

Université de Montréal

**Organisation anatomique et rôle du couplage astrocytaire
dans l'activité rythmique du noyau sensoriel du trijumeau**

par Steven Condamine

Département de neurosciences

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de docteur
en Neurosciences

Décembre 2018

© Condamine, 2018

Résumé

Plusieurs fonctions cérébrales dépendent de la capacité de générer une activité rythmique dans les circuits neuronaux. L'exemple le plus intuitif est celui des réseaux de neurones, nommés générateurs de patrons centraux (GPCs), encodant des patrons de mouvements répétitifs tels que ceux de la locomotion, de la respiration et de la mastication.

Nos travaux ont été réalisés dans le noyau sensoriel principal du trijumeau (NVsnpr) dans lequel une activité rythmique est observée uniquement dans la partie dorsale qui formerait le cœur rythmogénique du GPC de la mastication. Des travaux antérieurs ont démontré le rôle clé des interactions astrocytes-neurones pour la genèse de décharges rythmiques. En effet, l'activité rythmogénique de ces neurones dépend d'un courant sodique persistant (I_{NaP}) dont l'activation est favorisée par une baisse du calcium extracellulaire. Les astrocytes activés par les afférences au noyau interviennent dans ce processus en libérant une protéine chélatrice du calcium, le S100 β , provoquant une baisse de calcium extracellulaire. Les astrocytes sont généralement couplés par des jonctions communicantes et dans de nombreux cas, la forme des réseaux astrocytaires chevauche parfaitement l'organisation neuronale sous-jacente dans les régions où celle-ci respecte une certaine cartographie. Cependant, il n'existe aucune description de l'organisation des réseaux astrocytaires dans les GPCs.

Notre première hypothèse est que le couplage astrocytaire présenterait une organisation spatiale supportant la fonction rythmogénique neuronale située exclusivement dans la partie dorsale du NVsnpr. Pour cela, nous avons développé une méthode d'analyse vectorielle pour

étudier l'orientation préférentielle des réseaux astrocytaires dans le noyau. Deuxièmement, ce couplage astrocytaire pourrait jouer un rôle dans la rythmogenèse et sa coordination.

Nos résultats démontrent que le couplage astrocytaire est augmenté par les stimuli induisant la rythmogenèse, cette modulation impliquant le S100 β . Ces réseaux d'astrocytes présentent une étendue limitée et une organisation spatiale qui épouse les frontières de la partie dorsale du NVsnpr. Enfin, ce couplage astrocytaire est nécessaire à la rythmogenèse.

Ces résultats démontrent l'implication des réseaux astrocytaires dans la délimitation d'une frontière fonctionnelle et suggèrent qu'ils pourraient jouer un rôle important dans la coordination et/ou la synchronisation de la décharge des populations. Cette implication des réseaux astrocytaires dans une activité rythmique pourrait être observée dans d'autres circuits neuronaux comme les GPCs de la respiration ou de la locomotion.

Mots-clés : Mastication, Générateurs de patrons centraux, Noyau sensoriel principal du trijumeau, S100 β , Réseaux astrocytaires, Connexines, Analyse vectorielle.

Abstract

Several cerebral functions depend on the capacity of neuronal circuit to generate rhythmic activity. The most intuitive example is neuronal circuits referred to as central pattern generators (CPGs), which encode the repetitive movement patterns for locomotion, respiration and mastication.

Our work was performed in the trigeminal main sensory nucleus where rhythmic activity observed only in the dorsal part is thought to reflect the rhythmogenic core of the masticatory CPG. Previous studies have shown the key role that astrocytes-neurons interactions play in neuronal rhythmic firing. In these neurons, rhythmogenic activity relies on a sodium persistent current (I_{NaP}) which activation is promoted by a decrease of extracellular calcium. Astrocytes activated by afferences to the nucleus take part in this process by releasing S100 β , a protein that chelates calcium and promotes I_{NaP} activation by decreasing extracellular calcium. Generally, astrocytes are coupled by gap junctions and in many cases where neurons are organized topographically, the shape of astrocytic networks overlap perfectly the underlying neuronal organization. However, the organization of astrocytic networks in CPGs has not been described so far.

Our first hypothesis is that the organization of astrocytic coupling supports the rhythmogenic function in the dorsal part of the NVsnpr. We developed a vectorial analysis method to address the preferential orientation of astrocytic networks in the nucleus. Secondly, astrocytic coupling could be implicated in rhythmogenesis.

The results presented in this thesis show that rhythmogenic stimuli increase astrocytic coupling and S100 β is implicated in this modulation. Astrocytic networks show a limited

spread and a spatial organization which follow the boundaries of the dorsal part of NVsnpr. Finally, astrocytic coupling is required for rhythmogenesis.

Our results indicate that astrocytic networks define functional boundaries and suggest that they could play an important role in the coordination and/or synchronization of firing of neuronal populations. Astrocytic coupling may also play a similar role in other neural circuits such as locomotion and respiration CPG.

Keywords: Mastication, Central pattern generator, Trigeminal main sensory nucleus, S100 β , Astrocyte networks, Connexin, Vectorial analysis

Table des matières

| | |
|---|-------------|
| RÉSUMÉ | II |
| ABSTRACT | IV |
| TABLE DES MATIÈRES | VI |
| LISTE DES TABLEAUX | IX |
| LISTE DES FIGURES | X |
| LISTE DES SIGLES | XIII |
| REMERCIEMENTS | XVI |
| CHAPITRE 1: INTRODUCTION | 18 |
| 1. LES MOUVEMENTS RYTHMIQUES | 18 |
| 2. LA MASTICATION ET SON CONTRÔLE..... | 18 |
| 2.1 <i>Le mouvement masticatoire</i> | 18 |
| 2.2 <i>Organisation des muscles masticatoires</i> | 21 |
| 2.3 <i>Les motoneurones</i> | 22 |
| 2.4 <i>Contrôle cortical de la mastication</i> | 24 |
| 2.5 <i>Concept de Générateur de Patron Central (GPC)</i> | 26 |
| 2.6 <i>Localisation du GPC masticatoire</i> | 29 |
| 2.7 <i>Le Noyau sensoriel principal du trijumeau (NVsnpr)</i> | 30 |
| 3. LA RYTHMOGÈNE DANS LE NVSNPR | 34 |
| 3.1 <i>Les mécanismes neuronaux de la rythmogenèse</i> | 34 |
| 3.2 <i>Induction de la rythmogenèse dans le NVsnpr : les différents stimuli impliqués</i> | 39 |
| 4. LES CELLULES GLIALES : HISTORIQUE DE LEUR DÉCOUVERTE..... | 43 |
| 5. LES DIFFÉRENTS TYPES DE CELLULES GLIALES | 45 |
| 5.1 <i>Les oligodendrocytes</i> | 45 |
| 5.2 <i>Les microglies</i> | 46 |
| 5.3 <i>Les cellules NG2</i> | 46 |
| 5.4 <i>Les astrocytes</i> | 46 |
| 6. LES INTERACTIONS ASTROCYTES-NEURONES..... | 57 |

| | |
|---|------------|
| 6.1 La gliotransmission | 57 |
| 6.2 La synapse tripartite | 61 |
| 6.3 La régulation des ions extracellulaires..... | 66 |
| 6.4 Implication des astrocytes dans des activités rythmiques | 69 |
| 7. LE COUPLAGE ASTROCYTAIRE | 74 |
| 7.1 Les connexines et les jonctions communicantes : principes généraux et définitions | 74 |
| 7.2 Expressions générales des connexines dans le cerveau | 75 |
| 7.3 Régulations des jonctions communicantes et des connexons : principes généraux | 76 |
| 7.4 Pharmacologie et outils permettant d'inhiber les connexines..... | 79 |
| 7.5 Rôles des jonctions communicantes dans les astrocytes du SNC..... | 81 |
| 8. CONCLUSIONS ET HYPOTHÈSES DE TRAVAIL..... | 90 |
| CHAPITRE 2 : ARTICLE I | 91 |
| ABSTRACT: | 91 |
| INTRODUCTION: | 92 |
| PROTOCOL:..... | 94 |
| 1. Preparation of rat brain slices..... | 94 |
| 2. Sulforhodamine 101 (SR-101) labeling of astrocytes | 96 |
| 3. Astrocytes patching and biocytin filling | 96 |
| 4. Biocytin revelation..... | 99 |
| 5. Network imaging..... | 100 |
| 6. Image analysis..... | 101 |
| SUPPLEMENTARY METHODS | 114 |
| REPRESENTATIVE RESULTS: | 116 |
| DISCUSSION: | 121 |
| ACKNOWLEDGMENTS: | 123 |
| DISCLOSURES:..... | 123 |
| REFERENCES: | 124 |
| CHAPITRE 3 : ARTICLE II..... | 126 |
| ABSTRACT | 126 |
| INTRODUCTION | 127 |
| MATERIAL AND METHODS..... | 129 |
| Brainstem slices preparation | 129 |
| Electrophysiology and biocytin labeling..... | 129 |

| | |
|--|------------|
| <i>Drug applications</i> | 130 |
| <i>Biocytin revelation and imaging</i> | 131 |
| <i>Network analysis</i> | 131 |
| <i>Statistics</i> | 134 |
| RESULTS..... | 135 |
| <i>Coupling in basic conditions</i> | 135 |
| <i>Modulation of coupling under bursting conditions</i> | 137 |
| <i>Coupling depends on NMDA receptors and S100β</i> | 140 |
| <i>Anatomical organization of astrocytic networks</i> | 142 |
| <i>Necessity of astrocytic coupling for neuronal bursting</i> | 145 |
| DISCUSSION..... | 151 |
| <i>The spatial organization of NVsnpr astrocytic networks determines or follows the boundaries of a distinct functional domain</i> | 153 |
| <i>Decoupling astrocytes disrupts neuronal bursting in NVsnpr</i> | 155 |
| <i>Conclusion</i> | 156 |
| REFERENCES..... | 157 |
| CHAPITRE 4 : DISCUSSION GÉNÉRALE | 163 |
| 4.1 MODULATION DU COUPLAGE ASTROCYTAIRE PAR LES STIMULI INDUISANT DES DÉCHARGES NEURONALES RYTHMIQUES..... | 165 |
| 4.1.1 <i>Les mécanismes potentiels de régulation du couplage</i> | 165 |
| 4.1.2 <i>Les limites de la méthode de diffusion d'un traceur</i> | 167 |
| 4.2 UNE ORGANISATION SPATIALE CONFINÉE DANS LES LIMITES DU NVSNPR-D..... | 168 |
| 4.2.1 <i>Des réseaux de petite taille</i> | 168 |
| 4.2.2 <i>La pertinence d'une analyse vectorielle dans le NVsnpr-D</i> | 169 |
| 4.2.3 <i>Des réseaux confinés dans le NVsnpr-D</i> | 173 |
| 4.2.4 <i>Considération sur le concept de réseau panglial</i> | 174 |
| 4.3 LE DÉCOUPLAGE ASTROCYTAIRE AFFECTE LA RYTHMOGÈNESE..... | 174 |
| 4.4 IMPLICATION FONCTIONNELLE DE NOS RÉSULTATS..... | 177 |
| 4.4.1 <i>Implication fonctionnelle dans le NVsnpr</i> | 177 |
| 4.4.2 <i>Implication fonctionnelle dans le SNC</i> | 178 |
| 4.4.3 <i>Implication pathologique</i> | 179 |
| 4.4 PERSPECTIVES D'AVENIR..... | 180 |
| 4.5 CONCLUSION..... | 181 |
| RÉFÉRENCES | 183 |

Liste des tableaux

| | |
|---|-----|
| Table 2.1: Composition of the sucrose-based solution used for brain slicing..... | 94 |
| Table 2.2: Composition of the aCSF solution used for slice storage and whole-cell recording..... | 94 |
| Table 2.3: Composition of the internal solution used for whole-cell recording..... | 96 |
| Table 3.1: Effects of CBX on NVsnpr neurons membrane and firing properties..... | 146 |

Liste des figures

| | |
|---|----|
| Figure 1.1 : Patrons des mouvements de la mâchoire et électromyogrammes des muscles de la mâchoire durant les différentes séquences masticatoires chez le lapin..... | 20 |
| Figure 1.2 : Représentation anatomique des muscles impliqués dans la mastication..... | 22 |
| Figure 1.3 : organisation topographique des motoneurons du noyau moteur schématisée sur 3 tranches coronales rostrale (A) à caudale (C)..... | 24 |
| Figure 1.4 : Quelques évolutions des modèles de GPCs..... | 28 |
| Figure 1.5 : Schéma du tronc cérébral et des noyaux impliqués dans la mastication..... | 30 |
| Figure 1.6 : Distribution des neurones rythmogènes dans le NVsnpr..... | 32 |
| Figure 1.7 : Pourcentage des neurones présentant une activité rythmique dans le NVsnpr-D en fonction de l'âge..... | 33 |
| Figure 1.8 : Implication d' I_{NaP} dans la rythmogénèse des neurones du NVsnpr..... | 35 |
| Figure 1.9 : Implication d'une faible concentration de calcium extracellulaire dans l'activité rythmique des neurones du NVsnprD..... | 36 |
| Figure 1.10 : Modèle fonctionnel de la rythmogénèse dans le NVsnpr..... | 38 |
| Figure 1.11 : Les différents stimuli provoquant la rythmogénèse dans le NVsnpr induisent une baisse de calcium extracellulaire..... | 42 |
| Figure 1.12 : Historique de l'évolution de la morphologie des cellules gliales et des neurones..... | 45 |
| Figure 1.13 : Immunomarquage des astrocytes dans le NVsnpr-D..... | 49 |
| Figure 1.14 : Signalisation calcique dans les astrocytes : les mécanismes..... | 54 |
| Figure 1.15 : Mécanismes de propagation des vagues calciques dans les astrocytes..... | 56 |
| Figure 1.16 : Les différentes voies de libération des principaux gliotransmetteurs..... | 60 |
| Figure 1.17 : Les astrocytes au contact des synapses..... | 61 |

| | |
|---|-----|
| Figure 1.18 Modèle des interactions astrocyte-neurones au niveau des synapses CA3-CA1 dans l'hippocampe..... | 63 |
| Figure 1.19 : La recapture du potassium extracellulaire et de gliotransmetteurs par les astrocytes..... | 65 |
| Figure 1.20 : Modèle de l'interaction astrocytes-neurones dans la rythmogenèse du NVsnpr-D..... | 70 |
| Figure 1.21 : Concept de la synergie des concentrations extracellulaires de calcium et de potassium dans la genèse de la décharge rythmique..... | 72 |
| Figure 1.22 : Gliotransmission et modulation de l'activité rythmique des GPCs..... | 73 |
| Figure 1.23 : Structure d'une connexines dans la membrane cellulaire d'une cellule..... | 74 |
| Figure 1.24 : Anatomie des connexons et des jonctions communicantes..... | 75 |
| Figure 1.25 : Le couplage des astrocytes dans l'hippocampe varie selon les régions..... | 82 |
| Figure 1.26 : Synapse tripartite et réseau neuroglial..... | 84 |
| Figure 1.27 : La redistribution spatiale du potassium au sein des astrocytes..... | 87 |
| Figure 1.28 : Soutien métabolique des astrocytes et rôle du couplage astrocytaire..... | 89 |
| Figure 2.1 : Whole-cell patch-clamp of astrocyte..... | 99 |
| Figure 2.2 : Treatment and analysis of imaged astrocytic networks with ImageJFIJI software..... | 103 |
| Figure 2.3 : Detection of cells in astrocytic networks with ImageJFIJI software..... | 106 |
| Figure 2.4 : Network area analysis and determination of the patched cell in ImageJFIJI software..... | 108 |

Figure 2.5: Diagram of the different referentials used for astrocytic networks analysis.....115

Figure 2.6: Astrocytic networks labeled with biocytin in NVsnpr under different conditions show different sizes.....118

Figure 2.7: Characterisation of networks obtained in NVsnpr under Ca^{2+} -free aCSF and with electrical stimulation of the Vth tract.....120

Figure 3.1: Methods used to identify NVsnpr astrocytes and for networks analysis parameters.....133

Figure 3.2: Burst-inducing stimuli increase gap junctional tracer coupling between NVsnpr astrocytes.....136

Figure 3.3: Blockade of gap-junctions does not prevent astrocytes membrane depolarisation by local applications of NMDA or sensory fibers stimulation.....139

Figure 3.4: Blockade of endogenous S100 β or of NMDA receptors prevent the increase of tracer coupling between NVsnpr astrocytes induced by local applications of NMDA.....142

Figure 3.5: Characterisation of networks obtained under two different conditions.....144

Figure 3.6: Blockade of gap-junctions impairs NMDA-induced bursting but not S100 β -induced bursting.....148

Figure 3.7: Specific connexin 43 inhibitor (GAP26) impairs NMDA-induced bursting.....150

Figure 4.1 Les réseaux astrocytaires du NVsnpr-D définiraient des domaines fonctionnels.....164

Figure 4.2 : Méthode d’analyse des réseaux dans les régions du tronc cérébral rattachées à l’audition.....170

Figure 4.3 : Méthode de l’analyse de réseaux astrocytaires présents dans les barillets de la couche IV du cortex somato-sensoriel.....171

Liste des sigles

ACM: Aire corticale masticatoire

Aldh1L1: *Aldehyde Dehydrogenase 1 Family Member L1*

ADP: Après-dépolarisation

AMPA: Acide alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl—isoxazolepropionique

ATP: Adénosine-5'-triphosphate

ARN: Acide RiboNucléique

BAPTA: 1,2-bis(*o*-aminophenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid

BK_{Ca}: grands courants potassiques dépendant du calcium

[Ca²⁺]_e: Concentration de calcium extracellulaire

CA1: Corne d'Ammon 1

CA3: Corne d'Ammon 2

CBX: Carbenoxolone

CLC-2: Canaux chlore voltage dépendants

Cx: Connexine

DAT: *Dopamine transporter*

dLSO: Région dorsale de l'Olive Latérale Supérieure

EAAT: *Excitatory Amino Acid Transporter*

GABA: Acide gamma-aminobutyrique

GAT: *GABA Transporter*

GCP: Générateurs de patron centraux

GFAP: *Glial Fibrillary Acidic Protein*

GLAST: *GLutamate Aspartate Transporter*

I_{NaP}: Courant sodium persistant

IP₃: Inositol 1,4,5-triphosphate

IP₃R2: Récepteur de type 2 à l'inositol 1,4,5-triphosphate

KARs: Récepteurs kainate

[K⁺]_e: Concentration de potassium extracellulaire

LSO: Olive Latérale Supérieure

NERT: Transporteur à la norépinephrine

Nint V : Noyau intertrigéminal
NMDA: N-méthyl-D-aspartate
NPontc : noyau réticulaire pontis caudalis
nV : tractus trigéminal
NVmt: Noyau moteur du Trijumeau
NVsnpr: Noyau sensoriel principal du Trijumeau
NVsnpr-D: Partie dorsale du noyau sensoriel principal du Trijumeau
NsV : noyau supratrigéminal
mGluRs: Récepteurs métabotropiques au glutamate
mPeriV : région péri-trigéminal médiane
PBC: Complexe de pre-Bötzing
PCRt : Formation réticulaire parvocellulaire
PLC: Phospholipase C
Peri V: Aire peritrigéminal
RT-PCR: Transcription inverse de la réaction en chaîne par polymérase
SK_{Ca}: Petit courant potassique dépendant du calcium
SERT: *Serotonin Transporter*
SNC: Système nerveux central
SPN: Noyau Supérieur Paraolivaire
TEA: Tétréthylammonium
TTX: Tétrodotoxine
VAMP2: Protéine 2 d'association vésicule-membrane
VATPases: ATPases vacuolaires
V_k: Potentiel d'équilibre du potassium
VRACs: Canaux anioniques régulés par le volume
VGLUTs: Transporteurs vésiculaires du glutamate

A mon grand-père Jacques Marcel Persuy

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de thèse Arlette Kolta pour son accueil au sein de son laboratoire : elle a toujours veillé à me fournir tous les outils nécessaires pour l'avancée de mon projet de doctorat, que ce soit par la participation à de nombreux congrès scientifiques de renommée internationale ou par la mise à disposition de matériel de recherche. La confiance qu'elle m'a témoignée ainsi que ses conseils judicieux m'ont été précieux et m'ont permis de développer mes compétences scientifiques et mon sens critique.

Merci à Dorly pour ton soutien et ton accompagnement durant toutes ces années. Pour les nombreuses fois où tu t'es assise à mes côtés pour essayer de comprendre ce qui ne marchait pas, pour me donner de multitudes conseils qui, par la suite, ont permis de m'améliorer en tant que scientifique et d'acquérir cette grande vertu qu'est la patience.

Merci aux docteurs Roberto Araya et Richard Robitaille d'avoir été mes parrains et apportés leurs conseils avisés durant ces années

Merci à ma famille ainsi qu'à ma mère pour son soutien durant toutes ces années de thèse, même en étant à distance.

Merci aux nombreux collègues du cinquième étage du pavillon Paul G. Desmarais pour les échanges scientifiques au coin des couloirs : Eric, Phillippe-Antoine, Éve, Julien, Sarah, Elsa, Danielle, Frédéric, Sandrine, Aymane, et d'autres encore qui se reconnaîtront.

Merci aux nombreux membres du laboratoire que j'ai croisés durant toutes ces années : Marwa, Philippe, Mohammed, Julia, Marc, Dominic, Julie et Danielle pour sa bienveillance, son sourire quotidien ainsi que ses conseils avisés pour les immunohistochimies.

Merci à Dimitri qui m'a offert de grands moments d'échanges et de discussions scientifiques qui ont été précieux dans l'élaboration de la méthode d'analyse de ce travail.

Merci aussi à Éléonore pour ton soutien durant les longues soirées d'études dans les bureaux étudiants et pour ta présence dans les moments difficiles.

Merci à Marien et Melen pour tous ces moments partagés qui étaient une bouffée d'oxygène.

Merci à tous les québécoises et québécois que j'ai rencontrés durant toutes ces années et m'ont fait découvrir leur pays, plus particulièrement à Rosie, Thémis, Claude et Benoît.

A Luna, pour ta présence réconfortante.

A Karol qui m'a soutenu pendant la durée de rédaction de ce travail et à qui je renouvelle toute mon affection.

Chapitre 1: Introduction

1. Les mouvements rythmiques

Les mouvements rythmiques comme ceux permettant la respiration, la mastication et la locomotion sont des mouvements stéréotypés répétitifs. Selon Feldman et Grillner (Feldman & Grillner, 1983), les circuits neuronaux comprennent : 1) Une unité de contrôle supérieure permettant l'initiation du mouvement et l'intégration d'informations sensorielles afin d'adapter le mouvement. 2) Une structure permettant à des réseaux de neurones de produire des décharges rythmiques coordonnées. 3) Une connexion permettant la transmission de ces décharges aux motoneurons contrôlant les muscles du mouvement. 4) Une composante permettant un rétrocontrôle sensoriel grâce à des récepteurs périphériques pour ajuster le mouvement en cours.

Les réseaux neuronaux permettant de produire une activité neuronale rythmique sont appelés les générateurs de patron centraux (GCP) et se situent au niveau de la moelle épinière pour la locomotion et au niveau du tronc cérébral pour la respiration et la mastication.

2. La mastication et son contrôle

La mastication est la première étape de la digestion. C'est un ensemble de mouvements organisés en séquences permettant de réduire et d'avaler le bol alimentaire. Le mouvement masticatoire présente de nombreuses différences entre les espèces carnivores et herbivores.

2.1 Le mouvement masticatoire

Le mouvement masticatoire est organisé en différents cycles qui changent et s'adaptent en fonction de la nourriture ingérée. La plupart des études sur le mouvement masticatoire ont été effectuées sur le lapin ou le cochon d'inde. Cependant, les descriptions sont basées principalement sur la mastication du lapin car c'est un animal qui présente un mouvement plus naturel dans les conditions expérimentales et dont le patron de mouvements se rapproche de celui de l'humain. En effet bien que les mouvements masticatoires varient grandement selon les espèces, l'organisation du système trigéminal semble relativement conservée à travers la phylogénie comme le montre une étude effectuée sur le système trigéminal de la lamproie

(Huard, Lund, Veilleux, & Dubuc, 1999). Les cycles masticatoires sont subdivisés en 3 types différents. 1) Le cycle de type I appelé cycle préparatoire, 2) Le cycle de type II appelé cycle réducteur et 3) le cycle de type III appelé cycle de pré-déglutition (Schwartz, Enomoto, Valiquette, & Lund, 1989) (Voir Figure 1.1).

2.1.1 Le cycle préparatoire

Le cycle préparatoire dit de type I est constitué d'une phase de fermeture rapide comportant un léger mouvement latéral et d'une phase d'ouverture de la mâchoire. Le cycle préparatoire est le plus court des trois types de cycles.

2.1.2 Le cycle réducteur

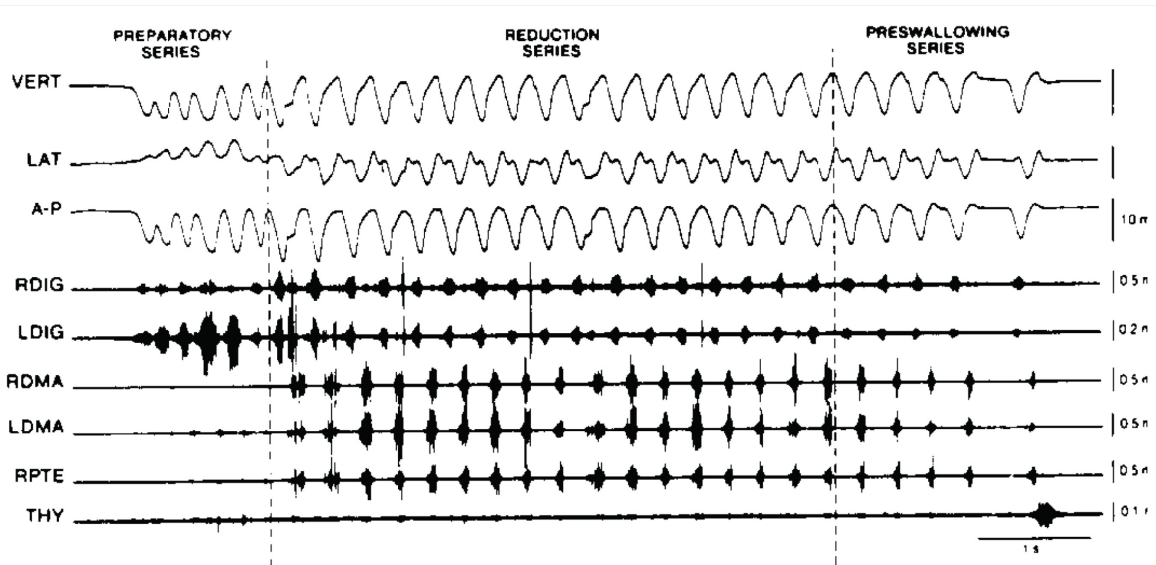
Le cycle réducteur dit cycle de type II est composé de 3 phases : les phases de fermeture et d'ouverture rapides mais aussi une phase de fermeture lente appelée phase occlusale. La phase de fermeture rapide est passive à l'inverse de la phase de fermeture lente où les muscles présentent une activité plus soutenue. De plus, cette phase de fermeture lente est caractérisée par des oscillations latérales de la mâchoire qui aboutissent à un mouvement d'écrasement et de réduction (Hidaka et al., 1997; Lavigne, Kim, Valiquette, & Lund, 1987; Morimoto, Inoue, Masuda, & Nagashima, 1989; Morimoto, Inoue, Nakamura, & Kawamura, 1985; Schwartz et al., 1989). Le cycle réducteur est d'une durée intermédiaire (Lund, 1991).

2.1.3 Le cycle pré-avalement ou oro-pharyngal

Le cycle de type III est composé de 5 phases différentes : une phase de fermeture rapide, une phase de fermeture lente ainsi que 3 phases d'ouverture O₁, O₂ et O₃. O₁ est une phase d'ouverture rapide et précoce, O₂ une phase d'ouverture dite de pause et O₃ une phase d'ouverture rapide et finale. Ce cycle montre des ressemblances avec les cycles réducteurs mais sont d'amplitude plus petite, de durée plus longue et montrent une faible activité des muscles de fermeture de la mâchoire (Schwartz et al., 1989).

La durée totale de la mastication diffère en fonction de la nourriture ingérée. Chaque cycle masticatoire ne ressemble jamais au précédent car le bol alimentaire est modifié à chaque cycle. L'analyse du mouvement masticatoire laisse penser que sa régulation peut être grandement liée à un phénomène de rétrocontrôle sensoriel (Lavigne et al., 1987).

A



B

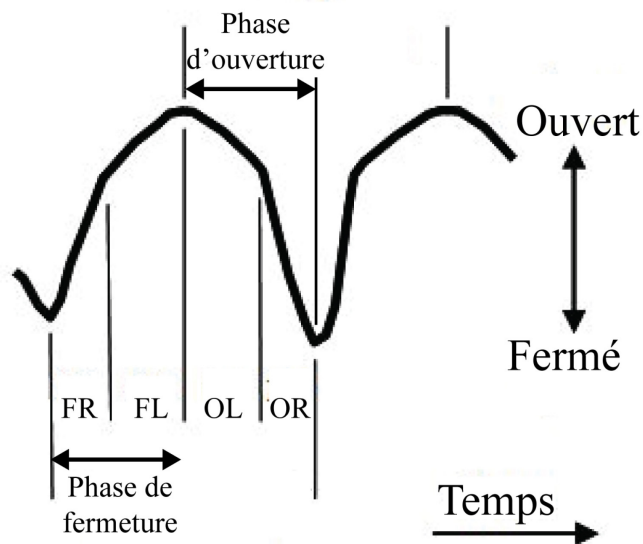


Figure 1.1 : Patrons des mouvements de la mâchoire et électromyogrammes des muscles de la mâchoire durant les différentes séquences masticatoires chez le lapin.

A : Une croquette est introduite dans la gueule du lapin. Elle est transportée au niveau des molaires pendant la phase de préparation puis ensuite mâchée pendant la phase de réduction et préparée pour la phase de déglutition (pre-swallowing series sur la figure).

Les trois tracés du haut représentent les mouvements de la mâchoire dans l'axe vertical (VERT), latéral (LAT) et antéro-postérieur (A-P).

Les 5 tracés du bas représentent les électromyogrammes des différents muscles impliqués dans la mastication : les muscles digastriques droits et gauches (RDIG et LDIG), les masséters

profonds droits et gauches (RDMA et LDMA) et le muscle ptérygoïde médian droit (RPTE). Le dernier tracé montre l'activation du muscle thyroïde (THY) pendant la déglutition. Tiré de (Nakamura & Katakura, 1995)

B : Tracé du mouvement de la mâchoire dans l'axe vertical durant le cycle oro-pharyngal.

On y voit les phases d'ouverture et de fermeture. Le détail des différentes phases est inscrit : FR pour la phase de fermeture rapide, FL pour la phase de fermeture lente, OL pour la phase d'ouverture lente et OR pour la phase d'ouverture rapide. Il est à noter que la phase d'ouverture dite de pause n'a pas été représentée. Figure adaptée de (Gerstner, G, Madhavan, S, & Crane, E, 2011).

2.2 Organisation des muscles masticatoires

Les muscles impliqués dans la mastication peuvent être divisés en 2 principales catégories : les muscles de fermeture ou éleveurs de la mâchoire et les muscles d'ouverture ou abaisseurs. Les muscles de fermeture de la mâchoire sont le masséter, le temporal, et le ptérygoïdien médian alors que les muscles d'ouverture sont le digastrique, le mylohyoïdien, le géniohyoïdien et l'infra-hyoïdien (Figure 1.2). Ces muscles présentent une anatomie bien définie en relation avec leurs fonctions. En effet, plusieurs de ces muscles sont formés de plusieurs compartiments distincts qui peuvent être activés séparément (Figure 1.2). Par exemple, le masséter est formé de deux compartiments majeurs, un superficiel et un profond divisés en plusieurs parties (voir vue latérale et médiane de la Figure 1.2) alors que le muscle temporal est divisé en une portion antérieure et une autre postérieure (Belser & Hannam, 1986; Herring, Grimm, & Grimm, 1979). Dans chaque compartiment, les fibres sont orientées différemment et peuvent être recrutées indépendamment. Les régions postérieures du muscle temporal et profondes du masséter sont activées durant le mouvement rétrusif de la mâchoire alors que les régions antérieures du muscle temporal et superficielles du masséter sont activées lors d'une fermeture maximale des mâchoires.

Des études plus détaillées chez le lapin ont révélé jusqu'à 23 compartiments anatomiques distincts dans le masséter (A. W. English, Carrasco, & Widmer, 1999; Weijs & Dantuma, 1981; Widmer, Carrasco, & English, 2003b; Widmer, Klugman, & English, 1997). Chacun de ces 23 compartiments est innervé par une unique unité motrice axonale et peut être activé indépendamment des autres pour provoquer une action mécanique différente (A. W. English, & Widmer, C.G, 2001; A. W. English et al., 1999). Cette organisation peut expliquer la diversité et la complexité des différents mouvements masticatoires et oraux.

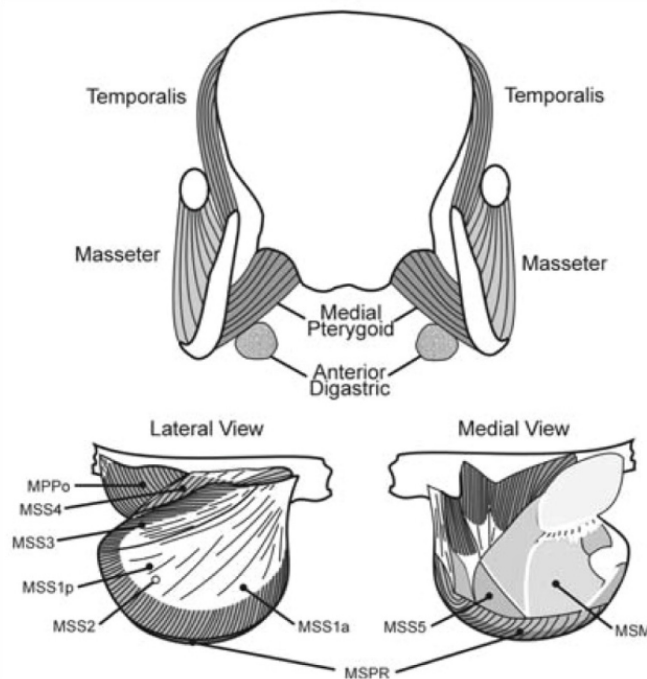


Figure 1.2 : Représentation anatomique des muscles impliqués dans la mastication chez le lapin. Schéma de mâchoire de lapin sur lequel on peut observer les muscles de fermeture de la mâchoire : le temporalis (ou muscle temporal), le masséter et le ptérygoïde médian ainsi qu'un des muscles d'ouverture de la mâchoire, le digastrique. On remarquera différents compartiments neuromusculaires du masséter représentés sur les vues latérales. Figure tirée et adaptée de (Widmer, Carrasco, & English, 2003a).

2.3 Les motoneurones

Les motoneurones innervant les muscles de la mastication sont principalement rassemblés dans le noyau moteur du Trijumeau (NVmt) situé médialement au complexe sensoriel trigéminal au niveau du noyau sensoriel (Figure 1.5). Le NVmt est principalement composé de motoneurones mais contient aussi quelques interneurones. Les motoneurones sont divisés en deux grandes populations fonctionnelles : une grande population occupant la partie dorso-latérale rostrale et contenant les motoneurones commandant les muscles de fermeture (masséter, temporal et ptérygoïde médian) et une plus petite occupant la partie ventro-médiane caudale et innervant les muscles d'ouverture (le tiers antérieur du digastrique et le mylohyoïdien) (Jacquin, Rhoades, Enfiejian, & Egger, 1983; Limwongse & DeSantis, 1977; Lynch, 1985; Mizuno, Konishi, & Sato, 1975; Rokx & van Willigen, 1985; Sasamoto, 1979).

La population dorso-latérale des motoneurones présente une topographie organisationnelle précise (Rokx & van Willigen, 1985). Les motoneurones innervant le masséter antérieur profond sont interposés entre les motoneurones innervant le masséter superficiel latéralement et les motoneurones innervant le muscle temporal médialement. Les motoneurones innervant le muscle ptérygoïde sont groupés avec des motoneurones de muscles de fermeture dans la partie ventrale de la division dorso-latérale (Matsuda, Uemura, Kume, Matsushima, & Mizuno, 1978) (voir Figure 1.3).

Un groupe de motoneurones impliqués dans la mastication a été découvert en dehors du NVmt. Il s'agit d'un groupe de motoneurones γ nommé groupe K innervant les muscles masséters et digastriques antérieurs et situé ventrolatéralement au NVmt (Donga, Dubuc, Kolta, & Lund, 1992; Saad, Dubuc, Widmer, Westberg, & Lund, 1997).

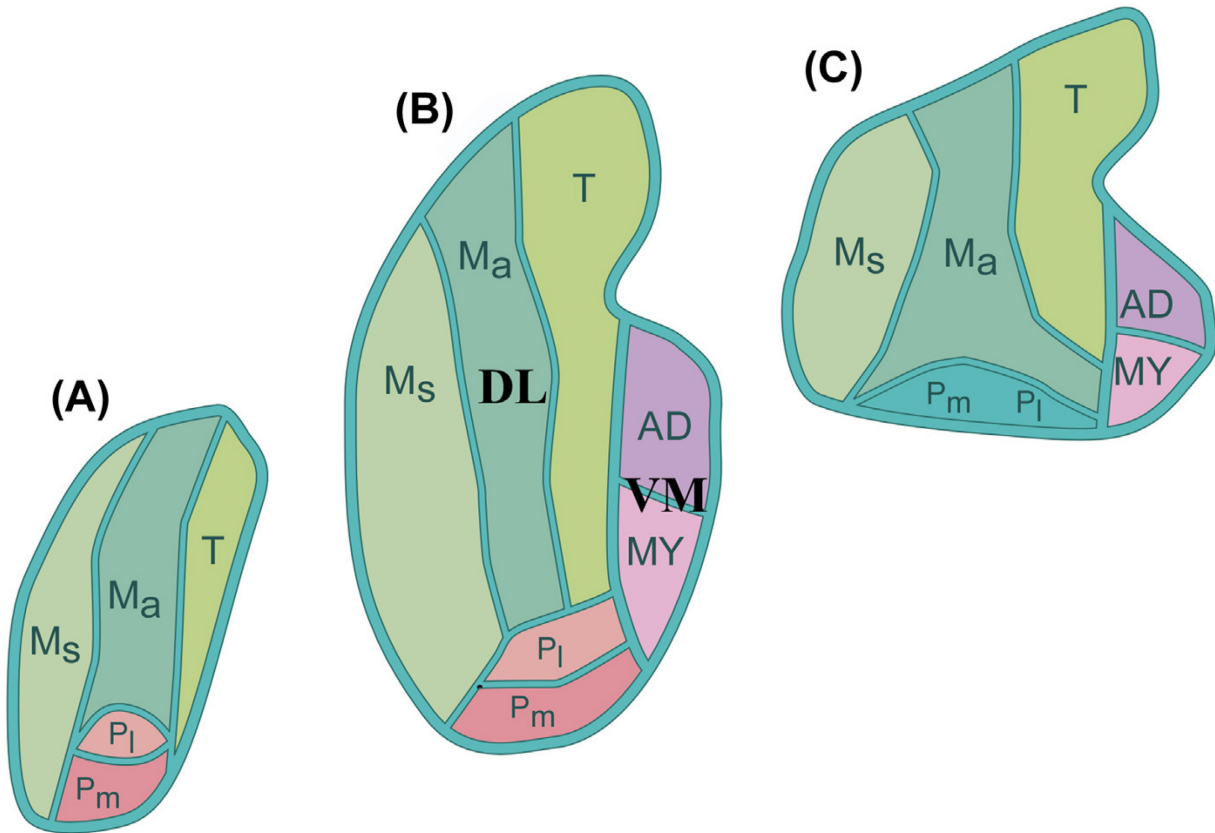


Figure 1.3: Organisation topographique des motoneurones du noyau moteur chez le rat schématisée sur 3 tranches coronales rostrale (A) à caudale (C).

Les pools de motoneurones innervant les muscles de fermeture de la mâchoire sont ségrégués dans la partie dorso-latérale (DL) présente sur tout l'axe rostro-caudal du noyau moteur (tranches A à C) : masséter superficiel (Ms), masséter profond antérieur (Ma), le temporal (T), le ptérygoïde médian (Pm) et latéral (Pl). Les motoneurones contrôlant les muscles d'ouverture (le digastrique antérieur (AD) et le mylohyoïdien

(MY)) se situent dans la partie ventro-médiane (VM) qui s'étend plus sur la partie caudale du noyau moteur (tranches B à C). Figure provenant de (Travers, 2015).

2.4 Contrôle cortical de la mastication

Le contrôle cortical de la mastication est une des premières découvertes dans la compréhension du phénomène masticatoire. Les premières expériences de stimulation dans le cortex de différentes espèces animales montrent qu'elle provoque des mouvements masticatoires (Ferrier, 1886) ou des mouvements rythmiques des mâchoires. Par la suite, l'aire corticale masticatoire (ACM) fut mise en évidence (Bremer, 1923). Chez le cochon, le lapin et

le cochon d'inde, cette zone corticale se situe dans le cortex sensori-moteur (Bremer, 1923; Goldberg & Tal, 1978; Z. J. Liu et al., 1993; Lund, Sasamoto, Murakami, & Olsson, 1984; Nozaki, Iriki, & Nakamura, 1986a).

Plusieurs hypothèses avaient été formulées au sujet de la génération du rythme masticatoire. En 1934, Rioch postulait que la stimulation électrique de la voie corticofugale activait sélectivement les motoneurones responsables de l'ouverture de la mâchoire. Le rythme masticatoire découlerait alors d'une inhibition tonique intermittente de l'ouverture des mâchoires provoquée par un réflexe de fermeture de ces dernières (Rioch, 1934). A l'inverse, en 1933, Magoun postulait la présence d'un centre de contrôle rythmique de la mastication situé au niveau bulbaire (Magoun, Ranson, & C., 1933).

La stimulation électrique de différentes zones de l'ACM permet de déclencher plusieurs types de mouvements masticatoires. En effet, chez le lapin, des stimulations de la partie antérieure de l'ACM produisent des mouvements masticatoires correspondant à la phase préparatoire de la mastication alors que des stimulations de la zone postérieure de l'ACM provoquent des mouvements de la phase de réduction (Lund et al., 1984). La fréquence de stimulation (de 20 à 200Hz) n'impacte pas la fréquence de la mastication (Dellow & Lund, 1971), de même qu'il existe une latence assez importante (200ms à 10s) avant le déclenchement du mouvement. Cette latence ne peut pas s'expliquer par des délais synaptiques entre l'ACM et les motoneurones car Lund *et al*, 1984 y observent des réponses de faibles latences (environ 5ms) sans pour autant observer des mouvements masticatoires établis (Lund et al., 1984).

Ces observations laissent penser que la génération du rythme masticatoire provient d'un centre de contrôle rythmique de la mastication activé par l'ACM qui nécessite un délai d'activation. Cette hypothèse est corroborée par le travail de Dellow et Lundes en 1971. En effet, des expériences effectuées sur des lapins décérébrés et paralysés montrent qu'un rythme neuronal peut être induit dans le tronc cérébral isolé par des stimulations dans le putamen ou la voie corticobulbaire. Cette activité neuronale ressemble à celle observée dans le tronc cérébral lors de mouvements masticatoires déclenchés par des stimulations de l'ACM (Dellow & Lund, 1971).

2.5 Concept de Générateur de Patron Central (GPC)

L'hypothèse qu'il y ait un centre de contrôle rythmique de la mastication revient à parler du concept du générateur de patron central (GPC). Un GPC est un réseau de neurones contrôlant des mouvements rythmiques. De par les propriétés intrinsèques de ses éléments ou de par leur connectivité, il génère une activité rythmique afin de maintenir une alternance d'excitation et d'inhibition transmises aux motoneurones innervant les muscles antagonistes impliqués dans les mouvements. Ce GPC a la particularité de rester fonctionnel même si coupé des commandes descendantes des centres supérieurs et des afférences sensorielles périphériques (McCrea & Rybak, 2008). En principe, tous les mouvements rythmiques tels que la mastication, la respiration et la locomotion relèvent d'un GPC. Le concept de GPC a été proposé pour la première fois par Graham Brown qui démontra, chez le chat, que la moelle épinière pouvait générer un rythme locomoteur en l'absence de commandes des centres supérieurs et des afférences sensorielles. Il proposa donc, avec son équipe, un modèle dit de demi-centre. Dans ce modèle, le GPC est composé d'un demi-centre de générateur de patron central pour chaque membre. Chaque GPC contient 2 groupes d'interneurones excitateurs qui projettent sur les motoneurones d'extension ou de flexion. Une inhibition croisée permet d'avoir chacun des demi-centres actifs à un seul moment pour que les muscles fléchisseurs et extenseurs ne fonctionnent pas de concert, ce qui bloquerait le mouvement. L'inactivation d'un demi-centre se ferait par un processus de fatigue et le balancement d'activité avec l'autre demi-centre se ferait lorsque l'activité de l'un s'abaisse en-deçà d'un certain seuil et que l'inhibition de l'autre est levée (Brown, 1914; Jankowska, Jukes, Lund, & Lundberg, 1967a, 1967b). (Figure 1.4A)

L'activité alternante des motoneurones fléchisseurs et extenseurs provient d'une activité alternante des interneurones correspondants mais ceux-ci pourraient être aussi activés par les afférences sensorielles (Lundberg, 1981). Ce modèle présente des limites du fait qu'il s'articule autour de patrons rythmiques alternés des fléchisseurs et extenseurs avec des motoneurones strictement répartis dans ces deux catégories. Grillner a proposé l'idée qu'il y ait des modules séparés d'interneurones ou des unités génératrices de rythme contrôlant sélectivement des groupes de motoneurones (Grillner, 1981) (Figure 1.4B). En effet, des études ont montrées des motoneurones actifs aussi bien dans les phases d'extension que de

flexion d'un cycle locomoteur. Le début et la fin de l'activité de ces motoneurones ne sont pas les mêmes que pour les groupes de motoneurones uniquement activés pendant l'une de ces deux phases (Grillner & Zangger, 1975; Rossignol, 1996).

Malgré son évolution, ce modèle pose un problème essentiel: les interneurons excitateurs qui génèrent le rythme sont directement connectés aux motoneurones, donc tout changement dans l'excitabilité des demi-centres se traduira par des effets sur les motoneurones. Il est donc difficile d'expliquer les variations de patrons observées pendant la locomotion ou la marche. D'autres modèles ont alors été proposés pour aboutir au concept de GPC à 2 niveaux avec un niveau gérant les patrons et l'activité des motoneurones (générateur de patron) et un autre niveau distinct générant le rythme (générateur de rythme) (Perret & Cabelguen, 1980; Rybak, Shevtsova, Lafreniere-Roula, & McCrea, 2006; Rybak, Stecina, Shevtsova, & McCrea, 2006) (Figure 1.4C). Des voies de rétrocontrôle sensoriel sont incluses dans le modèle et innervent aussi bien le générateur de rythme que le générateur de patron. Ceci permet d'expliquer la raison pour laquelle la stimulation des afférences sensorielles peut affecter le cycle locomoteur sans modifier le patron du mouvement (Kriellaars, Brownstone, Noga, & Jordan, 1994).

Dans ce modèle de GPC, les motoneurones reçoivent des entrées synaptiques inhibitrices afin de pouvoir avoir une alternance dans les mouvements. Dans le cas de la mastication, seulement les motoneurones de fermeture de la mâchoire reçoivent une entrée synaptique inhibitrice durant la phase d'ouverture de la mâchoire. Les motoneurones d'ouverture ne reçoivent que d'entrées synaptiques excitatrices (Chandler & Goldberg, 1982; Inoue, Chandler, & Goldberg, 1994; Kubo, Enomoto, & Nakamura, 1981; Nakamura & Kubo, 1978; Nozaki, Iriki, & Nakamura, 1993). On pourrait penser que l'inhibition est initiée par des motoneurones d'ouverture projetant à des interneurons inhibiteurs contactant les motoneurones de fermeture. Toutefois, il existe peu d'évidences démontrant l'existence de collatérales provenant des motoneurones d'ouverture (Kidokoro, Kubota, Shuto, & Sumino, 1968; Shigenaga et al., 1988). De plus, lors de l'initiation de la mastication, l'inhibition des motoneurones des muscles de fermeture débute avant l'activation des motoneurones d'ouverture.

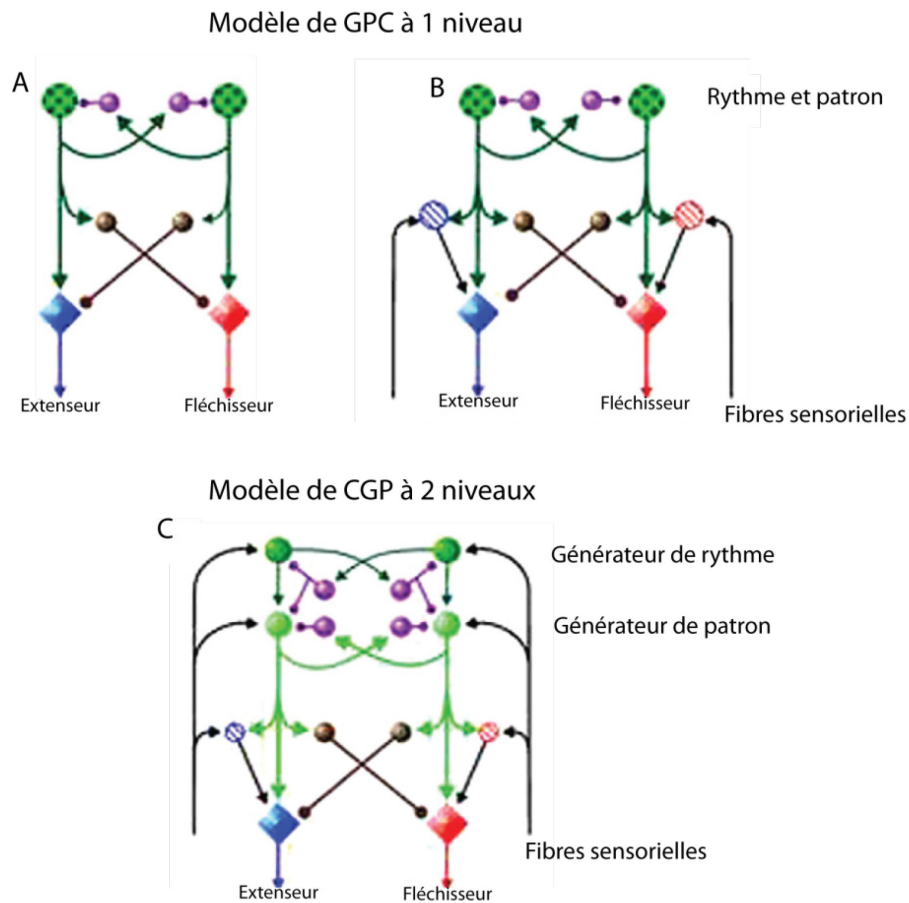


Figure 1.4 : Quelques évolutions des modèles de GPC

Les cercles représentent les interneurons spinaux, les losanges représentent les motoneurons fléchisseurs ou extenseurs. Les connexions inhibitrices ou excitatrices sont représentées par une ligne finissant par un cercle ou une flèche respectivement.

A. Modèle de GPC dit de demi-centre à un niveau (hypothèse supportée par *Graham Brown et Lundberg*). Deux populations d’interneurons excitateurs (en vert avec des points) interconnectées par une inhibition réciproque (en violet) génèrent une activité rythmique. Ces mêmes interneurons activent les populations de motoneurons correspondants (en bleu et rouge) mais aussi des interneurons inhibiteurs (en marron) qui permettent une inhibition rythmique des motoneurons durant le mouvement. **B.** Variante du modèle de GPC de demi-centre dans lequel les motoneurons reçoivent aussi de l’excitation provenant d’interneurons (cercles hachurés rouges et bleus) recevant des entrées synaptiques sensorielles durant le mouvement et qui peuvent influencer le GPC. Le rythme serait généré par des unités génératrices de rythme organisées au sein des interneurons spinaux. Ce modèle est supporté par *Grillner*. **C.** Modèle de GPC à deux niveaux. Le modèle est le même que présenté en B sauf que la génération du rythme et celle du patron sont séparées et réalisées par deux circuits d’interneurons distincts (cercles verts foncés et cercles verts clairs). Ce modèle est supporté par *Perret et Cabelguen* (*Perret & Cabelguen, 1980*). Figure adaptée de (*McCrea & Rybak, 2008*).

2.6 Localisation du GPC masticatoire

Le GPC de la mastication n'a pas encore été précisément localisé. Il n'y a pas d'éléments ni de frontières anatomiques exactes permettant de le délimiter. Tout d'abord, Dellow et Lund l'ont situé dans le tronc cérébral (Dellow & Lund, 1971). Grâce à des études *in vivo* chez le cochon d'inde, il a été localisé ensuite entre la partie rostrale du NVmt et le noyau moteur hypoglosse du nerf XII (Nozaki et al., 1986a; Nozaki, Iriki, & Nakamura, 1986b). Des études *in vitro* ultérieures ont permis d'affiner cette localisation à une région située entre la partie rostrale du NVmt et la partie rostrale du noyau facial. Cette zone comprend médialement le noyau *Pontis Caudalis* et latéralement l'aire péritrigéminale (Peri V; composée des interneurons prémoteurs entourant le NVmt), le noyau sensoriel principal du trijumeau (NVsnpr) et la partie rostrale du noyau spinal du trijumeau (Kogo, Funk, & Chandler, 1996; Tanaka, Kogo, Chandler, & Matsuya, 1999) (Figure 1.5). Lors d'expériences de mastication fictive, une activité rythmique a été observée dans ces différents noyaux (Inoue et al., 1994; Inoue, Masuda, Nagashima, Yoshikawa, & Morimoto, 1992; Kogo et al., 1996; Kogo, Tanaka, Chandler, & Matsuya, 1998; Tanaka et al., 1999). Cependant, des études *in vitro* des propriétés intrinsèques des neurones dans ces différentes régions ont démontré qu'à part un faible pourcentage des interneurons de la zone supratrigéminale (située dorsalement au NVmt), seuls les neurones de la partie dorsale du NVsnpr, adjacente à la zone supratrigéminale, présentent des propriétés rythmogéniques (Bourque & Kolta, 2001; Sandler, Puil, & Schwarz, 1998).

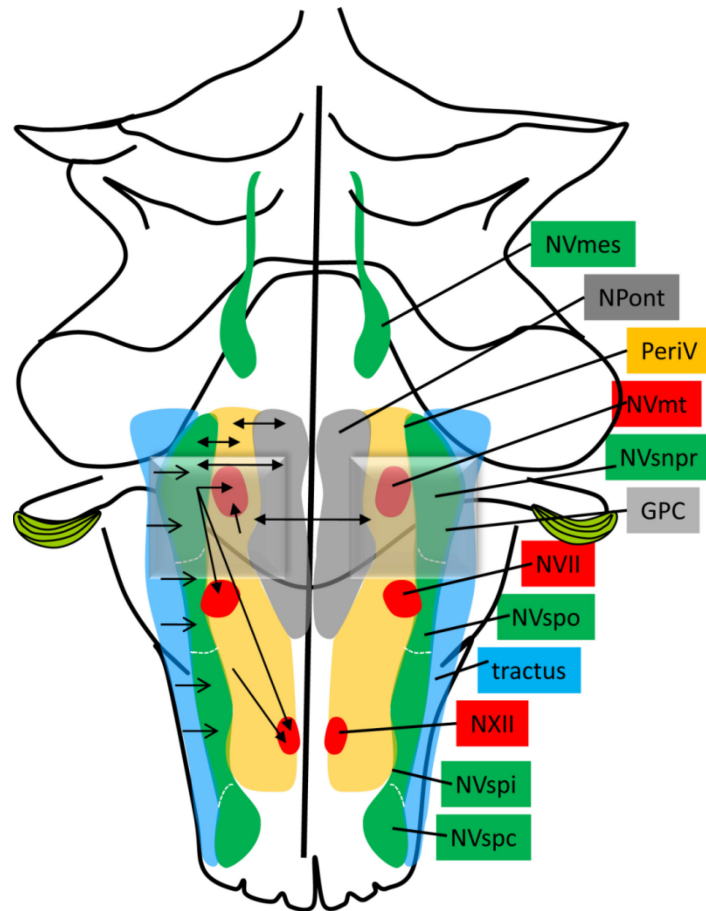


Figure 1.5 Schéma du tronc cérébral et des noyaux impliqués dans la mastication.

Le GPC de la mastication est localisé dans la zone définie par le carré gris. Le noyau moteur trigéminal (NVmt) contient les motoneurones impliqués dans le contrôle des muscles masticatoires, le noyau sensoriel du trijumeau (NVsnpr) formerait le cœur rythmogénique du GPC et reçoit des entrées afférentes sensorielles dont les branches axonales forment le tractus trigéminal (en bleu). Les flèches représentent les connexions et projections entre les différents noyaux. Figure adaptée de (Kolta, Morquette, Lavoie, Arsenault, & Verdier, 2010).

2.7 Le Noyau sensoriel principal du trijumeau (NVsnpr)

Le NVsnpr a surtout été considéré comme un relais des entrées synaptiques sensorielles qu'il reçoit des afférences primaires jusqu'au thalamus. Ces entrées synaptiques sensorielles sont organisées de façon topographique et proviennent des trois branches du nerf trigéminal. Les régions supérieures de la face sont représentées ventralement alors que les régions inférieures sont représentées dorsalement (Eisenman, Landgren, & Novin, 1963; Shigenaga et

al., 1986). Chaque partie du noyau sensoriel principal contient des neurones qui jouent le rôle de relais sensoriels via la voie trigémino-thalamique jusqu'au niveau du cortex sensoriel primaire oro-facial (Eisenman, Fromm, Landgren, & Novin, 1964). Eisenman *et al*, 1963 décrit aussi des ilots de cellules très denses dans la partie dorso-médiane du NVsnpr (Eisenman et al., 1963). C'est dans cette partie que Sandler *et al*, 1998 et plus tard Kolta *et al*, 2001 décrivent des neurones ayant la capacité de décharger de façon rythmique dans une préparation de tranche aiguë chez la gerbille et le rat suggérant un possible rôle d'interneurones pré-moteurs pendant la mastication (Bourque & Kolta, 2001; Sandler et al., 1998). Ceci fut par la suite supporté par les résultats d'une étude utilisant la mastication fictive *in vivo* induite par des stimulations du cortex sensori-moteur chez le lapin, dans laquelle Tsuboi *et al*, 2003 ont enregistré des activités rythmiques uniquement dans la partie dorsale du NVsnpr (Tsuboi, Kolta, Chen, & Lund, 2003). Toujours dans le même animal, une étude immunohistochimique, utilisant un marquage contre la protéine c-fos comme marqueur d'activité, a révélé une augmentation de l'expression de cette protéine dans la partie dorsale du NVsnpr (NVsnpr-D) en réponse à l'induction de courts épisodes de mastication fictive (Athassiadis, Olsson, Kolta, & Westberg, 2005). Une cartographie détaillée des réponses évoquées dans les neurones du NVsnpr chez le rat suite à la stimulation des régions avoisinantes a ensuite démontré que des bouffées rythmiques étaient produites dans 37% de ces neurones et que ceux-ci étaient tous situés dans la partie dorsale du noyau (Figure 1.6) (Athassiadis, Westberg, Olsson, & Kolta, 2005).

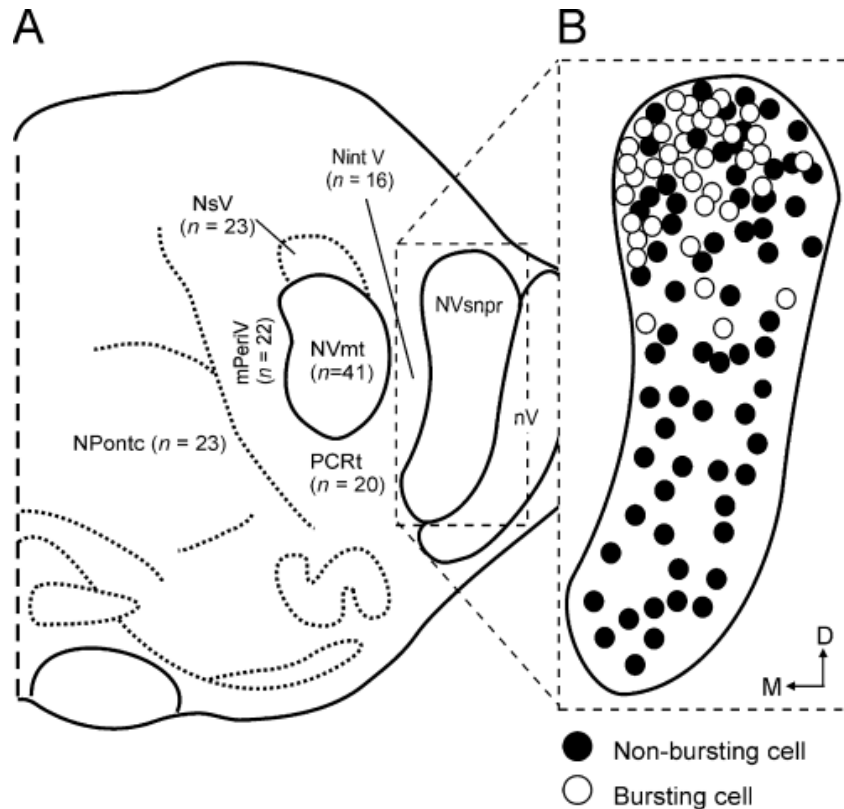


Figure 1.6 Distribution des neurones rythmogènes dans le NVsnpr.

A : Schéma d'une coupe transverse du tronc cérébral au niveau du noyau moteur montrant les différents sites de micro-stimulations effectués *in vitro*.

B : Distribution spatiale des différentes réponses obtenues dans le NVsnpr (cercles blancs pour des réponses rythmiques et cercles noirs pour des réponses non-rythmiques). Les réponses rythmiques sont majoritairement observées dans la partie dorsale du NVsnpr. Figure adaptée de (Athanasiadis, Westberg, et al., 2005).

Une autre observation importante est que cette capacité de décharges rythmiques des neurones du NVsnpr-D apparaît en même temps que l'établissement de la mastication. Chez le rat, les premiers mouvements masticatoires apparaissent vers 12 jours après la naissance (P12) pour s'établir de manière définitive vers 18-21 jours (Westneat & Hall, 1992). Brocard *et al* ont mis en parallèle l'apparition de ces mouvements et l'apparition d'activité rythmique dans le NVsnpr-D (Brocard, Verdier, Arsenault, Lund, & Kolta, 2006). A P10, seulement 5% des neurones démontrent des propriétés rythmogéniques. Cette proportion monte à 25% après P12 et à 45% à P14 quand la mastication est définitivement établie (Figure 1.7).

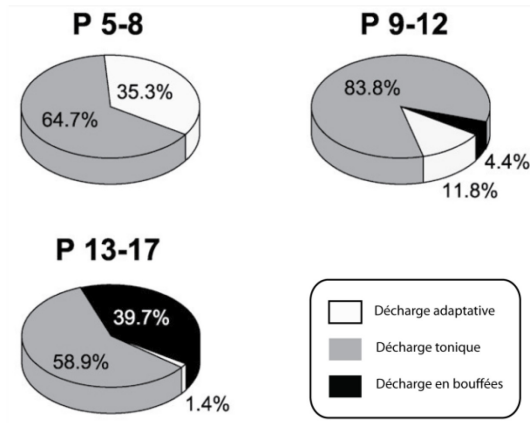


Figure 1.7 : Pourcentage des neurones présentant une activité rythmique dans le NVsnpr-D en fonction de l'âge.

Graphique représentant les proportions en pourcentage des différents types de neurones répertoriés en fonction de leur type de décharge : adaptative, tonique ou en bouffées. Chez les animaux jeunes (P5-8), aucune activité rythmique n'est observée. Entre P9-12, une toute petite part des neurones commence à présenter une activité rythmique. Les mouvements masticatoires commencent à apparaître à partir de P12. Entre P13-17, la part des neurones rythmogènes devient plus importante, durant cette période la mastication se consolide pour être établie définitivement. Figure adaptée de (Brocard et al., 2006).

De plus, plusieurs études anatomiques décrivent des projections depuis le NVsnpr jusqu'aux motoneurones innervant les muscles responsables de la mastication (Kolta, Westberg, & Lund, 2000; Y. Q. Li, Takada, & Mizuno, 1993a; Pinganaud, Bernat, Buisseret, & Buisseret-Delmas, 1999; Travers & Norgren, 1983; Yoshida et al., 1998). En effet, les neurones de la partie dorsale du NVsnpr projettent vers les motoneurones de fermeture situés dans la région dorso-latérale du noyau moteur alors que les neurones de la partie ventrale du NVsnpr projettent préférentiellement vers la région ventro-médiane du noyau moteur où se situent les motoneurones d'ouverture de la mâchoire. L'ensemble des observations rapportées ci-dessus supporte une implication importante du NVsnpr, plus particulièrement de sa partie dorsale, dans la génération du mouvement masticatoire.

3. La rythmogenèse dans le NVsnpr

3.1 Les mécanismes neuronaux de la rythmogenèse

L'activité rythmique dans les neurones du NVsnpr se définit par des décharges en bouffées récurrentes. Ces décharges sont formées d'un plateau présentant au minimum 3 potentiels d'actions (Kadala, Verdier, Morquette, & Kolta, 2015). La fréquence moyenne des décharges en bouffées (6.25Hz) coïncide avec la fréquence du mouvement masticatoire (6-8Hz). Cette activité résulte des propriétés intrinsèques des neurones puisqu'elle peut être maintenue en absence de calcium dans le milieu de perfusion des préparations; condition empêchant toute transmission synaptique, en principe (Brocard et al., 2006). Une activité rythmique intrinsèque de ce genre suppose l'implication de deux différents types de courants ioniques dans les neurones. L'un pour médier un plateau dépolarisant et l'autre hyperpolarisant pour l'arrêter (Harris-Warrick, 2010).

3.1.1 Les courants ioniques dépolarisants

Plusieurs évidences suggèrent que le courant ionique responsable du plateau dépolarisant dans les neurones du NVsnpr-D est le courant sodique persistant (I_{NaP}).

1) Ces plateaux rythmiques sont abolis par une faible concentration de tétrodotoxine (TTX) ($1\mu\text{M}$) (Figure 1.8A) ou par le riluzole ($20\mu\text{M}$) (Figure 1.8B) (Brocard et al., 2006; Urbani & Belluzzi, 2000; Wu et al., 2005). La TTX en faible dose provoque la disparition des plateaux sans affecter les potentiels d'action laissant penser à l'implication d' I_{NaP} car à cette faible concentration elle agit d'abord et principalement sur les canaux sodique médiant les courants persistants que sur ceux médiant les courants transitoires responsables des potentiels d'actions. Ceci est confirmé par un effet semblable du riluzole dont l'un des effets principaux est de bloquer les courants sodiques persistants.

2) Ces plateaux rythmiques sont voltage-dépendants. Ils ne se déclenchent qu'entre -60mV et -50mV ce qui correspond au potentiel d'activation d' I_{NaP} (Brocard et al., 2006; Crill, 1996).

