

Université de Montréal

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

par Marc Couillard-Larocque

Département de neurosciences, Université de  
Montréal Faculté de Médecine

Mémoire présenté  
en vue de l'obtention du grade de  
Maîtrise en Neurosciences

avril 2020

© Marc Couillard-Larocque, 2020

Université de Montréal  
Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé :

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

Présenté par :

MARC COUILLARD-LAROCQUE

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

**Hélène Girouard** : Président-rapporteur

**Arlette Kolta** : Directeur de recherche

**Réjean Dubuc** : Membre du jury

# 1 Résumé

De nombreuses fonctions cérébrales dépendent de la capacité de réseaux de neurones à générer une activité rythmique. Les réseaux neuronaux, nommés générateurs de patron centraux (GPCs), contrôlant les patrons de mouvements répétitifs comme la locomotion, la respiration et la mastication en sont un exemple important. Des travaux antérieurs ont montré que le noyau sensoriel principal du trijumeau (NVsnpr), qui fait partie du GPC de la mastication, contient des neurones qui peuvent décharger de façon rythmique et que les astrocytes et leur protéine S100 $\beta$  étaient nécessaires pour cette rythmogénèse neuronale. Cependant, l'effet de l'activation directe des astrocytes sur la décharge des neurones du NVsnpr n'a jamais été investigué. De plus, comme les astrocytes forment des réseaux bien définis dans le NVsnpr, nous avons émis l'hypothèse que l'activation de ces réseaux pourrait contribuer à synchroniser l'activité rythmique de groupes de neurones. Pour investiguer ces deux questions, nous avons utilisé des enregistrements en mode cellules entières de neurones et d'astrocytes du NVsnpr lors de stimulations optogénétiques des astrocytes chez des souris transgéniques. Différentes lignées de souris transgéniques ont été utilisées pour exprimer des protéines photosensibles comme la channelrhodopsin (ChR2) ou le récepteur adrénergique  $\alpha$ -1 dans les astrocytes du NVsnpr dans le but de pouvoir les stimuler par l'exposition à la lumière. De ces lignées, seul le croisement de souris S100 $\beta$ -Cre à des souris ChR2-lox donna des réponses significatives. Ces résultats démontrent que la stimulation optogénétique des astrocytes du NVsnpr cause divers effets sur la décharge neuronale, dont la genèse de bouffées rythmiques. Cependant, l'enregistrement de paires de neurones n'a pas permis de confirmer l'implication des astrocytes dans la synchronisation de l'activité rythmique des neurones de NVsnpr. Ces résultats permettent d'affiner les méthodes d'études des astrocytes dans le système trigéminal ainsi que de confirmer l'implication des astrocytes dans une activité rythmique, une implication qui pourrait potentiellement être observée dans d'autres structures du système nerveux central comme les GPCs de la locomotion ou de la respiration.

**Mots-clés** : Mastication, Générateurs de patrons centraux, Communication neurone-glie Noyau sensoriel principal du trijumeau, S100 $\beta$ , Optogénétique.

## 2 Abstract

Several cerebral functions depend on the capacity of neural network to generate a rhythmic activity. One prominent example of this is the neural networks, named central pattern generators (CPGs), controlling repetitive movements patterns like locomotion, breathing and chewing. Previous studies have shown that the trigeminal main sensory nucleus (NVsnpr), which is part of the masticatory CPG, contains neurons that can rhythmically discharge and that the astrocytes and their protein, S100 $\beta$ , were essential for this neuronal rhythmogenesis. However, the effect of the activation of astrocytes on neuronal discharge of the NVsnpr remains uninvestigated. Additionally, since astrocytes form well-defined networks in the NVsnpr, we hypothesized that the activation of these networks could help synchronize the rhythmic activity of groups of neurons. To investigate these questions, we used whole cell recordings of neurons and astrocytes of the NVsnpr during optogenetic stimulation of astrocytes in transgenic mice. Different mice strains have been used to express photosensitive proteins such as channelrhodopsin (ChR2) or the  $\alpha$ -1 adrenergic receptor in NVsnpr astrocytes to enable their stimulation with light. Of all these strains, only the S100 $\beta$ -Cre X ChR2-lox hybrids provided significant responses. Optogenetic stimulation of NVsnpr astrocytes produced various effects on neuronal discharge, including the genesis of rhythmic bursts. However, the recording of pairs of neurons did not confirm the involvement of astrocytes in the synchronization of the rhythmic activity of NVsnpr neurons. These results contribute to the refinement of methods used to study astrocytes in the trigeminal system and confirm the involvement of astrocytes in rhythmogenesis, an involvement that could be observed in other structures of the central nervous system such as the CPGs for respiration or locomotion.

**Keywords:** Mastication, Central pattern generator, Neuron-Glia Communication, Trigeminal main sensory nucleus, S100 $\beta$ , Optogenetic.

