label the TMNs prior to slice preparation has been described in details before (Kolta 1997, Bourque & Kolta 2001). Briefly, Sprague-Dawley rat pups (0 to 2 days old) were anesthetized by hypothermia. A 5 μ l-10 solution of a retrograde tracer (Cholera toxin conjugated to Alexa Fluor 488, Molecular Probes, 0.5 mg/ml) was injected in the masseter muscle and was given a few days to diffuse.

Brainstem slices preparation:

The rats are killed by decapitation when they are 5-14 days old. The brain was removed quickly and immersed in cold (4°C), sucrose-based artificial cerebrospinal fluid (ACSF, in mM: 225 sucrose, 5 KCl, 1.25 KH₂PO₄, 4 MgSO₄, 0.2 CaCl₂, 20 NaHCO₃, and 10 D-glucose) that has been bubbled with 95% O₂ – 5% CO₂. Transverse sections of 300 μ m thickness were cut with a vibratome (Leica VT1000s). Slices containing the NVmot were transferred into a submerged-type recording chamber and continuously perfused (2ml/min) with oxygenated (mixture of 95% O₂ and 5% CO₂) ACSF (in mM: 125 NaCl, 5 KCl, 1.25 KH₂PO₄, 1.3 MgSO₄, 2.4 CaCl₂, 20 NaHCO₃, and 10 D-glucose) at room temperature.

Recording from visualized neurons:

After locating the NVmot under low power (4X) epifluorescence, individual small fusiform neurons were visualized at high power with DIC optics using a 40X water-immersion objective and illumination in the near-infrared (bandpass 750-

800nm). The epifluorescence was again used to insure that the selected cell was not a motoneuron projecting to the masseter muscle and filled with Cholera Toxin (fig.1). Occasionally some TMNs were recorded in order to make a comparison with the INs.

Whole-cell recordings were made with a patch pipette pulled from thin wall glass (World Precision Instruments, 1.5 mm outer diameter, no inner filament) using a model P-97 puller (Sutter Instruments) and filled with an internal solution of the following composition (in mM): 140 potassium gluconate, 5 NaCl, 2 MgCl₂, 10 Hepes, 0.5 EGTA, 2 ATP and 0.4 GTP. The electrode resistance range was 7-10 Ω M for the INs and 5-7 Ω M for the TMNs. The patch-electrode resistance was monitored in Bridge Mode of an AxoClamp-2B amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA) by measuring the voltage drop induced by a current pulse (-100 pA, 200ms). The electrode was visually guided onto the cell body while applying positive pressure to the back of the pipette to prevent attachment to loose material. An increase in resistance of 20-30 M Ω was taken as a sign that the electrode tip contacted the surface of a neuron. Gentle suction was applied until a high-resistance (1-5 G Ω) seal was made. Then a brief suction was used to break into the cell body. The serial resistance was compensated with bridge balance. Whole-cell current and voltage recordings were then performed in concert with pCLAMP acquisition software (v8.1, Axon Instruments). Threshold was determined by injecting incrementing depolarizing pulses (steps of 0.1nA) and was defined as the first membrane potential at which spikes were triggered. Synaptic responses were evoked by electrical stimulation of adjacent areas using bipolar nichrome electrodes (25 μ m diameter) that were placed hundreds of micrometers from the recording electrode.

The intensity and duration of the stimulus was varied to determine optimal stimulation.

As already described above, several INs fulfilled more than one criterion: fusiform shape, small soma size, not retrogradely labeled from injections in the periphery, no response to motor root stimulation. We ignored all data from neurons that failed to meet these criteria. Interneurons were identified using the criteria described above and data were only accepted from neurons that also met the additional criterion that the membrane potential did not fall below -50mV during the period of recording. Viability of the TMNs was also confirmed by resting potential less than -50mV and action potential amplitude more than 60mV .

Drug application:

Drugs were bath-applied at the following concentrations: bicuculline ($10\mu\text{M}$; Sigma), 6,7-dinitroquinoxaline (DNQX, $10\mu\text{M}$, RBI), strychnine ($5\mu\text{M}$; Sigma) and tetrodotoxin (TTX, $1\mu\text{M}$, RBI).

Biocytin labeling and tissue processing:

During the recording period, biocytin (1%; Sigma), which was included in the patch electrode solution, diffused into the neurons (see fig.1). At the end of the recording session, the slices were fixed in 4% paraformaldehyde and processed to reveal the biocytin filled cells using standard techniques. The slices were treated with 0.5% H_2O_2 , rinsed in PB, incubated overnight in an avidin-biocytin complex (ABC kit; Vector Laboratories), and reacted with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; 0.05%) and H_2O_2 (0.03%) in PB buffer. The slices were mounted with Entellan after dehydration and were examined under light microscopy. To determine

the soma diameter, no correction was made for shrinkage induced by the histological procedures.

RESULTS

Morphological features of the recorded neurons:

The soma-dendritic morphology and axonal course of the recorded neurons were investigated by intracellular biocytin filling. Ninety five cells were characterized as INs within NVmot and filled with biocytine, of which 47 had well stained soma, dendrites, and axonal arbors (Fig.1). The INs were spread throughout the masseteric pool of NVmot and were of a much smaller size than TMNs (Fig.2). The soma dimension was derived by approximating it to an ellipsoid and by measuring the major and minor axes (table 1). To differentiate the dendrites from the axon the later constitute the thinner process. Also, where dendrites get thinner when branching, the axon remains consistently the same in diameter. A few dendrites (2-4) emerged from these neurons and often extended beyond the borders of NVmot sometimes reaching up to 779 μ m. The dendritic trees extended either in one direction (dorsal or ventral) or in opposite directions on the medio-lateral axis like the neurons shown in fig.2. The axons of INs reached the supratrigeminal area (SupV: above NVmot), the intertrigeminal area (IntV: lateral to NVmot), the medial peritrigeminal area (mPeriV: medial to NVmot) and the dorsal cap of the main sensory nucleus (NVsnpr: lateral to IntV), and faded within these regions making it impossible to ascertain the target zone. In four cases the axons headed medially and

crossed the midline, while in three other cases they reached the facial nucleus. In 7 cases, the axons arborized locally.

Fourteen cells retrogradely labeled with the cholera toxin injected in the masseter were identified as TMNs and were successfully filled with biocytin. They were all multipolar, ellipsoid, and of large size (Fig.2 and table1) with approximately 7 primary dendrites emanating from the soma (range 6-10). Their dendritic field was much more complex than the one of INs and also reached out of NVmot. It extended in a radiate fashion with considerable overlapping between branches. In 8 cases out of the 14, an axon was distinguishable and found to traverse the nucleus to enter the trigeminal motor root laterally.

Electrophysiological identification:

Membrane passive and active properties:

The basic electrophysiological characteristics of NVmot neurons are summarized in table2. Interneurons had a resting membrane potential relatively similar to that of TMNs but a much larger input resistance (table2, $P < 0.001$).

Rectification:

Fifty five percent of INs had a linear current-voltage relationship at potentials ranging from -100mV to -40mV , just before starting to spike (fig. 3A and solid line in D). Thirty five percent of INs had a pronounced sag suggesting the activation of hyperpolarization and time dependant inward rectification (fig.3B). Twenty nine percent of recorded INs exhibited an outward rectification during depolarization (fig.3 C). Eighteen percent had both types of rectification (Fig.3D, dotted line). Thirty seven percent of TMNs had a linear I-V relationship while 36% had an

outward rectification at potentials more depolarized than $-29.8 \pm 4.3\text{mV}$. None of the TMNs had an inward rectification during hyperpolarization, but 27% showed one with depolarization (Fig. 3E).

Firing properties:

Some basic characteristics of firing differed markedly between the groups of neurons recorded, while on the contrary, patterns of firing were remarkably similar. For instance INs had a significantly ($P < 0,001$) longer-lasting spikes and after-hyperpolarization (AHPs) than TMNs (table2). Three types of AHP were observed. In the majority of INs (78%) and a minority of TMNs (9%), a slow, long-lasting AHP was observed (fig. 4A). Fast, short-lasting AHPs were seen only in TMNs (in 60% of cases; see fig. 4B). A small percentage of both populations (22% of INs and 31% of TMNs) had biphasic AHPs. In 26% of INs and 27% of TMNs, the first spike of a train was followed by an after depolarization (ADP) while the following spikes had either a slow AHP (18%) or a biphasic AHP (8%) in INs and in the case of TMNs either a fast AHP (14%) or biphasic AHP (13%) (fig.4 A and B, lower traces).

Increasing depolarization from threshold was paralleled by a linear increase in firing rate at steady state in both INs and TMNs (fig.5 A). In our population of INs, the discharge frequency reached $24 \pm 1,1\text{Hz}$ at the mean potential of $-27,6 \pm 1,1\text{mV}$.

Accommodation, a depolarization and time dependent change in the interspike interval in a train was also observed in a significant proportion of neurons

(40.2% INs and 45.5% TMNs). At the onset of a long current pulse, an initial doublet or triplet is often seen, followed by a period during which the firing frequency drops sharply (fig.5 B). Accommodation is reflected in the frequency-time relationship in Fig. 5 B. The mean firing frequency in the first and second phases were $81,4 \pm 4,8\text{Hz}$, and $16,6 \pm 2,3 \text{ Hz}$ at $-39,7\text{mV}$ for the group of INs. The firing rate of the interneuron shown in Fig. 5 B is constant at low membrane potentials (-38mV , $1,1\text{pA}$ current intensity) but drops drastically within 150ms at more depolarized potentials (from -36mV for $I= 1,5\text{pA}$ and -34mV for $I=2,3 \text{ pA}$). The time course of spike-frequency accommodation is remarkably consistent across INs suggesting that it may be another *fingerprint* of their intrinsic properties. This type of accommodation was observed in all INs and TMNs having an ADP after the first spike in a train, but also in other neurons where an ADP was not detected.

However, in nearly half of INs (42%), depolarization above $-19 \pm 2,0 \text{ mV}$ caused a decrease of spike amplitude and increase in duration. These changes in spike parameters grew with time in a spike train and seemed to be supported by an underlying slow inward current, the kinetics of which are presumably voltage dependent since it reached steady state faster at more depolarized potentials (Fig. 6A). At very depolarized potentials, these cells fired an initial spike at the beginning of the pulse followed by a dampening oscillation that ceased when the membrane stabilized. This phenomenon, to which we will refer as adaptation, was encountered in 45% of TMNs and occurred at slightly more depolarized membrane potentials ($-16 \pm 3.5\text{mV}$). This marked firing rate adaptation caused eventually the cells to cease firing when reaching these membrane potentials.

In 25% of the recorded INs, a slow depolarization followed release from hyperpolarization. Depolarization from a hyperpolarized state (-90mV) induced a “low threshold calcium-like spike” overridden by a burst of action potentials in Fig.6 B. The same cell injected with an equivalent current pulse from the resting membrane potential (-58mV) does not display such a phenomenon. Firing frequency was much higher during the burst (interspike interval $19,4 \pm 2,1$ ms during burst and $127,4 \pm 12,7$ ms at steady state). The underlying slow depolarization had an amplitude of $12,2 \pm 0,7$ mV and a duration of $76,9 \pm 2,1$ ms. This type of behavior was observed, also, in 36% of the recorded TMNs.

In 25% of INs and 27% of TMNs a rebound discharge was observed at the end of hyperpolarizing pulses (fig. 6 C).

Synaptic activity at resting membrane potential:

Spontaneous events observed at rest:

Most of INs (68%) displayed rapid spontaneous fluctuations of their membrane potential at a mean frequency of $2,2 \pm 0,2$ Hz (fig.7). The largest potentials were in the order of $2,2 \pm 0,2$ mV in amplitude. This activity was consistently observed in recordings from INs suggesting that it may be another *fingerprint* reflecting the pattern of their synaptic input. In all tested cases (n=8), the polarity of these potentials did not reverse with imposed changes of membrane potential indicating that they resulted from a flow of cationic ions into the cell. Fig.7A shows, under voltage clamp conditions, the increase in amplitude of these spontaneous EPSCs with hyperpolarization. The amplitude of the inward current is plotted against the holding potential in Fig.7 B. In 5 cases, the excitatory nature of these events was ascertained by the fact that they were blocked by bath application of

the AMPA/Kainate receptor antagonist DNQX (fig.7 C). However, spontaneous inhibitory events may also occur since, for 2 cells where only discrete small synaptic potentials were observed occasionally under control conditions, bath application of bicuculline and strychnine (n=2) produced a large increase in both their number and amplitude (fig.7 D). In contrast, all recorded TMNs were quiescent at resting membrane potential and none displayed such an activity.

Synaptic responses:

Stimulation of the areas surrounding NVmot typically evoked EPSPs in INs (fig.8 A, table 3) with latencies ranging from $2,8 \pm 0,3$ to $5,9 \pm 1,0$ ms (table3). These EPSPs had a relatively steep rising phase (rise time 10-90% = $7,9 \pm 0,9$ ms) and a slow decay (decay time 10-90% = $112,6 \pm 20,6$ ms) and could follow stimulation frequencies ranging from 25 to 102 Hz. Only 3 inhibitory postsynaptic potentials (IPSPs) were obtained (fig.8 A, right; latencies from $4,9 \pm 0,4$ to 6,4 ms) while 4 were unmasked by blockage of EPSPs with DNQX (latencies from 3,4 to 3,9ms). These IPSPs could follow frequencies varying from 25 to 102Hz and reversed polarity around -60 mV. One of them was blocked with bicuculline (fig. 8A). Stimulation of the motor root failed to induce any response in INs. The EPSPs increased in amplitude with hyperpolarization (fig.8 A) but could not be made to reverse because spiking was not blocked. In 5 cases, DNQX reversibly suppressed the EPSPs. In 6 stimulations, increasing stimulus intensity to PCRt, SupV and mPeriV areas increased the amplitude of the EPSP sufficiently to bring the neuron to threshold, thus inducing an action potential (fig.8 B, right panel). The other neurons produced no action potentials at any stimulus intensities. In two particular cases, the stimulation of SupV and mPeriV caused antidromic firing of the unit at latencies of

1,0ms and 0,7ms respectively (fig.8 B, left panel). When stimulus intensity was reduced below the threshold for antidromic activation an EPSP was revealed.

Synaptic responses were also obtained from TMNs by stimulation of PCRt, SupV, mPeriV and IntV (table 3). Eight EPSPs with latencies ranging from $2,9 \pm 0,4$ to 3,6 ms and following frequencies ranging from 45 to $55 \pm 13,0$ Hz were obtained from these areas. In 3 out of these cases, the excitatory synaptic responses were completely abolished by bath application of DNQX revealing, in 2 cases, an underlying IPSP. In one particular case, further application of bicuculline suppressed the slow component of this IPSP while an additional bath application of strychnine blocked the remaining fast component (fig.8 C). Two IPSPs were also obtained by stimulation of mPeriV and IntV at latencies of 1,3ms and 2,8ms respectively.

One intriguing feature of synaptic responses in TMNs, which did never occur in INs, was a high incidence of failure (non-shown data). Our experiments showed that synaptic transmission from the peri-trigeminal areas onto TMNs is accompanied by frequent electrical stimulation that could previously induce a PSP, but that failed to elicit detectable post-synaptic events a number of times.

DISCUSSION

We have presented evidence that NVmot contains a population of INs that are morphologically and electrophysiologically distinct from TMNs. These INs receive extensive synaptic inputs from adjacent trigeminal areas and have electrophysiological characteristics that resemble those of local interneurons in the peritrigeminal area (Bourque and Kolta, 2001).

Several criteria were used in this study to distinguish INs from TMNs; the most important of which being the small size and fusiform shape of the soma and the lack of retrograde labeling from injections made in the muscles. Also, when tested, these neurons did not respond to the stimulation of the motor root. There still remain a possibility that our sample of small neurons corresponds to the small TMNs innervating intrafusal muscle fibers (γ -TMNs). Three lines of evidence argue against this: First, the size of γ -TMNs is not clearly distinct from that of α -TMNs. Some studies indicated a clear bimodal distribution of soma size in NVmot corresponding to γ -TMNs and α -TMNs (Kubota et al. 1988, Cameron & He 1989, Limvongse & De Santis 1977, Rokx et al. 1987, Bae et al. 2002), but many failed to reproduce this finding and reported an overlap of the soma size of the two populations (Miyata et al. 1996; Jacquin et al. 1983; Shigenaga et al. 1988a). Second, even if some γ -TMNs are intermingled with α -TMNs (Card et al. 1986), they constitute a small proportion (Yoshida et al. 2001) mainly confined to the margins of the masseteric pool (Shigenaga et al. 1988a). Our sample of INs accounts for 26% of neurons in NVmot (see companion paper) and is distributed throughout the masseteric pool. Third, small fusiform cells supplying the jaw muscles (presumably γ -TMNs) are clustered

in cell group K outside NVmot (Saad et al. 1997, Donga et al. 1992, Grottel et al. 1986).

General morphological features:

TMNs were examined in this study, only for comparison purposes with INs. Our findings concerning the morphological features of TMNs only confirms what is already known from the vast literature that exists on these cells (Kubota et al. 1988, Lingenhohl et al. 1991, Kamagowa et al. 1998, Nagase et al. 1997, Mong et al. 1988, Curtis et al. 1993, Moore et al. 1991, Moritani et al. 2003, Shigenaga et al. 1988a, Yabuta et al. 1991). In contrast, little is known about the INs. The only case described in the literature comes from a study by Shigenaga et al. (1988a) in which one NVmot neuron was injected with HRP. The morphological features of this neuron correspond to those of our INs and are clearly distinct from those of TMNs. The cell body was fusiform and had 3 dendrites emerging from it, while the axon gave off collaterals that reached the reticular formation but their target areas were not determined. Our observations also show that other divisions of PeriV (SupV, IntV) and NVsnpr are potential targets of the axonal projections of INs. This supports the electrophysiological results previously obtained that suggested that PeriV interneurons receive synaptic inputs from NVmot interneurons (Bourque and Kolta, 2001). In a few cases, we also observed commissural projections from these neurons (see companion paper). This also support previous preliminary observations by Kolta (1997) and Ter Horst et al. (1990). An interesting finding of the present study was that although the dendritic tree of INs was much simpler than the elaborate radial dendritic tree of TMNs, they still had long tortuous dendrites that extended far

beyond the boundaries of NVmot suggesting that they are likely to receive inputs from remote areas, not necessarily projecting to NVmot proper.

Electrophysiological characteristics of INs and TMNs:

One objective of this study was to uncover the electrophysiological characteristics of INs that can help distinguishing them from TMNs. No major differences could be detected in the resting membrane potential of the two types of cells, hereby supporting the unlikeliness of the small cells being γ -motoneurons, since these should have a lower membrane potential (-40 to -60mV) according to Mikhailov & Kuneev (1981). However, significant differences in the input resistance and spike and AHP duration were found between TMNs and INs. As could be expected, given their size difference, INs had a considerably higher input resistance than TMNs. Our values of resting membrane potential and membrane resistance for TMNs are consistent with those reported elsewhere from whole cell patch recordings in the same age range (Hsiao et al. 2002). The observation that the spike and AHP duration of INs were longer than those of TMNs corroborates the hypothesis that the AHP in motoneurons is smaller than other types of neurons including interneurons (Sawczuk et al. 1995). However, the AHP duration in our population of TMNs was still longer than the values reported from intracellular recordings of these neurons (Moore and Appenteng 1991, Curtis and Appenteng 1993, Chandler et al. 1994, Kobayashi et al. 1997). This disparity could be due to differences in the recording methods (intracellular versus whole-cell recordings), temperature of the preparation or the findings of Curtis et al. (1993) that the AHP duration in motoneurons is tightly correlated with the mechanical properties of the innervated muscle. In 12 days old rats, the masseter muscle is formed almost totally of prenatal myosin which is

associated with slower contractile speeds than adult myosin. There was, indeed, a tendency for shorter AHPs in older animals (71ms versus 100ms in younger animals).

Three types of AHP were observed in the population of recorded neurons: fast, slow and biphasic. The majority of TMNs had a fast AHP (fAHP), while the majority of INs had a slow AHP (sAHP). Fast AHPs were never observed in INs, while sAHPs were sometimes observed in TMNs. Biphasic AHPs, in which the second phase was made of a medium AHP (mAHP), were seen in some cases in the two populations. In motoneurons, the fAHP is mediated by a delayed rectifier K^+ current activated by depolarization that is blocked by tetraethylammonium (TEA) (see Rekling et al. 2000 for review), while the sAHP seen in a minority of TMNs is mediated by a slowly activating and inactivating Ca^{++} -dependent K^+ current (Chandler et al. 1994). In TMNs and other cranial motoneurons, biphasic AHPs also depend on a Ca^{++} -activated K^+ current (Inoue et al. 1999). Like Chandler et al. (1994), we also observed an after-depolarization (ADP) in TMNs following the first spike only in a few cases, in contrast to Kobayashi et al. (1997) who reported them in 89% of these TMNs.

The basic properties of the INs recorded here are reminiscent of those of the last-order premotoneurons previously described by Bourque and Kolta (2001) in PeriV. This leads us to speculate that the INs within NVmot are part of an interneuronal matrix that surround NVmot and in which the TMNs are embedded.

Our sample of INs had values for resting membrane potential, spike and AHP duration comparable to those corresponding to the interneurons of PeriV reported by Bourque et Kolta (2001). We cannot compare the input resistance because of the use of different methods (intracellular versus patch). The majority of neurons recorded

in PeriV also fired regularly with small depolarizing pulses. About half fired throughout depolarizing pulses (named Type1), while most of the others fired regularly up to ~ -30 mV and then ended up with damped oscillations (named Type 2) like neurons reported here. A small percentage (15%) adapted at all depolarization level and fired only 1-3 spikes at the beginning of the pulse (Type 3). Our INs would correspond to Types 1 and 2.

Like Type 2 PeriV interneurons, about one-third of INs and 36% of TMNs displayed an outward rectification during depolarization. Hyperpolarization-induced inward rectification was also seen in about one third of the INs. The latter type of rectification was not observed in our sample TMNs, but Chandler et al. (1994) described a prominent inward rectification mediated by a hyperpolarization-activated inward rectifier in 30% of TMNs. The discrepancy between our data and theirs may result from our small sample of TMNs. Another type of rectification was obtained in some TMNs in the present study that was never encountered in the INs. Thirty-six percent of TMNs showed an inward rectification upon depolarization, in agreement with Chandler et al. (1994) who demonstrated that this behavior was mediated by a persistent sodium current.

Thus, on the basis of these observations, we can speculate that the INs can be distinguished from the TMNs by the presence of an inward rectification to hyperpolarization and the lack of an inward rectification to depolarization.

Like most Type 2 neurons in PeriV, most INs and TMNs fired a few spikes at the offset of a hyperpolarizing pulse. This type of rebound firing may involve a hyperpolarization-activated current (I_h) mediated by Na^+ and K^+ ions, or activation of a low threshold Ca^{++} channel (see for review Reikling et al. 2000).

Nearly half the INs and TMNs fired repetitively in response to sustained depolarization and increased their firing frequency with depolarization. It has been previously shown that in TMNs, this is due to a persistent (non-inactivating) Na^+ current which activates below spike threshold and pulls the membrane potential towards threshold, hereby amplifying EPSPs and producing a linearization of firing with increased current input (see Rekling et al. 2000 for review). We hypothesize that this current may also be present in some of the INs.

In the second half of the recorded neurons, there was a marked adaptation of firing with depolarization, eventually causing it to stop. Little is known about the conductances involved in such a phenomenon in TMNs, but in other types of neurons it depends on K^+ mediated outward currents (Del Negro et al. 1997).

Another firing feature of the recorded neurons is accommodation, a depolarization and time dependent change in the interspike interval. According to Rekling et al. (2000, see also Sawczuk 1995 for review), the high frequency discharge of the initial doublets is established by a Ca^{2+} inward currents triggered by the first spikes. However this phenomenon is not entirely Ca^{2+} dependent, because it is not completely abolished by blocking the Ca^{2+} influx. Other mechanisms may also be involved since changes in the conductances shaping the spikes have been also reported (Rekling et al. 2000). The mechanisms underlying accommodation in our neurons are unclear at present, but they are probably linked to the presence of an ADP. The ADP can trigger additional spikes (Viana et al. 1993) and sometimes burst firing (Carette 1998).

Moore et al. (1990) proposed that in TMNs, the initial steep slope in firing may ensure that, once activated, motoneuron firing is rapidly brought up to a frequency at which contractions of individual motor units would partially summate. The

subsequent decrease in slope would then occur over the isometric frequency-tension curve of the motor unit. The result is that the gain for the motoneurons frequency-current relationship is the inverse of the motor unit frequency-force relationship.

Synaptic activity

All recorded TMNs were quiescent at resting membrane potential in accordance with previous studies (Chandler et al. 1994, Kobayashi et al. 1997, Hsiao et al. 2002), while most INs had spontaneous miniature EPSPs that were mainly mediated by AMPA/Kainate glutamatergic receptors. The frequency of these EPSPs was reduced by TTX (data not shown) and their amplitude was voltage dependent.

Synaptic response

Honma et al. (2003) recently demonstrated, in a combined retrograde labeling of masseter TMNs with immunohistochemistry against synaptophysin, that presynaptic boutons make contacts with labeled and non-labeled neurons. We presume that the later are INs. Our results suggest that at least part of this input originates from local trigeminal interneurons surrounding NVmot and in NVsnpr. It is difficult to draw conclusions about the prevalence of inputs from one area compared to the others when working in a slice preparation, because some of the connections are lost, but this is unlikely to be the case for the areas closest to NVmot. Our results suggest that fewer responses could be obtained from IntV, NVsnpr and mPeriV, and could be more readily obtained by stimulation of SupV and PCRt. The connections between INs and all areas of PeriV and dorsal NVsnpr are reciprocal since we have already shown that electrical stimulation of NVmot or glutamate injection within NVmot produce a PSPs in the majority of neurons in PeriV

(Bourque and Kolta, 2001) and NVsnpr (unpublished observations). Many of these PSPs occurred at a very short latency indicating involvement of a monosynaptic pathway (Bourque and Kolta, 2001). Some of the responses recorded in this investigation probably resulted from activation of polysynaptic pathways (like those elicited by stimulation of NVsnpr) because they occurred at long latencies and could not follow stimulation frequencies above 20Hz. However some others occurred at very short latencies ($2,8 \pm 0,3\text{ms}$) and are likely to involve monosynaptic connections. These were mostly observed following stimulation of PCrT, SupV, mPeriV and IntV. A monosynaptic connection can also be assumed for the four IPSPs (two from SupV, one from mPeriV and one from PCrT) that were unmasked by DNQX. These IPSPs occurred at latencies ranging from 3,4 to 3,9ms.

Previous electrophysiological and anatomical studies have established the presence of glutamatergic, GABAergic and glycinergic neurons in PeriV (Turman et al. 1994 a, b; Rampon et al. 1996; Kolta et al 1997; Del Negro et al. 1998; Li et al.1998; Kolta et al. 2000; Bourque et Kolta, 2001; Bae et al. 2002; Moritani et al. 2003; Peever et al. 2003). Accordingly, we obtained both EPSPs and IPSPs in INs following stimulation of adjacent areas. EPSPs were predominant and often masked IPSPs. The latter were more frequently obtained following stimulation of SupV (4 / 7 total). One of these IPSPs was blocked by bicuculline suggesting implication of GABA_A receptors. It is difficult to draw conclusions about the presence or absence of glycinergic responses in these cells, because so few IPSPs were obtained and tested pharmacologically, but the others IPSPs had a slow decay time typical of GABAergic responses and not of the fast decaying glycinergic events (O'Brien et al. 1999). Thus inhibitory inputs to the INs seem scarce and are likely to be at least partially mediated by GABAergic synapses. We failed to detect glycinergic inputs to

INs but not to TMNs which received both glycinergic and GABAergic inputs, as could be expected from the vast anatomical evidence showing that SupV, IntV, PCRt and NVsnpr contain glycinergic and GABAergic neurons projecting to NVmot. (Turman et al. 1994b; Rampon et al. 1996; Li et al. 1998; Bae et al. 2002; Inoue et al. 2002; Moritani et al. 2003). There are also evidence that GABA and glycine are co-localized in inhibitory premotoneurons contacting TMNs (Inoue et al., 2002) and other types of motoneurons (Shupliakov et al. 1993, Tall and Hostege 1994, Ornung et al. 1996, Todd et al. 1996).

Eighty percent of immunolabeled boutons on jaw closing α -TMNs are glycine-immunoreactive, while less than 50% are GABA-immunoreactive, which some are immunoreactive to both (Bae et al. 2002). TMNs express the highest density of glycinergic receptors among cranial motoneurons (Araki et al, 1988). Physiological studies also suggest a higher incidence of inhibitory rather than excitatory inputs to jaw closing TMNs following stimulation of peripheral nerves innervating the intraoral or perioral structures (Goldberg & Nakamura 1968, Kidokoro et al. 1968, Shigenaga et al. 1988b).

Besides the pattern of inhibitory inputs, another important difference between INs and TMNs appears in the incidence of transmission failure. Once stimulation intensity set to obtain a sub-threshold response, failure never occurred in INs, but was common in TMNs in agreement with previous observations, made both *in vivo* (Grimwood et al. 1992, Appenteng et al. 1995) and *in vitro* (Curtis & Appenteng 1993) showing that transmission at excitatory synapses between either spindle afferents or premotor interneurons and TMNs is subject of a high incidence of presynaptic spikes that fail to elicit detectable post-synaptic events. This high failure rate has been attributed to GABAergic presynaptic control of glutamatergic

transmission because of the high prevalence of GABA immunoreactive boutons forming axo-axonic synapses on glutamatergic neurons within NVmot (Saha et al. 1991, Yang et al. 1997).

There was no statistically significant difference between the latencies, rise times and decay times of PSPs elicited in TMNs and INs.

Conclusions:

The present study documented the intrinsic properties and local synaptic inputs of a previously undescribed population of interneurons within NVmot. These neurons can be distinguished from jaw closing TMNs on the basis of some of their electrophysiological properties, but also on the basis of their synaptic activity. The role of these neurons is unclear at present and future studies need to examine their influence on the output of TMNs. We have already established that the population is made up of a mix of glutamatergic, GABAergic and glycinergic neurons that project to surrounding interneurons and to the contralateral NVmot. The commissural inhibitory neurons may be the analogues of Renshaw cells. As for the role of the others, it remains to be elucidated. One possibility is that these neurons receive inputs from components of the masticatory central pattern generator (CPG) and act as sign inverting synapses before transmitting this information to antagonistic motoneurons. Another possibility is that their role is similar to that of the other interneurons with which they form a uniform matrix.

TABLES AND LEGENDS

Table I : Main morphological features of INs and TMNs of NVmot.

Features		TMNs (n=14)	INs (n=47)
soma shape		multipolar, ellipsoid	fusiform, ovoid, triangular, round
soma size	major axis (μm)	$31,2 \pm 1,4$	$16,7 \pm 0,6$
	minor axis (μm)	$19,3 \pm 1,5$	$11,4 \pm 0,4$
primary dendrites	average number	$7 \pm 0,6$	$3,1 \pm 0,1$
	range	6 -10	2 - 4
axon projection		motor root	SupV, mPeriV, IntV, NVsnpr, NVII, midline

SupV: supratrigeminal area, mPeriV: medial peri-trigeminal area, IntV: intertrigeminal area, NVsnpr: principal sensory nucleus, NVII: facial nucleus.

Table II : Electrophysiological characteristics of the neurons within NVmot

Electrophysiological characteristics		INs (n=91)	TMNs (n=11)
Resistance (M Ω)*		205,9 \pm 15	69,2 \pm 9,3
Resting membrane potential (mV)		-60 \pm 0,5	-56 \pm 2
Neuronal activity at resting membrane potential	spontaneously active	10,3%	0%
	miniature PSPs	67,8%	0%
	quiescent	21,9%	100%
Spike characteristics	firing threshold (mV)	-38,0 \pm 0,8	-34,2 \pm 1,8
	amplitude (mV)	72,8 \pm 1,5	69,3 \pm 3,1
	duration (ms)*	3,1 \pm 0,1	1,4 \pm 0,1
AHP	amplitude (mV)	7,0 \pm 0,4	8,3 \pm 1,0
	duration (ms)*	193,1 \pm 59,7	94,9 \pm 5,5
Rectification	outward during depolarization	29,0%	36,4%
	inward during hyperpolarization	35,0%	0%
	inward during depolarization	0%	27,3%

* Values that are significantly ($P < 0,001$) different between INs and TMNs based on Mann-Whitney Rank Sum test.