3) L'apparition de ces plateaux est grandement favorisée par une baisse de calcium extracellulaire (Brocard et al., 2006) (Figure 1.9). Une telle relation entre le calcium

extracellulaire et le courant I_{NaP} a déjà été démontrée chez le rat dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe (Z. Li & Hatton, 1996; Su, Alroy, Kirson, & Yaari, 2001) ou encore dans les interneurons spinaux en lien avec le GPC de la locomotion (Brocard et al., 2013; Tazerart, Vinay, & Brocard, 2008) mais aussi dans le NVsnpr (Morquette et al., 2015; Tsuruyama, Hsiao, & Chandler, 2013).

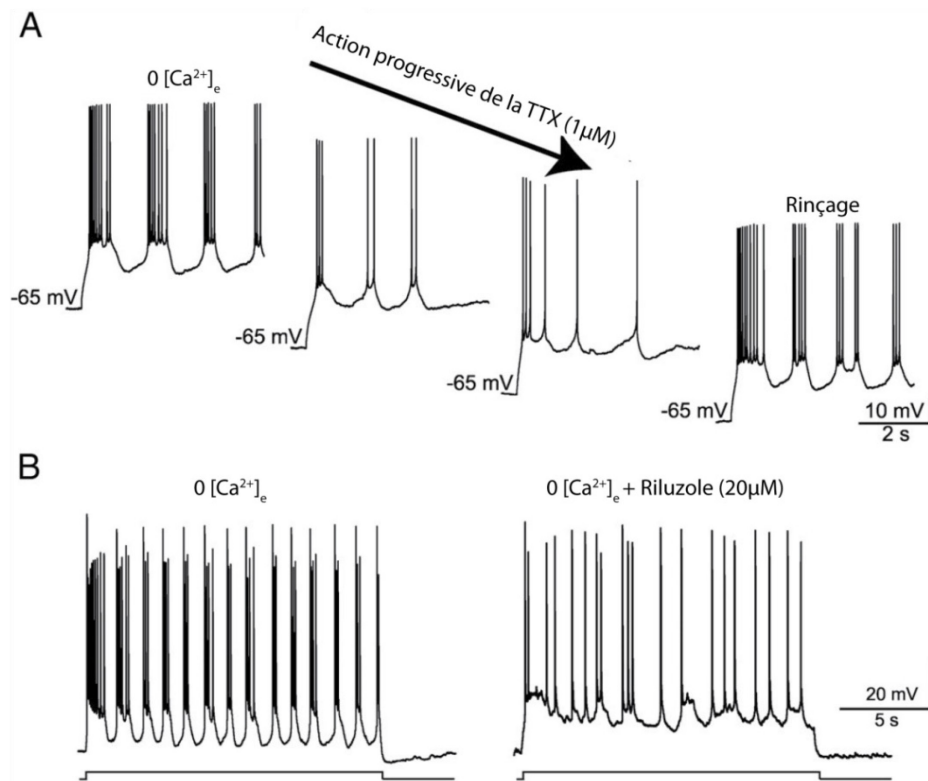


Figure 1.8 Implication d' I_{NaP} dans la rythmogenèse des neurones du NVsnpr.

Enregistrements en patch clamp configuration cellule entière de neurones du NVsnpr-D en faible concentration de calcium extracellulaire. A. L'application de TTX ($1 \mu\text{M}$) agit de façon progressive sur le patron de décharge pour finir par le rendre tonique. Cet effet est réversible. B. L'application de riluzole ($20 \mu\text{M}$) fait disparaître la décharge en bouffées au profit d'une décharge tonique. Figure adaptée de (Brocard et al., 2006)

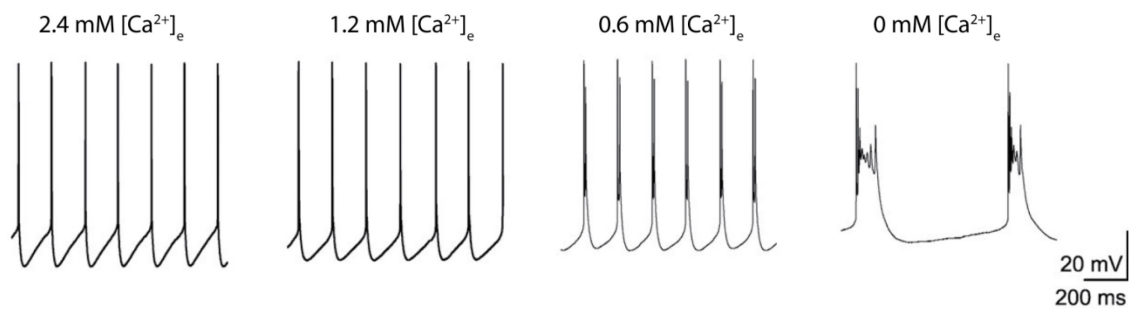


Figure 1.9 Implication d'une faible concentration de calcium extracellulaire dans l'activité rythmique des neurones du NVsnprD.

Enregistrements en patch clamp configuration cellule entière de neurones du NVsnpr-D. La concentration de calcium extracellulaire agit sur le patron de décharge des neurones. Si cette concentration est baissée à 0.6 ou 0 mM, le patron de décharge change de tonique à rythmique. Cet effet étant réversible dès que le calcium extracellulaire est de nouveau augmenté à 1.2 mM. Figure adaptée de (Brocard et al., 2006)

Une autre conductance pouvant aussi être impliquée dans l'initiation et/ou le maintien de la décharge en bouffée des neurones du NVsnpr-D est le courant I_h , un courant cationique activé par l'hyperpolarisation. Chez le rat, dans un médium de faible concentration de calcium extracellulaire, l'application d'un antagoniste du courant I_h (ZD 7288, 10-20 μ M) ne fait pas disparaître l'activité rythmique indiquant qu' I_h ne semble pas nécessaire pour cette activité dans le NVsnpr-D. Cependant, elle augmente la fréquence des plateaux tout en diminuant l'amplitude et la durée des hyperpolarisations suivant les plateaux (Brocard et al., 2006).

3.1.2 Les courants ioniques hyperpolarisants, ou d'arrêt des décharges en bouffées

Les courants ioniques hyperpolarisants sont principalement des courants ioniques potassiques. Ils peuvent influencer les décharges en bouffées car les plateaux formant ces dernières se terminent par une hyperpolarisation. Le plus souvent ces canaux potassiques sont activés par une élévation du calcium intracellulaire qui intervient durant les bouffées rythmiques (Onimaru, Arata, & Homma, 1997; Richter, Champagnat, Jacquin, & Benacka, 1993).

En condition de faible concentration de calcium extracellulaire, l'application de Tétréthylammonium (TEA), un inhibiteur non spécifique des canaux potassiques, augmente la

durée des plateaux mais n'arrête pas les décharges en bouffées (Brocard et al., 2006). Des données non publiées du laboratoire montrent que, dans des conditions provoquant des décharges en bouffées sur des tranches aiguës de tronc cérébral de rat, l'injection de 1,2-bis(*o*-aminophenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (BAPTA) intracellulaire dans les neurones augmente la durée des bouffées. Ce résultat démontre l'importance des canaux potassiques sensibles au calcium intracellulaire dans la régulation de la durée des bouffées rythmiques. Ces courants sont au nombre de deux : les petits courants potassiques dépendants du calcium (SK_{Ca}) ou les grands courants potassiques dépendants du calcium (BK_{Ca}) plus sensibles aux variations de calcium intracellulaire. Ces courants sont responsables de la phase lente et rapide de l'hyperpolarisation. Leur implication dans les décharges en bouffées du NVsnpr a déjà été démontrée.

L'apamine, un bloqueur spécifique des SK_{Ca} , n'a pas d'effet sur les bouffées malgré le fait qu'elle fait diminuer l'amplitude de l'hyperpolarisation. La charybdotoxine, un bloqueur sélectif des canaux BK_{Ca} , produit le même effet sauf qu'en réduisant l'hyperpolarisation elle permet souvent l'apparition d'une dépolarisation suivant le potentiel d'action encore appelée après-dépolarisation (ADP) qui soutient une décharge en doublet lorsque les neurones sont dépolarisés au seuil de décharge (Brocard et al., 2006). Cette ADP favorise l'apparition d'un petit plateau avec 2 potentiels d'actions. C'est un préambule au plateau qui soutient les bouffées.

Pour résumer, sur la base de ces données, Kolta *et al* ont proposé un modèle en 2010 pour expliquer la rythmogenèse dans le NVsnpr-D (Kolta et al., 2010):

1) Une faible activation des afférences sensorielles provoquerait une faible dépolarisation et une décharge tonique ainsi qu'une faible baisse de la concentration de calcium extracellulaire qui ne permet pas d'activer I_{NaP} mais qui peut amorcer l'inactivation des canaux BK_{Ca} permettant l'apparition d'ADP et de décharges en doublets (Figure 1.10, étape 2).

2) Une augmentation de l'activité des afférences sensorielles amplifierait la baisse de calcium extracellulaire ainsi que la dépolarisation des neurones les amenant ainsi dans la fenêtre d'activation d' I_{NaP} (-60mV à -50mV). Les conditions pour l'activation d' I_{NaP} sont alors

réunies et les neurones déchargent en bouffées. La fréquence des bouffées serait alors proportionnelle au niveau de dépolarisation produit par l'activité des afférences sensorielles (Figure 1.10, étape 3 et 4).

3) Quand l'activité des afférences sensorielles devient très importante, comme lors d'un stimulus trop fort ou potentiellement nocif, cela provoque une dépolarisation des neurones hors de la fenêtre d'activation de I_{NaP} . L'activité en bouffées s'arrête alors pour redevenir tonique (Figure 1.10, étape 5).

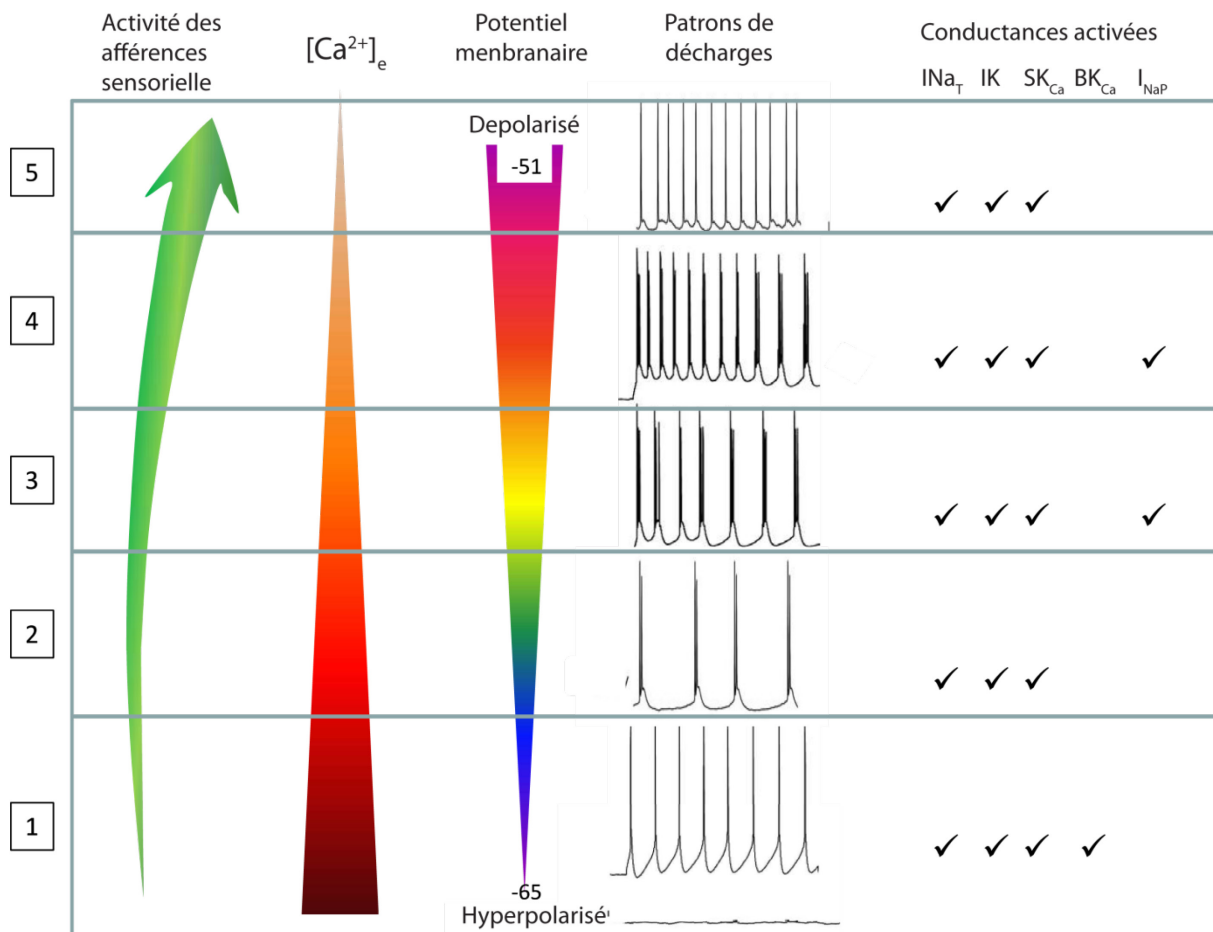


Figure 1.10 : Modèle fonctionnel de la rythmogenèse dans le NVsnpr.

Ce modèle illustre les différentes étapes du mécanisme rythmogénique dans le NVsnpr-D avec l'implication de l'activation des afférences sensorielles, une baisse de calcium extracellulaire permettant l'activation de conductances particulières provoquant un changement de patron de décharge. Adaptée de (Kolta et al., 2010).

3.2 Induction de la rythmogenèse dans le NVsnpr : les différents stimuli impliqués

Des bouffées rythmiques peuvent être induites dans les neurones du NVsnpr-D de différentes manières.

3.2.1 La stimulation des afférences sensorielles

Les premières observations d'une activité rythmique dans le NVsnpr furent rapportées en réponse à la stimulation électrique de l'ACM (voir point 3.2).

Le NVsnpr-D ne reçoit pas que des entrées synpatiques corticales, il reçoit également des entrées synpatiques sensorielles dont la stimulation peut provoquer une activité rythmique. De simples stimulations électriques à faible fréquence (<1Hz) du tractus sensoriel n'induisent que de l'activité tonique ou même une inhibition, mais des stimulations à plus haute fréquence, entre 40Hz et 60Hz, provoquent des bouffées rythmiques (Bernier, Arsenault, Lund, & Kolta, 2010) (Figure 1.11 b et 1.11d). De façon intéressante, cela correspond à la fréquence de stimulation optimale de l'ACM pour induire la mastication (40Hz) et à la fréquence de décharge naturelle des afférences proprioceptives pendant la mastication (Trulsson & Johansson, 2002). Une autre observation intéressante est qu'une stimulation massive (à haute fréquence pendant des centaines de millisecondes) semble être nécessaire pour provoquer les bouffées. Cela peut s'expliquer par le fait que de simples stimulations à faible fréquence ne suffisent pas à dépolariser suffisamment les neurones du NVsnpr-D pour les amener dans la fenêtre de potentiels membranaires permettant l'activation d' I_{NaP} .

3.2.2 L'application locale de NMDA

Les afférences sensorielles et corticales projetant au NVsnpr-D sont glutamatergiques. Les bouffées rythmiques induites par la stimulation à haute fréquence des afférences sensorielles se révèlent être sensibles à l'acide DL-2-amino-5-phosphonopentanoïque (APV), un inhibiteur des récepteurs N-méthyl-D,-aspartate (NMDA) (Bernier et al., 2010). Toutefois, les tentatives d'induire des bouffées rythmiques dans des neurones du NVsnpr-D, enregistrés en patch clamp configuration cellule entière, avec des applications locales de NMDA dans des tranches aiguës se sont révélées infructueuses lorsque les neurones étaient laissés à leur potentiel de membrane de repos : ce procédé n'induisait que des décharges toniques massives.

Cependant, lorsqu'une hyperpolarisation membranaire (par injection de courant dans la pipette de patch) est imposée simultanément à l'application locale de NMDA, il devient alors possible d'induire une décharge en bouffées rythmiques (Figure 1.11e) dans les neurones de la partie dorsale du NVsnpr. Cette activité rythmique induite par le NMDA est sensible au riluzole ce qui implique donc bien la participation du courant I_{NaP} (Morquette et al., 2015).

La nécessité d'hyperpolariser la cellule pour obtenir les décharges rythmiques s'explique par le fait que la dépolarisation importante induite par l'application de NMDA amène le potentiel membranaire hors de la fenêtre d'activation d' I_{NaP} .

3.2.3 Une faible concentration de calcium extracellulaire

La décharge en bouffées des neurones du NVsnpr-D est provoquée par l'activation d' I_{NaP} qui implique une baisse du calcium extracellulaire. La perfusion d'un milieu extracellulaire avec une faible concentration de calcium a été le premier moyen utilisé pour révéler la rythmicité dans le NVsnpr-D (Brocard et al., 2013; Brocard et al., 2006) (Figure 1.9 et Figure 1.11a). Plus tard, l'application locale de BAPTA pour produire une baisse locale de calcium extracellulaire et induire de la rythmicité fut aussi utilisée (Morquette et al., 2015).

3.2.4 Considération générale sur les stimuli induisant des bouffées rythmiques dans le NVsnpr-D et le calcium extracellulaire

La rythmicité dans le NVsnpr-D implique la conductance I_{NaP} qui nécessite le maintien du potentiel membranaire dans une fenêtre d'activation restreinte et qui est favorisée par une baisse du calcium extracellulaire. Tous les stimuli cités plus haut provoquent bien une dépolarisation neuronale. Cependant, le lien entre la stimulation des afférences sensorielles ou l'application locale de NMDA et une baisse de calcium extracellulaire n'avait jamais été démontré. Morquette *et al*, 2015 ont réalisé des expériences utilisant des électrodes ions sensibles pour mesurer la concentration extracellulaire de calcium en temps réel lors de l'application de ces stimuli tout en enregistrant l'activité neuronale en patch clamp lorsque les préparations sont en configuration submergée ou de façon extracellulaire pour les préparations en configuration interface. Principalement, cette étude a démontré que les stimuli utilisés pour induire une décharge en bouffées rythmiques dans les neurones du NVsnpr provoquent une

baisse de calcium significative (de 0.1 à 0.7mM) qui intervient en même temps que le changement du patron de décharge des neurones (Figure 1.11c et f) (Morquette et al., 2015). Les auteurs ont alors cherché à déterminer comment cette baisse de calcium est provoquée et ont orienté leurs travaux sur le rôle potentiel des cellules gliales dans la rythmogenèse. La prochaine section portera donc sur les cellules gliales, plus spécialement sur les astrocytes et leurs interactions avec les neurones.

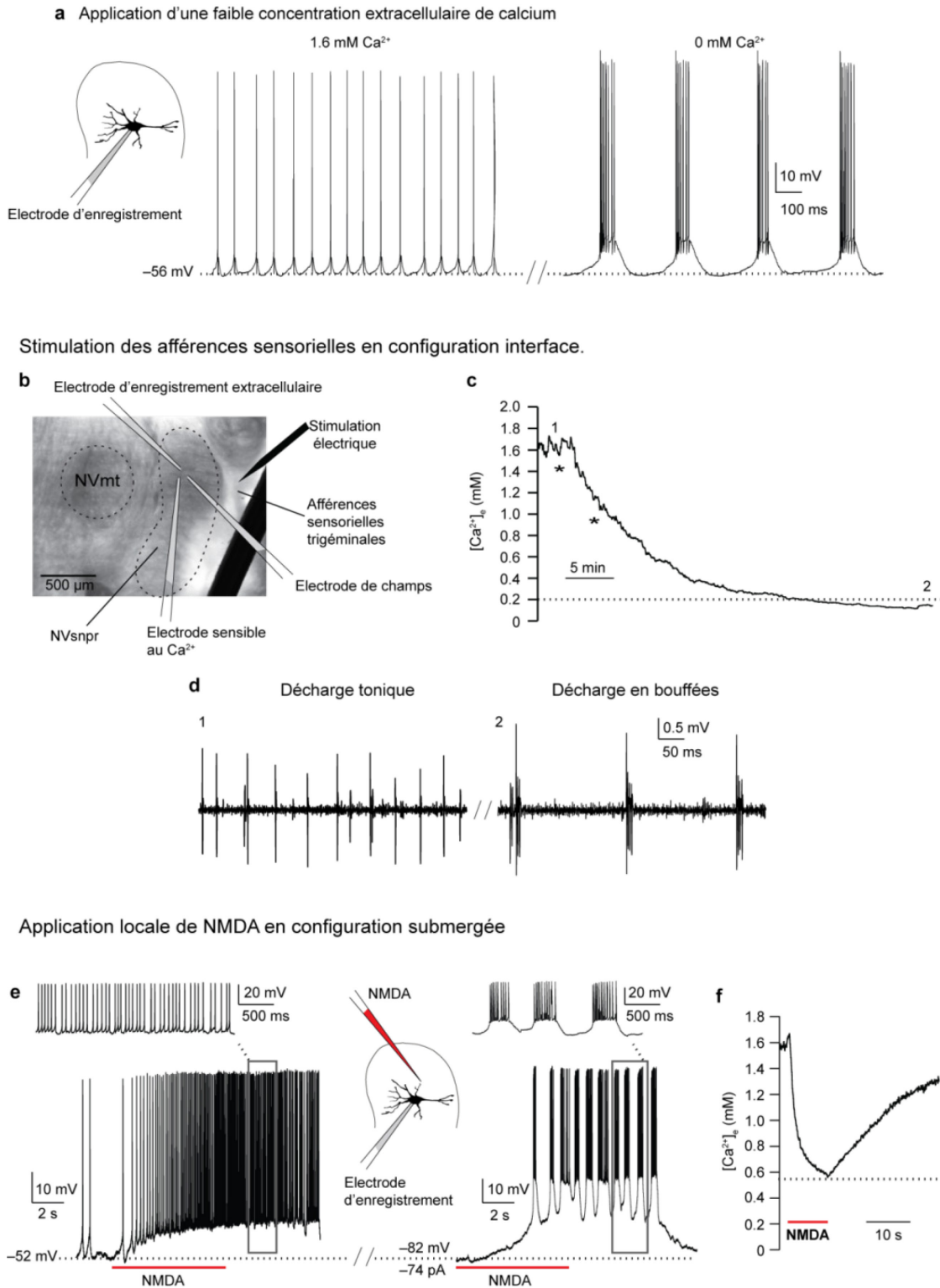


Figure 1.11 : Les différents stimuli provoquant la rythmogenèse dans le NVsnp induisent une baisse de calcium extracellulaire. (Suite de la légende page suivante)

a) L'application d'un milieu extracellulaire avec une faible concentration de calcium provoque des décharges en bouffées. b) Schéma de la position de la stimulation électrique des afférences sensorielles, des électrodes d'enregistrements extracellulaires et d'une électrode ions-sensible au calcium. c) La stimulation électrique des afférences sensorielles induit une baisse de calcium extracellulaire durable détectée par l'électrode ions-sensible. d) La stimulation électrique des afférences sensorielles induit des décharges en bouffées dans le NVsnpr-D. Les chiffres 1 et 2 permettent de faire le lien avec l'enregistrement de la concentration extracellulaire de calcium. e) L'application locale de NMDA permet d'induire une décharge en bouffées dans des neurones patchés en configuration cellule entière. f) Cette application de NMDA provoque en même temps une baisse de calcium extracellulaire. Figure adaptée de (Morquette et al., 2015)

4. Les cellules gliales : historique de leur découverte

Les connaissances sur les cellules gliales semblent nettement moins étoffées que celles sur les neurones. Pourtant l'attestation de leur existence n'est absolument pas récente. En effet, deux composantes du système nerveux, à savoir ce qu'on appelle aujourd'hui les neurones et la glie, ont probablement été observés et dessinés pour la première fois par *Henri Dutrochet* en 1824 grâce à l'observation au microscope d'un modèle de mollusque. Cependant le concept de glie n'est pas encore apparu. A l'époque certains parlent d'un tissu constitué de cellules non nerveuses mais considéré comme "connectif" (Valentin, 1836). Le terme de "neuroglia" apparaît en 1856 comme étant un type de tissu connectif qui maintient les éléments nerveux ensemble et principalement constitué de fibres gliales et d'éléments cellulaires gliaux (Virchow, 1856). Le premier dessin, de ce qui pourrait être aujourd'hui un astrocyte, mais défini comme une cellule du tissu connectif avec des prolongements, a été fait en même temps que celui de neurones (Deiters, 1865) (Figure 1.12d). *Deiters* distingue les cellules du «tissu connectif» des cellules nerveuses par le fait qu'elles ne possèdent pas d'axone. Un dessin et une description plus précise de cellule gliale furent proposés par *Camillo Golgi* : une cellule ronde avec un prolongement long et d'autres plus fins orientés pour la plupart vers les vaisseaux sanguins. *Camillo Golgi* y décrit aussi deux types de cellules gliales : fibreuse et protoplasmiques. Il décrit aussi des réseaux de cellules gliales, intrigué par la réaction noire (technique de coloration histologique) qui ne colore que des groupes de cellules bien délimités (Golgi, 1873). D'autres chercheurs proposent aussi l'idée de syncytium glial (Henle & Merkel, 1869; His, 1888). Aujourd'hui, ces descriptions semblent correspondre à des

astrocytes. Golgi propose même le concept de pied astrocytaire au niveau des vaisseaux sanguins suggérant que les cellules gliales transporteraient des nutriments depuis le sang jusqu'aux neurones. (Golgi 1875). Cette idée est reprise aussi par *Ramon y Cajal* (Ramon y Cajal, 1893).

Le terme d'astrocyte apparaît en 1893 pour décrire des cellules gliales en forme d'étoiles (Lenhossek, 1893). La première description d'oligodendrocytes fut publiée en 1899 mais considérée comme de la "mesoglie" et sans lien avec la myéline. Les oligodendrocytes sont formellement identifiés et nommés 20 ans plus tard (Rio Hortega, n.d.) et le lien avec la myéline est établi en 1962 (Bunge, Bunge, & Pappas, 1962). La microglie est quant à elle identifiée en 1917 sans être nommée comme tel (Rio Hortega, 1917). Rio Hortega la décrit d'abord comme une petite population de phagocytes qui ont migré dans le SNC (Rio Hortega, 1932). Il les nomme ensuite microglies car elles ne peuvent être considérées comme étant des éléments neuronaux ou astrocytaires et sont distinctes des oligodendrocytes (Rio Hortega, 1939). Ces identifications découlent de recherches morphologiques et anatomiques aidées par la mise au point de nouvelles techniques de coloration des lames histologiques (Rio Hortega, 1917). La figure 1.12 présente un récapitulatif historique de différents dessins anatomiques des cellules gliales.

De par leurs propriétés morphologiques et physiologiques, le concept de 'glue' domine dans l'histoire de la glie ce qui explique un général désintérêt de la communauté scientifique à son égard. Ce désintérêt peut être d'autant plus justifié par le fait que l'électrophysiologie permit de phénoménaux progrès dans l'étude des neurones. Ainsi, bien que leur étude anatomique fût amorcé en même temps, l'étude électrophysiologique de la glie ne débuta que dans les années cinquante, 160 ans après le début des études sur les neurones. L'étude biochimique de la glie, elle, n'intervient que 100 ans après l'application des techniques de biochimie à l'étude des neurones (Fan & Agid, 2018).

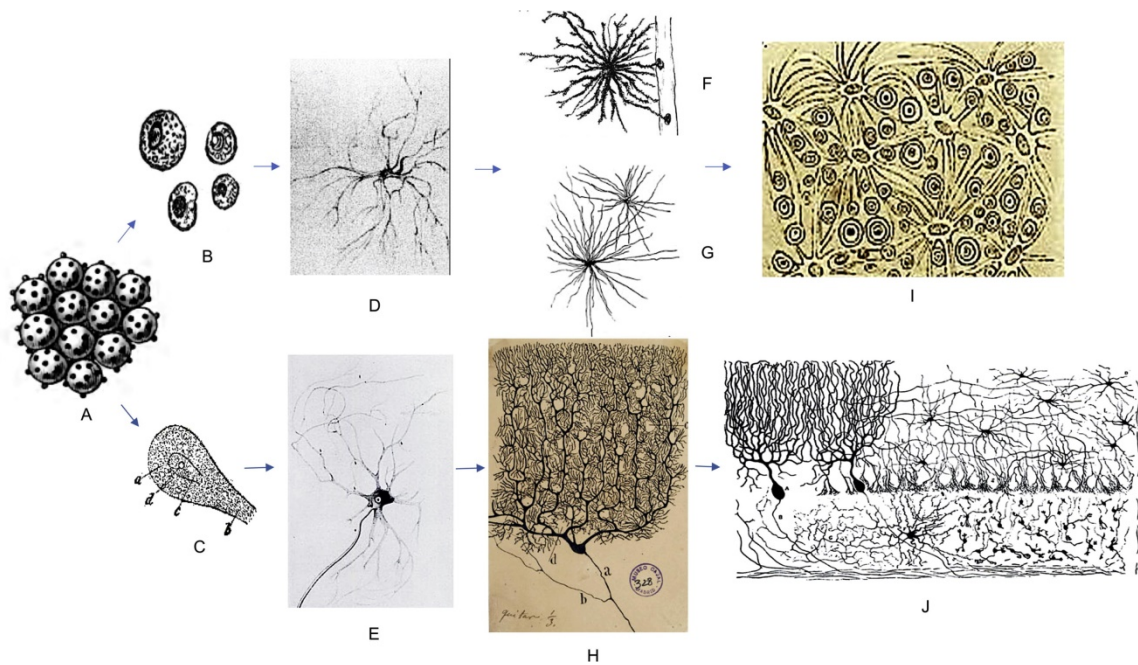


Figure 1.12 : Historique de l'évolution de la morphologie des cellules gliales et des neurones.

A : Petits globules sur la surface de plus gros globules dans le système nerveux de mollusques (Dutrochet, 1824). **B** : Cellules gliales de cerveau humain (Virchow, 1856), **C** : Première image microscopique d'une cellule nerveuse (Valentin 1836). **D** : Première illustration d'un astrocyte (Deiters, 1865). **E** : Première illustration d'une cellule nerveuse avec des dendrites et un axone (Deiters, 1865). **F** : Astrocyte protoplasmique (Andriezen, 1893). **G** : Astrocyte fibreux (Andriezen, 1893). **H** : Cellule de Purkinje dans le cortex cérébelleux du chat (Ramon y Cajal, 1899). **I** : Réseau d'astrocytes (Golgi, 1903). **J** : Réseau neuronal dans le cervelet de poulet (Ramon y Cajal, 1888). Figure tirée de (Fan & Agid, 2018).

5. Les différents types de cellules gliales

Différents types de cellules gliales ont été différenciés selon leur morphologie et de leurs fonctions présumées. Ces différents types sont au nombre de quatre : les oligodendrocytes, les microglies, les cellules NG2 ou pro-génitrices et les astrocytes.

5.1 Les oligodendrocytes

Les oligodendrocytes sont des cellules qui isolent les axones des neurones du SNC. Ils possèdent des petits corps cellulaires ronds avec des prolongements entourant les axones et

formant la myéline. Un oligodendrocyte peut myéliniser jusqu'à 50 segments axonaux (Baumann & Pham-Dinh, 2001).

5.2 Les microglies

Les microglies sont les macrophages du SNC et représentent 5 à 20% du nombre total de cellules gliales chez l'adulte (Lawson, Perry, Dri, & Gordon, 1990). Les microglies représentent une ligne de défense et couvrent tout le SNC avec leurs prolongements. Elles sont toujours en alerte et peuvent avoir des prolongements qui se ramifient lorsqu'elles sont activées. Leur activation est causée par la présence d'un agent pathogène ou de lésions (Saijo & Glass, 2011).

5.3 Les cellules NG2

Les cellules NG2 sont caractérisées par l'expression de l'antigène neurone-glie 2 (NG2). Ce sont des cellules qui lors du développement post-natal prolifèrent dans les différentes régions du SNC. Elles sont alors capables de se différencier en oligodendrocytes (Dawson, Levine, & Reynolds, 2000), en astrocytes ou en cellules de Schwann dans le système nerveux périphérique (Belachew et al., 2003; Richardson, Young, Tripathi, & McKenzie, 2011). A l'âge adulte, elles représentent principalement un réservoir de nouveaux oligodendrocytes et, pour cette raison, elles sont aussi dénommées cellules pro-génitrices.

5.4 Les astrocytes

Les astrocytes présentent une morphologie en étoile avec de petits corps cellulaires. Ils représentent 20 à 40% du nombre total de cellules dans le cerveau des mammifères. Les astrocytes protoplasmiques se retrouvent dans la matière grise du CNS alors que les astrocytes fibreux sont dans la matière blanche (Miller & Raff, 1984). Plusieurs types d'astrocytes ont été décrits en fonction de leur anatomie : les astrocytes protoplasmiques qui se trouvent dans la matière grise du CNS et les astrocytes fibreux qui sont dans la matière blanche (Miller & Raff, 1984), les cellules radiales qui, durant le développement du SNC, assistent la migration neuronale, les astrocytes péri vasculaires qui ont leur soma et leurs prolongements au contact des vaisseaux sanguins, les astrocytes marginaux qui sont au niveau des limites entre le tissu neuronal et le tissu non neuronal. Au niveau du système nerveux périphérique on trouve les

astrocytes satellites. Enfin, certains types d'astrocytes ont été décrits dans des structures précises comme les cellules de Bergman dans le cervelet et les cellules de Muller dans la rétine (Christensen, Petersen, & Perrier, 2013). Dans la cadre de cette thèse, nous nous intéresserons aux astrocytes protoplasmiques.

Chez les rongeurs, les astrocytes protoplasmiques ont un diamètre de 4 à 6 μ m. Ils sont composés d'un soma avec 4 à 10 prolongements majeurs et de très nombreux prolongements plus fins qui leur donnent cet aspect spongieux permettant les contacts avec de nombreuses synapses (Bushong, Martone, Jones, & Ellisman, 2002; Ogata & Kosaka, 2002).

Les astrocytes présentent une forme d'hétérogénéité dans le SNC. En effet, l'activité astrocytaire présente des dynamiques différentes dans les différentes couches corticales (Takata & Hirase, 2008). Dans l'hippocampe, des études proposent l'existence de sous-types d'astrocytes différenciés en fonction de leurs propriétés électrophysiologiques et de l'expression de leurs protéines membranaires (Matthias et al., 2003; Zhou & Kimelberg, 2001). Ainsi, les astrocytes GluT expriment les transporteurs au glutamate GLAST et GLT-1 et présentent une relation courant-voltage linéaire ainsi qu'une résistance d'entrée faible et un potentiel de membrane hyperpolarisé. Les astrocytes GLuR expriment les récepteurs ionotropes à l'acide alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl—isoxazolepropionique (AMPA), au glutamate et présentent une relation courant-voltage non linéaire résultant de forts courants sortants avec une résistance d'entrée plus élevée et un potentiel membranaire moins hyperpolarisé. Une autre caractéristique différencie ces deux types d'astrocytes. Les GluT peuvent former des syncytiums via un couplage par les jonctions communicantes et les connexines alors que les GLuR n'en formeraient pas (Schools, Zhou, & Kimelberg, 2006; Serrano, Robitaille, & Lacaille, 2008). Une explication serait que les astrocytes GLuR n'exprimeraient pas la connexine 43 (voir section 7).

Cependant, d'autres études immunohistochimiques montrent que les cellules passives (GluT) expriment la GFAP (*Glial Fibrillary Acidic protein*) alors que les cellules GLuR expriment la NG2 (Grass et al., 2004; Matthias et al., 2003; Schools, Zhou, & Kimelberg, 2003). Ainsi, il faudrait considérer les cellules GLuR comme des NG2⁺ et les cellules GluT comme des astrocytes (Mishima & Hirase, 2010; Nishiyama, Yang, & Butt, 2005). Cette distinction est prise en considération dans le travail présenté dans cette thèse.

Des marqueurs spécifiques permettent d'identifier les astrocytes en utilisant le plus souvent des méthodes immunohistochimiques. Le plus connu et le premier marqueur découvert est la GFAP (Eng, Ghirnikar, & Lee, 2000). Cependant la GFAP en tant que marqueur présente des limites. Premièrement, le marquage immunohistochimique des astrocytes à la GFAP ne marque que les prolongements et non le soma. De plus, l'expression de la GFAP, bien qu'étant spécifique aux astrocytes dans le cerveau, est augmentée en cas de lésion, d'inflammation ou dans certaines pathologies. Ainsi, dans certaines populations d'astrocytes, seuls les astrocytes dits "activés" expriment la GFAP (Nishiyama et al., 2005) et donc, un immunomarquage négatif ne peut confirmer l'absence d'astrocytes. Les astrocytes activés sont des astrocytes qui changent de phénotype suite à une lésion ou inflammation. Ils peuvent être classés en deux groupes : les astrocytes activés A1 qui sont neurotoxiques et les astrocytes activés A2 qui sont neuroprotecteurs. Ils présentent alors une augmentation d'expression de nombreuses protéines différentes dont la GFAP (T. Li, Chen, Zhang, Zhang, & Yao, 2019; Liddel et al., 2017). Il faut aussi considérer que le niveau d'expression basal de la GFAP peut différer selon les différentes régions du cerveau. Enfin, la GFAP peut être exprimée par d'autres cellules du SNC comme, par exemple, les cellules radiales, qui à certains stades développementaux sont considérées comme des astrocytes, mais qui peuvent aboutir aux cellules pyramidales corticales plus tard au cours du développement (Garcia, Doan, Imura, Bush, & Sofroniew, 2004; Middeldorp & Hol, 2011; Sofroniew & Vinters, 2010). En conclusion, la GFAP est un marqueur des astrocytes à utiliser avec précaution car ce dernier est lié à des situations lésionnelles, inflammatoires ou pathologiques.

D'autres marqueurs spécifiques des astrocytes existent. En outre, la protéine S100, une protéine dimérique, dont la sous-unité β est spécifiquement synthétisée par les astrocytes. Le S100 β peut lier le calcium et participer à la régulation de la structure de la cellule en interagissant avec des protéines du cytosquelette et notamment la GFAP. Lorsqu'elle est sécrétée dans le milieu extracellulaire, elle exerce un effet sur la croissance neuronale et la prolifération astrocytaire. Cependant, certaines études ont montré des immuno-marquages S100 β -positifs dans certains neurones et dans des oligodendrocytes (Donato et al., 2009).

Enfin, un autre marqueur astrocytaire d'intérêt est l'Aldh1L1 (*Aldehyde Dehydrogenase 1 Family Member L1*) un promoteur spécifique aux astrocytes (Barres, 2008). Cette protéine est

une 10-formyltetrahydrofolate déshydrogénase participant au métabolisme du folate dans les astrocytes. On la retrouve dans les astrocytes matures et immatures aussi bien dans la substance blanche que dans la substance grise du SNC (Cahoy et al., 2008).

Aujourd'hui, des analyses de transcriptomes des astrocytes mettent à jour une grande diversité moléculaire des astrocytes dans différentes régions cérébrales (Khakh & Sofroniew, 2015). Cela ouvre la possibilité d'identifier de nombreux moyens de repérer et cibler des populations astrocytaires précises.

Dans le NVsnpr-D, les astrocytes présentent un profil qui leur est propre. Les marquages de la GFAP se révèlent plutôt faibles mais ceux du S100 β donnent un signal beaucoup plus important et un marquage concentré dans le soma des astrocytes et bien spécifique à ces derniers (Figure 1.13) (Morquette et al., 2015).

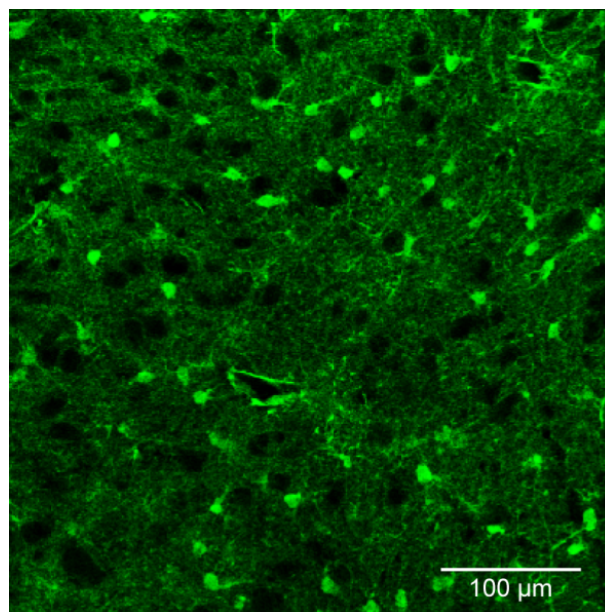


Figure 1.13 : Immunomarquage des astrocytes dans le NVsnpr-D.

Marquage immunohistochimique des astrocytes grâce à un anticorps anti-S100 β . Le marquage est bien défini et se concentre au niveau des corps cellulaires des astrocytes. Figure adaptée de (Morquette et al., 2015).

5.4.1 Les récepteurs et canaux ioniques exprimés par les astrocytes

Les astrocytes expriment une multitude de canaux ioniques et de récepteurs aux neurotransmetteurs. Ils sont donc équipés pour détecter l'activité neuronale et les changements du milieu extracellulaire.

5.4.1.1 Les canaux potassiques.

Les canaux potassiques revêtent une importance capitale car les astrocytes présentent un potentiel membranaire proche du potentiel d'équilibre des ions potassium. Les conductances potassiques exprimées le plus dans les astrocytes sont des conductances passives de fuite (D'Ambrosio, Wenzel, Schwartzkroin, McKhann, & Janigro, 1998). Les canaux TWIK-1 et TREK-1 sont les principaux contributeurs de ces conductances potassiques passives des membranes astrocytaires (Zhou et al., 2009). Les astrocytes expriment d'autres canaux potassiques avec une propriété de rectification entrante : les canaux Kir. Cette propriété de rectification entrante est attribuée aux ions Mg^{2+} intracellulaires qui bloquent le pore des canaux de manière voltage dépendant (Topert et al., 1998). Ces canaux contribuent aussi au potentiel membranaire de repos des astrocytes mais sont aussi impliqués dans la régulation du potassium extracellulaire (voir section 6.3.1). Une quinzaine de canaux Kir ont été découverts dans les astrocytes mais le principal exprimé est le Kir4.1 (L. Li, Head, & Timpe, 2001). En plus des Kir, les astrocytes expriment deux types de canaux potassiques voltages dépendants: les $K_v1.5$ et les $K_v1.6$ (Roy et al., 1996; Smart, Bosma, & Tempel, 1997). Cependant, on ne leur connaît pas de réelle fonction mis à part un rôle dans la prolifération astrocytaire (Pappas, Ullrich, & Sontheimer, 1994). Les derniers types de canaux potassiques exprimés par les astrocytes sont les canaux potassiques activés par le calcium : les canaux BK avec une grande conductance et sensibles au voltage, et les canaux SK avec une conductance plus faible et non sensibles au voltage (Hille, 2001).

5.4.1.2 Les canaux calciques.

Les études de RT-PCR (transcription inverse de la réaction en chaîne par polymérase) ont mis à jour l'expression des canaux $Ca_v1.2$, $Ca_v1.3$, $Ca_v2.2$, $Ca_v2.3$ et $Ca_v3.1$ dans des astrocytes en culture (Latour, Hamid, Beedle, Zamponi, & Macvicar, 2003). Des études

électrophysiologiques ont permis également d'enregistrer des courants calciques de type L (Barres, Chun, & Corey, 1989; MacVicar & Tse, 1988), de type T (Barres, Koroshetz, Swartz, Chun, & Corey, 1990) et des types N et R (D'Ascenzo et al., 2004) en accord avec les résultats obtenus en RT-PCR. Les fonctions de ces canaux calciques ne sont pas toutes connues mais, il est clair que le calcium est un second messager particulièrement important chez les astrocytes et possiblement impliqué dans la libération de gliotransmetteurs et autres molécules par ces derniers.

5.4.1.3 Les canaux sodiques.

Les canaux sodiques ont été souvent considérés comme étant exclusivement exprimés par les neurones, mais 5 types de canaux sodiques ont été détectés dans des astrocytes en culture : Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3 (Oh, Black, & Waxman, 1994) ainsi que Nav1.5 (Black, Newcombe, & Waxman, 2010) et Nav1.6 (Reese & Caldwell, 1999). Cependant, il convient d'être prudent car l'expression de ces canaux a été mise en évidence dans des modèles d'astrocytes en culture qui sont loin de réunir les mêmes conditions qu'un modèle *in vivo* ou en tranches. En effet, seul le canal Nav1.2 a été détecté *in situ* dans des tranches de moelle épinière et de nerf optique de rats (Black, Westenbroek, Ransom, Catterall, & Waxman, 1994). Cependant, des études électrophysiologiques ont permis de déduire l'expression des autres types de canaux sodiques (pour revue voir Pappalardo, Black, and Waxman (2016)). Les niveaux d'expression des canaux sodiques dans les astrocytes sont 100 à 1000 fois plus faibles que ceux observés dans les neurones, les astrocytes ne peuvent donc pas produire de potentiels d'action (Sontheimer & Waxman, 1992).

5.4.1.4 Les canaux chlore ou anioniques.

Les astrocytes possèdent des canaux chlore voltage-dépendants : les canaux CLC-2 (Sik, Smith, & Freund, 2000). Ils expriment aussi des canaux anioniques régulés par le volume (VRACs) impliqués dans le changement de volume des astrocytes (Crepel, Panenka, Kelly, & MacVicar, 1998). Enfin, la présence de canaux chlore activés par le calcium a aussi été démontrée en culture (Park et al., 2009).

5.4.1.5 Les récepteurs aux neurotransmetteurs.

Les astrocytes expriment une myriade de récepteurs aux neurotransmetteurs. Les premières démonstrations ont été effectuées par Bowman *et al* en 1984 quand ils ont observé qu'une application de glutamate ou de kainate sur des astrocytes en culture induisait une dépolarisation de ces derniers (Bowman & Kimelberg, 1984). C'est une découverte capitale car elle prouve que les astrocytes peuvent détecter une activité neuronale et synaptique. Par la suite, la liste des récepteurs aux neurotransmetteurs s'est allongée considérablement. On fera ici une liste exhaustive. On peut distinguer les récepteurs ionotropes et les récepteurs métabotropes.

Les récepteurs ionotropes exprimés chez les astrocytes sont les récepteurs AMPA et NMDA pour le glutamate (Kettenmann, Backus, & Schachner, 1984; Steinhauser & Gallo, 1996; Ziak, Chvatal, & Sykova, 1998). A noter que les récepteurs NMDA des astrocytes revêtent une importance particulière dans la rythmogenèse du NVsnprD (Voir section 6.4.1). Les récepteurs GABA_A (Fraser, Mudrick-Donnon, & MacVicar, 1994; Kettenmann et al., 1984; MacVicar, Tse, Crichton, & Kettenmann, 1989), à la glycine (Kirchhoff, Mulhardt, Pastor, Becker, & Kettenmann, 1996), P2X à l'ATP (Ballerini et al., 1996; Kukley, Barden, Steinhauser, & Jabs, 2001; Walz, Gimpl, Ohlemeyer, & Kettenmann, 1994) et nicotiques à l'acétylcholine (Araque, Martin, Perea, Arellano, & Buno, 2002) ont aussi été mis en évidence.

Les astrocytes expriment aussi de nombreux récepteurs métabotropes impliquant des seconds messagers comme le calcium (voir section 5.4.2). Ainsi, ils expriment des récepteurs métabotropes au glutamate (mGluRs) (Chen, Backus, & Deitmer, 1997; Condorelli et al., 1999), au GABA (J. Kang, Jiang, Goldman, & Nedergaard, 1998; Patte et al., 1999), à l'adénosine (Porter & McCarthy, 1995), à l'ATP (Fiacco & McCarthy, 2006) à l'acétylcholine (Araque et al., 2002), aux endocannabinoïdes (Navarrete & Araque, 2010), à la sérotonine (Azmitia, 2001), à la dopamine (Hosli & Hosli, 1993) et à la norépinephrine (Bekar, He, & Nedergaard, 2008).

La présence de la majorité de ces récepteurs a été démontrée dans des tranches aiguës de cortex ou d'hippocampe chez le rat et la souris avec des techniques d'électrophysiologies,

d'immunohistochimie ou de RT-PCR. Cependant l'expression de tous ces récepteurs peut varier d'une structure cérébrale à un autre ainsi qu'entre les différentes espèces (pour revue (Christensen et al., 2013)).

5.4.2 La nature de l'activité astrocytaire.

Comme pour les autres types cellulaires composant la glie, les astrocytes ne présentent pas d'activité électrique. Cependant, des augmentations transitoires de la concentration de calcium intracellulaire ont pu être observées dans les astrocytes grâce à des indicateurs calciques fluorescents soit de manière spontanée, soit provoquée par une activité neuronale (Charles, Merrill, Dirksen, & Sanderson, 1991; Cornell-Bell, Finkbeiner, Cooper, & Smith, 1990). Cette activité calcique peut mener les astrocytes à libérer certaines molécules appelées gliotransmetteurs (ATP, D-serine, Glutamate) susceptibles d'agir sur les astrocytes mais aussi sur les neurones. Cette découverte a permis d'établir le concept que les astrocytes sont des cellules excitables mais grâce à des variations de calcium intracellulaire et non de voltage (Halassa, Fellin, & Haydon, 2007).

Le calcium servant à cette forme de signalisation est stocké dans le réticulum endoplasmique. La mobilisation de ce calcium est possible grâce à deux types de récepteurs : les récepteurs à la ryanodine et les récepteurs sensibles à l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) produite par la phospholipase C (PLC) qui elle-même peut être activée par des récepteurs métabotropiques (Cotrina & Nedergaard, 2005) (voir Figure 1.14). Le calcium peut aussi provenir des canaux membranaires perméables au calcium sensibles à des ligands ou au voltage (Barres et al., 1989; Barres, Koroshetz, Chun, & Corey, 1990; Christensen et al., 2013; D'Ascenzo et al., 2004; Ertel et al., 2000; Latour et al., 2003).

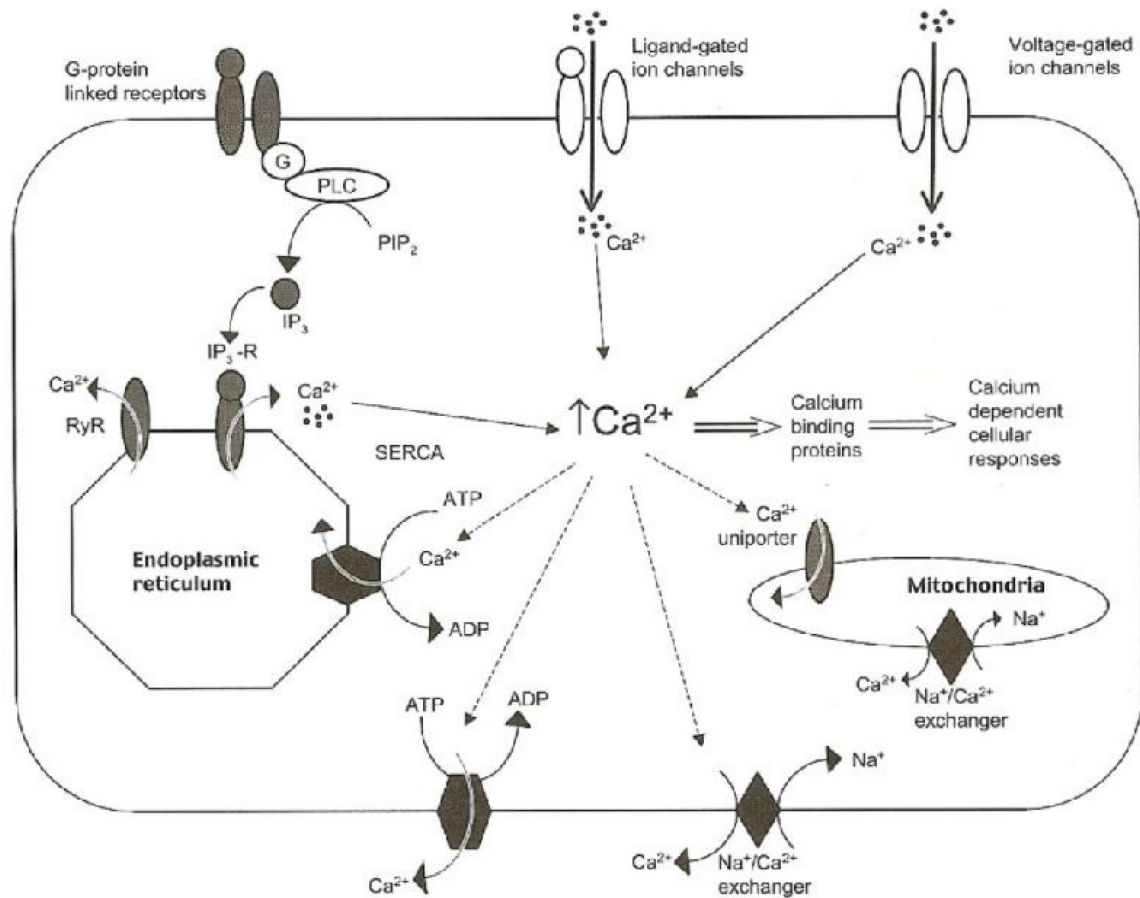


Figure 1.14 : Signalisation calcique dans les astrocytes : les mécanismes.

L'élévation du calcium intracellulaire provient de stocks internes dans le réticulum endoplasmique selon une voie de signalisation dépendante de l'IP₃ résultant de l'activation de récepteurs couplés à des protéines G. Cependant, l'augmentation du calcium intracellulaire peut aussi provenir d'autres sources comme un influx de calcium provenant du milieu extracellulaire via les canaux membranaires perméables au calcium. Figure adaptée de (Cotrina & Nedergaard, 2005).

Ces activités calciques astrocytaires présentent différentes caractéristiques et ne sont pas toutes semblables. Sept différents types d'activités calciques ont été recensées dans les astrocytes (Khakh & Sofroniew, 2015).

1) Le premier type d'activité calcique, et aussi celui rencontré le plus souvent, est un signal calcique spontané très localisé dans ce qu'on peut appeler des microdomaines situés dans les branches et les ramifications des astrocytes (Haustein et al., 2014; Paukert et al.,

2014; Shigetomi et al., 2013; Shigetomi, Kracun, & Khakh, 2010; Shigetomi, Kracun, Sofroniew, & Khakh, 2010; Shigetomi, Tong, Kwan, Corey, & Khakh, 2011). Cette activité ne dépend pas d'une décharge des neurones environnants mais seulement de la libération du calcium provenant des stocks intracellulaires dépendants des récepteurs 2 à l'IP₃ (IP₃R2) (Haustein et al., 2014).

2) Le deuxième type est aussi une activité localisée aux microdomaines mais dépend d'une activité neuronale. Ce type d'activité a été observé dans l'hippocampe au niveau du CA1 et du gyrus dentelé (Di Castro et al., 2011; Panatier et al., 2011).

3) Le 3ème type est une activité spontanée qui se développe dans les branches principales des astrocytes et éventuellement dans le soma et peut se déplacer jusqu'à une dizaine de micromètres dans la cellule (Haustein et al., 2014).

4) Le 4ème type d'activité calcique est une vague calcique dite globale comprenant l'entièreté de l'astrocyte, y compris son soma. Cette activité est IP₃R2 dépendante mais nécessite aussi une activité neuronale massive comme montré dans le CA3 de l'hippocampe (Haustein et al., 2014).

Cette activité peut se propager sur un ensemble d'une centaine d'astrocytes ce qui peut être considéré comme une forme de communication intercellulaire de longue distance. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour ce phénomène : la diffusion d'IP₃ à travers les jonctions communicantes qui peuvent lier les astrocytes, la libération d'ATP (voir section 6.1 sur la gliotransmission) qui permet d'activer les récepteurs purinergiques des astrocytes environnants ou à plus longue distance, initiant une cascade activant la PLC et la production d'IP₃ et donc une élévation de calcium intracellulaire qui peut conduire à la libération d'ATP et donc conduire à la formation d'une vague calcique (Perea & Araque, 2005a).

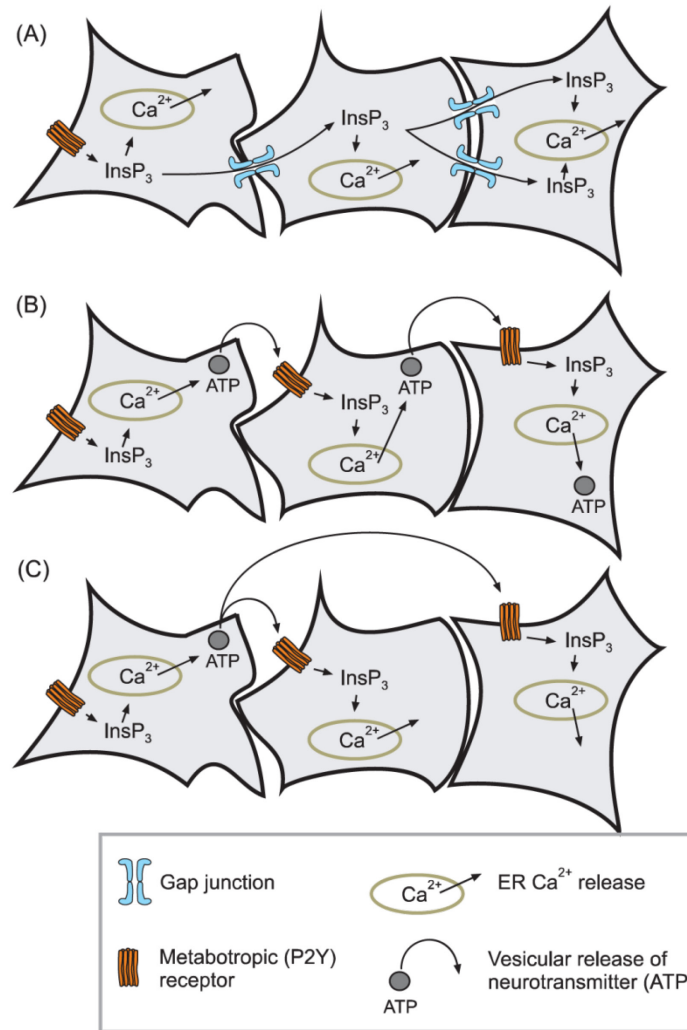


Figure 1.15 : Mécanismes de propagation des vagues calciques dans les astrocytes.

A : Les vagues calciques peuvent être maintenues par la diffusion de l' IP_3 à travers les jonctions communicantes vers d'autres astrocytes, ce qui permet de libérer du calcium dans le milieu intracellulaire. **B et C :** Les vagues calciques peuvent être maintenues grâce à la libération de gliotransmetteurs. Ici, l'ATP est libéré par un premier astrocyte et va activer l'astrocyte voisin (B) ou même des astrocytes plus éloignés (C). Figure adaptée de (Verkhratsky & Butt, 2013).

5) Le 5ème type d'activité calcique est une activité observée dans les pieds astrocytaires dépendante de l' IP_3R2 et des stocks intracellulaires de calcium (Straub, Bonev, Wilkerson, & Nelson, 2006) et aussi de l'entrée de calcium par les canaux TRPV4 (des canaux cationiques non spécifiques) (Dunn, Hill-Eubanks, Liedtke, & Nelson, 2013).

6) Le 6ème type d'activité calcique est une activité très longue dans le temps (de l'ordre de 70s) et très localisée observée dans les prolongements des astrocytes corticaux *in vivo* (Kanemaru et al., 2014).

7) Enfin, le 7ème type d'activité a été aussi observé *in vivo* durant la locomotion dans le cortex et est caractérisé par une réponse calcique très vaste dans tous les différents compartiments astrocytaires et régulé par la libération de neuromodulateurs (Ding et al., 2013; Paukert et al., 2014; Srinivasan et al., 2015).

6. Les interactions astrocytes-neurones

6.1 La gliotransmission

La gliotransmission est le fait que les astrocytes sont capables de libérer des molécules permettant de communiquer avec les neurones ou les autres astrocytes environnants. Ces molécules sont alors nommées des gliotransmetteurs. Les principales molécules identifiées comme gliotransmetteurs sont le glutamate, la D-sérine et l'ATP.

6.1.1 Le glutamate

Le premier gliotransmetteur mis à jour est le glutamate. La première démonstration fut publiée par Papura *et al.* Ils montrent que l'application de bradykinine sur des astrocytes en co-culture avec des neurones produit une élévation du calcium intracellulaire dans des astrocytes et une libération de glutamate pouvant influencer les neurones environnants via leurs récepteurs NMDA (Parpura et al., 1994). Ce phénomène se ferait par exocytose de vésicules de glutamate induite par le calcium intracellulaire. En effet, l'application de toxine botulique, connue pour inhiber des protéines du complexe SNARE, induit une baisse de libération du glutamate par les astrocytes. Ces protéines du complexe SNARE notamment la protéine 2 d'association vésicule-membrane (VAMP2), la synthaxin-1 et la protéine 23 associée au synaptosome seraient donc impliquées dans la libération de glutamate par les astrocytes via un processus d'exocytose (Montana, Malarkey, Verderio, Matteoli, & Parpura, 2006; Parpura & Zorec, 2010). Des études appuient cette idée et démontrent l'entrée de glutamate dans des vésicules au sein des astrocytes grâce à des transporteurs vésiculaires du glutamate (VGLUTs) fonctionnant avec un gradient de protons H^+ produit par des ATPases

vacuolaires (V-ATPases) (Gucek, Vardjan, & Zorec, 2012; Takamori, Rhee, Rosenmund, & Jahn, 2000). L'inhibition de ces V-ATPases bloque la libération de glutamate dépendante du calcium dans les astrocytes (Parpura & Zorec, 2010). De plus, les transporteurs vésiculaires du glutamate, au nombre de 2 (VGLUT1 et VGLUT2) ont été co-localisés dans les astrocytes sur des vésicules ressemblant à des vésicules synaptiques (Bezzi et al., 2004).

Cependant, ce phénomène de libération exocytotique du glutamate par les astrocytes ne serait pas le seul. Plusieurs autres mécanismes ont été démontrés. Les astrocytes ont également des transporteurs membranaires au glutamate qui recaptent le glutamate au niveau de leur membrane mais qui peuvent aussi fonctionner à l'envers et donc participer à la libération de glutamate (Longuemare & Swanson, 1995). Des récepteurs ionotropes à l'ATP, de type P2X₇ peuvent aussi permettre la libération de glutamate une fois activés (Duan et al., 2003). Finalement, les astrocytes sont connus pour être pourvus des connexons formant des hémicanaux (voir section 7) régulés de différentes manières, et dont l'ouverture permet la libération de glutamate dans le milieu extracellulaire (Ye, Wyeth, Baltan-Tekkok, & Ransom, 2003). La Figure 1.16 illustre les principales voies de libération de glutamate par les astrocytes.

6.1.2 La D-sérine :

La D-sérine est un gliotransmetteur produit à partir de la L-sérine par la serine racemase (De Miranda, Panizzutti, Foltyn, & Wolosker, 2002). L'application de glutamate sur des astrocytes en culture provoque une libération de D-sérine dépendante du calcium intracellulaire. Cette libération se fait via l'activation des récepteurs AMPA, des récepteurs kainate (KARs) et des récepteurs métabotropes au glutamate (mGluR) (Mothet et al., 2005). L'utilisation d'agonistes aux AMPA/KARs ou des mGluR augmente la libération de D-sérine alors que celle d'inhibiteurs la diminue. Cette libération est liée à l'exocytose de vésicules puisqu'elle est supprimée par la toxine botulique ou les inhibiteurs de V-ATPase. De plus, des études immunohistochimiques montrent une co-localisation des protéines VAMP 2/3 et VGLUT2 des vésicules contenant la D-sérine (Martineau et al., 2013) (Figure 1.16).

La D-sérine, un co-agoniste nécessaire pour l'activation des récepteurs NMDA sur l'élément post-synaptique est importante pour le phénomène de potentialisation à long terme;

sa fixation au récepteur permet de repousser l'ion Mg^{2+} qui en bloque le pore (Henneberger, Papouin, Oliet, & Rusakov, 2010).

6.1.3 L'ATP :

L'ATP peut être libérée par les astrocytes et agir comme molécule de signalisation via les récepteurs purinergiques. Cette libération a été démontrée par Guthrie *et al* qui ont remarqué que le milieu de culture des astrocytes montrant des vagues calciques contenait plus d'ATP que le milieu de culture dit témoin dans lequel les astrocytes ne montrent pas de vagues calciques. L'addition du milieu de culture des astrocytes "activés" sur les astrocytes témoins produisit des vagues calciques qui furent inhibées par des antagonistes purinergiques (Guthrie et al., 1999). Des études ont démontré que les connexons, particulièrement ceux formés avec la connexine 43 (Cx43), sont perméables à l'ATP (J. Kang et al., 2008) et que la libération d'ATP par les astrocytes est bloquée par l'utilisation de bloqueurs de connexons, ou dans des souris knockout pour les Cx43 et les Cx30 (Torres et al., 2012). L'ATP serait donc libéré via les connexons spécifiquement les connexons Cx43. Un autre mécanisme de libération de l'ATP serait celui d'une libération calcium-dépendante par des lysosomes présents dans les astrocytes et contenant de l'ATP (Oya et al., 2013) (Figure 1.16).

6.1.4 Autres gliotransmetteurs

Une longue liste de gliotransmetteurs existe. On peut ici citer, l'adénosine (Caciagli, Ciccarelli, Di Iorio, Ballerini, & Tacconelli, 1988), le GABA (Gallo, Patrizio, & Levi, 1991), la taurine (Pasantes Morales & Schousboe, 1988), le $TNF\alpha$ (Beattie et al., 2002) et les eicosanoïdes (Xia & Zhu, 2011).

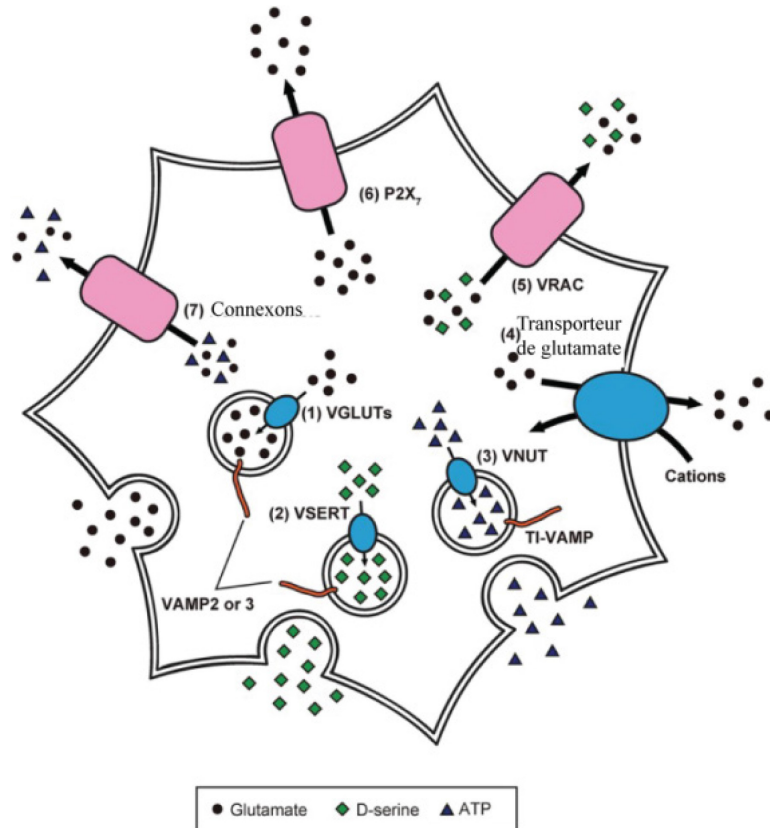


Figure 1.16 : Les différentes voies de libération des principaux gliotransmetteurs.

Via des vésicules d'exocytose : Le glutamate et la D-sérine sont intégrés dans des vésicules via les VGLUTs (1) et les transporteurs vésiculaires de la D-sérine (VSERT) (2). Sous l'effet d'une augmentation du calcium intracellulaire, ces vésicules fusionneront avec la membrane plasmique grâce aux protéines SNARE, VAMP 2 ou VAMP3.

Via la sécrétion de lysosomes : L'ATP est stocké dans des lysosomes via VNUT (3). D'une manière calcium dépendante, l'exocytose des lysosomes est effectuée via l'interaction des protéines SNARE dont TI-VAMP.

Autres mécanismes de libération de gliotransmetteurs : le glutamate peut être libéré par un fonctionnement inverse du transporteur au glutamate (4), des gliotransmetteurs peuvent être libérés par les transporteurs VRAC (5), les récepteurs P2X₇ (6) ou encore les connexons (7). Figure adaptée de (Harada, Kamiya, & Tsuboi, 2015).

6.2 La synapse tripartite

De par les découvertes faites à leur sujet depuis la dernière trentaine d'années, les astrocytes font maintenant partie intégrante du concept de synapse qui ne contient donc plus uniquement les éléments pré et post-synaptiques. D'où le concept de synapse tripartite (Araque, Parpura, Sanzgiri, & Haydon, 1999). Pour exemple, dans le cortex et l'hippocampe les synapses sont le plus souvent associées avec les prolongements astrocytaires (Ventura & Harris, 1999) et chaque astrocyte peut envelopper ainsi 300-600 dendrites pouvant contenir de l'ordre de 100 000 synapses (Bushong et al., 2002; Halassa, Fellin, Takano, Dong, & Haydon, 2007). Les astrocytes enlacent la fente synaptique et les éléments de la synapse (Figure 1.17). Cela permet d'avoir des interactions dites bidirectionnelles avec les éléments pré et post-synaptique neuronaux. En effet, les astrocytes sont capables de détecter l'activité synaptique (voir section 5.4.1), de libérer des gliotransmetteurs (voir section 6.1) et d'influencer les neurones mais peuvent aussi effectuer la recapture des neurotransmetteurs.

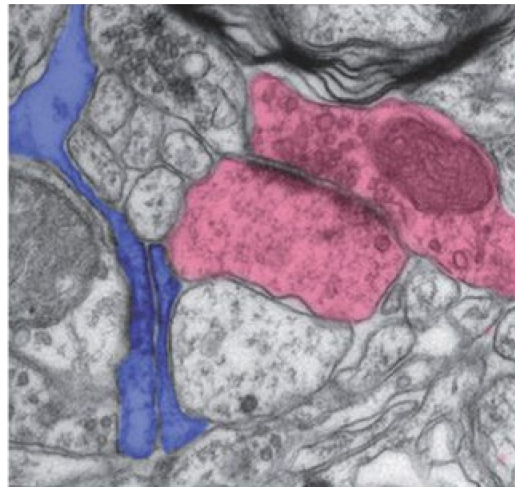


Figure 1.17 : Les astrocytes au contact des synapses.

Image de microscopie électronique montrant les éléments pré et post-synaptiques (en rose) et des prolongements astrocytaires (en bleu) les enserrant. Figure adaptée de (Giaume, Koulakoff, Roux, Holcman, & Rouach, 2010)

Les exemples d'interactions et de synapse tripartite sont nombreux mais les plus détaillés sont au sein de l'hippocampe. L'activation des collatérales de Schaeffer induit la libération de glutamate sur les dendrites des neurones pyramidaux et leurs récepteurs post-

synaptiques. Toutefois, ce glutamate agit aussi sur les récepteurs astrocytaires et provoque une libération d'ATP par ces derniers. L'ATP libéré se retrouve hydrolysé en adénosine qui active les récepteurs A_{2A} sur l'élément pré-synaptique. Il en résulte l'arrêt de la libération de neurotransmetteur au sein de la fente synaptique : c'est un mécanisme de rétrocontrôle inhibiteur (J. M. Zhang et al., 2003). A l'inverse, les astrocytes peuvent aussi augmenter l'excitabilité des neurones et même synchroniser une population de neurones via un mécanisme non-synaptique en libérant du glutamate (Angulo, Kozlov, Charpak, & Audinat, 2004; Fellin et al., 2004). Le glutamate libéré par les astrocytes peut agir sur des récepteurs glutamatergiques (kainate, NMDA) ou métabotropes de l'élément post-synaptique pour induire une variété d'effets (Fiacco & McCarthy, 2004; Jourdain et al., 2007; Perea & Araque, 2007) incluant : 1) une augmentation de la fréquence des courants synaptiques excitateurs spontanés ou évoqués par la stimulation de la voie synaptique, 2) une potentiation (Pasti, Volterra, Pozzan, & Carmignoto, 1997) ou une dépression de l'activité synaptique (Q. S. Liu, Xu, Arcuino, Kang, & Nedergaard, 2004; Panatier & Robitaille, 2016), 3) des courants entrants (SICs) (Angulo et al., 2004; Araque, Sanzgiri, Parpura, & Haydon, 1998; Perea & Araque, 2005b; Shigetomi, Bowser, Sofroniew, & Khakh, 2008). Rappelons aussi que les astrocytes en libérant la D-sérine, un coagoniste des récepteurs NMDA, jouent un rôle dans la potentiation à long terme (Henneberger et al., 2010). La Figure 1.18 résume ce concept de synapse tripartite.

En conclusion, les astrocytes peuvent influencer l'efficacité des connexions synaptiques en fonction des sites d'actions de leurs gliotransmetteurs mais aussi de leur nature. Ceci révèle au final une capacité de régulation très complexe d'autant plus que les astrocytes sont capables de discriminer l'activité de différents circuits synaptiques. En effet, les astrocytes situés dans le *stratum oriens* de la région CA1 de l'hippocampe répondent aux stimulations de l'*alveus*, contenant des fibres cholinergiques et glutamatergiques, par des élévations calciques induits spécifiquement par l'acétylcholine (Araque et al., 2002) mais ne répondent au glutamate que lorsqu'il provient des terminaisons synaptiques d'une autre voie : celles des collatérales de Schaeffer (Perea & Araque, 2005b). Ainsi, les astrocytes sont capables de discriminer les entrées synaptiques de différentes voies et d'agir en fonction de la provenance de l'activité synaptique. Un autre exemple de cette discrimination spatiale existe

aussi dans le cortex somatosensoriel en tonneaux (barrel cortex). En effet, les astrocytes des couches 2 et 3 répondent aux entrées synaptiques glutamatergiques de la couche 4 dans la même colonne. Par contre, ils ne répondent pas à des entrées de même nature provenant d'entrées des couches 2 et 3 des colonnes adjacentes (Schipke, Haas, & Kettenmann, 2008).

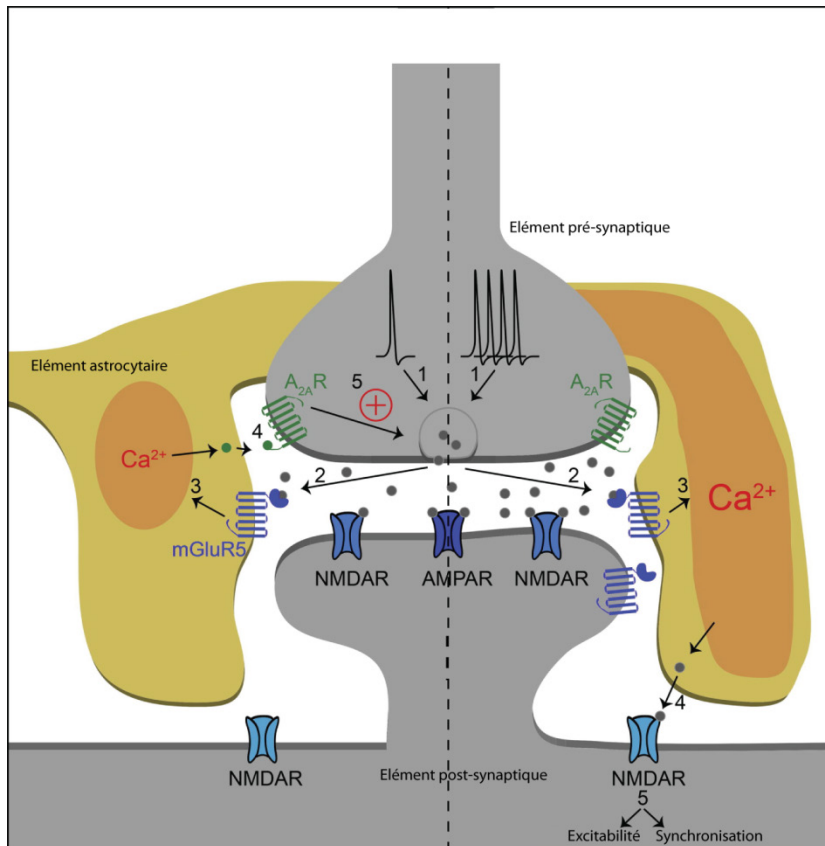


Figure 1.18 Modèle des interactions astrocytes-neurones au niveau des synapses CA3-CA1 dans l'hippocampe.

Partie de gauche : à l'arrivée d'un potentiel d'action dans l'élément présynaptique du glutamate est libéré (1) et va activer les récepteurs mGluR5 de l'astrocyte (2). Cela mène à une augmentation du calcium intracellulaire dans le prolongement astrocytaire (3) qui permet la libération de purines (comme l'ATP) par les astrocytes. Ces purines activent les récepteurs présynaptiques à l'adénosine de type 2 (A_{2A}) (4) permettant une augmentation de l'efficacité de la transmission (5).

Partie de droite : durant une activité soutenue (1) le glutamate active les récepteurs mGluR5 astrocytaires (2) provoquant une importante augmentation du calcium intracellulaire (3) qui se propage dans l'ensemble de l'astrocyte. Dans ces conditions, l'astrocyte libère alors du glutamate qui va activer les récepteurs NMDA extra synaptiques (4). Cela permet de contrôler l'excitabilité neuronale et la synchronie (5). Figure adaptée de (Panatier & Robitaille, 2016).

Au sein de la synapse tripartite, les astrocytes ne font pas que détecter l'activité synaptique ou libérer des gliotransmetteurs. Ils interviennent en participant à la recapture des neurotransmetteurs dans la fente synaptique. Lorsqu'un neurotransmetteur est libéré dans la fente synaptique, il est recapté par des transporteurs spécifiques situés dans la membrane de l'élément post-synaptique mais aussi dans la membrane astrocytaire. On ne trouve pas ces transporteurs sur l'élément pré-synaptique. Pour le glutamate, les deux transporteurs EAAT1 et EAAT2 (*Excitatory Amino Acid Transporter*) exprimés dans les membranes des astrocytes sont primordiaux (Rothstein et al., 1996). Ils permettent aux astrocytes de recapter le glutamate pour le transformer en glutamine qui est, à son tour excrétée et recaptée par les neurones pour ensuite être de nouveau convertie en glutamate et assurer le fonctionnement de la synapse.

La recapture du GABA fait appel aux transporteurs spécifiques GAT (*GABA Transporter*). GAT-1 est exprimé dans les neurones et les astrocytes, et GAT-3 est spécifiquement exprimé dans les astrocytes (Durkin et al., 1995; Kinney & Spain, 2002; Minelli, DeBiasi, Brecha, Zuccarello, & Conti, 1996). La Figure 1.19 décrit succinctement ces transporteurs.

Les transporteurs à la sérotonine (SERT), à la dopamine (DAT) et à la norépinéphrine (NERT) sont aussi exprimés dans les astrocytes ainsi que d'autres pour plusieurs des neurotransmetteurs existants (pour revue voir (Swanson, 2005)).

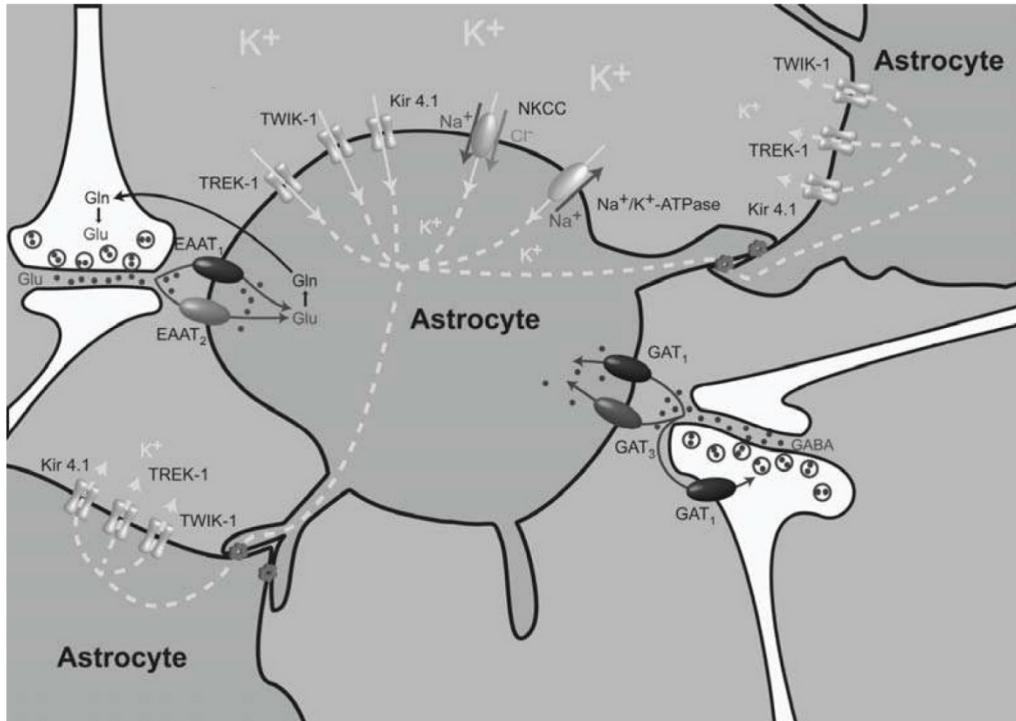


Figure 1.19 : La recapture du potassium extracellulaire et de gliotransmetteurs par les astrocytes.

Durant l'activité neuronale, la concentration de potassium extracellulaire augmente. Les astrocytes modulent cette hausse en recaptant le potassium via les canaux TREK-1, TWIK-1 et Kir4.1, les transporteurs NKCC ou la Na⁺/K⁺-ATPase. Le potassium peut être redistribué dans d'autres astrocytes via les jonctions communicantes et être évacué par les canaux de fuites potassiques dans le milieu extracellulaire à distance du lieu de l'activité neuronale. Les astrocytes sont aussi impliqués dans la recapture du glutamate avec les EAAT₁ et les EAAT₂, et le GABA avec les transporteurs GAT. Figure adaptée de (Christensen et al., 2013).

6.3 La régulation des ions extracellulaires

Les astrocytes régulent les concentrations d'ions dans le milieu extracellulaire qui elles-mêmes varient avec l'activité neuronale. En effet, une activité neuronale accrue provoque une hausse du potassium extracellulaire, mais provoque aussi des fluctuations de sodium, de calcium ou encore de chlore que les astrocytes détectent et régulent de différentes façons.

6.3.1 *Le potassium extracellulaire*

Lors d'une activité neuronale dans des conditions physiologiques normales, la concentration extracellulaire ($[K^+]_e$) de potassium peut augmenter jusqu'aux environs de 12mM (Dietzel & Heinemann, 1986). Étant donné l'importante différence de concentration en potassium entre le milieu intracellulaire (130mM) et le milieu extracellulaire (2.7-3.5mM) (Kofuji & Newman, 2004), l'activation de courants potassiques neuronaux essentielle pour repolariser les neurones produira une augmentation du potassium extracellulaire. Or, une augmentation trop importante réduira le gradient entre le milieu intracellulaire et le milieu extracellulaire affectant par le fait même plusieurs conductances importantes pour la décharge neuronale. La régulation du potassium extracellulaire par les astrocytes est donc essentielle. Des mécanismes passifs et actifs sont impliqués dans cette régulation.

En effet, les astrocytes possèdent plusieurs canaux potassiques voltage dépendants. (Voir section 5.4.1.1). Les canaux TREK-1 et TWIK-1 mais surtout les canaux Kir (majoritairement les Kir 4.1) permettent de récupérer le potassium extracellulaire d'autant plus qu'ils sont impliqués dans le maintien du potentiel de membrane des astrocytes. Ce mécanisme se fait donc passivement. Les canaux Kir 4.1 sont co-exprimés avec les aquaporines 4, des canaux membranaires permettant le passage de l'eau, responsables du phénomène du changement de volume des astrocytes observé lors d'une intense activité neuronale. Ces canaux pourraient aussi jouer un rôle dans la régulation du potassium extracellulaire (Nagelhus, Mathiisen, & Ottersen, 2004). L'importance des canaux Kir 4.1 dans la régulation du potassium extracellulaire est illustrée par le fait que les astrocytes des animaux présentant un knock-out des canaux Kir 4.1 ont un potentiel membranaire dépolarisé

et une capacité réduite à réguler le potassium extracellulaire accumulé durant l'activité neuronale (Bay & Butt, 2012; Chever, Djukic, McCarthy, & Amzica, 2010).

L'hypothèse d'une redistribution spatiale du potassium extracellulaire via les jonctions communicantes a été proposée sur la base de l'organisation des astrocytes en syncytium (Orkand, Nicholls, & Kuffler, 1966), et de l'observation que l'élévation du potassium extracellulaire augmente le couplage astrocytaire (De Pina-Benabou, Srinivas, Spray, & Scemes, 2001; Deitmer, Verkhratsky, & Lohr, 1998) (voir paragraphes suivants sur le couplage astrocytaire). Cependant, ce concept est débattu car Wallraff *et al.*, 2006 qui n'observent pas de changement dans la régulation du potassium extracellulaire par les astrocytes au sein de l'hippocampe chez des animaux présentant une délétion génétique des connexines astrocytaires permettant la formation de jonctions communicantes (Wallraff *et al.*, 2006).

Un autre phénomène, actif, peut être impliqué dans cette régulation. En effet, les astrocytes possèdent en plus des canaux Kir, une pompe $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ qui participerait à la régulation du potassium extracellulaire (D'Ambrosio, Gordon, & Winn, 2002). Une autre pompe pouvant aussi jouer un rôle dans la régulation du potassium extracellulaire est celle du co-transporteur $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ (Hertz, Chen, & Spatz, 2000; Tas, Massa, Kress, & Koschel, 1987).

6.3.2 Le sodium extracellulaire

A l'inverse du potassium, lors de la décharge neuronale, le sodium extracellulaire diminue car les ions Na^+ entrent dans le milieu intracellulaire des neurones via différentes conductances sodiques (Dietzel, Heinemann, Hofmeier, & Lux, 1982).

Les astrocytes expriment des canaux sodiques voltage-dépendants qui assurent une légère entrée d'ions Na^+ afin de maintenir une concentration de Na^+ cytoplasmique suffisante pour le fonctionnement de la pompe Na^+ / K^+ (Rose & Karus, 2013; Sontheimer, 1994).

L'utilisation de l'imagerie sodique avec des sondes fluorescentes sensibles au sodium, a permis de montrer des signaux sodiques coordonnés avec l'activité synaptique (Bennay, Langer, Meier, Kafitz, & Rose, 2008). Cette augmentation de sodium intracellulaire

persisterait pour environ 10s et serait causée par un transporteur du glutamate qui fait entrer 3 ions Na^+ avec chaque molécule de glutamate (Langer & Rose, 2009).

6.3.3 Le chlore extracellulaire

Les astrocytes expriment des canaux chlore (voir section 5.4.1.4) jouant un rôle dans la régulation du volume des astrocytes (VRACs : *Volume regulated anion channels*) (Crepel et al., 1998) puisqu'ils sont activés par le gonflement de ces derniers. Ces canaux sont aussi activés par l'hyperpolarisation et l'acidification du milieu extracellulaire (Jentsch, Stein, Weinreich, & Zdebik, 2002). Lorsque le milieu extracellulaire devient hypotonique, ils produisent un efflux de Cl^- (Benesova et al., 2012). Les ions Cl^- peuvent aussi être impliqués dans la régulation du volume des astrocytes via la pompe $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ (Jayakumar & Norenberg, 2010).

De plus, les canaux Cl^- pourraient jouer un rôle dans la régulation du potassium extracellulaire. En effet, l'entrée d'ions Cl^- se ferait avec de l'eau et entrainerait aussi des ions potassium. Des augmentations des concentrations de chlore intracellulaire et de potassium intracellulaire ont été observés simultanément dans les astrocytes lors d'activité neuronale (Ballanyi 1987) ce qui indiquerait des flux entrants de chlore avec des ions potassium.

6.3.4 Le Calcium extracellulaire

Les astrocytes possèdent aussi des senseurs calciques (Chattopadhyay et al., 2000) les rendant capables de détecter les baisses de calcium extracellulaire, auxquelles ils répondent par une augmentation du calcium intracellulaire qui peut se propager à travers le syncytium par une vague calcique (Zanotti & Charles, 1997). Récemment, une étude a démontré que le S100 β , une protéine astrocytaire, peut réguler le calcium extracellulaire et le faire baisser. En effet, en activant les astrocytes du NVsnpr-D avec du NMDA, Morquette *et al* observent une baisse de calcium qui peut être abolie par l'application d'anticorps anti-S100 β (Morquette et al., 2015). Le S100 β est connu pour exercer plusieurs effets différents dont celui de pouvoir chélater le calcium (Mani, Boyes, & Kay, 1982; Mani, Shelling, Sykes, & Kay, 1983). De plus, il a été démontré que le S100 β peut être libéré par les astrocytes après une élévation de

leur calcium intracellulaire (Davey, Murmann, & Heizmann, 2001; Van Eldik & Zimmer, 1987). Cependant, le mécanisme exact de cette libération n'est pas encore découvert à ce jour.

Cette action sur le calcium extracellulaire est à la base d'un mécanisme de rythmogenèse décrit au prochain paragraphe.

6.4 Implication des astrocytes dans des activités rythmiques

6.4.1 Les astrocytes du NVsnpr-D et leur implication dans la rythmogenèse

Comme décrit précédemment, une activité rythmique dépendante d' I_{NaP} et aussi d'une baisse de calcium extracellulaire peut être induite dans les neurones du NVsnpr-D par la stimulation de leurs afférences glutamatergiques à haute fréquence (40Hz) ou par l'application locale de NMDA. Morquette *et al* ont fait le rapprochement entre l'action chélatrice du calcium du S100 β connu pour être un marqueur spécifique des astrocytes et la baisse de concentration extracellulaire de calcium qui accompagne la transition du patron de décharge de tonique à rythmique dans les neurones du NVsnpr. Ils ont démontré que l'application de S100 β permet de favoriser l'activation d' I_{NaP} alors que son blocage avec un anticorps empêche toute possibilité d'induire une activité rythmique dans ces neurones.

Sur la base de ces données, ils proposent un modèle selon lequel un faible niveau d'activité des afférences au NVsnpr-D serait insuffisant pour activer les astrocytes et le courant I_{NaP} des neurones qui déchargent alors de façon tonique dans ce mode alors qu'une activité plus intense et soutenue de ces afférences permettrait une activation autant des neurones que des astrocytes via leurs récepteurs NMDA. Ces derniers libèreraient alors du S100 β lequel, en faisant baisser le calcium extracellulaire, favoriserait l'activation d' I_{NaP} et produirait un patron de décharge rythmique dans les neurones (Figure 1.20). Ce modèle met en lumière une nouvelle forme d'interaction astrocytes-neurones jouant un rôle primordial dans les phénomènes de rythmogenèse.

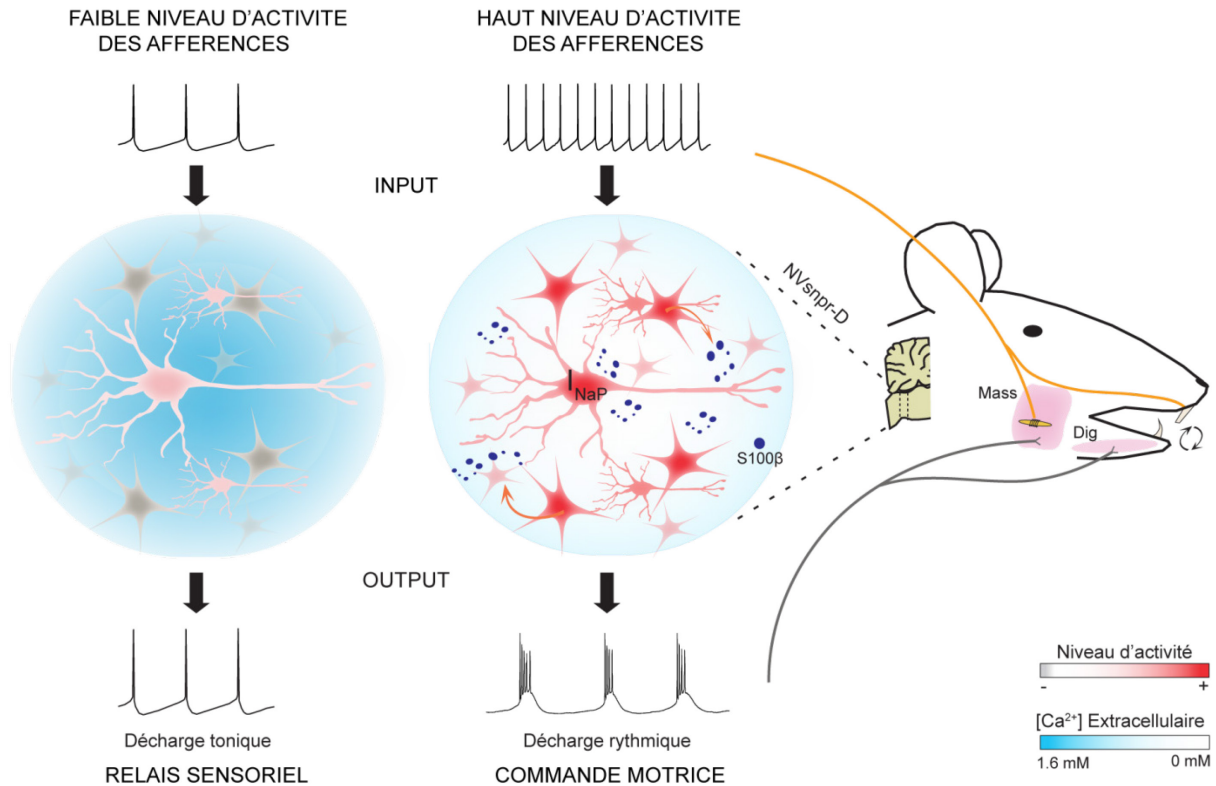


Figure 1.20 : Modèle de l'interaction astrocytes-neurones dans la rythmogenèse du NVsnpr-D.

Lorsque les afférences sensorielles ont un faible niveau d'activité, les neurones du NVsnpr-D sont dans un mode de relais sensoriel et déchargent toniquement, les astrocytes ne sont pas activés. Quand l'activité des afférences sensorielles devient beaucoup plus soutenue, les astrocytes sont activés et, via la libération de S100β, diminuent la concentration de calcium extracellulaire; ce qui favorise l'activation d'I_{NaP} et la décharge rythmique des neurones qui sont alors en mode de commande motrice. Figure adaptée de (Morquette et al., 2015)

6.4.2 Astrocytes et régulation de l'activité rythmique dans les GPCs

Plusieurs évidences suggèrent une implication des astrocytes dans la régulation de la rythmicité des GPCs.

Premièrement, comme stipulé plus haut, au sein du GPC de la mastication, les astrocytes sont impliqués dans la régulation du calcium extracellulaire via le S100β permettant de favoriser l'activation d'I_{NaP} et les décharges rythmiques. La rythmicité dans le GPC de la locomotion est aussi corrélée à une baisse de calcium extracellulaire (Brocard, Tazerart, & Vinay, 2010; Tazerart et al., 2008; Torres et al., 2012). Cependant, même si on pouvait penser

à l'implication des astrocytes dans ce phénomène, cela n'a pas encore été démontré dans ce GPC.

Deuxièmement, une synergie des concentrations extracellulaires des ions calcium et potassium serait importante pour la rythmicité et impliquerait les astrocytes. En effet, dans le GPC de la locomotion, Brocard *et al* observent des changements dans la concentration extracellulaire de ces ions (une baisse de calcium et une augmentation du potassium) avant même d'observer tout changement de patron de décharge dans les neurones. Ils en concluent que ces changements de concentration sont la cause de la mise en place du changement de patron de décharge. En modifiant les concentrations de calcium et de potassium extracellulaires, ils finissent par déterminer qu'une réduction de 0.9mM de calcium concomitant avec une hausse jusqu'à 6mM de potassium extracellulaire suffisent à déclencher des décharges en bouffées dans 25% des neurones (Figure 1.22) (Brocard et al., 2013). Une interaction similaire est aussi rapportée dans le GPC de la respiration (Panaitescu, Ruangkittisakul, & Ballanyi, 2009). Or en plus de jouer un rôle potentiel dans la régulation du calcium extracellulaire, les astrocytes sont aussi impliqués dans la régulation du potassium extracellulaire et sa recapture (voir section 6.3.1). En effet, dans le GPC de la respiration, des courants périodiques sensibles au baryum (un bloqueur des canaux Kir) reflètent la recapture du potassium extracellulaire qui augmente à chaque décharge en bouffées produite par les neurones environnants (Schnell, Fresemann, & Hulsman, 2011). De par l'ensemble de ces résultats, les astrocytes seraient donc des acteurs centraux de ce phénomène de synergie garantissant un environnement extracellulaire propice à la rythmogenèse.

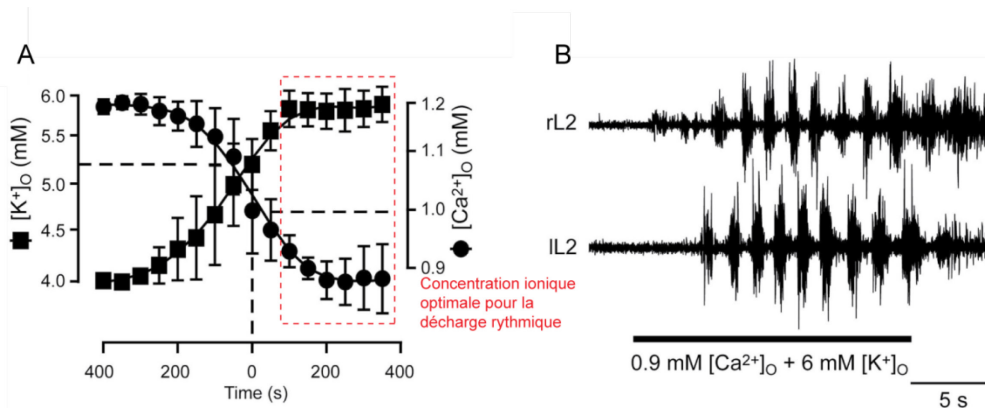


Figure 1.21 : Concept de la synergie des concentrations extracellulaires de calcium et de potassium dans la genèse de la décharge rythmique.

A : Évolution de la $[Ca^{2+}]_e$ (cercle) et de $[K^+]_e$ (carré) avant et après l'induction (à 0s) d'une activité rythmique dans le GPC de la locomotion. Les concentrations optimales de calcium et de potassium (0.9 et 6 mM respectivement) sont enserrées dans un rectangle rouge. Les astrocytes sont impliqués dans la régulation de ces deux ions. **B** : Enregistrements extracellulaires effectués dans la moelle épinière de rat dans les segments L2 (droite et gauche, rL2 et lL2 respectivement) lors l'application de 0.9mM de $[Ca^{2+}]_e$ et de 6mM de $[K^+]_e$. Figure adaptée de (Brocard et al., 2013).

Troisièmement, les astrocytes sont impliqués dans la régulation de l'activité rythmique des GPC via la libération de gliotransmetteurs, particulièrement l'ATP. Dans le GPC de la locomotion de la souris, l'application d'ATP augmente la fréquence de la locomotion fictive alors que l'adénosine la diminue (Kuzmin, Johansson, Gimenez, Ogren, & Fredholm, 2006; Witts, Panetta, & Miles, 2012). Dans un modèle *in vitro* de moelle épinière de souris néonatale, Witts *et al* ont montré que les astrocytes libèrent de l'ATP qui module alors la rythmicité via les récepteurs P2Y avant d'être hydrolysé en adénosine qui va ensuite réduire la fréquence de la locomotion via l'activation des récepteurs à l'adénosine A_1 (Witts et al., 2012) (Figure 1.21). Cette libération d'ATP peut se faire par voie vésiculaire, mais aussi via les connexons dont l'ouverture est favorisée par la baisse de calcium extracellulaire (voir les deux points précédents).

Ce phénomène a aussi été observé pour le GPC de la respiration dans le complexe de Pre-Bötzinger (PBC) (Witts et al., 2012). Lors d'une acidification du sang, les astrocytes situés dans la medula ventrolatérale adjacente au noyau retrotrapezoïde détectent la baisse de

pH et répondent par une augmentation du calcium intracellulaire qui provoque une libération d'ATP qui à son tour va activer les neurones du RTN (via les récepteurs P2Y) et augmenter la fréquence respiratoire (Gourine et al., 2010) (Figure 1.21). L'ATP peut aussi directement activer les astrocytes via leurs récepteurs P2Y, ce qui provoque une augmentation de leur calcium intracellulaire et la libération de glutamate qui, à son tour agit sur les neurones pour augmenter la fréquence du rythme respiratoire (Huxtable et al., 2010) (Figure 1.21).

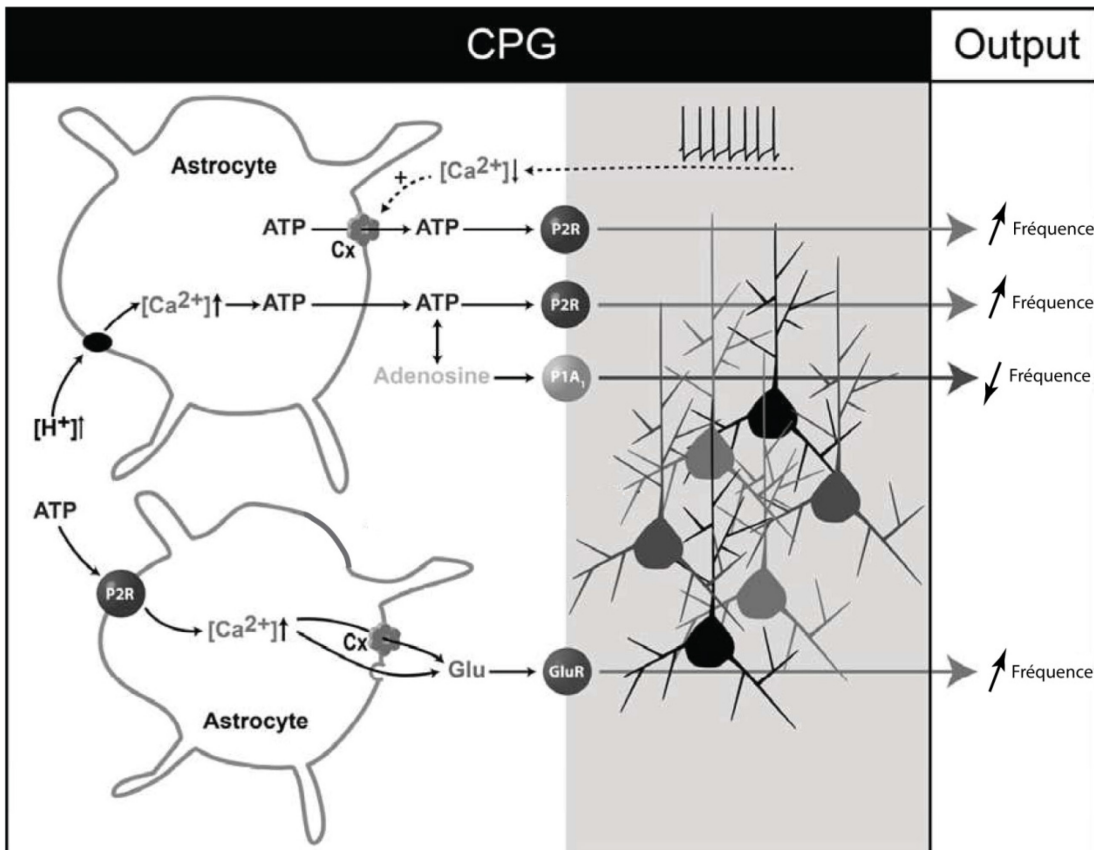


Figure 1.22 : Gliotransmission et modulation de l'activité rythmique des GPCs.

En détectant une acidification du sang dans le GPC de la respiration ou en réaction à l'activité du GPC de la locomotion, les astrocytes peuvent libérer de l'ATP qui augmente alors l'activité neuronale : soit via les récepteurs P2Y neuronaux, soit par l'activation des récepteurs P2Y astrocytaires qui amène alors les astrocytes à libérer du glutamate. Dans le milieu extracellulaire, l'ATP peut être hydrolysé en adénosine qui va alors agir sur les récepteurs A1 et diminuer l'activité du GPC. Figure adaptée de (Christensen et al., 2013).

7. Le couplage astrocytaire

7.1 Les connexines et les jonctions communicantes : principes généraux et définitions

Les protéines constituant les jonctions communicantes sont divisées en 3 familles différentes : les innexines, les pannexines et les connexines (Cx). Les pannexines et connexines se retrouvent dans la famille des deutérostomiens alors que seules les innexines sont présentes chez les protostomiens (Scemes, Spray, & Meda, 2009; Yen & Saier, 2007). Nous ne nous intéresserons ici qu'aux connexines qui représentent une famille de 21 gènes et connexines différentes. Ce sont des protéines formées de 4 domaines transmembranaires en hélice alpha, de deux boucles extracellulaires, une boucle intracellulaire ainsi que les parties C-terminale et N-terminale situées intracellulairement (Bennett, 1994; Hertzberg, Disher, Tiller, Zhou, & Cook, 1988; Yancey, John, Lal, Austin, & Revel, 1989; Yeager, Unger, & Falk, 1998) (Figure 1.23). La boucle intracellulaire ainsi que la partie C-terminale sont responsables des spécificités de chaque connexine à savoir de sa conductance, sa dépendance au pH ou au voltage pour son ouverture ou encore sa perméabilité sélective. Chaque connexine est nommée par sa masse moléculaire (exemple : la masse moléculaire de la connexine 43 (Cx43) est 43036Da).

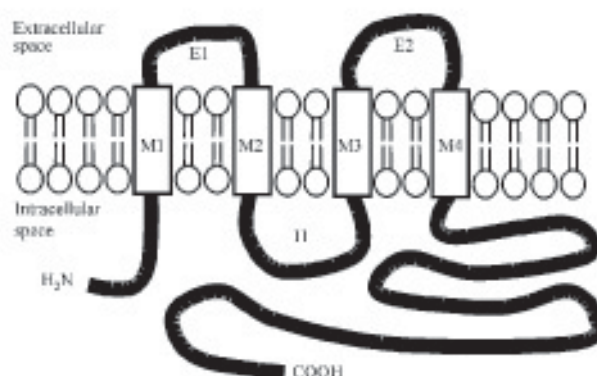


Figure 1.23 : Structure d'une connexine dans la membrane cellulaire d'une cellule. Figure adaptée de (Giaume, Leybaert, Naus, & Saez, 2013)

Les connexines sont assemblées en hexamère (6 Cx) pour former un connexon. Un assemblage de 2 connexons permet la formation d'une jonction communicante entre 2

cellules. Des cystéines présentes dans les boucles extracellulaires des protéines permettent l'assemblage de 2 connexons pour former une jonction communicante entre 2 cellules reliant le milieu intracellulaire et permettant d'avoir une voie de signalisation métabolique ou électrique directe entre elles.

Les connexons sont organisés par plaques au niveau des membranes cellulaires. Chaque plaque en contiendrait une centaine mais seulement une petite fraction serait couplée et fonctionnelle pour former une jonction communicante (Palacios-Prado, Sonntag, Skeberdis, Willecke, & Bukauskas, 2009). Les jonctions communicantes présentent une demi-vie de quelques heures (Musil, Le, VanSlyke, & Roberts, 2000; Saffitz, Laing, & Yamada, 2000).

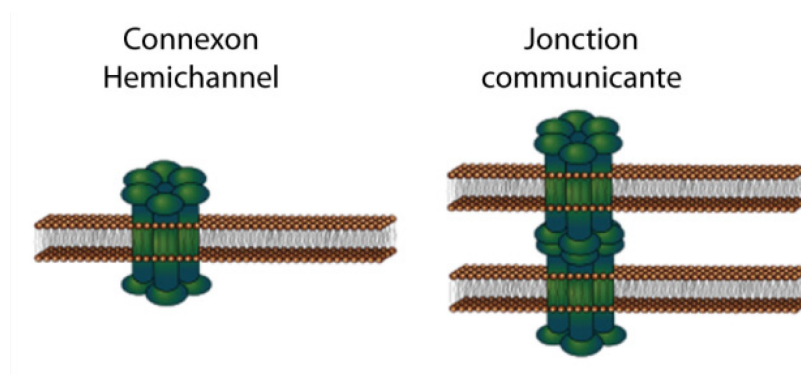


Figure 1.24 : Anatomie des connexons et des jonctions communicantes.

A gauche : Les connexons sont formés d'un assemblage de 6 connexines (chaque connexine est représentée par un cylindre vert).

A droite : Les jonctions communicantes sont l'assemblage de deux connexons apposés. Figure adaptée de (Giaume et al., 2013).

7.2 Expressions générales des connexines dans le cerveau

Les connexines sont exprimées dans la plupart des tissus. Si on considère l'expression des connexines dans le cerveau, il semblerait qu'elles soient plus abondantes dans la glie (astrocytes, oligodendrocytes et microglies) que dans les neurones (Rouach et al., 2002). Dans les neurones, on retrouve les connexines Cx26, Cx30.2, Cx36, Cx45 et Cx57 (Andrew, MacVicar, Dudek, & Hatton, 1981; Rouach et al., 2002; Sohl & Willecke, 2004).

Les connexines exprimées dans les astrocytes sont les Cx26, Cx30, Cx40, Cx43, Cx45 et Cx46 (Giaume, Orellana, Abudara, & Saez, 2012). Parmi toutes ces différentes connexines, les Cx43 et les Cx30 sont les plus exprimées au sein des astrocytes (Nagy, Dudek, & Rash, 2004).

Il est possible d'observer des jonctions communicantes entre les astrocytes et les neurones, mais cela ne se produit qu'entre connexines homologues exprimées dans les deux types cellulaires (Alvarez-Maubecin, Garcia-Hernandez, Williams, & Van Bockstaele, 2000; Froes et al., 1999).

7.3 Régulations des jonctions communicantes et des connexons : principes généraux

Les jonctions communicantes peuvent être régulées de différentes manières et chaque connexine peut avoir des moyens de régulations spécifiques.

7.3.1 La sensibilité au voltage

Les connexines possèdent une sensibilité au voltage et cela peut réguler le couplage entre deux cellules excitables tout comme l'ouverture des connexons. Les jonctions communicantes possèdent un mécanisme lent de fermeture et un autre rapide tous deux sensibles au voltage (Bukauskas & Verselis, 2004). Un domaine cytoplasmique des connexines (domaine NT) contient des résidus chargés qui déterminent la magnitude et la polarité du mécanisme de fermeture rapide. Ce mécanisme permet d'évoluer des conformations ouverte à résiduelle. Le mécanisme de fermeture lent, quant à lui, implique les boucles extracellulaires et permet d'atteindre une fermeture complète des connexons (Bukauskas & Verselis, 2004).

Les connexines peuvent être classées en deux groupes pour ce qui est de la polarité de fermeture : certaines connexines se ferment en réponse à une hyperpolarisation du potentiel membranaire (Cx45 et Cx57 par exemple) alors que d'autres se ferment sous l'effet d'une dépolarisation (Cx43, Cx26 et Cx30 par exemple) (Gonzalez, Gomez-Hernandez, & Barrio, 2007).

7.3.2 La sensibilité au calcium intracellulaire

La fermeture des jonctions communicantes par le calcium intracellulaire interviendrait principalement comme mécanisme de protection contre la fuite de métabolites ou la dépolarisation lors de dommage à une cellule, ce qui permettrait de déconnecter cette dernière des autres. Dans des conditions physiologiques, il n'est pas encore bien établi si la conductance des connexines est influencée directement par le calcium intracellulaire ou via des intermédiaires intracellulaires. Cependant, des études ont montré le rôle de la calmoduline dans la fermeture des jonctions communicantes. En se liant au calcium intracellulaire, cette protéine change de conformation et interagit avec les Cx38 (Peracchia, Wang, Li, & Peracchia, 1996), Cx32 (Peracchia, Sotkis, Wang, Peracchia, & Persechini, 2000), Cx37 et Cx43 (Sotkis et al., 2001), Cx44 et Cx50 (X. Zhang, Zou, Liu, & Qi, 2006).

7.3.3 La sensibilité au calcium extracellulaire

La première évidence qu'une baisse de calcium extracellulaire induit l'ouverture des connexines fut obtenue sur des cellules hépatiques en culture, exprimant la Cx43, dans lesquelles cette baisse a causé une augmentation de l'absorption de jaune de *Lucifer*, un traceur fluorescent ajouté dans le milieu extracellulaire. Cet effet fut bloqué par l'utilisation d'octanol ou d'heptanol, des bloqueurs des connexines, mais aussi par la transfection des cellules avec un vecteur anti-sens bloquant l'expression de la Cx43 (H. Li et al., 1996). L'effet régulateur du calcium extracellulaire sur l'état ouvert-fermé des connexons ou jonctions communicantes s'explique par la présence de sites de liaison au calcium sur une partie extracellulaire des connexines formée d'anneaux de résidus aspartate. Lorsque le calcium occupe ces sites de liaison, les connexons et les jonctions communicantes sont fermées (Gomez-Hernandez, de Miguel, Larrosa, Gonzalez, & Barrio, 2003; Torres et al., 2012). La baisse de calcium dans le milieu extracellulaire déloge les ions calciques de ces sites, favorisant l'ouverture des connexons et des jonctions communicantes. Ce mécanisme a été clairement démontré pour la Cx32 mais reste plausible pour les autres connexines gliales. Ainsi, une baisse de calcium peut promouvoir l'ouverture des connexons et jonctions communicantes.

7.3.4 Le potassium extracellulaire

Le potassium extracellulaire est connu pour augmenter lors de l'activité neuronale (voir section 7.5.2.2). Cette hausse du potassium extracellulaire durant l'activité neuronale a été mise en relation avec la communication intercellulaire des astrocytes (Scemes & Spray, 2012). Roux *et al* ont mis en évidence le rôle du potassium extracellulaire dans l'augmentation du couplage astrocytaire et donc de l'ouverture des connexines dans le gloméris olfactif. Toutefois, cette étude ne montre la régulation que sur la Cx30 (Roux, Benchenane, Rothstein, Bonvento, & Giaume, 2011).

7.3.5 La phosphorylation

La partie C-terminale des connexines contient de multiples sites de phosphorylation (serine, thréonine, et tyrosine), qui, en modifiant la conformation des connexines en modifient aussi la conductance (Moreno, Fishman, & Spray, 1992), la cinétique (Cottrell, Lin, Warn-Cramer, Lau, & Burt, 2003) ou la probabilité d'ouverture des jonctions communicantes (van Veen, van Rijen, & Jongsma, 2000). Ces changements de conformation peuvent aussi altérer la charge électrique de la partie C-terminale des connexines et en modifier la sensibilité au pH ou au voltage. Cela permet différentes possibilités de régulation qui diffèrent selon le type de connexines. Sans oublier le fait qu'un certain nombre de connexines sont-elles mêmes des protéines phosphorylantes (Cx31, Cx32, Cx36, Cx37, Cx43, Cx45, Cx46, Cx50, Cx56) (Saez, Martinez, Branes, & Gonzalez, 1998; Solan & Lampe, 2005).

7.3.6 La sensibilité au pH intracellulaire

Les connexines sont toutes sensibles au pH intracellulaire. Certaines, comme la Cx36, seraient plus sensibles à l'alcalinisation du milieu intracellulaire pour leur fermeture (Gonzalez-Nieto et al., 2008), quoique cela reste débattu (Teubner et al., 2000). La plupart des connexines réagissent plutôt à l'acidification du milieu intracellulaire par une baisse de la conductance des jonctions communicantes. La sensibilité au potentiel hydrogène (pH) intracellulaire varie selon les connexines et selon une étude utilisant un modèle d'oocytes exprimant différents types de connexines, leur sensibilité classée en ordre décroissant serait la

suivante : Cx50 > Cx46 > Cx45 > Cx26 > Cx37 > Cx43 > Cx40 > Cx32 (Stergiopoulos et al., 1999).

7.4 Pharmacologie et outils permettant d'inhiber les connexines.

Bien qu'un grand nombre de molécules inhibent les jonctions communicantes ou les connexons, il est difficile d'obtenir des blocages sélectifs des sous-types de connexines ou encore des jonctions communicantes. En effet, la majeure partie des bloqueurs ne sont que faiblement sélectifs, et agissent aussi bien sur les connexons que sur les jonctions communicantes ou sur d'autres cibles. Les premiers inhibiteurs utilisés furent des alcools (octanol, heptanol) (Johnston & Ramon, 1981) et des anesthésiques volatiles comme l'halotane (Johnston, Simon, & Ramon, 1980), nécessitant toutefois des doses (de l'ordre du mM au μ M) impliquant beaucoup d'effets secondaires. Les dérivés des acides glycyrrhétiniques sont aussi efficaces pour bloquer les jonctions communicantes mais ne sont pas plus spécifiques à ces dernières (Davidson, Baumgarten, & Harley, 1986). Parmi ces dérivés, le composé le plus utilisé, aussi bien en culture que dans des modèles de tranches aiguës, est la carbenoxolone (CBX) (Juszczak & Swiergiel, 2009; Rozental, Srinivas, & Spray, 2001). Toutefois, elle n'est spécifique à aucune connexine et peut agir sur d'autres cibles, comme les canaux potassiques voltage dépendants (Rouach, Segal, Koulakoff, Giaume, & Avignone, 2003), les canaux calciques (Vessey et al., 2004), les récepteurs purinergiques P2X7 (Suadicani, Brosnan, & Scemes, 2006), les courants évoqués par les récepteurs NMDA (Chepkova, Sergeeva, & Haas, 2008) ou encore les mitochondries qu'elle pourrait endommager (Salvi et al., 2005). C'est donc un outil à utiliser avec beaucoup de précautions.

D'autres composés montrent une sélectivité relative à certains types de connexines comme la quinine (Cx36 et Cx45) ou la méfloquine qui bloquent les Cx36 à faible concentration (3μ M) et qui à forte concentration (30μ M) bloquent les Cx43 et agissent partiellement sur les Cx26 et Cx32 (Cruikshank et al., 2004; Srinivas, Hopperstad, & Spray, 2001).

Sont apparus dans les années 90, comme des bloqueurs plus spécifiques, les peptides mimétiques des connexines. Ces résidus peptidiques dont la séquence est identique à un domaine spécifique d'une boucle extracellulaire impliquée dans la liaison de 2 connexons vont

interagir avec les boucles pour empêcher l'ouverture des connexons et leur liaison avec un autre pour la formation de jonction communicante. Gap26 et Gap27 sont deux peptides mimétiques correspondants aux séquences de la 1^{ère} et 2^{ème} boucle extracellulaire de la Cx43. Des études ont démontré l'efficacité de ces peptides pour bloquer les connexons (Braet, Vandamme, Martin, Evans, & Leybaert, 2003; Desplantez, Verma, Leybaert, Evans, & Weingart, 2012; Evans, De Vuyst, & Leybaert, 2006; Wang et al., 2012) mais aussi des effets sur les jonctions communicantes (Evans & Boitano, 2001). En effet, le Gap26 et le Gap27 ont un effet rapide sur les connexons libres d'interactions (de l'ordre de quelques minutes) mais, par la suite, l'effet s'étend aux jonctions communicantes (dans l'ordre de l'heure) (Matchkov et al., 2006). D'autres peptides mimétiques ont des séquences ciblant des domaines intracellulaires des connexines. Par exemple, le peptide L2 ou le Gap19 qui sont des peptides présentant des séquences de la partie intracellulaire N-terminale de la Cx43. Ces 2 composés agissent préférentiellement sur les connexons avec peu d'effet sur le couplage et les jonctions communicantes (Ponsaerts et al., 2010; Wang et al., 2013).

D'autres solutions consistent à utiliser des anticorps dirigés spécifiquement contre des connexines et leurs boucles extracellulaires. Cependant, ce procédé affecte autant les jonctions communicantes que les connexons (Hofer & Dermietzel, 1998).

Une autre méthode est d'utiliser des ARN interférents (siRNA). Ce sont des ARN conçus pour cibler des ARN messagers avec des séquences complémentaires et donc empêcher l'expression d'une protéine (ici des connexines) (He & Hannon, 2004). Le défaut de cette technique est le manque de spécificité du ciblage d'un ARN messager. En effet, il arrive que les séquences soient similaires avec d'autres ARN messagers qui ne sont pas les cibles voulues (Svoboda, 2007). Enfin, cette approche est moins efficace qu'une approche génétique avec l'ablation d'un gène. Cependant, plusieurs études ont utilisé cette technique avec succès pour étudier les connexines que ce soit dans les astrocytes ou d'autres types cellulaires (pour revue voir Giaume and Theis (2010)).

L'utilisation d'animaux transgéniques est un moyen beaucoup plus spécifique pour agir sur les connexines que l'utilisation d'outils pharmacologiques. De plus, cela permet de cibler spécifiquement certains types cellulaires (comme les astrocytes par exemple). De nombreuses lignées ciblant les connexines existent (pour revue voir Giaume and Theis (2010)). L'ablation

génétiq ue de la connexine la plus exprimée dans les astrocytes, la Cx43 est létale (Reaume et al., 1995). Il faut donc utiliser des knock-outs conditionnels ou cibler spécifiquement la délétion du gène dans les astrocytes. En effet, les lignées transgéniques présentant un knock-out de la Cx43 spécifiquement dans les astrocytes sont viables (Theis et al., 2003; Wiencken-Barger, Djukic, Casper, & McCarthy, 2007). Cependant, dans ces lignées, il reste encore du couplage astrocytaire via la Cx30 dont l'expression semble plus importante que dans les animaux témoins suggérant la mise en place d'un mécanisme compensatoire. (Rouach, Koulakoff, Abudara, Willecke, & Giaume, 2008; Theis et al., 2003; Wallraff et al., 2006). Ainsi, pour supprimer au mieux le couplage astrocytaire, il faudrait utiliser des lignées transgéniques ciblant aussi bien les Cx43 que les Cx30 (Rouach et al., 2008; Wallraff et al., 2006).

7.5 Rôles des jonctions communicantes dans les astrocytes du SNC

7.5.1 Description de couplage astrocytaires dans le SNC

Des réseaux astrocytaires de différentes formes et de différentes tailles ont été décrits dans de nombreuses régions cérébrales. Pour n'en citer que quelques-uns : les astrocytes présentent un couplage important avec une centaine de cellules dans le striatum ou l'aire CA1 de l'hippocampe (Adermark & Lovinger, 2008) alors que dans la couche IV du cortex somatosensoriel en tonneaux ou le glomérule olfactif, les réseaux astrocytaires sont plus petits, de l'ordre d'une cinquantaine de cellules, comme dans l'aire CA3 (D'Ambrosio et al., 1998; Houades, Koulakoff, Ezan, Seif, & Giaume, 2008; Roux et al., 2011). Des réseaux ont aussi été décrits dans l'olive latérale supérieure (LSO) et le thalamus (Augustin et al., 2016; Stephanie Griemsmann et al., 2015). La méthode la plus utilisée pour étudier les réseaux astrocytaires consiste à injecter un traceur dans un seul astrocyte et à le laisser diffuser à travers le syncytium. Pour passer les jonctions communicantes, cette molécule, le plus souvent de la biocytine, du jaune de *Lucifer*, de la neurobiotine, ou des Alexa, doit être de petite taille (Giaume & Theis, 2010).

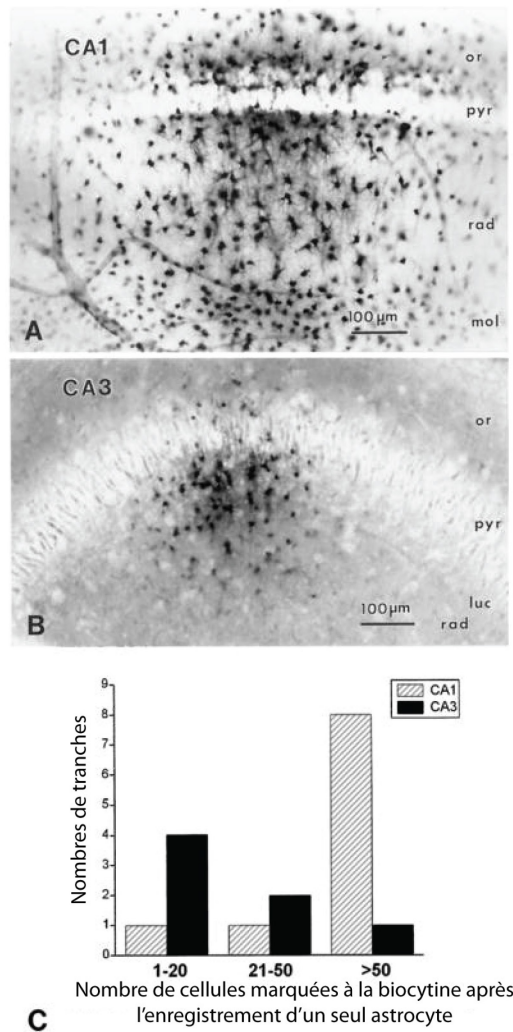


Figure 1.25 : Le couplage des astrocytes dans l'hippocampe varie selon les régions.

A, B : Photographies illustrant les profils des marquages obtenus après l'injection de biocytine dans un seul astrocyte de l'aire CA1 (A) ou de l'aire CA3 (B).

C : Histogramme du nombre de cellules observées par injection de biocytine soulignant la différence de taille des réseaux astrocytaires entre les aires CA1 et CA3 de l'hippocampe. Figure adaptée de (D'Ambrosio et al., 1998).

7.5.2 Les potentielles fonctions du couplage astrocytaire dans le SNC

La communication directe entre des cellules adjacentes par la mise en contact de leur cytoplasme permet aux jonctions communicantes d'établir un couplage électrique et/ou une coopération métabolique médiés par le passage de différentes molécules incluant les ions, les acides aminés, le glucose, le glutathionne, l'ATP, des seconds messagers, des petites molécules de signalisation (Sohl & Willecke, 2004) et des micro-ARN (acide ribonucléique) (Katakowski, Buller, Wang, Rogers, & Chopp, 2010). Ce mode de communication affectera plusieurs fonctions comme la libération de gliotransmetteurs, la propagation des vagues calciques ou encore la régulation d'ions extracellulaires comme le potassium.

7.5.2.1 Couplage astrocytaire et synapse tripartite

Les réseaux d'astrocytes peuvent être impliqués dans l'activité synaptique et la plasticité. En effet, dans l'hippocampe, Pannasch *et al* montrent que, dans un modèle de souris déficientes en Cx30 et Cx43, l'activité synaptique est augmentée alors que la plasticité synaptique à long terme est altérée. Ces effets seraient expliqués par une diminution de la clairance astrocytaire du glutamate et du potassium qui nécessite un couplage astrocytaire pour être efficace mais aussi, par une excitabilité neuronale et une probabilité de libération de neurotransmetteur augmentées (Pannasch et al., 2011). En plus du rôle des connexons, un réseau astrocytaire pourrait coordonner l'activité d'un groupe de synapses. La libération coordonnée de gliotransmetteurs d'astrocytes d'un réseau peut couvrir une grande région et donc affecter l'ensemble d'un réseau neuronal. En effet, il a été montré que les jonctions communicantes astrocytaires peuvent être perméables au glutamate et à la glutamine (Giaume, Tabernero, & Medina, 1997). Cette hypothèse peut être testée en infusant des molécules impliquées dans la gliotransmission au sein des réseaux astrocytaires ou en utilisant des souris transgéniques supprimant l'expression de connexines astrocytaires. Dans l'hippocampe, les réseaux astrocytaires sont impliqués dans la dépression hétérosynaptique. De l'ATP est libéré par les astrocytes au-delà de la zone d'activité synaptique et converti en adénosine qui cause une inhibition de la libération de neurotransmetteurs dans les synapses avoisinantes (Serrano, Haddjeri, Lacaille, & Robitaille, 2006). Une autre étude montre que l'infusion d'IP₃ dans les réseaux astrocytaires de l'hippocampe provoque la libération de glutamate qui peut alors

dépolariser les neurones et même provoquer des décharges épileptiques (N. Kang, Xu, Xu, Nedergaard, & Kang, 2005). Ces observations ont amené à l'hypothèse que l'activation d'un astrocyte à une synapse donnée peut, grâce au couplage, produire la libération de gliotransmetteurs au niveau de synapses distantes du lieu de l'activation (Figure 1.26). Cependant ce mécanisme n'a jamais encore été démontré directement.

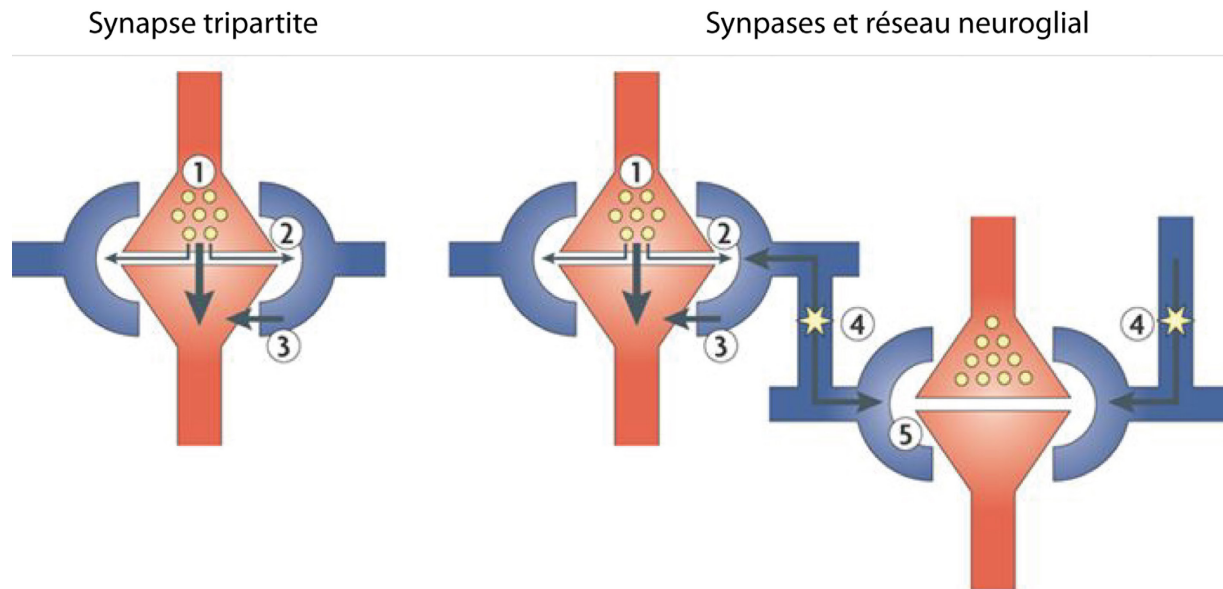


Figure 1.26 : Synapse tripartite et réseau neuroglial.

A gauche, dans la synapse tripartite, seules les interactions neurogliales entre les éléments synaptiques (en rouge) et les prolongements astrocytaires (en bleu) sont considérées. Les différentes étapes de ces interactions sont décrites : 1) libération de neurotransmetteurs. 2) les neurotransmetteurs activent des récepteurs et transporteurs astrocytaires. 3) cela conduit à la libération de gliotransmetteurs lesquels à leur tour peuvent influencer l'activité neuronale.

A droite, le concept de couplage astrocytaire est ajouté au précédent modèle. Des étapes y sont donc ajoutées. 4) les neurotransmetteurs qui ont été recaptés par les astrocytes peuvent diffuser dans le réseau astrocytaire via les jonctions communicantes. 5) cela peut mener à la libération de gliotransmetteurs au niveau de synapses distantes et donc avoir un effet sur un ensemble de neurones. Figure adaptée de (Giaume et al., 2010).

7.5.2.2 Couplage astrocytaire et régulation spatiale du potassium extracellulaire.

En ce qui concerne la clairance du potassium extracellulaire, le rôle des astrocytes est déjà bien établi via les canaux potassiques qu'ils possèdent, principalement les canaux Kir 4.1

(voir section 5.4.1.1). Cependant, l'implication du couplage astrocytaire a aussi été suggérée dans ce phénomène. Le couplage astrocytaire est présumé participer à une redistribution spatiale du potassium au sein des réseaux d'astrocytes lorsqu'une région soumise à une forte activité neuronale provoque une augmentation du potassium extracellulaire importante à un endroit précis (Orkand et al., 1966). Dans des conditions de repos la concentration de potassium extracellulaire ($[K^+]_e$) est de 3mM alors que la concentration de potassium intracellulaire ($[K^+]_i$) est de 130mM et le potentiel d'équilibre du potassium (V_k) est de -95mV. Le potentiel de repos des astrocytes est compris entre -60 et -85 mV ce qui favorise donc un gradient sortant pour le potassium (Buskila et al., 2007; Ma, Xu, Wang, Enyeart, & Zhou, 2014; McKhann, D'Ambrosio, & Janigro, 1997; Tong et al., 2014). Une élévation du $[K^+]_e$ causé par l'activité neuronale fait changer le V_k vers des potentiels plus positifs, entraînant une dépolarisation des astrocytes. Cependant, pour qu'il y ait un courant entrant de potassium, il faut que le potentiel de repos des astrocytes soit plus négatif que le V_k . Pour obtenir ces conditions, les astrocytes utilisent la membrane collective formée par les jonctions communicantes du syncytium astrocytaire pour maintenir une isopotentialité (Ma et al., 2016); en d'autres mots, ces jonctions permettent d'étendre la charge positive sur une surface membranaire plus grande afin d'empêcher qu'une dépolarisation locale trop importante bloque le travail des astrocytes. Ainsi, dans les régions où la $[K^+]_e$ est élevée, les astrocytes peuvent présenter un courant potassique entrant alors que dans les régions où la $[K^+]_e$ est faible, ils présentent un courant potassique sortant. Via leur jonctions communicantes, ils peuvent ainsi redistribuer le potassium dans des régions ne présentant pas de hausse de la $[K^+]_e$ et libérer le potassium passivement via les connexons (Figure 1.27). Avant que Ma *et al*, 2016 ne démontrent ce phénomène en comparant leurs résultats avec des modèles de calculs incluant l'équation de Nernst, plusieurs études avaient déjà rapporté des résultats pouvant supporter l'idée de la répartition spatiale du potassium au sein des réseaux astrocytaires. Gardner-Medwin *et al*, 1983 ont montré dans le cortex de rat que la $[K^+]_e$ varie en terme de concentration et de temps de manière parallèle au transfert intracellulaire des ions potassium (Gardner-Medwin, 1983a, 1983b; Gardner-Medwin & Nicholson, 1983). Par la suite, des expériences de diffusion de marqueurs fluorescents dans les astrocytes corticaux en culture ont démontré que la dépolarisation membranaire est reliée à l'augmentation de la $[K^+]_e$ mais augmente aussi la conductance des jonction communicantes (Enkvist & McCarthy, 1994).