Table III: Synaptic responses of INs and TMNs to stimulation of adjacent trigeminal interneurons.

stimulated area	EPSP		IPSP		No response	
	INs	TMNs	INs	TMNs	INs	TMNs
	latency (ms)	latency (ms)	latency (ms)	latency (ms)		
PCRt	3,8 ± 0,5 (n=13)	3,2 ± 0,4 (n=2)			3	0
SupV	3,9 ± 0,3 (n=15)	3,3 ± 0,4 (n=2)	4,9 ± 0,4 (n=2)		7	2
mPeriV	2,8 ± 0,3 (n=9)	2,9 ± 0,4 (n=3)		1,3 (n=1)	4	1
IntV	3,8 ± 0,2 (n=5)	3,6 (n=1)		2,8 (n=1)	4	0
NVsnpr	5,9 ± 1,0 (n=4)		6,4 (n= 1)		16	
Motor root					6	

SupV: supratrigeminal area, PCRt: parvocellular reticular formation, mPeriV: medial peri-trigeminal area, IntV: intertrigeminal area, NVsnpr: principal sensory nucleus.

FIGURES AND LEGENDS

Figure 1: Image of an interneuron filled with biocytin superposed to the massive trigeminal motoneurons retrogradely labeled with Alexa Fluor-488 conjugated to cholera-toxin.

Figure 2: Example of two labeled neurons within the NVmot. A) photomicrograph of biocytin-filled motoneuron. *Inset*, a high-power view of the same motoneuron. B) photomicrograph of biocytin-filled interneuron. A magnification of this interneuron is illustrated in the *inset*.

Figure 3: Rectification in the recorded neurons. Left panel represents the three different behaviours encountered in INs. A) Response to imposed current steps of a cell that did not have any rectification. B) Example of a cell showing an inward rectification at hyperpolarized potentials. C) Example of a cell showing an outward rectification at depolarized potentials. D) The current-voltage (I-V) curve of two INs. Cell1 displays an inward rectification at hyperpolarization and an outward rectification at depolarization. Cell2 has a linear I-V curve. E) Example of an inward rectification at depolarization seen in one TMN just before getting to the membrane potential where the cell starts spiking.

Figure 4: Spike and AHP properties in recorded neurons. A) The pattern discharge to a pulse of injected current in interneurons. Upper trace is an example of slow

long-lasting AHP. Middle trace shows an example of biphasic AHP. Note the spike after-depolarization (ADP) in the first spike in the lower trace. B) The pattern discharge to imposed positive current pulse in TMNs. The fast short-lasting AHP is illustrated in the upper trace. The middle trace shows the biphasic AHP of these motoneurons. Note the spike after-depolarization (ADP) in the first spike of the lower trace while the remaining spikes in the train are followed by fast short-lasting AHP.

Figure 5: A) At the steady state, all recorded INs increased their firing rate linearly with depolarization. Upper traces represent cell discharge at 3 different membrane potentials. The plot shows how the discharge frequency varies linearly with injected current when measured at the steady state. B) Upper traces shows accommodation starting from a membrane potential of -36mV . Plot: firing frequency versus time curves obtained from a single interneuron in response to three different levels of injected current. Firing rate was constant for $1,1\text{ pA}$ current intensity but varied with time from $69,4\text{Hz}$ to $9,7\text{Hz}$ for $I=1,5\text{pA}$ and from $83,3\text{Hz}$ to $16,6\text{Hz}$ for $I=2,3\text{pA}$. In both A and B, the values in mV next to the traces indicate the “estimated” membrane potential between spikes (and not the initial membrane potential prior to depolarization).

Figure 6: Firing adaptation and hyperpolarization-induced discharge in INs. A) Adaptation; the cell ceased firing when reaching a membrane potential of -14mV . Values in mV next to the traces indicate membrane potential at steady state. B) Hyperpolarization-activated discharge in which depolarization from a hyperpolarized potential (-90mV), by applying a current step, induced a low threshold “calcium-like

spike” overridden by a burst of action potentials. Middle trace shows how the same current pulse applied from the resting membrane potential does not trigger such a phenomenon. C) Example of an interneuron that had a rebound activity at the offset of hyperpolarizing pulses.

Figure 7: Spontaneous synaptic activity recorded at rest. A) Spontaneous EPSCs recorded at different holding potentials in one interneuron. B) Amplitude of the inward current plotted against the holding potential. C) Spontaneous EPSPs recorded at resting membrane potential in an interneuron disappear with DNQX and are partially recovered after washout as shown in the two lower traces. D) Example of spontaneous EPSPs that increase in amplitude, frequency and duration with application of bicuculline and strychnine. E) Example of a quiescent TMN at resting membrane potential (-56mV).

Figure 8: A) Synaptic responses recorded in two different INs obtained by electrical stimulating SupV. Left: an EPSP is completely blocked by application of DNQX. This EPSP can follow a high frequency stimulation of 97Hz. The amplitude of this EPSP increased in amplitude with imposed membrane hyperpolarization. Right: an IPSP obtained by stimulation of SupV can be suppressed by application of bicuculline. This IPSP followed a high frequency stimulation of 82Hz and reversed its polarity at membrane potential of 62mV. B) Examples of response to stimulation of SupV in Ins. Left panel: low-intensity stimulation of SupV evoked an EPSP while increasing the stimulus intensity was sufficient to bring the interneuron to threshold causing a synaptic spike. Note the same rising kinetics of the synaptic spike and the underlying EPSP. Right panel: another interneuron responding by antidromic

potential to stimulation of SupV. Note the shorter latency and the fast rising phase compared to the synaptic spike illustrated in the left panel. C) Response of one TMN to stimulation of SupV. The upper traces in the left panel show an EPSP at different potentials evoked by stimulation of SupV. The lower traces show how this EPSP was blocked completely by application of DNQX revealing an IPSP with a reversal potential at -64mV . The upper traces in the right panel illustrate how only the slow component of this IPSP was suppressed by application of bicuculline leaving a fast IPSP that reversed polarity around -62mV . The lower traces show how the remaining fast component of the IPSP was completely blocked with additional application of strychnine at all membrane potentials.

Figure 1



Figure 2

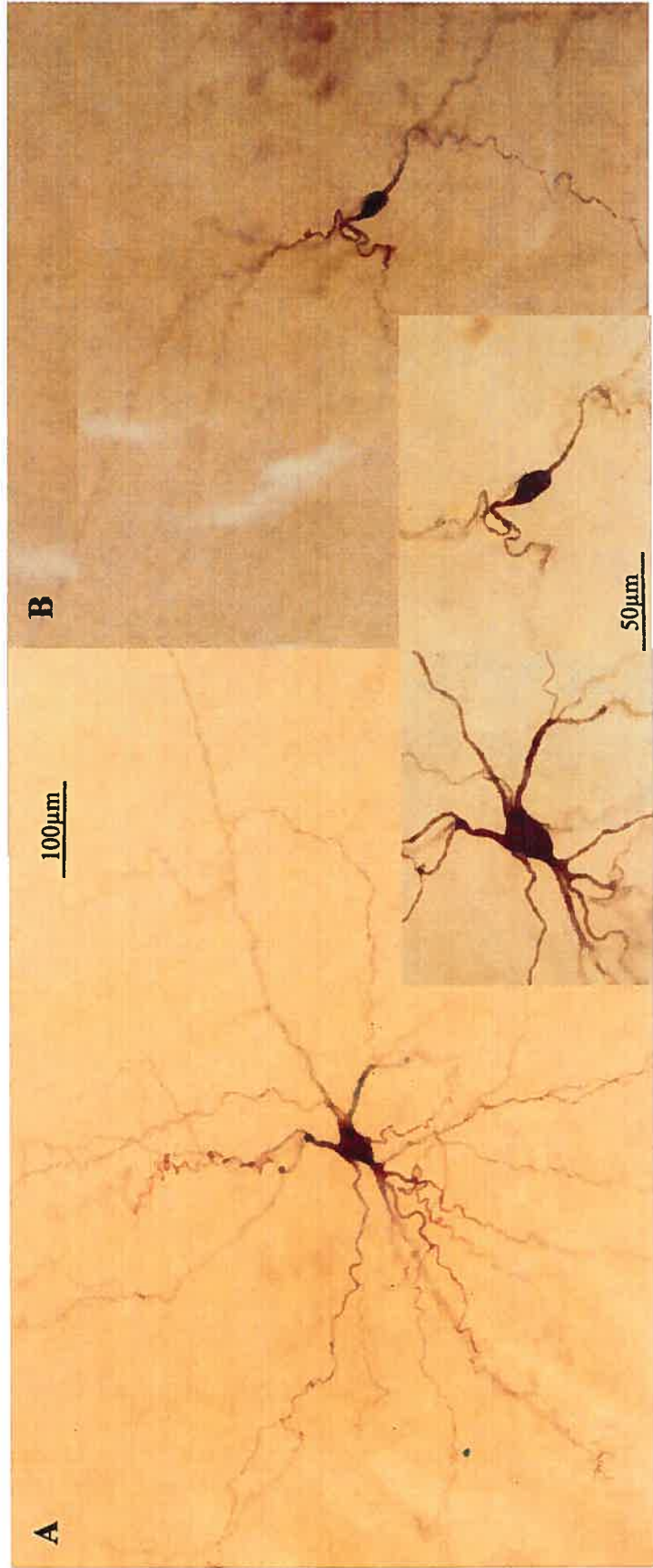


Figure 3

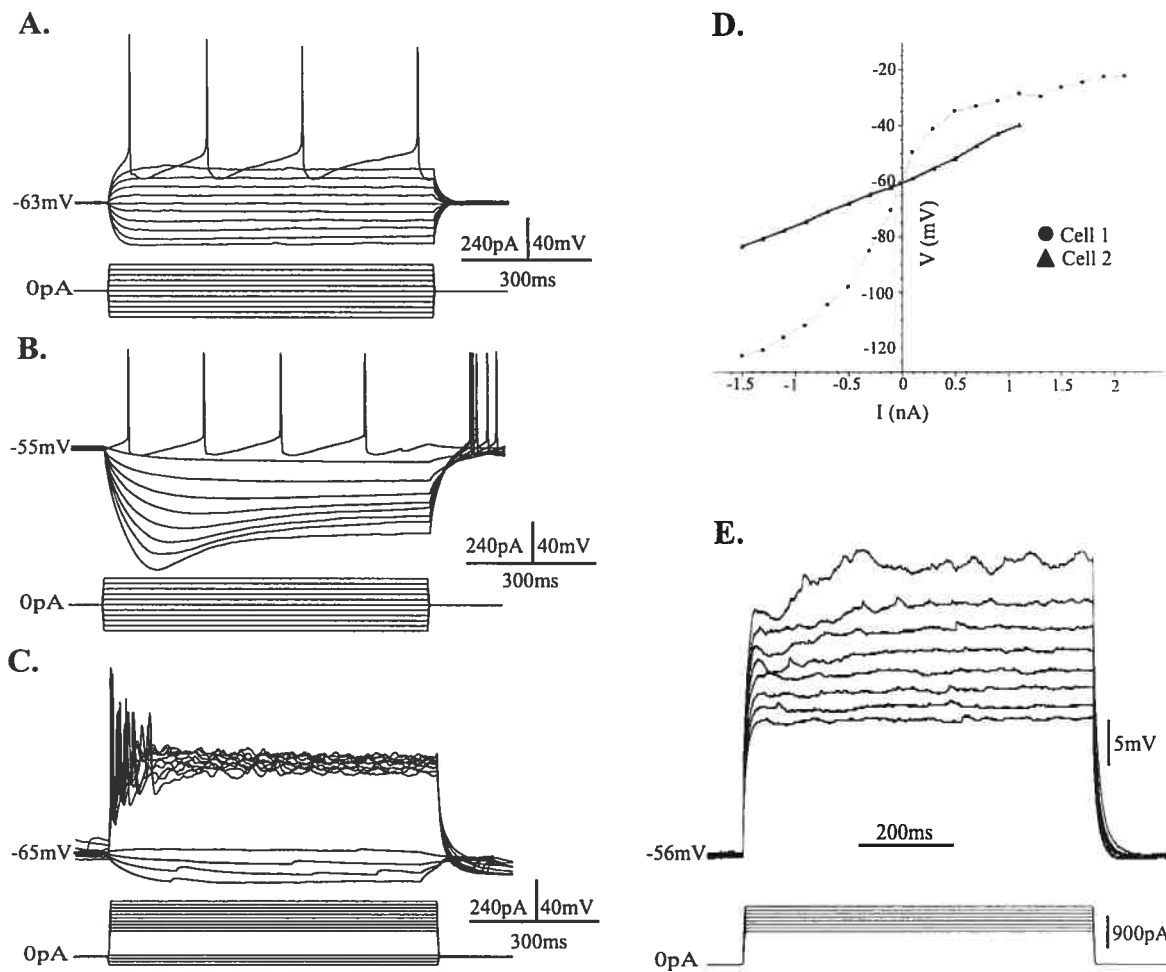


Figure 4

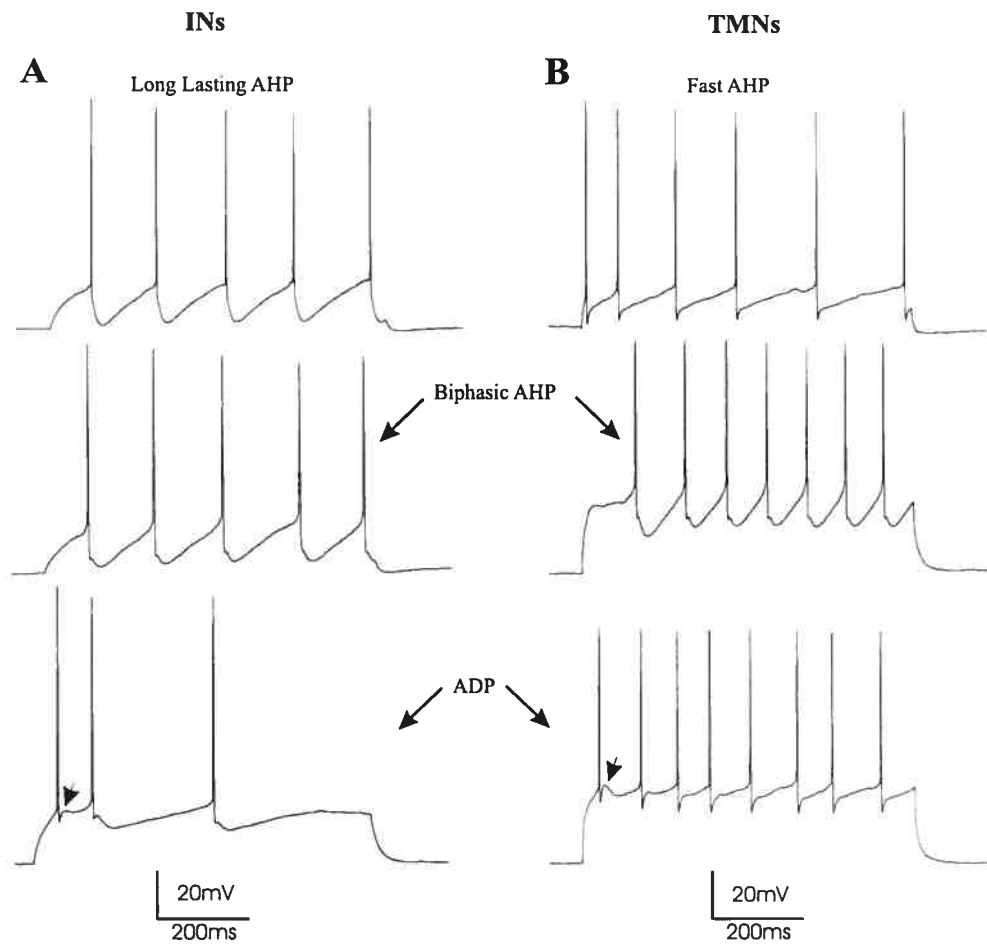
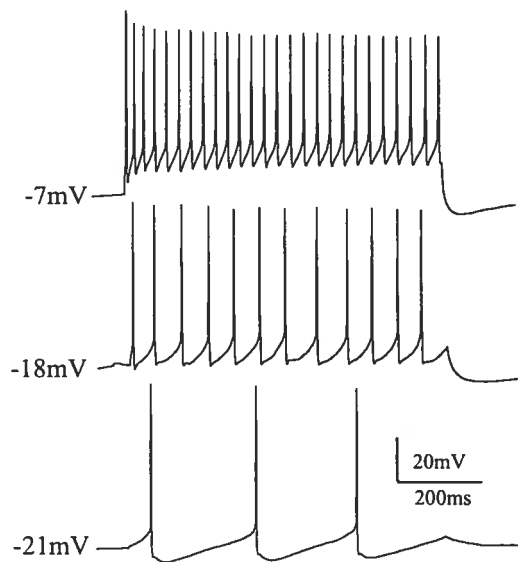


Figure 5

A.



B.

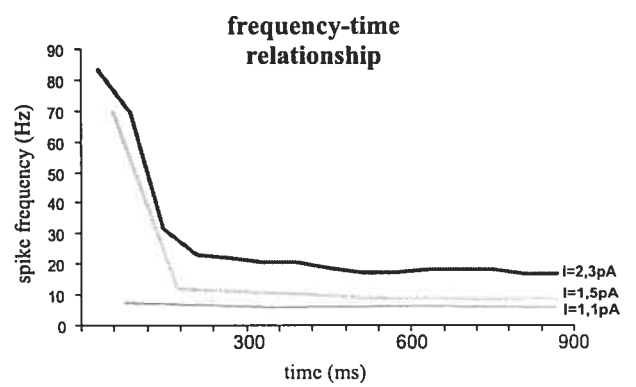
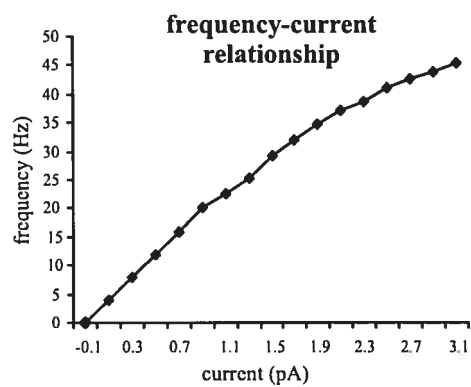
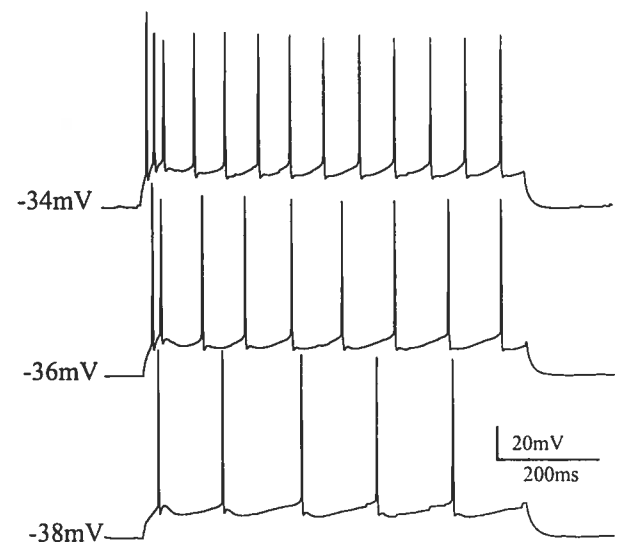


Figure 6

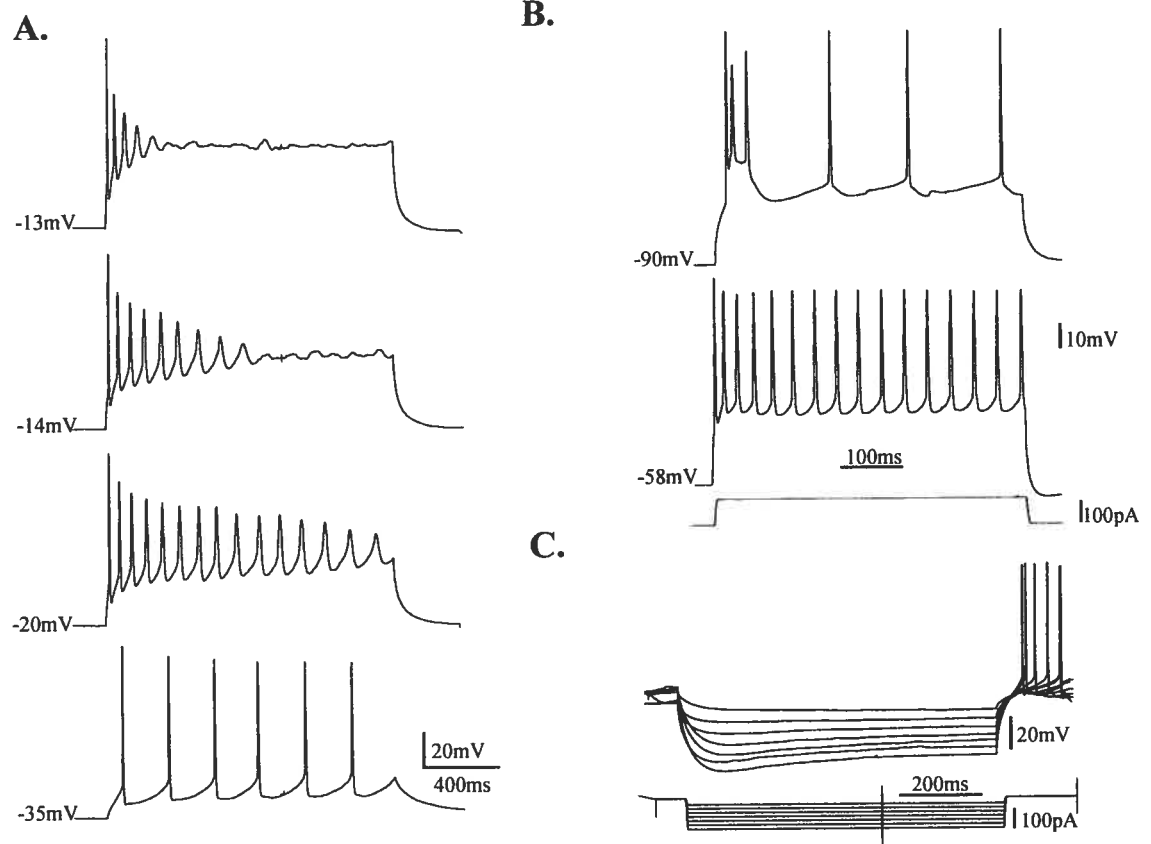


Figure 7

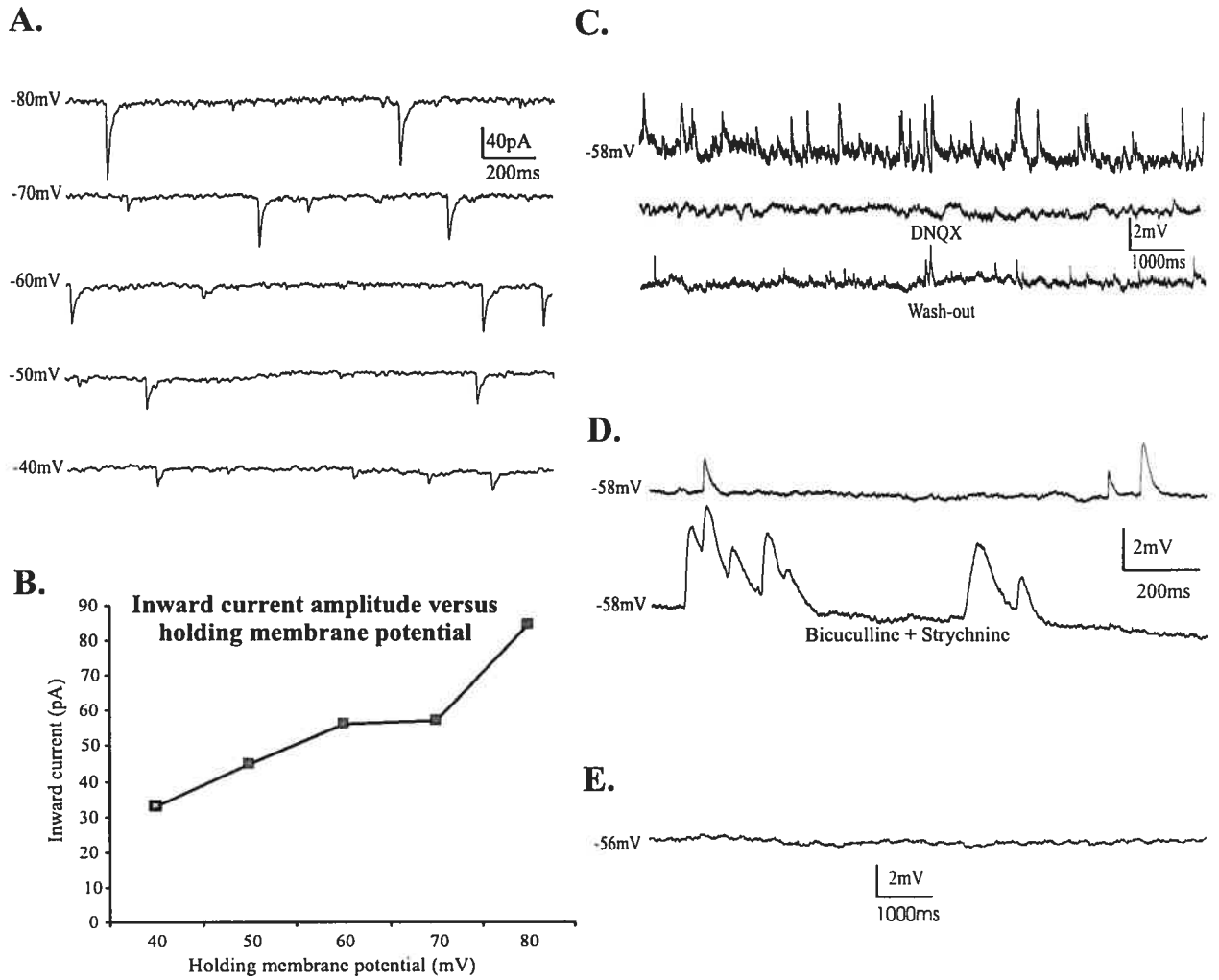
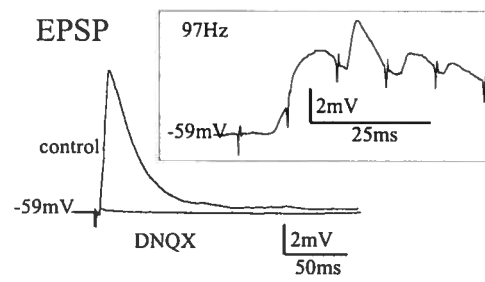
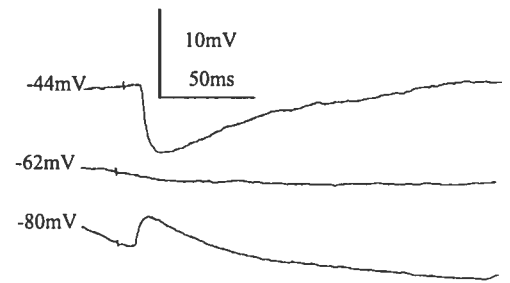
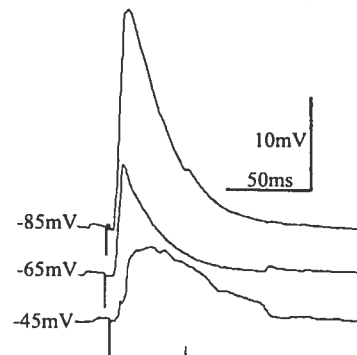
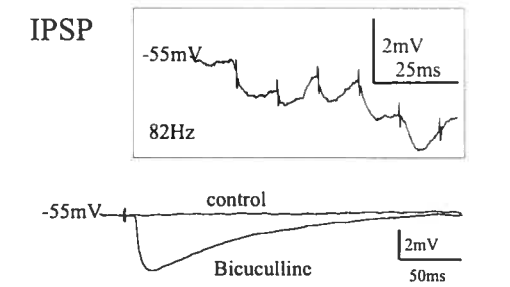


Figure 8

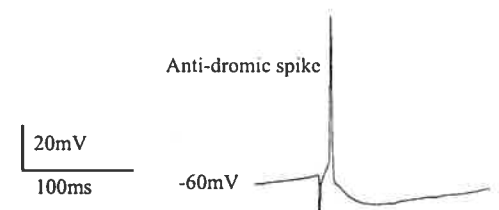
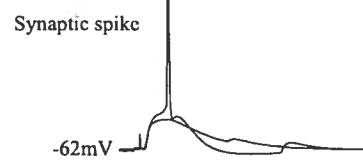
A. INs



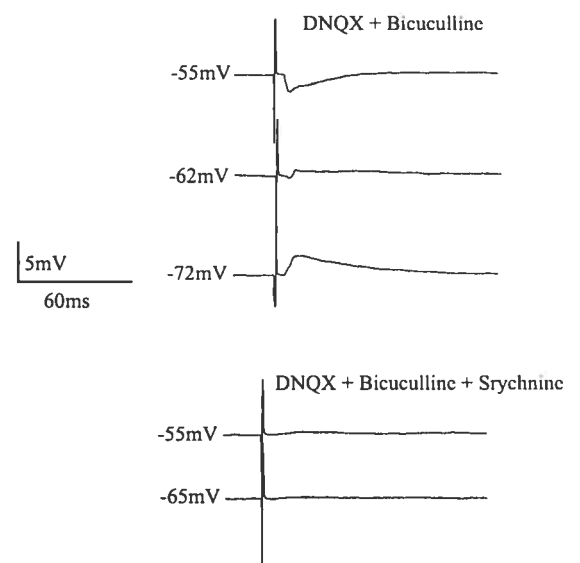
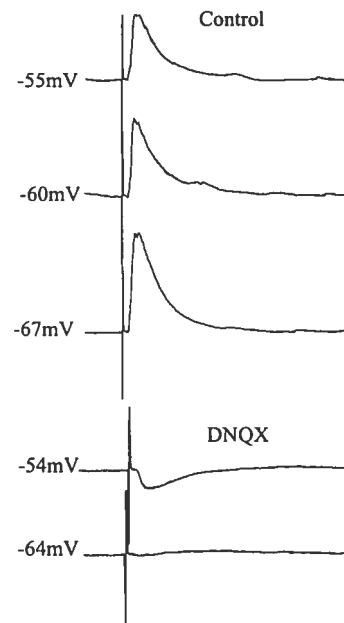
IPSP



B. INs



C. TMNs



REFERENCE LIST

1. Abudara V, Alvarez AF, Chase MH, Morales FR., Nitric oxide as an anterograde neurotransmitter in the trigeminal motor pool. *J Neurophysiol.* 2002 Jul;88(1):497-506.
2. Ali DW, Buss RR, Drapeau P., Properties of miniature glutamatergic EPSCs in neurons of the locomotor regions of the developing zebrafish. *J Neurophysiol.* 2000 Jan;83(1):181-91.
3. Appenteng K., Curtis JC, Grimwood PD, Min M-Y, Yang H-W. Modulation of transmission in reflex pathways of trigeminal motoneurons. In: Taylor A, Gladden MH, Durbura R (eds) *Alpha and gamma motor systems*, New York, 1995, pp 29-36.
4. Araki T, Yamano M, Murakami T, Wanaka A, Betz H, Tohyama M. Localization of glycine receptors in the rat central nervous system: an immunocytochemical analysis using monoclonal antibody. *Neuroscience.* 1988 May;25(2):613-24.
5. Bae YC, Choi BJ, Lee MG, Lee HJ, Park KP, Zhang LF, Honma S, Fukami H, Yoshida A, Ottersen OP, Shigenaga Y. Quantitative ultrastructural analysis of glycine- and gamma-aminobutyric acid-immunoreactive terminals on trigeminal alpha- and gamma-motoneuron somata in the rat. *J Comp Neurol.* 2002 Jan 21;442(4):308-19.
6. Batini C, Buisseret-Delmas C, Corvisier J., Horseradish peroxidase localization of masticatory muscle motoneurons in cat. *J Physiol (Paris).* 1976 Jun;72(3):301-9.

7. Bourque MJ, Kolta A. Properties and interconnections of trigeminal interneurons of the lateral pontine reticular formation in the rat. *J Neurophysiol.* 2001 Nov;86(5):2583-96.
8. Cameron WE, Fang H, Brozanski BS, Guthrie RD. The postnatal growth of motoneurons at three levels of the cat neuraxis. *Neurosci Lett.* 1989 Oct 9;104(3):274-80.
9. Card JP, Riley JN, Moore RY. The motor trigeminal nucleus of the rat: analysis of neuronal structure and the synaptic organization of noradrenergic afferents. *J Comp Neurol.* 1986 Aug 22;250(4):469-84.
10. Carette B., Characterization of carbachol-induced rhythmic bursting discharges in neurons from guinea pig lateral septum slices. *J Neurophysiol.* 1998 Sep;80(3):1042-55.
11. Chandler SH, Hsaio CF, Inoue T, Goldberg LJ., Electrophysiological properties of guinea pig trigeminal motoneurons recorded in vitro. *J Neurophysiol.* 1994 Jan;71(1):129-45.
12. Curtis JC, Appenteng K., The electrical geometry, electrical properties and synaptic connections onto rat V motoneurons in vitro. *J Physiol.* 1993 Jun;465:85-119.
13. Del Negro CA, Chandler SH. Physiological and theoretical analysis of K⁺ currents controlling discharge in neonatal rat mesencephalic trigeminal neurons. *J Neurophysiol.* 1997 Feb;77(2):537-53.
14. Del Negro CA, Chandler SH., Regulation of intrinsic and synaptic properties of neonatal rat trigeminal motoneurons by metabotropic glutamate receptors. *J Neurosci.* 1998 Nov 15;18(22):9216-26.