Cela suggère que le potassium peut faciliter sa propre régulation en augmentant le couplage astrocytaire (voir section 7.3.4). Une autre étude montre que le blocage des jonctions communicantes dans le SNC du criquet migrateur provoque des hausses répétitives du $[K^+]_e$ mesurées par une pipette ion-sensible (Spong & Robertson, 2013). Enfin, Roux *et al*, 2011 ont démontré que les réseaux astrocytaires dans le glomérule olfactif détectent les variations du $[K^+]_e$ via leurs canaux K_{ir} afin d'adapter leur couplage (Roux et al., 2011).

Cependant, d'autres arguments laissent penser que la répartition spatiale du K^+ n'est pas un phénomène si important. Dans un modèle génétique permettant la délétion des jonctions communicantes astrocytaires, Wallraff *et al*, 2006 ont montré que les courants médiés par les jonctions communicantes ne représentent que 30% des conductances astrocytaires et que la clairance du potassium n'est que faiblement diminuée dans l'hippocampe (Wallraff et al., 2006). Une autre étude de modélisation a estimé que les jonctions communicantes entre les astrocytes seraient 5 fois plus dédiées au transport du potassium qu'à sa diffusion extracellulaire (Gardner-Medwin, 1983b). La répartition spatiale est donc toujours fortement débattue et le débat est résumé par Macaulay and Zeuthen (2012).

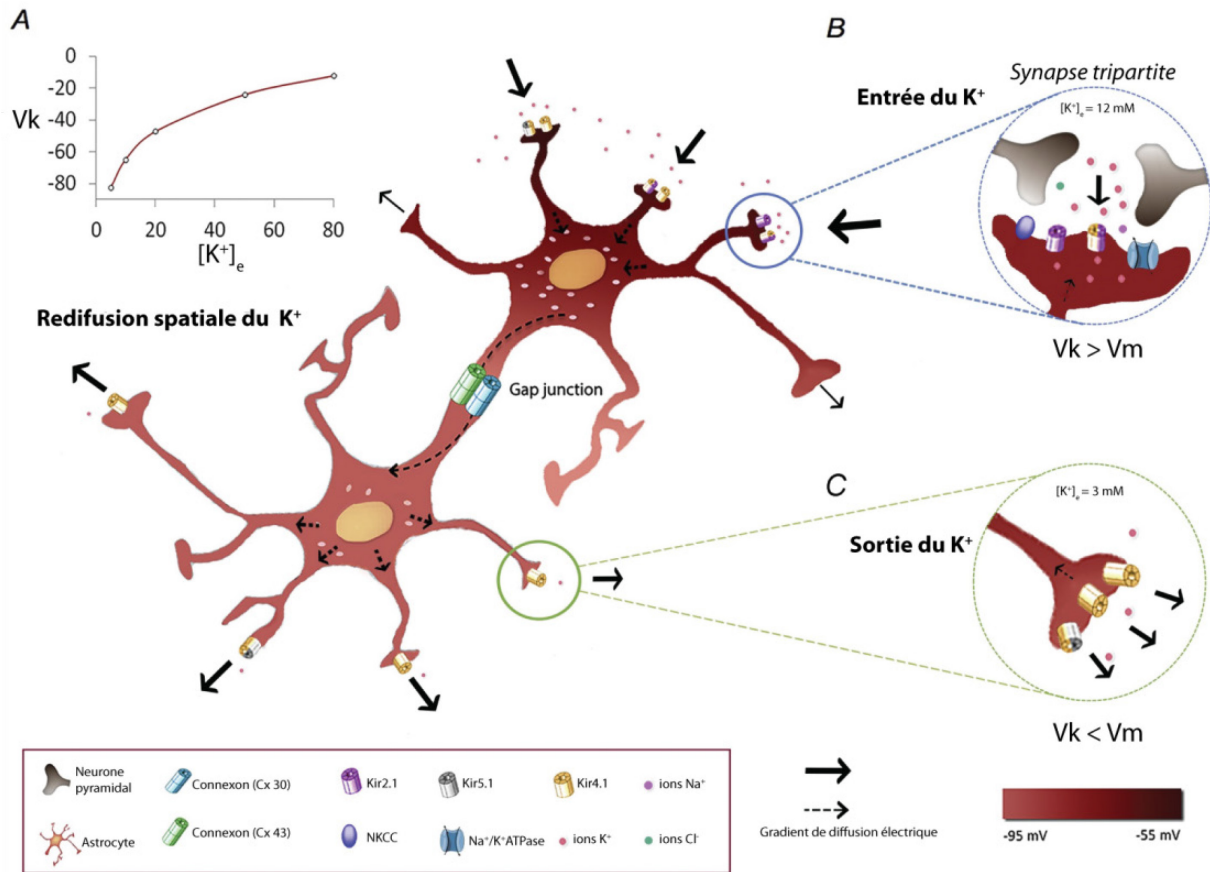


Figure 1.27 : La redistribution spatiale du K^+ au sein des astrocytes.

A : Graphique représentant les changements du potentiel d'équilibre du K^+ (V_k) en fonction de l'augmentation de la concentration de $[K^+]_e$ calculée avec l'équation de Nernst.

B : Schéma décrivant les trois mécanismes se mettant en place pour la redistribution spatiale du K^+ après une augmentation de la $[K^+]_e$. En haut à droite : L'activité neuronale provoque une augmentation de la $[K^+]_e$ ($\sim 12 \text{ mM}$) ce qui modifie le V_k à -60 mV . Dans ces conditions, des calculs de modélisation utilisant l'équation de Nernst prédisent une dépolarisation des astrocytes de l'ordre de 25.4 mV soit une dépolarisation jusqu'à -56 mV . Cependant, grâce au couplage astrocytaire qui permet une isotopotentialité, le potentiel membranaire de l'astrocyte n'est alors dépolarisé que d'environ 5 mV . Ainsi, le potentiel membranaire de l'astrocyte est plus négatif que le V_k et permet un courant entrant de potassium comme montré par (Ma et al., 2016). **C :** Le potassium entré dans l'astrocyte dans la zone d'activité neuronale (en B) peut être redistribué au sein du réseau astrocytaire via les jonctions communicantes jusque dans une zone où il n'y a pas d'activité neuronale intense et la $[K^+]_e$ est basse (3 mM). A cet endroit, les conditions sont réunies pour favoriser un courant sortant du potassium qui peut alors sortir dans l'espace extracellulaire via les connexons. Les flèches montrent la direction du potassium. Figure adaptée de (Bellot-Saez, Kekesi, Morley, & Buskila, 2017).

7.5.2.3 Couplage astrocytaire et soutien métabolique

Les astrocytes fournissent aux neurones qui libèrent du glutamate des substrats métaboliques en fonction de leur activité. Ce mécanisme implique la recapture du glutamate couplé au Na^+ dans les astrocytes et l'activation de la Na^+/K^+ ATPase qui déclenche l'absorption du glucose depuis le sang. Par la suite, le cycle glycolytique amène les astrocytes à libérer du lactate. Ce lactate, aussi bien que le glucose, peut être utilisé par les neurones ayant besoin d'énergie (Magistretti, 2006). On appelle ce modèle, le modèle de la navette astrocyte-neurone du lactate (Magistretti & Pellerin, 1999) (Figure 1.28a). Ce modèle considère les astrocytes comme une entité unique et non comme des entités pouvant être connectées. Cependant, le glutamate libéré par les neurones peut générer des vagues métaboliques dans des astrocytes en culture, résultant en l'absorption du glucose via le couplage des astrocytes et permettant une amplification du métabolisme (Bernardinelli, Magistretti, & Chatton, 2004). Ainsi, le couplage astrocytaire permettrait de pouvoir amener des ressources énergétiques sur des lieux d'activités neuronales de manière plus rapide et plus efficace (Figure 1.28b). Le transport du glucose et de ses métabolites, comme le lactate, à travers les jonctions communicantes des réseaux astrocytaires a été démontré en culture (Tabernerero, Giaume, & Medina, 1996), en tranche (Rouach et al., 2008) et *in vivo* (Cruz, Ball, & Dienel, 2007). Dans l'hippocampe, ce transport est augmenté par la libération de glutamate et l'activation des récepteurs neuronaux AMPA mais pas par les transporteurs du glutamate des astrocytes. L'activité synaptique plus que la décharge neuronale semble favoriser ce transport du glucose à travers les réseaux astrocytaires. Ce couplage métabolique a aussi été montré dans le cortex visuel chez le chat (Viswanathan & Freeman, 2007) et le bulbe olfactif chez le rat (Lecoq et al., 2009).

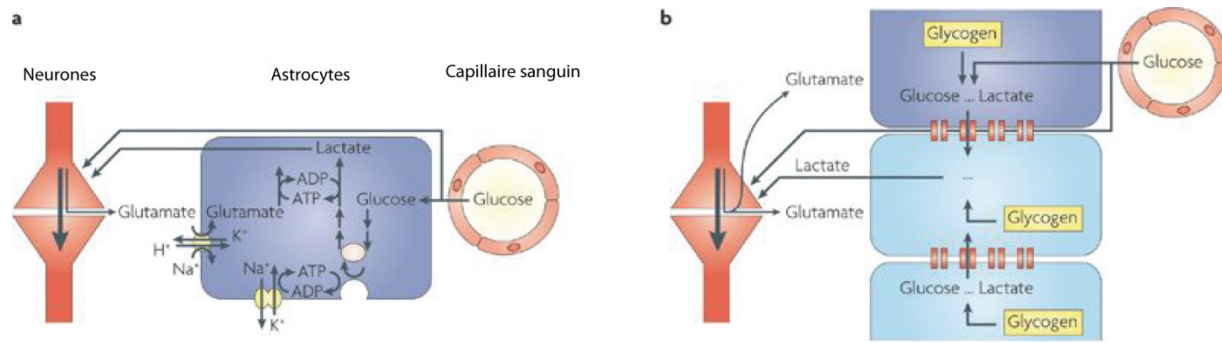


Figure 1.28 : Soutien métabolique des astrocytes et rôle du couplage astrocytaire.

- a) Le modèle classique de la navette astrocyte-neurone du lactate : en plus d'une voie extracellulaire, le glucose est absorbé par les astrocytes en réponse à l'activité neuronale glutaminergique qui inclut une recapture de glutamate par les astrocytes. L'énergie requise pour la recapture du glutamate provient du métabolisme du glucose provoquant une production de lactate qui est ensuite transmis aux neurones.
- b) Contribution du couplage astrocytaire au soutien métabolique. Après l'absorption du glucose par l'astrocyte proche du capillaire sanguin (bleu foncé), ce dernier et ses métabolites peuvent passer à travers les jonctions communicantes vers d'autres astrocytes (en bleu clair) qui sont en contact avec des neurones actifs et donc leur donner des substrats énergétiques. Figure adaptée de (Giaume et al., 2010).

7.5.2.4 Couplage astrocytaire et contrôle du flux sanguin dans le SNC

Les pieds astrocytaires qui englobent les vaisseaux sanguins sont caractérisés par un haut niveau d'expression des connexines (Nagy, Patel, Ochalski, & Stelmack, 1999; Rouach et al., 2008). En conséquence, le couplage astrocytaire est donc favorisé au niveau des vaisseaux sanguins (Rouach et al., 2008). Beaucoup d'évidences relie la signalisation calcique intracellulaire des astrocytes dans la vasodilatation ou la vasoconstriction (Gordon, Mulligan, & MacVicar, 2007; Koehler, Roman, & Harder, 2009). Une augmentation locale de calcium intracellulaire dans un prolongement périvasculaire d'un astrocyte se propage dans tous les autres prolongements mais aussi aux pieds astrocytaires adjacents (Mulligan & MacVicar, 2004). Les connexines et les jonctions communicantes sont connues pour leur implication dans la propagation de la signalisation calcique dans les astrocytes (voir section 5.4.2), il est donc logique de suggérer leur implication dans la régulation du flux sanguin en augmentant le nombre de pieds astrocytaires impliqués dans une réponse calcique (Kuo, Chan-Ling, Wojcikiewicz, & Hill, 2008).

8. Conclusions et hypothèses de travail

La rythmogenèse dans le NVsnpr-D nécessite une coordination entre les neurones pour transmettre une commande motrice aux motoneurones dans le GPC de la mastication. Sachant que cette rythmogenèse repose sur l'activation astrocytaire et que les astrocytes sont généralement couplés entre eux, on peut penser que le couplage astrocytaire joue un rôle important dans la rythmogenèse et sa coordination dans le NVsnpr-D.

Le premier objectif de ce projet est donc d'étudier le couplage astrocytaire dans le NVsnpr-D et de voir si son organisation spatiale reflète l'organisation neuronale du noyau où les neurones rythmogènes sont exclusivement localisés dans la partie dorsale. Pour cela, nous avons mis au point une méthode d'analyse des réseaux astrocytaires pour étudier leur orientation préférentielle au sein du NVsnpr-D chez le rat.

Le 2ème objectif du projet est de déterminer si le couplage astrocytaire joue un rôle dans la rythmogenèse. Pour cela, nous avons utilisé différents moyens pharmacologiques pour bloquer le couplage mais aussi étudier si les stimuli qui induisent le rythme influencent le couplage astrocytaire grâce à des injections de biocytine en patch clamp configuration cellule entière. Nous nous sommes ensuite intéressés au mécanisme de régulation du couplage. De précédentes études démontrant l'importance d'une faible concentration de calcium extracellulaire dans l'étendue du couplage astrocytaire, nous avons étudié le rôle du S100 β (une protéine astrocytaire chélatrice de calcium et impliquée dans la rythmogenèse du NVsnpr-D) dans le couplage.

La suite de cette thèse est divisée en trois parties. Une première partie présente la méthode d'analyse des réseaux astrocytaires développée pour cette étude et faisant l'objet d'une publication dans le *Journal of Visualized Experiments*. La deuxième partie fait état des résultats de nos travaux de recherche publiés dans *Glia*. Enfin, la troisième partie présente une discussion générale.

Chapitre 2 : Article I

Ce chapitre contient le manuscrit de l'article "Analyzing the Size, Shape, and Directionality of Networks of Coupled Astrocytes" par Steven Condamine, Dorly Verdier, Arlette Kolta publié le 4 octobre 2018 dans Journal of Visualized Experiments.

ABSTRACT:

It is increasingly clear that astrocytes modulate neuronal function not only at the synaptic or single cell levels, but also at the network level. Astrocytes are strongly connected to each other through gap junctions and coupling through these junctions is dynamic and highly regulated. An emerging concept is that astrocytic functions are specialized and adapted to the function of the neuronal circuit to which they are associated. Therefore, methods to measure various parameters of astrocytic networks are needed to better describe the rules governing their communication and coupling and eventually better understand their function.

Here, using the image analysis software (e.g. ImageJ/FIJI), we describe a method to analyze confocal images of astrocytic networks revealed by dye-coupling. These methods allow for: 1) an automated and unbiased detection of labeled cells; 2) calculation of the size of the network; 3) computation of the preferential orientation of dye spread within the network and 4) repositioning of the network within the area of interest.

This analysis can be used to characterize astrocytic networks of a particular area; compare networks of different areas associated to different functions; or compare networks obtained under different conditions having different effects on coupling. These observations may lead to important functional considerations. For instance, in this paper we analyze the astrocytic networks of a trigeminal nucleus where we have previously shown that astrocytic coupling is essential for the ability of neurons to switch their firing pattern from tonic to rhythmic bursting¹. By measuring the size, confinement and preferential orientation of astrocytic networks in this nucleus we can build hypotheses about functional domains that they

circumscribe. A number of studies suggest that several other brain areas, including the barrel cortex, the lateral superior olive, the olfactory glomeruli, sensory nuclei in the thalamus or the visual cortex, to name a few, could benefit from a similar analysis.

INTRODUCTION:

Many studies have described how neuron-astrocyte dialogue at the sub-cellular or synaptic level can have implications in neuronal functions and synaptic transmission. It is well established that astrocytes are sensitive to the surrounding neuronal activity; they have receptors for many neurotransmitters including glutamate, GABA, acetylcholine and ATP (see previously published review^{2,3,4}). In return, astrocytic processes ensheath synaptic elements and influence neuronal activity there and at extrasynaptic sites as well by regulating extracellular ionic homeostasis and by releasing a number of factors or transmitters such as glutamate, D-serine, ATP, etc.⁵⁻⁷

The idea that astrocytes could also modulate neuronal function at the network level has emerged with evidence that astrocytic coupling is spatially regulated and corresponds to neuronal segmentation in areas characterized by a clear anatomical compartmentalization like areas with sensory representations, indicating that astrocytes will couple to other astrocytes serving the same function rather than just those that are close by. In the lateral superior olive, for instance, most astrocytic networks were oriented orthogonally to the tonotopic axis⁸, whereas in the barrel cortex or the olfactory glomeruli communication between astrocytes is much stronger within barrels or within glomeruli and much weaker between adjacent ones^{9,10}. In both cases, the astrocytic networks are oriented towards the center of the glomerule or of barrel^{9,10}.

We recently showed that astrocytic activity modulates neuronal firing by decreasing the concentration of extracellular Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_e$) presumably through the release of S100 β , a Ca^{2+} -binding protein¹¹. This effect, which was demonstrated in a population of trigeminal rhythmogenic neurons in the dorsal part of the trigeminal main sensory nucleus (NVsnpr thought to play an important role in the generation of masticatory movements), results from

the fact that rhythmic firing in these neurons depends on a persistent Na^+ current that is promoted by decreases of $[\text{Ca}^{2+}]_e$ ^{11,12}. Rhythmic firing in these neurons can be elicited “physiologically” by stimulation of their inputs or by artificial decrease of $[\text{Ca}^{2+}]_e$. We further showed that astrocytic coupling was required for neuronal rhythmic firing¹. This raised the possibility that astrocytic networks could form circumscribed functional domains where neuronal activity can be synchronized and coordinated. To assess this hypothesis, we first needed to develop a method to rigorously document organization of these networks within NVsnpr.

Previous studies on astrocytic networks have mostly described the extent of coupling in terms of cells number and density and area covered. Attempts to evaluate the shape of astrocytic networks and the direction of (dye) coupling were done mostly by comparing the size of networks along two axes (x and y) in the barrel cortex⁹, the hippocampus¹³⁻¹⁵, the barreloid fields of the thalamus¹⁶, the lateral superior olive⁸, the olfactory glomeruli¹⁰, and the cortex¹⁴. The methods described here enable unbiased counts of labeled cells in a network and estimation of the area they cover. We also developed tools to define the preferred orientation of coupling within a network, and to assess whether this preferred orientation is towards the center of the nucleus or in a different direction. In comparison to previously used methods, this protocol provides a mean to describe the organization and orientation of astrocytic networks in structures like the dorsal trigeminal main sensory nucleus that do not have a known clear anatomical compartmentalization. In the above studies, the networks orientation is described in a relationship to the shape of the structure itself which is already documented (e.g., the barreloid in the thalamus, the barrels in the cortex, the layers in the hippocampus and cortex, the glomeruli in the olfactory bulb...etc). In addition, vectorial analysis allows for comparisons of coupling orientation revealed under different conditions. To analyze whether these parameters changed according to the position of the network within the nucleus, we also developed a method to replace each network in reference to the boundaries of the nucleus. These tools can be easily adapted to other areas to investigate networks of coupled cells.

PROTOCOL:

All procedures abode by the Canadian Institutes of Health Research rules and were approved by the University of Montreal Animal Care and Use Committee.

1. Preparation of rat brain slices

1.1 Prepare 1L of a sucrose-based solution (Table 2.1) and 1L of standard artificial cerebral-spinal fluid (aCSF) (Table 2.2).

Table 2.1 Composition of the sucrose-based solution used for brain slicing.

(*) = pH and osmolarity were adjusted to 7.3-7.4 and 300-320 mosmol/kg, respectively.

| sucrose-aCSF* | mMol |
|---------------------------------|-------------|
| Sucrose | 219 |
| KCl | 3 |
| KH ₂ PO ₄ | 1,25 |
| MgSO ₄ | 4 |
| NaHCO ₃ | 26 |
| Dextrose | 10 |
| CaCl ₂ | 0,2 |

Table 2.2: Composition of the aCSF solution used for slice storage and whole-cell recording.

(*) = pH and osmolarity were adjusted to 7.3-7.4 and 290-300 mosmol/kg, respectively.

| aCSF* | mMol |
|---------------------------------|-------------|
| NaCl | 124 |
| KCL | 3 |
| KH ₂ PO ₄ | 1,25 |
| MgSO ₄ | 1,3 |
| NaHCO ₃ | 26 |
| Dextrose | 10 |
| CaCl ₂ | 1,6 |

1.2 Bubble the sucrose-based solution with a mix of 95% O₂ and 5% CO₂ (carbogen) for 30 min before placing it in -80 °C for about 30 min until the solution is cold but not entirely frozen. Use this ice-cold sucrose as the cutting buffer for the slicing of the brain. Keep it on ice, once removed from the freezer.

1.3 Bubble the aCSF with carbogen the entire experiment. Use this solution for slice storage and as the perfusing buffer in which the patch-clamping and biocytin-filling of astrocytes will be performed. Prepare a slice recovery holding chamber to deposit the brain slices as soon as they are cut.

Note: The slice recovery holding chamber could be custom-made and consists essentially in a small well with a mesh at the bottom suspended in a larger well filled with aCSF in which a tube is inserted to bring carbogen from the bottom.

1.4 Use 15 to 21-day old Sprague-Dawley rats without any sex strain specific bias. Anesthetize the animal with isoflurane (1 ml isoflurane in an anesthesia induction chamber) Check the depth of anesthesia by gently pinching the hind paw or the tail of the animal.

1.5 Decapitate the rat using a guillotine, cut its skull with scissors, and quickly remove the brain from the cranium with a flat spatula.

1.6 Dip the brain in the ice-cold sucrose-based solution for about 30 s and transfer it (with the solution) in a petri dish. With a razor blade remove the portions that are anterior and posterior to the area to be sectioned, if cutting slices in the transverse plane.

1.7 Glue the remaining block of brain tissue on its rostral side and proceed to cutting brain slices (350 μm thick) in the sucrose-based medium using a vibratome. Then, transfer the collected slices in a recovery holding chamber filled with carbogenated aCSF at room

temperature (RT) until they are ready to be used (allow at least 1 hour for recovery).

Note: Recent development in the field allow prolonged incubation, up to 24h, of brain slices in *in vitro* conditions¹⁷.

2. Sulforhodamine 101 (SR-101) labeling of astrocytes

2.1 Pre-heat a water bath to 34 °C and place two slice incubation chambers in it. Fill one of the slice incubation chambers with a solution of aCSF containing 1 μM of SR-101 and the other only with aCSF.

2.2 Incubate the slices in the incubation chamber containing 1 μM of SR-101 for 20 min and then transfer them into the second incubation chamber to rinse out the excess of SR-101 from the tissue. Let it incubate for 20 min or more at 34°C and then keep the incubation chamber containing the slices at RT until they are needed¹⁸.

3. Astrocytes patching and biocytin filling

3.1 Select a slice and place it in the recording chamber of the microscope. To patch astrocytes, use electrodes with resistance of 4-6MΩ when filled with a potassium-gluconate based solution (see Table 2.3).

Table 2.3 Composition of the internal solution used for whole-cell recording.

(*) = pH and osmolarity were adjusted to 7.2-7.3 and 280-300 mosmol/kg respectively.

| Internal patch solution * | mMol |
|----------------------------------|-------------|
| K-gluconate | 140 |
| NaCl | 5 |
| HEPES | 10 |
| EGTA | 0,5 |
| Tris ATP salt | 2 |
| Tris GTP salt | 0,4 |

3.2 Under visual guidance and using a micromanipulator, direct the recording electrode towards an SR-101-labeled astrocyte as in Figure 2.1. Avoid cells located at the surface of the slice since they are more likely to be damaged or to have lost their connections to neighboring cells.

3.3 To prevent leakage of biocytin in the tissue, minimize the positive pressure added to the patch pipette and apply it only when close to the astrocyte to be patched (0.1 to 0.4 ml in a syringe of 1 ml).

3.4 Prior to patch, adjust the offset of the pipette and its capacitance. Correct for liquid junction potentials as accurate and precise voltage commands are critical to the experiments¹⁹.

3.5 Move the pipette close enough of the astrocyte to observe the depression caused by the positive pressure. Then, remove the positive pressure and slowly apply some negative pressure. Clamp the astrocyte to -70mV when the seal reaches 100 M Ω . Wait until the seal reaches 1-3 G Ω . Continue to apply negative pressure until breaking into the cell. Be careful while applying negative pressure since astrocytes are very fragile.

3.6 Assess the electrophysiological properties of the patched cell. In voltage-clamp mode, perform a whole-cell current-voltage protocol with a ramp voltage command of 600 ms duration ranging from -120 to +110 mV. In current-clamp mode, perform a step IV protocol in which the injection of 1000 ms current steps of 100 pA from -1 to 1 nA, the sampling rate of the whole-cell recordings is 10 kHz.

Note: Astrocytes show a linear current-voltage profile without any kind of rectification (as shown in Figure 2.1B) and no action potential firing upon membrane depolarization (Figure 2.1C). The resting membrane potential (RMP) should be stable and not positive to -60mV. In

some brain areas, the RMP of astrocytes is more hyperpolarized than in the NVsnpr.

3.7 Allow the biocytin to diffuse within the astrocyte for 30 min while performing a step IV protocol every 5 min.

3.8 Retract and detach the patch pipette carefully without damaging the patched astrocyte and immediately take note of the offset of the pipette before taking it out of the recording chamber. Subtract that value from the membrane potential recordings.

3.9 Leave the brain slice to rest in the recording chamber for a minimum of 15 min (in addition to the 30 min for injection) to allow spreading of the tracer from the patched astrocyte to the entire network of coupled cells.

Note: To reveal a network of coupled cells, only a single cell should be patched in the nucleus of interest. If multiple attempts are required in order to achieve a successful patch, discard the case and try to patch on the contralateral side or in another brain slice.

3.10 Make a mark or an incision in the tissue to identify which side of the slice was up and transfer the slice first to a petri dish containing normal aCSF and then in a solution of 4% paraformaldehyde (PFA). Incubate at 4°C overnight.

CAUTION: PFA is extremely harmful. Use protective equipment in a ventilated hood. Ensure that all material (brush, tube...etc) that has been in contact with PFA does not get in contact with the recovery holding chamber, the incubation chamber or other material used for recording from fresh tissue.

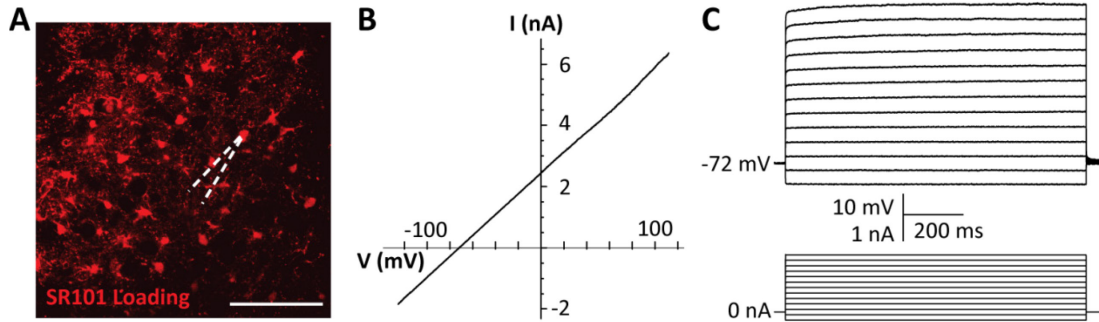


Figure 2.1: Whole-cell patch-clamp of astrocyte (adapted from Condamine et al., 2017).

A: Astrocytes labeled with a loading of the specific marker sulforhodamine 101 (SR-101) in NVsnpr. An SR-101-labeled astrocyte soma is targeted with the patch pipette (white dashed line). Scale bar = 100 μm . **B:** A depolarizing ramp protocol is performed in voltage clamp (from -120 to 110mV) to assess the astrocyte passive characteristics. **C:** Assessment of the lack of action potential firing in the astrocyte by injection of current pulses in current-clamp mode.

4. Biocytin revelation

4.1 Revelation with fluorescent streptavidine

4.1.1 Wash the brain slices 2 x 10 min in 0.1 M phosphate buffer saline (PBS) at RT. Then, reveal the biocytin by incubating the brain slices with Streptavidine conjugated to a fluorophore at 1/200 in PBS-non-ionic detergent 0.4% for 4 h at RT.

4.1.2 Wash the brain slices 3 x 10 min in 0.1M PBS at RT and mount the sections on glass slides using an aqueous mounting medium. Place the side that was injected upwards, cover-slip the slides and seal with nail-varnish.

4.2 Revelation with DAB

Note: DAB (3,3-Diaminobenzidine) revelation can be used when fluorescence cannot be used. In this case, only one revelation method should be employed for making comparisons

4.2.1 Wash the brain slices 3 x 10 min in PBS at RT. Incubate the slices in PBS + H_2O_2 0.5% for 1 hour at RT.

4.2.2 Rinse the slices 3 x 10 min in PBS at RT. Then, incubate the slices in an avidin-biotin

complex staining solution composed of PBS-non-ionic detergent 0.1% + avidin-biotin complex peroxidase standard staining kit reagents at 1/100 for 24 hours at RT.

4.2.3 Rinse the slices 3 x 10 min in PBS at RT, incubate them in a solution of PBS + DAB 0.05% for 20 min at RT and transfer them in a solution of PBS + DAB 0.05% + H₂O₂ 0.5%.

CAUTION: DAB is extremely harmful. Use protective equipment in a ventilated hood. The color reaction is stopped when the slices are transferred in PBS.

4.2.4 Rinse the slices 5 x 10 min in PBS at RT, mount the sections on glass slides (place the side that was injected upwards) and let them dry on a slide drying bench overnight at 34°C.

4.2.5 Submerge the glass slides 1 min in several alcohol baths at 70%, 95% and 100% and end with a bath of Xylene for 1 min.

4.2.6 Mount the glass slides using a toluene-based synthetic resin mounting medium. Place coverslips the slides and seal with nail-varnish.

5. Network imaging

5.1 Visualize the astrocytic networks using a scanning confocal microscope equipped with a 20X and a 4X objective (or an appropriate objective to visualize the entire nucleus where the network is located) and a laser to detect the fluorophore used (in this case Alexa-594 is used).

5.2 Use the 20X magnification to make a z-stack of the network of labeled cells. Use a resolution of 800 by 800 pixels and a scan speed of 12.5µs/pixel

Note: In order to image the whole network, multiple stacks are usually required and the number of stacks needs to be adjusted for each network. The resolution and the scan speed could be changed but make sure to use the same settings to image all data.

5.3 Use the 4X magnification to take an image of the network and of the region of interest

Note: The 4X imaging is used to determine the network position within the nucleus of interest. Always image the same field in transmitted light. This image will be useful if you cannot determine the border of the nucleus in the confocal fluorescent image.

6. Image analysis

6.1 Data preparation

6.1.1 Use the software ImageFIJI (Download it at <https://fiji.sc/>). Open the file and click OK in the “Bio-Formats Import Options” window.

6.1.2 To redefine a z-stack that will contain only the optical slices you want to keep for your final z-stack (Figure 2.2A), click on the Stack knob in the toolbar (stk->Z Project). Select “Max Intensity” in the projection type settings (Figure 2.2A). Save the file and name it “stack file”.

6.1.3 If the imaging file contains several channels split it to conserve only the channel with the astrocytic network imaging (Image->Color->Split Channels).

6.1.4 Check pixel settings of the image (Image->Properties: choose "Pixel" with "1" for pixel dimension).

6.1.5 Use the Subtract Background tool (Process->Subtract Background) to remove the background of biocytin labelling. Use the Preview function to set the Rolling Ball Radius which is generally set at 50 pixels (Figure 2.2B).

6.1.6 Use the Remove Outliers tool (Process->Noise->Remove Outliers) if it is required following the Subtract Background step. Select “Bright” in the “Which Outliers” setting (Figure 2C). Use the Preview function to set the Radius and the Threshold. Be careful with

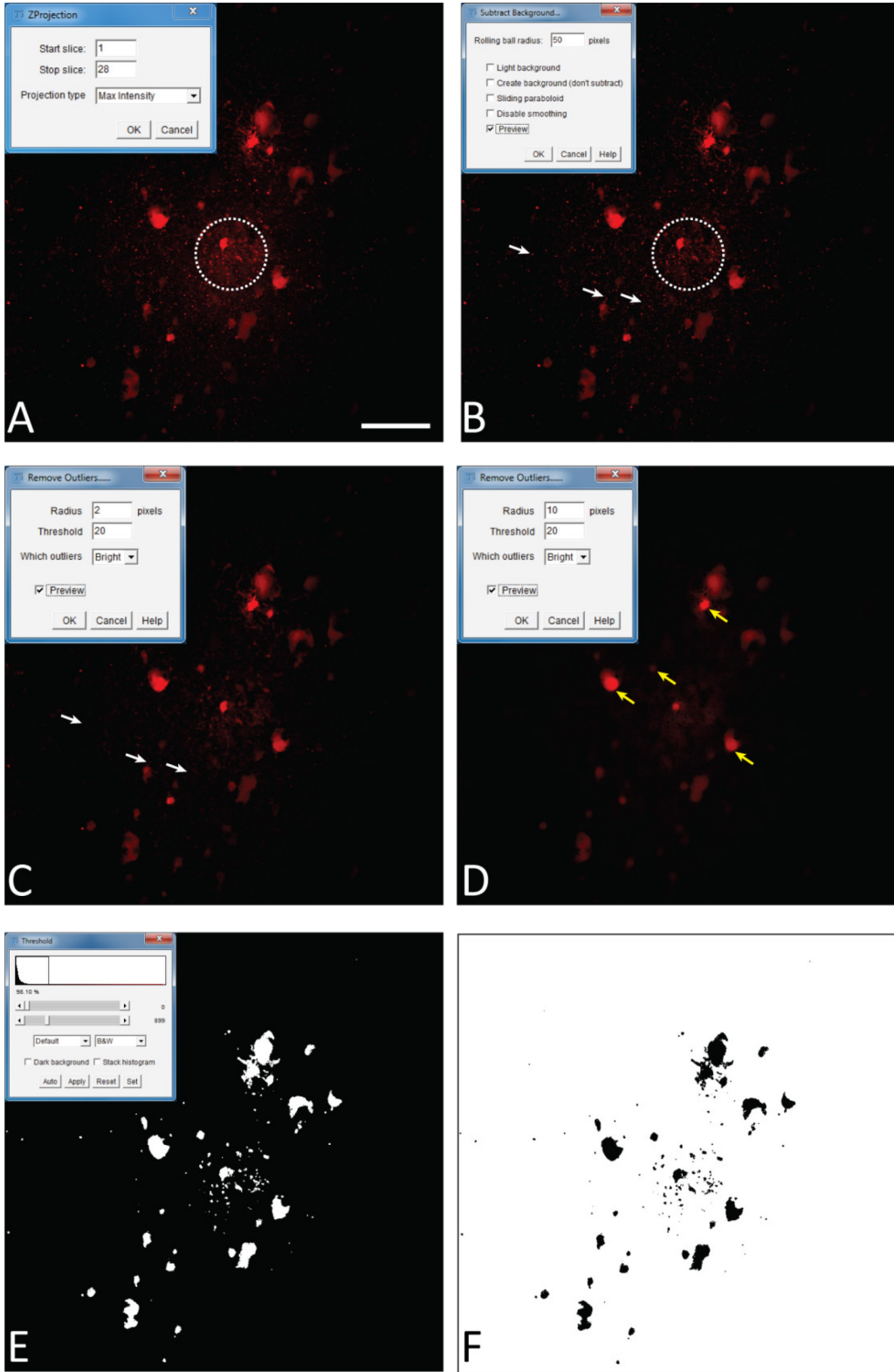
this tool as it may blur the data as shown in Figure 2.2D.

Note: This tool removes the small spots caused by unspecific deposits of streptavidine (see white arrows in Figure 2.2B and Figure 2.2C, before and after the treatment, respectively).

6.1.7 Adjust the Threshold with (Image->Adjust->Threshold). Select “Default” and “B&W” mode (Figure 2.2E). Click on Apply.

Note: Auto adjusting could be used; but manual adjusting with the two slider bars is preferred. The aim of this step is to reduce noise to the maximum without losing any labeled cell.

6.1.8 Convert the image into a binary image with the Binary Process tool (Process->Binary->Make Binary) as shown in Figure 2.2F. Save the file as a TIFF file and name it “binary file”.



(Légende sur la page suivante)

Figure 2.2 Treatment and analysis of imaged astrocytic networks with ImageJ/FIJI software (page précédente).

A: Z-Stack creation from the confocal imaging of an astrocytic network. At the top-left, Z-stack window in ImageJ/FIJI. **B:** Background subtraction process. At the top-left, Subtract background window in ImageJ/FIJI. The dotted circle emphasizes the area on the image where the effect of the subtract background command is the more obvious when compared to the image in A. **C:** Remove outliers process. This process removes the small spots due to unspecific deposits of streptavidine coupled to an Alexa 594. The white arrows show the deposit prior to (in B) and after the command has been processed (in C). In the top-left, remove outliers window in ImageJ/FIJI. **D:** Example of the blurring effect that could be produced by an inadequate adjustment of the remove outliers parameters. Yellow arrows show some blurred cells. **E:** Adjust threshold process. At the top-left, adjust threshold window in ImageJ/FIJI. The scroll bars act on the threshold signal adjustment. **F:** Make binary step. The image is converted into a binary file in ImageJ/FIJI. Scale bar = 100 μm .

6.2 Cells Counting

6.2.1 Check the setting of the Measure function (Analyze->Set measurement). Select the “Centroid” option.

6.2.2 Use the “Analyze Particles” tool on the “binary file” (Figure 2.3A) produced in the previous step (Analyze->Analyze Particle) (Figure 3C at the left part). Select “Outlines” in the setting “Show” (Figure 2.3C). It generates a new file that shows the result of the detection (Figure 2.3B).

6.2.3 Play with the parameters: Size (to detect only cells, use values between 30 and 6000) and Circularity (determine an interval between 0 to 1, 1 defines a perfect circle, 0 a random shape) to refine the detection (Figure 2.3C, left portion). Run the detection by clicking on OK.

Note: Two tables appear following the detection: 1) a table titled “Summary” that provides the number of detected cells and 2) a table titled “Results” (Figure 2.3C, right portion) that provides the coordinates (X and Y) of each cell.

6.2.4 Copy the values and paste them in a spreadsheet application. Save this table under the name “detection table”. A file with a plot of detected cells also appears (Figure 2.3B). Save this file as a TIFF file under the name “detection file”.

6.2.5 If a group of 2 or more labeled cells in the network are detected as a single cell with the Analyze Particles tool, because they are too close to each other, use the Watershed tool (Process->Binary->Watershed) **on the binary image** before applying the Analyze Particles tool, and redo the Analyze Particles steps.

Note: The Watershed tool creates a delimitation of 1 pixel wide between extremely close cells. A cell counter pluggin can be used when labeling is unequivocal and can be conducted manually.

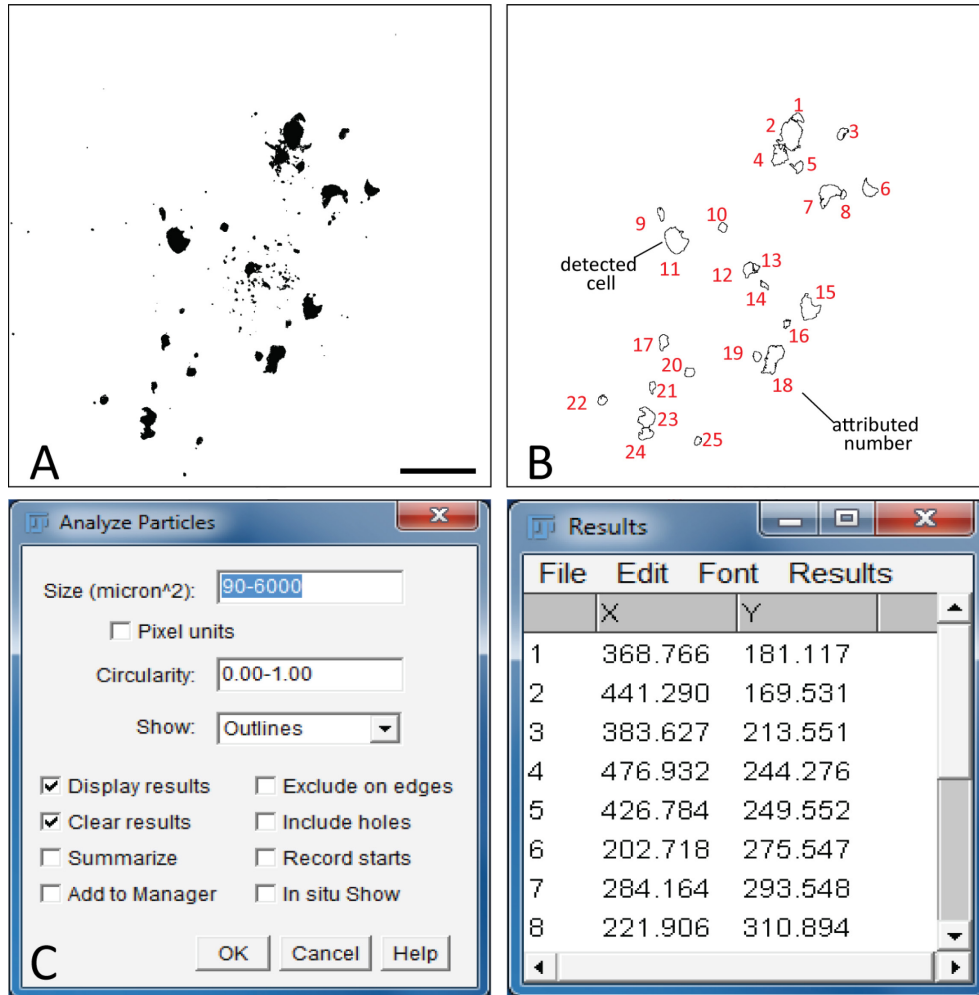


Figure 2.3: Detection of cells in astrocytic networks with ImageJ software.

A: Example of a binary image of an astrocytic network obtained in ImageJ. Scale bar = 100 μm . **B:** Analyze particles window in ImageJ. This function detects the cells of the network in the binary image. The size of the detected cells and their circularity can be adjusted. Numbers to be used should be set by trial and error until a satisfactory result is obtained. **C:** Illustrates the “detection file” obtained after applying the analyze particles process on the binary file. The shapes correspond to all the detected cells with their associated number in red. **D:** Detection table generated by the analyze particles process. X and Y columns list the coordinates of each cell detected in the image.

6.3 Measuring astrocytic network area

6.3.1 To measure the surface area of the networks, use the detection file using Image J.

6.3.2 Use the Polygon Selection tool (left click on the button in the tool bar to select it) to trace a polygon that connects all the cells located in the external periphery of the network

(Figure 4A). Left click to begin to trace the polygon, right click to close it.

Note: This polygon will be defined as a region of interest (ROI) and its surface measured to determine the surface area of the network.

6.3.3 Open the Set Measurement window (Analyze-> Set Measurement) and select the “Area” option. Open the ROI Manager (Analyze-> Tools-> ROI Manager) (Figure 2.4B). Then, add the traced polygon in the ROI Manager by clicking “Add” (Figure 2.4B) and run the measurement clicking “Measure” in the ROI Manager.

Note: The area measurement will appear in a table and will be expressed in pixels. Do not forget to convert this value with the conversion factor for the microscope used for imaging to obtain a value in μm^2 .

6.4 Determination of the main direction vector

6.4.1 Determination of the patched cell

6.4.1.1 Open the stack file in ImageJ/FIJI and identify the patched cell in the stack file by its stronger labeling intensity (Figure 2.4C). Then, open the file named “detection table” in a spreadsheet application and find the number associated to the patched cell and its corresponding coordinates.

6.4.1.2 If unable to accurately determine the patched cell, surround the area where the deposit of biocytin is denser in the imaged network of coupled cells using the Polygon tool in ImageJ/FIJI and refer to this position as being that of the patched cell (Figure 2.4D).

6.4.1.3 Use the ROI Manager (Analyze->Tools->ROI Manager). Then, draw a ROI at the patched cell location and add it to the ROI Manager (see figure 2.4B).

6.4.1.4 Set measurement (Analyze->Set Measurement) and select the Centroid option.

6.4.1.5 In the ROI Manager, click on Measure to obtain the coordinates of the centroid of the traced area. Use these coordinates as the reference point for this specific network.

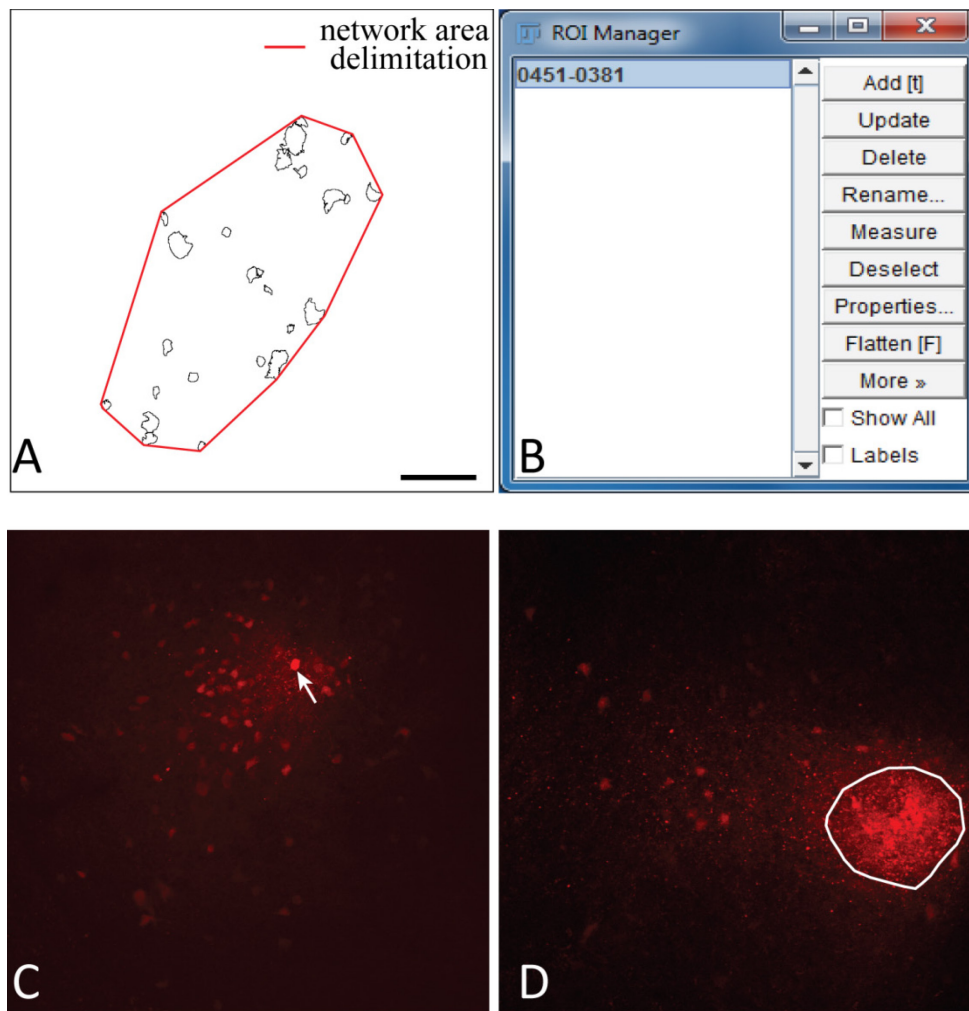


Figure 2.4: Network area analysis and determination of the patched cell in ImageJ/FIJI software.

A: Using the polygon tool in ImageJ/FIJI, an ROI is traced around the cluster of detected cells (red line) that will be used to determine the surface area of the network. **B:** The ROI is added in the ROI Manager. **C:** Example of an astrocytic network in which the patched cell (white arrow) is easily identifiable because of the striking intensity of its biocytin labeling. **D:** Example of an astrocytic network where the patched cell could not be identified, but where an area of denser labeling clearly indicates biocytin deposits. An ROI is drawn around this area and added to the ROI manager. Its centroid is computed and considered as the position of the patched cell to use for the vectorial analysis. Scale bar = 100 μm .

6.4.2 Referential translation

6.4.2.1 Calculate the coordinates of each cell in reference to the patched astrocyte by using the following formula:

$$(x', y') = (x - x_0, y - y_0)$$

With: (x, y) as the coordinates for a given cell; (x_0, y_0) as the coordinates of the patched cell (or the referential point of the network) and (x', y') as the coordinates for a given cell in the new referential.

Note: Expressing the coordinates of each cell in reference of the patched astrocyte is an important step to calculate vectors from the patched astrocyte. Be careful when using ImageJFIJI the referential for any image is located in the top-left corner of the image

6.4.3 Determination of the main vector of preferential orientation

6.4.3.1 Calculate the coordinates of the main vector of preferential orientation with the following formula:

$$(x_p, y_p) = (x'_1 + x'_2 + x'_3 + \dots, y'_1 + y'_2 + y'_3 + \dots)$$

With: (x_p, y_p) as the coordinates of the main vector of preferential orientation and $(x'_1, y'_1); (x'_2, y'_2); \dots$ as the coordinates of each cell of the network obtained with the patched cell as referential.

Note: For each cell in the network, a vector is determined relatively to the coordinates of the patched astrocyte. The main vector of preferential orientation of the network is the sum of all of these vectors.

6.4.3.2 Divide the length of the main vector (provided by the coordinates obtained by using the above formula) by the number of cells in the network minus one (since the coordinates of the patched cell are not included) to normalize the values and enable comparisons between networks. A schematic view of this analysis is presented in figure 2.5.

6.4 Placement of analyzed network in the nucleus of interest

6.5.1 Alignment of the 20X and the 4X images

6.5.1.1 To determine the position of each network in the nucleus of interest (NVsnpr here), use the 4X image. Open the 4X image with a vector image editor.

6.5.1.2 Select the 4X image and modify its size by multiplying it per 5. The Dimension window is in the right part of the top horizontal tool bar. For instance: for a 4X image that has been sampled at 800 * 800 pixels, change the sampling resolution to 4000*4000 pixels (to set the working unit in pixels, go to Document Setup under the file tab: File->Document Setup). Export the file in TIFF format and name it resized 4X.

6.5.1.3 Align the left top corner of the image with the left-bottom corner of the Adobe Illustrator document.

Note: The software provides coordinates from a left-bottom corner referential point.

6.5.1.4 Open the 20X image of the network. Use the "binary file" or the "detection file" because it's easier to align. Then, play with the Opacity tool on the "binary file" of the 20X image to align it on the re-sized 4X image.

Note: The Opacity tool is in the top horizontal tool bar.

6.5.1.5 When the alignment is done, select and hold the Pipette tool to see the Measure tool and select it in the left toolbar.

6.5.1.6 Use the Measure tool to click on the left-top corner of the 20X image to get the coordinates of the 20X referential point in the re-sized 4X image.

Note: These coordinates which are referred as the 20X referential (20XR in Figure 2.5) will be useful to express the position of each network on a schematic drawing of the nucleus.

6.5.2 Normalization of the nucleus of interest

Note: To sum up the data, a normalization of the nucleus (NVsnpr) as a rectangle is used. The steps are described below.

6.5.2.1 Open the 4X resized file in ImageJ/FIJI, and use the Polygon tool to surround the nucleus (NVsnpr). Use the image with transmitted light if the borders of the nucleus are not able to be seen; in which case, remember to resize it first.

6.5.2.2 Open the ROI Manager and add the drawn ROI. In Set Measurement, select the ‘‘Bounding Rectangle’’ option.

Note: The Bounding Rectangle option calculates the tiniest rectangle within the drawn nucleus.

6.5.2.3 Click ‘‘Measure’’.

Note: A table appears with BX and BY, the coordinates of the top left corner of the rectangle: ‘‘Rectangle Position’’ and provides its width and height. BX and BY are the coordinates of the Bounding Rectangle referential to which we will refer as x_{BR} and y_{BR} .

6.5.3 Expression of each network position in the normalized nucleus

6.5.3.1 Express the coordinates of each cell with the 4X referential (black square in Figure 2.5) using this formula:

$$(x_{4X}, y_{4X}) = (x_{20X} + x_{20XR}, y_{20X} + y_{20XR})$$

Where: (x_{4X}, y_{4X}) are the cells coordinates with the 4X referential; (x_{20X}, y_{20X}) are the cells coordinates with the 20X referential (orange square in Figure 2.5) and (x_{20XR}, y_{20XR}) are the coordinates of the 20X referential point in the 4X image (20XR).

6.5.3.2 Express the cell coordinates in the Bounding Rectangle referential (blue in Figure 2.5): using this formula:

$$(x_R, y_R) = (x_{4X} - x_{BR}, y_{4X} - y_{BR})$$

Where (x_R, y_R) are the cells coordinates in the Bounding Rectangle referential; (x_{4X}, y_{4X}) are the cells coordinates in the 4X referential and (x_{BR}, y_{BR}) are the coordinates of the Bounding Rectangle referential in the 4X image

6.5.3.3 Transform the cells coordinates in the Bounding Rectangle referential to percentage of width and height of the Bounding Rectangle using this formula:

$$(x_{\%}, y_{\%}) = \left(\frac{x_R}{w} \times 100, \frac{y_R}{h} \times 100 \right)$$

Where $(x_{\%}, y_{\%})$ are the cells coordinates in percentage of the width and height of the Bounding Rectangle; (x_R, y_R) are the cells coordinates in the Bounding Rectangle referential; w is the width of the Bounding Rectangle measured above in the protocol and h is the height of the Bounding Rectangle measured above in the protocol

6.5.3.4 To represent all the networks on the same figure, take into account the orientation of the slice (left side or right side). To standardize the data, the referential is applied on the left side of the slice. Transfer network coordinates of the right side to the left side by applying this formula only to x coordinates:

$$x_L = 100 - x_R$$

Where x_R is the x coordinates on the right side of the slice and x_L is the new x coordinate expressed in the referential on the left side of the slice.

Note: Alternatively, mirror the picture in ImageJ/FIJI before the analysis (Image ->Transform->Flip Horizontally).

6.5.3.5 To express the coordinates of the main vector of preferential orientation follow the same steps than with the cells coordinates (steps 6.5.3.1 to 6.5.3.4).

Note: The expression of the coordinates in percentage allows a compilation of the data in a single plot in which the nucleus (NVsnpr) is designed as a rectangle.

6.6 Study of the angular difference of the main vector of preferential direction

Note: The angular difference of an astrocytic network is used to determine whether its preferential orientation is towards the center of the nucleus of interest. To calculate the angular difference (α in Figure 5), which is the angle between the main vector of preferential direction of the network (PD, red line, Figure 5) and the line connecting P to C, apply the Al-Kashi theorem into the triangle PDC (see inset of Figure 5 and the Supplementary Methods).

6.6.1 First, calculate the different lengths using the application of the Pythagorean Theorem into a Cartesian referential using the following equation:

$$d = \sqrt{(x_p - x_c)^2 + (y_p - y_c)^2}$$

Where the coordinates of P and C are (x_p, y_p) and (x_c, y_c) , respectively in the Bounding Rectangle referential (calculated above).

6.6.2 Determine the angular difference in radians with the following formula:

$$\alpha = \cos^{-1}\left(d^2 + p^2 - \frac{c^2}{2cd}\right)$$

6.6.3 Convert the angular difference in degree (for example with the DEGREES function in excel software).

6.6.4 Compile all the angular differences by plotting them in vertical bar charts (Fig 2.7C-D) and determine if there is a preferential orientation of astrocytic networks.

SUPPLEMENTARY METHODS

The angular difference of an astrocytic network is used to determine whether its preferential orientation is towards the center of the nucleus of interest. For each network a straight line (black line in Figure 5) was drawn from the patched astrocyte (P, black dot in Figure 5) to the center of the theoretical nucleus of interest. In this case, as only the dorsal half of NVsnpr is of interest, the center was defined as the intersection of a line from the 50% lateromedial axis and a line from 25% dorsoventral axis of the bounding rectangle (C, blue dot Figure 5). The angular difference (α , Figure 5) is the angle between the main vector of preferential direction of the network (PD, red line, Figure 5) and the line connecting P to C. To calculate the angular difference, use the Al-Kashi theorem into the triangle PDC (inset of Figure 5). This theorem gives the following equation:

$$d^2 = c^2 + p^2 - 2cp \cos \alpha$$

Where d is the length of [PC], c is the length of [PD] and p the length of [DC].

To calculate the angular difference, the Al-Kashi theorem was used with the following equation:

$$\alpha = \cos^{-1}\left(d^2 + p^2 - \frac{c^2}{2cd}\right)$$

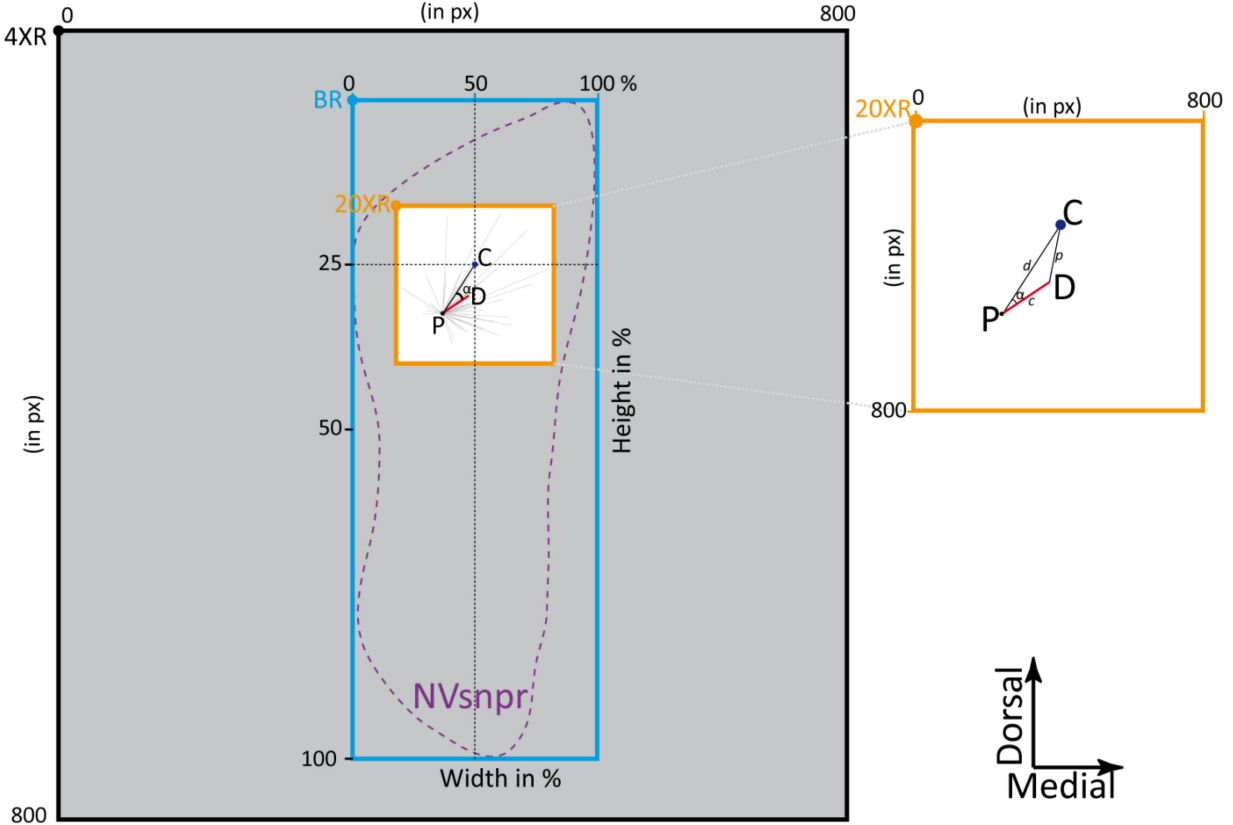


Figure 2.5: Diagram of the different referentials used for astrocytic networks analysis. The grey square is the 4X image with the referential point 4XR to be aligned with the left bottom corner of the Adobe Illustrator document. The white square surrounded in orange is the 20X image with the referential point 20XR. Both images are aligned on each other like described in the protocol. The bounding rectangle (in blue) defines NVsnpr (in purple dashed line) and scaled in percentage with his referential point (BR). The theoretical center of the dorsal part of NVsnpr is schematized by the dark blue dot (C). The astrocytic network is schematized by the patched cell (black dot, P) and the main vector of the preferential direction (Red line). Each dashed black line is the vector of each cell of the astrocytic network. The angular difference of the astrocytic network (α) is the angle between the main preferential orientation of the network (red line) and the black line which connects the patched astrocyte to the theoretical center of the nucleus. Inset is a zoom of the 20X image showing the triangle PCD formed by the theoretical center of the NVsnpr (C), the patched cell and the main vector of preferential direction (D).

REPRESENTATIVE RESULTS:

Coupling between cells in the brain is not static but rather dynamically regulated by many factors. The methods described above were developed to analyze astrocytic networks revealed under different conditions and understand their organization in NVsnpr. These results have been already published in Condamine *et al.*¹. We performed biocytin filling of single astrocytes in the dorsal part of the NVsnpr in three different conditions: at rest (in control conditions in absence of any stimulation), in Ca^{2+} -free conditions, and following electrical stimulation of sensory fibers that project to the nucleus. The experimental settings for biocytin filling of astrocytes for each condition are illustrated in the left part of Figure 2.6A-C.

Networks of biocytin labeled cells could be observed in control conditions and attest of a basal state of cell coupling between NVsnpr astrocytes at rest. In eleven tested cases, biocytin diffusion showed networks composed of 11 ± 3 cells (Figure 2.6A-middle panel and Fig 2.6D) extending over an area of $34737 \pm 13254 \mu\text{m}^2$ (Figure 2.6E). Carbenoxolone (CBX, 20 μM), a non-specific blocker of gap junctions, was used in an independent set of experiments to insure that the labeling observed labeling was a result of biocytin diffusion through gap junctions and not uptake by the cells of biocytin, which could leak into the extracellular space from the positive pressure applied to the patch pipette prior to patching. Bath application of CBX reduced the number of labeled cells to 2 ± 0.5 cells (Figure 2.6A right panel and Figure 2.6D; Iman-Conover method, $P=0.016$, Holm-Sidak test, $P=0.010$) and the area of biocytin spread to $2297 \pm 1726 \mu\text{m}^2$ (Figure 6E; Iman-Conover method, $P=0.0009$, Holm-Sidak test, $P=0.025$).

The effect of calcium removal from the medium on the NVsnpr astrocytic networks was tested because low extracellular calcium concentration is known to open connexins and gap junctions²⁰⁻²² and it can be used as a massive and uniform stimulus, to open up the syncytium and maximize tracer diffusion through gap junctions. The astrocytic networks revealed in Ca^{2+} -free conditions (n=10) showed a larger number of cells than the networks revealed in control conditions with 37 ± 10 labeled cells (Figure 2.6C middle panel and Figure 2.6D, Iman-Conover method, $P=0.016$, Holm-Sidak test, $P<0.001$) covering an area of $108123 \pm$

27450 μm^2 (Figure 2.6C middle panel and Figure 2.6E; Iman-Conover method, $P=0.009$, Holm-Sidak test, $P=0.001$).

Compared to the complete removal of calcium from the medium, electrical stimulation of afferent inputs to the nucleus of interest is a more physiological stimulus that directly involves the neuronal circuitry of interest. Consequently, the results from this type of manipulation can provide meaningful information regarding to the functional implications of the astrocytic networks observed. For instance, inputs from two different pathways may lead to different effects on the basal state of cells coupling in a given area or it may elicit coupling between astrocytes in distinct subdivisions of the nucleus. In our circuit, electrical stimulation of the sensory fibers that project to the NVsnpr using 2 s trains of 0.2 ms pulses at 40-60 Hz ($n=11$), produced an increase of the coupling between NVsnpr astrocytes, relatively to the unstimulated conditions, with 23 ± 6 cells (Figure 2.6B middle panel and Figure 2.6D; Iman-Conover method, $P=0.016$, Holm-Sidak test, $P=0.012$) spreading out over an area of $814174\pm 15270 \mu\text{m}^2$ (Figure 2.6B middle panel and Figure 2.6E; Iman-Conover method, $P=0.009$, Holm-Sidak test, $P=0.004$).

The effects of these two types of stimulation, the removal of calcium from the medium and the electrical stimulation of afferent inputs, are all disrupted by CBX. The astrocytic networks in this condition comprised only 5 ± 1 cells in Ca^{2+} -free aCSF (Figure 2.6C right panel, and Figure 2.6D; $n=4$; Iman-Conover method, $P=0.016$, Holm-Sidak test, $P<0.001$) and 9 ± 2 cells with sensory fibers stimulation (Figure 2.6B right panel and Figure 2.6D; $n=6$; Iman-Conover method, $P=0.016$, Holm-Sidak test, $P=0.023$). The networks surface areas were also reduced to $17987\pm 9843 \mu\text{m}^2$ with Ca^{2+} -free aCSF (Figure 2.6E ; $n=4$; Iman-Conover method, $P=0.009$, Holm-Sidak test, $P=0.004$) and to $39379\pm 11014 \mu\text{m}^2$ with sensory fibers stimulation (Figure 2.6E; $n=6$; Iman-Conover method, $P=0.009$, Holm-Sidak test, $P=0.055$).