15. Del Negro CA, Hsiao CF, Chandler SH, Garfinkel A., Evidence for a novel bursting mechanism in rodent trigeminal neurons. *Biophys J.* 1998 Jul;75(1):174-82.
16. Del Negro CA, Hsiao CF, Chandler SH., Outward currents influencing bursting dynamics in guinea pig trigeminal motoneurons. *J Neurophysiol.* 1999 Apr;81(4):1478-85.
17. Denavit-Saubie M, Corvisier J. Cat trigeminal motor nucleus: rhythmic units firing in relation to opening movements of the mouth. *Brain Res.* 1972 May 26;40(2):500-3.
18. Donga R, Dubuc R, Kolta A, Lund JP. Evidence that the masticatory muscles receive a direct innervation from cell group k in the rabbit. *Neuroscience.* 1992 Aug;49(4):951-61.
19. Eccles JC, Eccles RM, Iggo A, Lundberg A. Electrophysiological investigations on Renshaw cells. *J Physiol (Paris).* 1961 Dec;159:461-78.
20. Goldberg LJ, Nakamura Y. 1968.. Lingually induced inhibition of masseteric motoneurons. *Experientia* 24: 371-373.
21. Grimwood PD, Appenteng K, Curtis JC. Monosynaptic EPSPs elicited by single interneurons and spindle afferents in trigeminal motoneurons of anaesthetized rats. *J Physiol.* 1992 Sep;455:641-62.
22. Grottel K, Zimny R, Jakielska D. The nucleus "k" of Meessen and Olszewski efferents to the cerebellar paramedian lobule: a retrograde tracing histochemical (HRP) study in the rabbit and the cat. *J Hirnforsch.* 1986;27(3):305-22.
23. Ho SM, Waite PM., Spontaneous activity in the perinatal trigeminal nucleus of the rat. *Neuroreport.* 1999 Feb 25;10(3):659-64.

24. Honma S, Varathan V, Wakisaka S., Postnatal development of synaptic inputs to rat masseter motoneurons. *Brain Res Dev Brain Res.* 2002 Nov 15;139(1):67-71. Erratum in: *Brain Res Dev Brain Res.* 2003 Feb 16;140(2):315..
25. Hsiao CF, Del Negro CA, Trueblood PR, Chandler SH., Ionic basis for serotonin-induced bistable membrane properties in guinea pig trigeminal motoneurons. *J Neurophysiol.* 1998 Jun;79(6):2847-56.
26. Hsiao CF, Trueblood PR, Levine MS, Chandler SH., Multiple effects of serotonin on membrane properties of trigeminal motoneurons in vitro. *J Neurophysiol.* 1997 Jun;77(6):2910-24.
27. Hsiao CF, Wu N, Levine MS, Chandler SH., Development and serotonergic modulation of NMDA bursting in rat trigeminal motoneurons. *J Neurophysiol.* 2002 Mar;87(3):1318-28.
28. Hunt CC, Kuno M. Properties of spinal interneurons. *J Physiol.* 1959 Sep 2;147:346-63.
29. Inoue M, Nozawa-Inoue K, Donga R, Yamada Y., Convergence of selected inputs from sensory afferents to trigeminal premotor neurons with possible projections to masseter motoneurons in the rabbit. *Brain Res.* 2002 Dec 6;957(1):183-91.
30. Inoue T, Itoh S, Kobayashi M, Kang Y, Matsuo R, Wakisaka S, Morimoto T., Serotonergic modulation of the hyperpolarizing spike afterpotential in rat jaw-closing motoneurons by PKA and PKC. *J Neurophysiol.* 1999 Aug;82(2):626-37.

31. Jacquin MF, Semba K, Egger MD, Rhoades RW. Organization of HRP-labeled trigeminal mandibular primary afferent neurons in the rat. *J Comp Neurol.* 1983 Apr 20;215(4):397-420.
32. Jüch PJ, Minkels RF, van Willigen JD. Inhibitory commissural connections of neurones in the trigeminal motor nucleus of the rat. *Arch Oral Biol.* 1993 Dec;38(12):1083-91.
33. Kamogawa H, Hiraba H, Manabe K, Sakanashi T, Sekiguchi T, Inage T. Morphological analysis of cat masseteric motoneurons after intracellular staining with horseradish peroxidase. *Brain Res.* 1998 Feb 23;785(1):18-23.
34. Kidokoro Y, Kubota K, Shuto S, Sumino R. 1968. Reflex organization of cat masticatory muscles. *J Neurophysiol* 31: 695-708.
35. Kobayashi M, Inoue T, Matsuo R, Masuda Y, Hidaka O, Kang Y, Morimoto T. Role of calcium conductances on spike afterpotentials in rat trigeminal motoneurons. *J Neurophysiol.* 1997 Jun;77(6):3273-83.
36. Kolta A, Westberg KG, Lund JP. Identification of brainstem interneurons projecting to the trigeminal motor nucleus and adjacent structures in the rabbit. *J Chem Neuroanat.* 2000 Jul;19(3):175-95.
37. Kolta A. In vitro investigation of synaptic relations between interneurons surrounding the trigeminal motor nucleus and masseteric motoneurons. *J Neurophysiol.* 1997 Sep;78(3):1720-5.
38. Kubota K, Narita N, Ohkubo K, Shibanaï S, Nagae K, Kubota M, Odagiri N, Kawamoto T., Morphological studies of the neuromuscular mechanism shifting from sucking to biting of mice. *Acta Anat (Basel).* 1988;133(3):200-8.
39. Li JL, Kaneko T, Nomura S, Mizuno N., Projections from the caudal spinal trigeminal nucleus to commissural interneurons in the supratrigeminal region:

- an electron microscope study in the rat. *Neurosci Lett.* 1998 Sep 18;254(1):57-60.
40. Li YQ, Takada M, Kaneko T, Mizuno N. GABAergic and glycinergic neurons projecting to the trigeminal motor nucleus: a double labeling study in the rat. *J Comp Neurol.* 1996 Sep 30;373(4):498-510.
41. Limwongse V, DeSantis M. Cell body locations and axonal pathways of neurons innervating muscles of mastication in the rat. *Am J Anat.* 1977 Aug;149(4):477-88.
42. Lingenhohl K, Friauf E. Sensory neurons and motoneurons of the jaw-closing reflex pathway in rats: a combined morphological and physiological study using the intracellular horseradish peroxidase technique. *Exp Brain Res.* 1991;83(2):385-96.
43. Lund JP. Mastication and its control by the brain stem. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1991;2(1):33-64. Review.
44. Luo PF, Li JS. Monosynaptic connections between neurons of trigeminal mesencephalic nucleus and jaw-closing motoneurons in the rat: an intracellular horseradish peroxidase labelling study. *Brain Res.* 1991 Sep 20;559(2):267-75.
45. Manaker S, Tischler LJ, Bigler TL, Morrison AR. Neurons of the motor trigeminal nucleus project to the hypoglossal nucleus in the rat. *Exp Brain Res.* 1992;90(2):262-70.
46. Marani E, Usunoff KG. The trigeminal motonucleus in man. *Arch Physiol Biochem.* 1998 Dec;106(5):346-54.

47. Mikhailov VV, Kuneev NV. Electrical properties of membranes of motor neurons innervating the masseter muscle in rats. *Neurophysiology*. 1981;13(3):270-4.
48. Miyata H, Sugiura T, Wada N, Kawai Y, Shigenaga Y. Morphological changes in the masseter muscle and its motoneurons during postnatal development. *Anat Rec*. 1996 Apr;244(4):520-8.
49. Mizuno N, Konishi A, Sato M., Localization of masticatory motoneurons in the cat and rat by means of retrograde axonal transport of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol*. 1975 Nov 1;164(1):105-15.
50. Mong FS, Chen YC, Lu CH. Dendritic ramifications of trigeminal motor neurons innervating jaw-closing muscles of rats. *J Neurol Sci*. 1988 Sep;86(2-3):251-64.
51. Moore J, Appenteng K., The membrane properties and firing characteristics of rat jaw-elevator motoneurons. *J Physiol*. 1990 Apr;423:137-53.
52. Moore JA, Appenteng K., The morphology and electrical geometry of rat jaw-elevator motoneurons. *J Physiol*. 1991;440:325-43.
53. Moritani M, Kida H, Nagase Y, Fukami H, Honma S., Takemura M, Masuda Y, Bae YC, Shigenaga Y, Yoshida A., Quantitative analysis of the dendritic architectures of single jaw-closing and jaw-opening motoneurons in cats. *Exp Brain Res*. 2003 Jun;150(3):265-75.
54. Nagase Y, Moritani M, Nakagawa S, Yoshida A, Takemura M, Zhang LF, Kida H, Shigenaga Y., Serotonergic axonal contacts on identified cat trigeminal motoneurons and their correlation with medullary raphe nucleus stimulation. *J Comp Neurol*. 1997 Aug 4;384(3):443-55.

55. O'Brien JA, Berger AJ. Cotransmission of GABA and glycine to brain stem motoneurons. *J Neurophysiol.* 1999 Sep;82(3):1638-41.
56. Ornung G, Shupliakov O, Linda H, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Ulfhake B, Cullheim S. Qualitative and quantitative analysis of glycine- and GABA-immunoreactive nerve terminals on motoneuron cell bodies in the cat spinal cord: a postembedding electron microscopic study. *J Comp Neurol.* 1996 Feb 12;365(3):413-26.
57. Parsons RL, Barstow KL, Scornik FS., Spontaneous miniature hyperpolarizations affect threshold for action potential generation in mudpuppy cardiac neurons. *J Neurophysiol.* 2002 Sep;88(3):1119-27.
58. Peever JH, Lai YY, Siegel JM., Excitatory effects of hypocretin-1 (orexin-A) in the trigeminal motor nucleus are reversed by NMDA antagonism. *J Neurophysiol.* 2003 May;89(5):2591-600. Epub 2003 Jan 15.
59. Petropoulos D, Lund JP, Dubuc R., A physiological study of brainstem and peripheral inputs to trigeminal motoneurons in lampreys. *Neuroscience.* 1999;91(1):379-89.
60. Rampon C, Luppi PH, Fort P, Peyron C, Jouvet M., Distribution of glycine-immunoreactive cell bodies and fibers in the rat brain. *Neuroscience.* 1996 Dec;75(3):737-55.
61. Rekling JC, Funk GD, Bayliss DA, Dong XW, Feldman JL., Synaptic control of motoneuronal excitability. *Physiol Rev.* 2000 Apr;80(2):767-852. Review.
62. Reuveni I, Friedman A, Amitai Y, and Gutnick MJ. Stepwise repolarization from Ca²⁺ plateaus in neocortical pyramidal cells: evidence for nonhomogeneous distribution of HVA Ca²⁺ in dendrites. *J Neurosci* 31: 4609-4621, 1993.

63. Rokx JT, Juch PJ, Van Willigen JD., On the bilateral innervation of masticatory muscles: a study with retrograde tracers. *J Anat.* 1985 Mar;140 (Pt 2):237-43.
64. Rokx JT, Liem RS, van Willigen JD. Identification of alpha and gamma trigeminal motoneurons by the vibratome paraplast technique for HRP histochemistry. *Acta Anat (Basel).* 1987;129(4):333-6.
65. Saad M, Dubuc R, Widmer CG, Westberg KG, Lund JP. Anatomical organization of efferent neurons innervating various regions of the rabbit masseter muscle. *J Comp Neurol.* 1997 Jul 14;383(4):428-38.
66. Sasamoto K., Motor nuclear representation of masticatory muscles in the rat. *Jpn J Physiol.* 1979;29(6):739-47.
67. Sawczuk A., Powers R.K. & Binder M.D., Intrinsic properties of motoneurons. Implications of muscle fatigue. 1995, pp.123-134.
68. Schrader LA, Tasker JG., Presynaptic modulation by metabotropic glutamate receptors of excitatory and inhibitory synaptic inputs to hypothalamic magnocellular neurons. *J Neurophysiol.* 1997 Feb;77(2):527-36.
69. Sessle BJ. Identification of alpha and gamma trigeminal motoneurons and effects of stimulation of amygdala, cerebellum, and cerebral cortex. *Exp Neurol.* 1977 Feb;54(2):303-22.
70. Shigenaga Y, Yoshida A, Mitsuhiro Y, Doe K, Suemune S. Morphological and functional properties of trigeminal nucleus oralis neurons projecting to the trigeminal motor nucleus of the cat. *Brain Res* 1988b, 416: 143-149.
71. Shigenaga Y, Yoshida A, Tsuru K, Mitsuhiro Y, Otani K, Cao CQ. Physiological and morphological characteristics of cat masticatory

- motoneurons--intracellular injection of HRP. *Brain Res.* 1988 Oct 4;461(2):238-56.
72. Shupliakov O, Ornung G, Brodin L, Ulfhake B, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Cullheim S. Immunocytochemical localization of amino acid neurotransmitter candidates in the ventral horn of the cat spinal cord: a light microscopic study. *Exp Brain Res.* 1993;96(3):404-18.
73. Taal W, Holstege JC. GABA and glycine frequently colocalize in terminals on cat spinal motoneurons. *Neuroreport.* 1994 Nov 21;5(17):2225-8.
74. Takahashi T, Inward rectification in neonatal rat spinal motoneurons. *J Physiol (Lond)* 1990 423: 47-62.
75. Ter Horst GJ, Copray JC, Van Willigen JD, Liem RS., Contralateral projections of cells in the motor trigeminal nucleus of the rat. *Neurosci Lett.* 1990 Jun 8;113(3):260-6.
76. Todd AJ, Watt C, Spike RC, Sieghart W. Colocalization of GABA, glycine, and their receptors at synapses in the rat spinal cord. *J Neurosci.* 1996 Feb 1;16(3):974-82.
77. Turman J Jr, Chandler SH., Immunohistochemical evidence for GABA and glycine-containing trigeminal premotoneurons in the guinea pig. *Synapse.* 1994 Sep;18(1):7-20.
78. Turman JE Jr, Chandler SH., Immunohistochemical localization of glutamate and glutaminase in guinea pig trigeminal premotoneurons. *Brain Res.* 1994 Jan 14;634(1):49-61.
79. Viana F, Bayliss DA, Berger AJ. Calcium conductances and their role in the firing behaviour of neonatal rat hypoglossal motoneurons. *J Neurophysiol.* 1993 Jun;69:2137-49.

80. Vornov JJ, Sutin J. Noradrenergic hyperinnervation of the motor trigeminal nucleus: alterations in membrane properties and responses to synaptic input. *J Neurosci.* 1986 Jan;6(1):30-7.
81. Widmer CG, Morris-Wiman JA, Calhoun JC. Development of trigeminal mesencephalic and motor nuclei in relation to masseter muscle innervation in mice. *Brain Res Dev Brain Res.* 1998 Jun 15;108(1-2):1-11.
82. Yabuta NH, Yasuda K, Nagase Y, Yoshida A, Fukunishi Y, Shigenaga Y. Light microscopic observations of the contacts made between two spindle afferent types and alpha-motoneurons in the cat trigeminal motor nucleus. *J Comp Neurol.* 1996 Oct 21;374(3):436-50.
83. Yang HW, Appenteng K, Batten TF., Ultrastructural subtypes of glutamate-immunoreactive terminals on rat trigeminal motoneurons and their relationships with GABA-immunoreactive terminals. *Exp Brain Res.* 1997 Mar;114(1):99-116.
84. Yoshida A, Fukami H, Nagase Y, Appenteng K, Honma S, Zhang LF, Bae YC, Shigenaga Y., Quantitative analysis of synaptic contacts made between functionally identified oralis neurons and trigeminal motoneurons in cats. *J Neurosci.* 2001 Aug 15;21(16):6298-307.
85. Yuste R, Gutnick MJ, Saar D, Delaney KR, and Tank DW. Ca²⁺ accumulation in dendrites of neocortical pyramidal neurons: an apical band and evidence for two functional compartments. *Neuron* 13: 23-43, 1994.

Deuxième chapitre

(Suite)

**« INTERNEURONS WITHIN THE TRIGEMINAL
MOTOR NUCLEUS: MORPHOLOGICAL AND
IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERIZATION »**

*(sous la forme « prêt à être soumis » à la revue *European**

Journal of Neuroscience)

**Interneurons within the trigeminal motor nucleus: morphological
and immunohistochemical characterization**

S. MEDDAHI¹, A. KOLTA^{1,2}, F. AUCLAIR¹

¹Centre de recherche en sciences neurologiques, Université de Montréal, Montréal, Québec H3C 3J7, CANADA.

² Faculté de Médecine dentaire, Université de Montréal, Montréal, Québec H3C 3J7, CANADA.

Keywords: trigeminal motor nucleus, interneurons, rat, morphology, immunohistochemistry

Correspondence:

Dr. A. Kolta,
Université de Montréal,
CRSN, Pavillon Paul-G. Desmarais
C.P. 6128, Succ. Centre-Ville
Montréal, Québec, CANADA
H3C 3J7.

Tel: (514)-343-7112

Fax: (514)-343-2111

e-mail: arlette.kolta@umontreal.ca

SUMMARY

The trigeminal nucleus (NVmot) consists of two functionally distinct populations of neurons: 1) motoneurons supplying the jaw muscles (TMNs); and 2) small interneurons (INs). Neuroanatomical studies were performed on rats in which TMNs were retrogradely labeled by injections of cholera toxin conjugated to Alexa 488 into the masseter muscles. We examined the size and distribution of these two populations with Nissl stainings. The TMNs were densely stained and could be subdivided in two populations on the basis of their somatic size: alpha-TMNs (large) that were uniformly distributed in the nucleus and gamma-TMNs (small) that were located at the margins of the nucleus. The INs were small, uniformly distributed and had a pale labeling. They accounted for 26% of the neurons of the nucleus. Using, immunohistochemistry, we showed that some of these putative INs are immunoreactive to GABA, glycine or glutamate. To investigate the commissural projections of these INs, we conducted double-labeling experiments combining the retrograde labeling of TMNs to injections of the dye Dil in one of the NVmot in the slice. Neurons that were retrogradely labeled with Dil were found in the contralateral NVmot and were not labeled by the tracer injected in the muscle indicating that INs have commissural fibers linking the two NVmot. Using intracellular injections of biocytin, we found the INs to be morphologically subdivided in two groups: 1) fusiform small cells with 2-4 stem dendrites and a bipolar dendritic arbor extending in a medial-lateral direction; 2) triangular, oval, round or polygonal small cells with a fan-like dendritic arbor oriented either dorsally or ventrally. The axonal projections of both types were seen to reach the peri-trigeminal area, the trigeminal principal nucleus, the facial nucleus or to travel toward the midline and cross it.

INTRODUCTION

The trigeminal motor nucleus (NVmot) contains the somata of neurons that send their axons in the fifth cranial nerve and providing motor innervation of the jaw muscles. These cells, the trigeminal motoneurons (TMNs), use acetylcholine as neurotransmitter (see Olsson et al. 1989 for review). Electrophysiological studies have provided strong evidence for the existence of a second population of neurons in this nucleus that use GABA, glycine and glutamate as neurotransmitter (Kolta 1997, Bourque et Kolta 2000). Several anatomical studies (Mizuno et al. 1983, Travers and Norgren 1983) have also provided indirect evidence of their existence, but no detailed description of their morphological and anatomical features has been carried on. In contrast, considerable data is available for TMNs. Marani et al. (1998) discerned two morphological types of neurons in Nissl stained sections of NVmot in the man: big multipolar cells (α motoneurons) and small fusiform cells (interneurons and γ motoneurons), but did not report on the relative proportion of each type, nor their spatial distribution. A few immunohistochemistry investigations reported that NVmot contains some GABAergic, glycinergic and glutamatergic neurons (Ginestal et al. 1993, Rampon et al. 1996, Kolta et al. 2000), but these findings are still controversial since one study reported absence of GABAergic cells in NVmot (Saha et al. 1991). There are also circumstantial reports of commissural fibers originating from small bipolar interneurons situated within the NVmot and linking the dorsal parts of NVmot bilaterally (Kolta et al. 1997, Ter Horst 1990). All these reports point to the existence of interneurons (INs) in NVmot, but none provided conclusive evidence by ruling out the possibility that the small fusiform neurons may be γ -TMNs. Therefore, we set out to investigate these presumably commissural INs that

may play a crucial role in bilateral coordination of the jaw muscles by: 1) describing their distribution, number and soma size using Nissl staining; 2) assessing their neurotransmitters content by means of immunohistochemistry; 3) proving that the commissural fibers originate from them and not from axon collaterals of TMNs by combining retrograde labeling of these motoneurons and commissural INs with injections of the dye Dil in the contralateral NVmot in the slice; and 4) fully describing their morphological features by filling them intracellularly with biocytin.

MATERIAL AND METHODS

Labeling of the trigeminal motoneurons:

The procedures used to label TMNs were those described in details before (Kolta 1997, Bourque & Kolta 2001). In brief, a 5 μ l-10 solution of retrograde tracer (Cholera toxin conjugated to Alexa Fluor 488, Molecular Probes, 0.5 mg/ml) is injected in the masseter muscle of 1-2 day old Sprague-Dawley rats that were anesthetized by hypothermia. Few days were given to allow the tracer to diffuse.

Perfusion fixation and tissue processing:

Anesthesia was induced by sodium pentobarbital (50mg/Kg; I.P.) in all rats. Then they were perfused first with PBS for a few minutes, then with a fixative solution for 20 minutes through the ascending aorta (4% paraformaldehyde for Nissl staining; mixture of 0.1% glutaraldehyde- 2% paraformaldehyde for

immunohistochemistry against GABA and glutamate; 0.5% glutaraldehyde-4% paraformaldehyde for immunohistochemistry against glycine). The brain was removed and a block dissected extending from the caudal part of the fifth cervical segment to its rostral extreme was prepared and soaked in 30% sucrose in PB until it sank. The block was then frozen and transversally sectioned on a cryostat to be used for Nissl staining (30 μ m thickness) and for immunohistochemistry (40 μ m thickness).

The rats are killed by decapitation when they are 5-14 days old. The brain was removed quickly and immersed in cold (4°C), sucrose-based artificial cerebrospinal fluid (ACSF, in mM: 225 sucrose, 5 KCl, 1.25 KH₂PO₄, 4 MgSO₄, 0.2 CaCl₂, 20 NaHCO₃, and 10 D-glucose) that has been bubbled with 95% O₂ – 5% CO₂. Transverse sections of 300 μ m thickness were cut with a vibratome (Leica VT1000s). Slices containing the NVmot were transferred into a submerged-type recording chamber and continuously perfused (2ml/min) with oxygenated (mixture of 95% O₂ and 5% CO₂) ACSF (in mM: 125 NaCl, 5 KCl, 1.25 KH₂PO₄, 1.3 MgSO₄, 2.4 CaCl₂, 20 NaHCO₃, and 10 D-glucose) at room temperature.

Nissl stainings:

Cryosections were mounted on slides and stained with cresyl violet. Tissue sections were dehydrated in graded alcohol, cleared with xylol and mounted in mounting medium (Permount, Fisher Scientific). We examined the number and the distribution of the different neurons constituting the masseteric pool of NVmot (NVmot-MASS) in every other section throughout its entire rostro-caudal limits.

Immunohistochemistry examinations:

Cryostat sections at the level of NVmot were incubated in sequence with the following reagents: PBS (3 times), normal goat serum (5%), rabbit anti-serum raised against GABA (Sigma), glutamate (Sigma) or glycine (Chemicon International). The following dilutions were used: 1:500, 1:800 and 1:400 for GABA, glutamate and glycine respectively. The sections were rinsed with PBS (3 times) and incubated for 60 minutes with secondary antibodies diluted 1:500 (4% normal goat serum, 0.1% Triton in PBS). They were rinsed again and treated with Streptavidin-Texas Red (1:200 in PBS). A final rinsing was made in PBS. Sections were mounted on gelatinized slides, dehydrated in graded alcohol, cleared in xylene and coverslipped with Entellan. During each experiment, random sections were used as negative controls. They were treated to every step of histochemical processing except exposure to primary antibody.

DiI injection:

In an other set of experiments, we combined the Alexa Fluor 488- cholera toxin retrograde labeling of TMNs innervating the masseter on one side of the jaw with injections of the carbocyanine dye DiI C₁₈ (1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate ; Molecular Probes) in the contralateral NVmot-MASS in the slice in order to reveal afferents to the nucleus. Transverse sections of 300µm thickness containing the NVmot-MASS were cut with a vibratome (Leica VT1000s) and fixed with 4% paraformaldehyde overnight. Crystals of DiI were inserted in the NVmot-MASS contralateral to the muscle injected with Alexa Fluor 488-cholera toxin NVmot-MASS. Injections were small and restricted to NVmot-MASS. All cases where crystals spread or contaminated

areas adjacent to NVmot-MASS were rejected. Slices were maintained at 38°C or room temperature for up to 70 days to facilitate diffusion of the dye. Afterwards, they were rinsed in PBS, mounted on slides in Gel Mount (Biomedex), viewed using epifluorescence microscopy with the appropriate filters, and imaged with a color camera (Sony). Each field was imaged with both filters for Alexa Fluor 488- cholera toxin and for DiI.

Biocytin labeling and tissue processing:

In the present study 47 INs were selected from a previous investigation of their electrophysiological properties (see companion paper) in which they were filled with biocytin (1%; Sigma) during whole-cell patch recordings. At the end of the recording session, the slices were fixed in 4% paraformaldehyde and processed to reveal the biocytin filled cells using standard techniques. The slices were first pretreated with 0.5% H₂O₂, rinsed in PB, and incubated overnight in an avidin-biocytin complex (ABC kit; Vector Laboratories. After 5 min rinse on the following day, they were incubated with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; 0.05%) and H₂O₂ (0.03%) in PB buffer. The intensity of the reaction product was visually controlled during the incubation and the reaction was stopped with three consecutive washouts in PBS and finally with PB. The slices were mounted with Entellan after dehydration and were examined under light microscopy. When determining the soma diameter, no correction was made for shrinkage induced by the histological procedures.

Fourteen other INs were also recovered and identified after biocytin staining. They were immunostained with antisera to GABA, glycine or glutamate using the protocol described above for immunohistochemistry.

RESULTS

Nissl stainings:

Thirteen animals were used for Nissl stainings. There were no significant differences between these animals and therefore only the results from one animal are presented here. Fig.1 shows the same masseteric pool of TMNs in NVmot (NVmot-MASS) viewed under fluorescence and after Nissl staining at low magnification (A and B respectively) and higher magnification (C and D respectively). Three populations were distinguished in Nissl stained sections: densely stained cells that under epi-fluorescence almost always appeared to be retrogradely labeled from the periphery (arrow heads in C and D) and small pale cells (arrows in D) that were never labeled under epi-fluorescence. The latter were considered as INs. The former were further subdivided into large multipolar cells and small fusiform cells corresponding to α -TMNs (Fig. 1 C and D arrowheads) and γ -TMNs respectively. Only 3.5% of α -TMNs detected in Nissl staining (large multipolar cells) were not retrogradely labeled with Alexa Fluor 448- cholera toxin indicating that this method is fairly reliable to distinguish TMNs from INs. Fig 1E shows soma size (long axis) distribution of all neurons counted in one section of NVmot-MASS. Interneurons corresponding to the population with smallest size (black) are clearly distinct from α -TMNs (green), but some overlap exists between γ -TMNs and the two other populations. Fig 1F shows the spatial distribution of the three types of neurons within NVmot-MASS in one section. Gamma-TMNs were located marginally in the nucleus while INs and α -TMNs were uniformly distributed within NVmot-MASS.

This distribution was also uniform throughout the entire rostro-caudal extent of NVmot-MASS. Interneurons accounted for 26% of total number of neurons in NVmot-MASS whereas γ -TMNs and α -TMNs represented 15% and 59% of the population respectively.

Immunohistochemistry:

Immunohistochemistry against GABA was carried on 22 slices from 2 animals each containing 2 retrogradely labeled NVmot-MASS nuclei. A total of 46 small ($12 \pm 0.83\mu\text{m}$ per $13.8 \pm 1.6\mu\text{m}$), ovoid or round GABA-immunoreactive neurons were found in 44 nuclei analyzed (0 to 5 cells/ nucleus; Fig.2 A-B). Their medio-lateral and dorso-ventral distributions seemed to be homogenous. The control sections resulted in no immuno-reaction.

Sixteen slices containing a total of 24 NVmot-MASS were immunostained against glutamate. Small ($16.1 \pm 0.58\mu\text{m}$ per $10.1 \pm 0.3\mu\text{m}$) glutamate immunopositive neurons with fusiform, ovoid or round perikarya were observed within NVmot-MASS (Fig.2 C-D). Their number ranged between 0 and 10 per nucleus. Although, these glutamatergic cells were found throughout NVmot-MASS, they tended to be concentrated in its dorsal part. There was no immuno-reaction in control sections.

Immunohistochemistry against GABA, glutamate and glycine was also carried on 14 INs that were filled with biocytin and examined under confocal microscopy. One cell was found to be glycinergic (Fig.2 E) and another one to be GABAergic (not shown). The glycinergic cell had a fusiform ($13,9\mu\text{m}$ by $9,1\mu\text{m}$) soma from which immerge 3 primary dendrites extending medially and ventrally

respectively. One thin process, considered as the axon, was seen traveling medio-ventrally. This neuron was found in a medio-dorsal position of NVmot-MASS.

Commissural fibers:

Deposits of DiI crystals were made in 138 NVmot-MASS obtained from 46 animals (Fig. 3A). Fine commissural fibers exiting the nucleus were seen in all cases (Fig. 3B). In 18 cases, these fibers could be tracked up to the contralateral NVmot-MASS, which had been retrogradely labeled with injections of Alexa Fluor 488 conjugated to Cholera toxin in the masseter muscle. The DiI labeled fibers originated from small cells that were retrogradely labeled with DiI, but not with Alexa Fluor-Cholera toxin (Fig.3 E-F). These cells could be found throughout NVmot-MASS, but tended to concentrate in the dorso-medial part (Fig.3 C-D). Twenty to twenty five such neurons could be found per nucleus, but this is by no means an estimation of the entire population because the injections of DiI crystals were intentionally kept very small to avoid diffusion to and contamination of the surrounding areas.

Morphological examination of biocytin-filled interneurons:

Two types of interneurons classified on morphological basis:

A total of 47 cells visualized under infrared microscopy and characterized as INs on the basis of electrophysiological criteria (see companion paper) were filled with biocytin. They all had well stained soma, dendrites, and axonal arbors. Fifty percent of the cells had a fusiform or oval shaped soma and were bipolar in the medio-lateral plan. A primary dendrite emerged from each pole and ramified medially and laterally in the transverse plan (Fig.4 A). The other 50% were

composed of triangular, round, oval or polygonal cells that had dendritic trees extending in a fan-like fashion on a transverse plan. The majority of these neurons (71%) had their dendrites polarized dorsally (Fig.4B1), while a minority (29%) had them oriented ventrally (Fig.4B2).

Extent of the dendritic arbors:

Table1 summarizes the basic morphological features of each type of neurons. In general, 2-4 dendrites emanated from the soma of these cells. The dendritic tree had a simple configuration with little or no overlap between branches, but extend far beyond the boundaries of NVmot. Figure 5 A shows a representative bipolar interneuron extending its dendritic arbor outside NVmot defined by Nissl staining, into the medial peritrigeminal area (mPeri) and the intertrigeminal area laterally. The longest dendrites were on average $493.2 \pm 40.3\mu\text{m}$ from the soma. The trigeminal motor nucleus is surrounded by a shell of interneurons which is subdivided in four regions: the supratrigeminal area (SupV), the parvocellular reticular formation (PCRt), the inter-trigeminal area (IntV) and the medial peri-trigeminal area (mPeriV) that are located dorsally, ventrally, laterally and medially respectively and that we refer to collectively as the peritrigeminal area (PeriV). The dendritic trees of the biocytin-filled INs reached into all these areas with different degrees with mPeri been the most targeted area and PCRt the least (fig. 5 B). The vast majority of cells also had dendrites that remained confined within NVmot (fig. 5B).

Position and axonal projections of labeled interneurons:

The position and axonal projection of the 47 INs and 8 masseteric TMNs filled with biocytin are shown in Fig.6. The filled INs were distributed throughout

NVmot-MASS, but were much more concentrated in the dorsal half of the nucleus. The axons of these INs reached all divisions of PeriV except PCRt. In several cases, the axons headed medially, but in only 4 cases did they cross the midline. The facial nucleus (NVII) and the main sensory nucleus (NVsnpr) were the axonal targets in 3 and 4 cases respectively. In 14 cells, the axon remained in NVmot. All axons faded within the above-mentioned regions, making it impossible to identify further target zones. Local collaterals were observed in 7 axons. These collaterals generally ended in the same region except in 3 cases where they were found in NVmot and NVsnpr, ipsi- and contra-lateral mPeriV and mPeriV and NVmot.