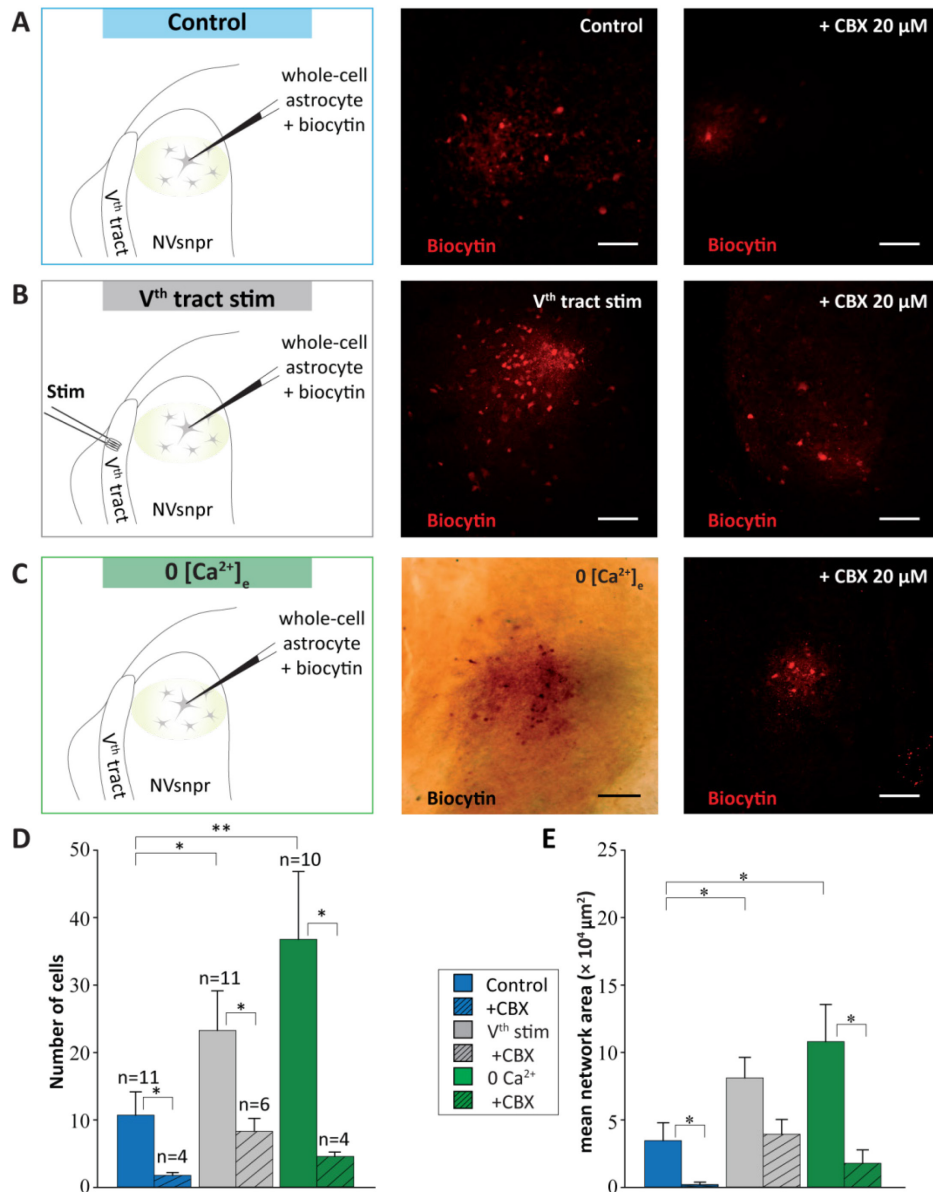


Figure 2.6: Astrocytic networks labeled with biocytin in NVsnpr under different conditions show different sizes. (adapted from Condamine et al., 2017).

A-C: At left, schematic drawing of the experimental condition. In all conditions, a single astrocyte labeled by SR-101 was targeted for whole cell recording and filled with biocytin (0.2%). Middle column: photomicrographs illustrating the astrocytic networks obtained under control conditions (A), after electrical stimulation of the Vth tract (2 s trains, 40-60 Hz, 10-300 μ A, 0.2 ms pulses) (B); and after perfusion with a Ca²⁺-free aCSF (C). Right column: photomicrographs illustrating the astrocytic networks obtained under the same conditions but in presence of CBX (20 μ M) in the bath prior. Scale bar = 100 μ m.

D-E: Vertical bars chart representing the number of coupled cells and the surface area respectively of the biocytin-filled networks of astrocytes under the three experimental conditions presented above (A-B-C) in presence (hatched) and in absence (solid) of CBX (20 μ M). Data are represented as mean \pm SEM. Multiple comparisons (Holm-Sidak test) - * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.001$.

Anatomical analysis was performed only on cases where the NVsnpr boundaries could be clearly defined on 4X imaging which was the case for 9 out of the 10 networks obtained with Ca^{2+} -free aCSF and for 8 out of the 11 networks obtained with electrical stimulation. Plotting of all the analyzed astrocytic networks on a theoretical NVsnpr, shows that most of the cells comprised in the networks were confined within the nucleus boundaries (Figure 2.7 A-B, left and middle panel). Under Ca^{2+} -free aCSF, 4 out of 9 astrocytic networks spread outside of the NVsnpr in direction of the motor nucleus located medially to the NVsnpr. In these 4 cases, the vast majority of the labeled cells were confined in the nucleus. The networks of labeled cells obtained with electrical stimulation of the sensory fibers were more restricted. Only 2 networks extended over the nucleus borders. One spread over the mediodorsal border into the lateral supratrigeminal area (dark green network, Figure 2.7B, left and middle panel). In a second case, 2 astrocytes in the red network (Figure 2.7B, left and middle panel) crossed to the ventral part of the NVsnpr.

The vectorial analysis for the astrocytic networks preferential orientation (Figure 2.7A-B, right panel) produced different results depending on the stimulus used. Indeed, for the astrocytic networks observed with Ca^{2+} -free aCSF, all but one of the vectors of preferential orientation were oriented towards the center of the NVsnpr. However, for the astrocytic networks observed with electrical stimulation, the preferential orientation vectors were mostly oriented towards the borders of the nucleus. This is reflected in the computed angular differences in preferential orientation between the astrocytic networks obtained with Ca^{2+} -free aCSF and the ones obtained with electrical stimulation of the sensory fibers. Under Ca^{2+} -free aCSF, the vertical bar charts of the distribution of angular difference showed that most of the networks of labeled cells have an angular difference between 0 to 40 degree with a mean of angular difference of 39.5 ± 12.7 degrees (Figure 2.7C). With electrical stimulation of sensory fibers, the distribution is more uniform and the mean angular difference (99.5 ± 17 degrees) is significantly different (Figure 2.7D, Student t-test, $P=0.012$).

These data show that biocytin labeling analysis allows to distinguish how different stimuli modulate astrocytic coupling. Moreover, mapping of the astrocytic networks in a normalized nucleus and vectorial analysis provides information on the size, and anatomical organization of these networks.

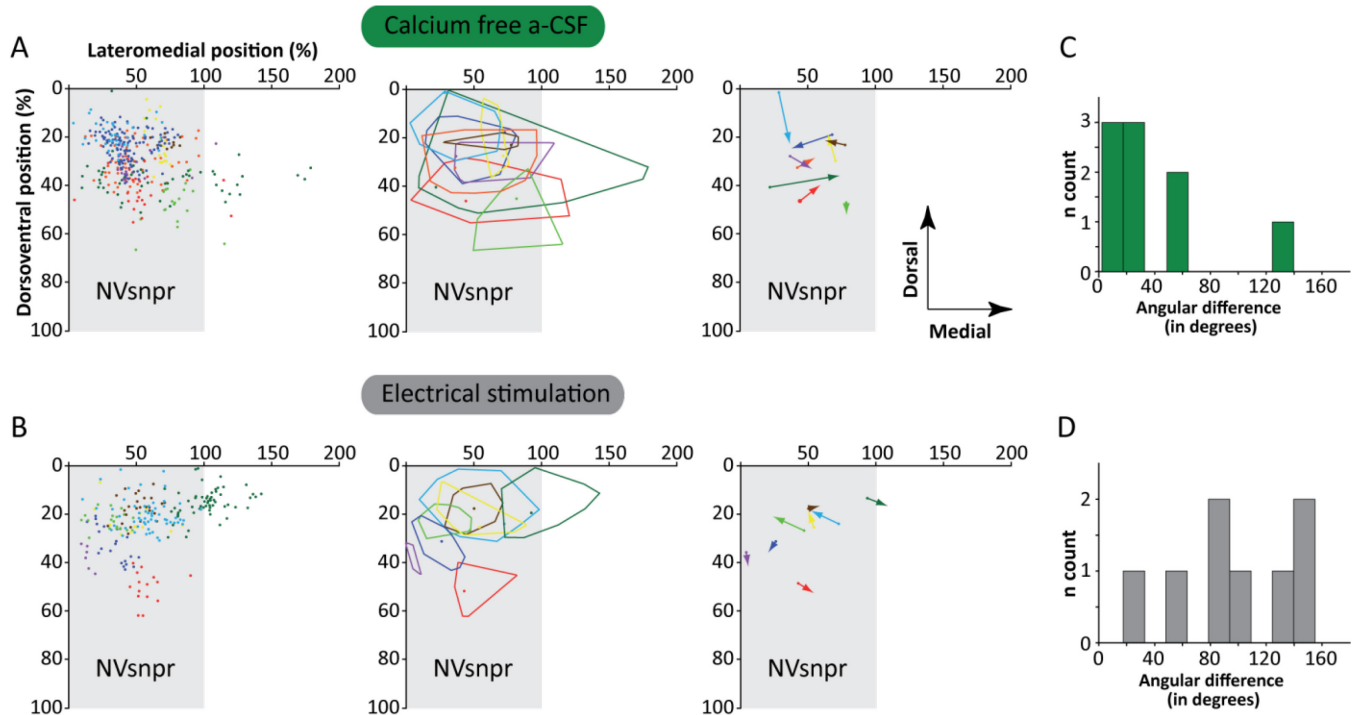


Figure 2.7: Characterisation of networks obtained in NVsnpr under Ca^{2+} -free aCSF and with electrical stimulation of the V^{th} tract (adapted from Condamine et al., 2017).

A-B: Left: All cells labeled in 9 networks filled under perfusion with Ca^{2+} -free aCSF (A) or in 8 networks filled while stimulating the V^{th} tract (B) are plotted according to their position in a theoretical NVsnpr nucleus (gray rectangle). Each network (and the cells composing it) is represented by a different color. **Middle:** Boundaries of each network. The dot in each area represents the patched cell. **Right:** Representation of main vector of preferential orientation of each network. The dot represents the patched cell and the arrow the vector of preferential direction. **C-D:** Distribution of angular differences between the main vector of the preferential orientation and a straight line connecting the patched cell to the center of the dorsal part of NVsnpr (located at 25% on the dorsoventral axis and 50% on the mediolateral axis) under the two conditions studied. The mean angular difference was 39.5 ± 12.7 degrees in Ca^{2+} -free aCSF indicating a preferential orientation towards the centre of the nucleus and 99.5 ± 17 degrees with electrical stimulation, indicating a preferential orientation towards the periphery (Student t-test, $P=0.012$).

DISCUSSION:

A number of electrophysiological methods exist to assess functional coupling between astrocytes^{23,24}. However, these methods do not provide information about the anatomical arrangement of astrocytic networks. A number of studies have already shown that “dye or tracer coupling”, as done here, occurs only in a fraction of coupled cells that are detected by electrophysiological methods²⁵⁻²⁷, suggesting that the number of cells detected with this method is underestimated. Nevertheless, this is still the best method for “visualisation” of coupling. Greater dye coupling is obtained when using molecule tracer smaller than 1-1.2 KDa to permeate gap junctions²⁰. Live visualization of coupling can be performed by monitoring diffusion of fluorescent glucose derivatives (2-NBDG) or a fluorescent marker (like some Alexa dyes or Lucifer Yellow)¹³, but due to its smaller size biocytin yields better results and allows for quantification on fixed tissue. Thus, it should be bared in mind that the number of cells detected with this method is largely underestimated. On the other hand, some of the labeled cells may be labeled, not because of their coupling, but due to uptake of tracer leaked into the extracellular space. The extent of labeling resulting from this can be estimated in control experiments with bath applications of a gap junction blocker¹. However, we assume that any bias due to the method would apply to all conditions.

Finally, it should be emphasized that not all coupled cells are astrocytes. Panglial networks where astrocytes are coupled to oligodendrocytes have been described in several brain areas, including the lateral superior olive⁸, the thalamus¹⁶, the cortex and the hippocampus²⁸. Our aim was to develop a method to compare astrocytic networks revealed with dye coupling under different conditions to assess the hypothesis that they form well defined distinctive functional domains revealed by different stimuli. Since in NVsnpr, the trigeminal brainstem nucleus in which this protocol was conducted, coupling between astrocytes is very limited under resting conditions, it was important to first develop a reliable and unbiased method to detect labeled cells. This was achieved with automated detection with ImageJFIJI. It is sometimes difficult to distinguish faintly labeled cells from background noise. Here, stack imaging and a method in ImageJFIJI are used to improve the signal, but even then background noise can sometimes be too high and lead to data rejection. In future studies, clarification protocols may be used to improve the signal/noise ratio. A clearing protocol is an interesting

method of clarification that preserves the tissues morphology (no shrinkage), does not affect lipids and is compatible with immunostaining²⁹. Another limitation of the method described is the “watershed” tool used to discriminate cells that are too close to each other. Visual inspection of detected cells should be done when using this tool.

If astrocytic networks form functional domains then they may define the boundaries of a nucleus or should at least be confined within the boundaries of a nucleus. Revealed networks may always be confined within a nucleus, more so if they are small in size, if the patched astrocyte is in the center (or within) the nucleus. To test if astrocytes sitting near the border of a nucleus couple with other astrocytes outside the nucleus or preferably with astrocytes within the nucleus, we needed to develop a method to determine the preferential direction in which the dye spread from the patched astrocyte. Several other studies addressed a similar issue in the barrel cortex, the barreloid fields of the thalamus, the olfactory glomeruli, the hippocampus and the lateral superior olive, but they focused their analysis mostly on the distance of diffusion of the tracer, the electrophysiological characterization of different types of astrocytes in function of their localization, and the spread of dye along orthogonal axes with respect to these well defined structures^{8-10,13,14,16}. Here we used vectorial analysis to determine the dominant direction of tracer spread, which was given by the size and orientation of the normalized main vector. Small vectors indicate no clear “dominant” or preferential orientation. A critical step for vectorial analysis is the ability to accurately identify the patched astrocyte which is not always possible. An interesting alternative to help locate the patched astrocyte is to add a large (non gap-junction permeant) and fixable tracer, like dextrans, in the recording solution. If impossible to determine the patched cell or the patch location, it may be better to omit these experiments from the vector analysis.

Finally, to analyze whether properties of networks varied according to their location in the nucleus, we needed a method to express their position in a “normalized” nucleus. The only critical step in this procedure is the ability to clearly see the borders of the nucleus in the low magnification images (4X). A simple solution to this problem, if it occurs often, is to add a standard histological coloration to tissue processing before analysis.

Heterogeneity of astrocytes across brain regions is clearly established and a growing body of evidence supports the concept that their specializations are particularly adapted for the function of the circuit that they are embedded in^{9,10,30,31}. For this to be true, inter-astrocytic communication should be limited to astrocytes associated to the same circuit. Observations supporting this assumption are emerging in different brain areas but are more evident in areas with clustered representations like sensory maps in the barrel cortex or the olfactory bulb for instance. However, most reports of an overlap of neuronal and astrocytic maps are descriptive and qualitative. The methods reported here can be used to objectify these observations and to develop tools to better analyze astrocytic networks according to their position in a given circuit.

ACKNOWLEDGMENTS:

This work is funded by the Canadian Institute for Health research, Grant/Award number: 14392

DISCLOSURES:

The authors have nothing to disclose

REFERENCES:

- 1 Condamine, S., Lavoie, R., Verdier, D. & Kolta, A. Functional rhythmogenic domains defined by astrocytic networks in the trigeminal main sensory nucleus. *Glia*. **66** (2), 311-326, doi:10.1002/glia.23244, (2018).
- 2 Verkhratsky, A., Orkand, R. K. & Kettenmann, H. Glial calcium: homeostasis and signaling function. *Physiological Review*. **78** (1), 99-141, doi:10.1152/physrev.1998.78.1.99, (1998).
- 3 Christensen, R. K., Petersen, A. V. & Perrier, J. F. How do glial cells contribute to motor control? *Current Pharmaceutical Design*. **19** (24), 4385-4399 (2013).
- 4 Verkhratsky, A. & Steinhauser, C. Ion channels in glial cells. *Brain Research Review*. **32** (2-3), 380-412 (2000).
- 5 Harada, K., Kamiya, T. & Tsuboi, T. Gliotransmitter Release from Astrocytes: Functional, Developmental, and Pathological Implications in the Brain. *Frontiers Neuroscience*. **9** 499, doi:10.3389/fnins.2015.00499, (2015).
- 6 Montero, T. D. & Orellana, J. A. Hemichannels: new pathways for gliotransmitter release. *Neuroscience*. **286** 45-59, doi:10.1016/j.neuroscience.2014.11.048, (2015).
- 7 Araque, A. *et al.* Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron*. **81** (4), 728-739, doi:10.1016/j.neuron.2014.02.007, (2014).
- 8 Augustin, V. *et al.* Functional anisotropic panglial networks in the lateral superior olive. *Glia*. **64** (11), 1892-1911, doi:10.1002/glia.23031, (2016).
- 9 Houades, V., Koulakoff, A., Ezan, P., Seif, I. & Giaume, C. Gap junction-mediated astrocytic networks in the mouse barrel cortex. *Journal of Neuroscience*. **28** (20), 5207-5217, doi:10.1523/JNEUROSCI.5100-07.2008, (2008).
- 10 Roux, L., Benchenane, K., Rothstein, J. D., Bonvento, G. & Giaume, C. Plasticity of astroglial networks in olfactory glomeruli. *Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America*. **108** (45), 18442-18446, doi:10.1073/pnas.1107386108, (2011).
- 11 Morquette, P. *et al.* An astrocyte-dependent mechanism for neuronal rhythmogenesis. *Nature Neuroscience*. **18** (6), 844-854, doi:10.1038/nn.4013, (2015).
- 12 Brocard, F., Verdier, D., Arsenault, I., Lund, J. P. & Kolta, A. Emergence of intrinsic bursting in trigeminal sensory neurons parallels the acquisition of mastication in weanling rats. *Journal of Neurophysiology*. **96** (5), 2410-2424, doi:10.1152/jn.00352.2006, (2006).
- 13 Anders, S. *et al.* Spatial properties of astrocyte gap junction coupling in the rat hippocampus. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Science*. **369** (1654), 20130600, doi:10.1098/rstb.2013.0600, (2014).
- 14 Houades, V. *et al.* Shapes of astrocyte networks in the juvenile brain. *Neuron Glia Biology*. **2** (1), 3-14, doi:10.1017/S1740925X06000081, (2006).
- 15 Rouach, N., Koulakoff, A., Abudara, V., Willecke, K. & Giaume, C. Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. *Science*. **322** (5907), 1551-1555, doi:10.1126/science.1164022, (2008).

- 16 Claus, L. *et al.* Barreloid Borders and Neuronal Activity Shape Panglial Gap Junction-Coupled Networks in the Mouse Thalamus. *Cerebral Cortex*. **28** (1), 213-222, doi:10.1093/cercor/bhw368, (2018).
- 17 Cameron, M. A. *et al.* Prolonged Incubation of Acute Neuronal Tissue for Electrophysiology and Calcium-imaging. *Journal of Visualized Experiment*. (120), doi:10.3791/55396, (2017).
- 18 Kafitz, K. W., Meier, S. D., Stephan, J. & Rose, C. R. Developmental profile and properties of sulforhodamine 101--Labeled glial cells in acute brain slices of rat hippocampus. *Journal of Neuroscience Methods*. **169** (1), 84-92, doi:10.1016/j.jneumeth.2007.11.022, (2008).
- 19 Neher, E. Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments. *Methods in Enzymology*. **207** 123-131 (1992).
- 20 Giaume, C., Leybaert, L., Naus, C. C. & Saez, J. C. Connexin and pannexin hemichannels in brain glial cells: properties, pharmacology, and roles. *Frontiers in Pharmacology*. **4** 88, doi:10.3389/fphar.2013.00088, (2013).
- 21 Torres, A. *et al.* Extracellular Ca(2)(+) acts as a mediator of communication from neurons to glia. *Science Signaling*. **5** (208), ra8, doi:10.1126/scisignal.2002160, (2012).
- 22 Ye, Z. C., Wyeth, M. S., Baltan-Tekkok, S. & Ransom, B. R. Functional hemichannels in astrocytes: a novel mechanism of glutamate release. *Journal of Neuroscience*. **23** (9), 3588-3596 (2003).
- 23 Ma, B. *et al.* Gap junction coupling confers isopotentiality on astrocyte syncytium. *Glia*. **64** (2), 214-226, doi:10.1002/glia.22924, (2016).
- 24 Meme, W., Vandecasteele, M., Giaume, C. & Venance, L. Electrical coupling between hippocampal astrocytes in rat brain slices. *Neuroscience Research*. **63** (4), 236-243, doi:10.1016/j.neures.2008.12.008, (2009).
- 25 Ransom, B. R. & Kettenmann, H. Electrical coupling, without dye coupling, between mammalian astrocytes and oligodendrocytes in cell culture. *Glia*. **3** (4), 258-266, doi:10.1002/glia.440030405, (1990).
- 26 Audesirk, G., Audesirk, T. & Bowsher, P. Variability and frequent failure of lucifer yellow to pass between two electrically coupled neurons in *Lymnaea stagnalis*. *Journal of Neurobiology*. **13** (4), 369-375, doi:10.1002/neu.480130407, (1982).
- 27 Ewadinger, N., Syed, N., Lukowiak, K. & Bulloch, A. Differential Tracer Coupling between Pairs of Identified Neurones of the Mollusc *Lymnaea Stagnalis*. *Journal of Experimental Biology*. **192** (1), 291-297 (1994).
- 28 Griemsmann, S. *et al.* Characterization of Panglial Gap Junction Networks in the Thalamus, Neocortex, and Hippocampus Reveals a Unique Population of Glial Cells. *Cereb Cortex*. **25** (10), 3420-3433, doi:10.1093/cercor/bhu157, (2015).
- 29 Kuwajima, T. *et al.* ClearT: a detergent- and solvent-free clearing method for neuronal and non-neuronal tissue. *Development*. **140** (6), 1364-1368, doi:10.1242/dev.091844, (2013).
- 30 Gourine, A. V. *et al.* Astrocytes control breathing through pH-dependent release of ATP. *Science*. **329** (5991), 571-575, doi:10.1126/science.1190721, (2010).
- 31 Forsberg, D., Ringstedt, T. & Herlenius, E. Astrocytes release prostaglandin E2 to modify respiratory network activity. *Elife*. **6**, doi:10.7554/eLife.29566, (2017).

Chapitre 3 : Article II

Ce chapitre contient le manuscrit de l'article «Functional rhythmogenic domains defined by astrocytic networks in the trigeminal main sensory nucleus» par Steven Condamine, Raphaël Lavoie, Dorly Verdier, Arlette Kolta publié le 27 Octobre 2017 dans *Glia*.

ABSTRACT

In many nervous functions that rely on the ability of neuronal networks to generate a rhythmic pattern of activity, coordination of firing is an essential feature. Astrocytes play an important role in some of these networks, but the contribution of astrocytic coupling remains poorly defined. Here we investigate the modulation and organization of astrocytic networks in the dorsal part of the trigeminal main sensory nucleus (NVsnpr), which forms part of the network generating chewing movements. Using whole-cell recordings and the dye coupling approach by filling a single astrocyte with biocytin to reveal astrocytic networks, we showed that coupling is limited under resting conditions, but increases importantly under conditions that induce rhythmic firing in NVsnpr neurons. These are: repetitive electrical stimulation of the sensory inputs to the nucleus, local application of NMDA and decrease of extracellular Ca^{2+} . We have previously shown that rhythmic firing induced in NVsnpr neurons by these stimuli depends on astrocytes and their Ca^{2+} -binding protein S100 β . Here we show that extracellular blockade of S100 β also prevents the increase in astrocytic coupling induced by local application of NMDA. Most of the networks were small and remained confined to the functionally distinct area of dorsal NVsnpr. Disrupting coupling by perfusion with the non-specific gap junction blocker, carbenoxolone or with GAP26, a selective inhibitor of connexin 43, mostly expressed in astrocytes, abolished NMDA-induced rhythmic firing in NVsnpr neurons. These results suggest that astrocytic coupling is regulated by sensory inputs, necessary for neuronal bursting, and organized in a region specific manner.

INTRODUCTION

Repetitive movements like mastication, locomotion or respiration rely on neuronal networks known as central pattern generators (CPGs) that encode rhythmicity. In the trigeminal circuits associated to masticatory movements, rhythmic firing in phase with the masticatory rhythm is observed in several areas surrounding the trigeminal motor nucleus *in vivo* (Donga & Lund, 1991; Inoue, Masuda, Nagashima, Yoshikawa, & Morimoto, 1992; Moriyama, 1987; Tsuboi, Kolta, Chen, & Lund, 2003; Westberg, Clavelou, Sandstrom, & Lund, 1998), but *in vitro*, it could be elicited only in neurons located in the dorsal part of the trigeminal main sensory nucleus (NVsnpr) (Brocard, Verdier, Arsenault, Lund, & Kolta, 2006; Sandler, Puil, & Schwarz, 1998) and a small percentage of the immediately adjacent neurons of the supratrigeminal area (Bourque & Kolta, 2001; Hsiao, Gougar, Asai, & Chandler, 2007). In NVsnpr, this bursting activity is supported by a sodium persistent current (I_{NaP}) which is voltage dependent and sensitive to the extracellular Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_e$) (Brocard et al., 2006; Morquette et al., 2015; Tsuruyama, Hsiao, & Chandler, 2013). Low $[Ca^{2+}]_e$ shifts the activation potential of I_{NaP} towards more negative potentials and increases the amplitude of the current (Armstrong, 1999; Brocard et al., 2013; Z. Li & Hatton, 1996; Morquette et al., 2015; Tsuruyama et al., 2013). Because of this, artificially lowering $[Ca^{2+}]_e$ elicits recurrent bursting in NVsnpr neurons. More physiological stimuli, like repetitive stimulation of the glutamatergic afferent inputs to NVsnpr, also produce a decrease of $[Ca^{2+}]_e$ and elicit rhythmic bursting that relies on I_{NaP} . This condition is mimicked by local application of NMDA. Our previous work has shown that astrocytes and their Ca^{2+} -binding protein S100 β are essential for this process (Morquette et al., 2015).

Rhythmogenesis is a critical function of CPGs, but coordination and synchronization of rhythmically active neurons is another one. Synchronization has often been thought to result from neuronal electrical coupling through gap junctions. However, there is no evidence of electrical coupling among NVsnpr neurons. Astrocytes, on the other hand, are well known for their extensive coupling through connexins 43 (Cx43) and 30 (Cx30) (Nagy, Dudek, & Rash, 2004) which have been described in many brain areas including the hippocampus, the barrel cortex or the olfactory bulb (Adermark & Lovinger, 2008; D'Ambrosio, Wenzel, Schwartzkroin, McKhann, & Janigro, 1998). A number of ions and small bioactive molecules

can permeate these channels which functions have often been associated to maintenance of homeostasis across a network of coupled cells (Harris, 2007; Taberner, Medina, & Giaume, 2006). Some of these functions, such as spatial buffering of K^+ and Na^+ ions or glutamate clearance among others, have direct or indirect impact on neuronal excitability and coordination of firing across a network. However, most studies considering the impact of astrocytes on neuronal excitability examined their interactions at the single cell level. While some did also investigate their role at the network level (Fellin et al., 2009; Lee et al., 2014; Poskanzer & Yuste, 2011; Sasaki et al., 2014; F. Wang et al., 2012), only very few assessed the contribution of astrocytic gap junction coupling to regulation of neuronal networks (Chever, Dossi, Pannasch, Derangeon, & Rouach, 2016; Pannasch, Derangeon, Chever, & Rouach, 2012). Those that did were conducted in the hippocampus and focused on the importance of neuronal synchronization under pathological conditions in relation to epileptiform events.

Thus, little is known about the role of astrocytic gap junction coupling in coordinating firing in neuronal populations under more “physiological conditions”. Here, to assess the role of astrocytic coupling, in generation and coordination of rhythmic firing by neurons of the dorsal NVsnpr, we set out to describe the spatial organization of astrocytic networks in this nucleus and to examine how coupling is modulated by physiological factors influencing bursting in NVsnpr neurons. We showed that stimuli that trigger neuronal bursting increase coupling between NVsnpr astrocytes that otherwise form very small networks if unstimulated and that astrocytic networks are spatially arranged to form functional domains confined into the boundaries of the nucleus. Finally, blocking astrocytic coupling disrupts neuronal bursting.

MATERIAL AND METHODS

Brainstem slices preparation

All procedures above by the Canadian Institutes of Health Research rules and were approved by the University of Montreal Animal Care and Use Committee.

Experiments were conducted on 15-21 day old Sprague-Dawley rats anesthetized with isoflurane (Pharmaceutical Partners of Canada Inc., Richmond Hill, Ontario, Canada) prior to decapitation. Their brain was quickly removed from the cranium and dipped in an ice cold sucrose-based solution containing (in mM) 3 KCl, 1.25 KH₂PO₄, 4 MgSO₄, 26 NaHCO₃, 10 Dextrose, 0.2 CaCl₂, 219 Sucrose and bubbled with a mix of 95% O₂ and 5% CO₂, pH 7.3-7.4, 300-320 mOsmol/kg. Transverse slices (300-350µm thick) of the trigeminal main sensory nucleus (NVsnpr) were prepared in the same medium with a Vibratome (Leica, Model VT 100S).

Slices were then stored and allowed to rest for an hour in a holding chamber filled with artificial cerebral-spinal fluid (aCSF) at room temperature (in mM: 124 NaCl, 3 KCl, 1.25 KH₂PO₄, 1.3 MgSO₄, 26 NaHCO₃, 10 Dextrose and 1.6 CaCl₂, pH 7.3-7.4, 290-300 mOsmol/kg). In some experiments, CaCl₂ was omitted and replaced by MgCl₂ (1.6mM).

Electrophysiology and biocytin labeling

Whole cell recordings were obtained from 300-350µm thick brainstem slices continuously perfused with oxygenated aCSF maintained at room temperature. Neurons and astrocytes were visualized with an infrared-sensitive CCD camera and displayed on a video monitor. The camera was mounted on a Nikon Eclipse E600 microscope equipped with a 40X water-immersion objective. Whole cell recordings were performed using an Axoclamp 2B amplifier and a Digidata 1322A digitizer (Axon Instruments, Downingtown, PA, USA). Patch pipettes were pulled from borosilicate glass capillaries (1.5 mm OD, 1.12 mm ID; World Precision Instruments, Sarasota, FL) on a Sutter P-97 puller (Sutter Instruments, Novato, CA). Electrodes for neuronal recordings (resistance 6-8 MΩ) were filled with an internal solution containing (in mM) 140 K-gluconate, 5 NaCl, 10 HEPES, 0.5 EGTA, 2 Tris ATP salt, 0.4 Tris GTP salt, pH 7.2-7.3, 280-300 mOsmol/kg. Bursts were defined as depolarizing plateaus

overridden by at least 3 actions potentials. Neurons were monitored all along experiments to assess their viability. Cells with action potentials that did not overshoot 0 mV or with resting membrane potential (RMP) above -40 mV were discarded.

Electrodes for astrocyte recordings (resistance 4-6 M Ω) were filled with an internal solution containing (in mM) 140 K-gluconate, 5 NaCl, 10 HEPES, 0.5 EGTA, 2 Tris ATP salt, 0.4 Tris GTP salt, pH 7.2-7.3, 280-300 mOsmol/kg, and 0.2% biocytin. To identify astrocytes, Sulforhodamine 101 (SR101) labeling was performed (1 μ M SR101 for 20 min at 34 C $^\circ$ and 20 min of washout) with the procedure of Kafitz *et al.* (2008) (Fig 1A). The type of glial cells was further characterized by performing a whole-cell current-voltage profile using a ramp voltage command from -120 to +110 mV (600 ms duration) in voltage-clamp mode (Panatier *et al.*, 2011; Serrano, Robitaille, & Lacaille, 2008) (Fig 1B). Cells included in this study were characterized by a linear profile (in voltage-clamp mode) and lack of action potential firing with a step IV protocol (in current-clamp mode) (Fig 1C). The resting membrane potential was monitored in current-clamp configuration all along the experiment and cells with RMP above -60 mV were rejected.

In some experiments, an Isostim stimulator (model A320; WPI, Sarasota, FL, USA) and tungsten (bipolar) electrodes were used to electrically stimulate (2 s trains at 40–60 Hz) the sensory fibers in the trigeminal tract bordering the NVsnpr.

Drug applications

The following drugs were locally applied near the recorded cells using positive pressure pulses (Picospritzer III) to one or two pipettes containing either : N-Methyl-D-Aspartate (NMDA 1 mM), or S100 β (129 μ M). Carbenoxolone (CBX 20 μ M), MK-801 (10 μ M) and GAP26 (193 μ M) were bath applied. Compounds were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada), and Tocris Bioscience (Ellisville, Missouri, USA). GAP26 was purchased from Apexbio (Houston, Texas, USA). S100 β was obtained from Inixium (Laval, Québec, Canada) in aliquots at a concentration of 14.0 mg/ml supplemented with glycerol to a final concentration of 50% and stored at -80 $^\circ$ C. Before use, to eliminate the glycerol, aliquots of the protein were thawed and microdialysed overnight using a dialysis device (Float-A-Lyzer from Spectra/Por) floating in a 20 mM HEPES buffer containing 140 mM of NaCl at pH 7.4. The

protein was then reconcentrated by centrifugation using centrifugal filter units (Amicon Ultra). The same buffer (20 mM HEPES containing 140 mM NaCl, but no Ca^{2+}) was used to suspend and adjust its concentration to 129 μM .

Antibodies used to pretreat the tissue in some experiments were applied locally with a large tip pipette in the tissue near the patched astrocyte. The antibody containing pipette was left there to leak for 10–15 min prior to testing the effects of the antibody. Two antibodies were tested: an anti-S100 β antibody (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$, sodium azide salt (140 μM); Sigma Aldrich, # S2532) and a non-specific donkey anti-sheep antibody (120 $\mu\text{g}/\text{ml}$, sodium azide salt (312 μM); Invitrogen–Molecular Probes, # A11015).

Biocytin revelation and imaging

After recording, slices were fixed in 4% paraformaldehyde. Biocytin was revealed with DAB using Vectastain ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) or with streptavidine-alexa 594 (Molecular Probes, #S11227).

Imaging was performed using a Nikon Eclipse E600 microscope with a 10X lens (Nikon, 0.30 N.A) for DAB revelation cases and an Olympus FluoView FV 1000 confocal microscope equipped with a 20X water-immersion lens (Olympus, 0.80 N.A) was used for all cases with streptavidine revelation.

Network analysis

Analysis of tracer coupling was performed using ImageJ FIJI software. Each astrocytic network photomicrograph was treated with the subtract background tool (Fig 1D left). The threshold was adjusted and the photomicrograph was converted into a binary image with the binary process tool (Fig 1D, second panel). The analysis of the number of coupled cells was performed using the analyze particle function of the software (Fig 1D, third panel). To determine the astrocytic network surface area, a line (red line in figure 1D, third panel) was traced with the polygon tool in ImageJ that connects all the cells located in the external periphery of the network and defined as a region of interest (ROI). The ImageJ ROI manager was then used to measure the area of the traced ROI.

In each network, the patched astrocyte was identified. If the identification was impossible, a polygon was traced around the area where a dense biocytin deposit could be detected and was defined as the centroid of this polygon.

To analyse the preferential orientation of each astrocytic network, a vector was determined from the patched astrocyte (or point of patched reference) to each cell in the network (black dotted lines in Fig 1E). The main vector of preferential orientation (red line in Fig 1E) was defined as the sum of all vectors in the network. The length of the main vector was divided by the number of cells in the network studied to normalise and compare it with other networks. The position of each network was expressed in percentage of the latero-median and dorso-ventral axis of the cartesian referential rectangle roughly surrounding the main sensory nucleus (Fig 1F).

For each network, a straight line (black line in Fig 1F) was drawn from the patched astrocyte (black dot in Fig 1F) to the centre of dorsal NVsnpr defined as the intersection of a line from the 50% latero-median axis and a line from 25% dorso-ventral axis (blue dot in Fig 1F) and the angular difference (α , Fig 1F) of each vector of preferential orientation to this line was computed.

Circularity of each network was estimated as the ratio of the distance measured between the 2 most distant cells in one axis of an ellipse fitted over the network over the distance between the 2 most distant cells in the perpendicular axis.

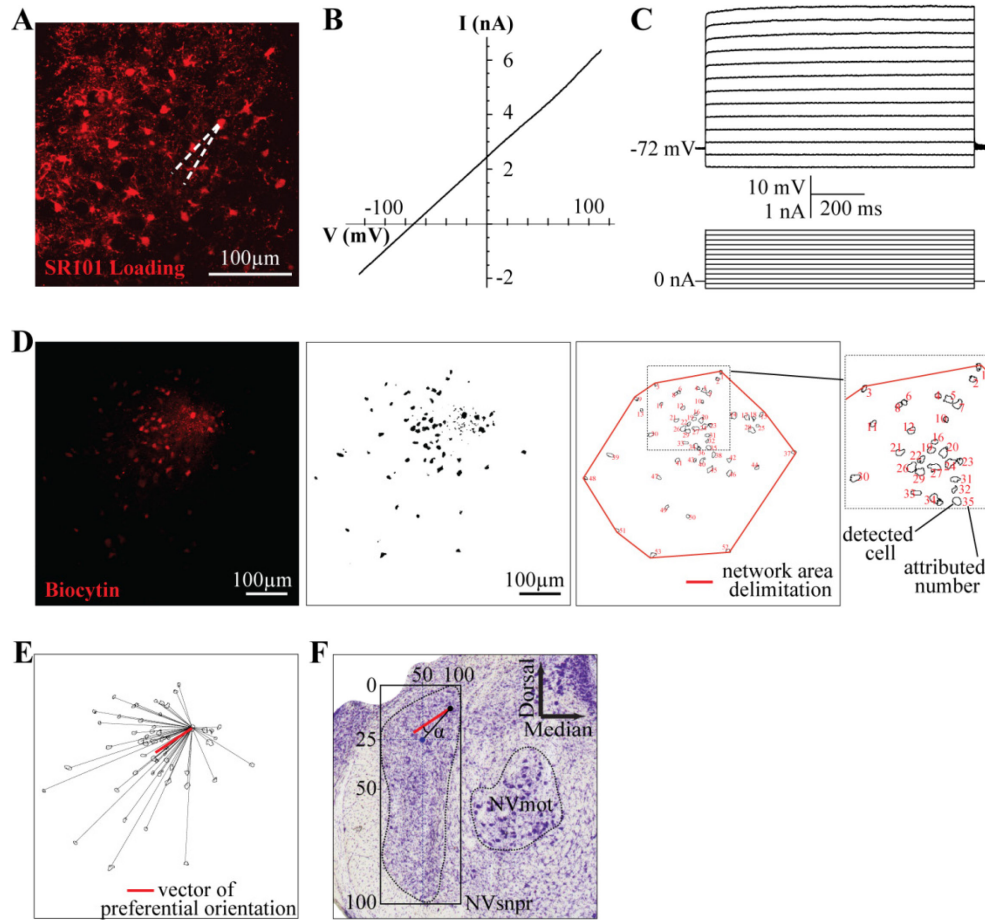


Figure 3.1: Methods used to identify NVsnpr astrocytes and for networks analysis parameters.

A: Photomicrograph of NVsnpr astrocytes labelled with the specific marker Sulforhodamine 101 (SR101). SR101 positive somata within the dorsal part of the NVsnpr were specifically targeted for whole-cell recordings (patch pipette, white dashed line). **B:** A depolarizing ramp performed in voltage-clamp mode (from -120 to 110 mV) reveals the typical linear passive characteristics of recorded NVsnpr astrocytes. **C:** Injections of current pulses in current-clamp mode show the lack of action potentials in recorded astrocytes. **D:** *Left panel,* Photomicrograph of an astrocytic network filled with biocytin. *Middle panel,* example of the binary image produced by ImageJ for this network. *Right panel and inset,* Result of the "analyse particle" function processing for the network showing the drawing of each cell and their assigned number (see inset). The red line defines the border of the network used to calculate its surface area. **E:** Vectors are drawn from the patched astrocyte to each cell in the network and the preferential vector orientation (red line) representing the sum is calculated. To allow for comparison between networks, the length is divided by the number of cells in the network. **F:** The angular difference (α) represents the difference between the orientation of the vector of preferential orientation and that of a straight line (black line) connecting the patched astrocyte (black dot) to the centre of dorsal NVsnpr (intersection of the 50% latero-median axis and the 25% dorso-ventral axis, blue dot).

Statistics

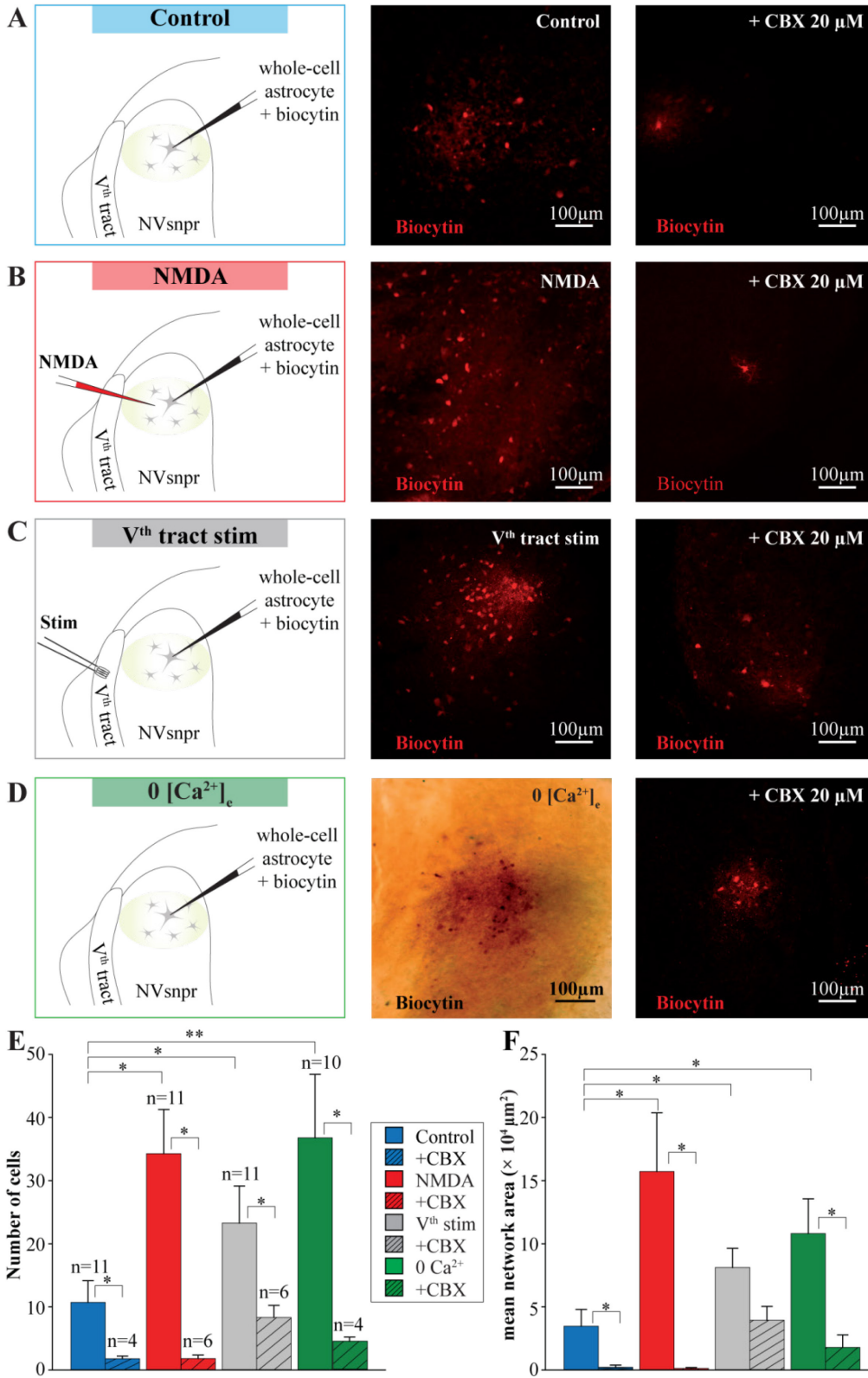
Data are presented as mean \pm Standard Error (SE) throughout the text. Normality of data distribution was tested with the Kolmogorov-Smirnov test. For data not following a normal distribution, Kruskal-Wallis one way ANOVA followed with Dunn's post-hoc test or two-way ANOVA on Ranks (Iman-Conover method)(Conover & Iman, 1981) followed with a post-hoc Holm-Sidak test were used to compare the effect of different stimuli on the astrocytic networks. Electrophysiological data were compared with a Student t-test, when normally distributed, or a Wilcoxon signed t-test, when not normally distributed. Characteristics of neuronal bursting were normally distributed and were compared with a one way repeated measured ANOVA coupled to a post-hoc Holm-Sidak test.

RESULTS

Coupling in basic conditions

We investigated the extent of astrocytic coupling in the dorsal part of NVsnpr under control conditions, by performing whole cell patch clamp recordings in single astrocytes using electrodes filled with biocytin as schematized in figure 2A (left). Recorded cells were characterized as astrocytes on the basis of their labelling with SR101 as shown in figure 1A, their linear current-voltage relationship revealed by a ramp voltage from -120 to 110 mV (Fig 1B) and on their lack of action potentials firing with current pulse injections (Fig 1C). The recorded cells were systematically kept for a minimal recording time of 20 minutes and their resting membrane potential (RMP) and input resistance had to be stable for the duration of the recording. The average RMP and input resistance of 11 astrocytes recorded under control conditions were -69 ± 0.8 mV and 22 ± 6 M Ω , respectively. Diffusion of biocytin referred to as tracer coupling hereafter as illustrated in the middle panel of figure 2A, was observed in all 11 cases. The networks revealed through tracer coupling in these conditions were fairly small. They were in average composed of 11 ± 3 cells (Fig 2E) and spread over an area of 34737 ± 13254 μm^2 (Fig 2F). Bath application of Carbenoxolone (CBX, 20 μM), a non-specific blocker of gap junctions, was used to insure that tracer spread resulted from diffusion of the tracer through gap junctions. In 4 cases, CBX dramatically reduced the number of labelled cells (Fig 2A, right and 2E). In two of the four cases, only the patched cell was labelled, while 2 and 3 cells were labelled in the two remaining cases, for an average of 2 ± 0.5 cells (Fig 2E; Iman-Conover method, $P=0.016$, Holm-Sidak test, $P=0.010$). The area of labelled networks was also significantly reduced by CBX to 2297 ± 1726 μm^2 (Fig 2F; Iman-Conover method, $P=0.0009$, Holm-Sidak test, $P=0.025$).

All but one of the astrocytic networks remained confined within the dorsal part of the NVsnpr.



(Légende sur la page suivante)

Figure 3.2: Burst-inducing stimuli increase gap junctional tracer coupling between NVsnpr astrocytes.

A-D: *Left*, Schematic drawing of the brainstem slice preparation and the experimental condition used. In all cases, a single SR101 labelled astrocyte is targeted for whole-cell recording and filled with biocytin (0.2%). *Middle and right*, Photomicrographs illustrating the extent of tracer spread between NVsnpr astrocytes under the experimental condition illustrated in the left panel in absence (middle) and following bath application of CBX (20 μ M; right). Experimental conditions: **A:** Control conditions (no stimulation); **B:** local applications of NMDA (1 mM) near the recorded astrocyte; **C:** Electrical stimulation of the Vth tract (2 s trains, 40-60 Hz, 10-300 μ A, 0.2 ms pulses); **D:** Perfusion with a Ca²⁺-free aCSF. **E:** Vertical bars chart representing the number of coupled cells in the biocytin-filled networks of astrocytes under the four experimental conditions presented above (A-B-C-D) without and following bath application of CBX (20 μ M). **F:** Vertical bars chart representing the surface area of the biocytin-filled networks of astrocytes under the four experimental conditions presented above (A-B-C-D) without and following bath application of CBX (20 μ M). Data are represented as mean \pm SEM. Multiple comparisons (Holm-Sidak test) - * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.001$.

Modulation of coupling under bursting conditions

It was previously shown that 3 types of stimuli efficiently induce bursting in NVsnpr neurons (Morquette *et al.*, 2015): 1) depletion of external calcium with local application of the Ca²⁺ chelator BAPTA or perfusion with Ca²⁺-free aCSF; 2) local application of NMDA; and 3) repetitive electrical stimulation (at 40-60 Hz) of trigeminal sensory fibers travelling in the trigeminal tract and projecting to NVsnpr. We have also shown that the latter two activate NVsnpr astrocytes and that, at least for the local applications of NMDA, part of the astrocytic response depends on direct activation of NMDA astrocytic receptors (Morquette *et al.*, 2015).

The effects of all 3 types of burst-inducing stimuli on astrocytic coupling were examined using tracer coupling experiments as described above and as illustrated in the schematic drawings in figure 2B, C and D (left). NMDA (1mM) was locally applied with 10 sec pressure pulses every ~5min throughout the recordings and drastically increased astrocytic coupling (Fig 2B, middle) in 11 tested cases as reflected in the increased number of cells per labelled network (34 \pm 7 cells; Fig 2E; Iman-Conover method, $P=0.016$, Holm-Sidak test, $P < 0.001$) and the area of the networks (157272 \pm 46376 μ m²; Fig 2F; Iman-Conover method, $P=0.009$, Holm-Sidak test, $P < 0.001$).

Similar, albeit smaller, effects were obtained with electrical stimulation of sensory fibers in the trigeminal tract (2 s trains of 0.2 ms pulses delivered at 40-60 Hz, every ~ 4.5 min).

Networks revealed by tracer coupling under this condition (Fig 2C, middle; n=11) spread over an area of $81147 \pm 15270 \mu\text{m}^2$ (Fig 2F; Iman-Conover method, $P=0.009$, Holm-Sidak test, $P=0.004$) and counted in average 23 ± 6 cells (Fig 2E; Iman-Conover method, $P=0.016$, Holm-Sidak test, $P=0.012$).

NMDA local applications and sensory fibers stimulation produced large depolarizations (Fig 3A) with an average amplitude of 6.9 ± 1 mV and 3.9 ± 0.8 mV, respectively (Fig 3B). Blockade of gap junctions with CBX did not significantly alter the amplitude of responses elicited with NMDA (n=6) or sensory fibers stimulation (n=6) (Fig 3B; unpaired Student t-test, $P=0.706$ and 0.790 , respectively). No significant correlation could be found between the level of depolarization and the number of coupled cells per network in either case (NMDA, Fig 3C; Linear regression, $r=0.160$, $P=0.639$ and sensory fibers stimulation, Fig 3D; Linear regression, $r=0.268$, $P=0.425$).

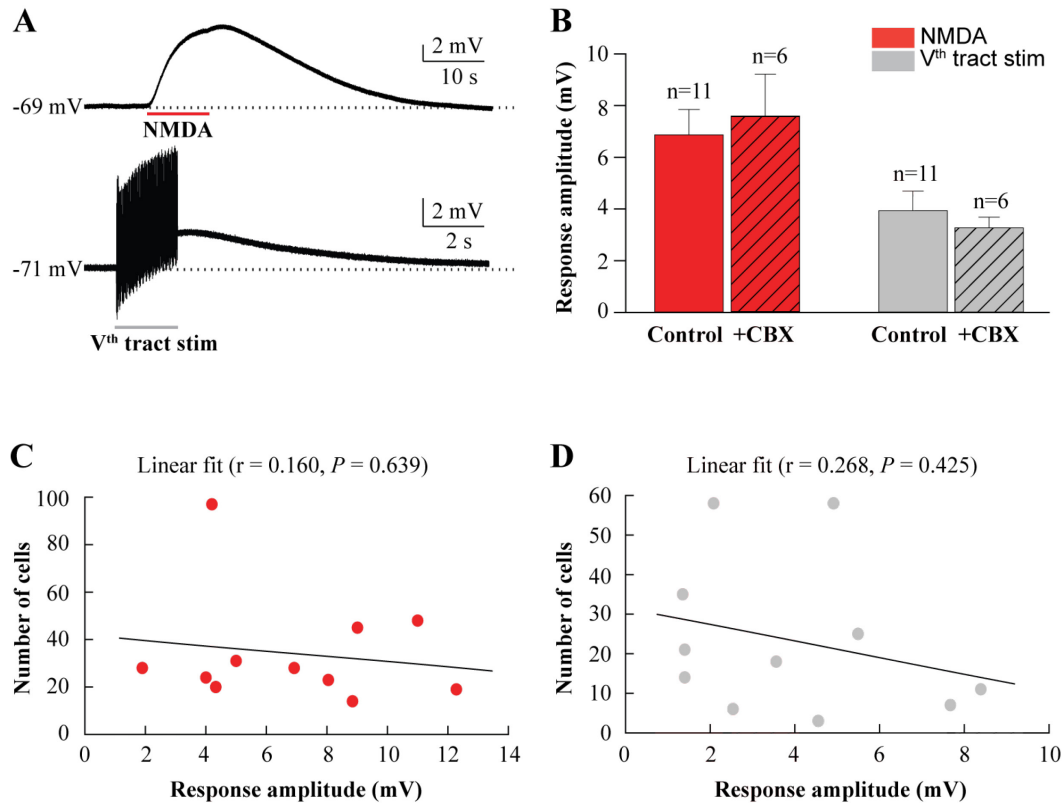


Figure 3.3: Blockade of gap-junctions does not prevent astrocytes membrane depolarisation by local applications of NMDA or sensory fibers stimulation.

A: Depolarization of an NVsnpr astrocyte following local application of NMDA (1 mM; *top*) and of another astrocyte following electrical stimulation of the V^{th} tract (2s, 60 Hz; *bottom*). **B:** Average amplitude of the depolarizations induced with local NMDA applications or electrical stimulation of the V^{th} tract in presence and absence of CBX (20 μM). **C:** Representation of the number of coupled cells in the biocytin-filled networks after NMDA application in function of the NMDA-induced membrane depolarization. Continuous line is the best-fit linear regression function (r = correlation coefficient). **D:** Representation of the number of coupled cells in the biocytin-filled networks after electrical stimulation of the V^{th} tract in function of the stimulation-induced membrane depolarization. Continuous line is the best-fit linear regression function (r = correlation coefficient). Data are represented as mean \pm SEM.

Perfusion with a Ca^{2+} -free aCSF also increased tracer coupling (Fig 2D, middle). In 10 cases, networks labelled by biocytin filling extended over an area of $108123 \pm 27450 \mu\text{m}^2$ (Fig 2F; Iman-Conover method, $P=0.009$, Holm-Sidak test, $P=0.001$) and were composed of 37 ± 10 cells (Fig 2E, Iman-Conover method, $P=0.016$, Holm-Sidak test, $P<0.001$).

Again, to insure that network labelling obtained with tracer diffusion under all 3 conditions depended on coupling through gap junctions, we repeated the same experiments with bath application of CBX. In presence of CBX, network areas were reduced to $1326 \pm 659 \mu\text{m}^2$ after local NMDA applications (Fig 2F, $n=6$; Iman-Conover method, $P=0.009$, Holm-Sidak test, $P<0.001$), to $39379 \pm 11014 \mu\text{m}^2$ with sensory fibers stimulation (Fig 2F; $n=6$; Iman-Conover method, $P=0.009$, Holm-Sidak test, $P=0.055$), and to $17987 \pm 9843 \mu\text{m}^2$ with Ca^{2+} -free aCSF (Fig 2F; $n=4$; Iman-Conover method, $P=0.009$, Holm-Sidak test, $P=0.004$). The number of cells per network was reduced to 2 ± 0.5 cells with NMDA applications (Fig 2E; $n=6$; Iman-Conover method, $P=0.016$, Holm-Sidak test, $P<0.001$), to 9 ± 2 cells with sensory fibers stimulation (Fig 2E; $n=6$; Iman-Conover method, $P=0.016$, Holm-Sidak test, $P=0.023$) and to 5 ± 1 cells with Ca^{2+} -free aCSF (Fig 2E; $n=4$; Iman-Conover method, $P=0.016$, Holm-Sidak test, $P<0.001$). Overall, CBX prevented significantly the increase of tracer coupling between NVsnpr astrocytes subsequent to exposure to burst inducing stimuli except for the increase of the mean network area observed after sensory fibers stimulation which was reduced but not significantly. Again, all but 4 networks were confined within the dorsal part of the NVsnpr.

Coupling depends on NMDA receptors and S100 β

In our previous work, we have shown that neuronal bursting in NVsnpr depended on the ability to activate astrocytes and more specifically on the astrocytic Ca^{2+} -binding protein, S100 β (Morquette *et al.*, 2015). NMDA-induced activation of astrocytes involved, at least partially astrocytic NMDA receptors. To determine whether NMDA receptors and S100 β are also required for astrocytic coupling, we examined the effects of NMDA local applications on biocytin labeling in slices treated with an anti-S100 β antibody (40 $\mu\text{g/ml}$) in one set of experiments and with MK-801 (10 μM), a selective NMDA-receptor antagonist, in a different set of experiments. Local application of the anti-S100 β antibody drastically abolished astrocytic coupling induced with local NMDA applications, as shown in the example in figure

4A, in 3 tested cases, with a number of 4 ± 1 cells per network (Fig 4d; Kruskal-Wallis one-way ANOVA, $P=0.002$, Dunn's test, $P<0.05$) and an average network area of $10917\pm 8589\mu\text{m}^2$ (Fig 4E; Kruskal-Wallis one-way ANOVA, $P=0.021$, Dunn's test, $P<0.05$) whereas in 5 tested cases, treatment of the tissue with a different antibody, as in the example shown in figure 4B, did not significantly reduce coupling (24 ± 12 cells; Fig 4D; Kruskal-Wallis one-way ANOVA $P=0.002$, Dunn's test, $P>0.05$ and $49971\pm 26566\mu\text{m}^2$; Fig 4E; Kruskal-Wallis one-way ANOVA $P=0.021$, Dunn's test, $P>0.05$). Not surprisingly, in 6 tested cases, MK-801 decreased the amplitude of the depolarizations induced by local applications of NMDA from 6.9 ± 1 mV to 3.2 ± 0.4 mV (Mann-Whitney Rank Sum test, $P=0.041$), and lowered the number of cells per network (9 ± 3 cells; Fig 4D; Kruskal-Wallis one-way ANOVA, $P=0.021$, Dunn's test, $P<0.05$). The average network area was also reduced, but not to a significant extent ($65486\pm 28961\mu\text{m}^2$; Fig 4E; Kruskal-Wallis one-way ANOVA, $P=0.002$ Dunn's test, $P>0.05$, respectively). Overall, the anti-S100 β antibody application significantly prevented the increase of tracer coupling between NVsnpr astrocytes by local application of NMDA whereas the non-specific antibody application did not have a significant effect. Blockade of NMDA receptors with MK-801 prevented the increase of the number of cells per network induced by NMDA application but did not significantly reduce the increase of the mean network area. All astrocytic networks were confined within the border of the dorsal part of the NVsnpr except for 2 cases.

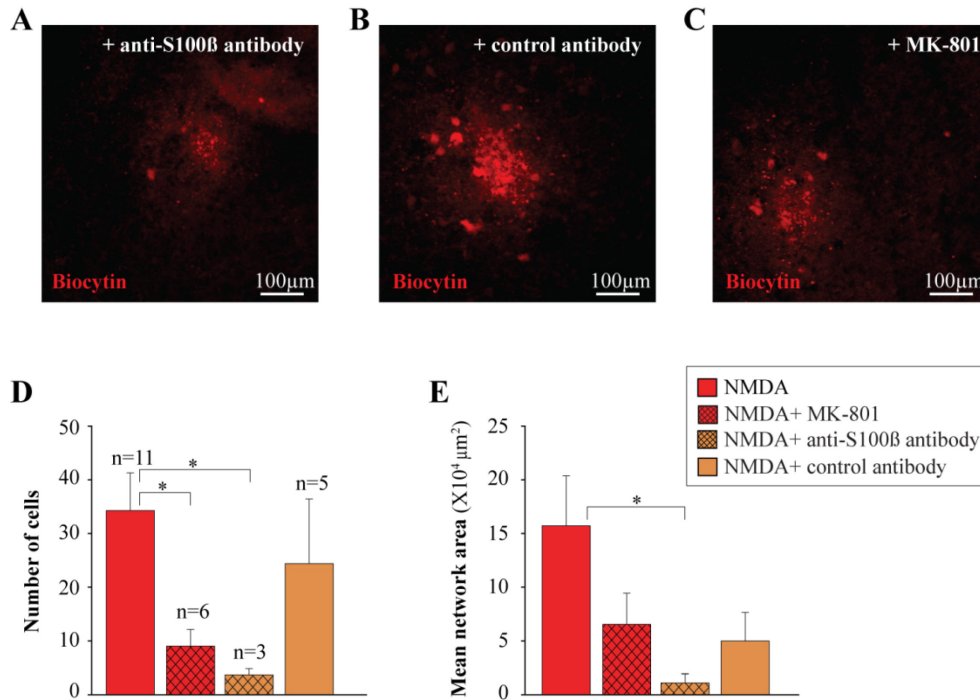


Figure 3.4: Blockade of endogenous S100 β or of NMDA receptors prevent the increase of tracer coupling between NVsnpr astrocytes induced by local applications of NMDA.

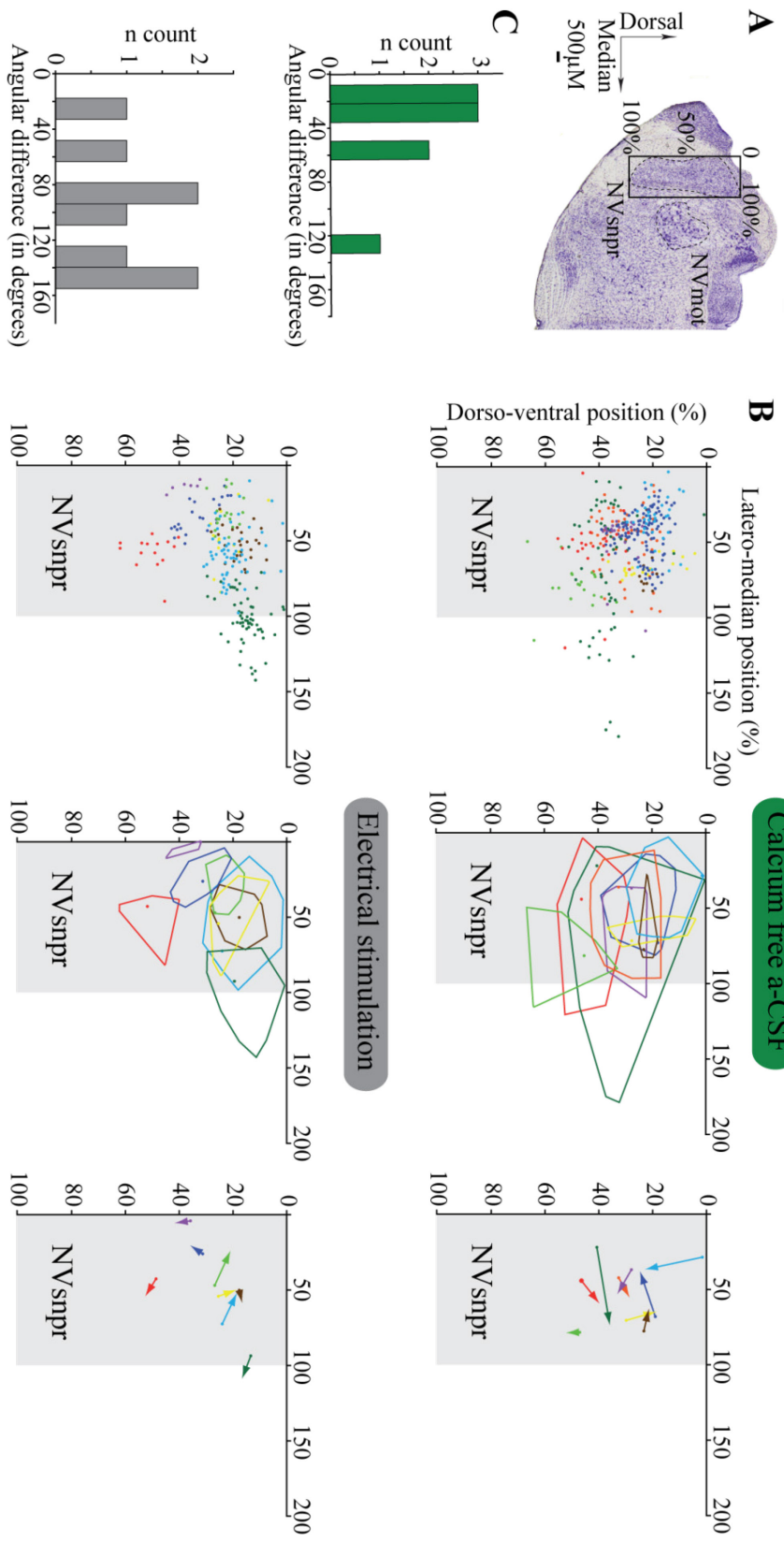
Photomicrographs illustrating the extent of tracer coupling between NVsnpr astrocytes with local applications of NMDA after: **A**: pretreating the tissue with an anti-S100 β antibody (40 $\mu\text{g/ml}$). **B**: pretreating the tissue with an unspecific (control) antibody (120 $\mu\text{g/ml}$). **C**: following bath application of the NMDA receptor antagonist MK-801 (10 μM). Vertical bars chart of the number of coupled cells (**D**) and mean area (**E**) of biocytin-filled networks of astrocytes with local applications of NMDA alone or in presence of an anti-S100 β antibody, a non-specific (control) antibody, or MK-801. Data are represented as mean \pm SEM. Multiple comparisons, (Dunn's test) - * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.001$.

Anatomical organization of astrocytic networks

Having shown that burst-inducing stimuli modulate astrocytic coupling, we then characterized the location, shape and organization of astrocytic networks revealed under two conditions: the Ca^{2+} -free aCSF condition where we presume that all cells are submitted to a uniform condition and the electrical stimulation condition where only a few cells of the network are putatively receiving inputs from incoming afferents. This analysis was performed only when the boundaries of NVsnpr could be clearly defined on imaging which was the case for 9 of the 10 networks revealed under Ca^{2+} -free aCSF, and for 8 of the 11 networks revealed after electrical stimulation of the Vth tract.

As evident in Fig 5B, most cells of the astrocytic networks observed under the 2 conditions remained within the boundaries of NVsnpr. Spread of the tracer to cells running towards the motor nucleus occurred in 4 of the 9 astrocytic networks obtained under Ca^{2+} -free aCSF, but even in those cases, the majority of labelled cells (82% in 3 out of these 4 networks) were confined to NVsnpr. Only few cells crossed the border of NVsnpr in networks revealed after electrical stimulation of the Vth tract. In one case, the spread occurred at the mediodorsal border into the lateral supratrigeminal area, which is often considered to form a homogeneous neuronal population with dorso-medial NVsnpr neurons on the basis of cytoarchitecture. In a second case, 2 astrocytes crossed to the very dorsal part of ventral NVsnpr.

There was no difference in the shape of networks elicited under the two conditions as estimated by their “circularity” (ratio of 1.97 ± 0.24 in Ca^{2+} -free aCSF and 1.84 ± 0.35 with electrical stimulation, Mann-Whitney Rank Sum Test, $P=0.736$) indicating that networks revealed by electrical stimulation did not have a particular shape in comparison to those revealed by the Ca^{2+} -free aCSF which presumably open all gap junctions equally. However, a difference was perceived in the direction of tracer spread between the two conditions. In Ca^{2+} -free aCSF, the main orientation vectors pointed preferentially towards the center of the dorsal part of the NVsnpr (Fig 5B, top, right) with a mean angular difference of 39.5 ± 12.7 degrees (Fig 5C, top), whereas with electrical stimulation, the vectors pointed towards the periphery (Fig 5B, bottom, right) with a significantly different mean angular difference of 99.5 ± 17 degrees (Fig 5C, bottom, Student t-test, $P=0.012$). Overall, this analysis shows that, under both conditions, astrocytic networks are mostly confined to the dorsal part of the NVsnpr. Their shape is not dependent on the type of stimulus used to open up the gap junctions but their preferential orientation differs.



(Légende page suivante)

Figure 3.5: Characterisation of networks obtained under two different conditions.