In contrast, masseteric TMNs had axons that did not give any collateral and headed directly into the motor root ventral and lateral to NVmot.

DISCUSSION

The present study provides strong evidence for the existence of three neuronal populations within NVmot-MASS: γ -TMNs, α -TMNs, and INs. The 3 types of neurons can be distinguished on the basis of their spatial distribution within the nucleus, their soma size, their morphology and their neurochemical content.

In Nissl stained sections, TMNs could be easily distinguished from INs by the density of their coloration. Cells assigned to one group or the other were further examined under epifluorescence microscopy to verify the presence (TMNs) or absence (INs) of retrograde labeling from the periphery. The presence and distribution of γ -TMNs in NVmot-MASS is not clearly established. Earlier studies (Cooper et al. 1960, Alvarado-Mallart et al. 1975, Lund et al. 1978) have reported the existence of small motoneurons supplying intrafusal fibers of the masseter that were located at the margin of the masseteric pool (Card et al. 1986, Shigenaga et al. 1988). Our results are consistent with these findings and not with those of Marani and coworkers (1998), who found γ -TMNs dispersed throughout NVmot in man. This discrepancy could be due either to species difference or to the fact that they may have mistaken some interneurons for motoneurons. Our results clearly indicate that the INs outnumber γ -TMNs. The ratio of γ -TMNs to α -TMNs was 1:3.9. This is comparable to the ratio of 1:3.5 reported by Sessle et al. (1977).

The somatic size and morphology was another criteria used to distinguish between the 3 types of neurons. As previously reported by others, the multipolar somata of α -TMNs were larger than the fusiform perikarya of γ -TMNs. (Yabuta et al. 1996, Shigenaga et al. 1988, Ter Horst et al. 1987). Interneurons had an even smaller size of soma than γ -TMNs, consistent with previous findings (Bourque et

Kolta 2001, Ter Horst et al. 1990). There is little overlap between the sizes of α -TMNs and INs, but some overlap exists between γ -TMNs and the 2 other populations. The diameter of α -TMNs increased rapidly between 5 and 21 days of age, while the diameter of γ -TMNs remained relatively constant during that period because their maturation is achieved earlier than that of α -TMNs (Miyata et al. 1996); suggesting that overlap in soma size is likely to diminish with age.

Biocytin filled neurons:

The INs filled with biocytin in this study have a morphology similar to that of local trigeminal interneurons described by Bourque and Kolta (2001). This strengthens the hypothesis that they are part of a matrix of interneurons encompassing the cytoarchitecturally similar areas of PeriV (Kuypers 1958, Mizuno 1970, Torvik 1956) and extending between the Vth and VIIth motor nuclei.

Two main morphological types were identified in this study. Fusiform cells with dendrites extending in a bipolar fashion along the medio-lateral axis and triangular cells with fan shaped dendritic tree extending either dorsally or ventrally in the vertical axis. The basic electrophysiological properties and synaptic inputs of these neurons are described in the companion paper. No major differences were observed between the physiological characteristics of the two types, except the observation that nearly all of the triangular neurons (17/19) had spontaneous miniature postsynaptic potentials at rest, whereas only 52% of the fusiform type displayed this type of activity.

Both morphological types had simple dendritic arborizations with little or no overlap. The dendrites sometimes reached out of NVmot into PeriV, but often remained confined within the nucleus. A few dendrites extended in PCRt, but these

were rare. Many areas are known to project to NVmot. These have traditionally been thought to contact TMNs, but only in a few cases were double labelling studies conducted to demonstrate that the postsynaptic targets were motoneurons. The inputs could conceivably terminate on INs too. Part of the synaptic inputs of the INs may also be received outside NVmot on distal dendrites reaching PeriV. These inputs would be expected to be slower and smaller. Some of the longer latencies responses reported in the companion paper may arise from inputs occurring on distal portions of dendrites.

The axonal projections of the INs and the masseteric TMNs filled with biocytin were also examined. An important difference between the axonal projection of the INs and those of TMNs was the presence (for the former) or absence (for the latter) of collaterals. This is consistent with the report made by Shigenaga et al. (1988a) about one interneuron that was injected with HRP and that was found to have two axon collaterals. TMNs, on the other hand, lack such collaterals as has been reported previously (Kamogawa et al. 1998, Shigenaga et al. 1988a) and as was presumed on the basis of earlier observations of absence of Renshaw inhibition in the trigeminal system (Kidokoro et al. 1968a, Nakamura et al. 1980). The axonal course of the TMNs was quite distinct from that of INs and corresponds to existing reports. The axons of the masseteric TMNs ran directly ventrolaterally to leave NVmot via the motor root in contrast to the axons of jaw-opening motoneurons (Szekely & Matesz 1982, Nakamura & Mizuno 1983) or those of facial motoneurons (Friauf et al. 1986) that project in a long loop first dorsally and form a genu before bending ventrolaterally toward the trigeminal and facial motor roots respectively.

The axons of INs coursed in various directions and reached different trigeminal areas including IntV and NVsnpr laterally to NVmot, SupV dorsally;

mPeriV medially and the facial nucleus ventrally. Many crossed the midline and reached the contralateral medial reticular formation. In a large number of cases, the axons did not exit NVmot. The projections described here are by no means exhaustive because of limitations inherent to use of slice preparations. For instance, Roste (1989) and Manaker et al. (1992) provided anatomical evidence for projections from NVmot to the cerebellum and to the hypoglossal nucleus respectively that are likely to originate from interneurons. Another limitation of the methods used is the inability to determine whether the axons tracked had reached their final destination or were coursing through these areas since part of the axons may have been cut. However, we have ample evidence from a previous electrophysiological investigation (Bourque and Kolta 2001) that interneurons surrounding NVmot receive synaptic inputs from neurons located within NVmot, presumably the INs. We did not obtain any evidence of axonal projection towards PCRt, the area of the reticular formation ventral to NVomt, although synaptic inputs were elicited in neurons of this area following stimulation of NVomt (see Bourque and Kolta, 2001). However, only one of the seven EPSPs recorded in that area occurred at a latency sufficiently short to be considered as potentially monosynaptic.

Intracellular biocytin filling may be a suitable method for examining short local axonal projections, but is not adequate for long-range projections because the preparation needs to be maintained alive for the time necessary for the tracer to fill the processes of the injected cell which is sometimes difficult *in vitro*. Therefore, the longest projections are likely to be underrepresented with this method. In the slice preparation, the longest projections are probably the commissural projections. To better investigate these, we proceeded with injections of DiI crystals into one NVmot and screened the contralateral NVmot for retrogradely labelled cell bodies. As in all

previous experiments, masseteric TMNs were marked with Alexa-fluor 488 conjugated to cholera-toxin. Our DiI injections showed no evidence of double labelled neurons in the contralateral NVmot, strongly suggesting that the commissural fibers seen previously originate from interneurons within NVmot and not from a-TMNs or g-TMNs by means of collaterals. Most of the neurons retrogradely labeled with DiI were found in the dorsomedial subdivision of the masseteric trigeminal pool. In the rat, other anatomical studies (Mizuno et al. 1983, Travers and Norgren 1983, Ter Horst 1990, Kolta 1997, Bourque and Kolta 2001), as well as physiological studies (Jüch et al. 1993, Kolta et al. 1997) had suggested the existence of commissural fibers linking the dorsal parts of both NVmot without clearly describing the location and type of neurons to which belonged the projections. Thus, our results confirm these previous findings and provide additional details about the cells of origin of the commissural fibers and their location.

Interestingly, all divisions of PeriV also contain neurons that sends commissural projections to NVmot and/or their contralateral counterpart (Rokx et al. 1986, Appenteng et al. 1990, Donga and Lund 1991, Turman et al. 1994, Bourque and Kolta 2001, Li et al. 2002, Inoue et al. 2002, Desmond et al. 1983, Jerge et al. 1963a, Kidokoro et al. 1968b, Minkels et al. 1995, Ohta et al. 1986, Takata et al. 1970), adding another similarity between these neurons and NVmot interneurons.

There is also evidence of commissural interneurons within NVmot in other species. Petropoulos et al. (1999) recorded large EPSPs in the NVmot of lampreys following stimulation of the contralateral NVmot, while Kolta et al. (2000) described in the rabbit neurons in NVmot that were marked by injections of retrograde tracer in the contralateral NVmot and that were immunoreactive to glutamate or GABA. Based on all these previous observations as well as our results, we confirm that the

bilateral connection of NVmot arising from the nucleus itself is by means of axonal projections of the INs within the nucleus. The INs can therefore participate to the bilateral coordination of the jaw muscles involved in feeding behaviour.

Immunohistochemistry:

In a previous electrophysiological study (Bourque and Kolta, 2001), we reported about postsynaptic potentials recorded in PeriV interneurons following electrical stimulation of NVmot. These potentials were also observed following glutamate injection at the site of electrical stimulation indicating that they resulted from activation of local neurons rather than passing by fibers. Most of these PSPs occurred at short latency and could be blocked by antagonists acting on AMPA/kainate, GABA_A or glycine receptors. The immunohistochemical findings reported here confirm these previous observations and provide direct evidence of the presence of interneurons containing amino-acid neurotransmitters in NVmot. GABAergic neurons were found throughout the nucleus, whereas glutamatergic neurons tended to be clustered in dorsal part of the nucleus. Only 2 of 14 biocytin-filled INs were successfully stained histochemically with antisera against GABA, glutamate and glycine (used randomly). The lack of immuno-reactivity in the 12 remaining cells cannot be interpreted as a negative results because of several limits of the methods. First, only one cell per slice was stained and only one antibody could be tested per section; it may not necessarily have been the right one. Second, the location of several of these cells was deep in the tissue and it is well known that the penetration of the antibody is limited to the first 50-100µm. Third, even with confocal microscopy, visualization of a faint fluorescent signal is difficult in thick

sections. The number of glutamatergic and GABAergic neurons detected immunohistochemically is much lower than the estimated number of INs on the basis of Nissl counts when using immunofluorescence. The unaccounted INs may use a neurotransmitter different from those tested. This is difficult to ascertain due to the limitations of the methods used. Immunofluorescence is not very sensitive, but was used to ensure that immunoreactive cells were not labelled by the injection of cholera-toxin in the periphery. Nevertheless, our findings corroborate those made by others in the rat and the rabbit who reported similarly scarce number of GABAergic (Ginestal et al. 1993, Kolta et al. 2000, Li et al. 1996), glycinergic (Rampon et al. 1996, Li et al. 1996) and glutamatergic (Kolta et al. 2000) neurons in NVmot, while others still failed to detect them at all in the rat (Saha et al. 1991) and the guinea pig (Turman et al., 1994 a and b).

Immunofluorescence does not allow a detailed analysis of the morphology of the stained cells, but nonetheless, the soma shape and size could be described. GABA-immunoreactive cells detected here tended to have ovoid or round somata that corresponded more to the cell type II described earlier with 3-4 dendrites. In contrast, glutamatergic-immunoreactive neurons were mostly fusiform and likely correspond to the cell type I with 2-3 dendrites. The unique glycinergic cell also seemed to belong to the later group.

Functional implications:

The full elucidation of the role of these INs must take into account their inputs and final output. We know that part of their inputs comes from surrounding interneurons in PeriV and NVsnpr (see companion paper) and Shigenaga et al. (1998a), described one case recorded in vivo that received convergent afferent input

from oral and jaw muscle nerves. Dessem et al. (1997) have also shown terminals of trigeminal fusorial primary afferents that contact neurons within NVmot that are not motoneurons and that are likely to be interneurons. Thus, these neurons are likely to receive sensory information either directly or indirectly and be involved in oligosynaptic reflex pathways. The present study described the course of their axonal projections, but did not provide clear description of their postsynaptic targets. As mentioned previously, we know from electrophysiological investigation that at least some of these INs project monosynaptically to surrounding interneurons and by this access a network of interconnected neurons in which inputs are rapidly and robustly distributed. It should be noted that in this network, NVmot interneurons are probably important players because they provide the largest proportion of inputs to surrounding interneurons and because in this network, they are the largest providers of inhibitory inputs to the other neurons. Their reciprocal connections with ipsilateral surrounding interneurons of PeriV or their putative connections with their controlateral counterparts may also play an important role in rythmogenesis during mastication. If their commissural fibers terminate on contralateral motoneurons then they may well be involved in bilateral coordination of the mandible. Excitatory interneurons could then serve to simultaneously activate synergistic muscles or muscles sections, while inhibitory interneurons would inhibit those acting as antagonistic muscles (e.g. in some lateral movements, some sections of the masseters are antagonistic).

TABLES AND LEGENDS

Table I: Morphological characteristics of interneurons in the trigeminal motor nucleus.

Type	soma form	soma size (μm)		number of dendrites	longest dendrite (μm)	form of the dendritic arbor	Orientation of the dendritic arbor	relative frequency (%)
		minor axis	major axis					
I	fusiform-oval	$11,6 \pm 0,5$	$16,8 \pm 0,7$	2 - 4	$500,1 \pm 28,0$	bipolar	medial-lateral	50
II	triangular / oval-round / oval-polygonal	$11,7 \pm 0,7$	$16,4 \pm 1,5$	3 - 4	$486,2 \pm 31,0$	fan-like	dorsal, ventral	50

FIGURES AND LEGENDS

Figure 1: Nissl stainings of brain stem slices containing NVmot. A) low-power view of the trigeminal masseteric pool. TMNs were labelled retrogradely with Alexa-fluor 488-cholera toxin injected in the masseteric muscle. B) The corresponding region of NVmot (as in A), after Nissl staining. C) Higher power magnification of TMNs retrogradely labelled with Alexa-fluor 488-cholera toxin. D) The same field as in C, viewed under optic microscopy to show the cells stained with cresyl violet. Note the differences of shape and size of TMNs (arrow heads) and the non-labelled interneurons (arrows). E) Plot of the soma size of the three types of neurons versus the number of cells (interneurons: black, gamma TMNs: red, alpha TMNs: green). F) Spatial distribution of the three types of neurons within the limits of the NVmot. The interneurons, gamma TMNs and alpha TMNs are represented with black, red and green dots respectively. G) The respective proportions of the three types of neurons (interneurons, gamma TMNs and alpha TMNs) within NVmot.

Figure 2: GABAergic, glutamatergic and glycinergic immunoreactive neurons within NVmot. A) Microphotograph of a representative GABA immunopositive neurons within NVmot pointed by an arrow. B) The same field showing the TMNs filled retrogradely with Alexa fluor. Note the considerable difference in the size as well as the shape of the soma between the TMNs and the GABAergic neuron. C) Microphotograph of a representative glutamate immunopositive neuron within NVmot pointed by an arrow. D) The corresponding field showing the TMNs filled retrogradely with Alexa fluor. Note the considerable difference in the size as well as the shape of the soma between the TMNs and the glutamatergic neuron. E) One

interneuron that was characterized electrophysiologically, filled with biocytin and, like it is showing in this photomicrograph, is glycine-immunoreactive.

Figure 3: Commissural neurons revealed by DiI injections. A) The Alexa Fluor 488-cholera toxin retrograde labelling of TMNs innervating the masseter on one side of the jaw was combined with injections of DiI in the contralateral NVmot. DiI crystals deposits are pointed with an arrow. Ipsilaterally to the injection, the labelling obtained is so dense that it can be seen even with an inappropriate filter to visualize DiI. B) Enlargement of the box in A showing commissural fibers originating from NVmot and reaching the contralateral nucleus. C) Low-power magnification of the trigeminal motor nucleus where the masseteric TMNs are labelled retrogradely with Alexa-fluor 488-cholera toxin. D) Same region as in C showing small neurons labelled retrogradely by deposits of DiI crystals in the contralateral NVmot. The contour of the nucleus are defined by a white line. A higher density of retrogradely DiI-filled neurons can be observed within the medio-dorsal subdivision of NVmot. Higher magnification view of this area viewed with the filter for DiI (E) and with the filter for Alexa-488 (F). Note the difference in size of the DiI-labelled neurons and the TMNs.

Figure 4: Representative photomicrographs of biocytin filled interneurons classified on a morphological basis. A) The dendritic field is bipolar with medial and lateral orientation. Inset, the soma is fusiform. B.1) The dendritic arbour has a fan-like configuration in the transverse plan and is oriented dorsally. Inset, the soma takes a triangular form. B.2) The fan-like arrangement of the dendritic field is also present but it is oriented ventrally. Inset, the form of the soma is oval.

Figure 5: Extent of dendritic arbors. A) Combined biocytine and Nissl staining. Type II interneuron filled with biocytine located in the heart of NVmot is seen extending its dendrites in the areas medial and lateral to NVmot (mPeriV and IntV). B) Histograms showing the percentage of cells having a dendritic arbor reaching each area. NVmot: trigeminal motor nucleus; mPeriV: medial peri-trigeminal area; IntV: Inter-trigeminal area; SupV: supra-trigeminal area; NVsnpr: principal sensory nucleus and PCRt: parvocellular reticular area.

Figure 6: Position and axonal projections of biocytin-filled neurons within NVmot. On the right side, the position of 47 INs (●) is represented with their axonal processes. The position and axonal projections of 8 TMNs (✦) is presented on the left side. The axons of these motoneurons are seen to enter the motor root laterally of NVmot.

Figure 1

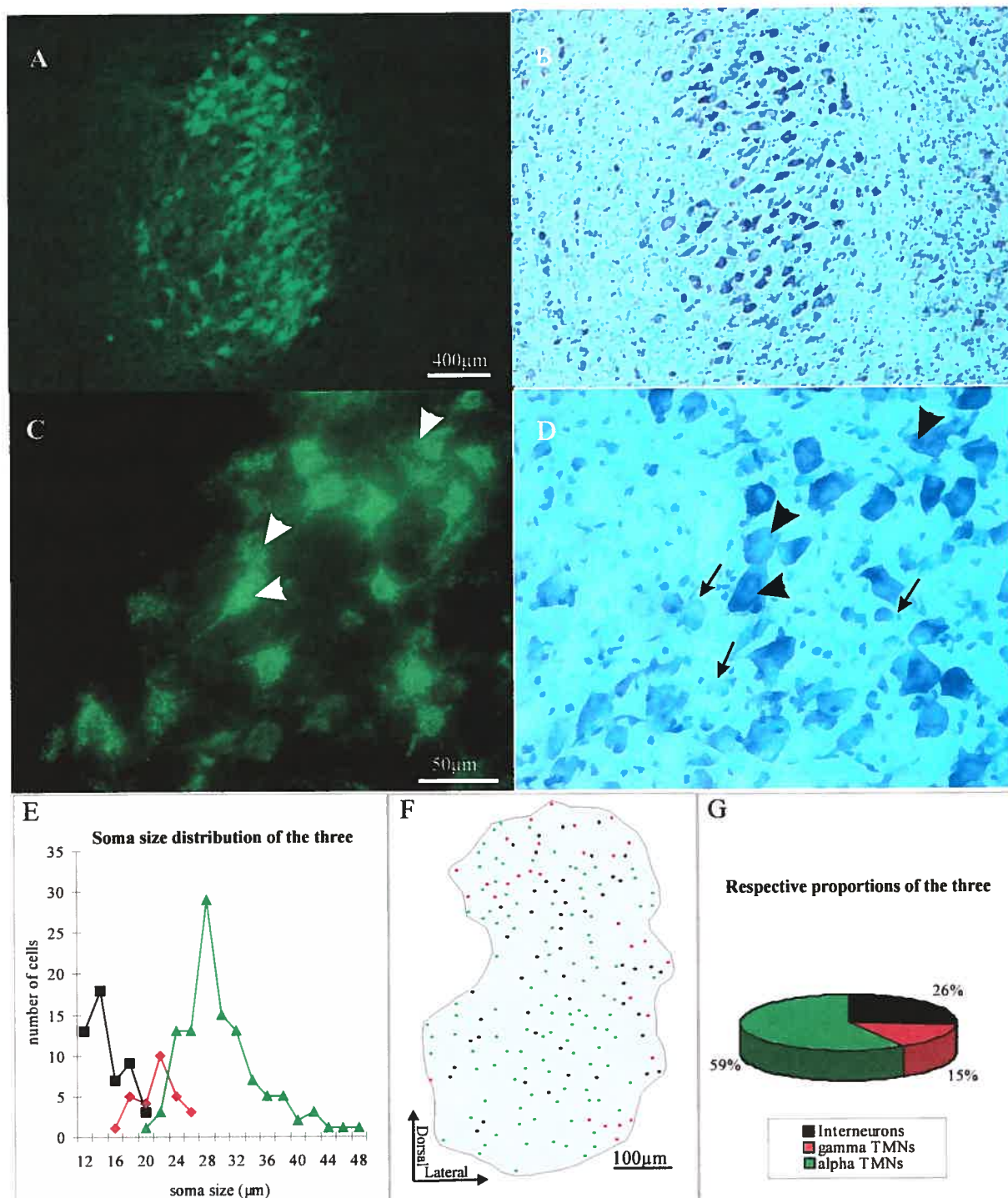


Figure 2

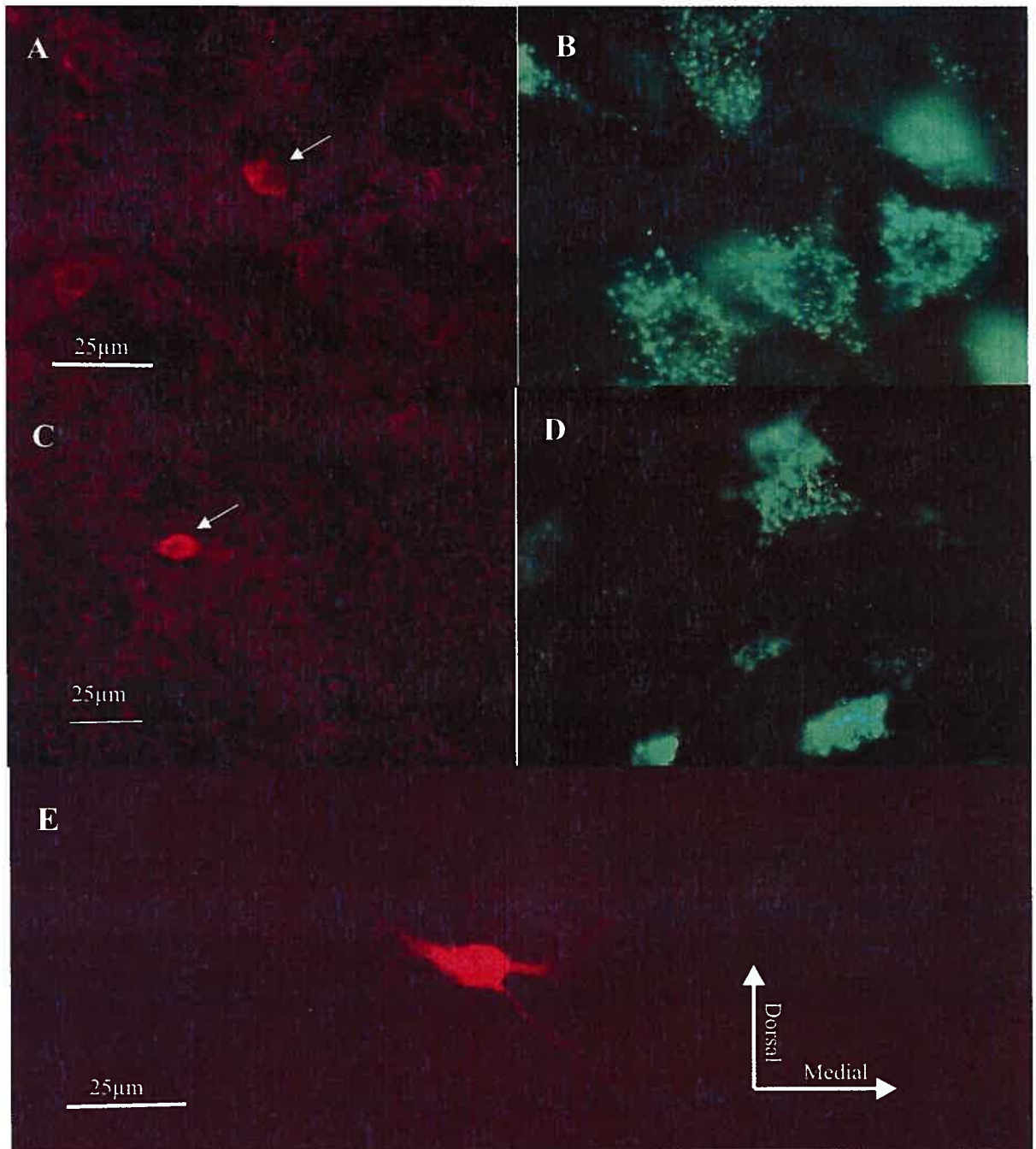


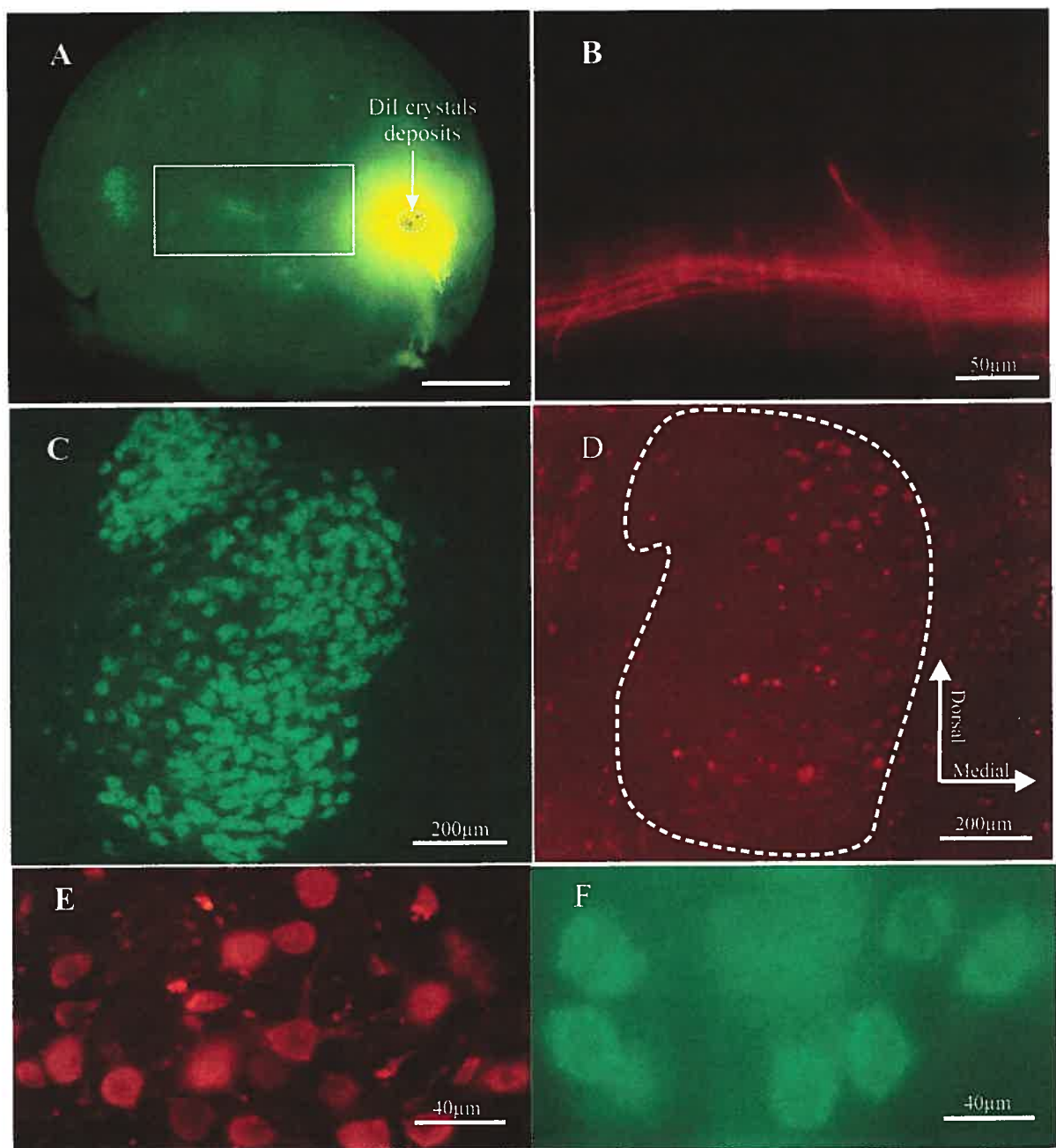
Figure 3

Figure 4

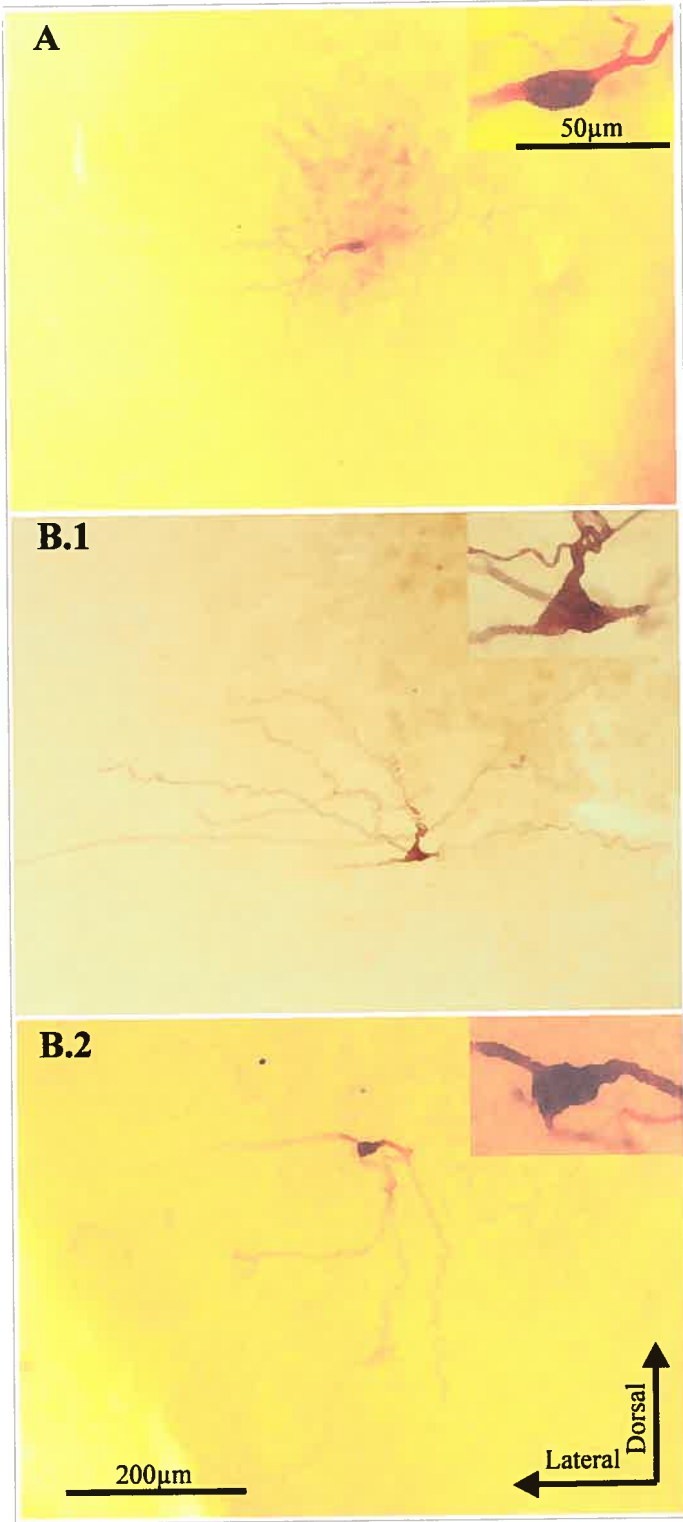


Figure 5

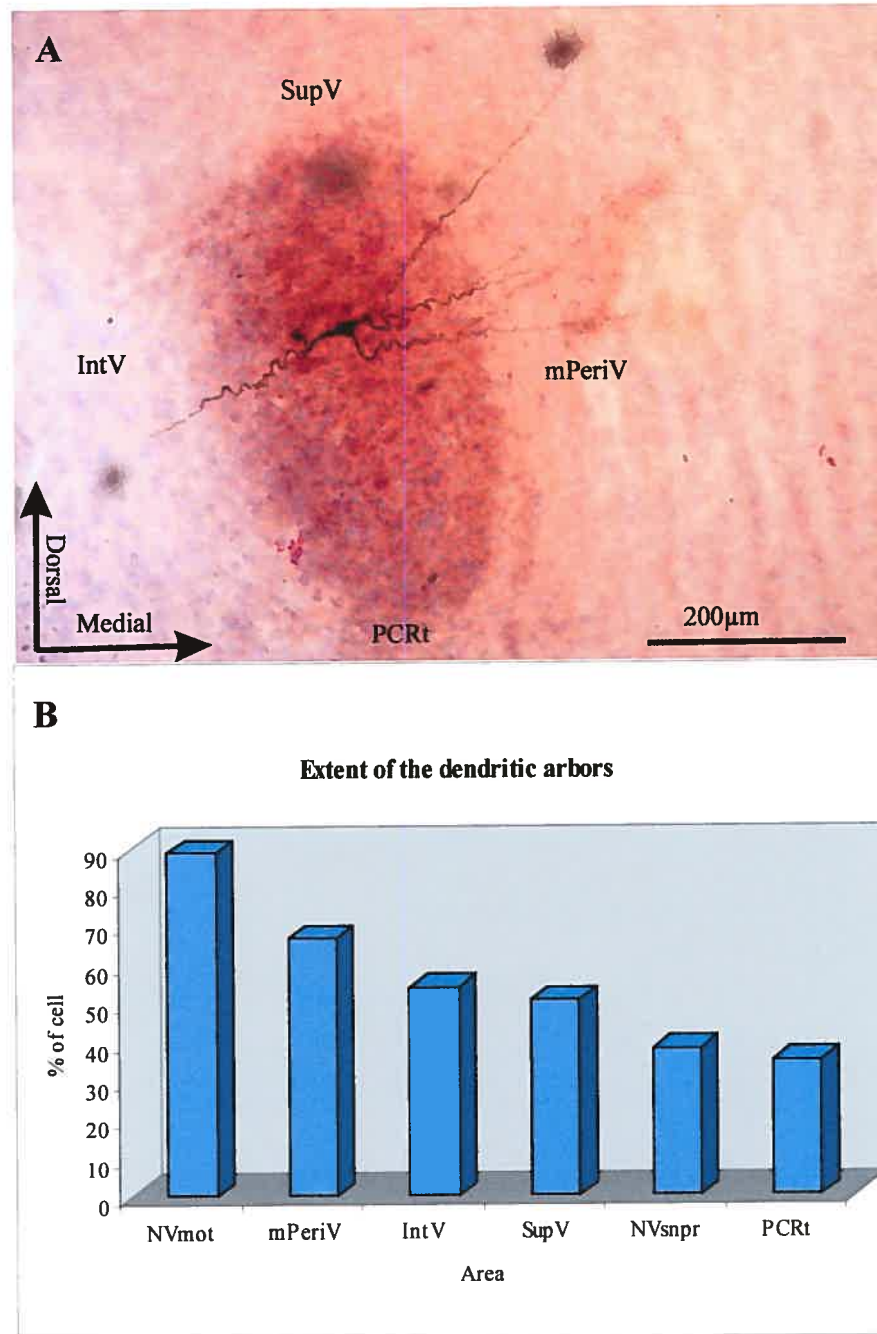
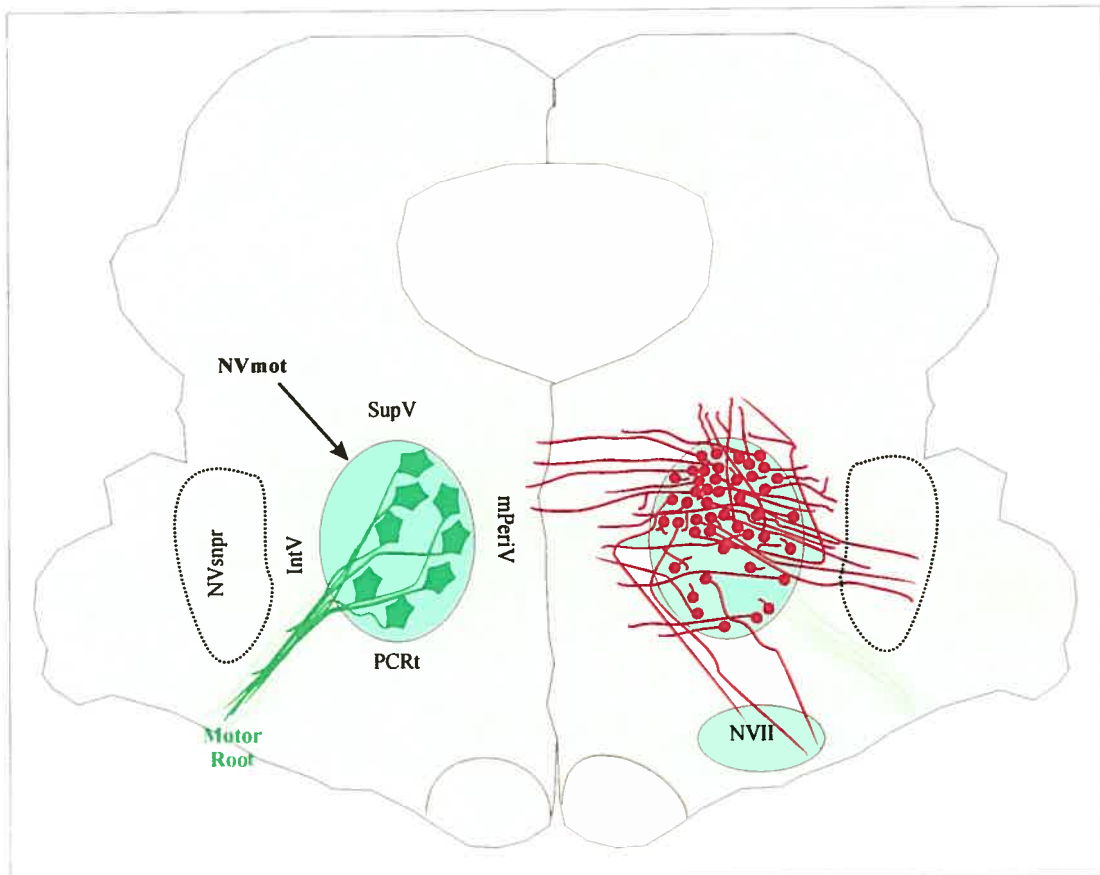


Figure 6



REFERENCE LIST

1. Alvarado-Mallart MR, Batini C, Buisseret-Delmas C, Corvisier J. Trigeminal representations of the masticatory and extraocular proprioceptors as revealed by horseradish peroxidase retrograde transport. *Exp Brain Res.* 1975 Aug 14;23(2):167-79.
2. Appenteng K, Conyers L, Curtis J, Moore J. Monosynaptic connexions of single V interneurons to the contralateral V motor nucleus in anaesthetised rats. *Brain Res.* 1990 Apr 23;514(1):128-30.
3. Appenteng K, Donga R, Williams RG. Morphological and electrophysiological determination of the projections of jaw-elevator muscle spindle afferents in rats. *J Physiol.* 1985 Dec;369:93-113.
4. Appenteng K, O'Donovan MJ, Somjen G, Stephens JA, Taylor A. The projection of jaw elevator muscle spindle afferents to fifth nerve motoneurons in the cat. *J Physiol.* 1978 Jun;279:409-23.
5. Bae YC, Choi BJ, Lee MG, Lee HJ, Park KP, Zhang LF, Honma S, Fukami H, Yoshida A, Ottersen OP, Shigenaga Y. Quantitative ultrastructural analysis of glycine- and gamma-aminobutyric acid-immunoreactive terminals on trigeminal alpha- and gamma-motoneuron somata in the rat. *J Comp Neurol.* 2002 Jan 21;442(4):308-19.
6. Bourque MJ, Kolta A. Properties and interconnections of trigeminal interneurons of the lateral pontine reticular formation in the rat. *J Neurophysiol.* 2001 Nov;86(5):2583-96.

7. Brodin L, Dale N, Christenson J, Storm-Mathisen J, Hokfelt T, Grillner S., Three types of GABA-immunoreactive cells in the lamprey spinal cord. *Brain Res.* 1990 Jan 29;508(1):172-5.
8. Buisseret-Delmas C, Pinganaud G, Compoin C, Buisseret P. Projection from trigeminal nuclei to neurons of the mesencephalic trigeminal nucleus in rat. *Neurosci Lett.* 1997 Jul 4;229(3):189-92.
9. Card JP, Riley JN, Moore RY. The motor trigeminal nucleus of the rat: analysis of neuronal structure and the synaptic organization of noradrenergic afferents. *J Comp Neurol.* 1986 Aug 22;250(4):469-84.
10. Cooper S. Muscle spindles and other muscle receptors. In: *The structure and function of muscle.* G.H. Bourne, ed. Academic Press, New York 1960, p.1.
11. Cullheim S, Kellerth JO. A morphological study of the axons and recurrent axon collaterals of cat alpha-motoneurons supplying different functional types of muscle unit. *J Physiol.* 1978 Aug;281:301-13.
12. Desmond JE, Moore JW. A supratrigeminal region implicated in the classically conditioned nictitating membrane response. *Brain Res Bull.* 1983 Jun;10(6):765-73.
13. Dessem D, Donga R, Luo P. Primary- and secondary-like jaw-muscle spindle afferents have characteristic topographic distributions. *J Neurophysiol.* 1997 Jun;77(6):2925-44.
14. Donga R, Lund JP. Discharge patterns of trigeminal commissural last-order interneurons during fictive mastication in the rabbit. *J Neurophysiol.* 1991 Nov;66(5):1564-78.
15. Ginestal E, Matute C., Gamma-aminobutyric acid-immunoreactive neurons in the rat trigeminal nuclei. *Histochemistry.* 1993 Jan;99(1):49-55.

16. Goldberg LJ, Chandler SH, Tal M. Relationship between jaw movements and trigeminal motoneuron membrane-potential fluctuations during cortically induced rhythmical jaw movements in the guinea pig. *J Neurophysiol.* 1982 Jul;48(1):110-38.
17. Harrison, F. and K.B. Corbin. The central pathway for the jaw-jerk. *Am. J. Physiol.* (1942)135:439-445
18. Huard H, Lund JP, Veilleux D, Dubuc R. An anatomical study of brainstem projections to the trigeminal motor nucleus of lampreys. *Neuroscience.* 1999;91(1):363-78.
19. Hugelin A, Bonvallet M. [Oscillographic study of a monosynaptic cranial reflex, masseteric reflex] *J Physiol (Paris).* 1957 Jan-Mar;49(1):210-1.
20. Inoue M, Nozawa-Inoue K, Donga R, Yamada Y., Convergence of selected inputs from sensory afferents to trigeminal premotor neurons with possible projections to masseter motoneurons in the rabbit. *Brain Res.* 2002 Dec 6;957(1):183-91.
21. Jerge CR. The function of the nucleus supratrigeminalis. *J Neurophysiol.* 1963a May;26:393-402.
22. Jerge CR. Organization and function of the trigeminal mesencephalic nucleus. *J Neurophysiol.* 1963b May;26:379-92.
23. Kamogawa H, Hiraba H, Manabe K, Sakanashi T, Sekiguchi T, Inage T. Morphological analysis of cat masseteric motoneurons after intracellular staining with horseradish peroxidase. *Brain Res.* 1998 Feb 23;785(1):18-23.
24. Kidokoro Y, Kubota K, Shuto S, Sumino R. Reflex organization of cat masticatory muscles. *J Neurophysiol.* 1968a Sep;31(5):695-708.

25. Kidokoro Y, Kubota K, Shuto S, Sumino R., Possible interneurons responsible for reflex inhibition of motoneurons of jaw-closing muscles from the inferior dental nerve. *J Neurophysiol.* 1968b Sep;31(5):709-16.
26. Kolta A, Westberg KG, Lund JP. Identification of brainstem interneurons projecting to the trigeminal motor nucleus and adjacent structures in the rabbit. *J Chem Neuroanat.* 2000 Jul;19(3):175-95.
27. Kolta A., In vitro investigation of synaptic relations between interneurons surrounding the trigeminal motor nucleus and masseteric motoneurons. *J Neurophysiol.* 1997 Sep;78(3):1720-5.
28. Kuypers HG. An anatomical analysis of cortico-bulbar connexions to the pons and lower brain stem in the cat. *J Anat.* 1958 Apr;92(2):198-218.
29. Kwa SH, Weijs WA, van Eijden TM. Effects of activation rate on contractile properties of rabbit masseter motor units. *Exp Brain Res.* 2002 Jan;142(2):221-6. Epub 2001 Nov 15.
30. Li JL, Kaneko T, Nomura S, Mizuno N., Projections from the caudal spinal trigeminal nucleus to commissural interneurons in the supratrigeminal region: an electron microscope study in the rat. *Neurosci Lett.* 1998 Sep 18;254(1):57-60.
31. Li YQ, Takada M, Kaneko T, Mizuno N. GABAergic and glycinergic neurons projecting to the trigeminal motor nucleus: a double labeling study in the rat. *J Comp Neurol.* 1996 Sep 30;373(4):498-510.
32. Li YQ, Tao FS, Okamoto K, Nomura S, Kaneko T, Mizuno N. The supratrigeminal region of the rat sends GABA/glycine-cocontaining axon terminals to the motor trigeminal nucleus on the contralateral side. *Neurosci Lett.* 2002 Sep 13;330(1):13-6.

33. Lingenhohl K, Friauf E. Sensory neurons and motoneurons of the jaw-closing reflex pathway in rats: a combined morphological and physiological study using the intracellular horseradish peroxidase technique. *Exp Brain Res.* 1991;83(2):385-96.
34. Lund JP, Richmond FJ, Touloumis C, Patry Y, Lamarre Y. The distribution of Golgi tendon organs and muscle spindles in masseter and temporalis muscles of the cat. *Neuroscience.* 1978;3(2):259-70.
35. Luschei ES. Central projections of the mesencephalic nucleus of the fifth nerve: an autoradiographic study. *J Comp Neurol.* 1987 Sep 1;263(1):137-45.
36. Manaker S, Tischler LJ, Bigler TL, Morrison AR. Neurons of the motor trigeminal nucleus project to the hypoglossal nucleus in the rat. *Exp Brain Res.* 1992;90(2):262-70.
37. Marani E, Usunoff KG. The trigeminal motonucleus in man. *Arch Physiol Biochem.* 1998 Dec;106(5):346-54.
38. Minkels RF, Juch PJ, van Willigen JD. Interneurones of the supratrigeminal area mediating reflex inhibition of trigeminal and facial motoneurons in the rat. *Arch Oral Biol.* 1995 Apr;40(4):275-84.
39. Miyata H, Sugiura T, Wada N, Kawai Y, Shigenaga Y. Morphological changes in the masseter muscle and its motoneurons during postnatal development. *Anat Rec.* 1996 Apr;244(4):520-8.
40. Mizuno N, Yasui Y, Nomura S, Itoh K, Konishi A, Takada M, Kudo M. A light and electron microscopic study of premotor neurons for the trigeminal motor nucleus. *J Comp Neurol.* 1983 Apr 10;215(3):290-8.
41. Mizuno N. Projection fibers from the main sensory trigeminal nucleus and the supratrigeminal region. *J Comp Neurol* 139: 457-472, 1970.

42. Nakamura Y. Brain stem motor mechanisms controlling the trigeminal motoneuron activity. In: spinal and supraspinal mechanisms of voluntary motor control and locomotion. Prog. Clin. Neurophysiol. Desmedt J.E (Ed), Basel, Karger, 1980, Vol 8, pp 181-202.
43. Nomura S, Mizuno N. Axonal trajectories of masticatory motoneurons: a genu formation of axons of jaw-opening motoneurons in the cat. Neurosci Lett. 1983 May 27;37(1):11-5.
44. Nomura S, Mizuno N. Differential distribution of cell bodies and central axons of mesencephalic trigeminal nucleus neurons supplying the jaw-closing muscles and periodontal tissue: a transganglionic tracer study in the cat. Brain Res. 1985 Dec 16;359(1-2):311-9.
45. Ohta M, Moriyama Y. Supratrigeminal neurons mediate the shortest, disynaptic pathway from the central amygdaloid nucleus to the contralateral trigeminal motoneurons in the rat. Comp Biochem Physiol A. 1986;83(4):633-41.
46. Olsson K.-A. and K-G. Westberg. Interneurones in the trigeminal motor system. EMG of jaw reflexes in man 1989. Laven University Press pp. 19-37.
47. Olsson KA, Landgren S, Westberg KG. Location of, and peripheral convergence on, the interneuron in the disynaptic path from the coronal gyrus of the cerebral cortex to the trigeminal motoneurons in the cat. Exp Brain Res. 1986;65(1):83-97.
48. Palmer JB, Hiiemae KM, Liu J. Tongue-jaw linkages in human feeding: a preliminary videofluorographic study. Arch Oral Biol. 1997 Jun;42(6):429-41.

49. Petropoulos D, Lund JP, Dubuc R. A physiological study of brainstem and peripheral inputs to trigeminal motoneurons in lampreys. *Neuroscience*. 1999;91(1):379-89.
50. Rampon C, Luppi PH, Fort P, Peyron C, Jouvet M., Distribution of glycine-immunoreactive cell bodies and fibers in the rat brain. *Neuroscience*. 1996 Dec;75(3):737-55.
51. Rokx JT, Juch PJ, Van Willigen JD., On the bilateral innervation of masticatory muscles: a study with retrograde tracers. *J Anat*. 1985 Mar;140 (Pt 2):237-43.
52. Rokx JT, van Willigen JD, Juch PJ., Bilateral brainstem connections of the rat supratrigeminal region. *Acta Anat (Basel)*. 1986;127(1):16-21.
53. Roste GK. Non-motoneurons in the facial and motor trigeminal nuclei projecting to the cerebellar flocculus in the cat. A fluorescent double-labelling and WGA-HRP study. *Exp Brain Res*. 1989;75(2):295-305.
54. Saha S, Appenteng K, Batten TF., Quantitative analysis and postsynaptic targets of GABA-immunoreactive boutons within the rat trigeminal motor nucleus. *Brain Res*. 1991 Oct 4;561(1):128-38.
55. Sessle BJ., Identification of alpha and gamma trigeminal motoneurons and effects of stimulation of amygdala, cerebellum, and cerebral cortex. *Exp Neurol*. 1977 Feb;54(2):303-22.
56. Sherrington, C.S. Reflexes elicitable in the cat from pinna, vibrissae and jaws. *J. Physiol. (Lond.)*, 1927, 51:404-431
57. Shigenaga Y, Sera M, Nishimori T, Suemune S, Nishimura M, Yoshida A, Tsuru K. The central projection of masticatory afferent fibers to the

- trigeminal sensory nuclear complex and upper cervical spinal cord. *J Comp Neurol.* 1988 b Feb 22;268(4):489-507.
58. Shigenaga Y, Yoshida A, Tsuru K, Mitsuhiro Y, Otani K, Cao CQ. Physiological and morphological characteristics of cat masticatory motoneurons--intracellular injection of HRP. *Brain Res.* 1988a Oct 4;461(2):238-56.
59. Szekely G, Matesz C. The accessory motor nuclei of the trigeminal, facial, and abducens nerves in the rat. *J Comp Neurol.* 1982 Sep 20;210(3):258-64.
60. Szentagothai, J. Anatomical considerations of monosynaptic reflex arcs. *J Neurophysiol.* (1948)11:445-454.
61. Takata M, Kawamura Y. Neurophysiologic properties of the supratrigeminal nucleus. *Jpn J Physiol.* 1970 Feb 15;20(1):1-11.
62. Ter Horst GJ, Copray JC, Van Willigen JD, Liem RS., Contralateral projections of cells in the motor trigeminal nucleus of the rat. *Neurosci Lett.* 1990 Jun 8;113(3):260-6.
63. Ter Horst GJ, Luiten PG, Kuipers F. Descending pathways from hypothalamus to dorsal motor vagus and ambiguus nuclei in the rat. *J Auton Nerv Syst.* 1984 Jul;11(1):59-75.
64. Torvik A. Afferent connections to the sensory trigeminal nuclei, the nucleus of the solitary tract and adjacent structures; an experimental study in the rat. *J Comp Neurol.* 1956 Nov;106(1):51-141.
65. Travers JB, Norgren R., Afferent projections to the oral motor nuclei in the rat. *J Comp Neurol.* 1983 Nov 1;220(3):280-98.

66. Turman J Jr, Chandler SH., Immunohistochemical evidence for GABA and glycine-containing trigeminal premotoneurons in the guinea pig. *Synapse*. 1994b Sep;18(1):7-20.
67. Turman J Jr, Chandler SH., Immunohistochemical localization of glutamate and glutaminase in guinea pig trigeminal premotoneurons. *Brain Res*. 1994a Jan 14;634(1):49-61.
68. Usunoff KG, Marani E, Schoen JH. The trigeminal system in man. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 1997;136:I-X, 1-126. Review.
69. Weber CM, Smith A. Reflex responses in human jaw, lip, and tongue muscles elicited by mechanical stimulation. *J Speech Hear Res*. 1987 Mar;30(1):70-9.
70. Yabuta NH, Yasuda K, Nagase Y, Yoshida A, Fukunishi Y, Shigenaga Y. Light microscopic observations of the contacts made between two spindle afferent types and alpha-motoneurons in the cat trigeminal motor nucleus. *J Comp Neurol*. 1996 Oct 21;374(3):436-50.
71. Yamamoto T, Onozuka M, Nagasaki S, Watanabe K, Ozono S. Origin of primary sensory neurons innervating the buccal stretch receptor. *J Dent Res*. 1999 Jan;78(1):49-53.
72. Yang HW, Appenteng K, Batten TF., Ultrastructural subtypes of glutamate-immunoreactive terminals on rat trigeminal motoneurons and their relationships with GABA-immunoreactive terminals. *Exp Brain Res*. 1997 Mar;114(1):99-116.

Troisième Chapitre

DISCUSSION

Nous tenterons, en premier lieu dans cette section d'élaborer sur les résultats reportés dans les deux articles. Nous essayerons ensuite de faire des analogies avec d'autres noyaux moteurs crâniens et nous traiterons des approches expérimentales qui permettront éventuellement de compléter la présente recherche. Enfin nous discuterons de nos résultats sur le plan fonctionnel et nous examinerons leur pertinence pour la mastication.

3.1 Discussion des deux articles

3.1.1 Propriétés électrophysiologiques

Les caractéristiques électrophysiologiques des interneurones au sein du NVmot-MASS (INs) rapportées dans cette étude sont semblables à celle des pré-motoneurones de dernier ordre de PeriV rapportées précédemment dans une étude sur le même type de préparation de tranches du tronc cérébral chez le rat effectuée dans notre laboratoire (Bourque et Kolta 2001). Ceci nous permet de spéculer que ces INs font partie intégrante du système d'interneurones qui entoure NVmot.

Certaines de ces caractéristiques diffèrent nettement de celles des TMNs (figure 1), alors que d'autres non. Ainsi la résistance membranaire des TMNs est plus petite que celle des INs, ce qui est typique des cellules de grande taille. Toutefois, il n'existe aucune différence remarquable entre les valeurs de potentiels membranaires des deux populations de neurones.

Les injections de courant dépolarisant ont révélé une rectification sortante à la dépolarisation dans 34% des INs. Ce comportement est présent dans 36% de nos TMNs mais n'a jamais été rapporté dans la littérature. Nous n'avons pas observé de rectification entrante induite par des courants hyperpolarisants dans nos TMNs, mais

Chandler *et al.* (1994) l'ont observé dans 30% de leurs enregistrements effectués dans NVmot de TMNs chez le cochon d'Inde (Chandler *et al.* 1994). Cependant aucune mesure n'était prise dans cette étude pour distinguer les TMNs des INs. Par comparaison, 29% de notre échantillon d'INs avait une rectification entrante à l'hyperpolarisation. Un autre type de rectification, rencontrée seulement dans les TMNs (36%), est une rectification entrante à la dépolarisation que nous n'avons jamais observée dans notre population d'INs. Ces observations peuvent aider à distinguer les TMNs des INs sur la base d'enregistrements électrophysiologiques. Bien qu'une bonne proportion des deux groupes de neurones ne présentait pas de rectification, la présence d'une rectification entrante à l'hyperpolarisation serait unique aux INs, alors que celle d'une rectification entrante à la dépolarisation, le serait aux TMNs.

Nous avons également démontré qu'il existe des différences significatives dans les durées des potentiels d'action et d'AHP des INs et des TMNs. Ces derniers sont caractérisés par des potentiels d'action et des AHP de courte durée inversement aux INs qui possèdent des valeurs correspondantes de longue durée. Ces données supportent l'hypothèse voulant que l'AHP dans les motoneurones est toujours plus courte que celle des autres types neuronaux incluant les interneurones (Sawczuck *et al.* 1995). Nous avons obtenu trois types d'AHP lors de nos enregistrements: rapide, lente et biphasique. Les AHP rapides faisant suite au potentiel d'action été obtenues dans la plupart des TMNs, mais n'ont jamais été observées dans les INs qui présentaient pour la plupart une AHP lente. L'AHP biphasique quant à elle, nous l'avons notée dans les deux populations de neurones. Lors d'injection de courant dépolarisant assez puissant pour faire décharger la cellule d'une façon répétitive, nous avons remarqué une « Après Dépolarisation » (ADP) suivant le premier

potentiel d'action dans quelques INs et TMNs. Ces observations nous procurent des critères additionnels pour différencier les INs des TMNs dans le NVmot-MASS. Un potentiel d'action de courte durée suivi par une AHP rapide est un indice que l'enregistrement électrophysiologique provient d'un motoneurone, dans le cas contraire, c'est-à-dire un potentiel d'action et une AHP de longue durée, il s'agirait fort probablement d'un interneurone.

Malgré certaines différences, les INs et les TMNs possèdent aussi certaines caractéristiques communes. Ainsi, dans les deux types de neurones, un rebond d'activité suivait l'application de courant hyperpolarisant et l'injection d'un pulse de courant dépolarisant à partir d'un potentiel membranaire hyperpolarisé induisait un plateau de dépolarisation sans doute calcique.

Nous avons remarqué aussi des changements du patron de décharge qui sont voltage-dépendants. En réponse à un pulse dépolarisant supra-seuil, les neurones (INs et TMNs) déchargent d'une façon répétitive. Une augmentation progressive de la dépolarisation engendrait une élévation proportionnelle de la fréquence de décharge tant pour les INs que pour les TMNs.

Une autre caractéristique commune aux INs et aux TMNs est une adaptation de la décharge où le neurone cesse de produire des potentiels d'action lorsque la dépolarisation membranaire atteint un certain niveau.

Dans une partie de notre échantillon, nous avons également observé une accommodation de la décharge qui se traduit par une diminution de la fréquence de décharge dépendante du temps et de la dépolarisation membranaire. Cette accommodation semble être étroitement liée à la présence d'ADP suivant le premier potentiel d'action du train. L'ADP semble pouvoir déclencher des potentiels d'action additionnels en facilitant l'atteinte du seuil de décharge (Viana *et al.* 1993,

Carette *et al.* 1998). Pour les motoneurones, l'accommodation peut jouer un rôle important dans la commande motrice. Moore et ses collègues (1990) ont suggéré que la haute fréquence de décharge dans la première phase d'accommodation pourrait être une sorte de processus permettant de s'assurer, qu'une fois activé, la décharge motoneuronale est rapidement amenée à une certaine fréquence à laquelle il y aurait une fusion partielle des contractions induites dans les fibres musculaires. Par la suite, la diminution de fréquence dans la deuxième phase surviendrait durant la portion isométrique de la courbe fréquence-tension de l'unité motrice.

3.1.2 Inputs synaptiques

Nous avons examiné l'activité synaptique au potentiel de repos de toutes nos cellules. Les TMNs étaient tous silencieux au départ, confirmant ainsi les résultats d'autres études (Chandler *et al.* 1994, Kobayashi *et al.* 1997, Hsiao *et al.* 2002). Par contre, nous avons constaté que la majorité des INs présentaient au repos des potentiels post-synaptiques excitateurs dont l'amplitude augmente avec l'hyperpolarisation. Nous avons réussi à bloquer ces PPSEs, dans certains cas, avec un antagoniste des récepteurs AMPA/Kainate (DNQX) suggérant qu'ils sont glutamatergiques.

Nous avons démontré que les INs répondent à la stimulation du NVsnpr et des quatre régions constituant PeriV par des potentiels post-synaptiques (PPSs) indiquant qu'ils reçoivent des inputs d'une ou de plusieurs de ces régions. Concernant ces connections synaptiques, l'équipe de Honna (2003) a récemment démontré, dans une expérience combinant un marquage rétrograde des motoneurones masséterins avec la synaptophysine (une protéine membranaire facilitant la fusion des vésicules synaptique de neurotransmetteurs avec la membrane pré-synaptique), la

présence de boutons synaptiques contactant des neurones marqués (motoneurones) mais aussi des neurones non-marqués (non-motoneurones). Nous supposons que ces derniers sont des interneurones. Nous avons déjà démontré dans notre laboratoire en utilisant la même préparation de tranches du tronc cérébral *in vitro* (Bourque et Kolta 2001) l'existence de connexions réciproques entre les pré-motoneurones de dernier ordre de la région PeriV. Comme ces régions répondent toutes à la stimulation des INs de NVmot, il ne serait pas étonnant que les relations avec les INs de PeriV soient aussi réciproques. La majorité des réponses synaptiques que nous avons enregistrées dans les INs de NVmot-MASS étaient glutamatergiques. Ceci n'est point surprenant puisqu'une proportion importante des pré-motoneurones du NVmot sont immunoréactifs au glutamate (Turman et Chandler 1994a, Kolta *et al.* 2000). Pour ce qui est des réponses synaptiques inhibitrices, nous n'avons détecté que trois PPSIs en provenance de SupV et de NVsnpr dans notre population d'INs. Nous avons aussi pu constater que ces PPSIs sont de nature GABAergique puisque nous avons réussi à bloquer l'un d'entre eux avec un antagoniste des récepteurs GABA_A, la bicuculline, et que les autres avaient une cinétique semblable au premier. Ces PPSIs avaient un temps lent de décroissance typique aux réponses GABAergiques, contrairement aux PPSIs glycinergiques ayant, quant à eux, un temps de décroissance plus rapide (O'Brien *et al.* 1999).



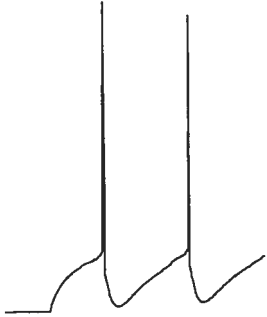

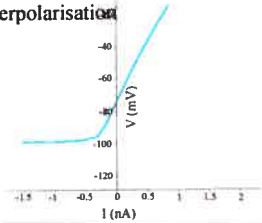
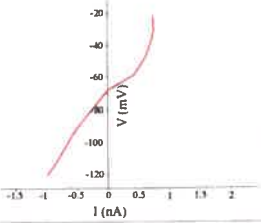



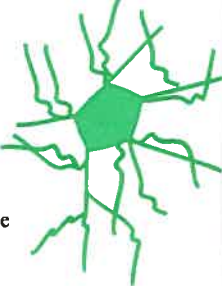
Parallèlement, nos résultats sur les TMNs nous indiquent que ces derniers reçoivent les deux sortes de réponses synaptiques inhibitrices de PeriV: GABAergiques et glycinergiques. Il existe présentement une littérature abondante décrivant ces connexions inhibitrices sur les TMNs (Turman et Chandler 1994a, Rampon *et al.* 1996a, b ; Moritani *et al.* 2003). La majorité des boutons synaptiques sur les TMNs semble être glycinergique et une moindre proportion est GABAergique

(Bae *et al.* 2002). Ces données sont en accord avec ceux de Araki et ses collègues (1988) affirmant que l'expression des récepteurs glycinergiques est beaucoup plus dense sur les TMNs que sur les autres motoneurons crâniens. La haute incidence des PPSIs sur les TMNs pourrait être expliquée physiologiquement: il semble bien que les TMNs de fermeture de la mâchoire, quoique recevant à la fois des inputs excitateurs et inhibiteurs, reçoivent essentiellement des inputs inhibiteurs suite à la stimulation des nerfs périphériques innervant les structures intra-orales et péri-orales (Goldberg et Nakamura 1968, Kidokoro *et al.* 1968b, Shigenaga *et al.* 1988b) et pendant la phase d'ouverture de la mastication fictive évoquée par la stimulation corticale (Nakamura et Kubo 1978, Kubo *et al.* 1981, Chandler et Goldberg 1982). Au contraire les TMNs de l'ouverture ne reçoivent que des PPSEs (Chandler et Goldberg 1982, Sessle 1977b).

Un autre point soulevé dans la présente étude est une fréquence élevée dans le taux d'échec de la transmission synaptique aux TMNs, un phénomène jamais observé dans les INs. Chez le rat des recherches utilisant des préparations *in vivo* (Grimwood *et al.* 1992, Appenteng *et al.* 1995) et des tranches *in vitro* (Curtis et Appenteng 1993) montraient que la transmission des synapses excitatrices tant des afférences fusoriales que des pré-motoneurons sur les TMNs est sujette à une haute incidence d'échecs. Ce phénomène a été expliqué par la présence de neurones immunoréactifs au GABA formant des synapses axo-axoniques sur des terminaisons glutamatergiques dans NVmot (Saha *et al.* 1991, Yang *et al.* 1997). Cette modulation pré-synaptique des neurones glutamatergiques expliquerait des échecs de transmission synaptique sur les TMNs. Il apparaît alors que le contrôle de l'excitabilité de ces motoneurons est un dispositif essentiel du contrôle moteur oral. Ces données soulèvent des questions importantes quant à l'implication des INs dans

ce contrôle. Malheureusement, nous n'en sommes qu'au début de l'investigation du rôle de ces neurones, mais il est possible qu'ils soient eux-même la source des inputs des terminaisons GABA axo-axonales puisque nous savons que nombre d'entre eux sont GABAergiques.