A: Photomicrograph of a Nissl stained section of rat brainstem showing how a reference rectangle was traced on the borders of NVsnpr (in each experimental slice) and used to express the position of each astrocytic network in percentage of the length of the dorso-ventral and latero-median axes. **B:** Comparison of networks obtained in Ca^{2+} -free aCSF (Top; $n=9$) and with electrical stimulation of the V^{th} tract (Bottom; $n=8$). *Left:* Distribution of all astrocytes labelled in all networks included in this analysis. Each network is represented by a different color. *Middle:* Boundaries of each network traced as described above in Fig 1. The dot in each area represents the position of the patched cell. *Right:* Vectorial analysis of the preferential orientation of tracer spread within the network. The dot represents the patched cell and the arrow the vector of preferential direction. In each graph, the gray box represents the schematic NVsnpr. **C:** Distribution of the angular difference of main vectors of the preferential orientation of astrocytic networks expressed in absolute number in relation to the center of the dorsal part of NVsnpr (that is the position corresponding to 25% on the dorso-ventral axis and 50% on the latero-dorsal axis) under the two experimental conditions depicted in B. The mean angular difference was 39.5 ± 12.7 degrees in Ca^{2+} -free aCSF and 99.5 ± 17 degrees with electrical stimulation, indicating a preferential orientation towards the centre of the nucleus in the former condition and towards the periphery in the latter (Student t-test, $P=0.012$).

Necessity of astrocytic coupling for neuronal bursting

The above results show that stimuli that induce neuronal bursting increase coupling among NVsnpr astrocytes. To determine whether astrocytic coupling is required for neuronal bursting, we performed whole-cell patch clamp recordings of NVsnpr neurons in which rhythmic firing was induced by local application of NMDA as illustrated in the schematic drawing in figure 6A (middle). Bursting in NVsnpr neurons depends on activation of a voltage-gated sodium persistent current (I_{NaP}) which activation range is roughly between -60 and -50 mV (Morquette *et al.*, 2015). Thus, as previously shown, NMDA locally applied induces bursting only if the cell is hyperpolarized through current injection prior to the application to maintain the membrane potential within the activation range of I_{NaP} (see Morquette *et al.*, 2015). Using a similar approach, we elicited bursting in 15 NVsnpr neurons as in the example shown in Fig 6A (left trace and inset). The bursts appeared at around -60 mV and consisted in recurrent plateaus of 16 ± 0.9 mV that lasted 458 ± 113 ms and occurred at an average frequency of 2 ± 0.4 Hz. In 11 of the 15 cases (73%), the NMDA-induced bursting was completely blocked following bath-application of CBX (20 μM) (Fig 6B, left trace and inset). Table 1 compares the electrophysiological properties of the recorded neurons before and after bath application of CBX. Spontaneous firing (Fig 6C, top traces) was observed in 7

of the 15 cells (47%) and CBX application disrupted this only in 2 cells. Prior to CBX application, 14 of the 15 neurons (96%) presented a depolarizing sag (Fig 6C, bottom traces) upon strong membrane hyperpolarization that gave rise to a rebound action potential in all but one neuron (87%). CBX application abolished the sag in 2 neurons and the rebound firing in only one cell. Bath application of CBX caused a slight but significant hyperpolarisation of both the RMP (Table 1; paired Student t-test, $P=0.015$) and firing threshold (Table 1; Wilcoxon Signed Rank test, $P=0.002$) of the recorded neurons. Overall, CBX does not seem to cause substantial alterations of NVsnpr neurons membrane properties that could account for the observed effects on burst firing.

TABLE 3.1

Effects of CBX on NVsnpr neurons membrane and firing properties

| Parameters | Control | CBX | <i>P</i> |
|-----------------------|----------|----------|---------------------|
| RMP (mV) | -52±1 | -54±1 | 0.015 ^{1*} |
| Input resistance (MΩ) | 298±36 | 281±30 | 0.679 ² |
| Firing threshold (mV) | -43±1 | -45±1 | 0.002 ^{2*} |
| Firing frequency (Hz) | 8.3±3 | 13.5±9.2 | 0.625 ² |
| AP amplitude (mV) | 75±2 | 76±2 | 0.669 ¹ |
| AP duration (ms) | 0.99±0.1 | 0.98±0.1 | 0.389 ² |
| AHP amplitude (mV) | -5.5±0.6 | -6.3±0.9 | 0.349 ¹ |

¹*P* values were obtained from the paired Student t-test comparing the differences before and after CBX treatment.

²*P* values were obtained from the Wilcoxon Signed Rank test comparing the differences before and after CBX treatment.

However, in order to unequivocally discard an unspecific effect of CBX on I_{NaP} and to assess that the neurons could still fire rhythmically, we tested whether local application of S100β could elicit bursting once the NMDA-induced bursting is abolished. Indeed, in all 3 tested cases, local applications of S100β elicited bursting in NVsnpr neurons prior to CBX

application (Fig 6A, right trace and inset) as with NMDA but also in the presence of CBX (Fig 6B, right trace and inset), even when the NMDA-induced bursting was abolished (Fig 6B, left trace and inset).

CBX is a non-specific blocker of all gap junctions, neuronal as well as astrocytic. To assess that the effect of CBX on burst firing was not due to an action on neuronal coupling, biocytin filling was performed for at least 30 min in 5 NVsnpr neurons in which bursting was induced repetitively with local applications of NMDA. There was no evidence of tracer spread to another cell in any of the 5 cases tested; only the recorded neuron was labelled in each case (Fig 6D) indicating that NVsnpr neurons are not coupled together.

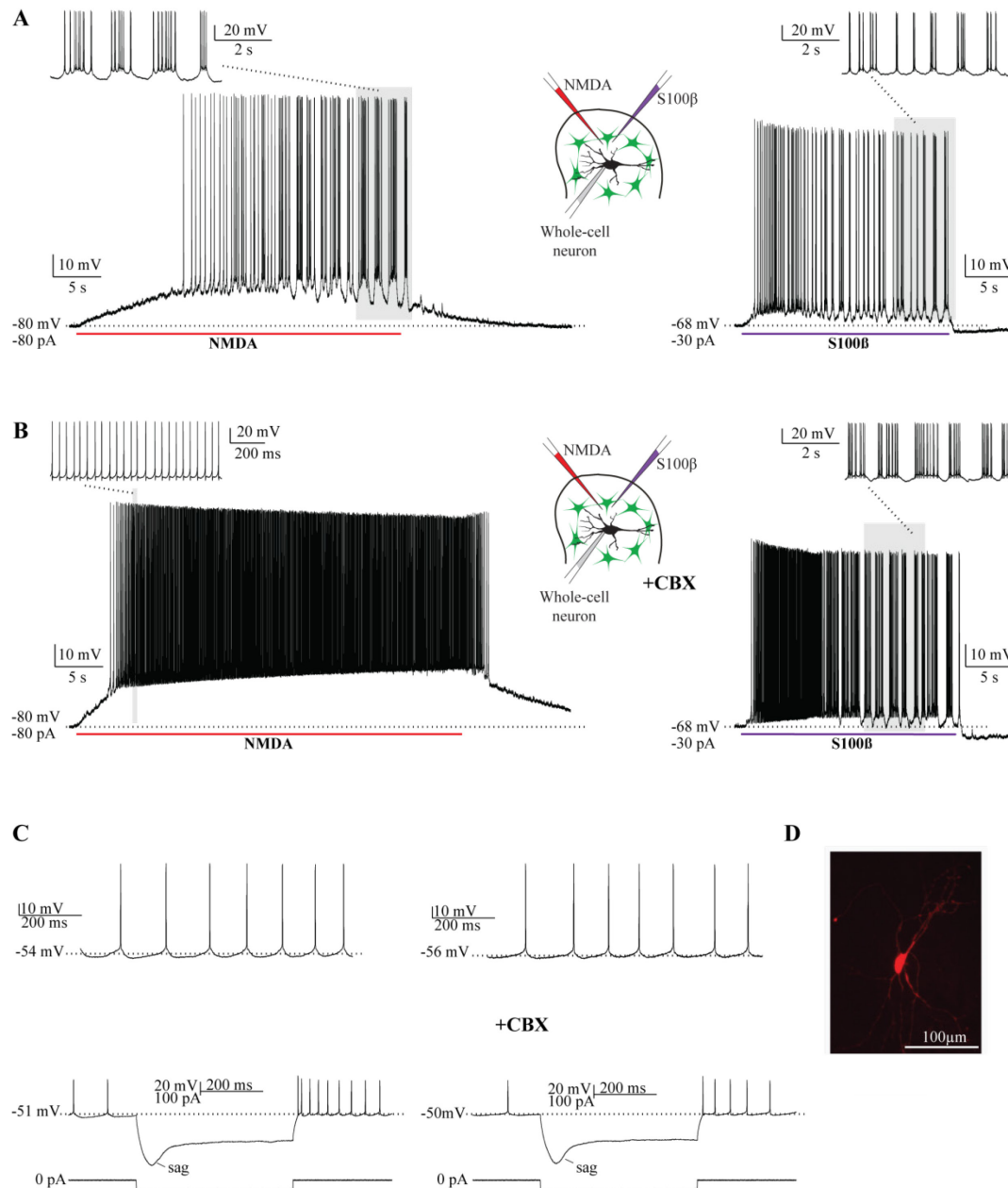


Figure 3.6: Blockade of gap-junctions impairs NMDA-induced bursting but not S100β-induced bursting.

A: Local application of either NMDA (1 mM) (left trace and inset) or S100β (129 μM) (right trace and inset) induces bursting in an NVsnpr neuron. **B:** After bath application of CBX (20 μM), only tonic firing could be elicited by NMDA (left trace and inset) while S100β still causes the neuron to burst (right trace and inset). **C:** *Top*, Example of spontaneous activity recorded in an NVsnpr neuron, in control condition (*left*) and after bath application of CBX (*right*). *Bottom*, Response of an NVsnpr neuron to membrane hyperpolarization showing a depolarizing sag at the onset of the hyperpolarizing pulse in control condition (*left*) and after bath application of CBX (*right*). **D** Photomicrograph of a biocytin-filled NVsnpr neuron after local applications of NMDA. No evidence of tracer coupling could be seen.

To further discard an effect of CBX on a putative coupling between NVsnpr neurons or an indirect effect of this drug on the neurons intrinsic properties, we then used GAP26, a connexin mimetic peptide that specifically blocks Cx43, which are expressed only in astrocytes (reviewed in (Nagy *et al.*, 2004); (Yamamoto, Ochalski, Hertzberg, & Nagy, 1990a, 1990b). GAP26 (193 μ M) was bath-applied in a closed circuit. In 3 of 4 tested cells, GAP26 (193 μ M) blocked the NMDA-induced bursting recorded prior to its application (Fig 7A). Complete blockade of bursting under GAP26 occurred only after perfusion with the drug over 60 min, but significant effects could be detected on the plateaus amplitude and duration after as little as 15 minutes of perfusion (Fig 7B; one way repeated measures ANOVA, $P < 0.001$, Holm-Sidak test, $P = 0.0009$; and Fig 7C; one way repeated measures ANOVA, $P < 0.001$, Holm-Sidak test, $P = 0.0003$, respectively).

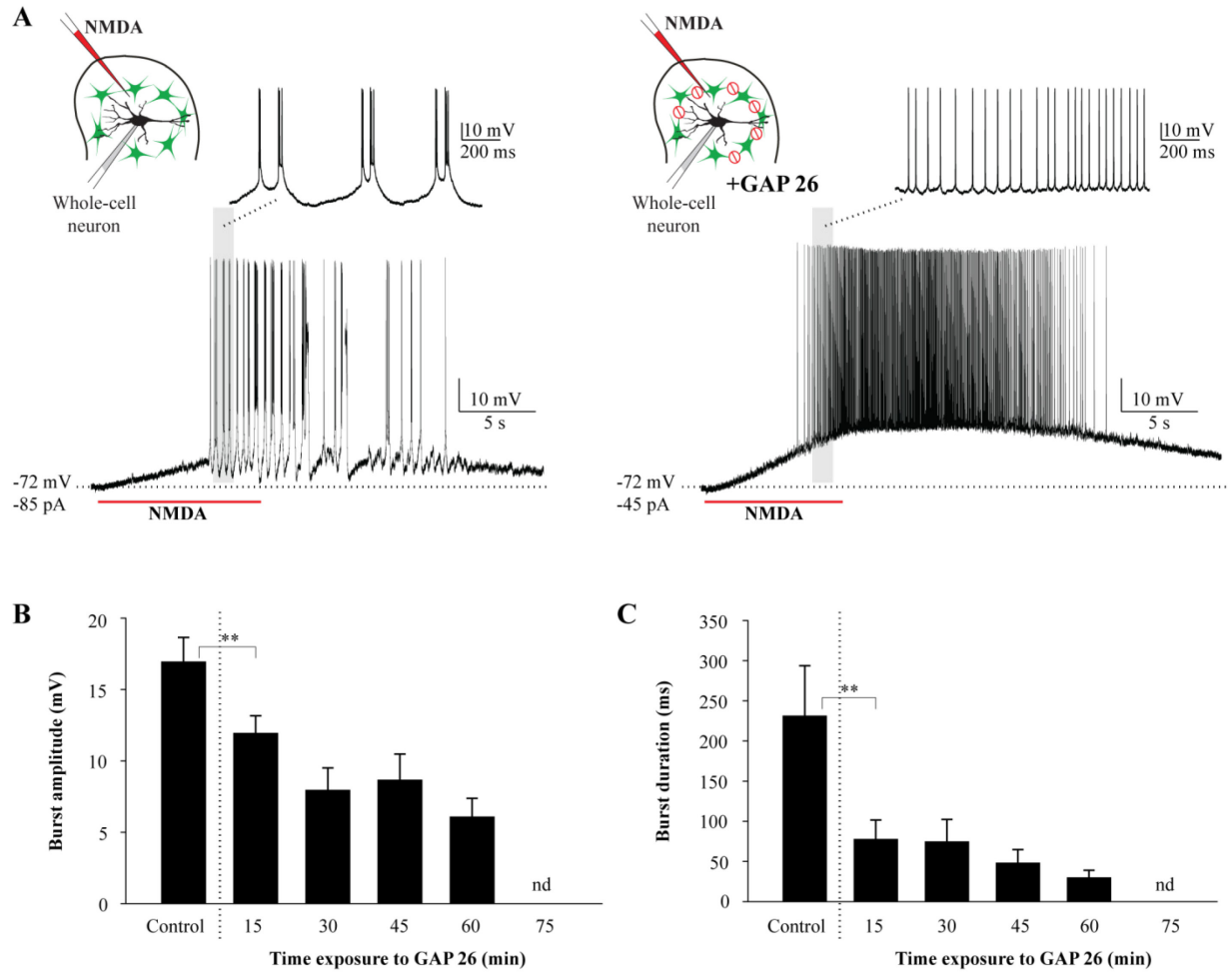


Figure 3.7: Specific connexin 43 inhibitor (GAP26) impairs NMDA-induced bursting.

A: Local application of NMDA (1 mM) induces bursting in an NVsnpr neuron (left trace and inset). Following bath application of GAP26 (193 μ M), only tonic firing could be elicited by NMDA (right trace and inset). **B:** Vertical bars chart representing the amplitude of the plateaus of the NMDA-induced bursts all along GAP26 application. **C:** Vertical bars chart representing the duration of the plateaus of the NMDA-induced bursts all along GAP26 application. Data are represented as mean \pm SEM. Multiple comparisons (Holm-Sidak method) - * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.001$.

DISCUSSION

This study shows that in the main sensory nucleus of the trigeminal nerve (NVsnpr), very little coupling occurs between astrocytes studied in an *in vitro* slice preparation under resting conditions. However, as documented elsewhere, for both neurons and astrocytes, gap junction coupling is dynamic and can be regulated by a variety of stimuli and conditions (De Pina-Benabou, Srinivas, Spray, & Scemes, 2001; De Vuyst *et al.*, 2006; De Vuyst *et al.*, 2007; Enkvist & McCarthy, 1994; Marrero & Orkand, 1996; Muller, Moller, Neuhaus, & Kettenmann, 1996; Rouach, Glowinski, & Giaume, 2000; Rouach, Tence, Glowinski, & Giaume, 2002; Serrano, Robitaille, & Lacaille, 2008; Valiunas & Weingart, 2000; Wallraff, Odermatt, Willecke, & Steinhauser, 2004). A distinctive characteristic of NVsnpr neurons is their ability to switch their firing pattern from a regular tonic mode to a rhythmic bursting mode and we postulate that this switch of firing pattern corresponds to a switch of function as well. In the tonic mode, the neurons function as a sensory relay, while in the rhythmic mode they may function as a motor command for chewing movements. The transition from one mode to the other occurs under conditions that produce a strong activation of NVsnpr neurons, such as repetitive stimulation of the afferent inputs to the nucleus or local application of NMDA. Both types of stimuli cause a decrease of $[Ca^{2+}]_e$ that enhances a sodium persistent current responsible for the rhythmic bursting pattern and induce a Ca^{2+} signal in astrocytes. Here, we show that in addition both types of stimuli also increase coupling significantly among astrocytes. Removing Ca^{2+} from the perfusing medium to mimic the effect of these stimuli also increases coupling dramatically, which is not surprising since Ca^{2+} -free medium is known to open gap junctions (Giaume, Leybaert, Naus, & Saez, 2013; H. Li *et al.*, 1996; Ramachandran, Xie, John, Subramaniam, & Lal, 2007; Stout, Costantin, Naus, & Charles, 2002; Torres *et al.*, 2012; Ye, Wyeth, Baltan-Tekkok, & Ransom, 2003). Many other factors are known to regulate gap junction coupling, including rise of intracellular Ca^{2+} , depolarization, activation of astrocytic NMDA receptors and increase of extracellular K^+ (De Pina-Benabou *et al.*, 2001; De Vuyst *et al.*, 2006; De Vuyst *et al.*, 2007; Dietzel, Heinemann, Hofmeier, & Lux, 1982; Enkvist & McCarthy, 1994; Muller *et al.*, 1996; Serrano *et al.*, 2008; Valiunas & Weingart, 2000; N. Wang *et al.*, 2012). Indeed, local application of NMDA or electrical stimulation of the glutamatergic sensory fibers are likely to cause an increase of

extracellular K^+ . We show here that they produce a depolarization and have already shown that they also evoke intracellular increases of Ca^{2+} (see Morquette *et al.*, 2015), and that at least some of these effects are mediated by astrocytic NMDA receptors (Morquette *et al.*, 2015). However, these factors are probably not the most determinant for astrocytic coupling in NVsnpr. First, we found no correlation between the amplitude of the induced depolarization and the extent of coupling. Second, MK-801, a specific blocker of NMDA receptors, reduced the number of coupled cells and the area of astrocytic networks (not significantly), but not as dramatically as the anti-S100 β antibody. The NMDA-induced depolarization in astrocytes was also only partially blocked by MK-801. These residual effects of NMDA in presence of the blocker may result from the fact that neuronal NMDA receptors need to first be activated and released from their Mg^{2+} block before MK-801 enters into the pore and blocks the channel (Huettner & Bean, 1988). Extracellular blockade of S100 β with the antibody was far more efficient in preventing the NMDA-induced coupling, indicating that the drop in $[Ca^{2+}]_e$ is probably the most important factor in the case of NVsnpr astrocytes. S100 β release is downstream of astrocytic NMDA receptors activation. Thus, the fact that the S100 β antibody blocks coupling (more efficiently than MK-801) indicates that the extracellular Ca^{2+} decrease produced by release of S100 β is more important to regulate coupling than the rise of intracellular Ca^{2+} , depolarization and increase of extracellular K^+ produced by NMDA. S100 β is known to have several intracellular and extracellular effects including effects on apoptosis and cell differentiation, proliferation and migration. It's most well described extracellular actions are through activation of RAGE (receptor for advanced glycation end products) which transduces an effect in a variety of cell types with different outcomes (Donato *et al.*, 2009). However, it's potential effect on $[Ca^{2+}]_e$ are largely ignored. S100 β binds Ca^{2+} with an apparent dissociation constant (K_d) of 25 μ M and the anti- S100 β antibody interferes with its Ca^{2+} binding ability. Pre-treatment of the tissue with this antibody prevents the extracellular decrease of $[Ca^{2+}]_e$ induced by electrical stimulation of Vth tract and local NMDA applications (Morquette *et al.*, 2015).

The spatial organization of NVsnpr astrocytic networks determines or follows the boundaries of a distinct functional domain

Under all conditions, even when coupling was at its maximum, most of the astrocytic networks revealed remained relatively small when compared to those described in other areas of the brain. Astrocytic networks in the striatum and in area CA1 of the hippocampus are composed of hundreds of cells while in the CA3 area of the hippocampus as in the layer IV of the barrel cortex astrocytic networks are smaller and count around 50 cells (Adermark & Lovinger, 2008; D'Ambrosio *et al.*, 1998; Houades, Koulakoff, Ezan, Seif, & Giaume, 2008). Astrocytes in the dorsal part of the NVsnpr showed coupling but the networks were considerably smaller with 11 ± 3 cells in control conditions to a maximum of 37 ± 10 cells in Ca^{2+} -free condition. To insure that tracer diffusion occurred through gap junction coupling, and not because of leakage from the electrode and uptake from the extracellular environment, we assessed dye coupling under CBX, a blocker of gap junctions. Indeed, CBX disrupted dye diffusion under all conditions tested. The very small labelling that persisted could either be due to leakage from the electrode when approaching the astrocyte to be recorded or the fact that we used a low dose of CBX, 20 μM , instead of what is usually used, 100 μM , to limit the numerous unspecific effects of this drug.

Interestingly, most networks remained confined to the dorsal part of NVsnpr and did not spread to the ventral part. Dye spread outside of the dorsal part of NVsnpr was observed in only 7 of the 53 networks for which the boundaries of the nucleus could be clearly defined with anatomical landmarks. In all, but two, of these 7 cases, only very few cells were found out of the dorsal part of the nucleus and most frequently they ran towards the motor nucleus to which NVsnpr neurons project (Kolta, Westberg, & Lund, 2000; Y. Q. Li, Takada, Kaneko, & Mizuno, 1995; Y. Q. Li, Takada, & Mizuno, 1993; Pinganaud, Bernat, Buisseret, & Buisseret-Delmas, 1999; Stanek, Cheng, Takatoh, Han, & Wang, 2014; Travers & Norgren, 1983; Yoshida *et al.*, 1998). It is noteworthy, that in the Ca^{2+} free condition, where junctions are putatively maximally open, even when the patched astrocyte was close to any of the borders of the dorsal part of the nucleus, the dye spread preferentially towards the center of this functionally distinct part of the nucleus and rarely crossed outside of it. All NVsnpr neurons are mostly driven by sensory inputs from the trigeminal nerve, but the dorsal and ventral parts

are functionally linked to different behaviors. The ventral part receives mostly inputs related to whiskers and is linked to whisking (Erzurumlu & Killackey, 1983; Furuta *et al.*, 2008), whereas the dorsal part receives mostly inputs from the jaw muscles and oral cavity and is linked to jaw movements (Eisenman, Landgren, & Novin, 1963; Takemura, Sugimoto, & Shigenaga, 1991; Tsuboi *et al.*, 2003). Therefore, such a precise regulation of coupling suggests that the astrocytic networks follow, or may even define, functional boundaries.

The concept that intercellular communication between astrocytes can be limited to form restricted networks associated to distinct functional units has slowly emerged in the past decade (Giaume & Liu, 2012). Before that, virtually all astrocytes were considered to communicate through a syncytium (Mugnaini, 1986). However, emerging evidence from new functional studies suggest that in brain areas that are characterized by a clear anatomical compartmentalization of functionally distinct neuronal populations, astrocytic communication is highly restricted. In the barrel cortex for instance, gap-junction mediated communication between astrocytes is much stronger within a barrel and much weaker between two adjacent barrels (Houades *et al.*, 2008). Astrocytic networks of this area overlap neural compartments forming the barrels suggesting that they may contribute to the confinement of neuroglial interaction within a defined barrel (Petersen & Sakmann, 2000). Similar findings have been obtained in olfactory glomeruli, where dye-coupling experiments have shown a preferential communication between astrocytes within glomeruli and not between astrocytes in adjacent glomeruli. In both cases, the astrocytic networks are oriented towards the center of the glomerule or of the barrel (Roux, Benchenane, Rothstein, Bonvento, & Giaume, 2011), just as is apparently the case here for astrocytic networks obtained in the Ca^{2+} -free condition. This manipulation was used as a mean of opening up gap junctions uniformly across the entire preparation since low extracellular Ca^{2+} concentration is known to increase gap junction coupling with a direct effect on the extracellular loop of connexins (Contreras, Saez, Bukauskas, & Bennett, 2003; Stout *et al.*, 2002). In contrast, most networks where coupling was induced by stimulation of the Vth tract were oriented towards the lateral border of the nucleus. This suggests that the tracer diffusion may reflect an activity gradient, because this is where sensory fibers projections are the densest and where their putative terminals onto astrocytes are presumably most retained in the slice preparation.

Decoupling astrocytes disrupts neuronal bursting in NVsnpr

Astrocytes are essential for rhythmogenesis in dorsal NVsnpr (Morquette *et al.*, 2015). Here, we examined to which extent coupling between astrocytes is also required. In the vast majority of cases, decoupling astrocytic networks, with a non-specific gap junction blocker (CBX) or with a specific Cx43 blocker (GAP26) (Boitano & Evans, 2000; Desplantez, Verma, Leybaert, Evans, & Weingart, 2012), disrupted neuronal bursting induced by local applications of NMDA. Some studies reported a contribution of astrocytic coupling for K⁺ clearance which may have an effect on the activity of the neuronal network (Wallraff *et al.*, 2006; F. Wang *et al.*, 2012). However, this is unlikely to be the case here since rhythmic firing could still be induced with S100 β after blockade of gap junctions.

Besides acting on gap junctions, CBX is also known to have many effects including some on ionic conductances (Osborne & Williams, 1996; Rekling, Shao, & Feldman, 2000; Travagli, Dunwiddie, & Williams, 1995). Indeed, it has been reported to disrupt rhythmic firing in the locomotor and respiratory CPGs as well as in hippocampal and cortical neuronal cultures (Rouach, Segal, Koulakoff, Giaume, & Avignone, 2003). In the locomotor CPG, this effect is achieved through a blockade of neuronal gap junctions (Elsen, Shields, Roe, Vandam, & Kelty, 2008; Tazerart, Vinay, & Brocard, 2008), whereas in the pre-Bötzing Complex of the respiratory CPG, and the hippocampal and cortical cultures, other non-specific effects (on input resistance, firing rate, firing threshold, and I_{Na}) have also contributed (Elsen *et al.*, 2008). Here we used a low dose of CBX (20 μ M) to minimize some of the above effects reported at a dose of 100 μ M. Although, this does not rule out all non-specific effects of CBX, we only observed a small hyperpolarization of the RMP and the firing threshold.

The fact that rhythmic bursting could still be elicited with S100 β under CBX suggests that CBX did not alter the conductance and properties underlying bursting. Two other observations plead against the possibility that CBX disrupts bursting by acting on neuronal gap junctions. First, dye coupling was never observed when neurons were filled with biocytin. Second, the effects of CBX on bursting were reproduced with bath application of GAP26, a specific blocker of Cx43 (Boitano & Evans, 2000; Desplantez, Verma, Leybaert, Evans, & Weingart, 2012) which are exclusively found in astrocytes. Bath application of GAP26 abolished the rhythmic bursting in 3 of 4 neurons. This massive effect is surprising, given that astrocytes

also express Cx30 which levels of expression are as important and equivalent to those of Cx43 in the brainstem (Nagy, Patel, Ochalski, & Stelmack, 1999). In the hippocampus astrocytic coupling is preserved through Cx30 in transgenic mice with a conditional deletion of Cx43 (Wallraff *et al.*, 2006). The strong effect of GAP26 on bursting may reflect a low expression of Cx30 in the NVsnpr due to regional distribution or age. Indeed, it has been shown that the expression of Cx30 is low before P20 in the brainstem (Nagy *et al.*, 1999), and P15 to P21 rats were mostly used for this study.

Conclusion

Astrocytic coupling is important for a number of physiological functions like extracellular ionic homeostasis and redistribution of glucose to active neurons. Here, we demonstrate that it is also essential for rhythmogenesis in a nucleus that may putatively form the core of the masticatory CPG. We have already shown that rhythmogenesis in this nucleus depends on release of S100 β , but occurs independently from activation of purinergic receptors ruling out the necessity of release of ATP from astrocytes as a potential mediator (Morquette *et al.*, 2015). Whether coupling is necessary for release of S100 β or other factors remains an open question. Astrocytes implication in neuronal network synchronization (Chever *et al.*, 2016; Sasaki *et al.*, 2014) and in other rhythmic phenomena like cortical slow oscillations, cortical up state, gamma oscillation and recognition memory has been demonstrated (Fellin *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2014; Poskanzer & Yuste, 2011). It would be interesting to assess whether these phenomena also depend on S100 β release and/or astrocytic coupling.

REFERENCES

- Adermark, L., & Lovinger, D. M. (2008). Electrophysiological properties and gap junction coupling of striatal astrocytes. *Neurochem Int*, 52(7), 1365-1372. doi:10.1016/j.neuint.2008.02.006
- Armstrong, C. M. (1999). Distinguishing surface effects of calcium ion from pore-occupancy effects in Na⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(7), 4158-4163.
- Boitano, S., & Evans, W. H. (2000). Connexin mimetic peptides reversibly inhibit Ca²⁺ signaling through gap junctions in airway cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 279(4), L623-630.
- Bourque, M. J., & Kolta, A. (2001). Properties and interconnections of trigeminal interneurons of the lateral pontine reticular formation in the rat. *J Neurophysiol*, 86(5), 2583-2596.
- Brocard, F., Shevtsova, N. A., Bouhadfane, M., Tazerart, S., Heinemann, U., Rybak, I. A., & Vinay, L. (2013). Activity-dependent changes in extracellular Ca²⁺ and K⁺ reveal pacemakers in the spinal locomotor-related network. *Neuron*, 77(6), 1047-1054. doi:10.1016/j.neuron.2013.01.026
- Brocard, F., Verdier, D., Arsenault, I., Lund, J. P., & Kolta, A. (2006). Emergence of intrinsic bursting in trigeminal sensory neurons parallels the acquisition of mastication in weanling rats. *J Neurophysiol*, 96(5), 2410-2424. doi:10.1152/jn.00352.2006
- Chever, O., Dossi, E., Pannasch, U., Derangeon, M., & Rouach, N. (2016). Astroglial networks promote neuronal coordination. *Sci Signal*, 9(410), ra6. doi:10.1126/scisignal.aad3066
- Conover, W. J., & Iman, R. L. (1981). Rank Transformations as a Bridge between Parametric and Nonparametric Statistics - Rejoinder. *American Statistician*, 35(3), 132-133. doi: Doi 10.2307/2683978
- Contreras, J. E., Saez, J. C., Bukauskas, F. F., & Bennett, M. V. (2003). Gating and regulation of connexin 43 (Cx43) hemichannels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(20), 11388-11393. doi:10.1073/pnas.1434298100
- D'Ambrosio, R., Wenzel, J., Schwartzkroin, P. A., McKhann, G. M., 2nd, & Janigro, D. (1998). Functional specialization and topographic segregation of hippocampal astrocytes. *J Neurosci*, 18(12), 4425-4438.
- De Pina-Benabou, M. H., Srinivas, M., Spray, D. C., & Scemes, E. (2001). Calmodulin kinase pathway mediates the K⁺-induced increase in Gap junctional communication between mouse spinal cord astrocytes. *J Neurosci*, 21(17), 6635-6643.
- De Vuyst, E., Decrock, E., Cabooter, L., Dubyak, G. R., Naus, C. C., Evans, W. H., & Leybaert, L. (2006). Intracellular calcium changes trigger connexin 32 hemichannel opening. *EMBO J*, 25(1), 34-44. doi:10.1038/sj.emboj.7600908
- De Vuyst, E., Decrock, E., De Bock, M., Yamasaki, H., Naus, C. C., Evans, W. H., & Leybaert, L. (2007). Connexin hemichannels and gap junction channels are differentially influenced by lipopolysaccharide and basic fibroblast growth factor. *Mol Biol Cell*, 18(1), 34-46. doi:10.1091/mbc.E06-03-0182
- Desplantez, T., Verma, V., Leybaert, L., Evans, W. H., & Weingart, R. (2012). Gap26, a connexin mimetic peptide, inhibits currents carried by connexin43 hemichannels and gap junction channels. *Pharmacol Res*, 65(5), 546-552. doi:10.1016/j.phrs.2012.02.002

- Dietzel, I., Heinemann, U., Hofmeier, G., & Lux, H. D. (1982). Stimulus-induced changes in extracellular Na⁺ and Cl⁻ concentration in relation to changes in the size of the extracellular space. *Exp Brain Res*, *46*(1), 73-84.
- Donato, R., Sorci, G., Riuzzi, F., Arcuri, C., Bianchi, R., Brozzi, F., . . . Giambanco, I. (2009). S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim Biophys Acta*, *1793*(6), 1008-1022. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.11.009
- Donga, R., & Lund, J. P. (1991). Discharge patterns of trigeminal commissural last-order interneurons during fictive mastication in the rabbit. *J Neurophysiol*, *66*(5), 1564-1578.
- Eisenman, J., Landgren, S., & Novin, D. (1963). Functional Organization in the Main Sensory Trigeminal Nucleus and in the Rostral Subdivision of the Nucleus of the Spinal Trigeminal Tract in the Cat. *Acta Physiol Scand Suppl*, SUPPL214:211-244.
- Elsen, F. P., Shields, E. J., Roe, M. T., Vandam, R. J., & Kelty, J. D. (2008). Carbenoxolone induced depression of rhythmogenesis in the pre-Botzinger Complex. *BMC Neurosci*, *9*, 46. doi:10.1186/1471-2202-9-46
- Enkvist, M. O., & McCarthy, K. D. (1994). Astroglial gap junction communication is increased by treatment with either glutamate or high K⁺ concentration. *J Neurochem*, *62*(2), 489-495.
- Erzurumlu, R. S., & Killackey, H. P. (1983). Development of order in the rat trigeminal system. *J Comp Neurol*, *213*(4), 365-380. doi:10.1002/cne.902130402
- Fellin, T., Halassa, M. M., Terunuma, M., Succol, F., Takano, H., Frank, M., . . . Haydon, P. G. (2009). Endogenous nonneuronal modulators of synaptic transmission control cortical slow oscillations in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(35), 15037-15042. doi:10.1073/pnas.0906419106
- Furuta, T., Timofeeva, E., Nakamura, K., Okamoto-Furuta, K., Togo, M., Kaneko, T., & Deschenes, M. (2008). Inhibitory gating of vibrissal inputs in the brainstem. *J Neurosci*, *28*(8), 1789-1797. doi:10.1523/JNEUROSCI.4627-07.2008
- Giaume, C., Leybaert, L., Naus, C. C., & Saez, J. C. (2013). Connexin and pannexin hemichannels in brain glial cells: properties, pharmacology, and roles. *Front Pharmacol*, *4*, 88. doi:10.3389/fphar.2013.00088
- Giaume, C., & Liu, X. (2012). From a glial syncytium to a more restricted and specific glial networking. *J Physiol Paris*, *106*(1-2), 34-39. doi:10.1016/j.jphysparis.2011.09.001
- Harris, A. L. (2007). Connexin channel permeability to cytoplasmic molecules. *Prog Biophys Mol Biol*, *94*(1-2), 120-143. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2007.03.011
- Houades, V., Koulakoff, A., Ezan, P., Seif, I., & Giaume, C. (2008). Gap junction-mediated astrocytic networks in the mouse barrel cortex. *J Neurosci*, *28*(20), 5207-5217. doi:10.1523/JNEUROSCI.5100-07.2008
- Hsiao, C. F., Gougar, K., Asai, J., & Chandler, S. H. (2007). Intrinsic membrane properties and morphological characteristics of interneurons in the rat supratrigeminal region. *J Neurosci Res*, *85*(16), 3673-3686. doi:10.1002/jnr.21442
- Huettner, J. E., & Bean, B. P. (1988). Block of N-methyl-D-aspartate-activated current by the anticonvulsant MK-801: selective binding to open channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *85*(4), 1307-1311.
- Inoue, T., Masuda, Y., Nagashima, T., Yoshikawa, K., & Morimoto, T. (1992). Properties of rhythmically active reticular neurons around the trigeminal motor nucleus during fictive mastication in the rat. *Neurosci Res*, *14*(4), 275-294.

- Kafitz, K. W., Meier, S. D., Stephan, J., & Rose, C. R. (2008). Developmental profile and properties of sulforhodamine 101--Labeled glial cells in acute brain slices of rat hippocampus. *J Neurosci Methods*, *169*(1), 84-92. doi:10.1016/j.jneumeth.2007.11.022
- Kolta, A., Westberg, K. G., & Lund, J. P. (2000). Identification of brainstem interneurons projecting to the trigeminal motor nucleus and adjacent structures in the rabbit. *J Chem Neuroanat*, *19*(3), 175-195.
- Lee, H. S., Ghetti, A., Pinto-Duarte, A., Wang, X., Dziewczapolski, G., Galimi, F., . . . Heinemann, S. F. (2014). Astrocytes contribute to gamma oscillations and recognition memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(32), E3343-3352. doi:10.1073/pnas.1410893111
- Li, H., Liu, T. F., Lazrak, A., Peracchia, C., Goldberg, G. S., Lampe, P. D., & Johnson, R. G. (1996). Properties and regulation of gap junctional hemichannels in the plasma membranes of cultured cells. *J Cell Biol*, *134*(4), 1019-1030.
- Li, Y. Q., Takada, M., Kaneko, T., & Mizuno, N. (1995). 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*, *356*(4), 563-579. doi:10.1002/cne.903560407
- Li, Y. Q., Takada, M., & Mizuno, N. (1993). Premotor neurons projecting simultaneously to two orofacial motor nuclei by sending their branched axons. A study with a fluorescent retrograde double-labeling technique in the rat. *Neurosci Lett*, *152*(1-2), 29-32.
- Li, Z., & Hatton, G. I. (1996). Oscillatory bursting of phasically firing rat supraoptic neurones in low-Ca²⁺ medium: Na⁺ influx, cytosolic Ca²⁺ and gap junctions. *J Physiol*, *496* (Pt 2), 379-394.
- Marrero, H., & Orkand, R. K. (1996). Nerve impulses increase glial intercellular permeability. *Glia*, *16*(3), 285-289. doi:10.1002/(SICI)1098-1136(199603)16:3<285::AID-GLIA11>3.0.CO;2-W
- Moriyama, Y. (1987). Rhythmical jaw movements and lateral ponto-medullary reticular neurons in rats. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*, *86*(1), 7-14.
- Morquette, P., Verdier, D., Kadala, A., Fethiere, J., Philippe, A. G., Robitaille, R., & Kolta, A. (2015). An astrocyte-dependent mechanism for neuronal rhythmogenesis. *Nat Neurosci*, *18*(6), 844-854. doi:10.1038/nn.4013
- Mugnaini, A. (1986). Il colore e il corpo nel panorama scientifico e quotidiano del cinquecento. *Ann Ist Stor Italo Ger Trento*, *12*, 125-145.
- Muller, T., Moller, T., Neuhaus, J., & Kettenmann, H. (1996). Electrical coupling among Bergmann glial cells and its modulation by glutamate receptor activation. *Glia*, *17*(4), 274-284. doi:10.1002/(SICI)1098-1136(199608)17:4<274::AID-GLIA2>3.0.CO;2-#
- Nagy, J. I., Dudek, F. E., & Rash, J. E. (2004). Update on connexins and gap junctions in neurons and glia in the mammalian nervous system. *Brain Res Brain Res Rev*, *47*(1-3), 191-215. doi:10.1016/j.brainresrev.2004.05.005
- Nagy, J. I., Patel, D., Ochalski, P. A., & Stelmack, G. L. (1999). Connexin30 in rodent, cat and human brain: selective expression in gray matter astrocytes, co-localization with connexin43 at gap junctions and late developmental appearance. *Neuroscience*, *88*(2), 447-468.
- Osborne, P. B., & Williams, J. T. (1996). Forskolin enhancement of opioid currents in rat locus coeruleus neurons. *J Neurophysiol*, *76*(3), 1559-1565.

- Pannasch, U., Derangeon, M., Chever, O., & Rouach, N. (2012). Astroglial gap junctions shape neuronal network activity. *Commun Integr Biol*, 5(3), 248-254. doi:10.4161/cib.19410
- Panatier, A., Vallee, J., Haber, M., Murai, K. K., Lacaille, J. C., & Robitaille, R. (2011). Astrocytes are endogenous regulators of basal transmission at central synapses. *Cell*, 146(5), 785-798. doi: 10.1016/j.cell.2011.07.022
- Petersen, C. C., & Sakmann, B. (2000). The excitatory neuronal network of rat layer 4 barrel cortex. *J Neurosci*, 20(20), 7579-7586.
- Pinganaud, G., Bernat, I., Buisseret, P., & Buisseret-Delmas, C. (1999). Trigeminal projections to hypoglossal and facial motor nuclei in the rat. *J Comp Neurol*, 415(1), 91-104.
- Poskanzer, K. E., & Yuste, R. (2011). Astrocytic regulation of cortical UP states. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(45), 18453-18458. doi:10.1073/pnas.1112378108
- Ramachandran, S., Xie, L. H., John, S. A., Subramaniam, S., & Lal, R. (2007). A novel role for connexin hemichannel in oxidative stress and smoking-induced cell injury. *PLoS One*, 2(8), e712. doi:10.1371/journal.pone.0000712
- Rekling, J. C., Shao, X. M., & Feldman, J. L. (2000). Electrical coupling and excitatory synaptic transmission between rhythmogenic respiratory neurons in the preBotzinger complex. *J Neurosci*, 20(23), RC113.
- Rickmann, M., & Wolff, J. R. (1995). S100 protein expression in subpopulations of neurons of rat brain. *Neuroscience*, 67(4), 977-991.
- Rouach, N., Glowinski, J., & Giaume, C. (2000). Activity-dependent neuronal control of gap-junctional communication in astrocytes. *J Cell Biol*, 149(7), 1513-1526.
- Rouach, N., Segal, M., Koulakoff, A., Giaume, C., & Avignone, E. (2003). Carbenoxolone blockade of neuronal network activity in culture is not mediated by an action on gap junctions. *J Physiol*, 553(Pt 3), 729-745. doi:10.1113/jphysiol.2003.053439
- Rouach, N., Tence, M., Glowinski, J., & Giaume, C. (2002). Costimulation of N-methyl-D-aspartate and muscarinic neuronal receptors modulates gap junctional communication in striatal astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(2), 1023-1028. doi:10.1073/pnas.022257499
- Roux, L., Benchenane, K., Rothstein, J. D., Bonvento, G., & Giaume, C. (2011). Plasticity of astroglial networks in olfactory glomeruli. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(45), 18442-18446. doi:10.1073/pnas.1107386108
- Sandler, V. M., Puil, E., & Schwarz, D. W. (1998). Intrinsic response properties of bursting neurons in the nucleus principalis trigemini of the gerbil. *Neuroscience*, 83(3), 891-904.
- Sasaki, T., Ishikawa, T., Abe, R., Nakayama, R., Asada, A., Matsuki, N., & Ikegaya, Y. (2014). Astrocyte calcium signalling orchestrates neuronal synchronization in organotypic hippocampal slices. *J Physiol*, 592(13), 2771-2783. doi:10.1113/jphysiol.2014.272864
- Serrano, A., Robitaille, R., & Lacaille, J. C. (2008). Differential NMDA-dependent activation of glial cells in mouse hippocampus. *Glia*, 56(15), 1648-1663. doi:10.1002/glia.20717
- Stanek, E. t., Cheng, S., Takatoh, J., Han, B. X., & Wang, F. (2014). Monosynaptic premotor circuit tracing reveals neural substrates for oro-motor coordination. *Elife*, 3, e02511. doi:10.7554/eLife.02511

- Stout, C. E., Costantin, J. L., Naus, C. C., & Charles, A. C. (2002). Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *J Biol Chem*, 277(12), 10482-10488. doi:10.1074/jbc.M109902200
- Tabernero, A., Medina, J. M., & Giaume, C. (2006). Glucose metabolism and proliferation in glia: role of astrocytic gap junctions. *J Neurochem*, 99(4), 1049-1061. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.04088.x
- Takemura, M., Sugimoto, T., & Shigenaga, Y. (1991). Difference in central projection of primary afferents innervating facial and intraoral structures in the rat. *Exp Neurol*, 111(3), 324-331.
- Tazerart, S., Vinay, L., & Brocard, F. (2008). The persistent sodium current generates pacemaker activities in the central pattern generator for locomotion and regulates the locomotor rhythm. *J Neurosci*, 28(34), 8577-8589. doi:10.1523/JNEUROSCI.1437-08.2008
- Torres, A., Wang, F., Xu, Q., Fujita, T., Dobrowolski, R., Willecke, K., . . . Nedergaard, M. (2012). Extracellular Ca(2)(+) acts as a mediator of communication from neurons to glia. *Sci Signal*, 5(208), ra8. doi:10.1126/scisignal.2002160
- Travagli, R. A., Dunwiddie, T. V., & Williams, J. T. (1995). Opioid inhibition in locus coeruleus. *J Neurophysiol*, 74(2), 518-528.
- Travers, J. B., & Norgren, R. (1983). Afferent projections to the oral motor nuclei in the rat. *J Comp Neurol*, 220(3), 280-298. doi:10.1002/cne.902200303
- Tsuboi, A., Kolta, A., Chen, C. C., & Lund, J. P. (2003). Neurons of the trigeminal main sensory nucleus participate in the generation of rhythmic motor patterns. *Eur J Neurosci*, 17(2), 229-238.
- Tsuruyama, K., Hsiao, C. F., & Chandler, S. H. (2013). Participation of a persistent sodium current and calcium-activated nonspecific cationic current to burst generation in trigeminal principal sensory neurons. *J Neurophysiol*, 110(8), 1903-1914. doi:10.1152/jn.00410.2013
- Valiunas, V., & Weingart, R. (2000). Electrical properties of gap junction hemichannels identified in transfected HeLa cells. *Pflugers Arch*, 440(3), 366-379.
- Wallraff, A., Kohling, R., Heinemann, U., Theis, M., Willecke, K., & Steinhauser, C. (2006). The impact of astrocytic gap junctional coupling on potassium buffering in the hippocampus. *J Neurosci*, 26(20), 5438-5447. doi:10.1523/JNEUROSCI.0037-06.2006
- Wallraff, A., Odermatt, B., Willecke, K., & Steinhauser, C. (2004). Distinct types of astroglial cells in the hippocampus differ in gap junction coupling. *Glia*, 48(1), 36-43. doi:10.1002/glia.20040
- Wang, F., Smith, N. A., Xu, Q., Fujita, T., Baba, A., Matsuda, T., . . . Nedergaard, M. (2012). Astrocytes modulate neural network activity by Ca(2)+-dependent uptake of extracellular K+. *Sci Signal*, 5(218), ra26. doi:10.1126/scisignal.2002334
- Wang, N., De Bock, M., Antoons, G., Gadicherla, A. K., Bol, M., Decrock, E., . . . Leybaert, L. (2012). Connexin mimetic peptides inhibit Cx43 hemichannel opening triggered by voltage and intracellular Ca2+ elevation. *Basic Res Cardiol*, 107(6), 304. doi:10.1007/s00395-012-0304-2
- Westberg, K., Clavelou, P., Sandstrom, G., & Lund, J. P. (1998). Evidence that trigeminal brainstem interneurons form subpopulations to produce different forms of mastication in the rabbit. *J Neurosci*, 18(16), 6466-6479.

- Yamamoto, T., Ochalski, A., Hertzberg, E. L., & Nagy, J. I. (1990a). LM and EM immunolocalization of the gap junctional protein connexin 43 in rat brain. *Brain Res*, 508(2), 313-319.
- Yamamoto, T., Ochalski, A., Hertzberg, E. L., & Nagy, J. I. (1990b). On the organization of astrocytic gap junctions in rat brain as suggested by LM and EM immunohistochemistry of connexin43 expression. *J Comp Neurol*, 302(4), 853-883. doi:10.1002/cne.903020414
- Ye, Z. C., Wyeth, M. S., Baltan-Tekkok, S., & Ransom, B. R. (2003). Functional hemichannels in astrocytes: a novel mechanism of glutamate release. *J Neurosci*, 23(9), 3588-3596.
- Yoshida, A., Hiraga, T., Moritani, M., Chen, K., Takatsuki, Y., Hirose, Y., . . . Shigenaga, Y. (1998). Morphologic characteristics of physiologically defined neurons in the cat trigeminal nucleus principalis. *J Comp Neurol*, 401(3), 308-328.

Chapitre 4 : Discussion générale

L'implication d'une interaction astrocyte-neurone dans le NVsnpr-D étant démontrée, les objectifs de ce travail étaient d'étudier le couplage astrocytaire et son organisation au sein du NVsnpr-D afin de voir si cette organisation reflétait la fonction rythmogénique des neurones de la partie dorsale. Nous voulions aussi déterminer si le couplage jouait un rôle dans la rythmogenèse et s'il était influencé par les stimuli déclencheurs de l'activité rythmique.

Après avoir réalisé des injections de traceurs dans des astrocytes individuels, nous avons développé une méthode pour étudier l'organisation des réseaux astrocytaires dans le NVsnpr afin de standardiser les mesures et calculer des vecteurs d'orientation préférentiels. Ces derniers sont reportés ensuite sur un modèle normalisé du NVsnpr afin de faire un bilan de tous les cas étudiés en fonction des différents stimuli. Des outils pharmacologiques ont été utilisés pour inhiber le couplage afin de valider nos expériences d'injections de traceurs mais aussi d'étudier son implication dans l'activité rythmique.

Les travaux de cette thèse suggèrent que le couplage astrocytaire joue un rôle important dans les interactions neurone-glie contribuant au processus de rythmogenèse dans le NVsnpr-D, les astrocytes n'étant pas des entités cellulaires distinctes mais formant des réseaux.

Nos données démontrent que :

- 1) Le couplage au sein du NVsnpr-D est augmenté par les stimuli induisant des décharges rythmiques dans les neurones. Cette modulation implique le S100 β .
- 2) Les réseaux astrocytaires du NVsnpr-D présentent une organisation spatiale qui épouse les frontières d'un domaine fonctionnel distinct.
- 3) Le couplage astrocytaire est nécessaire à la rythmogenèse.

Ces données supportent le modèle mis de l'avant par le laboratoire Kolta selon lequel le couplage astrocytaire, favorisé par les inputs synaptiques des afférences sensorielles dont les projections se font de façon très organisée, formerait des réseaux astrocytaires définissant des

domaines fonctionnels au sein desquels l'activité des neurones pourrait être synchronisée (Figure 4.1).

Nous allons discuter de certains points qui soulèvent des questions dans ce modèle ainsi que de ses implications fonctionnelles possibles et de la méthodologie d'analyse mise au point pour cette étude.

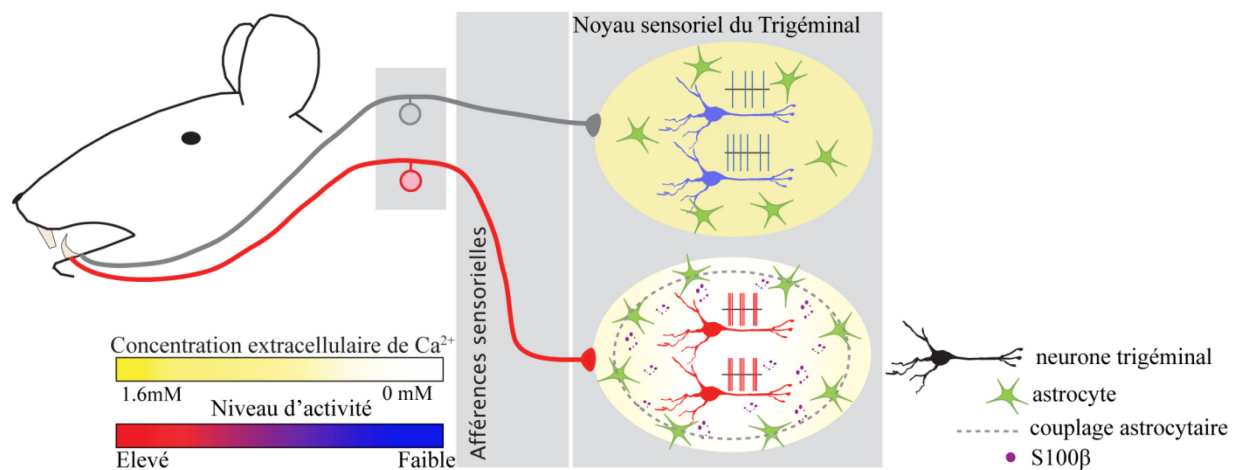


Figure 4.1 Les réseaux astrocytaires du NVsnpr-D définiraient des domaines fonctionnels. Lorsque les afférences sensorielles sont activées faiblement, les neurones du NVsnpr déchargent toniquement et ont un rôle de relais sensoriel (ellipse du haut). Lorsque les afférences présentent une activité soutenue, les astrocytes sont activés et libèrent du S100 β qui permet une baisse du calcium extracellulaire. Cela permet l'activation d' I_{NaP} responsable du changement de patron de décharge des neurones, mais favorise aussi le couplage des astrocytes qui formeraient alors des unités fonctionnelles au sein desquelles les neurones seraient synchronisés (ellipse du bas).

4.1 Modulation du couplage astrocytaire par les stimuli induisant des décharges neuronales rythmiques

Le couplage astrocytaire est un processus dynamique régulé par différents stimuli et conditions comme une dépolarisation membranaire, une baisse de calcium extracellulaire, ou une augmentation du potassium extracellulaire (voir section 7.3 du chapitre 1 pour plus de détails) (De Pina-Benabou et al., 2001; De Vuyst et al., 2006; De Vuyst et al., 2007; Enkvist & McCarthy, 1994; Muller, Moller, Neuhaus, & Kettenmann, 1996; Rouach et al., 2002; Rouach, Glowinski, & Giaume, 2000; Serrano et al., 2008; Valiunas & Weingart, 2000). Nos résultats montrent une importante augmentation du couplage lors de l'application locale de NMDA ou de la stimulation électrique des afférences sensorielles ainsi que lors du retrait du calcium du milieu de perfusion.

4.1.1 Les mécanismes potentiels de régulation du couplage

4.1.1.1 Le calcium extracellulaire

Les applications locales de NMDA et la stimulation des afférences sensorielles sont connues pour provoquer une baisse de $[Ca^{2+}]_e$ dans le NVsnpr-D (Morquette et al., 2015). Nos résultats ne sont donc pas surprenants car une faible $[Ca^{2+}]_e$ est connue pour ouvrir les connexines ainsi que les jonctions communicantes et donc augmenter le couplage. (Giaume et al., 2013; Gomez-Hernandez et al., 2003; H. Li et al., 1996; Ramachandran, Xie, John, Subramaniam, & Lal, 2007; Stout, Costantin, Naus, & Charles, 2002; Torres et al., 2012; Ye et al., 2003). Cette baisse calcique est causée par la libération de S100 β par les astrocytes suite à l'application des stimuli puisqu'elle est empêchée par l'application d'anticorps anti-S100 β qui interfère avec la liaison du calcium à la protéine (Morquette et al., 2015). De même, l'application de l'anticorps anti-S100 β bloque drastiquement le couplage astrocytaire induit par l'application locale de NMDA (Figure 3.4) suggérant que la baisse de calcium extracellulaire observée lors de la stimulation des afférences sensorielles ou de l'application locale de NMDA et produite grâce à la libération de S100 β par les astrocytes serait un mécanisme important permettant la régulation du couplage astrocytaire au sein du NVsnpr-D.

Cependant, le calcium extracellulaire n'est pas le seul moyen de modulation des connexines et jonctions communicantes et d'autres phénomènes peuvent être impliqués dans l'augmentation du couplage au sein du NVsnpr-D.

4.1.1.2 La dépolarisation membranaire

Les applications locales de NMDA et la stimulation des afférences sensorielles dépolarisent les astrocytes (Condamine, Lavoie, Verdier, & Kolta, 2018; Morquette et al., 2015) et les dépolarisations membranaires peuvent suffire à ouvrir les connexines (Bukauskas & Verselis, 2004; Gonzalez et al., 2007) et ainsi favoriser le couplage. Cependant, aucune corrélation entre l'amplitude de la dépolarisation astrocytaire provoquée par le NMDA ou la stimulation électrique et l'augmentation du couplage n'a pu être démontrée dans nos résultats (Figure 3.3).

4.1.1.3 L'activation calcique des astrocytes

L'activation des récepteurs NMDA astrocytaires, par la stimulation des afférences sensorielles glutaminergiques ou l'application locale de NMDA, produit une réponse calcique dans les astrocytes (Morquette et al., 2015; Q. Zhang, Hu, Sun, & Tong, 2003) pouvant réguler l'ouverture des connexines et des jonctions communicantes via la calmoduline (section 7.3.2 du chapitre 1) ou avec d'autres seconds messagers permettant la phosphorylation des connexines (De Vuyst et al., 2006; Sotkis et al., 2001).

Dans notre étude, l'ajout de MK-801, un antagoniste spécifique des récepteurs NMDA, réduit le couplage astrocytaire de manière significative en terme de nombre de cellules mais non en terme d'aire couverte pas les réseaux (Figure 3.4 C, D et E). L'application de MK-801 ne bloque que partiellement la dépolarisation astrocytaire induite lors de l'application locale de NMDA. Cet effet peut être expliqué par le blocage des récepteurs NMDA neuronaux par le Mg^{2+} qui nécessitent une première activation pour libérer le Mg^{2+} de leur pore avant que le MK-801 ne puisse y pénétrer pour y agir (Huettnner & Bean, 1988). L'application de NMDA peut alors encore avoir des effets sur l'activité neuronale avant que le MK-801 ne puisse bloquer les récepteurs NMDA neuronaux. L'activité neuronale libérant du potassium dans l'espace extracellulaire, cela peut provoquer une dépolarisation des astrocytes malgré le

blocage de leurs récepteurs NMDA par le MK-801 qui, eux, ne sont pas bloqués par le Mg^{2+} (Lalo, Pankratov, Kirchhoff, North, & Verkhratsky, 2006).

4.1.1.4 Le potassium extracellulaire

Le potassium extracellulaire libéré par l'activité neuronale peut aussi être impliqué directement dans l'extension du couplage astrocytaire car une augmentation du potassium extracellulaire est connue pour favoriser l'ouverture du canal formé par les connexines et l'accroissement du couplage (Roux et al., 2011; Scemes & Spray, 2012). Et ceci d'autant plus que les stimuli rythmogéniques au sein du NVsnpr sont des stimuli massifs provoquant une forte activité neuronale et que des hausses de potassium extracellulaire ont été montrées lors de l'activation du GPC de la locomotion (Brocard et al., 2013).

4.1.2 Les limites de la méthode de diffusion d'un traceur

En utilisant la technique de la diffusion de biocytine depuis un unique point d'injection dans un astrocyte, les résultats obtenus au chapitre 3 montrent l'existence d'un couplage astrocytaire au sein du NVsnpr-D au repos sans aucun stimulus appliqué.

Lors de ces expériences de remplissage, une attention particulière a été portée pour effectuer certains contrôles. Premièrement, la sélection de l'astrocyte comme point d'injection est faite sur des critères anatomiques grâce à la sulforhodamine 101 mais aussi sur des critères physiologiques, à savoir une relation courant-voltage linéaire et un potentiel membranaire de repos n'excédant pas -60mV durant toute la durée du remplissage (Figure 3.1). La prudence s'impose à l'utilisation de la sulforhodamine 101 pour l'identification des astrocytes car elle peut marquer également des oligodendrocytes (Hulsmann, Hagos, Heuer, & Schnell, 2017) ou induire de la potentialisation à long terme ou de l'activité épileptique à des concentrations de l'ordre de 100 à 250 μM (J. Kang et al., 2010; Rasmussen, Nedergaard, & Petersen, 2016). Cependant une concentration de 1 μM a été utilisée pour ce projet et une attention particulière fût portée sur les caractéristiques électrophysiologiques des cellules afin de s'assurer de ne remplir que des astrocytes. Afin de s'assurer que le marquage n'était pas causé par une diffusion extracellulaire, un contrôle utilisant de la CBX a été effectué pour chaque condition de remplissage. Cela a confirmé la diffusion du traceur à travers les jonctions communicantes

dans tous les cas étudiés. Quelques cas de contrôles avec la CBX présentent un marquage extracellulaire un peu étendu pouvant provenir d'un dépôt effectué lors de l'approche de la pipette de patch ou encore de la faible concentration de CBX utilisée (20 μ M au lieu de 100 μ M plus couramment utilisée). Cette disposition a été prise pour éviter les nombreux effets non-spécifiques de cette drogue. D'autres traceurs auraient pu être utilisés. Par exemple un traceur fluorescent (un Alexa ou du jaune de Lucifer) que l'on aurait pu observer directement durant l'expérimentation (Anders et al., 2014). Mais, la biocytine présente un poids moléculaire plus faible et permet de meilleurs résultats de diffusion ainsi que la possibilité de travailler sur du tissu fixé.

Malgré ces contrôles, la technique de diffusion de traceurs présente des limites. En effet, elle ne permettrait de révéler qu'une partie des cellules couplées ensemble. Des études électrophysiologiques menées sur le couplage ont démontré que des astrocytes couplés électrophysiologiquement via des jonctions communicantes ne montrent pas forcément un couplage anatomique révélé par diffusion d'un traceur (Audesirk, Audesirk, & Bowsher, 1982; Ewadinger, Syed, Lukowiak, & Bulloch, 1994; Ransom & Kettenmann, 1990). En ce sens, la méthode utilisée dans ce travail pourrait mener à une estimation du nombre de cellules par réseau plus faible qu'en réalité. Cependant, pour effectuer un travail anatomique, la méthode de diffusion d'un traceur reste le meilleur moyen. En effet, les méthodes d'études du couplage via l'électrophysiologie permettent seulement de déterminer le couplage entre deux cellules ou alors d'avoir une estimation du couplage mais sans avoir aucune information anatomique.

4.2 Une organisation spatiale confinée dans les limites du NVsnpr-D

4.2.1 Des réseaux de petite taille

Les réseaux astrocytaires décrits dans les différentes parties du cerveau montrent une hétérogénéité de taille. En effet, les réseaux astrocytaires décrits dans le striatum, l'aire CA1 de l'hippocampe ou l'olive latérale supérieure (LSO) présentent une centaine de cellules (Adermark & Lovinger, 2008; Augustin et al., 2016; D'Ambrosio et al., 1998). Dans d'autres structures, comme l'aire CA3 de l'hippocampe ou les barillets du cortex somatosensoriel, les réseaux astrocytaires sont composés d'une cinquantaine de cellules (D'Ambrosio et al., 1998; Houades et al., 2008). La particularité de nos résultats réside dans le fait que les réseaux

astrocytaires observés dans le NVsnpr-D sont de petite taille, comparativement à ceux décrits dans d'autres régions, allant de 11 ± 3 cellules en condition contrôle à un maximum de 37 ± 10 cellules en condition de faible $[Ca^{2+}]_e$.

4.2.2 La pertinence d'une analyse vectorielle dans le NVsnpr-D

Afin d'étudier l'organisation anatomique des réseaux astrocytaires au sein du NVsnpr, nous avons développé une méthode d'analyse vectorielle permettant de replacer les données obtenues dans un NVsnpr normalisé. Dans la littérature, les analyses de réseaux astrocytaires utilisent le plus souvent des ratios de hauteur et largeur pour les caractériser. Par exemple, Augustin *et al* ont étudié la forme de réseaux dans l'olive latérale supérieure (LSO), région du tronc cérébral impliqué dans l'audition où les neurones ont une organisation topographique très précise. Les réseaux astrocytaires sont classés selon un quotient d'extension (r) qui est défini dans la LSO comme le quotient de l'extension dans la direction orthogonale à l'axe tonotopique avec l'extension dans l'axe tonotopique (Figure 4.2A) et dans la région dorsale de la LSO (dLSO) (Figure 4.2B) ou la zone entre le noyau paraolivaire et la LSO (SPN-LSO) (Figure 4.2C), comme l'extension dans l'axe dorso-ventral avec l'extension dans l'axe medio-latéral. Ainsi, la valeur du quotient d'extension permet de classer les réseaux astrocytaire dans 3 classes de formes différentes: 1) de forme ovale orientée orthogonalement à l'axe tonotopique dans la LSO ou dans l'axe dorso ventral dans la dLSO et la SPN-LSO. 2) de forme sphérique. 3) de forme ovale orientée dans l'axe tonotopique dans la LSO ou dans l'axe medio-latéral dans la dLSO et la SPN-LSO (Augustin et al., 2016).

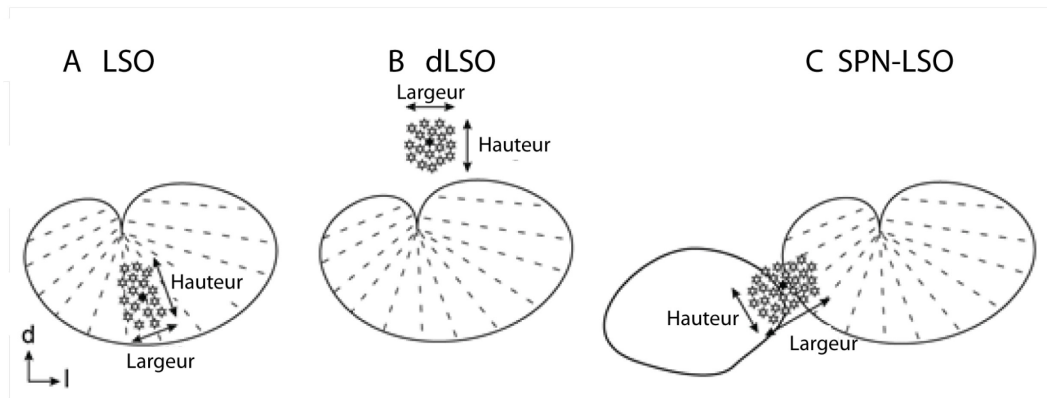


Figure 4.2 : Méthode d'analyse des réseaux dans les régions du tronc cérébral rattachées à l'audition.

Les cellules formant le réseau sont représentées par des étoiles blanches avec l'étoile noire présentant l'unique point d'injection du traceur. Les flèches montrent les mesures de hauteur de largeur effectuées en fonction de la topographie des différents noyaux : LSO (A), dLSO (B) et le SPN-LSO (C). Le quotient d'extension r défini comme le ratio entre la hauteur et la largeur donne alors une information sur la forme des réseaux qui n'est pas la même en fonction des différentes régions. Figure adaptée de (Augustin et al., 2016).

Le même type de méthode a été aussi utilisé dans l'étude des réseaux astrocytaires de la couche IV du cortex somato-sensoriel où les neurones présentent une organisation topographique précise des vibrisses dans ce qu'on appelle des barillets. Un ratio hauteur/largeur est aussi utilisé afin de différencier la forme des réseaux dans et à l'extérieur des barillets (Houades et al., 2008). Cependant, un autre type d'analyse a été utilisé dans cette étude pour déterminer si les réseaux astrocytaires dans les barillets étaient exclusivement contenus dans ces derniers. En effet, les auteurs ont mesuré deux distances depuis le site d'injection du traceur dans les réseaux étudiés à l'intérieur des barillets : la distance entre le site d'injection et le bord du barillet (d_w) et la distance entre le site d'injection et le centre du barillet (d_c). Ainsi, en normalisant les sites d'injections entre 3 compartiments correspondant à des pourcentages des dimensions normalisées des barillets (en fonction de la distance de l'injection depuis le bord du barillet) (Figure 4.2 B), ils ont pu déterminer que le couplage est plus grand lorsque le site d'injection est au centre des barillets. Le ratio d_c/d_w calculé a permis d'établir que plus le nombre de cellules observées dans les réseaux augmente plus le ratio se rapproche de 1 confirmant un confinement du couplage dans les barillets (Figure 4.2 C) (Houades et al., 2008).