Figure 1

	<u>INs</u>	<u>TMNs</u>
Résistance membranaire	Elevée	Faible
Activité principale au potentiel de repos	PPSEs miniatures 	Silencieuse 
Durée du potentiel d'action et de l'AHP (Type principal d'AHP)	Longue Lente 	Courte Rapide 
Rectification observée uniquement dans :	Entrante à l'hyperpolarisation 	Entrante à la dépolarisation 
Nature immunohistochimique	GABA, glycine, glutamate	Acétylcholine
Imprégnation du Crésyl violet	Faible 	Dense 
Taille / forme du corps cellulaire	Petite / Fusiforme, ovoïde, triangulaire, ronde 	Large / Multipolaire, ellipsoïde 
Nombre de dendrites primaires	2 - 4	6 - 10
Arbre dendritique	Simple, sans ou peu de chevauchement	Complexe, beaucoup de chevauchement
Projection axonale	SuPV, mPeriV, IntV, NVsnpr, NVII, NVmot contralatéral	Racine motrice

3.1.3 Caractéristiques morphologiques

Il est bien connu que le pool massétéрин de NVmot est formé des corps cellulaires des grands motoneurones alpha. Nous avons fourni de nouvelles informations sur les deux autres groupes de neurones trouvés aussi dans cette région de NVmot grâce à nos colorations de Nissl, soit les interneurones et les petits motoneurones gamma innervant les fibres intrafusales du masséter que nous n'avons vu qu'en périphérie du noyau. Ces observations sont compatibles avec des rapports précédents (Card *et al.* 1986, Shigenaga *et al.* 1988) où ces motoneurones intrafusaux se trouvaient à la marge du pool massétéрин. Le marquage rétrograde des TMNs dans la présente étude nous a permis de distinguer ces derniers des INs dans le noyau, évitant ainsi de prendre certains TMNs- γ pour des INs. Cela expliquerait les résultats controversés décrits par Marani et ses collègues (1998) lorsqu'ils ont trouvé que les TMNs- γ étaient dispersés partout dans NVmot. Sans doute certains de leurs interneurones ont été pris pour des TMNs- γ parce que, dans notre étude, les petits INs étaient distribués partout dans NVmot. De plus ces auteurs se basaient uniquement sur la coloration de Nissl pour identifier les TMNs- γ sans avoir recours à un traçage rétrograde des TMNs comme nous l'avons fait. Cependant, leur étude a été menée chez l'homme tandis que la nôtre a été effectuée chez le rat.

Nos résultats montrent également que les INs forment une proportion plus élevée que les TMNs gamma. De plus, la proportion des TMNs- γ par rapport aux TMNs- α était de 1:4; ce qui est comparable avec la proportion de 1:3.5 rapportée par Sessle (1977a).

Nous avons également montré que, mis à part leur distribution spatiale dans le noyau, les trois groupes neuronaux de NVmot sont distincts par la taille et la morphologie de leur soma et leur imprégnation au crésyl violet (figure 1). Les

TMNs- α peuvent être identifiés par la densité de leur coloration en Nissl et leurs corps cellulaires multipolaires de grande taille. Les somata fusiformes de taille moyenne densément marqués au Nissl correspondent aux TMNs- γ , alors que les INs sont caractérisés par une faible coloration au Nissl et les plus petits corps cellulaires du noyau. La distribution des tailles cellulaires des neurones de NVmot-MASS démontre un chevauchement entre les TMNs- α et TMNs- γ d'un côté et aussi entre les TMNs- γ et les INs de l'autre. Bien que ce chevauchement soit faible dans les deux cas, il doit être pris en compte lors de l'identification de ces neurones. Chez le rat, le diamètre des TMNs- α augmente rapidement entre l'âge de 5 à 21 jours tandis que celui des TMNs- γ reste relativement constant avec l'âge parce que la croissance des TMNs- γ se produit plus tôt que celle des alpha (Miyata *et al.* 1996).

Contrairement aux TMNs qui sont connus pour être cholinergiques, nos expériences d'immunohistochimie ont révélé l'existence de neurones GABAergiques, glycinergiques et glutamatergiques dans NVmot-MASS (figure 1). Ces neurones sont distribués partout dans NVmot-MASS. Des évidences électrophysiologiques concernant l'existence de tels neurones ont été précédemment fournies par Bourque et Kolta (2001) qui trouvaient que les stimulations dans NVmot induisaient des réponses dans les interneurons de PeriV pouvant être bloquées par des antagonistes des récepteurs glutamatergiques, GABAergiques et glycinergiques. Toutefois Saha *et al.* (1991) n'ont trouvé aucun neurone GABAergique dans NVmot lors d'expériences immunohistochimiques utilisant un anticorps contre le GABA, contrairement à d'autres ayant identifié l'existence de neurones GABAergiques, glycinergiques et glutamatergiques dans NVmot (Ginestal *et al.* 1993, Rampon *et al.* 1996b, Kolta *et al.* 2000).

Dans notre série d'expériences de double marquage (DiI injecté dans NVmot-MASS unilatéralement et Alexa Fluor dans le masséter bilatéralement), nous n'avons trouvé en aucun cas des neurones doublement marqués dans le NVmot-MASS contralatéral où les fibres commissurales prenaient origine. Cela prouve que ces fibres commissurales proviennent d'une population distincte d'interneurones dans NVmot-MASS et non pas de TMNs au moyen de collatérales axonales. À cet égard, il faut rappeler que des collatérales des TMNs n'ont jamais été trouvées. D'autant plus, dans des investigations précédentes, aucun axone des TMNs n'a été vu traversant la ligne médiane (Rokx *et al.* 1984, Huard *et al.* 1999). Nos résultats confirment l'existence d'une connexion entre les NVmot-MASS des deux côtés et démontrent que ces connexions se font au moyen des projections axonales des INs. Par conséquent, nous proposons que ces projections participent à la coordination bilatérale des muscles de la mâchoire impliqués dans le comportement masticatoire.

Toutefois, certaines régions de PeriV projettent aussi directement ou indirectement au NVmot ou à leurs régions homologues du côté contralatéral ce qui soulève un certain nombre de questions relatives aux conséquences fonctionnelles de la présence d'une population d'INs dans NVmot. Quel type d'information ne peut pas être transmise par les pré-motoneurones entourant NVmot et pouvant être acheminée par l'entremise des INs? Puisque les INs sont réciproquement connectés au réseau d'interneurones de la région péri-trigéminal (Kolta 1997, Bourque et Kolta 2001), nous supposons qu'ils sont dans une position idéale pour accéder à ce réseau et auraient la capacité de recevoir tous les inputs convergents sur ces pré-motoneurones. Par exemple, nous ne savons pas si les INs reçoivent des inputs des noyaux thalamiques liés au comportement nutritionnel mais SupV et PCRt les

reçoivent (Ter Horst *et al.* 1984). De là, nous supposons que c'est possible pour ces INs, via SupV et PCRt, d'avoir accès oligosynaptiquement à ces voies thalamiques afin de les intégrer, moduler et éventuellement distribuer cette information bilatéralement.

En utilisant la technique de marquage intracellulaire à la biocytine, nous avons démontré que les INs constituent une population relativement homogène morphologiquement. Les deux sous-types morphologiques sont semblables aux interneurons de PeriV décrits par Bourque et Kolta (2001), supportant ainsi notre hypothèse que les INs font partie de la matrice neuronale formée par ces pré-motoneurons. De plus, d'autres études, même si peu nombreuses, ont reporté une forme triangulaire, ovoïde et fusiforme de ces INs (Ter Horst *et al.* 1990, Bourque et Kolta 2001) conformément à nos résultats. Nous n'avons pas examiné la signification physiologique de ces deux types morphologiquement distincts d'INs parce que c'est au-delà de l'objectif de l'étude présente et que, probablement, de nouvelles approches seraient exigées pour explorer cet aspect. Aussi, contrairement aux TMNs- α , nous avons trouvé que les INs possèdent peu de dendrites et ont un arbre dendritique simple avec presque aucun chevauchement. Dans une minorité de cas, les dendrites sortaient de NVmot pour atteindre PeriV alors que dans une majorité de cas les dendrites étaient confinés à NVmot.

Les projections axonales des INs ont atteint différents secteurs trigéminaux: latéralement IntV et NVsnpr; dorsalement SupV; médialement mPeriV et la ligne médiane; ventralement NVII mot. Les axones que nous avons vu traverser la ligne médiane confirment notre observation de fibres commissurales décrites ci-dessus. Aussi, les enregistrements obtenus d'interneurons de PeriV indiquent qu'ils reçoivent des inputs de NVmot (Bourque et Kolta 2001). Les axones limités à

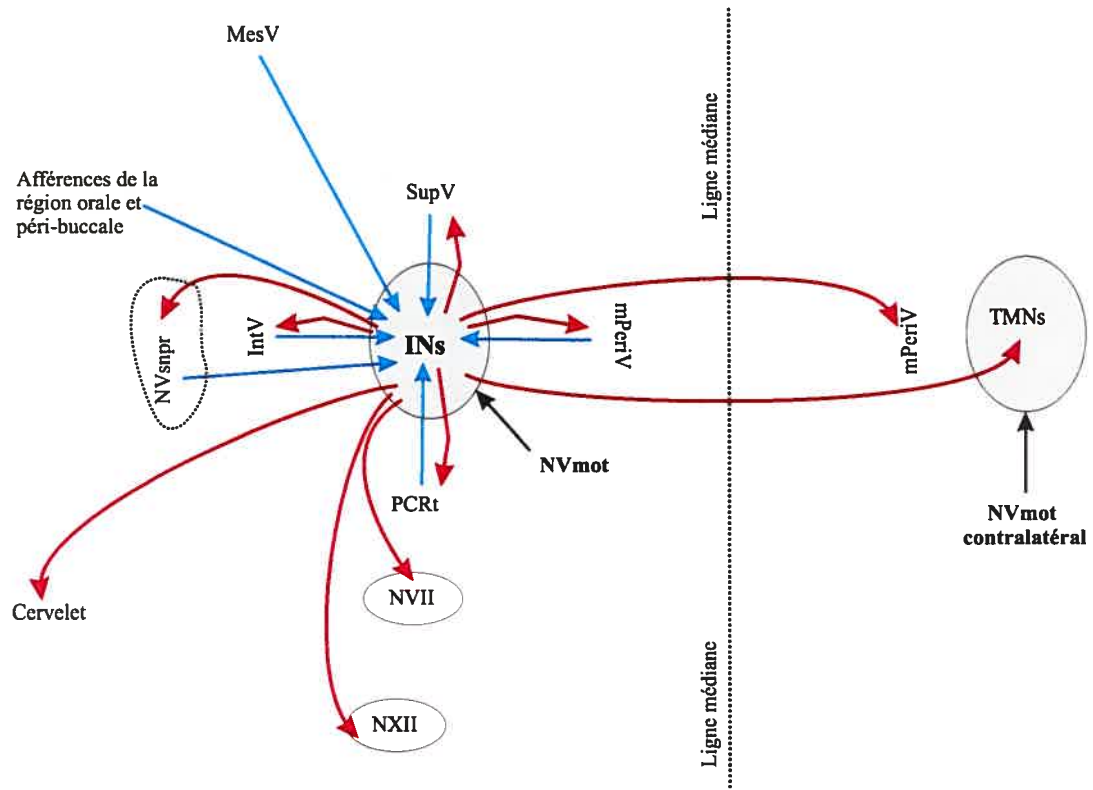
NVmot peuvent avoir été coupés dans la préparation de tranches, mais il est aussi possible que leurs contacts axonaux se limitent aux TMNs voisins. Ceci serait plausible puisque des boutons immunopositifs au glutamate, au GABA et à la glycine ont déjà été observés sur les TMNs (Yang *et al.* 1997, Bae *et al.* 2002). Nos résultats n'ont montré aucune évidence de la projection des INs à PCRt, mais cela devrait être pris avec beaucoup de réserve parce que des PSPs ont été obtenus dans les neurones de PCRt suite à la stimulation de NVmot (Bourque et Kolta 2001). Une autre caractéristique des projections axonales des INs est la présence de collatérales. Des résultats semblables ont été rapportés par le groupe de Shigenaga (1988a) où un de ces interneurones injecté avec de l'HRP possédait des collatérales axonales. Par contre, nos résultats ainsi que ceux d'autres groupes (Kamogawa *et al.* 1998, Shigenaga *et al.* 1988a) confirment l'absence de collatérales axonales dans les TMNs, validant ainsi des observations précédentes de manque d'inhibition de Renshaw dans le système trigeminal (Kidokoro *et al.* 1968a, Nakamura *et al.* 1980). De plus, le parcours axonal des TMNs était totalement différent de celui des INs. L'étude présente ainsi que d'autres qui l'ont précédé (Rokx *et al.* 1984, Lingenhohl *et al.* 1991) montrent que les axones des TMNs massétéris se dirigent directement ventrolatéralement pour quitter NVmot via la racine motrice.

Même si nous avons fourni une information substantielle sur les projections synaptiques des INs, nous n'avons apparemment pas pu les cerner tous. Le PCRt, comme nous l'avons déjà mentionné, constitue un exemple. De plus, des projections au cervelet en provenance des noyaux moteurs des nerfs crâniens ont été décrits par Kotchabhakdi et Walberg (1977). Après des injections d'HRP dans le cervelet, ils ont trouvé des neurones marqués dans les noyaux oculomoteurs, trochléaire, trigeminal, abducens, facial et hypoglosse. Dans une étude subséquente Langer et

ses collègues (1985) ont confirmé la présence de projections au cervelet à partir du NVmot et Roste (1989) a fourni une preuve anatomique que celle-ci se fait via des neurones autres que les TMNs. Ce dernier auteur a effectué des expériences de double marquage combinant des injections de traceur rétrograde fluorescent dans les muscles masticatoires avec des injections d'HRP dans le cervelet. Les neurones dans NVmot ont été classifiés en deux catégories : 1) petites cellules rondes ou ovoïdes marquées uniquement avec de l'HRP ; et 2) grandes cellules polygonales marquées par les injections musculaires. Utilisant le même principe des expériences de Roste (1989), l'équipe de Manaker (1992) a montré que les INs projettent aussi au noyau hypoglosse. Il est donc possible pour les INs de transférer de l'information au noyau hypoglosse monosynoptiquement ou oligosynoptiquement via SupV et PCRt, régions connues pour avoir des projections aux motoneurones hypoglosses (Fay et Norgren 1997c, Luo *et al.* 2001a, Popratiloff *et al.* 2001). Ceci dit, les INs au sein de NVmot-MASS semblent former un réseau de connexions synaptiques avec les régions avoisinantes (figure 2).

Figure 2

Connexions synaptiques des interneurones au sein du noyau moteur trigéminal
Essentiellement à partir des résultats de notre étude et complétées avec d'autres investigations citées dans la littérature

**Légende:**

NVmot: noyau moteur trigéminal
INs: interneurones au sein du NVmot
TMNs: motoneurones trigéminaux
MesV: noyau mésencéphalique du trijumeau
SupV: région supra-trigéminal
PCRt: région réticulaire parvocellulaire
IntV: région intertrigéminal
mPeriV: région péri-trigéminal médiale
NVsnpr: noyau principal sensoriel
NVII: noyau facial
NXII: noyau hypoglosse

← Inputs
← Outputs

3.1.3 Parallèle avec d'autres noyaux crâniens

Comme nous l'avons déjà exposé dans le premier chapitre, les TMNs, quoique plus larges que leurs homologues crâniens, ont une morphologie qui ressemble à ces derniers. Cette ressemblance va au-delà des attributs morphologiques puisque des enregistrements intracellulaires des motoneurones hypoglosses chez le cochon d'Inde démontrent les mêmes propriétés électrophysiologiques que ceux des TMNs incluant l'accommodation, les types de rectification, les rebonds suivant l'hyperpolarisation et les plateaux calciques (Mosfeldt Laursen et Rekling 1989).

Pour ce qui est des INs, nous ne sommes pas les premiers à indiquer la présence d'une population d'interneurones au sein d'un noyau moteur. Il paraît que des interneurones homologues se trouvent aussi dans d'autres noyaux crâniens, entre autres, le noyau abducens (Spencer et Sterling 1977, Destombes *et al.* 1979, Delgado-Garcia *et al.* 1986), le noyau facial (Falls et King 1976) et le noyau hypoglosse (Kotchabhakdi et Walberg 1977). Des motoneurones et des interneurones ont été identifiés électrophysiologiquement et marqués par une injection intracellulaire d'HRP dans le noyau abducens chez le chat (Highstein *et al.* 1982). Les dendrites des motoneurones étaient fortement embranchés contrairement à ceux des interneurones qui l'étaient beaucoup moins. Les axones des motoneurones n'avaient aucune collatérale et étaient dirigés vers le nerf abducens alors que certains des axones des interneurones traversaient la ligne médiane. La différence entre la taille des interneurones et des motoneurones était aussi frappante.

Une autre population d'interneurones est celle retrouvée dans le noyau facial. Falls et King (1976) ont identifié une petite classe de neurones dans le NVII mot de l'opossum qu'ils ont caractérisé comme des interneurones en raison des

ressemblances dans la morphologie avec les neurones de type Golgi II. Une autre étude menée par Roste (1989) montre que les interneurones dans le NVII mot projettent au cervelet. Tous les neurones du NVII mot marqués suite à des injections de traceur rétrograde dans le cervelet étaient plus petits que les neurones marqués après des injections dans les muscles faciaux. Seulement des neurones non-doublement marqués, de petite taille ont été trouvés après les injections de traceurs rétrograde dans le cervelet et les injections musculaires. Ces observations suggèrent fortement que les neurones dans le noyau facial qui projettent au cervelet ne sont pas des motoneurones.

En plus, d'autres rapports semblables sur le noyau hypoglosse (Boone et Aldes 1984, Popratiloff *et al.* 2001) indiquent que celui-ci contient aussi une population d'interneurones projetant aux structures avoisinantes du tronc cérébral. Ces interneurones de l'hypoglosse semblent utiliser principalement le GABA (Takasu *et al.* 1987, Aldes *et al.* 1988) et la glycine (Rampon *et al.* 1996b, Li *et al.* 1997) comme neurotransmetteur. L'équipe de Takasu (1988) a utilisé l'imprégnation de Golgi et la microscopie électronique pour examiner les neurones à l'intérieur du noyau hypoglosse du rat. Les petits interneurones étaient fusiformes ou ovoïdes et avaient quelques dendrites primaires avec peu de branches. Dans un échantillon, dans lequel un interneurone et un motoneurone ont été simultanément imprégnés, l'axone du petit neurone était en contact avec les dendrites du motoneurone au moyen de ses deux collatérales.

L'hypothèse étant à la base de cette similarité des composantes neuronales des noyaux moteurs du V, VII et XII est que si les muscles faciaux, linguaux et masticatoires affichent normalement une activité coordonnée pendant la mastication,

ils doivent aussi partager certains attributs de leurs circuits neuronaux, voir même partager certains neurones.

3.2 Implications fonctionnelles et nouvelles approches expérimentales

Nos résultats fournissent plusieurs raisons de croire que les INs font partie de la matrice d'interneurones entourant NVmot et qui est probablement impliquée dans la coordination bilatérale de la musculature de la mâchoire via ces projections commissurales. Cette hypothèse est basée sur les considérations suivantes: d'abord, les muscles de fermeture de la mâchoire se contractent simultanément, mais de façon inégale pendant le fonctionnement oral. Par exemple, pendant la mastication, les forces exercées par les muscles de fermeture sont supérieures sur le côté mastiquant que sur le côté libre. Aussi, le niveau de force musculaire exigée dépend de la dureté des aliments et change en fonction du temps d'où le besoin d'un ajustement précis de la force de contraction des muscles de la fermeture de la mâchoire bilatéralement. De plus, les afférences fusoriales des muscles de la mâchoire envoient leur information à la partie ipsilatérale de NVmot seulement. Cela signifie que les motoneurones contralatéraux ne reçoivent pas d'information monosynaptique sur l'état réel de la contraction des muscles ipsilatéraux. Ceci est en conflit avec la nécessité d'une synchronisation rapide et précise des contractions de tous les muscles impliqués dans la fermeture de la mâchoire. Les INs de NVmot-MASS sont de bons candidats pour cet échange rapide d'information parce qu'ils 1) sont placés dans le champ terminal des axones des afférences fusoriales dans NVmot-MASS. Ils peuvent, donc, avoir accès à l'information fournie par des fuseaux neuro-musculaires

ipsilatéraux des muscles de fermeture de la mâchoire et au niveau d'activité des motoneurones ipsilatéraux de ces muscles et 2) projettent directement aux motoneurones contralatéraux de fermeture de la mâchoire.

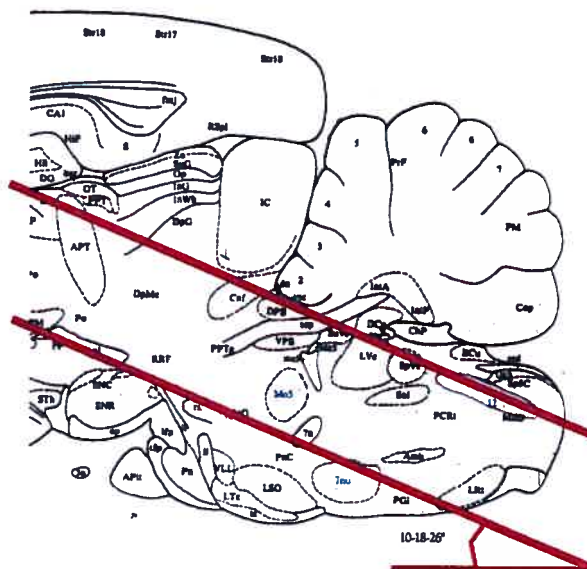
Plusieurs raisons nous laissent croire que la coordination bilatérale de la mâchoire ne constitue pas l'unique rôle des ces INs. Premièrement, les INs peuvent fournir l'inhibition aux TMNs pour compenser le fait que ceux-ci sont exemptés de collatérales axonales et que l'inhibition de Renshaw est absente sur ces motoneurones (Shigenaga *et al.* 1988b, Culheim et 1978 Kellerth, Yabuta 1996). Deuxièmement, les INs sont dans une position idéale pour être impliqués disynaptiquement dans le réflexe d'étirement de la mâchoire. Même s'il ne peut y avoir aucun doute que le réflexe monosynaptique de la mâchoire soit fonctionnellement très puissant, il faut noter que, dans la majorité des cas, ce réflexe a des composantes polysynaptiques (Appenteng *et al.* 1978). Pour ce faire, il existe divers chemins polysynaptiques entre MesV et NVmot (Luschei *et al.* 1987, Lingenhol *et al.* 1991) où les INs peuvent prendre place. Par exemple, on peut considérer les INs comme des interneurones classiques (Usunoff *et al.* 1997) recevant un input afférent et le transférant, dans ce cas, non pas un neurone de relais, mais à un motoneurone effecteur. Cette idée est supportée par la description du groupe de Shigenaga (1988a) d'un interneurone dans NVmot qui reçoit un input afférent convergent des nerfs oraux et des muscles de la mâchoire. De plus, dans une étude neuroanatomique effectuée chez le rat, un marqueur rétrograde (HRP) était injecté unilatéralement dans NVmot et, deux jours plus tard, les axones d'afférences fusoriales primaires du MesV contralatéral ont été physiologiquement identifiées et remplies avec de la biotinamide. Des neurones marqués à l'HRP ont été identifiés contralatralement dans NVmot. On a alors observé des contacts synaptiques en association

extrêmement étroites entre les boutons marqués intracellulairement et les neurones rétrogradement marqués. Cette étude suggère que les TMNs reçoivent des inputs disynaptiques des afférences fusoriales des muscles masticateurs contralatéraux via les INs. Il serait intéressant, à cet égard, de confirmer ces données électrophysiologiquement. Nous proposons de le faire avec une préparation de tranche du tronc cérébral *in vitro*, comme celle utilisée dans la présente étude et en enregistrant la réponse d'INs à la stimulation du MesV. De plus, les INs peuvent être également impliqués dans les réflexes de la mâchoire par des voies polysynaptiques via leurs connexions avec les pré-motoneurones. Dans ce cas-ci, on peut considérer ces INs comme un nœud de convergence de tous les inputs périphériques sur ses régions, les modulant pour produire un seul output coordonné affectant les TMNs. Troisièmement, les muscles de la mâchoire et ceux de la langue sont mécaniquement liés avec l'appareil mandibulaire et les mouvements de la mâchoire sont synchronisés avec ceux de la langue pendant la plupart des comportements oraux (Palmer *et al.* 1997, Weber *et al.* 1987). Les muscles faciaux sont, eux aussi, sollicités durant la mastication. Il devient donc probable que certains des INs, via leurs projections aux noyaux hypoglosse et facial, peuvent jouer un rôle important dans les réflexes trigemino-hypoglossaux et dans la coordination des mouvements oro-faciaux. Cette hypothèse peut, elle aussi, être testée par des expériences d'électrophysiologie. À cet égard, nous avons réussi, dans notre laboratoire, à développer une préparation de tranche horizontale du tronc cérébral contenant à la fois les V^e, VII^e et XII^e noyaux moteurs. L'injection d'un traceur rétrograde fluorescent au niveau de la langue, des muscles de la mâchoire et des muscles faciaux, nous permet d'identifier les trois noyaux dans cette préparation (figure 3). Finalement, le recrutement des TMNs peut constituer un autre rôle des INs. Kwa et ses collaborateurs (2002) ont proposé que,

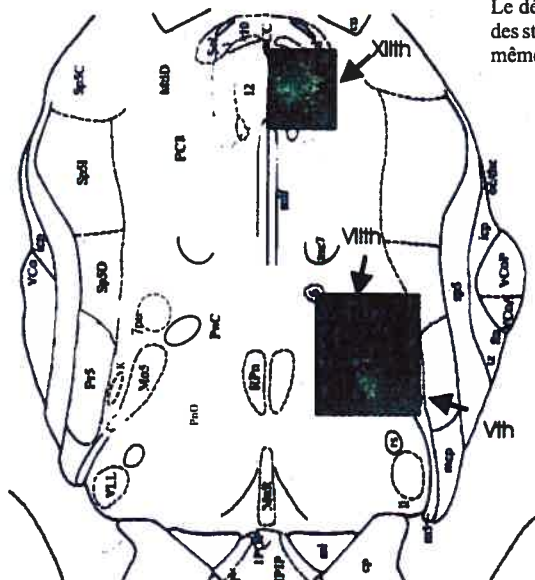
dépendamment de la tâche, de la consistance de la nourriture et des informations proprioceptives, un mouvement plus précis pourrait être produit en recrutant des unités motrices additionnelles et en réglant leur force. Celle-ci est modulée par deux mécanismes : le premier implique la variation du nombre d'unités motrices actives, et le deuxième implique un changement de la fréquence de décharge de l'unité motrice (Kernell et Sjöholm 1975, Fournier et Sieck 1988). Nous postulons que les INs participent dans les deux mécanismes : 1) via leurs collatérales axonales, ils peuvent activer un nombre variable de TMNs; 2) en modulant l'excitabilité des TMNs, ils peuvent contrôler leur fréquence de décharge.

Figure 3

Un traceur rétrograde (choléra-toxine-FITC) a été injecté chez des rats Sprague-Dawley nouveau-nés au niveau de la langue, des muscles digastriques et faciaux de la joue pour marquer les XII^e, V^e et VII^e noyaux moteurs qui innervent ces muscles respectivement. Des injections au DilC18(3) ont été effectuées au niveau des masséters afin d'identifier dans le V^e noyau moteur le pool de motoneurones de fermeture de la mâchoire. Des rats âgés de 8 à 23 jours ont été utilisés pour les expériences. Les tronc cérébraux ont été disséqués à différents angles et épaisseurs. Les tranches ont été observées sous épifluorescence.



L'épaisseur optimale pour maintenir les tranches viables et conserver les V^e, VII^e et XII^e noyaux moteurs avec leurs régions adjacentes est de 800µm.



Le développement des jeunes rats jusqu'à l'âge adulte entraîne un déplacement des structures cérébrales. Afin d'obtenir les V^e, VII^e et XII^e noyaux moteurs sur une même tranche, on doit ajuster l'angle de coupe en fonction de l'âge des rats.

Angle de coupe du tronc cérébral en fonction de l'âge des animaux.

Âge (jours)	Angle de coupe (°)
8-15	10
16-21	18
22 et +	26

3.4. Conclusions

En somme, dans la communication présente, nous avons réussi à démontrer d'une façon non équivoque l'existence d'une population d'interneurones au sein du NVmot-MASS qui jusqu'à présent était spéculative. Notre étude consacrée en première partie à l'électrophysiologie de ces INs, nous indique que ces derniers ont des propriétés cellulaires intrinsèques similaires à celles des interneurones constituant PeriV et qu'ils sont synaptiquement connectés à ce réseau neuronal. Ceci renforce l'idée que les INs de NVmot-MASS forment une partie intégrante de la matrice neuronale de PeriV. Dorénavant, les propriétés cellulaires intrinsèques autant que les inputs synaptiques de ces INs doivent être considérés lorsqu'on s'intéresse aux facteurs qui contrôlent l'excitabilité des TMNs et leur patron de décharge pendant les mouvements de la mâchoire. En deuxième partie, nous avons décrit la distribution spatiale, les caractéristiques neurochimiques et la morphologie des INs. De tels attributs indiquent une implication fonctionnelle non seulement pour l'activité des TMNs, mais également pour les mouvements oro-buccaux. Par conséquent, l'activité des TMNs ne devrait plus être considérée en isolation comme c'était souvent le cas dans le passé.

Malgré les efforts déployés dans la présente étude, il reste à établir le rôle de ces INs dans la mastication, les mouvements oraux et les réflexes de la mâchoire. De plus, comme notre étude était consacrée à la partie de NVmot contenant les TMNs de fermeture de la mâchoire, il serait intéressant aussi de savoir si une population équivalente d'interneurones existe dans le pool des TMNs d'ouverture de la mâchoire.

Liste de références

1. Abudara V, Alvarez AF, Chase MH, Morales FR., Nitric oxide as an anterograde neurotransmitter in the trigeminal motor pool. *J Neurophysiol.* 2002 Jul;88(1):497-506.
2. Aldes LD, Chronister RB, Marco LA. Distribution of glutamic acid decarboxylase and gamma-aminobutyric acid in the hypoglossal nucleus in the rat. *J Neurosci Res.* 1988 Mar;19(3):343-8.
3. Ali DW, Buss RR, Drapeau P., Properties of miniature glutamatergic EPSCs in neurons of the locomotor regions of the developing zebrafish. *J Neurophysiol.* 2000 Jan;83(1):181-91.
4. Alvarado-Mallart MR, Batini C, Buisseret-Delmas C, Corvisier J. Trigeminal representations of the masticatory and extraocular proprioceptors as revealed by horseradish peroxidase retrograde transport. *Exp Brain Res.* 1975 Aug 14;23(2):167-79.
5. Alvarez FJ, Dewey DE, Harrington DA, Fyffe RE. Cell-type specific organization of glycine receptor clusters in the mammalian spinal cord. *J Comp Neurol.* 1997 Mar 3;379(1):150-70.
6. Andersson O, Forssberg H, Grillner S, Wallen P. Peripheral feedback mechanisms acting on the central pattern generators for locomotion in fish and cat. *Can J Physiol Pharmacol.* 1981 Jul; 59(7): 713-26.

7. Appenteng K, Conyers L, Curtis J, Moore J. Monosynaptic connexions of single V interneurons to the contralateral V motor nucleus in anaesthetised rats. *Brain Res.* 1990 Apr 23;514(1):128-30.
8. Appenteng K, Donga R, Williams RG. Morphological and electrophysiological determination of the projections of jaw-elevator muscle spindle afferents in rats. *J Physiol.* 1985 Dec;369:93-113.
9. Appenteng K, Girdlestone D. Transneuronal transport of wheat germ agglutinin-conjugated horseradish peroxidase into trigeminal interneurons of the rat. *J Comp Neurol.* 1987 Apr 15;258(3):387-96.
10. Appenteng K, O'Donovan MJ, Somjen G, Stephens JA, Taylor A. The projection of jaw elevator muscle spindle afferents to fifth nerve motoneurons in the cat. *J Physiol.* 1978 Jun;279:409-23.
11. Appenteng K., Curtis JC, Grimwood PD, Min M-Y, Yang H-W. Modulation of transmission in reflex pathways of trigeminal motoneurons. In: Taylor A, Gladden MH, Durbura R (eds) *Alpha and gamma motor systems*, New York, 1995, pp 29-36.
12. Araki T, Yamano M, Murakami T, Wanaka A, Betz H, Tohyama M. Localization of glycine receptors in the rat central nervous system: an immunocytochemical analysis using monoclonal antibody. *Neuroscience.* 1988 May;25(2):613-24.
13. Arvidsson J, Raappana P, Diez M, Hokfelt T. Expression of neuropeptides in the rat mesencephalic trigeminal nucleus after peripheral axotomy. *Neuroreport.* 1994 Jun 2;5(10):1269-72.

14. Arvidsson J, Raappana P. An HRP study of the central projections from primary sensory neurons innervating the rat masseter muscle. *Brain Res.* 1989 Feb 20;480(1-2):111-8.
15. Bae YC, Choi BJ, Lee MG, Lee HJ, Park KP, Zhang LF, Honma S, Fukami H, Yoshida A, Ottersen OP, Shigenaga Y. Quantitative ultrastructural analysis of glycine- and gamma-aminobutyric acid-immunoreactive terminals on trigeminal alpha- and gamma-motoneuron somata in the rat. *J Comp Neurol.* 2002 Jan 21;442(4):308-19.
16. Bae YC, Nakagawa S, Yasuda K, Yabuta NH, Yoshida A, Pil PK, Moritani M, Chen K, Nagase Y, Takemura M, Shigenaga Y. Electron microscopic observation of synaptic connections of jaw-muscle spindle and periodontal afferent terminals in the trigeminal motor and supratrigeminal nuclei in the cat. *J Comp Neurol.* 1996 Oct 21;374(3):421-35.
17. Bae YC, Nakamura T, Ihn HJ, Choi MH, Yoshida A, Moritani M, Honma S, Shigenaga Y. Distribution pattern of inhibitory and excitatory synapses in the dendritic tree of single masseter alpha-motoneurons in the cat. *J Comp Neurol.* 1999 Nov 29;414(4):454-68.
18. Bae YC, Park KP, Yoshida A, Nakagawa S, Kurata S, Chen K, Takemura M, Shigenaga Y. Identification of gamma-aminobutyric acid-immunoreactive axon endings associated with mesencephalic periodontal afferent terminals and morphometry of the two types of terminals in the cat supratrigeminal nucleus. *J Comp Neurol.* 1997 Dec 8;389(1):127-38.
19. Batini C, Buisseret-Delmas C, Corvisier J., Horseradish peroxidase

- localization of masticatory muscle motoneurons in cat. *J Physiol (Paris)*. 1976 Jun;72(3):301-9.
20. Bazett H.C. and Penfield W.G. A study of the Sherrington decerbrate animal in the chronic as well as acute condition. *Brain* 1922, 45: 185-265.
21. Billig I, Yatim N, Compoin C, Buisseret-Delmas C, Buisseret P. Cerebellar afferences from the mesencephalic trigeminal nucleus in the rat. *Neuroreport*. 1995 Nov 27;6(17):2293-6.
22. Boone TB, Aldes LD. The ultrastructure of two distinct neuron populations in the hypoglossal nucleus of the rat. *Exp Brain Res*. 1984;54(2):321-6.
23. Bourque MJ, Kolta A. Properties and interconnections of trigeminal interneurons of the lateral pontine reticular formation in the rat. *J Neurophysiol*. 2001 Nov;86(5):2583-96.
24. Bredman JJ, Weijjs WA, Moorman AF, Brugman P. Histochemical and functional fibre typing of the rabbit masseter muscle. *J Anat*. 1990 Feb;168:31-47.
25. Bremer F. Physiologie nerveuse de la mastication chez le chat et le lapin. Réflexes de mastication. Réponse masticatrices corticales et centre cortical du goût. 1923.
26. Brodin L, Dale N, Christenson J, Storm-Mathisen J, Hokfelt T, Grillner S., Three types of GABA-immunoreactive cells in the lamprey spinal cord. *Brain Res*. 1990 Jan 29;508(1):172-5.
27. Bryan RN, Trevino DL, Willis WD. Evidence for a common location of

- alpha and gamma motoneurons. *Brain Res.* 1972 Mar 10;38(1):193-6.
28. Buisseret-Delmas C, Pinganaud G, Compoint C, Buisseret P. Projection from trigeminal nuclei to neurons of the mesencephalic trigeminal nucleus in rat. *Neurosci Lett.* 1997 Jul 4;229(3):189-92.
29. Burke RE, Strick PL, Kanda K, Kim CC, Walmsley B. Anatomy of medial gastrocnemius and soleus motor nuclei in cat spinal cord. *J Neurophysiol.* 1977 May;40(3):667-80.
30. Byers MR, Dong WK. Comparison of trigeminal receptor location and structure in the periodontal ligament of different types of teeth from the rat, cat, and monkey. *J Comp Neurol.* 1989 Jan 1;279(1):117-27.
31. Cameron WE, Fang H, Brozanski BS, Guthrie RD. The postnatal growth of motoneurons at three levels of the cat neuraxis. *Neurosci Lett.* 1989 Oct 9;104(3):274-80.
32. Capra NF, Wax TD. Distribution and central projections of primary afferent neurons that innervate the masseter muscle and mandibular periodontium: a double-label study. *J Comp Neurol.* 1989 Jan 15;279(3):341-52.
33. Card JP, Riley JN, Moore RY. The motor trigeminal nucleus of the rat: analysis of neuronal structure and the synaptic organization of noradrenergic afferents. *J Comp Neurol.* 1986 Aug 22;250(4):469-84.
34. Carette B., Characterization of carbachol-induced rhythmic bursting discharges in neurons from guinea pig lateral septum slices. *J Neurophysiol.* 1998 Sep;80(3):1042-55.

35. Cash RM, Linden RW. The distribution of mechanoreceptors in the periodontal ligament of the mandibular canine tooth of the cat. *J Physiol.* 1982 Sep;330:439-47.
36. Chandler SH, Goldberg LJ. Intracellular analysis of synaptic mechanisms controlling spontaneous and cortically induced rhythmical jaw movements in the guinea pig. *J Neurophysiol.* 1982 Jul;48(1):126-38.
37. Chandler SH, Hsaio CF, Inoue T, Goldberg LJ. Electrophysiological properties of guinea pig trigeminal motoneurons recorded in vitro. *J Neurophysiol.* 1994 Jan;71(1):129-45.
38. Chandler SH, Nielsen SA, Goldberg LJ. The effects of a glycine antagonist (strychnine) on cortically induced rhythmical jaw movements in the anesthetized guinea pig. *Brain Res.* 1985 Jan 28;325(1-2):181-6.
39. Chandler SH. Evidence for excitatory amino acid transmission between mesencephalic nucleus of V afferents and jaw-closer motoneurons in the guinea pig. *Brain Res.* 1989 Jan 16;477(1-2):252-64.
40. Cooper S. Muscle spindles and other muscle receptors. In: *The structure and function of muscle.* G.H. Bourne, ed. Academic Press, New York 1960, p.1.
41. Copray JC, Ter Horst GJ, Liem RS, van Willigen JD. Neurotransmitters and neuropeptides within the mesencephalic trigeminal nucleus of the rat: an immunohistochemical analysis. *Neuroscience.* 1990;37(2):399-411.
42. Cullheim S, Kellerth JO. A morphological study of the axons and recurrent axon collaterals of cat alpha-motoneurons supplying different functional

- types of muscle unit. *J Physiol.* 1978 Aug;281:301-13.
43. Curtis JC, Appenteng K., The electrical geometry, electrical properties and synaptic connections onto rat V motoneurons in vitro. *J Physiol.* 1993 Jun;465:85-119.
44. Darian-Smith I, Yokota T. Corticofugal effects on different neuron types within the cat's brain stem activated by tactile stimulation of the face. *J Neurophysiol.* 1966 Mar;29(2):185-206.
45. Del Negro CA, Chandler SH. Physiological and theoretical analysis of K⁺ currents controlling discharge in neonatal rat mesencephalic trigeminal neurons. *J Neurophysiol.* 1997 Feb;77(2):537-53.
46. Del Negro CA, Chandler SH. Regulation of intrinsic and synaptic properties of neonatal rat trigeminal motoneurons by metabotropic glutamate receptors. *J Neurosci.* 1998 Nov 15;18(22):9216-26.
47. Del Negro CA, Hsiao CF, Chandler SH, Garfinkel A., Evidence for a novel bursting mechanism in rodent trigeminal neurons. *Biophys J.* 1998 Jul;75(1):174-82.
48. Del Negro CA, Hsiao CF, Chandler SH., Outward currents influencing bursting dynamics in guinea pig trigeminal motoneurons. *J Neurophysiol.* 1999 Apr;81(4):1478-85.
49. Delgado-Garcia JM, del Pozo F, Baker R. Behavior of neurons in the abducens nucleus of the alert cat--II. Internuclear neurons. *Neuroscience.* 1986 Apr;17(4):953-73.

50. Dellow PG, Lund JP. Evidence for central timing of rhythmical mastication. *J Physiol.* 1971 May;215(1):1-13.
51. Denavit-Saubie M, Corvisier J. Cat trigeminal motor nucleus: rhythmic units firing in relation to opening movements of the mouth. *Brain Res.* 1972 May 26;40(2):500-3.
52. Desmond JE, Moore JW. A supratrigeminal region implicated in the classically conditioned nictitating membrane response. *Brain Res Bull.* 1983 Jun;10(6):765-73.
53. Dessem D, Donga R, Luo P. Primary- and secondary-like jaw-muscle spindle afferents have characteristic topographic distributions. *J Neurophysiol.* 1997 Jun;77(6):2925-44.
54. Dessem D, Iyadurai OD, Taylor A. The role of periodontal receptors in the jaw-opening reflex in the cat. *J Physiol.* 1988 Dec;406:315-30.
55. Dessem D, Taylor A. Morphology of jaw-muscle spindle afferents in the rat. *J Comp Neurol.* 1989 Apr 15;282(3):389-403.
56. Destombes J, Gogan P, Rouviere A. The fine structure of neurones and cellular relationships in the abducens nucleus in the cat. *Exp Brain Res.* 1979 Apr 2;35(2):249-67.
57. Destombes J, Horcholle-Bossavit G, Thiesson D, Jami L. Alpha and gamma motoneurons in the peroneal nuclei of the cat spinal cord: an ultrastructural study. *J Comp Neurol.* 1992 Mar 1;317(1):79-90.
58. Donga R, Dubuc R, Kolta A, Lund JP. Evidence that the masticatory muscles

- receive a direct innervation from cell group k in the rabbit. *Neuroscience*. 1992 Aug;49(4):951-61.
59. Donga R, Lund JP. Discharge patterns of trigeminal commissural last-order interneurons during fictive mastication in the rabbit. *J Neurophysiol*. 1991 Nov;66(5):1564-78.
60. Eccles JC, Eccles RM, Iggo A, Lundberg A. Electrophysiological studies on gamma motoneurons. *Acta Physiol Scand*. 1960 Sep 30;50:32-40.
61. Eccles JC, Eccles RM, Iggo A, Lundberg A. Electrophysiological investigations on Renshaw cells. *J Physiol (Paris)*. 1961 Dec;159:461-78.
62. English AW, Wolf SL, Segal RL. Compartmentalization of muscles and their motor nuclei: the partitioning hypothesis. *Phys Ther*. 1993 Dec;73(12):857-67. Review.
63. Enomoto S, Katakura N, Sunada T, Katayama T, Hirose Y, Ishiwata Y, Nakamura Y., Cortically induced masticatory rhythm in masseter motoneurons after blocking inhibition by strychnine and tetanus toxin. *Neurosci Res*. 1987 Jun;4(5):396-412.
64. Falls WM, King JS. The facial motor nucleus of the opossum: cytology and axosomatic synapses. *J Comp Neurol*. 1976 May 15;167(2):177-204.
65. Fay RA, Norgren R. Identification of rat brainstem multisynaptic connections to the oral motor nuclei in the rat using pseudorabies virus. II. Facial muscle motor systems. *Brain Res Brain Res Rev*. 1997b Dec;25(3):276-90. Review.

66. Fay RA, Norgren R. Identification of rat brainstem multisynaptic connections to the oral motor nuclei using pseudorabies virus. I. Masticatory muscle motor systems. *Brain Res Brain Res Rev.* 1997 Dec;25(3):255-75.
67. Fay RA, Norgren R. Identification of rat brainstem multisynaptic connections to the oral motor nuclei using pseudorabies virus. III. Lingual muscle motor systems. *Brain Res Brain Res Rev.* 1997c Dec;25(3):291-311. Review.
68. Fornal CA, Metzler CW, Marrosu F, Ribiero-do-Valle LE, Jacobs BL. A subgroup of dorsal raphe serotonergic neurons in the cat is strongly activated during oral-buccal movements. *Brain Res.* 1996 Apr 15;716(1-2):123-33.
69. Fort P, Luppi PH, Jouvét M. Afferents to the nucleus reticularis parvicellularis of the cat medulla oblongata: a tract-tracing study with cholera toxin B subunit. *J Comp Neurol.* 1994 Apr 22;342(4):603-18.
70. Fort P, Luppi PH, Sakai K, Salvat D, Jouvét M. Nuclei of origin of monoaminergic, peptidergic, and cholinergic afferents to the cat trigeminal motor nucleus: a double-labeling study with cholera-toxin as a retrograde tracer. *J Comp Neurol.* 1990 Nov 8;301(2):262-75.
71. Fournier M, Sieck GC. Mechanical properties of muscle units in the cat diaphragm. *J Neurophysiol.* 1988 Mar;59(3):1055-66.
72. Friauf E, Baker R. An intracellular HRP-study of cat tensor tympani motoneurons. *Exp Brain Res.* 1985;57(3):499-511.
73. Friauf E. Morphology of motoneurons in different subdivisions of the rat facial nucleus stained intracellularly with horseradish peroxidase. *J Comp*

- Neurol. 1986 Nov 8;253(2):231-41.
74. Gannon PJ, Eden AR. A specialized innervation of the tensor tympani muscle in *Macaca fascicularis*. *Brain Res.* 1987 Feb 24;404(1-2):257-62.
75. Ginestal E, Matute C., Gamma-aminobutyric acid-immunoreactive neurons in the rat trigeminal nuclei. *Histochemistry.* 1993 Jan;99(1):49-55.
76. Goldberg LJ, Chandler SH, Tal M. Relationship between jaw movements and trigeminal motoneuron membrane-potential fluctuations during cortically induced rhythmical jaw movements in the guinea pig. *J Neurophysiol.* 1982 Jul;48(1):110-38.
77. Goldberg LJ, Chandler SH. Evidence for pattern generator control of the effects of spindle afferent input during rhythmical jaw movements. *Can J Physiol Pharmacol.* 1981 Jul;59(7):707-12.
78. Goldberg LJ, Nakamura Y., Lingually induced inhibition of masseteric motoneurons. *Experientia.* 1968 Apr 15;24(4):371-3.
79. Goldberg LJ, Tal M. Intracellular recording in trigeminal motoneurons of the anesthetized guinea pig during rhythmic jaw movements. *Exp Neurol.* 1978 Jan 1;58(1):102-10.
80. Gottlieb S, Taylor A, Bosley MA. The distribution of afferent neurones in the mesencephalic nucleus of the fifth nerve in the cat. *J Comp Neurol.* 1984 Sep 10;228(2):273-83.
81. Grimwood PD, Appenteng K, Curtis JC. Monosynaptic EPSPs elicited by single interneurons and spindle afferents in trigeminal motoneurons of

- anaesthetized rats. *J Physiol.* 1992 Sep;455:641-62.
82. Grottel K, Zimny R, Jakielska D. The nucleus "k" of Meessen and Olszewski efferents to the cerebellar paramedian lobule: a retrograde tracing histochemical (HRP) study in the rabbit and the cat. *J Hirnforsch.* 1986;27(3):305-22.
83. Gura EV, Limanskii IuP, Piliavskii AI. Functional properties of interneurons in the masticatory reflex. *Neurophysiology.* 1972 Mar-Apr;4(2):150-7.
84. Hamos JE, King JS. The synaptic organization of the motor nucleus of the trigeminal nerve in the opossum. *J Comp Neurol.* 1980 Nov 15;194(2):441-63.
85. Harrison, F. and K.B. Corbin. The central pathway for the jaw-jerk. *Am. J. Physiol.* (1942)135:439-445.
86. Hatano Y, Kohli JD, Goldberg LI, Fried J, Mehrotra MM. Vascular relaxing activity and stability studies of 10,10-difluoro-13,14-dehydroprostacyclin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980 Nov;77(11):6846-50.
87. Herring SW, Grimm AF, Grimm BR. Functional heterogeneity in a multipinnate muscle. *Am J Anat.* 1979 Apr;154(4):563-76.
88. Hidaka O, Morimoto T, Masuda Y, Kato T, Matsuo R, Inoue T, Kobayashi M, Takada K. Regulation of masticatory force during cortically induced rhythmic jaw movements in the anesthetized rabbit. *J Neurophysiol.* 1997 Jun;77(6):3168-79.
89. Highstein SM, Karabelas A, Baker R, McCrea RA. Comparison of the

morphology of physiologically identified abducens motor and internuclear neurons in the cat: a light microscopic study employing the intracellular injection of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol*. 1982 Jul 10;208(4):369-81.

90. Hironaka T, Morita Y, Hagihira S, Tateno E, Kita H, Tohyama M. Localization of GABAA-receptor alpha 1 subunit mRNA-containing neurons in the lower brainstem of the rat. *Brain Res Mol Brain Res*. 1990 May;7(4):335-45.
91. Ho SM, Waite PM., Spontaneous activity in the perinatal trigeminal nucleus of the rat. *Neuroreport*. 1999 Feb 25;10(3):659-64.
92. Holstege G, Kuypers HG, Dekker JJ. The organization of the bulbar fibre connections to the trigeminal, facial and hypoglossal motor nuclei. II. An autoradiographic tracing study in cat. *Brain*. 1977 Jun;100(2):264-86.
93. Holstege G, Kuypers HG. Propriobulbar fibre connections to the trigeminal, facial and hypoglossal motor nuclei. I. An anterograde degeneration study in the cat. *Brain*. 1977 Jun;100(2):239-64.
94. Honma S, Varathan V, Wakisaka S., Postnatal development of synaptic inputs to rat masseter motoneurons. *Brain Res Dev Brain Res*. 2002 Nov 15;139(1):67-71. Erratum in: *Brain Res Dev Brain Res*. 2003 Feb 16;140(2):315..
95. Hoover JE, Durkovic RG. Morphological relationships among extensor digitorum longus, tibialis anterior, and semitendinosus motor nuclei of the cat: an investigation employing the retrograde transport of multiple

- fluorescent tracers. *J Comp Neurol.* 1991 Jan 8;303(2):255-66.
96. Horcholle-Bossavit G, Jami L, Thiesson D, Zytnicki D. Motor nuclei of peroneal muscles in the cat spinal cord. *J Comp Neurol.* 1988 Nov 15;277(3):430-40.
97. Hosokawa H. Proprioceptive innervation of striated muscles in the territory of cranial nerves. *Tex Rep Biol Med.* 1961;19:405-64.
98. Hounsgaard J, Hultborn H, Jespersen B, Kiehn O. Bistability of alpha-motoneurons in the decerebrate cat and in the acute spinal cat after intravenous 5-hydroxytryptophan. *J Physiol.* 1988 Nov;405:345-67.
99. Hsiao CF, Del Negro CA, Trueblood PR, Chandler SH., Ionic basis for serotonin-induced bistable membrane properties in guinea pig trigeminal motoneurons. *J Neurophysiol.* 1998 Jun;79(6):2847-56.
100. Hsiao CF, Trueblood PR, Levine MS, Chandler SH. Multiple effects of serotonin on membrane properties of trigeminal motoneurons in vitro. *J Neurophysiol.* 1997 Jun;77(6):2910-24.
101. Hsiao CF, Wu N, Levine MS, Chandler SH., Development and serotonergic modulation of NMDA bursting in rat trigeminal motoneurons. *J Neurophysiol.* 2002 Mar;87(3):1318-28.
102. Huard H, Lund JP, Veilleux D, Dubuc R. An anatomical study of brainstem projections to the trigeminal motor nucleus of lampreys. *Neuroscience.* 1999;91(1):363-78.
103. Hugelin A, Bonvallet M. Oscillographic study of a monosynaptic cranial

reflex, masseteric reflex. *J Physiol (Paris)*. 1957 Jan-Mar;49(1):210-1.

104. Hunt CC, Kuno M. Properties of spinal interneurons. *J Physiol*. 1959 Sep 2;147:346-63.
105. Ichikawa T, Shimizu T. Organization of choline acetyltransferase-containing structures in the cranial nerve motor nuclei and spinal cord of the monkey. *Brain Res*. 1998 Jan 1;779(1-2):96-103.
106. Ichikawa T, Shimizu T. Organization of choline acetyltransferase-containing structures in the cranial nerve motor nuclei and spinal cord of the monkey. *Brain Res*. 1998 Jan 1;779(1-2):96-103.
107. Inoue M, Nozawa-Inoue K, Donga R, Yamada Y., Convergence of selected inputs from sensory afferents to trigeminal premotor neurons with possible projections to masseter motoneurons in the rabbit. *Brain Res*. 2002 Dec 6;957(1):183-91.
108. Inoue T, Chandler SH, Goldberg LJ. Neuropharmacological mechanisms underlying rhythmical discharge in trigeminal interneurons during fictive mastication. *J Neurophysiol*. 1994 Jun;71(6):2061-73.
109. Inoue T, Itoh S, Kobayashi M, Kang Y, Matsuo R, Wakisaka S, Morimoto T., Serotonergic modulation of the hyperpolarizing spike afterpotential in rat jaw-closing motoneurons by PKA and PKC. *J Neurophysiol*. 1999 Aug;82(2):626-37.
110. Inoue T, Itoh S, Kobayashi M, Kang Y, Matsuo R, Wakisaka S, Morimoto T., Serotonergic modulation of the hyperpolarizing spike afterpotential in rat

- jaw-closing motoneurons by PKA and PKC. *J Neurophysiol.* 1999 Aug;82(2):626-37.
111. Jacquin MF, Rhoades RW, Enfiejian HL, Egger MD. Organization and morphology of masticatory neurons in the rat: a retrograde HRP study. *J Comp Neurol.* 1983 Aug 10;218(3):239-56.
112. Jerge CR. The function of the nucleus supratrigeminalis. *J Neurophysiol.* 1963a May;26:393-402.
113. Jerge CR. Organization and function of the trigeminal mesencephalic nucleus. *J Neurophysiol.* 1963b May;26:379-92.
114. Johnson IP. A quantitative ultrastructural comparison of alpha and gamma motoneurons in the thoracic region of the spinal cord of the adult cat. *J Anat.* 1986 Aug;147:55-72.
115. Jüch PJ, Minkels RF, van Willigen JD. Inhibitory commissural connections of neurones in the trigeminal motor nucleus of the rat. *Arch Oral Biol.* 1993 Dec;38(12):1083-91.
116. Kamogawa H, Hanashima N, Naito K, Kagaya K., Candidate interneurons mediating peripherally evoked disynaptic inhibition of masseter motoneurons of both sides. *Neurosci Lett.* 1988 Dec 19;95(1-3):149-54.
117. Kamogawa H, Hiraba H, Manabe K, Sakanashi T, Sekiguchi T, Inage T. Morphological analysis of cat masseteric motoneurons after intracellular staining with horseradish peroxidase. *Brain Res.* 1998 Feb 23;785(1):18-23.
118. Kawamura Y., Tsukamoto S. Analysis of jaw movements from the cortical

jaw motor area and amygdala. *Jpn J Physiol.* 1960 Oct 15;10:471-88.

119. Kernell D, Sjöholm H. Recruitment and firing rate modulation of motor unit tension in a small muscle of the cat's foot. *Brain Res.* 1975 Nov 7;98(1):57-72.
120. Kidokoro Y, Kubota K, Shuto S, Sumino R. Reflex organization of cat masticatory muscles. *J Neurophysiol.* 1968a Sep;31(5):695-708.
121. Kidokoro Y, Kubota K, Shuto S, Sumino R., Possible interneurons responsible for reflex inhibition of motoneurons of jaw-closing muscles from the inferior dental nerve. *J Neurophysiol.* 1968b Sep;31(5):709-16.
122. Kiehn O, Erdal J, Eken T, Bruhn T. Selective depletion of spinal monoamines changes the rat soleus EMG from a tonic to a more phasic pattern. *J Physiol.* 1996 Apr 1;492 (Pt 1):173-84.
123. Kiehn O. Plateau potentials and active integration in the 'final common pathway' for motor behaviour. *Trends Neurosci.* 1991 Feb;14(2):68-73. Review.
124. Kirsch J, Langosch D, Prior P, Littauer UZ, Schmitt B, Betz H. The 93-kDa glycine receptor-associated protein binds to tubulin. *J Biol Chem.* 1991 Nov 25;266(33):22242-5.
125. Kirsch J, Wolters I, Triller A, Betz H. Gephyrin antisense oligonucleotides prevent glycine receptor clustering in spinal neurons. *Nature.* 1993 Dec 23-30;366(6457):745-8.
126. Kobayashi M, Inoue T, Matsuo R, Masuda Y, Hidaka O, Kang Y, Morimoto

- T. Role of calcium conductances on spike afterpotentials in rat trigeminal motoneurons. *J Neurophysiol.* 1997 Jun;77(6):3273-83.
127. Kolta A, Dubuc R, Lund JP. An immunocytochemical and autoradiographic investigation of the serotonergic innervation of trigeminal mesencephalic and motor nuclei in the rabbit. *Neuroscience.* 1993 Apr;53(4):1113-26.
128. Kolta A, Westberg KG, Lund JP. Identification of brainstem interneurons projecting to the trigeminal motor nucleus and adjacent structures in the rabbit. *J Chem Neuroanat.* 2000 Jul;19(3):175-95.
129. Kolta A., In vitro investigation of synaptic relations between interneurons surrounding the trigeminal motor nucleus and masseteric motoneurons. *J Neurophysiol.* 1997 Sep;78(3):1720-5.
130. Kotchabhakdi N, Walberg F. Cerebeller afferents from neurons in motor nuclei of cranial nerves demonstrated by retrograde axonal transport of horseradish peroxidase. *Brain Res.* 1977 Nov 25;137(1):158-63.
131. Kubo Y, Enomoto S, Nakamura Y. Synaptic basis of orbital cortically induced rhythmical masticatory activity of trigeminal motoneurons in immobilized cats. *Brain Res.* 1981 Dec 28;230(1-2):97-110.
132. Kubota K, Narita N, Ohkubo K, Shibanaï S, Nagae K, Kubota M, Odagiri N, Kawamoto T., Morphological studies of the neuromuscular mechanism shifting from sucking to biting of mice. *Acta Anat (Basel).* 1988;133(3):200-8.
133. Kuypers HG. An anatomical analysis of cortico-bulbar connexions to the

pons and lower brain stem in the cat. *J Anat.* 1958a Apr;92(2):198-218.

134. Kuypers HG. Some projections from the peri-central cortex to the pons and lower brain stem in monkey and chimpanzee. *J Comp Neurol.* 1958b Oct;110(2):221-55.
135. Kwa SH, Korfage JA, Weijs WA. Function-dependent anatomical parameters of rabbit masseter motor units. *J Dent Res.* 1995 Oct;74(10):1649-57.
136. Kwa SH, Weijs WA, van Eijden TM. Effects of activation rate on contractile properties of rabbit masseter motor units. *Exp Brain Res.* 2002 Jan;142(2):221-6.
137. Landgren S, Olsson KA, Westberg KG. Bulbar neurones with axonal projections to the trigeminal motor nucleus in the cat. *Exp Brain Res.* 1986;65(1):98-111.
138. Landgren S, Olsson KA. Localization of evoked potentials in the digastric, masseteric, supra- and intertrigeminal subnuclei of the cat. *Exp Brain Res.* 1976 Oct 28;26(3):299-318.
139. Langer T, Fuchs AF, Scudder CA, Chubb MC. Afferents to the flocculus of the cerebellum in the rhesus macaque as revealed by retrograde transport of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol.* 1985 May 1;235(1):1-25.
140. Larsen JO, Hannibal J, Knudsen SM, Fahrenkrug J. Expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the mesencephalic trigeminal nucleus of the rat after transection of the masseteric nerve. *Brain*

Res Mol Brain Res. 1997 Jun;46(1-2):109-17.

141. Larson CR, Finocchio DV, Smith A, Luschei ES. Jaw muscle afferent firing during an isotonic jaw-positioning task in the monkey. *J Neurophysiol.* 1983 Jul;50(1):61-73.
142. Lauterborn JC, Isackson PJ, Montalvo R, Gall CM. In situ hybridization localization of choline acetyltransferase mRNA in adult rat brain and spinal cord. *Brain Res Mol Brain Res.* 1993 Jan;17(1-2):59-69.
143. Lavigne G, Kim JS, Valiquette C, Lund JP. Evidence that periodontal pressoreceptors provide positive feedback to jaw closing muscles during mastication. *J Neurophysiol.* 1987 Aug;58(2):342-58.
144. Li JL, Kaneko T, Nomura S, Mizuno N., Projections from the caudal spinal trigeminal nucleus to commissural interneurons in the supratrigeminal region: an electron microscope study in the rat. *Neurosci Lett.* 1998 Sep 18;254(1):57-60.
145. Li YQ, Takada M, Kaneko T, Mizuno N. Distribution of GABAergic and glycinergic premotor neurons projecting to the facial and hypoglossal nuclei in the rat. *J Comp Neurol.* 1997 Feb 10;378(2):283-94.
146. Li YQ, Takada M, Kaneko T, Mizuno N. GABAergic and glycinergic neurons projecting to the trigeminal motor nucleus: a double labeling study in the rat. *J Comp Neurol.* 1996 Sep 30;373(4):498-510.
147. Li YQ, Takada M, Kaneko T, Mizuno N. Premotor neurons for trigeminal motor nucleus neurons innervating the jaw-closing and jaw-opening muscles:

differential distribution in the lower brainstem of the rat. *J Comp Neurol.* 1995 Jun 12;356(4):563-79.

148. Li YQ, Takada M, Mizuno N. The sites of origin of serotonergic afferent fibers in the trigeminal motor, facial, and hypoglossal nuclei in the rat. *Neurosci Res.* 1993 Sep;17(4):307-13.
149. Li YQ, Tao FS, Okamoto K, Nomura S, Kaneko T, Mizuno N. The supratrigeminal region of the rat sends GABA/glycine-cocontaining axon terminals to the motor trigeminal nucleus on the contralateral side. *Neurosci Lett.* 2002 Sep 13;330(1):13-6.
150. Limwongse V, DeSantis M. Cell body locations and axonal pathways of neurons innervating muscles of mastication in the rat. *Am J Anat.* 1977 Aug;149(4):477-88.
151. Lingenhohl K, Friauf E. Sensory neurons and motoneurons of the jaw-closing reflex pathway in rats: a combined morphological and physiological study using the intracellular horseradish peroxidase technique. *Exp Brain Res.* 1991;83(2):385-96.
152. Lund J.P and Olsson K.A. The importance of reflexes and their control during jaw movement. In *Trends in Neurosciences.* 1983 Nov, vol.6, No.11, pp458-63.
153. Lund J.P. Specialization of the reflexes of the jaws. In: *Neurophysiology of jaws and teeth* 1990. p.p. 142-161.
154. Lund J.P., Rossignol S., La mastication comme modèle d'étude du contrôle

de la motricité, 1980, L'union Médicale, tome 109, No 6, pp.1-6.

155. Lund J.P., Sessle B.J. Neurophysiology mechanisms. From Temporomandibular Joint and Masticatory Muscle Disorders, 2nd edition. G.A. Zarb, G.E. Carlsson, B.J. Sessle & N.D. Mohl (Eds.), Munksgaard, Copenhagen, 1994b. pp.188-207.
156. Lund JP, Dellow PG. The influence of interactive stimuli on rhythmical masticatory movements in rabbits. *Arch Oral Biol.* 1971 Feb;16(2):215-23.
157. Lund JP, Enomoto S., 1988, The generation of mastication by the mammalian central nervous system. IN: Neural control of rhythmic movements in vertebrate. (ed): Chohen A., Rossignol S., Grellner F., New York 1988, 41.
158. Lund JP, Kolta A, Westberg KG, Scott G. Brainstem mechanisms underlying feeding behaviors. *Curr Opin Neurobiol.* 1998 Dec;8(6):718-24. Review.
159. Lund JP, Matthews B. Responses of muscle and joint afferents recorded from the Gasserian ganglion of rabbits. *J Physiol.* 1979 Aug;293:38P-39P.
160. Lund JP, Richmond FJ, Touloumis C, Patry Y, Lamarre Y. The distribution of Golgi tendon organs and muscle spindles in masseter and temporalis muscles of the cat. *Neuroscience.* 1978;3(2):259-70.
161. Lund JP, Sasamoto K, Murakami T, Olsson KA. Analysis of rhythmical jaw movements produced by electrical stimulation of motor-sensory cortex of rabbits. *J Neurophysiol.* 1984 Dec;52(6):1014-29.
162. Lund JP, Smith AM, Sessle BJ, Murakami T. Activity of trigeminal alpha- and gamma-motoneurons and muscle afferents during performance of a biting

task. *J Neurophysiol.* 1979 May;42(3):710-25.