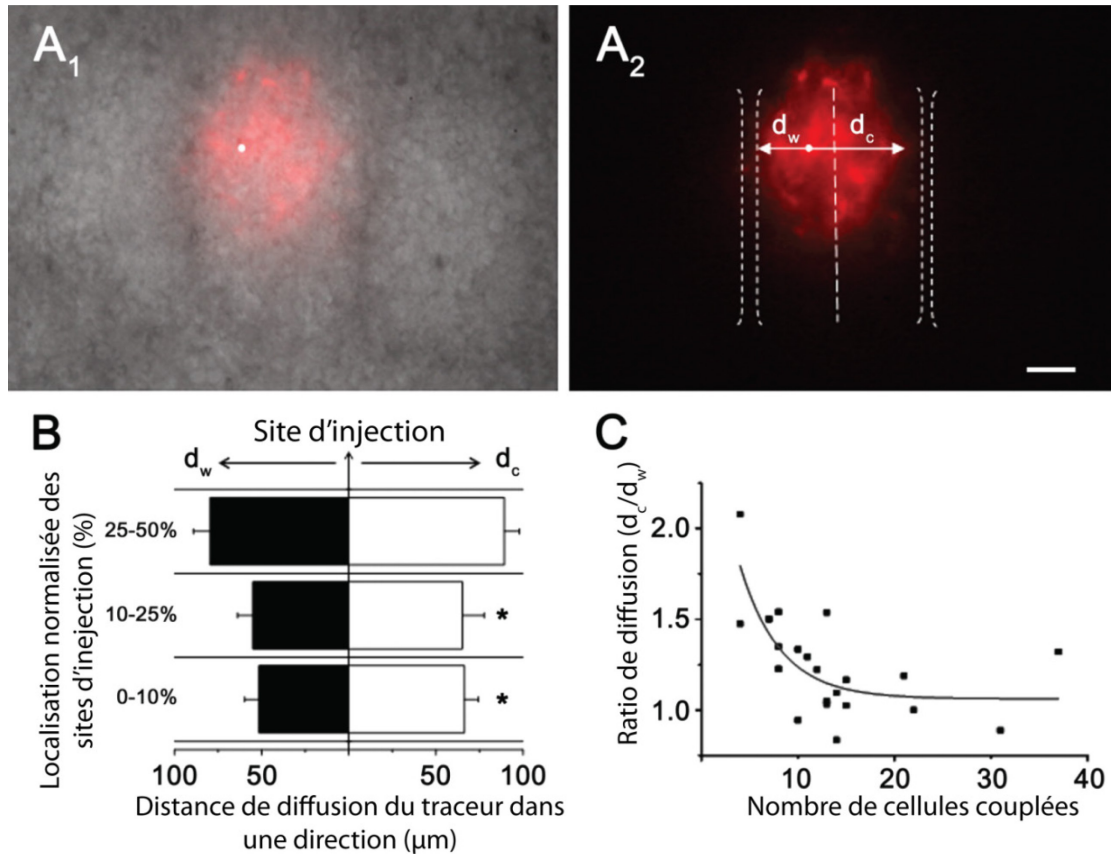


Figure 4.3 : Méthode d'analyse des réseaux astrocytaires des barillets de la couche IV du cortex somato-sensoriel.

A₁, A₂ : Observation directe de la diffusion de la sulforhodamine dans un réseau d'astrocytes au sein d'un barillet. **A₁** : la superposition de l'image en épifluorescence et en lumière à transmission montre bien la forme et les limites des barillets. **A₂** : Détail de deux paramètres permettant l'analyse de l'étendue du couplage dans un barillet. d_w et d_c représentent la distance entre le site d'injection (point blanc) et la limite du barillet la plus proche et la distance entre le site d'injection et le centre du barillet respectivement. **B** et **C** montrent des exemples des analyses pouvant provenir de la mesure des distances faites en **A₂**. **B** : histogramme montrant les distances de diffusion d_w (en noir) et d_c (en blanc) en fonction de la position du site d'injection normalisé en 3 catégories exprimant la distance du site d'injection à la limite latérale du barillet en %. **C** : graphique représentant le ratio de diffusion d_c/d_w en fonction du nombre de cellules couplées dans le réseau. Figure adaptée de (Houades et al., 2008).

L'intérêt d'utiliser des ratios de largeur/hauteur ou des mesures de distance de bordure est de pouvoir les relier à des structures anatomiques précises correspondant à une topographie déterminée. Toutefois, il nous fallut développer d'autres méthodes puisqu'à part une représentation somesthésique inversée du visage, aucune topographie précise ne fut rapportée dans la partie dorsale du NVsnpr contenant les neurones rythmogènes.

L'analyse vectorielle fut utilisée pour déterminer si les réseaux astrocytaires ont une tendance à sortir ou non du noyau et/ou de la partie dorsale, et s'ils ont une direction préférentielle. Ces vecteurs sont calculés et normalisés en divisant leur norme par le nombre de cellules ce qui permet de faire une comparaison générale de l'ensemble des cas étudiés en fonction de leur position dans le noyau ou encore des stimuli utilisés lors des expériences en créant une carte sur un schéma de NVsnpr normalisé.

Toutefois, cette analyse vectorielle repose sur la détermination de la cellule patchée qui définit le point à partir duquel le traceur diffuse. En effet, dans chaque réseau étudié, un seul astrocyte est patché en configuration cellule entière avec une solution interne contenant de la biocytine. Après révélation de la biocytine en fluorescence, la cellule patchée est repérée par son intensité de fluorescence plus importante et contrastée. Mais, il y a de nombreux cas où cette intensité de fluorescence ne permet pas de déterminer une cellule unique parmi d'autres. Dans ces circonstances, le barycentre de la région du réseau où la fluorescence est la plus intense est utilisé dans ces cas-ci (voir point 6.4.3 du chapitre 2). Une amélioration du protocole pour faciliter le repérage de la cellule patchée serait l'ajout d'un autre traceur à l'électrode d'enregistrement pour marquer la cellule enregistrée. Ce traceur doit être d'une taille l'empêchant de diffuser à travers les jonctions communicantes et doit pouvoir supporter la fixation. Une autre solution serait de prendre une photo à faible grossissement lors des expériences avant de retirer la pipette pour ensuite pouvoir repérer sa position sur les images réalisées sur la tranche fixée et révélée.

4.2.3 Des réseaux confinés dans le NVsnpr-D

L'analyse vectorielle montre que la plupart des réseaux astrocytaires sont confinés dans la partie dorsale du NVsnpr. Seulement 7 cas sur les 53 réseaux examinés dans l'étude comptaient quelques cellules hors des limites du NVsnpr-D. Sur ces 7 réseaux, 5 présentent très peu de cellules en dehors du NVsnpr-D et le plus fréquemment elles sont situées en direction du noyau moteur, région vers laquelle les neurones du NVsnpr-D projettent (Kolta et al., 2000; Y. Q. Li et al., 1993a; Y. Q. Li, Takada, & Mizuno, 1993b; Pinganaud et al., 1999; Stanek, Cheng, Takatoh, Han, & Wang, 2014; Travers & Norgren, 1983; Yoshida et al., 1998). En condition de faible $[Ca^{2+}]_e$, où les jonctions communicantes sont le plus ouvertes, les vecteurs d'orientations préférentielles des réseaux convergent vers le centre du NVsnpr-D même lorsque l'astrocyte patché se situe en bordure du noyau. À l'inverse, les réseaux astrocytaires révélés suite à la stimulation électrique des afférences sensorielles étaient principalement orientés vers la bordure latérale du NVsnpr-D où se trouvent les terminaisons des fibres. Les neurones du NVsnpr reçoivent tous des inputs des afférences sensorielles du nerf trigéminal mais les parties ventrales et dorsales sont fonctionnellement différentes. La partie ventrale reçoit des inputs reliés aux vibrisses (Erzurumlu & Killackey, 1983; Furuta et al., 2008) alors que la partie dorsale reçoit des inputs des muscles de la mâchoire et de la cavité orale et est reliée aux mouvements masticatoires (Eisenman et al., 1963; Takemura, Sugimoto, & Shigenaga, 1991; Tsuboi et al., 2003). Ainsi, cette organisation spatiale du couplage astrocytaire suggère l'implication de ces réseaux dans la délimitation d'une frontière fonctionnelle entre la partie dorsale et ventrale.

Le confinement des réseaux astrocytaires dans des régions anatomiques précises a déjà été décrit dans plusieurs autres régions du SNC dont l'organisation neuronale reflète fidèlement la représentation d'inputs sensoriels. En effet, comme cité plus haut, Houades *et al* montrent que le couplage astrocytaire est beaucoup plus important au sein d'un barillet qu'entre 2 barillets dans le cortex somatosensoriel (Houades et al., 2008). Ce résultat montrant que les réseaux d'astrocytes chevauchent parfaitement les barillets, des structures neuronales précises, suggère qu'ils peuvent contribuer à un confinement des interactions neurogliales au sein même d'un barillet (Petersen & Sakmann, 2000). Des résultats similaires ont été montrés dans les glomérules du bulbe olfactif et dans les barréloïdes du thalamus où les réseaux

astrocytaires sont confinés dans les glomérules et orientés vers leur centre (Claus et al., 2018; Roux et al., 2011). Enfin, dans l'olive latérale supérieure, Augustin *et al* démontrent une anisotropie des réseaux orthogonalement aux axes tonotopiques de cette région (Augustin et al., 2016).

4.2.4 Considération sur le concept de réseau panglial

L'expression de connexines n'est pas limitée qu'aux astrocytes. Les oligodendrocytes sont connus pour exprimer les Cx32, Cx47 et Cx29 (Altevogt, Kleopa, Postma, Scherer, & Paul, 2002; Wasseff & Scherer, 2011). Des jonctions communicantes peuvent donc théoriquement exister entre différentes cellules gliales. Il en existe très peu, voir aucune entre les oligodendrocytes (Kamasawa et al., 2005; Massa & Mugnaini, 1982; Nagy et al., 2001; Rash, Yasumura, Dudek, & Nagy, 2001). Mais du couplage entre astrocytes et oligodendrocytes fut rapporté dans plusieurs structures, dont le colliculus inférieur, le thalamus, le néocortex et l'hippocampe (Claus et al., 2018; Stephanie Griemsmann et al., 2015; Wadle et al., 2018). Cette connectivité entre les astrocytes et les oligodendrocytes jouerait un rôle dans la myélinisation entre autre (pour revue (Orthmann-Murphy, Abrams, & Scherer, 2008). On parle alors de réseaux pangliaux.

Dans notre étude, nous n'avons pas établi la nature de toutes les cellules couplées dans les réseaux. Il serait intéressant à l'avenir d'utiliser des outils d'immunohistochimie pour vérifier si les réseaux étudiés dans le NVsnpr-D contiennent des oligodendrocytes en faisant, par exemple, un double marquage ciblant le S100 β et Olig2 pour les oligodendrocytes (Stephanie Griemsmann et al., 2015).

4.3 Le découplage astrocytaire affecte la rythmogenèse

Les astrocytes sont essentiels dans le mécanisme de rythmogenèse du NVsnpr-D (Morquette et al., 2015). Mais, nos résultats montrent que leur couplage est aussi indispensable à ce mécanisme. Dans la plupart des cas, l'application de CBX ou de GAP26, un bloqueur spécifique de la Cx43, abolit l'activité rythmique induite par l'application locale de NMDA. Cependant, malgré ce découplage, l'application locale de S100 β déclenche toujours une activité rythmique démontrant que les propriétés intrinsèques des neurones ne sont pas

affectées. En effet, la CBX est connue pour ses effets non-spécifiques, entre autre sur les conductances ioniques incluant les canaux sodiques mais aussi sur la résistance d'entrée, la fréquence de décharge et le seuil de décharge des neurones (Elsen, Shields, Roe, Vandam, & Kelty, 2008; Osborne & Williams, 1996; Rekling, Shao, & Feldman, 2000; Travagli, Dunwiddie, & Williams, 1995). Nous avons donc effectué des contrôles sur les propriétés électrophysiologiques des neurones avant et après l'application de CBX. La CBX cause seulement une légère hyperpolarisation du potentiel de membrane et du seuil de décharge qui ne peut expliquer la disparition de la rythmicité.

Dans le GPC de la locomotion, il a été rapporté que la CBX abolit la rythmicité en bloquant les jonctions communicantes entre les neurones (Elsen et al., 2008; Tazerart et al., 2008). Les injections de biocytine que nous avons réalisées dans les neurones du NVsnpr n'ont montré aucun couplage entre ces derniers suggérant que l'action de la CBX s'exerce sur le couplage astrocytaire. Ce qui est confirmé par l'effet du GAP 26 qui cible spécifiquement les Cx43 astrocytaires et produit le même effet que la CBX.

En effet, l'application du GAP26 dans le bain abolit l'activité en bouffée dans 3 des 4 neurones patchés dans l'étude. Cet effet est surprenant car les astrocytes expriment aussi la Cx30 dont le niveau d'expression est équivalent à celui de la Cx43 (Nagy et al., 1999). Il est toutefois possible que l'expression des Cx30 soit encore faible aux âges utilisés dans nos expériences. En effet, chez le rat, l'expression des Cx30 reste faible avant l'âge de 20 jours postpartum (P20) (Nagy et al., 1999). Or, notre modèle expérimental et nos limites techniques nous imposent d'utiliser des rats âgés entre P15 et P20. Les mouvements masticatoires chez le rat commencent à être établis à partir de P14 mais la myélinisation croissante de l'importante quantité de fibres dans la région complice l'expérimentation sur des animaux plus âgés en interférant avec la visualisation des cellules. Le faible niveau d'expression de la Cx30 à cet âge explique l'effet drastique du GAP26 dans l'abolition de la décharge rythmique.

Il est intéressant de noter que cet effet sur la décharge en bouffée des neurones ne se manifeste qu'après plus d'une heure d'application de la drogue dans le bain. Toutefois, le GAP26 affecte la décharge des neurones dès son application, on observe une diminution significative de l'amplitude et de la durée des bouffées rythmiques dès 15 minutes après l'application (Figure 3.7B et C). Une étude démontre que l'action du GAP26 sur les

connexons se produit rapidement, dans l'ordre de la minute, alors que son action sur les jonctions communicantes se manifeste dans l'ordre de l'heure (Matchkov et al., 2006). Cela peut s'expliquer par le fait que le GAP26 interagit avec les boucles extracellulaires de la Cx43 (F. Liu, Arce, Ramachandran, & Lal, 2006) qui ne peuvent être accessibles que lorsque les connexons ne sont pas liés entre eux pour former une jonction communicante. Le GAP26 bloquerait donc les connexons en premier, ce qui, par la suite, empêche la formation de jonctions communicantes mais demande du temps justifiant le délai d'action observé dans nos résultats.

Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer la disparition de l'activité rythmique suite au découplage des réseaux astrocytaires.

Premièrement, on pourrait supposer que le découplage affecte la régulation $S100\beta$ -dépendante de la concentration du calcium extracellulaire par les astrocytes. Il est possible que le couplage astrocytaire soit requis pour permettre la libération d'une quantité suffisante de $S100\beta$ par un effet de recrutement cellulaire via les vagues calciques ou que le découplage intervient sur le processus même de son excrétion, processus dont on ignore encore aujourd'hui le mécanisme. Les voies de libération des astrocytes comportent celles dépendantes du calcium intracellulaire (Montana et al., 2006; Perea & Araque, 2005a, 2007) via l'exocytose vésiculaire ou lysosomale (Perea, Navarrete, & Araque, 2009) et celles utilisant les connexons (Parpura, Scemes, & Spray, 2004). Mais, le $S100\beta$ est une protéine présentant un poids moléculaire trop élevé pour passer à travers les connexons (Sakatani et al., 2008). De plus, les expériences de Morquette *et al* montrent que la chélation du calcium intracellulaire par le BAPTA bloque la capacité des astrocytes à réguler le calcium extracellulaire (Morquette et al., 2015). Donc un mécanisme vésiculaire ou lysosomale serait probablement responsable de la libération du $S100\beta$ par les astrocytes d'autant plus qu'une étude a montré que le $S100\beta$ était relâché à la suite d'une augmentation de calcium intracellulaire (Davey et al., 2001). Ainsi, la meilleure option pour explorer le possible rôle du découplage dans la régulation du calcium extracellulaire par les astrocytes serait d'effectuer des expériences avec une électrode ion sensible au calcium permettant de contrôler si la baisse calcique est toujours présente lors de l'application locale de NMDA ou de la stimulation électrique des afférences sensorielles en présence de CBX ou de GAP26. Nous avons tenté des

expériences préliminaires avec une électrode ion sensible au calcium, tout en enregistrant un neurone et en déclenchant une activité rythmique avec une application locale de NMDA. Les baisses de calcium observées sont restées identiques en présence de CBX dans le bain alors que les décharges rythmiques étaient abolies. Toutefois, d'importantes considérations techniques sont à améliorer pour rendre ces résultats crédibles.

Deuxièmement, le découplage astrocytaire pourrait impacter la régulation spatiale du potassium extracellulaire présentée dans la section 7.5.2.2 du chapitre 1. Brocard *et al*, 2013 ont mis en évidence une augmentation importante du $[K^+]_e$ lors de l'activation du GPC de la locomotion, mais aussi qu'il y avait une concentration idéale de 6 mM de K^+ à respecter pour son fonctionnement (Brocard et al., 2013). Une $[K^+]_e$ trop élevée entraîne une dépolarisation des neurones et leur sortie de la fenêtre d'activation d' I_{NaP} nécessaire à l'activité rythmique dans le NVsnpr-D. D'après l'hypothèse de la régulation spatiale du potassium, les astrocytes régulent le potassium extracellulaire pendant l'activité neuronale et peuvent le redistribuer dans des zones présentant une activité neuronale moins importante via les jonctions communicantes (Orkand et al., 1966). Même si cette hypothèse est controversée (Wallraff et al., 2006), une étude montre l'importance du couplage dans la régulation du potassium extracellulaire (Pannasch et al., 2011). Ainsi, la régulation spatiale du potassium pourrait être bloquée par la CBX ou le GAP26. Des expériences avec une électrode ion sensible au potassium mesurant l'évolution de la $[K^+]_e$ durant l'induction de la rythmogenèse avant et après l'application de CBX ou de GAP26 pourraient donner des éléments de réponses.

4.4 Implication fonctionnelle de nos résultats

4.4.1 Implication fonctionnelle dans le NVsnpr

Fonctionnellement, les neurones du NVsnpr-D présentent la particularité d'avoir deux modes de décharge hypothétiquement associés à deux fonctions : celle de relais sensoriel ou celle de commande motrice. Le travail de cette thèse démontre l'implication des réseaux astrocytaires pour le passage de l'un à l'autre de ces modes.

Les muscles masticatoires présentent une compartimentalisation dans laquelle chaque compartiment peut être activé indépendamment des autres, par des sous-ensembles de motoneurones présentant une topographie précise.

D'un autre côté, les afférences sensorielles du tractus trigéminal projettent au NVsnpr de manière très organisée et activent des sous-groupes de cellules adjacentes dont certains pourraient être des astrocytes. Le couplage astrocytaire induit par l'activité des afférences pourrait donc définir des domaines fonctionnels au sein desquels les astrocytes peuvent réguler la concentration extracellulaire de calcium via le S100 β et établir des conditions propices aux décharges rythmiques d'une population de neurones. La projection de tous les neurones d'un même 'domaine fonctionnel' du NVsnpr-D à un même sous-ensemble de motoneurones contrôlant un compartiment musculaire unique permettrait une ségrégation de la commande motrice afin de contrôler individuellement les compartiments musculaires. Pour que la commande motrice soit efficace, il est important qu'il y ait une synchronisation entre les neurones. Les réseaux astrocytaires pourraient aussi être impliqués dans cette synchronisation des neurones. Des études ont déjà démontré l'implication des astrocytes dans la synchronisation neuronale dans l'aire CA1 de l'hippocampe (Amiri, Bahrami, & Janahmadi, 2012; Carmignoto & Fellin, 2006; Pirttimaki et al., 2017).

Enfin, dans un autre domaine de recherche il a été démontré que le flux sanguin augmente de manière durable au sein du Nvsnpd durant la mastication (Viggiano et al., 2015). Il pourrait donc être intéressant d'étudier si l'augmentation du couplage astrocytaire démontré dans notre étude peut être reliée avec cette augmentation de débit sanguin.

4.4.2 Implication fonctionnelle dans le SNC

La présence de réseaux astrocytaires décrits dans de nombreuses structures cérébrales différentes laisse à penser qu'ils pourraient être impliqués dans le soutien de fonctions spécifiques. La délimitation de structures fonctionnelles par les réseaux astrocytaires a déjà été démontrée dans les barillets du cortex somatosensoriel (Houades et al., 2008) et du thalamus (Claus et al., 2018), des glomérules olfactifs (Roux et al., 2011) mais aussi dans les bandes d'isofréquences de la LSO (Augustin et al., 2016). L'organisation des réseaux astrocytaires au sein du NVsnpr et le mécanisme de rythmogenèse sous-jacent pourraient aussi se retrouver dans d'autres GPCs. Dans les circuits neuronaux des GPCs de la respiration et de la locomotion, le rôle de la conductance I_{NaP} a été démontré dans la rythmogenèse (Brocard et al., 2013; Brocard et al., 2010; Del Negro et al., 2005; Ryczko, Charrier, Ijspeert, &

Cabelguen, 2010; Tazerart et al., 2008). Pour la locomotion, lorsqu'une activité locomotrice est évoquée de façon physiologique, des régions correspondant au GPC locomoteur présentent une baisse du $[Ca^{2+}]_e$ et une augmentation du $[K^+]_e$ (Brocard et al., 2013; Brocard et al., 2010). Cette baisse calcique, dont le mécanisme est inconnu, pourrait impliquer les réseaux d'astrocytes et la libération de S100 β permettant la régulation du $[Ca^{2+}]_e$ et l'activation d' I_{NaP} . Ces réseaux pouvant aussi rentrer en jeu dans la délimitation de domaines fonctionnels dans les circuits de ces GPCs.

Les activités rythmiques ne se retrouvent pas uniquement qu'au sein de GPC mais sont aussi associées aux états de sommeil et d'éveil (Destexhe, Contreras, & Steriade, 1999), aux processus d'apprentissage et de mémoire (Sederberg et al., 2007) ainsi qu'aux processus cognitifs (Luu, Tucker, & Makeig, 2004). Le couplage astrocytaire pourrait aussi avoir un rôle dans ses activités et influencer des phénomènes cognitifs. De nombreuses évidences démontrent l'implication des astrocytes dans la régulation de l'activité neuronale (gliotransmission, recapture de neurotransmetteurs, régulation d'ions extracellulaires) mais rarement en les considérant comme pouvant être en réseaux. Or, le couplage astrocytaire pourrait avoir de nombreuses fonctions dans le transport de gliotransmetteurs, de métabolites et de la recapture de neurotransmetteurs au niveau d'ensemble de synapses mais aussi la gestion de la concentration d'ions extracellulaires comme le calcium ou le potassium qui peuvent avoir des effets sur l'activité d'un réseau neuronal (Bellot-Saez et al., 2017; Giaume et al., 2010; Morquette et al., 2015).

En fonction de l'activation de certaines voies neuronales, les réseaux d'astrocytes pourraient délimiter des réseaux fonctionnels et supporter et/ou déclencher différentes fonctions de ces derniers.

4.4.3 Implication pathologique

Le couplage astrocytaire peut être impliqué dans certaines pathologies. Dans l'épilepsie, les décharges pathologiques sont semblables à celles enregistrées dans le NVsnpr-D pendant l'activité rythmique et le courant I_{NaP} serait impliqué dans la maladie (Hargus, Nigam, Bertram, & Patel, 2013; Makinson, Tanaka, Lamar, Goldin, & Escayg, 2014). En effet, durant l'activité épileptique, une baisse du $[Ca^{2+}]_e$ est observée dans plusieurs régions du

SNC (Heinemann, Lux, & Gutnick, 1977; Pumain & Heinemann, 1985; Pumain, Kurcewicz, & Louvel, 1983) ainsi que des concentrations de S100 β plus élevées dans des cerveaux de sujets épileptiques (Steinhauser, Grunnet, & Carmignoto, 2016). En ce qui concerne le couplage astrocytaire, une étude montre que des souris transgéniques conditionnelles déficientes en Cx30 et Cx43 présentent des activités épileptiformes spontanées (Wallraff et al., 2006). Une autre étude démontre le rôle anti-convulsant des jonctions communicantes gliales (Rouach et al., 2008). A l'inverse, d'autres résultats démontrent une augmentation de l'expression de la Cx43 et des jonctions communicantes dans un modèle d'épilepsie sur des cultures organotypiques d'hippocampe (Samoilova et al., 2003), dans lesquelles une application prolongée de GAP26 a eu comme effet d'atténuer les activités épileptiformes, indiquant que le couplage astrocytaire pourrait supporter ou déclencher des phénomènes épileptiques (Samoilova, Wentlandt, Adamchik, Velumian, & Carlen, 2008). Le mécanisme de rythmogénèse du NVsnpr-D et le couplage astrocytaire pourraient donc être impliqués dans cette pathologie même si les résultats de l'implication du couplage astrocytaire semblent controversés.

Dans les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer, l'expression de la Cx43 est augmentée (Koulakoff, Mei, Orellana, Saez, & Giaume, 2012) de même que le couplage observé par diffusion d'un traceur dans le cortex de souris transgénique modélisant la pathologie (Peters et al., 2009). Ce couplage pathologique pourrait contribuer à l'augmentation des vagues calciques astrogliales observées en périphérie des plaques amyloïdes et se propageant sur des distances plus grandes que dans des conditions saines (Kuchibhotla, Lattarulo, Hyman, & Bacskai, 2009).

4.4 Perspectives d'avenir

Trois suites logiques à ce projet pourraient être proposées. Premièrement, il faudrait dresser une cartographie fonctionnelle neuronale et astrocytaire du NVsnpr-D. Ce qui pourrait être réalisé en utilisant des outils d'imagerie calcique et des modèles d'animaux transgéniques permettant d'exprimer une sonde calcique fluorescente sous le contrôle de promoteurs spécifiquement neuronal ou astrocytaire qui pourront être identifiés au préalable par des expériences d'immunohistochimies. Une cartographie fonctionnelle des domaines

astrocytaires pourrait être réalisée en fonction de différents sites de stimulation des afférences sensorielles dans le tractus. Ce même travail pourrait être réalisé pour les neurones.

Deuxièmement, il faudrait déterminer si les astrocytes et le couplage astrocytaire jouent un rôle dans la synchronie neuronale. Pour ce faire, des outils d'optogénétique et des modèles de souris transgéniques permettant l'expression de la channelrhodopsine spécifiquement dans les astrocytes, pourraient être utilisés afin d'activer les astrocytes. Des expériences de double patch de neurones dans le NVsnpr pourraient alors être réalisées pour étudier si l'activation d'un seul astrocyte, ou d'un ensemble d'astrocytes correspondant aux caractéristiques du couplage que nous avons observées, pourrait contribuer à une synchronie neuronale.

Troisièmement, il faudrait étudier de manière fonctionnelle la connectivité entre les neurones du NVsnpr-D et les motoneurones du NVmt. Avec les mêmes outils d'imagerie calcique cités auparavant, la connectivité entre les 2 noyaux pourrait être confirmée et une cartographie fonctionnelle pourrait être réalisée.

4.5 Conclusion

Notre étude démontre que les astrocytes du NVsnpr-D forment des réseaux présentant une anatomie et une organisation supportant la fonction rythmogénique de cette partie du noyau. En effet, en plus d'une interaction astrocyte-neurone déjà connue, nous avons démontré que le couplage astrocytaire est nécessaire à la rythmogenèse. Cela confirme l'importance de considérer les astrocytes non pas comme des entités cellulaires distinctes, mais comme des réseaux pouvant être modulés par l'activité neuronale. Dans le NVsnpr-D, suite à l'activation des afférences sensorielles du tractus trigéminal, cette modulation des réseaux astrocytaires est majoritairement causée par la libération de S100 β par les astrocytes, connue pour provoquer une baisse du calcium extracellulaire, qui favorise le couplage. Ce couplage astrocytaire permet de définir des domaines fonctionnels, qui pourraient correspondre à la topographie de projection du tractus trigéminal, et au sein desquels l'activité neuronale passe d'une fonction de relais sensoriel à une fonction de commande motrice produisant un patron rythmique. Les neurones de chaque domaine fonctionnel seraient

synchronisés et projetteraient à un-sous ensemble de motoneurones contrôlant un compartiment musculaire unique permettant un fin contrôle des différentes phases du mouvement masticatoire.

Afin de réaliser des cartographies fonctionnelles des réseaux astrocytaires et des neurones du NVsnpr-D ainsi que de la connectivité avec le NVmt, des expériences complémentaires seraient souhaitables pour confirmer ce modèle tout comme pour étudier l'implication des réseaux astrocytaires dans la synchronie des neurones.

La présence du couplage astrocytaire étant démontré dans de nombreuses structures cérébrales différentes, il serait intéressant d'étudier leur modulation et leur influence sur l'activité neuronale notamment dans d'autres GPCs.

Références

- Adermark, L., & Lovinger, D. M. (2008). Electrophysiological properties and gap junction coupling of striatal astrocytes. *Neurochem Int*, 52(7), 1365-1372. doi:10.1016/j.neuint.2008.02.006
- Altevogt, B. M., Kleopa, K. A., Postma, F. R., Scherer, S. S., & Paul, D. L. (2002). Connexin29 is uniquely distributed within myelinating glial cells of the central and peripheral nervous systems. *J Neurosci*, 22(15), 6458-6470.
- Alvarez-Maubecin, V., Garcia-Hernandez, F., Williams, J. T., & Van Bockstaele, E. J. (2000). Functional coupling between neurons and glia. *J Neurosci*, 20(11), 4091-4098.
- Amiri, M., Bahrami, F., & Janahmadi, M. (2012). Functional contributions of astrocytes in synchronization of a neuronal network model. *J Theor Biol*, 292, 60-70. doi:10.1016/j.jtbi.2011.09.013
- Anders, S., Minge, D., Griemsmann, S., Herde, M. K., Steinhauser, C., & Henneberger, C. (2014). Spatial properties of astrocyte gap junction coupling in the rat hippocampus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 369(1654), 20130600. doi:10.1098/rstb.2013.0600
- Andrew, R. D., MacVicar, B. A., Dudek, F. E., & Hatton, G. I. (1981). Dye transfer through gap junctions between neuroendocrine cells of rat hypothalamus. *Science*, 211(4487), 1187-1189.
- Andriezen, W. (1893). The neuroglia elements of the brain. *BMJ*, 2, 227-230.
- Angulo, M. C., Kozlov, A. S., Charpak, S., & Audinat, E. (2004). Glutamate released from glial cells synchronizes neuronal activity in the hippocampus. *J Neurosci*, 24(31), 6920-6927. doi:10.1523/JNEUROSCI.0473-04.2004
- Araque, A., Martin, E. D., Perea, G., Arellano, J. I., & Buno, W. (2002). Synaptically released acetylcholine evokes Ca²⁺ elevations in astrocytes in hippocampal slices. *J Neurosci*, 22(7), 2443-2450. doi:20026212
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R. P., & Haydon, P. G. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci*, 22(5), 208-215.
- Araque, A., Sanzgiri, R. P., Parpura, V., & Haydon, P. G. (1998). Calcium elevation in astrocytes causes an NMDA receptor-dependent increase in the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci*, 18(17), 6822-6829.
- Athanassiadis, T., Olsson, K. A., Kolta, A., & Westberg, K. G. (2005). Identification of c-Fos immunoreactive brainstem neurons activated during fictive mastication in the rabbit. *Experimental Brain Research*, 165(4), 478-489. doi:10.1007/s00221-005-2319-5
- Athanassiadis, T., Westberg, K. G., Olsson, K. A., & Kolta, A. (2005). Physiological characterization, localization and synaptic inputs of bursting and nonbursting neurons in the trigeminal principal sensory nucleus of the rat. *Eur J Neurosci*, 22(12), 3099-3110. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04479.x
- Audesirk, G., Audesirk, T., & Bowsler, P. (1982). Variability and frequent failure of lucifer yellow to pass between two electrically coupled neurons in *Lymnaea stagnalis*. *J Neurobiol*, 13(4), 369-375. doi:10.1002/neu.480130407
- Augustin, V., Bold, C., Wadle, S. L., Langer, J., Jabs, R., Philippot, C., . . . Stephan, J. (2016). Functional anisotropic panglial networks in the lateral superior olive. *Glia*, 64(11), 1892-1911. doi:10.1002/glia.23031

- Azmitia, E. C. (2001). Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. *Brain Res Bull*, *56*(5), 413-424.
- Ballerini, P., Rathbone, M. P., Di Iorio, P., Renzetti, A., Giuliani, P., D'Alimonte, I., . . . Ciccarelli, R. (1996). Rat astroglial P2Z (P2X7) receptors regulate intracellular calcium and purine release. *Neuroreport*, *7*(15-17), 2533-2537.
- Barres, B. A. (2008). The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron*, *60*(3), 430-440. doi:10.1016/j.neuron.2008.10.013
- Barres, B. A., Chun, L. L., & Corey, D. P. (1989). Calcium current in cortical astrocytes: induction by cAMP and neurotransmitters and permissive effect of serum factors. *J Neurosci*, *9*(9), 3169-3175.
- Barres, B. A., Koroshetz, W. J., Chun, L. L., & Corey, D. P. (1990). Ion channel expression by white matter glia: the type-1 astrocyte. *Neuron*, *5*(4), 527-544. doi:10.1016/0896-6273(90)90091-s
- Barres, B. A., Koroshetz, W. J., Swartz, K. J., Chun, L. L., & Corey, D. P. (1990). Ion channel expression by white matter glia: the O-2A glial progenitor cell. *Neuron*, *4*(4), 507-524.
- Baumann, N., & Pham-Dinh, D. (2001). Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev*, *81*(2), 871-927. doi:10.1152/physrev.2001.81.2.871
- Bay, V., & Butt, A. M. (2012). Relationship between glial potassium regulation and axon excitability: a role for glial Kir4.1 channels. *Glia*, *60*(4), 651-660. doi:10.1002/glia.22299
- Beattie, E. C., Stellwagen, D., Morishita, W., Bresnahan, J. C., Ha, B. K., Von Zastrow, M., . . . Malenka, R. C. (2002). Control of synaptic strength by glial TNF α . *Science*, *295*(5563), 2282-2285. doi:10.1126/science.1067859
- Bekar, L. K., He, W., & Nedergaard, M. (2008). Locus coeruleus alpha-adrenergic-mediated activation of cortical astrocytes in vivo. *Cereb Cortex*, *18*(12), 2789-2795. doi:10.1093/cercor/bhn040
- Belachew, S., Chittajallu, R., Aguirre, A. A., Yuan, X., Kirby, M., Anderson, S., & Gallo, V. (2003). Postnatal NG2 proteoglycan-expressing progenitor cells are intrinsically multipotent and generate functional neurons. *J Cell Biol*, *161*(1), 169-186. doi:10.1083/jcb.200210110
- Bellot-Saez, A., Kekesi, O., Morley, J. W., & Buskila, Y. (2017). Astrocytic modulation of neuronal excitability through K(+) spatial buffering. *Neurosci Biobehav Rev*, *77*, 87-97. doi:10.1016/j.neubiorev.2017.03.002
- Belser, U. C., & Hannam, A. G. (1986). The contribution of the deep fibers of the masseter muscle to selected tooth-clenching and chewing tasks. *J Prosthet Dent*, *56*(5), 629-635.
- Benesova, J., Rusnakova, V., Honsa, P., Pivonkova, H., Dzamba, D., Kubista, M., & Anderova, M. (2012). Distinct expression/function of potassium and chloride channels contributes to the diverse volume regulation in cortical astrocytes of GFAP/EGFP mice. *PLoS One*, *7*(1), e29725. doi:10.1371/journal.pone.0029725
- Bennay, M., Langer, J., Meier, S. D., Kafitz, K. W., & Rose, C. R. (2008). Sodium signals in cerebellar Purkinje neurons and Bergmann glial cells evoked by glutamatergic synaptic transmission. *Glia*, *56*(10), 1138-1149. doi:10.1002/glia.20685
- Bennett, M. V. (1994). Connexins in disease. *Nature*, *368*(6466), 18-19. doi:10.1038/368018a0

- Bernardinelli, Y., Magistretti, P. J., & Chatton, J. Y. (2004). Astrocytes generate Na⁺-mediated metabolic waves. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(41), 14937-14942. doi:10.1073/pnas.0405315101
- Bernier, A. P., Arsenault, I., Lund, J. P., & Kolta, A. (2010). Effect of the stimulation of sensory inputs on the firing of neurons of the trigeminal main sensory nucleus in the rat. *J Neurophysiol*, *103*(2), 915-923. doi:10.1152/jn.91109.2008
- Bezzi, P., Gundersen, V., Galbete, J. L., Seifert, G., Steinhauser, C., Pilati, E., & Volterra, A. (2004). Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat Neurosci*, *7*(6), 613-620. doi:10.1038/nm1246
- Black, J. A., Newcombe, J., & Waxman, S. G. (2010). Astrocytes within multiple sclerosis lesions upregulate sodium channel Nav1.5. *Brain*, *133*(Pt 3), 835-846. doi:10.1093/brain/awq003
- Black, J. A., Westenbroek, R., Ransom, B. R., Catterall, W. A., & Waxman, S. G. (1994). Type II sodium channels in spinal cord astrocytes in situ: immunocytochemical observations. *Glia*, *12*(3), 219-227. doi:10.1002/glia.440120307
- Bourque, M. J., & Kolta, A. (2001). Properties and interconnections of trigeminal interneurons of the lateral pontine reticular formation in the rat. *J Neurophysiol*, *86*(5), 2583-2596. doi:10.1152/jn.2001.86.5.2583
- Bowman, C. L., & Kimelberg, H. K. (1984). Excitatory amino acids directly depolarize rat brain astrocytes in primary culture. *Nature*, *311*(5987), 656-659.
- Braet, K., Vandamme, W., Martin, P. E., Evans, W. H., & Leybaert, L. (2003). Photoliberating inositol-1,4,5-trisphosphate triggers ATP release that is blocked by the connexin mimetic peptide gap 26. *Cell Calcium*, *33*(1), 37-48.
- Bremer, F. (1923). Physiologie nerveuse de la mastication chez le chat et le lapin. *Archs. Internat Physiolo.*, *21*, 308-352.
- Brocard, F., Shevtsova, N. A., Bouhadfane, M., Tazerart, S., Heinemann, U., Rybak, I. A., & Vinay, L. (2013). Activity-dependent changes in extracellular Ca²⁺ and K⁺ reveal pacemakers in the spinal locomotor-related network. *Neuron*, *77*(6), 1047-1054. doi:10.1016/j.neuron.2013.01.026
- Brocard, F., Tazerart, S., & Vinay, L. (2010). Do pacemakers drive the central pattern generator for locomotion in mammals? *Neuroscientist*, *16*(2), 139-155. doi:10.1177/1073858409346339
- Brocard, F., Verdier, D., Arsenault, I., Lund, J. P., & Kolta, A. (2006). Emergence of intrinsic bursting in trigeminal sensory neurons parallels the acquisition of mastication in weanling rats. *J Neurophysiol*, *96*(5), 2410-2424. doi:10.1152/jn.00352.2006
- Brown, T. G. (1914). On the nature of the fundamental activity of the nervous centres; together with an analysis of the conditioning of rhythmic activity in progression, and a theory of the evolution of function in the nervous system. *J Physiol*, *48*(1), 18-46.
- Bukauskas, F. F., & Verselis, V. K. (2004). Gap junction channel gating. *Biochim Biophys Acta*, *1662*(1-2), 42-60. doi:10.1016/j.bbamem.2004.01.008
- Bunge, M., Bunge, M., & Pappas, G. (1962). Electron microscopic demonstration of connections between glia and myelin sheaths in the developing mammalian central nervous system. *J. Cell. Biol.*, *12*, 448-453.
- Bushong, E. A., Martone, M. E., Jones, Y. Z., & Ellisman, M. H. (2002). Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci*, *22*(1), 183-192.

- Buskila, Y., Abu-Ghanem, Y., Levi, Y., Moran, A., Grauer, E., & Amitai, Y. (2007). Enhanced astrocytic nitric oxide production and neuronal modifications in the neocortex of a NOS2 mutant mouse. *PLoS One*, 2(9), e843. doi:10.1371/journal.pone.0000843
- Caciagli, F., Ciccarelli, R., Di Iorio, P., Ballerini, P., & Tacconelli, L. (1988). Cultures of glial cells release purines under field electrical stimulation: the possible ionic mechanisms. *Pharmacol Res Commun*, 20(11), 935-947.
- Cahoy, J. D., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L. C., Zamanian, J. L., Christopherson, K. S., . . . Barres, B. A. (2008). A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci*, 28(1), 264-278. doi:10.1523/JNEUROSCI.4178-07.2008
- Carmignoto, G., & Fellin, T. (2006). Glutamate release from astrocytes as a non-synaptic mechanism for neuronal synchronization in the hippocampus. *J Physiol Paris*, 99(2-3), 98-102.
- Chandler, S. H., & Goldberg, L. J. (1982). Intracellular analysis of synaptic mechanisms controlling spontaneous and cortically induced rhythmical jaw movements in the guinea pig. *J Neurophysiol*, 48(1), 126-138. doi:10.1152/jn.1982.48.1.126
- Charles, A. C., Merrill, J. E., Dirksen, E. R., & Sanderson, M. J. (1991). Intercellular signaling in glial cells: calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate. *Neuron*, 6(6), 983-992.
- Chattopadhyay, N., Evliyaoglu, C., Heese, O., Carroll, R., Sanders, J., Black, P., & Brown, E. M. (2000). Regulation of secretion of PTHrP by Ca(2+)-sensing receptor in human astrocytes, astrocytomas, and meningiomas. *Am J Physiol Cell Physiol*, 279(3), C691-699. doi:10.1152/ajpcell.2000.279.3.C691
- Chen, J., Backus, K. H., & Deitmer, J. W. (1997). Intracellular calcium transients and potassium current oscillations evoked by glutamate in cultured rat astrocytes. *J Neurosci*, 17(19), 7278-7287.
- Chepkova, A. N., Sergeeva, O. A., & Haas, H. L. (2008). Carbenoxolone impairs LTP and blocks NMDA receptors in murine hippocampus. *Neuropharmacology*, 55(2), 139-147. doi:10.1016/j.neuropharm.2008.05.001
- Chever, O., Djukic, B., McCarthy, K. D., & Amzica, F. (2010). Implication of Kir4.1 channel in excess potassium clearance: an in vivo study on anesthetized glial-conditional Kir4.1 knock-out mice. *J Neurosci*, 30(47), 15769-15777. doi:10.1523/JNEUROSCI.2078-10.2010
- Christensen, R. K., Petersen, A. V., & Perrier, J. F. (2013). How do glial cells contribute to motor control? *Curr Pharm Des*, 19(24), 4385-4399.
- Claus, L., Philippot, C., Griemsmann, S., Timmermann, A., Jabs, R., Henneberger, C., . . . Steinhauser, C. (2018). Barreloid Borders and Neuronal Activity Shape Panglial Gap Junction-Coupled Networks in the Mouse Thalamus. *Cereb Cortex*, 28(1), 213-222. doi:10.1093/cercor/bhw368
- Condamine, S., Lavoie, R., Verdier, D., & Kolta, A. (2018). Functional rhythmogenic domains defined by astrocytic networks in the trigeminal main sensory nucleus. *Glia*, 66(2), 311-326. doi:10.1002/glia.23244
- Condorelli, D. F., Conti, F., Gallo, V., Kirchhoff, F., Seifert, G., Steinhauser, C., . . . Yuan, X. (1999). Expression and functional analysis of glutamate receptors in glial cells. *Adv Exp Med Biol*, 468, 49-67.

- Cornell-Bell, A. H., Finkbeiner, S. M., Cooper, M. S., & Smith, S. J. (1990). Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science*, *247*(4941), 470-473.
- Cotrina, M. L., & Nedergaard, M. (2005). Intracellular calcium control mechanisms in glia. In O. u. Press (Ed.), *Neuroglia* (pp. 229-250).
- Cottrell, G. T., Lin, R., Warn-Cramer, B. J., Lau, A. F., & Burt, J. M. (2003). Mechanism of v-Src- and mitogen-activated protein kinase-induced reduction of gap junction communication. *Am J Physiol Cell Physiol*, *284*(2), C511-520. doi:10.1152/ajpcell.00214.2002
- Crepel, V., Panenka, W., Kelly, M. E., & MacVicar, B. A. (1998). Mitogen-activated protein and tyrosine kinases in the activation of astrocyte volume-activated chloride current. *J Neurosci*, *18*(4), 1196-1206.
- Crill, W. E. (1996). Persistent sodium current in mammalian central neurons. *Annu Rev Physiol*, *58*, 349-362. doi:10.1146/annurev.ph.58.030196.002025
- Cruikshank, S. J., Hopperstad, M., Younger, M., Connors, B. W., Spray, D. C., & Srinivas, M. (2004). Potent block of Cx36 and Cx50 gap junction channels by mefloquine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(33), 12364-12369. doi:10.1073/pnas.0402044101
- Cruz, N. F., Ball, K. K., & Dienel, G. A. (2007). Functional imaging of focal brain activation in conscious rats: impact of [(14)C]glucose metabolite spreading and release. *J Neurosci Res*, *85*(15), 3254-3266. doi:10.1002/jnr.21193
- D'Ambrosio, R., Gordon, D. S., & Winn, H. R. (2002). Differential role of KIR channel and Na(+)/K(+)-pump in the regulation of extracellular K(+) in rat hippocampus. *J Neurophysiol*, *87*(1), 87-102. doi:10.1152/jn.00240.2001
- D'Ambrosio, R., Wenzel, J., Schwartzkroin, P. A., McKhann, G. M., 2nd, & Janigro, D. (1998). Functional specialization and topographic segregation of hippocampal astrocytes. *J Neurosci*, *18*(12), 4425-4438.
- D'Ascenzo, M., Vairano, M., Andreassi, C., Navarra, P., Azzena, G. B., & Grassi, C. (2004). Electrophysiological and molecular evidence of L-(Cav1), N- (Cav2.2), and R-(Cav2.3) type Ca²⁺ channels in rat cortical astrocytes. *Glia*, *45*(4), 354-363. doi:10.1002/glia.10336
- Davey, G. E., Murmann, P., & Heizmann, C. W. (2001). Intracellular Ca²⁺ and Zn²⁺ levels regulate the alternative cell density-dependent secretion of S100B in human glioblastoma cells. *J Biol Chem*, *276*(33), 30819-30826. doi:10.1074/jbc.M103541200
- Davidson, J. S., Baumgarten, I. M., & Harley, E. H. (1986). Reversible inhibition of intercellular junctional communication by glycyrrhetic acid. *Biochem Biophys Res Commun*, *134*(1), 29-36.
- Dawson, M. R., Levine, J. M., & Reynolds, R. (2000). NG2-expressing cells in the central nervous system: are they oligodendroglial progenitors? *J Neurosci Res*, *61*(5), 471-479. doi:10.1002/1097-4547(20000901)61:5<471::AID-JNR1>3.0.CO;2-N
- De Miranda, J., Panizzutti, R., Foltyn, V. N., & Wolosker, H. (2002). Cofactors of serine racemase that physiologically stimulate the synthesis of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor coagonist D-serine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(22), 14542-14547. doi:10.1073/pnas.222421299
- De Pina-Benabou, M. H., Srinivas, M., Spray, D. C., & Scemes, E. (2001). Calmodulin kinase pathway mediates the K⁺-induced increase in Gap junctional communication between mouse spinal cord astrocytes. *J Neurosci*, *21*(17), 6635-6643.

- De Vuyst, E., Decrock, E., Cabooter, L., Dubyak, G. R., Naus, C. C., Evans, W. H., & Leybaert, L. (2006). Intracellular calcium changes trigger connexin 32 hemichannel opening. *EMBO J*, 25(1), 34-44. doi:10.1038/sj.emboj.7600908
- De Vuyst, E., Decrock, E., De Bock, M., Yamasaki, H., Naus, C. C., Evans, W. H., & Leybaert, L. (2007). Connexin hemichannels and gap junction channels are differentially influenced by lipopolysaccharide and basic fibroblast growth factor. *Mol Biol Cell*, 18(1), 34-46. doi:10.1091/mbc.e06-03-0182
- Deiters, O. (1865). *Untersuchungen über Gehirn und Rückenmark und der Säugethiere*.
- Deitmer, J. W., Verkhratsky, A. J., & Lohr, C. (1998). Calcium signalling in glial cells. *Cell Calcium*, 24(5-6), 405-416.
- Del Negro, C. A., Morgado-Valle, C., Hayes, J. A., Mackay, D. D., Pace, R. W., Crowder, E. A., & Feldman, J. L. (2005). Sodium and calcium current-mediated pacemaker neurons and respiratory rhythm generation. *J Neurosci*, 25(2), 446-453. doi:10.1523/JNEUROSCI.2237-04.2005
- Dellow, P. G., & Lund, J. P. (1971). Evidence for central timing of rhythmical mastication. *J Physiol*, 215(1), 1-13.
- Desplantez, T., Verma, V., Leybaert, L., Evans, W. H., & Weingart, R. (2012). Gap26, a connexin mimetic peptide, inhibits currents carried by connexin43 hemichannels and gap junction channels. *Pharmacol Res*, 65(5), 546-552. doi:10.1016/j.phrs.2012.02.002
- Destexhe, A., Contreras, D., & Steriade, M. (1999). Spatiotemporal analysis of local field potentials and unit discharges in cat cerebral cortex during natural wake and sleep states. *J Neurosci*, 19(11), 4595-4608.
- Di Castro, M. A., Chuquet, J., Liaudet, N., Bhaukaurally, K., Santello, M., Bouvier, D., . . . Volterra, A. (2011). Local Ca²⁺ detection and modulation of synaptic release by astrocytes. *Nat Neurosci*, 14(10), 1276-1284. doi:10.1038/nn.2929
- Dietzel, I., & Heinemann, U. (1986). Dynamic variations of the brain cell microenvironment in relation to neuronal hyperactivity. *Ann N Y Acad Sci*, 481, 72-86.
- Dietzel, I., Heinemann, U., Hofmeier, G., & Lux, H. D. (1982). Stimulus-induced changes in extracellular Na⁺ and Cl⁻ concentration in relation to changes in the size of the extracellular space. *Experimental Brain Research*, 46(1), 73-84.
- Ding, F., O'Donnell, J., Thrane, A. S., Zeppenfeld, D., Kang, H., Xie, L., . . . Nedergaard, M. (2013). alpha1-Adrenergic receptors mediate coordinated Ca²⁺ signaling of cortical astrocytes in awake, behaving mice. *Cell Calcium*, 54(6), 387-394. doi:10.1016/j.ceca.2013.09.001
- Donato, R., Sorci, G., Riuzzi, F., Arcuri, C., Bianchi, R., Brozzi, F., . . . Giambanco, I. (2009). S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim Biophys Acta*, 1793(6), 1008-1022. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.11.009
- Donga, R., Dubuc, R., Kolta, A., & Lund, J. P. (1992). Evidence that the masticatory muscles receive a direct innervation from cell group k in the rabbit. *Neuroscience*, 49(4), 951-961.
- Duan, S., Anderson, C. M., Keung, E. C., Chen, Y., Chen, Y., & Swanson, R. A. (2003). P2X7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes. *J Neurosci*, 23(4), 1320-1328.
- Dunn, K. M., Hill-Eubanks, D. C., Liedtke, W. B., & Nelson, M. T. (2013). TRPV4 channels stimulate Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in astrocytic endfeet and amplify neurovascular

- coupling responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(15), 6157-6162. doi:10.1073/pnas.1216514110
- Durkin, M. M., Smith, K. E., Borden, L. A., Weinshank, R. L., Branchek, T. A., & Gustafson, E. L. (1995). Localization of messenger RNAs encoding three GABA transporters in rat brain: an in situ hybridization study. *Brain Res Mol Brain Res*, 33(1), 7-21.
- Dutrochet, H. (1824). *Recherches anatomiques et physiologiques sur la structure intime des animaux et des végétaux, et sur leur motilité.* (J. B. B. Paris Ed.).
- Eisenman, J., Fromm, G., Landgren, S., & Novin, D. (1964). The Ascending Projections of Trigeminal Neurones in the Cat, Investigated by Antidromic Stimulation. *Acta Physiol Scand*, 60, 337-350. doi:10.1111/j.1748-1716.1964.tb02896.x
- Eisenman, J., Landgren, S., & Novin, D. (1963). Functional Organization in the Main Sensory Trigeminal Nucleus and in the Rostral Subdivision of the Nucleus of the Spinal Trigeminal Tract in the Cat. *Acta Physiol Scand Suppl*, SUPPL214:211-244.
- Elsen, F. P., Shields, E. J., Roe, M. T., Vandam, R. J., & Kelty, J. D. (2008). Carbenoxolone induced depression of rhythmogenesis in the pre-Botzinger Complex. *BMC Neurosci*, 9, 46. doi:10.1186/1471-2202-9-46
- Eng, L. F., Ghirnikar, R. S., & Lee, Y. L. (2000). Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res*, 25(9-10), 1439-1451.
- English, A. W., & Widmer, C.G. (2001). Neuromuscular compartments of the rabbit masseter are functionally distinct. *Journal of Dental Research*, 80(Spec Iss A).
- English, A. W., Carrasco, D. I., & Widmer, C. G. (1999). Torques produced by different compartments of the rabbit masseter muscle. *Journal of Applied Biomechanics*, 15(4), 348-360. doi:DOI 10.1123/jab.15.4.348
- Enkvist, M. O., & McCarthy, K. D. (1994). Astroglial gap junction communication is increased by treatment with either glutamate or high K⁺ concentration. *J Neurochem*, 62(2), 489-495.
- Ertel, E. A., Campbell, K. P., Harpold, M. M., Hofmann, F., Mori, Y., Perez-Reyes, E., . . . Catterall, W. A. (2000). Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron*, 25(3), 533-535. doi:10.1016/s0896-6273(00)81057-0
- Erzurumlu, R. S., & Killackey, H. P. (1983). Development of order in the rat trigeminal system. *J Comp Neurol*, 213(4), 365-380. doi:10.1002/cne.902130402
- Evans, W. H., & Boitano, S. (2001). Connexin mimetic peptides: specific inhibitors of gap-junctional intercellular communication. *Biochem Soc Trans*, 29(Pt 4), 606-612.
- Evans, W. H., De Vuyst, E., & Leybaert, L. (2006). The gap junction cellular internet: connexin hemichannels enter the signalling limelight. *Biochem J*, 397(1), 1-14. doi:10.1042/BJ20060175
- Ewadinger, N., Syed, N., Lukowiak, K., & Bulloch, A. (1994). Differential Tracer Coupling between Pairs of Identified Neurones of the Mollusc *Lymnaea stagnalis*. *J Exp Biol*, 192(1), 291-297.
- Fan, X., & Agid, Y. (2018). At the Origin of the History of Glia. *Neuroscience*, 385, 255-271. doi:10.1016/j.neuroscience.2018.05.050
- Feldman, J. L., & Grillner, S. (1983). Control of vertebrate respiration and locomotion: a brief account. *Physiologist*, 26(5), 310-316.
- Fellin, T., Pascual, O., Gobbo, S., Pozzan, T., Haydon, P. G., & Carmignoto, G. (2004). Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of

- extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron*, 43(5), 729-743. doi:10.1016/j.neuron.2004.08.011
- Ferrier, D. (1886). *The Function of the brain*. London.
- Fiacco, T. A., & McCarthy, K. D. (2004). Intracellular astrocyte calcium waves in situ increase the frequency of spontaneous AMPA receptor currents in CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci*, 24(3), 722-732. doi:10.1523/JNEUROSCI.2859-03.2004
- Fiacco, T. A., & McCarthy, K. D. (2006). Astrocyte calcium elevations: properties, propagation, and effects on brain signaling. *Glia*, 54(7), 676-690. doi:10.1002/glia.20396
- Fraser, D. D., Mudrick-Donnon, L. A., & MacVicar, B. A. (1994). Astrocytic GABA receptors. *Glia*, 11(2), 83-93. doi:10.1002/glia.440110203
- Froes, M. M., Correia, A. H., Garcia-Abreu, J., Spray, D. C., Campos de Carvalho, A. C., & Neto, M. V. (1999). Gap-junctional coupling between neurons and astrocytes in primary central nervous system cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(13), 7541-7546.
- Furuta, T., Timofeeva, E., Nakamura, K., Okamoto-Furuta, K., Togo, M., Kaneko, T., & Deschenes, M. (2008). Inhibitory gating of vibrissal inputs in the brainstem. *J Neurosci*, 28(8), 1789-1797. doi:10.1523/JNEUROSCI.4627-07.2008
- Gallo, V., Patrizio, M., & Levi, G. (1991). GABA release triggered by the activation of neuron-like non-NMDA receptors in cultured type 2 astrocytes is carrier-mediated. *Glia*, 4(3), 245-255. doi:10.1002/glia.440040302
- Garcia, A. D., Doan, N. B., Imura, T., Bush, T. G., & Sofroniew, M. V. (2004). GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat Neurosci*, 7(11), 1233-1241. doi:10.1038/nn1340
- Gardner-Medwin, A. R. (1983a). Analysis of potassium dynamics in mammalian brain tissue. *J Physiol*, 335, 393-426.
- Gardner-Medwin, A. R. (1983b). A study of the mechanisms by which potassium moves through brain tissue in the rat. *J Physiol*, 335, 353-374.
- Gardner-Medwin, A. R., & Nicholson, C. (1983). Changes of extracellular potassium activity induced by electric current through brain tissue in the rat. *J Physiol*, 335, 375-392.
- Gerstner, G., Madhavan, S., & Crane, E. (2011). Mammalian Oral Rhythms and Motor Control In *Biomechanics in Applications*.
- Giaume, C., Koulakoff, A., Roux, L., Holcman, D., & Rouach, N. (2010). Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nat Rev Neurosci*, 11(2), 87-99. doi:10.1038/nrn2757
- Giaume, C., Leybaert, L., Naus, C. C., & Saez, J. C. (2013). Connexin and pannexin hemichannels in brain glial cells: properties, pharmacology, and roles. *Front Pharmacol*, 4, 88. doi:10.3389/fphar.2013.00088
- Giaume, C., Orellana, J. A., Abudara, V., & Saez, J. C. (2012). Connexin-based channels in astrocytes: how to study their properties. *Methods Mol Biol*, 814, 283-303. doi:10.1007/978-1-61779-452-0_19
- Giaume, C., Taberero, A., & Medina, J. M. (1997). Metabolic trafficking through astrocytic gap junctions. *Glia*, 21(1), 114-123.
- Giaume, C., & Theis, M. (2010). Pharmacological and genetic approaches to study connexin-mediated channels in glial cells of the central nervous system. *Brain Res Rev*, 63(1-2), 160-176. doi:10.1016/j.brainresrev.2009.11.005

- Goldberg, L. J., & Tal, M. (1978). Intracellular recording in trigeminal motoneurons of the anesthetized guinea pig during rhythmic jaw movements. *Exp Neurol*, 58(1), 102-110.
- Golgi. (1873). Suella struttura delta sostanza grigia del cervello (comunicazione preventiva). *Gazzetta Medica Italiana, Lombardia*, 33, 244-246.
- Golgi. (1903). Sulta fina anatomia degli organi centrali del sistema nervosa. Revista sperimentale di Freniatria. In: Opera Omnia. Milano: U. Hoepli.
- Gomez-Hernandez, J. M., de Miguel, M., Larrosa, B., Gonzalez, D., & Barrio, L. C. (2003). Molecular basis of calcium regulation in connexin-32 hemichannels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(26), 16030-16035. doi:10.1073/pnas.2530348100
- Gonzalez-Nieto, D., Gomez-Hernandez, J. M., Larrosa, B., Gutierrez, C., Munoz, M. D., Fasciani, I., . . . Barrio, L. C. (2008). Regulation of neuronal connexin-36 channels by pH. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(44), 17169-17174. doi:10.1073/pnas.0804189105
- Gonzalez, D., Gomez-Hernandez, J. M., & Barrio, L. C. (2007). Molecular basis of voltage dependence of connexin channels: an integrative appraisal. *Prog Biophys Mol Biol*, 94(1-2), 66-106. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2007.03.007
- Gordon, G. R., Mulligan, S. J., & MacVicar, B. A. (2007). Astrocyte control of the cerebrovasculature. *Glia*, 55(12), 1214-1221. doi:10.1002/glia.20543
- Gourine, A. V., Kasymov, V., Marina, N., Tang, F., Figueiredo, M. F., Lane, S., . . . Kasparov, S. (2010). Astrocytes control breathing through pH-dependent release of ATP. *Science*, 329(5991), 571-575. doi:10.1126/science.1190721
- Grass, D., Pawlowski, P. G., Hirrlinger, J., Papadopoulos, N., Richter, D. W., Kirchhoff, F., & Hulsman, S. (2004). Diversity of functional astroglial properties in the respiratory network. *J Neurosci*, 24(6), 1358-1365. doi:10.1523/JNEUROSCI.4022-03.2004
- Grillner, S. (1981). *Control of locomotion in bipeds, tetrapods, and fish*. (J. M. Brookhart, Mountcastle, V.B Ed.).
- Grillner, S., & Zangger, P. (1975). How detailed is the central pattern generation for locomotion? *Brain Res*, 88(2), 367-371. doi:10.1016/0006-8993(75)90401-1
- Gucek, A., Vardjan, N., & Zorec, R. (2012). Exocytosis in astrocytes: transmitter release and membrane signal regulation. *Neurochem Res*, 37(11), 2351-2363. doi:10.1007/s11064-012-0773-6
- Guthrie, P. B., Knappenberger, J., Segal, M., Bennett, M. V., Charles, A. C., & Kater, S. B. (1999). ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *J Neurosci*, 19(2), 520-528.
- Halassa, M. M., Fellin, T., & Haydon, P. G. (2007). The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol Med*, 13(2), 54-63. doi:10.1016/j.molmed.2006.12.005
- Halassa, M. M., Fellin, T., Takano, H., Dong, J. H., & Haydon, P. G. (2007). Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. *J Neurosci*, 27(24), 6473-6477. doi:10.1523/JNEUROSCI.1419-07.2007
- Harada, K., Kamiya, T., & Tsuboi, T. (2015). Gliotransmitter Release from Astrocytes: Functional, Developmental, and Pathological Implications in the Brain. *Front Neurosci*, 9, 499. doi:10.3389/fnins.2015.00499
- Hargus, N. J., Nigam, A., Bertram, E. H., 3rd, & Patel, M. K. (2013). Evidence for a role of Nav1.6 in facilitating increases in neuronal hyperexcitability during epileptogenesis. *J Neurophysiol*, 110(5), 1144-1157. doi:10.1152/jn.00383.2013

- Harris-Warrick, R. M. (2010). General principles of rhythmogenesis in central pattern generator networks. *Prog Brain Res*, 187, 213-222. doi:10.1016/B978-0-444-53613-6.00014-9
- Haustein, M. D., Kracun, S., Lu, X. H., Shih, T., Jackson-Weaver, O., Tong, X., . . . Khakh, B. S. (2014). Conditions and constraints for astrocyte calcium signaling in the hippocampal mossy fiber pathway. *Neuron*, 82(2), 413-429. doi:10.1016/j.neuron.2014.02.041
- He, L., & Hannon, G. J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*, 5(7), 522-531. doi:10.1038/nrg1379
- Heinemann, U., Lux, H. D., & Gutnick, M. J. (1977). Extracellular free calcium and potassium during paroxysmal activity in the cerebral cortex of the cat. *Experimental Brain Research*, 27(3-4), 237-243.
- Henle, J., & Merkel, F. (1869). Über die sogenannte Binde substanz der Centralorgane des Nervensystems. *Z Med*, 34, 49-82.
- Henneberger, C., Papouin, T., Oliet, S. H., & Rusakov, D. A. (2010). Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature*, 463(7278), 232-236. doi:10.1038/nature08673
- Herring, S. W., Grimm, A. F., & Grimm, B. R. (1979). Functional heterogeneity in a multipinnate muscle. *Am J Anat*, 154(4), 563-576. doi:10.1002/aja.1001540410
- Hertz, L., Chen, Y., & Spatz, M. (2000). Involvement of non-neuronal brain cells in AVP-mediated regulation of water space at the cellular, organ, and whole-body level. *J Neurosci Res*, 62(4), 480-490. doi:10.1002/1097-4547(20001115)62:4<480::AID-JNR2>3.0.CO;2-K
- Hertzberg, E. L., Disher, R. M., Tiller, A. A., Zhou, Y., & Cook, R. G. (1988). Topology of the Mr 27,000 liver gap junction protein. Cytoplasmic localization of amino- and carboxyl termini and a hydrophilic domain which is protease-hypersensitive. *J Biol Chem*, 263(35), 19105-19111.
- Hidaka, O., Morimoto, T., Masuda, Y., Kato, T., Matsuo, R., Inoue, T., . . . Takada, K. (1997). Regulation of masticatory force during cortically induced rhythmic jaw movements in the anesthetized rabbit. *J Neurophysiol*, 77(6), 3168-3179. doi:10.1152/jn.1997.77.6.3168
- Hille, B. (2001). *Ion Channels of Excitable Membranes* (Sinauer Ed.).
- His, W. (1888). Zur Geschichte des Gehirns sowie der centralen und peripherischen Nervenbahnen beim menschlichen. *Embryo. Abh Kgl sachs Ges Wissensch math phys*, 1, 339-392.
- Hofer, A., & Dermietzel, R. (1998). Visualization and functional blocking of gap junction hemichannels (connexons) with antibodies against external loop domains in astrocytes. *Glia*, 24(1), 141-154.
- Hosli, E., & Hosli, L. (1993). Receptors for neurotransmitters on astrocytes in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol*, 40(4), 477-506.
- Houades, V., Koulakoff, A., Ezan, P., Seif, I., & Giaume, C. (2008). Gap junction-mediated astrocytic networks in the mouse barrel cortex. *J Neurosci*, 28(20), 5207-5217. doi:10.1523/JNEUROSCI.5100-07.2008
- Huard, H., Lund, J. P., Veilleux, D., & Dubuc, R. (1999). An anatomical study of brainstem projections to the trigeminal motor nucleus of lampreys. *Neuroscience*, 91(1), 363-378. doi:10.1016/s0306-4522(98)00529-6

- Huettner, J. E., & Bean, B. P. (1988). Block of N-methyl-D-aspartate-activated current by the anticonvulsant MK-801: selective binding to open channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(4), 1307-1311.
- Hulsmann, S., Hagos, L., Heuer, H., & Schnell, C. (2017). Limitations of Sulforhodamine 101 for Brain Imaging. *Front Cell Neurosci*, 11, 44. doi:10.3389/fncel.2017.00044
- Huxtable, A. G., Zwicker, J. D., Alvares, T. S., Ruangkittisakul, A., Fang, X., Hahn, L. B., . . . Funk, G. D. (2010). Glia contribute to the purinergic modulation of inspiratory rhythm-generating networks. *J Neurosci*, 30(11), 3947-3958. doi:10.1523/JNEUROSCI.6027-09.2010
- Inoue, T., Chandler, S. H., & Goldberg, L. J. (1994). Neuropharmacological mechanisms underlying rhythmical discharge in trigeminal interneurons during fictive mastication. *J Neurophysiol*, 71(6), 2061-2073. doi:10.1152/jn.1994.71.6.2061
- Inoue, T., Masuda, Y., Nagashima, T., Yoshikawa, K., & Morimoto, T. (1992). Properties of rhythmically active reticular neurons around the trigeminal motor nucleus during fictive mastication in the rat. *Neurosci Res*, 14(4), 275-294.
- Jacquin, M. F., Rhoades, R. W., Enfiejian, H. L., & Egger, M. D. (1983). Organization and morphology of masticatory neurons in the rat: a retrograde HRP study. *J Comp Neurol*, 218(3), 239-256. doi:10.1002/cne.902180302
- Jankowska, E., Jukes, M. G., Lund, S., & Lundberg, A. (1967a). The effect of DOPA on the spinal cord. 5. Reciprocal organization of pathways transmitting excitatory action to alpha motoneurons of flexors and extensors. *Acta Physiol Scand*, 70(3), 369-388. doi:10.1111/j.1748-1716.1967.tb03636.x
- Jankowska, E., Jukes, M. G., Lund, S., & Lundberg, A. (1967b). The effect of DOPA on the spinal cord. 6. Half-centre organization of interneurons transmitting effects from the flexor reflex afferents. *Acta Physiol Scand*, 70(3), 389-402. doi:10.1111/j.1748-1716.1967.tb03637.x
- Jayakumar, A. R., & Norenberg, M. D. (2010). The Na-K-Cl Co-transporter in astrocyte swelling. *Metab Brain Dis*, 25(1), 31-38. doi:10.1007/s11011-010-9180-3
- Jentsch, T. J., Stein, V., Weinreich, F., & Zdebik, A. A. (2002). Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev*, 82(2), 503-568. doi:10.1152/physrev.00029.2001
- Johnston, M. F., & Ramon, F. (1981). Electrotonic coupling in internally perfused crayfish segmented axons. *J Physiol*, 317, 509-518.
- Johnston, M. F., Simon, S. A., & Ramon, F. (1980). Interaction of anaesthetics with electrical synapses. *Nature*, 286(5772), 498-500.
- Jourdain, P., Bergersen, L. H., Bhaukaurally, K., Bezzi, P., Santello, M., Domercq, M., . . . Volterra, A. (2007). Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nat Neurosci*, 10(3), 331-339. doi:10.1038/nn1849
- Juszczak, G. R., & Swiergiel, A. H. (2009). Properties of gap junction blockers and their behavioural, cognitive and electrophysiological effects: animal and human studies. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 33(2), 181-198. doi:10.1016/j.pnpbp.2008.12.014
- Kadala, A., Verdier, D., Morquette, P., & Kolta, A. (2015). Ion Homeostasis in Rhythmogenesis: The Interplay Between Neurons and Astroglia. *Physiology (Bethesda)*, 30(5), 371-388. doi:10.1152/physiol.00023.2014

- Kamasawa, N., Sik, A., Morita, M., Yasumura, T., Davidson, K. G., Nagy, J. I., & Rash, J. E. (2005). Connexin-47 and connexin-32 in gap junctions of oligodendrocyte somata, myelin sheaths, paranodal loops and Schmidt-Lanterman incisures: implications for ionic homeostasis and potassium siphoning. *Neuroscience*, *136*(1), 65-86. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.08.027
- Kanemaru, K., Sekiya, H., Xu, M., Satoh, K., Kitajima, N., Yoshida, K., . . . Tanaka, K. F. (2014). In vivo visualization of subtle, transient, and local activity of astrocytes using an ultrasensitive Ca(2+) indicator. *Cell Rep*, *8*(1), 311-318. doi:10.1016/j.celrep.2014.05.056
- Kang, J., Jiang, L., Goldman, S. A., & Nedergaard, M. (1998). Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat Neurosci*, *1*(8), 683-692. doi:10.1038/3684
- Kang, J., Kang, N., Lovatt, D., Torres, A., Zhao, Z., Lin, J., & Nedergaard, M. (2008). Connexin 43 hemichannels are permeable to ATP. *J Neurosci*, *28*(18), 4702-4711. doi:10.1523/JNEUROSCI.5048-07.2008
- Kang, J., Kang, N., Yu, Y., Zhang, J., Petersen, N., Tian, G. F., & Nedergaard, M. (2010). Sulforhodamine 101 induces long-term potentiation of intrinsic excitability and synaptic efficacy in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Neuroscience*, *169*(4), 1601-1609. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.06.020
- Kang, N., Xu, J., Xu, Q., Nedergaard, M., & Kang, J. (2005). Astrocytic glutamate release-induced transient depolarization and epileptiform discharges in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol*, *94*(6), 4121-4130. doi:10.1152/jn.00448.2005
- Katakowski, M., Buller, B., Wang, X., Rogers, T., & Chopp, M. (2010). Functional microRNA is transferred between glioma cells. *Cancer Res*, *70*(21), 8259-8263. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0604
- Kettenmann, H., Backus, K. H., & Schachner, M. (1984). Aspartate, glutamate and gamma-aminobutyric acid depolarize cultured astrocytes. *Neurosci Lett*, *52*(1-2), 25-29.
- Khakh, B. S., & Sofroniew, M. V. (2015). Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. *Nat Neurosci*, *18*(7), 942-952. doi:10.1038/nn.4043
- Kidokoro, Y., Kubota, K., Shuto, S., & Sumino, R. (1968). Reflex organization of cat masticatory muscles. *J Neurophysiol*, *31*(5), 695-708. doi:10.1152/jn.1968.31.5.695
- Kinney, G. A., & Spain, W. J. (2002). Synaptically evoked GABA transporter currents in neocortical glia. *J Neurophysiol*, *88*(6), 2899-2908. doi:10.1152/jn.00037.2002
- Kirchhoff, F., Mulhardt, C., Pastor, A., Becker, C. M., & Kettenmann, H. (1996). Expression of glycine receptor subunits in glial cells of the rat spinal cord. *J Neurochem*, *66*(4), 1383-1390.
- Koehler, R. C., Roman, R. J., & Harder, D. R. (2009). Astrocytes and the regulation of cerebral blood flow. *Trends Neurosci*, *32*(3), 160-169. doi:10.1016/j.tins.2008.11.005
- Kofuji, P., & Newman, E. A. (2004). Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience*, *129*(4), 1045-1056. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.06.008
- Kogo, M., Funk, G. D., & Chandler, S. H. (1996). Rhythmical oral-motor activity recorded in an in vitro brainstem preparation. *Somatosens Mot Res*, *13*(1), 39-48.
- Kogo, M., Tanaka, S., Chandler, S. H., & Matsuya, T. (1998). Examination of the relationships between jaw opener and closer rhythmical muscle activity in an in vitro brainstem jaw-attached preparation. *Somatosens Mot Res*, *15*(3), 200-210.

- Kolta, A., Morquette, P., Lavoie, R., Arsenault, I., & Verdier, D. (2010). Modulation of rhythmogenic properties of trigeminal neurons contributing to the masticatory CPG. *Prog Brain Res*, *187*, 137-148. doi:10.1016/B978-0-444-53613-6.00009-5
- Kolta, A., Westberg, K. G., & Lund, J. P. (2000). Identification of brainstem interneurons projecting to the trigeminal motor nucleus and adjacent structures in the rabbit. *J Chem Neuroanat*, *19*(3), 175-195.
- Koulakoff, A., Mei, X., Orellana, J. A., Saez, J. C., & Giaume, C. (2012). Glial connexin expression and function in the context of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*, *1818*(8), 2048-2057. doi:10.1016/j.bbamem.2011.10.001
- Kriellaars, D. J., Brownstone, R. M., Noga, B. R., & Jordan, L. M. (1994). Mechanical entrainment of fictive locomotion in the decerebrate cat. *J Neurophysiol*, *71*(6), 2074-2086. doi:10.1152/jn.1994.71.6.2074
- Kubo, Y., Enomoto, S., & Nakamura, Y. (1981). Synaptic basis of orbital cortically induced rhythmical masticatory activity of trigeminal motoneurons in immobilized cats. *Brain Res*, *230*(1-2), 97-110.
- Kuchibhotla, K. V., Lattarulo, C. R., Hyman, B. T., & Bacsikai, B. J. (2009). Synchronous hyperactivity and intercellular calcium waves in astrocytes in Alzheimer mice. *Science*, *323*(5918), 1211-1215. doi:10.1126/science.1169096
- Kukley, M., Barden, J. A., Steinhauser, C., & Jabs, R. (2001). Distribution of P2X receptors on astrocytes in juvenile rat hippocampus. *Glia*, *36*(1), 11-21.
- Kuo, I. Y., Chan-Ling, T., Wojcikiewicz, R. J., & Hill, C. E. (2008). Limited intravascular coupling in the rodent brainstem and retina supports a role for glia in regional blood flow. *J Comp Neurol*, *511*(6), 773-787. doi:10.1002/cne.21873
- Kuzmin, A., Johansson, B., Gimenez, L., Ogren, S. O., & Fredholm, B. B. (2006). Combination of adenosine A1 and A2A receptor blocking agents induces caffeine-like locomotor stimulation in mice. *Eur Neuropsychopharmacol*, *16*(2), 129-136. doi:10.1016/j.euroneuro.2005.07.001
- Lalo, U., Pankratov, Y., Kirchhoff, F., North, R. A., & Verkhratsky, A. (2006). NMDA receptors mediate neuron-to-glia signaling in mouse cortical astrocytes. *J Neurosci*, *26*(10), 2673-2683. doi:10.1523/JNEUROSCI.4689-05.2006
- Langer, J., & Rose, C. R. (2009). Synaptically induced sodium signals in hippocampal astrocytes in situ. *J Physiol*, *587*(Pt 24), 5859-5877. doi:10.1113/jphysiol.2009.182279
- Latour, I., Hamid, J., Beedle, A. M., Zamponi, G. W., & Macvicar, B. A. (2003). Expression of voltage-gated Ca²⁺ channel subtypes in cultured astrocytes. *Glia*, *41*(4), 347-353. doi:10.1002/glia.10162
- Lavigne, G., Kim, J. S., Valiquette, C., & Lund, J. P. (1987). Evidence that periodontal pressoreceptors provide positive feedback to jaw closing muscles during mastication. *J Neurophysiol*, *58*(2), 342-358. doi:10.1152/jn.1987.58.2.342
- Lawson, L. J., Perry, V. H., Dri, P., & Gordon, S. (1990). Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*, *39*(1), 151-170.
- Lecoq, J., Tiret, P., Najac, M., Shepherd, G. M., Greer, C. A., & Charpak, S. (2009). Odor-evoked oxygen consumption by action potential and synaptic transmission in the olfactory bulb. *J Neurosci*, *29*(5), 1424-1433. doi:10.1523/JNEUROSCI.4817-08.2009
- Lenhossek, M. v. (1893). *Der feinere Bau des Nervensystems im litche neuester Forschung. Berlin: Fischer's Medicinische Buchhandlung.*

- Li, H., Liu, T. F., Lazrak, A., Peracchia, C., Goldberg, G. S., Lampe, P. D., & Johnson, R. G. (1996). Properties and regulation of gap junctional hemichannels in the plasma membranes of cultured cells. *J Cell Biol*, *134*(4), 1019-1030.
- Li, L., Head, V., & Timpe, L. C. (2001). Identification of an inward rectifier potassium channel gene expressed in mouse cortical astrocytes. *Glia*, *33*(1), 57-71.
- Li, T., Chen, X., Zhang, C., Zhang, Y., & Yao, W. (2019). An update on reactive astrocytes in chronic pain. *J Neuroinflammation*, *16*(1), 140. doi:10.1186/s12974-019-1524-2
- Li, Y. Q., Takada, M., & Mizuno, N. (1993a). Identification of premotor interneurons which project bilaterally to the trigeminal motor, facial or hypoglossal nuclei: a fluorescent retrograde double-labeling study in the rat. *Brain Res*, *611*(1), 160-164.
- Li, Y. Q., Takada, M., & Mizuno, N. (1993b). Premotor neurons projecting simultaneously to two orofacial motor nuclei by sending their branched axons. A study with a fluorescent retrograde double-labeling technique in the rat. *Neurosci Lett*, *152*(1-2), 29-32.
- Li, Z., & Hatton, G. I. (1996). Oscillatory bursting of phasically firing rat supraoptic neurones in low-Ca²⁺ medium: Na⁺ influx, cytosolic Ca²⁺ and gap junctions. *J Physiol*, *496* (Pt 2), 379-394.
- Liddelow, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., . . . Barres, B. A. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, *541*(7638), 481-487. doi:10.1038/nature21029
- Limwongse, V., & DeSantis, M. (1977). Cell body locations and axonal pathways of neurons innervating muscles of mastication in the rat. *Am J Anat*, *149*(4), 477-488. doi:10.1002/aja.1001490405
- Liu, F., Arce, F. T., Ramachandran, S., & Lal, R. (2006). Nanomechanics of hemichannel conformations: connexin flexibility underlying channel opening and closing. *J Biol Chem*, *281*(32), 23207-23217. doi:10.1074/jbc.M605048200
- Liu, Q. S., Xu, Q., Arcuino, G., Kang, J., & Nedergaard, M. (2004). Astrocyte-mediated activation of neuronal kainate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(9), 3172-3177. doi:10.1073/pnas.0306731101
- Liu, Z. J., Masuda, Y., Inoue, T., Fuchihata, H., Sumida, A., Takada, K., & Morimoto, T. (1993). Coordination of cortically induced rhythmic jaw and tongue movements in the rabbit. *J Neurophysiol*, *69*(2), 569-584. doi:10.1152/jn.1993.69.2.569
- Longuemare, M. C., & Swanson, R. A. (1995). Excitatory amino acid release from astrocytes during energy failure by reversal of sodium-dependent uptake. *J Neurosci Res*, *40*(3), 379-386. doi:10.1002/jnr.490400312
- Lund, J. P. (1991). Mastication and its control by the brain stem. *Crit Rev Oral Biol Med*, *2*(1), 33-64.
- Lund, J. P., Sasamoto, K., Murakami, T., & Olsson, K. A. (1984). Analysis of rhythmical jaw movements produced by electrical stimulation of motor-sensory cortex of rabbits. *J Neurophysiol*, *52*(6), 1014-1029. doi:10.1152/jn.1984.52.6.1014
- Lundberg, A. (1981). Half-centres revisited. In J. Szentagothai, M. Palkovits, & J. Hamori (Eds.), *Regulatory Functions of the CNS. Motion and Organization Principles*. Budapest, Hungary: Pergamon Akademiai Kiado, Adv. Physiol. Sci.
- Luu, P., Tucker, D. M., & Makeig, S. (2004). Frontal midline theta and the error-related negativity: neurophysiological mechanisms of action regulation. *Clin Neurophysiol*, *115*(8), 1821-1835. doi:10.1016/j.clinph.2004.03.031

- Lynch, R. (1985). A qualitative investigation of the topographical representation of masticatory muscles within the motor trigeminal nucleus of the rat: a horseradish peroxidase study. *Brain Res*, 327(1-2), 354-358.
- Ma, B., Buckalew, R., Du, Y., Kiyoshi, C. M., Alford, C. C., Wang, W., . . . Zhou, M. (2016). Gap junction coupling confers isopotentiality on astrocyte syncytium. *Glia*, 64(2), 214-226. doi:10.1002/glia.22924
- Ma, B., Xu, G., Wang, W., Enyeart, J. J., & Zhou, M. (2014). Dual patch voltage clamp study of low membrane resistance astrocytes in situ. *Mol Brain*, 7, 18. doi:10.1186/1756-6606-7-18
- Macaulay, N., & Zeuthen, T. (2012). Glial K(+) clearance and cell swelling: key roles for cotransporters and pumps. *Neurochem Res*, 37(11), 2299-2309. doi:10.1007/s11064-012-0731-3
- MacVicar, B. A., & Tse, F. W. (1988). Norepinephrine and cyclic adenosine 3':5'-cyclic monophosphate enhance a nifedipine-sensitive calcium current in cultured rat astrocytes. *Glia*, 1(6), 359-365. doi:10.1002/glia.440010602
- MacVicar, B. A., Tse, F. W., Crichton, S. A., & Kettenmann, H. (1989). GABA-activated Cl⁻ channels in astrocytes of hippocampal slices. *J Neurosci*, 9(10), 3577-3583.
- Magistretti, P. J. (2006). Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *J Exp Biol*, 209(Pt 12), 2304-2311. doi:10.1242/jeb.02208
- Magistretti, P. J., & Pellerin, L. (1999). Astrocytes Couple Synaptic Activity to Glucose Utilization in the Brain. *News Physiol Sci*, 14, 177-182.
- Magoun, H. W., Ranson, S. W., & C., F. (1933). Cortigofugal pathways for mastication, lapping and other motor fuctions in the cat. *Archs Neurol. Psychiat.*, 30, 292-308.
- Makinson, C. D., Tanaka, B. S., Lamar, T., Goldin, A. L., & Escayg, A. (2014). Role of the hippocampus in Nav1.6 (Scn8a) mediated seizure resistance. *Neurobiol Dis*, 68, 16-25. doi:10.1016/j.nbd.2014.03.014
- Mani, R. S., Boyes, B. E., & Kay, C. M. (1982). Physicochemical and optical studies on calcium- and potassium-induced conformational changes in bovine brain S-100b protein. *Biochemistry*, 21(11), 2607-2612.
- Mani, R. S., Shelling, J. G., Sykes, B. D., & Kay, C. M. (1983). Spectral studies on the calcium binding properties of bovine brain S-100b protein. *Biochemistry*, 22(7), 1734-1740.
- Martineau, M., Shi, T., Puyal, J., Knolhoff, A. M., Dulong, J., Gasnier, B., . . . Mothet, J. P. (2013). Storage and uptake of D-serine into astrocytic synaptic-like vesicles specify gliotransmission. *J Neurosci*, 33(8), 3413-3423. doi:10.1523/JNEUROSCI.3497-12.2013
- Massa, P. T., & Mugnaini, E. (1982). Cell junctions and intramembrane particles of astrocytes and oligodendrocytes: a freeze-fracture study. *Neuroscience*, 7(2), 523-538.
- Matchkov, V. V., Rahman, A., Bakker, L. M., Griffith, T. M., Nilsson, H., & Aalkjaer, C. (2006). Analysis of effects of connexin-mimetic peptides in rat mesenteric small arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 291(1), H357-367. doi:10.1152/ajpheart.00681.2005
- Matsuda, K., Uemura, M., Kume, M., Matsushima, R., & Mizuno, N. (1978). Topographical representation of masticatory muscles in the motor trigeminal nucleus in the rabbit: A HRP study. *Neurosci Lett*, 8(1), 1-4.

- Matthias, K., Kirchhoff, F., Seifert, G., Huttmann, K., Matyash, M., Kettenmann, H., & Steinhauser, C. (2003). Segregated expression of AMPA-type glutamate receptors and glutamate transporters defines distinct astrocyte populations in the mouse hippocampus. *J Neurosci*, *23*(5), 1750-1758.
- McCrea, D. A., & Rybak, I. A. (2008). Organization of mammalian locomotor rhythm and pattern generation. *Brain Res Rev*, *57*(1), 134-146. doi:10.1016/j.brainresrev.2007.08.006
- McKhann, G. M., 2nd, D'Ambrosio, R., & Janigro, D. (1997). Heterogeneity of astrocyte resting membrane potentials and intercellular coupling revealed by whole-cell and gramicidin-perforated patch recordings from cultured neocortical and hippocampal slice astrocytes. *J Neurosci*, *17*(18), 6850-6863.
- Middeldorp, J., & Hol, E. M. (2011). GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol*, *93*(3), 421-443. doi:10.1016/j.pneurobio.2011.01.005
- Miller, R. H., & Raff, M. C. (1984). Fibrous and protoplasmic astrocytes are biochemically and developmentally distinct. *J Neurosci*, *4*(2), 585-592.
- Minelli, A., DeBiasi, S., Brecha, N. C., Zuccarello, L. V., & Conti, F. (1996). GAT-3, a high-affinity GABA plasma membrane transporter, is localized to astrocytic processes, and it is not confined to the vicinity of GABAergic synapses in the cerebral cortex. *J Neurosci*, *16*(19), 6255-6264.
- Mishima, T., & Hirase, H. (2010). In vivo intracellular recording suggests that gray matter astrocytes in mature cerebral cortex and hippocampus are electrophysiologically homogeneous. *J Neurosci*, *30*(8), 3093-3100. doi:10.1523/JNEUROSCI.5065-09.2010
- Mizuno, N., Konishi, A., & Sato, M. (1975). Localization of masticatory motoneurons in the cat and rat by means of retrograde axonal transport of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol*, *164*(1), 105-115. doi:10.1002/cne.901640109
- Montana, V., Malarkey, E. B., Verderio, C., Matteoli, M., & Parpura, V. (2006). Vesicular transmitter release from astrocytes. *Glia*, *54*(7), 700-715. doi:10.1002/glia.20367
- Moreno, A. P., Fishman, G. I., & Spray, D. C. (1992). Phosphorylation shifts unitary conductance and modifies voltage dependent kinetics of human connexin43 gap junction channels. *Biophys J*, *62*(1), 51-53. doi:10.1016/S0006-3495(92)81775-7
- Morimoto, T., Inoue, T., Masuda, Y., & Nagashima, T. (1989). Sensory components facilitating jaw-closing muscle activities in the rabbit. *Experimental Brain Research*, *76*(2), 424-440.
- Morimoto, T., Inoue, T., Nakamura, T., & Kawamura, Y. (1985). Characteristics of rhythmic jaw movements of the rabbit. *Arch Oral Biol*, *30*(9), 673-677.
- Morquette, P., Verdier, D., Kadala, A., Fethiere, J., Philippe, A. G., Robitaille, R., & Kolta, A. (2015). An astrocyte-dependent mechanism for neuronal rhythmogenesis. *Nat Neurosci*, *18*(6), 844-854. doi:10.1038/nn.4013
- Mothet, J. P., Pollegioni, L., Ouanounou, G., Martineau, M., Fossier, P., & Baux, G. (2005). Glutamate receptor activation triggers a calcium-dependent and SNARE protein-dependent release of the gliotransmitter D-serine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(15), 5606-5611. doi:10.1073/pnas.0408483102
- Muller, T., Moller, T., Neuhaus, J., & Kettenmann, H. (1996). Electrical coupling among Bergmann glial cells and its modulation by glutamate receptor activation. *Glia*, *17*(4), 274-284. doi:10.1002/(SICI)1098-1136(199608)17:4<274::AID-GLIA2>3.0.CO;2-#

- Mulligan, S. J., & MacVicar, B. A. (2004). Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions. *Nature*, *431*(7005), 195-199. doi:10.1038/nature02827
- Musil, L. S., Le, A. C., VanSlyke, J. K., & Roberts, L. M. (2000). Regulation of connexin degradation as a mechanism to increase gap junction assembly and function. *J Biol Chem*, *275*(33), 25207-25215.
- Nagelhus, E. A., Mathiisen, T. M., & Ottersen, O. P. (2004). Aquaporin-4 in the central nervous system: cellular and subcellular distribution and coexpression with KIR4.1. *Neuroscience*, *129*(4), 905-913. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.08.053
- Nagy, J. I., Dudek, F. E., & Rash, J. E. (2004). Update on connexins and gap junctions in neurons and glia in the mammalian nervous system. *Brain Res Brain Res Rev*, *47*(1-3), 191-215. doi:10.1016/j.brainresrev.2004.05.005
- Nagy, J. I., Li, X., Rempel, J., Stelmack, G., Patel, D., Staines, W. A., . . . Rash, J. E. (2001). Connexin26 in adult rodent central nervous system: demonstration at astrocytic gap junctions and colocalization with connexin30 and connexin43. *J Comp Neurol*, *441*(4), 302-323.
- Nagy, J. I., Patel, D., Ochalski, P. A., & Stelmack, G. L. (1999). Connexin30 in rodent, cat and human brain: selective expression in gray matter astrocytes, co-localization with connexin43 at gap junctions and late developmental appearance. *Neuroscience*, *88*(2), 447-468.
- Nakamura, Y., & Katakura, N. (1995). Generation of masticatory rhythm in the brainstem. *Neurosci Res*, *23*(1), 1-19.
- Nakamura, Y., & Kubo, Y. (1978). Masticatory rhythm in intracellular potential of trigeminal motoneurons induced by stimulation of orbital cortex and amygdala in cats. *Brain Res*, *148*(2), 504-509.
- Navarrete, M., & Araque, A. (2010). Endocannabinoids potentiate synaptic transmission through stimulation of astrocytes. *Neuron*, *68*(1), 113-126. doi:10.1016/j.neuron.2010.08.043
- Nishiyama, A., Yang, Z., & Butt, A. (2005). Astrocytes and NG2-glia: what's in a name? *J Anat*, *207*(6), 687-693. doi:10.1111/j.1469-7580.2005.00489.x
- Nozaki, S., Iriki, A., & Nakamura, Y. (1986a). Localization of central rhythm generator involved in cortically induced rhythmical masticatory jaw-opening movement in the guinea pig. *J Neurophysiol*, *55*(4), 806-825. doi:10.1152/jn.1986.55.4.806
- Nozaki, S., Iriki, A., & Nakamura, Y. (1986b). Role of corticobulbar projection neurons in cortically induced rhythmical masticatory jaw-opening movement in the guinea pig. *J Neurophysiol*, *55*(4), 826-845. doi:10.1152/jn.1986.55.4.826
- Nozaki, S., Iriki, A., & Nakamura, Y. (1993). Trigeminal premotor neurons in the bulbar parvocellular reticular formation participating in induction of rhythmical activity of trigeminal motoneurons by repetitive stimulation of the cerebral cortex in the guinea pig. *J Neurophysiol*, *69*(2), 595-608. doi:10.1152/jn.1993.69.2.595
- Ogata, K., & Kosaka, T. (2002). Structural and quantitative analysis of astrocytes in the mouse hippocampus. *Neuroscience*, *113*(1), 221-233.
- Oh, Y., Black, J. A., & Waxman, S. G. (1994). The expression of rat brain voltage-sensitive Na⁺ channel mRNAs in astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res*, *23*(1-2), 57-65.
- Onimaru, H., Arata, A., & Homma, I. (1997). Neuronal mechanisms of respiratory rhythm generation: an approach using in vitro preparation. *Jpn J Physiol*, *47*(5), 385-403.

- Orkand, R. K., Nicholls, J. G., & Kuffler, S. W. (1966). Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J Neurophysiol*, 29(4), 788-806. doi:10.1152/jn.1966.29.4.788
- Orthmann-Murphy, J. L., Abrams, C. K., & Scherer, S. S. (2008). Gap junctions couple astrocytes and oligodendrocytes. *J Mol Neurosci*, 35(1), 101-116. doi:10.1007/s12031-007-9027-5
- Osborne, P. B., & Williams, J. T. (1996). Forskolin enhancement of opioid currents in rat locus coeruleus neurons. *J Neurophysiol*, 76(3), 1559-1565. doi:10.1152/jn.1996.76.3.1559
- Oya, M., Kitaguchi, T., Pais, R., Reimann, F., Gribble, F., & Tsuboi, T. (2013). The G protein-coupled receptor family C group 6 subtype A (GPRC6A) receptor is involved in amino acid-induced glucagon-like peptide-1 secretion from GLUtag cells. *J Biol Chem*, 288(7), 4513-4521. doi:10.1074/jbc.M112.402677
- Palacios-Prado, N., Sonntag, S., Skeberdis, V. A., Willecke, K., & Bukauskas, F. F. (2009). Gating, permselectivity and pH-dependent modulation of channels formed by connexin57, a major connexin of horizontal cells in the mouse retina. *J Physiol*, 587(Pt 13), 3251-3269. doi:10.1113/jphysiol.2009.171496
- Panaitescu, B., Ruangkittisakul, A., & Ballanyi, K. (2009). Silencing by raised extracellular Ca²⁺ of pre-Botzinger complex neurons in newborn rat brainstem slices without change of membrane potential or input resistance. *Neurosci Lett*, 456(1), 25-29. doi:10.1016/j.neulet.2009.03.074
- Panatier, A., & Robitaille, R. (2016). Astrocytic mGluR5 and the tripartite synapse. *Neuroscience*, 323, 29-34. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.03.063
- Panatier, A., Vallee, J., Haber, M., Murai, K. K., Lacaille, J. C., & Robitaille, R. (2011). Astrocytes are endogenous regulators of basal transmission at central synapses. *Cell*, 146(5), 785-798. doi:10.1016/j.cell.2011.07.022
- Pannasch, U., Vargova, L., Reingruber, J., Ezan, P., Holcman, D., Giaume, C., . . . Rouach, N. (2011). Astroglial networks scale synaptic activity and plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(20), 8467-8472. doi:10.1073/pnas.1016650108
- Pappalardo, L. W., Black, J. A., & Waxman, S. G. (2016). Sodium channels in astroglia and microglia. *Glia*, 64(10), 1628-1645. doi:10.1002/glia.22967
- Pappas, C. A., Ullrich, N., & Sontheimer, H. (1994). Reduction of glial proliferation by K⁺ channel blockers is mediated by changes in pHi. *Neuroreport*, 6(1), 193-196.
- Park, H., Oh, S. J., Han, K. S., Woo, D. H., Park, H., Mannaioni, G., . . . Lee, C. J. (2009). Bestrophin-1 encodes for the Ca²⁺-activated anion channel in hippocampal astrocytes. *J Neurosci*, 29(41), 13063-13073. doi:10.1523/JNEUROSCI.3193-09.2009
- Parpura, V., Basarsky, T. A., Liu, F., Jeftinija, K., Jeftinija, S., & Haydon, P. G. (1994). Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature*, 369(6483), 744-747. doi:10.1038/369744a0
- Parpura, V., Scemes, E., & Spray, D. C. (2004). Mechanisms of glutamate release from astrocytes: gap junction "hemichannels", purinergic receptors and exocytotic release. *Neurochem Int*, 45(2-3), 259-264. doi:10.1016/j.neuint.2003.12.011
- Parpura, V., & Zorec, R. (2010). Gliotransmission: Exocytotic release from astrocytes. *Brain Res Rev*, 63(1-2), 83-92. doi:10.1016/j.brainresrev.2009.11.008

- Pasantés Morales, H., & Schousboe, A. (1988). Volume regulation in astrocytes: a role for taurine as an osmoeffector. *J Neurosci Res*, 20(4), 503-509. doi:10.1002/jnr.490200415
- Pasti, L., Volterra, A., Pozzan, T., & Carmignoto, G. (1997). Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. *J Neurosci*, 17(20), 7817-7830.
- Patte, C., Gandolfo, P., Leprince, J., Thoumas, J. L., Fontaine, M., Vaudry, H., & Tonon, M. C. (1999). GABA inhibits endozepine release from cultured rat astrocytes. *Glia*, 25(4), 404-411.
- Paukert, M., Agarwal, A., Cha, J., Doze, V. A., Kang, J. U., & Bergles, D. E. (2014). Norepinephrine controls astroglial responsiveness to local circuit activity. *Neuron*, 82(6), 1263-1270. doi:10.1016/j.neuron.2014.04.038
- Peracchia, C., Sotkis, A., Wang, X. G., Peracchia, L. L., & Persechini, A. (2000). Calmodulin directly gates gap junction channels. *J Biol Chem*, 275(34), 26220-26224. doi:10.1074/jbc.M004007200
- Peracchia, C., Wang, X., Li, L., & Peracchia, L. L. (1996). Inhibition of calmodulin expression prevents low-pH-induced gap junction uncoupling in *Xenopus* oocytes. *Pflugers Arch*, 431(3), 379-387.
- Perea, G., & Araque, A. (2005a). Glial calcium signaling and neuron-glia communication. *Cell Calcium*, 38(3-4), 375-382. doi:10.1016/j.ceca.2005.06.015
- Perea, G., & Araque, A. (2005b). Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes. *J Neurosci*, 25(9), 2192-2203. doi:10.1523/JNEUROSCI.3965-04.2005
- Perea, G., & Araque, A. (2007). Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science*, 317(5841), 1083-1086. doi:10.1126/science.1144640
- Perea, G., Navarrete, M., & Araque, A. (2009). Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci*, 32(8), 421-431. doi:10.1016/j.tins.2009.05.001
- Perret, C., & Cabelguen, J. M. (1980). Main characteristics of the hindlimb locomotor cycle in the decorticate cat with special reference to bifunctional muscles. *Brain Res*, 187(2), 333-352. doi:10.1016/0006-8993(80)90207-3
- Peters, O., Schipke, C. G., Philipps, A., Haas, B., Pannasch, U., Wang, L. P., . . . Kettenmann, H. (2009). Astrocyte function is modified by Alzheimer's disease-like pathology in aged mice. *J Alzheimers Dis*, 18(1), 177-189. doi:10.3233/JAD-2009-1140
- Petersen, C. C., & Sakmann, B. (2000). The excitatory neuronal network of rat layer 4 barrel cortex. *J Neurosci*, 20(20), 7579-7586.
- Pinganaud, G., Bernat, I., Buisseret, P., & Buisseret-Delmas, C. (1999). Trigeminal projections to hypoglossal and facial motor nuclei in the rat. *J Comp Neurol*, 415(1), 91-104.
- Pirttimäki, T. M., Sims, R. E., Saunders, G., Antonio, S. A., Codadu, N. K., & Parri, H. R. (2017). Astrocyte-Mediated Neuronal Synchronization Properties Revealed by False Gliotransmitter Release. *J Neurosci*, 37(41), 9859-9870. doi:10.1523/JNEUROSCI.2761-16.2017
- Ponsaerts, R., De Vuyst, E., Retamal, M., D'Hondt, C., Vermeire, D., Wang, N., . . . Bultynck, G. (2010). Intramolecular loop/tail interactions are essential for connexin 43-hemichannel activity. *FASEB J*, 24(11), 4378-4395. doi:10.1096/fj.09-153007

- Porter, J. T., & McCarthy, K. D. (1995). Adenosine receptors modulate $[Ca^{2+}]_i$ in hippocampal astrocytes in situ. *J Neurochem*, 65(4), 1515-1523.
- Pumain, R., & Heinemann, U. (1985). Stimulus- and amino acid-induced calcium and potassium changes in rat neocortex. *J Neurophysiol*, 53(1), 1-16. doi:10.1152/jn.1985.53.1.1
- Pumain, R., Kurcewicz, I., & Louvel, J. (1983). Fast extracellular calcium transients: involvement in epileptic processes. *Science*, 222(4620), 177-179.
- Ramachandran, S., Xie, L. H., John, S. A., Subramaniam, S., & Lal, R. (2007). A novel role for connexin hemichannel in oxidative stress and smoking-induced cell injury. *PLoS One*, 2(8), e712. doi:10.1371/journal.pone.0000712
- Ramon y Cajal, S. (1888). Estructura de los centros nerviosos de las aves. *Rev. Trimest Histol Norm Patol*, 1, 305-315.
- Ramon y Cajal, S. (1893). La rétine des vertébrés. *La Cellule*. 119-257.
- Ramon y Cajal, S. (1899). *La Textura del Sistema Nerviosa del Hombre y los Vertebrados* (M. Moya Ed.).
- Ransom, B. R., & Kettenmann, H. (1990). Electrical coupling, without dye coupling, between mammalian astrocytes and oligodendrocytes in cell culture. *Glia*, 3(4), 258-266. doi:10.1002/glia.440030405
- Rash, J. E., Yasumura, T., Dudek, F. E., & Nagy, J. I. (2001). Cell-specific expression of connexins and evidence of restricted gap junctional coupling between glial cells and between neurons. *J Neurosci*, 21(6), 1983-2000.
- Rasmussen, R., Nedergaard, M., & Petersen, N. C. (2016). Sulforhodamine 101, a widely used astrocyte marker, can induce cortical seizure-like activity at concentrations commonly used. *Sci Rep*, 6, 30433. doi:10.1038/srep30433
- Reaume, A. G., de Sousa, P. A., Kulkarni, S., Langille, B. L., Zhu, D., Davies, T. C., . . . Rossant, J. (1995). Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science*, 267(5205), 1831-1834.
- Reese, K. A., & Caldwell, J. H. (1999). Immunocytochemical localization of NaCh6 in cultured spinal cord astrocytes. *Glia*, 26(1), 92-96.
- Rekling, J. C., Shao, X. M., & Feldman, J. L. (2000). Electrical coupling and excitatory synaptic transmission between rhythmogenic respiratory neurons in the preBotzinger complex. *J Neurosci*, 20(23), RC113.
- Richardson, W. D., Young, K. M., Tripathi, R. B., & McKenzie, I. (2011). NG2-glia as multipotent neural stem cells: fact or fantasy? *Neuron*, 70(4), 661-673. doi:10.1016/j.neuron.2011.05.013
- Richter, D. W., Champagnat, J., Jacquin, T., & Benacka, R. (1993). Calcium currents and calcium-dependent potassium currents in mammalian medullary respiratory neurones. *J Physiol*, 470, 23-33.
- Rio Hortega, P. d. (1917). El "tercer elemento" de los centros nerviosos. La microglia en estado normal. *Bol. Soc. Esp. Bol*, 67-82.
- Rio Hortega, P. d. (1932). Microglia. In N. Y. P.B. Hoeber (Ed.), *Citology and cellular pathology of the nervous system* (Vol. 2, pp. 483-534): Penfield W.
- Rio Hortega, P. d. (1939). The microglia. *Lancet*, 233, 1023-1026.
- Rio Hortega, P. d. (n.d.). Estudios sobre la neurogli. La glia de escasas radiaciones (oligodendroglia). *Bol. Soc. Esp Hist. Nat.*, 63-92.
- Rioch, J. M. (1934). The neural mechanism of mastication. *Am. J. Physiol*, 108, 168-176.

- Rokx, J. T., & van Willigen, J. D. (1985). Arrangement of supramandibular and suprahyoid motoneurons in the rat; a fluorescent tracer study. *Acta Anat (Basel)*, 122(3), 158-162.
- Rose, C. R., & Karus, C. (2013). Two sides of the same coin: sodium homeostasis and signaling in astrocytes under physiological and pathophysiological conditions. *Glia*, 61(8), 1191-1205. doi:10.1002/glia.22492
- Rossignol, S. (1996). Neural Control of Stereotypic limb movements. In N. Y. The American Physiological Society (Ed.), *Handbook of Physiology. Exercise: Regulation and Integration of Multiple Systems*. (pp. 173-216).
- Rothstein, J. D., Dykes-Hoberg, M., Pardo, C. A., Bristol, L. A., Jin, L., Kuncl, R. W., . . . Welty, D. F. (1996). Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron*, 16(3), 675-686.
- Rouach, N., Avignone, E., Meme, W., Koulakoff, A., Venance, L., Blomstrand, F., & Giaume, C. (2002). Gap junctions and connexin expression in the normal and pathological central nervous system. *Biol Cell*, 94(7-8), 457-475.
- Rouach, N., Glowinski, J., & Giaume, C. (2000). Activity-dependent neuronal control of gap-junctional communication in astrocytes. *J Cell Biol*, 149(7), 1513-1526.
- Rouach, N., Koulakoff, A., Abudara, V., Willecke, K., & Giaume, C. (2008). Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. *Science*, 322(5907), 1551-1555. doi:10.1126/science.1164022
- Rouach, N., Segal, M., Koulakoff, A., Giaume, C., & Avignone, E. (2003). Carbenoxolone blockade of neuronal network activity in culture is not mediated by an action on gap junctions. *J Physiol*, 553(Pt 3), 729-745. doi:10.1113/jphysiol.2003.053439
- Roux, L., Benchenane, K., Rothstein, J. D., Bonvento, G., & Giaume, C. (2011). Plasticity of astroglial networks in olfactory glomeruli. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(45), 18442-18446. doi:10.1073/pnas.1107386108
- Roy, M. L., Saal, D., Perney, T., Sontheimer, H., Waxman, S. G., & Kaczmarek, L. K. (1996). Manipulation of the delayed rectifier Kv1.5 potassium channel in glial cells by antisense oligodeoxynucleotides. *Glia*, 18(3), 177-184. doi:10.1002/(SICI)1098-1136(199611)18:3<177::AID-GLIA2>3.0.CO;2-X
- Rozental, R., Srinivas, M., & Spray, D. C. (2001). How to close a gap junction channel. Efficacies and potencies of uncoupling agents. *Methods Mol Biol*, 154, 447-476.
- Rybak, I. A., Shevtsova, N. A., Lafreniere-Roula, M., & McCrea, D. A. (2006). Modelling spinal circuitry involved in locomotor pattern generation: insights from deletions during fictive locomotion. *J Physiol*, 577(Pt 2), 617-639. doi:10.1113/jphysiol.2006.118703
- Rybak, I. A., Stecina, K., Shevtsova, N. A., & McCrea, D. A. (2006). Modelling spinal circuitry involved in locomotor pattern generation: insights from the effects of afferent stimulation. *J Physiol*, 577(Pt 2), 641-658. doi:10.1113/jphysiol.2006.118711
- Ryczko, D., Charrier, V., Ijspeert, A., & Cabelguen, J. M. (2010). Segmental oscillators in axial motor circuits of the salamander: distribution and bursting mechanisms. *J Neurophysiol*, 104(5), 2677-2692. doi:10.1152/jn.00479.2010
- Saad, M., Dubuc, R., Widmer, C. G., Westberg, K. G., & Lund, J. P. (1997). Anatomical organization of efferent neurons innervating various regions of the rabbit masseter muscle. *J Comp Neurol*, 383(4), 428-438.

- Saez, J. C., Martinez, A. D., Branes, M. C., & Gonzalez, H. E. (1998). Regulation of gap junctions by protein phosphorylation. *Braz J Med Biol Res*, *31*(5), 593-600.
- Saffitz, J. E., Laing, J. G., & Yamada, K. A. (2000). Connexin expression and turnover : implications for cardiac excitability. *Circ Res*, *86*(7), 723-728.
- Saijo, K., & Glass, C. K. (2011). Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat Rev Immunol*, *11*(11), 775-787. doi:10.1038/nri3086
- Sakatani, S., Seto-Ohshima, A., Shinohara, Y., Yamamoto, Y., Yamamoto, H., Itohara, S., & Hirase, H. (2008). Neural-activity-dependent release of S100B from astrocytes enhances kainate-induced gamma oscillations in vivo. *J Neurosci*, *28*(43), 10928-10936. doi:10.1523/JNEUROSCI.3693-08.2008
- Salvi, M., Fiore, C., Battaglia, V., Palermo, M., Armanini, D., & Toninello, A. (2005). Carbenoxolone induces oxidative stress in liver mitochondria, which is responsible for transition pore opening. *Endocrinology*, *146*(5), 2306-2312. doi:10.1210/en.2004-1128
- Samoilova, M., Li, J., Pelletier, M. R., Wentlandt, K., Adamchik, Y., Naus, C. C., & Carlen, P. L. (2003). Epileptiform activity in hippocampal slice cultures exposed chronically to bicuculline: increased gap junctional function and expression. *J Neurochem*, *86*(3), 687-699.
- Samoilova, M., Wentlandt, K., Adamchik, Y., Velumian, A. A., & Carlen, P. L. (2008). Connexin 43 mimetic peptides inhibit spontaneous epileptiform activity in organotypic hippocampal slice cultures. *Exp Neurol*, *210*(2), 762-775. doi:10.1016/j.expneurol.2008.01.005
- Sandler, V. M., Puil, E., & Schwarz, D. W. (1998). Intrinsic response properties of bursting neurons in the nucleus principalis trigemini of the gerbil. *Neuroscience*, *83*(3), 891-904.
- Sasamoto, K. (1979). Motor nuclear representation of masticatory muscles in the rat. *Jpn J Physiol*, *29*(6), 739-747.
- Scemes, E., & Spray, D. C. (2012). Extracellular K(+) and astrocyte signaling via connexin and pannexin channels. *Neurochem Res*, *37*(11), 2310-2316. doi:10.1007/s11064-012-0759-4
- Scemes, E., Spray, D. C., & Meda, P. (2009). Connexins, pannexins, innexins: novel roles of "hemi-channels". *Pflugers Arch*, *457*(6), 1207-1226. doi:10.1007/s00424-008-0591-5
- Schipke, C. G., Haas, B., & Kettenmann, H. (2008). Astrocytes discriminate and selectively respond to the activity of a subpopulation of neurons within the barrel cortex. *Cereb Cortex*, *18*(10), 2450-2459. doi:10.1093/cercor/bhn009
- Schnell, C., Freseman, J., & Hulsmann, S. (2011). Determinants of functional coupling between astrocytes and respiratory neurons in the pre-Botzinger complex. *PLoS One*, *6*(10), e26309. doi:10.1371/journal.pone.0026309
- Schools, G. P., Zhou, M., & Kimelberg, H. K. (2003). Electrophysiologically "complex" glial cells freshly isolated from the hippocampus are immunopositive for the chondroitin sulfate proteoglycan NG2. *J Neurosci Res*, *73*(6), 765-777. doi:10.1002/jnr.10680
- Schools, G. P., Zhou, M., & Kimelberg, H. K. (2006). Development of gap junctions in hippocampal astrocytes: evidence that whole cell electrophysiological phenotype is an intrinsic property of the individual cell. *J Neurophysiol*, *96*(3), 1383-1392. doi:10.1152/jn.00449.2006

- Schwartz, G., Enomoto, S., Valiquette, C., & Lund, J. P. (1989). Mastication in the rabbit: a description of movement and muscle activity. *J Neurophysiol*, *62*(1), 273-287. doi:10.1152/jn.1989.62.1.273
- Sederberg, P. B., Schulze-Bonhage, A., Madsen, J. R., Bromfield, E. B., McCarthy, D. C., Brandt, A., . . . Kahana, M. J. (2007). Hippocampal and neocortical gamma oscillations predict memory formation in humans. *Cereb Cortex*, *17*(5), 1190-1196. doi:10.1093/cercor/bhl030
- Serrano, A., Haddjeri, N., Lacaille, J. C., & Robitaille, R. (2006). GABAergic network activation of glial cells underlies hippocampal heterosynaptic depression. *J Neurosci*, *26*(20), 5370-5382. doi:10.1523/JNEUROSCI.5255-05.2006
- Serrano, A., Robitaille, R., & Lacaille, J. C. (2008). Differential NMDA-dependent activation of glial cells in mouse hippocampus. *Glia*, *56*(15), 1648-1663. doi:10.1002/glia.20717
- Shigenaga, Y., Okamoto, T., Nishimori, T., Suemune, S., Nasution, I. D., Chen, I. C., . . . et al. (1986). Oral and facial representation in the trigeminal principal and rostral spinal nuclei of the cat. *J Comp Neurol*, *244*(1), 1-18. doi:10.1002/cne.902440102
- Shigenaga, Y., Yoshida, A., Tsuru, K., Mitsuhiro, Y., Otani, K., & Cao, C. Q. (1988). Physiological and morphological characteristics of cat masticatory motoneurons--intracellular injection of HRP. *Brain Res*, *461*(2), 238-256.
- Shigetomi, E., Bowser, D. N., Sofroniew, M. V., & Khakh, B. S. (2008). Two forms of astrocyte calcium excitability have distinct effects on NMDA receptor-mediated slow inward currents in pyramidal neurons. *J Neurosci*, *28*(26), 6659-6663. doi:10.1523/JNEUROSCI.1717-08.2008
- Shigetomi, E., Bushong, E. A., Hausteiner, M. D., Tong, X., Jackson-Weaver, O., Kracun, S., . . . Khakh, B. S. (2013). Imaging calcium microdomains within entire astrocyte territories and endfeet with GCaMPs expressed using adeno-associated viruses. *J Gen Physiol*, *141*(5), 633-647. doi:10.1085/jgp.201210949
- Shigetomi, E., Kracun, S., & Khakh, B. S. (2010). Monitoring astrocyte calcium microdomains with improved membrane targeted GCaMP reporters. *Neuron Glia Biol*, *6*(3), 183-191. doi:10.1017/S1740925X10000219
- Shigetomi, E., Kracun, S., Sofroniew, M. V., & Khakh, B. S. (2010). A genetically targeted optical sensor to monitor calcium signals in astrocyte processes. *Nat Neurosci*, *13*(6), 759-766. doi:10.1038/nn.2557
- Shigetomi, E., Tong, X., Kwan, K. Y., Corey, D. P., & Khakh, B. S. (2011). TRPA1 channels regulate astrocyte resting calcium and inhibitory synapse efficacy through GAT-3. *Nat Neurosci*, *15*(1), 70-80. doi:10.1038/nn.3000
- Sik, A., Smith, R. L., & Freund, T. F. (2000). Distribution of chloride channel-2-immunoreactive neuronal and astrocytic processes in the hippocampus. *Neuroscience*, *101*(1), 51-65.
- Smart, S. L., Bosma, M. M., & Tempel, B. L. (1997). Identification of the delayed rectifier potassium channel, Kv1.6, in cultured astrocytes. *Glia*, *20*(2), 127-134.
- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*, *119*(1), 7-35. doi:10.1007/s00401-009-0619-8
- Sohl, G., & Willecke, K. (2004). Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res*, *62*(2), 228-232. doi:10.1016/j.cardiores.2003.11.013

- Solan, J. L., & Lampe, P. D. (2005). Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction channel assembly. *Biochim Biophys Acta*, *1711*(2), 154-163. doi:10.1016/j.bbame.2004.09.013
- Sontheimer, H. (1994). Voltage-dependent ion channels in glial cells. *Glia*, *11*(2), 156-172. doi:10.1002/glia.440110210
- Sontheimer, H., & Waxman, S. G. (1992). Ion channels in spinal cord astrocytes in vitro. II. Biophysical and pharmacological analysis of two Na⁺ current types. *J Neurophysiol*, *68*(4), 1001-1011. doi:10.1152/jn.1992.68.4.1001
- Sotkis, A., Wang, X. G., Yasumura, T., Peracchia, L. L., Persechini, A., Rash, J. E., & Peracchia, C. (2001). Calmodulin colocalizes with connexins and plays a direct role in gap junction channel gating. *Cell Commun Adhes*, *8*(4-6), 277-281.
- Spong, K. E., & Robertson, R. M. (2013). Pharmacological blockade of gap junctions induces repetitive surging of extracellular potassium within the locust CNS. *J Insect Physiol*, *59*(10), 1031-1040. doi:10.1016/j.jinsphys.2013.07.007
- Srinivas, M., Hopperstad, M. G., & Spray, D. C. (2001). Quinine blocks specific gap junction channel subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(19), 10942-10947. doi:10.1073/pnas.191206198
- Srinivasan, R., Huang, B. S., Venugopal, S., Johnston, A. D., Chai, H., Zeng, H., . . . Khakh, B. S. (2015). Ca²⁺ signaling in astrocytes from Ip3r2(-/-) mice in brain slices and during startle responses in vivo. *Nat Neurosci*, *18*(5), 708-717. doi:10.1038/nn.4001
- Stanek, E. t., Cheng, S., Takatoh, J., Han, B. X., & Wang, F. (2014). Monosynaptic premotor circuit tracing reveals neural substrates for oro-motor coordination. *Elife*, *3*, e02511. doi:10.7554/eLife.02511
- Steinhauser, C., & Gallo, V. (1996). News on glutamate receptors in glial cells. *Trends Neurosci*, *19*(8), 339-345.
- Steinhauser, C., Grunnet, M., & Carmignoto, G. (2016). Crucial role of astrocytes in temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*, *323*, 157-169. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.12.047
- Stephanie Griemsmann, Simon P. Höft, Peter Bedner, Jiong Zhang, Elena von Staden, Anna Beinhauer, . . . Steinhäuser, C. (2015). Characterization of Panglial Gap Junction Networks in the Thalamus, Neocortex, and Hippocampus Reveals a Unique Population of Glial Cells. *Cereb Cortex*, *25*, 3420-3433.
- Stergiopoulos, K., Alvarado, J. L., Mastroianni, M., Ek-Vitorin, J. F., Taffet, S. M., & Delmar, M. (1999). Hetero-domain interactions as a mechanism for the regulation of connexin channels. *Circ Res*, *84*(10), 1144-1155.
- Stout, C. E., Costantin, J. L., Naus, C. C., & Charles, A. C. (2002). Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *J Biol Chem*, *277*(12), 10482-10488. doi:10.1074/jbc.M109902200
- Straub, S. V., Bonev, A. D., Wilkerson, M. K., & Nelson, M. T. (2006). Dynamic inositol trisphosphate-mediated calcium signals within astrocytic endfeet underlie vasodilation of cerebral arterioles. *J Gen Physiol*, *128*(6), 659-669. doi:10.1085/jgp.200609650
- Su, H., Alroy, G., Kirson, E. D., & Yaari, Y. (2001). Extracellular calcium modulates persistent sodium current-dependent burst-firing in hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci*, *21*(12), 4173-4182.
- Suadicani, S. O., Brosnan, C. F., & Scemes, E. (2006). P2X7 receptors mediate ATP release and amplification of astrocytic intercellular Ca²⁺ signaling. *J Neurosci*, *26*(5), 1378-1385. doi:10.1523/JNEUROSCI.3902-05.2006

- Svoboda, P. (2007). Off-targeting and other non-specific effects of RNAi experiments in mammalian cells. *Curr Opin Mol Ther*, 9(3), 248-257.
- Swanson, R. A. (2005). Astrocyte Neurotransmitter Uptake. In O. S. Online (Ed.), *Neuroglia* (pp. 346-354): Helmut Kettenmann
- Bruce R. Ransom
- Tabernero, A., Giaume, C., & Medina, J. M. (1996). Endothelin-1 regulates glucose utilization in cultured astrocytes by controlling intercellular communication through gap junctions. *Glia*, 16(3), 187-195. doi:10.1002/(SICI)1098-1136(199603)16:3<187::AID-GLIA1>3.0.CO;2-#
- Takamori, S., Rhee, J. S., Rosenmund, C., & Jahn, R. (2000). Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. *Nature*, 407(6801), 189-194. doi:10.1038/35025070
- Takata, N., & Hirase, H. (2008). Cortical layer 1 and layer 2/3 astrocytes exhibit distinct calcium dynamics in vivo. *PLoS One*, 3(6), e2525. doi:10.1371/journal.pone.0002525
- Takemura, M., Sugimoto, T., & Shigenaga, Y. (1991). Difference in central projection of primary afferents innervating facial and intraoral structures in the rat. *Exp Neurol*, 111(3), 324-331.
- Tanaka, S., Kogo, M., Chandler, S. H., & Matsuya, T. (1999). Localization of oral-motor rhythmogenic circuits in the isolated rat brainstem preparation. *Brain Res*, 821(1), 190-199.
- Tas, P. W., Massa, P. T., Kress, H. G., & Koschel, K. (1987). Characterization of an Na⁺/K⁺/Cl⁻ co-transport in primary cultures of rat astrocytes. *Biochim Biophys Acta*, 903(3), 411-416.
- Tazerart, S., Vinay, L., & Brocard, F. (2008). The persistent sodium current generates pacemaker activities in the central pattern generator for locomotion and regulates the locomotor rhythm. *J Neurosci*, 28(34), 8577-8589. doi:10.1523/JNEUROSCI.1437-08.2008
- Teubner, B., Degen, J., Sohl, G., Guldenagel, M., Bukauskas, F. F., Trexler, E. B., . . . Willecke, K. (2000). Functional expression of the murine connexin 36 gene coding for a neuron-specific gap junctional protein. *J Membr Biol*, 176(3), 249-262.
- Theis, M., Jauch, R., Zhuo, L., Speidel, D., Wallraff, A., Doring, B., . . . Willecke, K. (2003). Accelerated hippocampal spreading depression and enhanced locomotory activity in mice with astrocyte-directed inactivation of connexin43. *J Neurosci*, 23(3), 766-776.
- Tong, X., Ao, Y., Faas, G. C., Nwaobi, S. E., Xu, J., Hausteiner, M. D., . . . Khakh, B. S. (2014). Astrocyte Kir4.1 ion channel deficits contribute to neuronal dysfunction in Huntington's disease model mice. *Nat Neurosci*, 17(5), 694-703. doi:10.1038/nn.3691
- Topert, C., Doring, F., Wischmeyer, E., Karschin, C., Brockhaus, J., Ballanyi, K., . . . Karschin, A. (1998). Kir2.4: a novel K⁺ inward rectifier channel associated with motoneurons of cranial nerve nuclei. *J Neurosci*, 18(11), 4096-4105.
- Torres, A., Wang, F., Xu, Q., Fujita, T., Dobrowolski, R., Willecke, K., . . . Nedergaard, M. (2012). Extracellular Ca²⁺ acts as a mediator of communication from neurons to glia. *Sci Signal*, 5(208), ra8. doi:10.1126/scisignal.2002160
- Travaglini, R. A., Dunwiddie, T. V., & Williams, J. T. (1995). Opioid inhibition in locus coeruleus. *J Neurophysiol*, 74(2), 519-528. doi:10.1152/jn.1995.74.2.519
- Travers, J. B. (2015). Oromotor Nuclei. In.

- Travers, J. B., & Norgren, R. (1983). Afferent projections to the oral motor nuclei in the rat. *J Comp Neurol*, 220(3), 280-298. doi:10.1002/cne.902200303
- Trulsson, M., & Johansson, R. S. (2002). Orofacial mechanoreceptors in humans: encoding characteristics and responses during natural orofacial behaviors. *Behav Brain Res*, 135(1-2), 27-33.
- Tsuboi, A., Kolta, A., Chen, C. C., & Lund, J. P. (2003). Neurons of the trigeminal main sensory nucleus participate in the generation of rhythmic motor patterns. *Eur J Neurosci*, 17(2), 229-238.
- Tsuruyama, K., Hsiao, C. F., & Chandler, S. H. (2013). Participation of a persistent sodium current and calcium-activated nonspecific cationic current to burst generation in trigeminal principal sensory neurons. *J Neurophysiol*, 110(8), 1903-1914. doi:10.1152/jn.00410.2013
- Urbani, A., & Belluzzi, O. (2000). Riluzole inhibits the persistent sodium current in mammalian CNS neurons. *Eur J Neurosci*, 12(10), 3567-3574.
- Valentin. (1836). Uber den Verlauf und die letzten Enden der Nerven. *Nova Acta Phys-Med Acad Leopoldina*, 18, 51-240.
- Valiunas, V., & Weingart, R. (2000). Electrical properties of gap junction hemichannels identified in transfected HeLa cells. *Pflugers Arch*, 440(3), 366-379.
- Van Eldik, L. J., & Zimmer, D. B. (1987). Secretion of S-100 from rat C6 glioma cells. *Brain Res*, 436(2), 367-370.
- van Veen, T. A., van Rijen, H. V., & Jongsma, H. J. (2000). Electrical conductance of mouse connexin45 gap junction channels is modulated by phosphorylation. *Cardiovasc Res*, 46(3), 496-510.
- Ventura, R., & Harris, K. M. (1999). Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *J Neurosci*, 19(16), 6897-6906.
- Verkhratsky, A., & Butt, A. (2013). *Glial Physiology and Pathophysiology* (Wiley-Blackwell Ed.).
- Vessey, J. P., Lalonde, M. R., Mizan, H. A., Welch, N. C., Kelly, M. E., & Barnes, S. (2004). Carbenoxolone inhibition of voltage-gated Ca channels and synaptic transmission in the retina. *J Neurophysiol*, 92(2), 1252-1256. doi:10.1152/jn.00148.2004
- Viggiano, A., Manara, R., Conforti, R., Paccone, A., Secondulfo, C., Lorusso, L., . . . Esposito, F. (2015). Mastication induces long-term increases in blood perfusion of the trigeminal principal nucleus. *Neuroscience*, 311, 75-80. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.10.017
- Virchow. (1856). Gesammelte Abhandlungen zur Wissenschaftlichen Medicin. *Frankfurt A. M: Meidinger Sohn & Comp.*
- Viswanathan, A., & Freeman, R. D. (2007). Neurometabolic coupling in cerebral cortex reflects synaptic more than spiking activity. *Nat Neurosci*, 10(10), 1308-1312. doi:10.1038/nn1977
- Wadle, S. L., Augustin, V., Langer, J., Jabs, R., Philippot, C., Weingarten, D. J., . . . Stephan, J. (2018). Anisotropic Panglial Coupling Reflects Tonotopic Organization in the Inferior Colliculus. *Front Cell Neurosci*, 12, 431. doi:10.3389/fncel.2018.00431
- Wallraff, A., Kohling, R., Heinemann, U., Theis, M., Willecke, K., & Steinhauser, C. (2006). The impact of astrocytic gap junctional coupling on potassium buffering in the hippocampus. *J Neurosci*, 26(20), 5438-5447. doi:10.1523/JNEUROSCI.0037-06.2006

- Walz, W., Gimpl, G., Ohlemeyer, C., & Kettenmann, H. (1994). Extracellular ATP-induced currents in astrocytes: involvement of a cation channel. *J Neurosci Res*, *38*(1), 12-18. doi:10.1002/jnr.490380104
- Wang, N., De Bock, M., Antoons, G., Gadicherla, A. K., Bol, M., Decrock, E., . . . Leybaert, L. (2012). Connexin mimetic peptides inhibit Cx43 hemichannel opening triggered by voltage and intracellular Ca²⁺ elevation. *Basic Res Cardiol*, *107*(6), 304. doi:10.1007/s00395-012-0304-2
- Wang, N., De Vuyst, E., Ponsaerts, R., Boengler, K., Palacios-Prado, N., Wauman, J., . . . Leybaert, L. (2013). Selective inhibition of Cx43 hemichannels by Gap19 and its impact on myocardial ischemia/reperfusion injury. *Basic Res Cardiol*, *108*(1), 309. doi:10.1007/s00395-012-0309-x
- Wasseff, S. K., & Scherer, S. S. (2011). Cx32 and Cx47 mediate oligodendrocyte:astrocyte and oligodendrocyte:oligodendrocyte gap junction coupling. *Neurobiol Dis*, *42*(3), 506-513. doi:10.1016/j.nbd.2011.03.003
- Weijis, W. A., & Dantuma, R. (1981). Functional-Anatomy of the Masticatory Apparatus in the Rabbit (*Oryctolagus-Cuniculus* L). *Netherlands Journal of Zoology*, *31*(1), 99-147.
- Westneat, M. W., & Hall, W. G. (1992). Ontogeny of feeding motor patterns in infant rats: an electromyographic analysis of suckling and chewing. *Behav Neurosci*, *106*(3), 539-554.
- Widmer, C. G., Carrasco, D. I., & English, A. W. (2003a). Differential activation of neuromuscular compartments in the rabbit masseter muscle during different oral behaviors. *Experimental Brain Research*, *150*(3), 297-307. doi:10.1007/s00221-003-1464-y
- Widmer, C. G., Carrasco, D. I., & English, A. W. (2003b). Differential activation of neuromuscular compartments in the rabbit masseter muscle during different oral behaviors. *Experimental Brain Research*, *150*(3), 297-307. doi:10.1007/s00221-003-1464-y
- Widmer, C. G., Klugman, D., & English, A. W. (1997). Anatomical partitioning and nerve branching patterns in the adult rabbit masseter. *Acta Anatomica*, *159*(4), 222-232.
- Wiencken-Barger, A. E., Djukic, B., Casper, K. B., & McCarthy, K. D. (2007). A role for Connexin43 during neurodevelopment. *Glia*, *55*(7), 675-686. doi:10.1002/glia.20484
- Witts, E. C., Panetta, K. M., & Miles, G. B. (2012). Glial-derived adenosine modulates spinal motor networks in mice. *J Neurophysiol*, *107*(7), 1925-1934. doi:10.1152/jn.00513.2011
- Wu, N., Enomoto, A., Tanaka, S., Hsiao, C. F., Nykamp, D. Q., Izhikevich, E., & Chandler, S. H. (2005). Persistent sodium currents in mesencephalic v neurons participate in burst generation and control of membrane excitability. *J Neurophysiol*, *93*(5), 2710-2722. doi:10.1152/jn.00636.2004
- Xia, M., & Zhu, Y. (2011). Signaling pathways of ATP-induced PGE₂ release in spinal cord astrocytes are EGFR transactivation-dependent. *Glia*, *59*(4), 664-674. doi:10.1002/glia.21138
- Yancey, S. B., John, S. A., Lal, R., Austin, B. J., & Revel, J. P. (1989). The 43-kD polypeptide of heart gap junctions: immunolocalization, topology, and functional domains. *J Cell Biol*, *108*(6), 2241-2254.

- Ye, Z. C., Wyeth, M. S., Baltan-Tekkok, S., & Ransom, B. R. (2003). Functional hemichannels in astrocytes: a novel mechanism of glutamate release. *J Neurosci*, *23*(9), 3588-3596.
- Yeager, M., Unger, V. M., & Falk, M. M. (1998). Synthesis, assembly and structure of gap junction intercellular channels. *Curr Opin Struct Biol*, *8*(4), 517-524.
- Yen, M. R., & Saier, M. H., Jr. (2007). Gap junctional proteins of animals: the innexin/pannexin superfamily. *Prog Biophys Mol Biol*, *94*(1-2), 5-14. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2007.03.006
- Yoshida, A., Hiraga, T., Moritani, M., Chen, K., Takatsuki, Y., Hirose, Y., . . . Shigenaga, Y. (1998). Morphologic characteristics of physiologically defined neurons in the cat trigeminal nucleus principalis. *J Comp Neurol*, *401*(3), 308-328.
- Zanotti, S., & Charles, A. (1997). Extracellular calcium sensing by glial cells: low extracellular calcium induces intracellular calcium release and intercellular signaling. *J Neurochem*, *69*(2), 594-602.
- Zhang, J. M., Wang, H. K., Ye, C. Q., Ge, W., Chen, Y., Jiang, Z. L., . . . Duan, S. (2003). ATP released by astrocytes mediates glutamatergic activity-dependent heterosynaptic suppression. *Neuron*, *40*(5), 971-982.
- Zhang, Q., Hu, B., Sun, S., & Tong, E. (2003). Induction of increased intracellular calcium in astrocytes by glutamate through activating NMDA and AMPA receptors. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, *23*(3), 254-257.
- Zhang, X., Zou, T., Liu, Y., & Qi, Y. (2006). The gating effect of calmodulin and calcium on the connexin50 hemichannel. *Biol Chem*, *387*(5), 595-601. doi:10.1515/BC.2006.076
- Zhou, M., & Kimelberg, H. K. (2001). Freshly isolated hippocampal CA1 astrocytes comprise two populations differing in glutamate transporter and AMPA receptor expression. *J Neurosci*, *21*(20), 7901-7908.
- Zhou, M., Xu, G., Xie, M., Zhang, X., Schools, G. P., Ma, L., . . . Chen, H. (2009). TWIK-1 and TREK-1 are potassium channels contributing significantly to astrocyte passive conductance in rat hippocampal slices. *J Neurosci*, *29*(26), 8551-8564. doi:10.1523/JNEUROSCI.5784-08.2009
- Ziak, D., Chvatal, A., & Sykova, E. (1998). Glutamate-, kainate- and NMDA-evoked membrane currents in identified glial cells in rat spinal cord slice. *Physiol Res*, *47*(5), 365-375.