163. Lund JP. Mastication and its control by the brain stem. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1991;2(1):33-64. Review.
164. Luo P, Dessem D, Zhang J. Axonal projections and synapses from the supratrigeminal region to hypoglossal motoneurons in the rat. *Brain Res.* 2001a Feb 2;890(2):314-29.
165. Luo P, Dessem D. Inputs from identified jaw-muscle spindle afferents to trigeminothalamic neurons in the rat: a double-labeling study using retrograde HRP and intracellular biotinamide. *J Comp Neurol.* 1995 Feb 27;353(1):50-66.
166. Luo P, Moritani M, Dessem D. Jaw-muscle spindle afferent pathways to the trigeminal motor nucleus in the rat. *J Comp Neurol.* 2001b Jul 2;435(3):341-53.
167. Luo PF, Li JS. Monosynaptic connections between neurons of trigeminal mesencephalic nucleus and jaw-closing motoneurons in the rat: an intracellular horseradish peroxidase labelling study. *Brain Res.* 1991 Sep 20;559(2):267-75.
168. Luschei ES. Central projections of the mesencephalic nucleus of the fifth nerve: an autoradiographic study. *J Comp Neurol.* 1987 Sep 1;263(1):137-45.
169. Manaker S, Tischler LJ, Bigler TL, Morrison AR. Neurons of the motor trigeminal nucleus project to the hypoglossal nucleus in the rat. *Exp Brain Res.* 1992;90(2):262-70.

170. Manaker S, Tischler LJ. Origin of serotonergic afferents to the hypoglossal nucleus in the rat. *J Comp Neurol*. 1993 Aug 15;334(3):466-76.
171. Manaker S, Zucchi PC. Autoradiographic localization of neurotransmitter binding sites in the hypoglossal and motor trigeminal nuclei of the rat. *Synapse*. 1998 Jan;28(1):44-59.
172. Marani E, Usunoff KG. The trigeminal motonucleus in man. *Arch Physiol Biochem*. 1998 Dec;106(5):346-54.
173. Matsuda KM, Uemura M, Kume M, Matsushima R and Mizuno N. Topographical representation of masticatory muscles in the motor trigeminal nucleus in the rabbit: A HRP study. *Neurosci.Lett*. 1978, 8:1-4
174. McFarland DH, Lund JP. Modification of mastication and respiration during swallowing in the adult human. *J Neurophysiol*. 1995 Oct;74(4):1509-17.
175. Mikhailov VV, Kuneev NV. Electrical properties of membranes of motor neurons innervating the masseter muscle in rats *Neurophysiology*. 1981;13(3):270-4.
176. Minkels RF, Juch PJ, Ter Horst GJ, Van Willigen JD., Projections of the parvocellular reticular formation to the contralateral mesencephalic trigeminal nucleus in the rat. *Brain Res*. 1991 Apr 26;547(1):13-21.
177. Minkels RF, Juch PJ, van Willigen JD. Interneurons of the supratrigeminal area mediating reflex inhibition of trigeminal and facial motoneurons in the rat. *Arch Oral Biol*. 1995 Apr;40(4):275-84.
178. Miyata H, Sugiura T, Wada N, Kawai Y, Shigenaga Y. Morphological

changes in the masseter muscle and its motoneurons during postnatal development. *Anat Rec.* 1996 Apr;244(4):520-8.

179. Mizuno N, Konishi A, Sato M., Localization of masticatory motoneurons in the cat and rat by means of retrograde axonal transport of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol.* 1975 Nov 1;164(1):105-15.
180. Mizuno N, Matsuda K, Iwahori N, Uemura-Sumi M, Kume M, Matsushima R. Representation of the masticatory muscles in the motor trigeminal nucleus of the macaque monkey. *Neurosci Lett.* 1981 Jan 1;21(1):19-22.
181. Mizuno N, Nomura S, Itoh K, Nakamura Y, Konishi A. Commissural interneurons for masticatory motoneurons: a light and electron microscope study using the horseradish peroxidase tracer technique. *Exp Neurol.* 1978 Apr;59(2):254-62.
182. Mizuno N, Nomura S, Konishi A, Uemura-Sumi M, Takahashi O, Yasui Y, Takada M, Matsushima R., Localization of motoneurons innervating the tensor tympani muscles: an horseradish peroxidase study in the guinea pig and cat. *Neurosci Lett.* 1982a Aug 31;31(3):205-8.
183. Mizuno N, Sauerland EK, Clemente CD. Projections from the orbital gyrus in the cat. I. To brain stem structures. *J Comp Neurol.* 1968 Aug;133(4):463-75.
184. Mizuno N, Uemura-Sumi M, Takahashi O, Takada M, Yasui Y, Kume M, Matsushima R., Identification of motoneurons supplying the tensor veli palatini muscle in the guinea pig and cat: an horseradish peroxidase study. *Neurosci Lett.* 1982b Sep 20;32(1):17-21.

185. Mizuno N, Yasui Y, Nomura S, Itoh K, Konishi A, Takada M, Kudo M. A light and electron microscopic study of premotor neurons for the trigeminal motor nucleus. *J Comp Neurol*. 1983 Apr 10;215(3):290-8.
186. Mizuno N. Projection fibers from the main sensory trigeminal nucleus and the supratrigeminal region. *J Comp Neurol* 139: 457-472, 1970.
187. Mogoseanu D, Smith AD, Bolam JP. Monosynaptic innervation of trigeminal motor neurones involved in mastication by neurones of the parvicellular reticular formation. *J Comp Neurol*. 1993 Oct 1;336(1):53-65.
188. Mong FS, Chen YC, Lu CH. Dendritic ramifications of trigeminal motor neurons innervating jaw-closing muscles of rats. *J Neurol Sci*. 1988 Sep;86(2-3):251-64.
189. Moore J, Appenteng K., The membrane properties and firing characteristics of rat jaw-elevator motoneurons. *J Physiol*. 1990 Apr;423:137-53.
190. Moore JA, Appenteng K., The morphology and electrical geometry of rat jaw-elevator motoneurons. *J Physiol*. 1991;440:325-43.
191. Morimoto T, Inoue T, Masuda Y, Nagashima T. Sensory components facilitating jaw-closing muscle activities in the rabbit. *Exp Brain Res*. 1989;76(2):424-40.
192. Moritani M, Kida H, Nagase Y, Fukami H, Honma S, Takemura M, Masuda Y, Bae YC, Shigenaga Y, Yoshida A., Quantitative analysis of the dendritic architectures of single jaw-closing and jaw-opening motoneurons in cats. *Exp*

Brain Res. 2003 Jun;150(3):265-75. Epub 2003 Apr 18.

193. Moriyama Y. Rhythmical jaw movements and lateral ponto-medullary reticular neurons in rats. *Comp Biochem Physiol A*. 1987;86(1):7-14.
194. Mosfeldt Laursen A, Rekling JC. Electrophysiological properties of hypoglossal motoneurons of guinea-pigs studied in vitro. *Neuroscience*. 1989;30(3):619-37.
195. Nagase Y, Moritani M, Nakagawa S, Yoshida A, Takemura M, Zhang LF, Kida H, Shigenaga Y. Serotonergic axonal contacts on identified cat trigeminal motoneurons and their correlation with medullary raphe nucleus stimulation. *J Comp Neurol*. 1997 Aug 4;384(3):443-55.
196. Nakamura Y, Katakura N, Nakajima M. Generation of rhythmical ingestive activities of the trigeminal, facial, and hypoglossal motoneurons in in vitro CNS preparations isolated from rats and mice. *J Med Dent Sci*. 1999 Jun;46(2):63-73. Review.
197. Nakamura Y, Kubo Y, Nozaki S, Takatori M. Cortically induced masticatory rhythm and its modification by tonic peripheral inputs in immobilized cats. *Bull Tokyo Med Dent Univ*. 1976 Jun;23(2):101-7.
198. Nakamura Y, Kubo Y. Masticatory rhythm in intracellular potential of trigeminal motoneurons induced by stimulation of orbital cortex and amygdala in cats. *Brain Res*. 1978 Jun 16;148(2):504-9.
199. Nakamura Y, Mori S, Nagashima H. Origin and central pathways of crossed inhibitory effects of afferents from the masseteric muscle on the masseteric

- motoneuron of the cat. *Brain Res.* 1973 Jul 16;57(1):29-42.
200. Nakamura Y. Brain stem motor mechanisms controlling the trigeminal motoneuron activity. In: spinal and supraspinal mechanisms of voluntary motor control and locomotion. *Prog. Clin. Neurophysiol.* Desmedt J.E (Ed), Basel, Karger, 1980, Vol 8, pp 181-202.
201. Nomura S, Mizuno N. Axonal trajectories of masticatory motoneurons: a genu formation of axons of jaw-opening motoneurons in the cat. *Neurosci Lett.* 1983 May 27;37(1):11-5.
202. Nomura S, Mizuno N. Differential distribution of cell bodies and central axons of mesencephalic trigeminal nucleus neurons supplying the jaw-closing muscles and periodontal tissue: a transganglionic tracer study in the cat. *Brain Res.* 1985 Dec 16;359(1-2):311-9.
203. Nosrat IV, Widenfalk J, Olson L, Nosrat CA., Dental pulp cells produce neurotrophic factors, interact with trigeminal neurons in vitro, and rescue motoneurons after spinal cord injury. *Dev Biol.* 2001 Oct 1;238(1):120-32.
204. Nozaki S, Enomoto S, Nakamura Y. Identification and input-output properties of bulbar reticular neurons involved in the cerebral cortical control of trigeminal motoneurons in cats.
205. Nozaki S, Iriki A, Nakamura Y. Localization of central rhythm generator involved in cortically induced rhythmical masticatory jaw-opening movement in the guinea pig. *J Neurophysiol.* 1986a Apr;55(4):806-25.
206. Nozaki S, Iriki A, Nakamura Y. Role of corticobulbar projection neurons in

cortically induced rhythmical masticatory jaw-opening movement in the guinea pig. *J Neurophysiol.* 1986b Apr;55(4):826-45.

207. O'Brien JA, Berger AJ. Cotransmission of GABA and glycine to brain stem motoneurons. *J Neurophysiol.* 1999 Sep;82(3):1638-41.
208. Ohta M, Moriyama Y. Supratrigeminal neurons mediate the shortest, disynaptic pathway from the central amygdaloid nucleus to the contralateral trigeminal motoneurons in the rat. *Comp Biochem Physiol A.* 1986;83(4):633-41.
209. Olsson KA, Landgren S, Westberg KG. Location of, and peripheral convergence on, the interneuron in the disynaptic path from the coronal gyrus of the cerebral cortex to the trigeminal motoneurons in the cat. *Exp Brain Res.* 1986;65(1):83-97.
210. Ornung G, Shupliakov O, Linda H, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Ulfhake B, Cullheim S. Qualitative and quantitative analysis of glycine- and GABA-immunoreactive nerve terminals on motoneuron cell bodies in the cat spinal cord: a postembedding electron microscopic study. *J Comp Neurol.* 1996 Feb 12;365(3):413-26.
211. Palmer JB, Hiiemae KM, Liu J. Tongue-jaw linkages in human feeding: a preliminary videofluorographic study. *Arch Oral Biol.* 1997 Jun;42(6):429-41.
212. Parsons RL, Barstow KL, Scornik FS. Spontaneous miniature hyperpolarizations affect threshold for action potential generation in mudpuppy cardiac neurons. *J Neurophysiol.* 2002 Sep;88(3):1119-27.

213. Peever JH, Lai YY, Siegel JM., Excitatory effects of hypocretin-1 (orexin-A) in the trigeminal motor nucleus are reversed by NMDA antagonism. *J Neurophysiol.* 2003 May;89(5):2591-600. Epub 2003 Jan 15.
214. Petropoulos D, Lund JP, Dubuc R. A physiological study of brainstem and peripheral inputs to trigeminal motoneurons in lampreys. *Neuroscience.* 1999;91(1):379-89.
215. Peyron MA, Maskawi K, Woda A, Tanguay R, Lund JP. Effects of food texture and sample thickness on mandibular movement and hardness assessment during biting in man. *J Dent Res.* 1997 Mar;76(3):789-95.
216. Pokorski M, Gromysz H. Involvement of the motor trigeminal nucleus in respiratory phase-switching in the cat. *Acta Neurobiol Exp (Mars).* 1997;57(1):31-9.
217. Popratiloff AS, Streppel M, Gruart A, Guntinas-Lichius O, Angelov DN, Stennert E, Delgado-Garcia JM, Neiss WF., Hypoglossal and reticular interneurons involved in oro-facial coordination in the rat. *J Comp Neurol.* 2001 May 7;433(3):364-79.
218. Raappana P, Arvidsson J. Location, morphology, and central projections of mesencephalic trigeminal neurons innervating rat masticatory muscles studied by axonal transport of cholera toxin B subunit-horseradish peroxidase. *J Comp Neurol.* 1993 Feb 1;328(1):103-14.
219. Rampon C, Luppi PH, Fort P, Peyron C, Jouvet M., Distribution of glycine-immunoreactive cell bodies and fibers in the rat brain. *Neuroscience,* 1996b Dec;75(3):737-55.

220. Rampon C, Peyron C, Petit JM, Fort P, Gervasoni D, Luppi PH. Origin of the glycinergic innervation of the rat trigeminal motor nucleus. *Neuroreport*. 1996a Nov 25;7(18):3081-5.
221. Rekling JC, Funk GD, Bayliss DA, Dong XW, Feldman JL. Synaptic control of motoneuronal excitability. *Physiol Rev*. 2000 Apr;80(2):767-852. Review.
222. Reuveni I, Friedman A, Amitai Y, and Gutnick MJ. Stepwise repolarization from Ca^{2+} plateaus in neocortical pyramidal cells: evidence for nonhomogeneous distribution of HVA Ca^{2+} in dendrites. *J Neurosci* 31: 4609-4621, 1993.
223. Rokx JT, Juch PJ, Van Willigen JD. On the bilateral innervation of masticatory muscles: a study with retrograde tracers. *J Anat*. 1985a Mar;140 (Pt 2):237-43.
224. Rokx JT, Liem RS, van Willigen JD. Identification of alpha and gamma trigeminal motoneurons by the vibratome paraplast technique for HRP histochemistry. *Acta Anat (Basel)*. 1987;129(4):333-6.
225. Rokx JT, Luiten PG, Van Willigen JD. Afferent projections to the mesencephalic trigeminal nucleus in the rat. Anterograde tracing with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *Acta Anat (Basel)*. 1988;132(3):260-4.
226. Rokx JT, van Willigen JD, Jansen HW. Muscle fibre types and muscle spindles in the jaw musculature of the rat. *Arch Oral Biol*. 1984;29(1):25-31.
227. Rokx JT, van Willigen JD, Juch PJ. Distribution of innervating neurons of masticatory muscle spindles in the rat: an HRP study. *Exp Neurol*. 1985b

Jun;88(3):562-9.

228. Rokx JT, van Willigen JD, Juch PJ., Bilateral brainstem connections of the rat supratrigeminal region. *Acta Anat (Basel)*. 1986;127(1):16-21.
229. Romfh JH, Capra NF, Gatipon GB. Trigeminal nerve and temporomandibular joint of the cat: a horseradish peroxidase study. *Exp Neurol*. 1979 Jul;65(1):99-106.
230. Roste GK. Non-motoneurons in the facial and motor trigeminal nuclei projecting to the cerebellar flocculus in the cat. A fluorescent double-labelling and WGA-HRP study. *Exp Brain Res*. 1989;75(2):295-305.
231. Ruggiero DA, Ross CA, Kumada M, Reis DJ. Reevaluation of projections from the mesencephalic trigeminal nucleus to the medulla and spinal cord: new projections: a combined retrograde and anterograde horseradish peroxidase study. *J Comp Neurol*. 1982 Apr 10;206(3):278-92.
232. Saad M, Dubuc R, Westberg KG, Lund JP. Distribution of cholinergic neurons in cell group K of the rabbit brainstem. *Neuroscience*. 1999;88(3):927-37.
233. Saad M, Dubuc R, Widmer CG, Westberg KG, Lund JP. Anatomical organization of efferent neurons innervating various regions of the rabbit masseter muscle. *J Comp Neurol*. 1997 Jul 14;383(4):428-38.
234. Saha S, Appenteng K, Batten TF. Light and electron microscopical localisation of 5-HT-immunoreactive boutons in the rat trigeminal motor nucleus. *Brain Res*. 1991a Sep 13;559(1):145-8.

235. Saha S, Appenteng K, Batten TF., Quantitative analysis and postsynaptic targets of GABA-immunoreactive boutons within the rat trigeminal motor nucleus. *Brain Res.* 1991b Oct 4;561(1):128-38.
236. Sandler VM, Puil E, Schwarz DW. Intrinsic response properties of bursting neurons in the nucleus principalis trigemini of the gerbil. *Neuroscience.* 1998 Apr;83(3):891-904.
237. Sasamoto K, Zhang G, Iwasaki M. Two types of rhythmical jaw movements evoked by stimulation of the rat cortex. *Shika Kiso Igakkai Zasshi.* 1990 Feb;32(1):57-68.
238. Sasamoto K., Motor nuclear representation of masticatory muscles in the rat. *Jpn J Physiol.* 1979;29(6):739-47.
239. Sato K, Zhang JH, Saika T, Sato M, Tada K, Tohyama M. Localization of glycine receptor alpha 1 subunit mRNA-containing neurons in the rat brain: an analysis using in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience.* 1991;43(2-3):381-95.
240. Sawczuk A., Powers R.K. & Binder M.D., Intrinsic properties of motoneurons. Implications of muscle fatigue. 1995, pp.123-134.
241. Schrader LA, Tasker JG., Presynaptic modulation by metabotropic glutamate receptors of excitatory and inhibitory synaptic inputs to hypothalamic magnocellular neurons. *J Neurophysiol.* 1997 Feb;77(2):527-36.
242. Schwartz G, Enomoto S, Valiquette C, Lund JP. Mastication in the rabbit: a description of movement and muscle activity. *J Neurophysiol.* 1989

Jul;62(1):273-87.

243. Sears TA. Investigations on respiratory motoneurons of the thoracic spinal cord. *Prog Brain Res.* 1964;12:259-73.
244. Sessle BJ., Identification of alpha and gamma trigeminal motoneurons and effects of stimulation of amygdala, cerebellum, and cerebral cortex. *Exp Neurol.* 1977a Feb;54(2):303-22.
245. Sessle BJ., Modulation of alpha and gamma trigeminal motoneurons by various peripheral stimuli. *Exp Neurol.* 1977b Feb;54(2):323-39.
246. Severin FV, Orlovskii GN, Shik ML. Work of muscle receptors during controlled locomotion. *Biophysics.* 1967 May-Jun;12(3):502-11.
247. Sherrington, C.S. Reflexes elicitable in the cat from pinna, vibrissae and jaws. *J. Physiol. (Lond.)*, 1927, 51:404-431
248. Shigenaga Y, Doe K, Suemune S, Mitsuhiro Y, Tsuru K, Otani K, Shirana Y, Hosoi M, Yoshida A, Kagawa K. Physiological and morphological characteristics of periodontal mesencephalic trigeminal neurons in the cat--intra-axonal staining with HRP. *Brain Res.* 1989 Dec 25;505(1):91-110.
249. Shigenaga Y, Hirose Y, Yoshida A, Fukami H, Honma S, Bae YC., Quantitative ultrastructure of physiologically identified premotoneuron terminals in the trigeminal motor nucleus in the cat. *J Comp Neurol.* 2000 Oct 9;426(1):13-30.
250. Shigenaga Y, Sera M, Nishimori T, Suemune S, Nishimura M, Yoshida A, Tsuru K. The central projection of masticatory afferent fibers to the

trigeminal sensory nuclear complex and upper cervical spinal cord. *J Comp Neurol.* 1988 b Feb 22;268(4):489-507.

251. Shigenaga Y, Yoshida A, Mitsuhiro Y, Doe K, Suemune S. Morphological and functional properties of trigeminal nucleus oralis neurons projecting to the trigeminal motor nucleus of the cat. *Brain Res* 1988c, 416: 143-149.
252. Shigenaga Y, Yoshida A, Tsuru K, Mitsuhiro Y, Otani K, Cao CQ. Physiological and morphological characteristics of cat masticatory motoneurons--intracellular injection of HRP. *Brain Res.* 1988a Oct 4;461(2):238-56.
253. Shupliakov O, Ornung G, Brodin L, Ulfhake B, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Cullheim S. Immunocytochemical localization of amino acid neurotransmitter candidates in the ventral horn of the cat spinal cord: a light microscopic study. *Exp Brain Res.* 1993;96(3):404-18.
254. Sjoström A, Zangger P. ALPHA-GAMMA-Linkage in the spinal generator for locomotion in the cat. *Acta Physiol Scand.* 1975 May;94(1):130-2.
255. Smith J, Wolkove N, Colacone A, Kreisman H. Coordination of eating, drinking and breathing in adults. *Chest.* 1989 Sep;96(3):578-82.
256. Spangler KM, Henkel CK, Miller IJ Jr. Localization of the motor neurons to the tensor tympani muscle. *Neurosci Lett.* 1982 Sep 20;32(1):23-7.
257. Spencer RF, Sterling P. An electron microscope study of motoneurons and interneurons in the cat abducens nucleus identified by retrograde intraaxonal transport of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol.* 1977 Nov 1;176(1):65-

- 85.
258. Stein RB. Peripheral control of movement. *Physiol Rev.* 1974 Jan;54(1):215-43. Review.
259. Strick PL, Burke RE, Kanda K, Kim CC, Walmsley B. Differences between alpha and gamma motoneurons labeled with horseradish peroxidase by retrograde transport. *Brain Res.* 1976 Sep 3;113(3):582-8.
260. Sumi T. Some properties of cortically-evoked swallowing and chewing in rabbits. *Brain Res.* 1969 Sep;15(1):107-20.
261. Svensson P, Houe L, Arendt-Nielsen L. Bilateral experimental muscle pain changes electromyographic activity of human jaw-closing muscles during mastication. *Exp Brain Res.* 1997 Aug;116(1):182-5.
262. Szekely G, Matesz C. The accessory motor nuclei of the trigeminal, facial, and abducens nerves in the rat. *J Comp Neurol.* 1982 Sep 20;210(3):258-64.
263. Szentagothai, J. Anatomical considerations of monosynaptic reflex arcs. *J Neurophysiol.* (1948)11:445-454.
264. Taal W, Holstege JC. GABA and glycine frequently colocalize in terminals on cat spinal motoneurons. *Neuroreport.* 1994 Nov 21;5(17):2225-8.
265. Takahashi O, Mizuno N, Mitani A, Takeuchi Y, Matsushima R. Identification of motoneurons innervating the tensor tympani muscle in the rabbit: a retrograde horseradish peroxidase study. *Neurosci Lett.* 1984 Aug 24;49(1-2):19-23.

266. Takahashi T, Inward rectification in neonatal rat spinal motoneurons. *J Physiol (Lond)* 1990 423: 47-62.
267. Takasu N, Hashimoto PH. Morphological identification of an interneuron in the hypoglossal nucleus of the rat: a combined Golgi-electron microscopic study. *J Comp Neurol*. 1988 May 15;271(3):461-71.
268. Takasu N, Nakatani T, Arikuni T, Kimura H. Immunocytochemical localization of gamma-aminobutyric acid in the hypoglossal nucleus of the macaque monkey, *Macaca fuscata*: a light and electron microscopic study. *J Comp Neurol*. 1987 Sep 1;263(1):42-53.
269. Takata M, Kawamura Y. Neurophysiologic properties of the supratrigeminal nucleus. *Jpn J Physiol*. 1970 Feb 15;20(1):1-11.
270. Takemura M, Sugimoto T, Sakai A. Topographic organization of central terminal region of different sensory branches of the rat mandibular nerve. *Exp Neurol*. 1987 Jun;96(3):540-57.
271. Takeuchi Y, Satoda T, Matsushima R. Amygdaloid projections to commissural interneurons for masticatory motoneurons. *Brain Res Bull*. 1988 Jul;21(1):123-7.
272. Ter Horst GJ, Copray JC, Liem RS, Van Willigen JD., Projections from the rostral parvocellular reticular formation to pontine and medullary nuclei in the rat: involvement in autonomic regulation and orofacial motor control. *Neuroscience*. 1991;40(3):735-58.
273. Ter Horst GJ, Copray JC, Van Willigen JD, Liem RS., Contralateral

projections of cells in the motor trigeminal nucleus of the rat. *Neurosci Lett*. 1990 Jun 8;113(3):260-6.

274. Ter Horst GJ, Luiten PG, Kuipers F. Descending pathways from hypothalamus to dorsal motor vagus and ambiguus nuclei in the rat. *J Auton Nerv Syst*. 1984 Jul;11(1):59-75.
275. Thexton AJ, Hiimae KM, Crompton AW. Food consistency and bite size as regulators of jaw movement during feeding in the cat. *J Neurophysiol*. 1980 Sep;44(3):456-74.
276. Todd AJ, Watt C, Spike RC, Sieghart W. Colocalization of GABA, glycine, and their receptors at synapses in the rat spinal cord. *J Neurosci*. 1996 Feb 1;16(3):974-82.
277. Torvik A. Afferent connections to the sensory trigeminal nuclei, the nucleus of the solitary tract and adjacent structures; an experimental study in the rat. *J Comp Neurol*. 1956 Nov;106(1):51-141.
278. Travers JB, Norgren R., Afferent projections to the oral motor nuclei in the rat. *J Comp Neurol*. 1983 Nov 1;220(3):280-98.
279. Trueblood PR, Levine MS, Chandler SH. Dual-component excitatory amino acid-mediated responses in trigeminal motoneurons and their modulation by serotonin in vitro. *J Neurophysiol*. 1996 Oct;76(4):2461-73.
280. Tsuboi A, Kolta A, Chen CC, Lund JP. Neurons of the trigeminal main sensory nucleus participate in the generation of rhythmic motor patterns. *Eur J Neurosci*. 2003 Jan;17(2):229-38.

281. Turman J Jr, Chandler SH., Immunohistochemical evidence for GABA and glycine-containing trigeminal premotoneurons in the guinea pig. *Synapse*. 1994b Sep;18(1):7-20.
282. Turman J Jr, Chandler SH., Immunohistochemical localization of glutamate and glutaminase in guinea pig trigeminal premotoneurons. *Brain Res*. 1994a Jan 14;634(1):49-61.
283. Turman JE Jr, Hiyama L, Castillo M, Chandler SH. Expression of group I and II metabotropic glutamate receptors in trigeminal neurons during postnatal development. *Dev Neurosci*. 2001;23(1):41-54.
284. Turman JE Jr, MacDonald AS, Pawl KE, Bringas P, Chandler SH. AMPA receptor subunit expression in trigeminal neurons during postnatal development. *J Comp Neurol*. 2000 Nov 6;427(1):109-23.
285. Uemura-Sumi M, Takahashi O, Matsushima R, Takata M, Yasui Y, Mizuno N. Localization of masticatory motoneurons in the trigeminal motor nucleus of the guinea pig. *Neurosci Lett*. 1982 Apr 26;29(3):219-24.
286. Ulfhake B, Kellerth JO. A quantitative light microscopic study of the dendrites of cat spinal alpha-motoneurons after intracellular staining with horseradish peroxidase. *J Comp Neurol*. 1981 Nov 10;202(4):571-83.
287. Usunoff KG, Marani E, Schoen JH. The trigeminal system in man. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 1997;136:I-X, 1-126. Review.
288. Viana F, Bayliss DA, Berger AJ. Calcium conductances and their role in the firing behaviour of neonatal rat hypoglossal motoneurons.. *J Neurophysiol*.

1993 Jun;69:2137-49.

289. Vornov JJ, Sutin J., Brainstem projections to the normal and noradrenergically hyperinnervated trigeminal motor nucleus. *J Comp Neurol.* 1983 Feb 20;214(2):198-208.
290. Weber CM, Smith A. Reflex responses in human jaw, lip, and tongue muscles elicited by mechanical stimulation. *J Speech Hear Res.* 1987 Mar;30(1):70-9.
291. Weijts W.A. and Dantuma R. Functional anatomy of the masticatory apparatus in the rabbit. *Netherl. J. Zool.* 1981, 31:99-147.
292. Weijts WA, Dantuma R. Electromyography and mechanics of mastication in the albino rat. *J Morphol.* 1975 May;146(1):1-33.
293. Weijts WA, Juch PJ, Kwa SH, Korfage JA. Motor unit territories and fiber types in rabbit masseter muscle. *J Dent Res.* 1993 Nov;72(11):1491-8.
294. Weijts-Boot J, van Willigen JD. Bilateral effects of electrical stimulation of the palate on digastric and tongue reflex activity in the rat. *Arch Oral Biol.* 1978;23(4):269-71.
295. Westberg K, Clavelou P, Sandstrom G, Lund JP. Evidence that trigeminal brainstem interneurons form subpopulations to produce different forms of mastication in the rabbit. *J Neurosci.* 1998 Aug 15;18(16):6466-79.
296. Westberg KG, Clavelou P, Schwartz G, Lund JP. Effects of chemical stimulation of masseter muscle nociceptors on trigeminal motoneuron and interneuron activities during fictive mastication in the rabbit. *Pain.* 1997

Dec;73(3):295-308.

297. Westberg KG, Sandstrom G, Olsson KA. Integration in trigeminal premotor interneurons in the cat. 3. Input characteristics and synaptic actions of neurones in subnucleus-gamma of the oral nucleus of the spinal trigeminal tract with a projection to the masseteric motoneurone subnucleus. *Exp Brain Res.* 1995;104(3):449-61.
298. Westberg KG, Scott G, Olsson KA, Lund JP. Discharge patterns of neurons in the medial pontobulbar reticular formation during fictive mastication in the rabbit. *Eur J Neurosci.* 2001 Nov;14(10):1709-18.
299. Widmer CG, Morris-Wiman JA, Calhoun JC. Development of trigeminal mesencephalic and motor nuclei in relation to masseter muscle innervation in mice. *Brain Res Dev Brain Res.* 1998 Jun 15;108(1-2):1-11.
300. Wold J.E. and Brodal A. The projection of cortical sensorimotor regions onto the trigeminal neurons in the cat. An experimental anatomical study. *Neurobiol.* 1973, 3:353-375.
301. Yabuta NH, Yasuda K, Nagase Y, Yoshida A, Fukunishi Y, Shigenaga Y. Light microscopic observations of the contacts made between two spindle afferent types and alpha-motoneurons in the cat trigeminal motor nucleus. *J Comp Neurol.* 1996 Oct 21;374(3):436-50.
302. Yamamoto T, Onozuka M, Nagasaki S, Watanabe K, Ozono S. Origin of primary sensory neurons innervating the buccal stretch receptor. *J Dent Res.* 1999 Jan;78(1):49-53.

303. Yang HW, Appenteng K, Batten TF., Ultrastructural subtypes of glutamate-immunoreactive terminals on rat trigeminal motoneurons and their relationships with GABA-immunoreactive terminals. *Exp Brain Res.* 1997b Mar;114(1):99-116.
304. Yang HW, Min MY, Appenteng K, Batten TF. Glycine-immunoreactive terminals in the rat trigeminal motor nucleus: light- and electron-microscopic analysis of their relationships with motoneurons and with GABA-immunoreactive terminals. *Brain Res.* 1997a Feb 28;749(2):301-19.
305. Yasui Y, Itoh K, Mitani A, Takada M, Mizuno N. Cerebral cortical projections to the reticular regions around the trigeminal motor nucleus in the cat. *J Comp Neurol.* 1985 Nov 15;241(3):348-56.
306. Yasui Y, Tsumori T, Ando A, Domoto T, Kayahara T, Nakano K. Descending projections from the superior colliculus to the reticular formation around the motor trigeminal nucleus and the parvicellular reticular formation of the medulla oblongata in the rat. *Brain Res.* 1994 Sep 12;656(2):420-6.
307. Yoshida A, Fukami H, Nagase Y, Appenteng K, Honma S, Zhang LF, Bae YC, Shigenaga Y., Quantitative analysis of synaptic contacts made between functionally identified oralis neurons and trigeminal motoneurons in cats. *J Neurosci.* 2001 Aug 15;21(16):6298-307.
308. Yoshida A, Tsuru K, Mitsuhiro Y, Otani K, Shigenaga Y. Morphology of masticatory motoneurons stained intracellularly with horseradish peroxidase. *Brain Res.* 1987 Jul 28;416(2):393-401.
309. Yuste R, Gutnick MJ, Saar D, Delaney KR, and Tank DW. Ca^{2+}

accumulation in dendrites of neocortical pyramidal neurons: an apical band and evidence for two functional compartments. *Neuron* 13: 23-43, 1994

310. Zhang GX, Sasamoto K. Projections of two separate cortical areas for rhythmical jaw movements in the rat. *Brain Res Bull.* 1990 Feb;24(2):221-30.
311. Zhang JD, Wang BR, Li HM, Li JS. Projections from neurons innervating the masseter muscle to the subnucleus oralis of the spinal trigeminal nucleus and adjacent lateral reticular formation in the rat. *J Hirnforsch.* 1991;32(5):641-6.