# Table des matières

1	Résumé.....	3
2	Liste des tableaux.....	7
3	Listes des figures .....	8
4	Listes des sigles.....	10
5	Introduction.....	14
5.1	Mise en contexte.....	14
5.2	Mouvement masticatoire.....	15
5.3	Muscles de la mastication .....	17
5.4	Noyau moteur du Trijumeau .....	18
5.5	L'aire corticale masticatoire .....	20
5.6	Générateur de Patron Central.....	21
5.6.1	Le GPC de la mastication .....	23
5.7	Noyau sensoriel principal du trijumeau .....	25
5.8	Rythmogénèse du Noyau sensoriel principal du trijumeau .....	26
5.8.1	Rythmogénèse du Noyau sensoriel principal du trijumeau .....	26
5.8.2	Stimuli invoquant la rythmogénèse dans le NVsnpr .....	29
5.9	Implication des astrocytes dans la rythmogénèse du Noyau sensoriel principal du trijumeau .	29
5.9.1	Les astrocytes .....	29
5.9.2	Activité astrocytaire et couplage.....	31
5.9.3	Gliotransmetteurs .....	32
5.10	Interactions neurone glie .....	33
5.10.1	La synapse tripartite.....	33
5.10.2	Rythmogénèse et astrocytes dans le NVsnpr.....	34
5.10.3	Rythmogénèse et astrocytes .....	35
5.11	Objectifs de l'étude .....	36
6	Matériel et méthode .....	38
6.1	Préparation des tranches .....	38
6.2	Électrophysiologie .....	38
6.3	Optogénétique .....	39
6.4	Analyse des résultats.....	40
7	Résultats .....	40

7.1	Effet de la stimulation optogénétique des astrocytes sur les astrocytes du NVsnpr dans différentes lignées de souris .....	41
7.1.1	Propriétés de base des astrocytes du NVsnpr.....	41
7.1.2	Réponse optogénétique des astrocytes du NVsnpr de différentes lignées de souris.....	42
7.1.3	Souris S100 $\beta$ -Cre/ChR2-lox .....	42
7.2	Effet de la stimulation optogénétique des astrocytes sur les neurones du NVsnpr dans différentes lignées de souris .....	44
7.2.1	Propriété de base des neurones du NVsnpr.....	44
7.2.2	Réponse des neurones du NVsnpr à la stimulation optogénétique des astrocytes dans différentes lignées de souris .....	44
7.2.3	Souris Aldh1l1-Cre/ ChR2-lox .....	45
7.2.4	Souris S100 $\beta$ -Cre/ChR2-lox .....	46
7.3	Effet de la stimulation électrique du tractus trigéminal sur les neurones du NVsnpr.....	50
7.3.1	Propriétés de base des neurones du NVsnpr .....	50
7.3.2	Effet de la stimulation simple du tractus trigéminal sur les neurones du NVsnpr.....	50
7.3.3	Effet de la stimulation électrique à haute fréquence du tractus trigéminal sur les neurones du NVsnpr.....	52
7.4	Interaction entre la stimulation électrique du tractus trigéminal et de la stimulation optogénétique des astrocytes sur les neurones du NVsnpr .....	54
7.5	Synchronisation de paires de neurones par la stimulation optogénétique des astrocytes sur les neurones du NVsnpr.....	56
8	Discussion .....	59
8.1	Les astrocytes réagissent à la stimulation optogénétique.....	59
8.2	Les neurones réagissent à la stimulation optogénétique des astrocytes .....	61
8.3	Les neurones réagissent à la stimulation électrique du tractus trigéminal .....	62
8.4	La stimulation optogénétique des astrocytes affectent la réponse des neurones à la stimulation électrique du tractus trigéminal.....	63
8.5	Synchronisation de l'activité des neurones dans le NVsnpr .....	64
8.6	Perspectives futures .....	67
8.7	Conclusion .....	68
9	Références.....	69

### **3 Liste des tableaux**

**Tableau I :** Caractéristiques électrophysiologiques des astrocytes du NVsnpr.

**Tableau II.** Nombre d'astrocytes du NVsnpr répondant à la stimulation optogénétique des astrocytes du NVsnpr sur ces astrocytes dans différentes souches de souris.

**Tableau III.** Caractéristiques électrophysiologiques des neurones du NVsnpr.

**Tableau IV.** Nombre de neurones du NVsnpr répondant à la stimulation optogénétique des astrocytes du NVsnpr sur les neurones u NVsnpr dans différentes souches de souris.

**Tableau V.** Caractéristiques électrophysiologiques des neurones du NVsnpr.

## 4 Listes des figures

**Figure 1 :** Les neurones du NVsnpr peuvent décharger de façon tonique ou rythmique.

**Figure 2 :** Patrons des mouvements de la mâchoire et électromyogrammes des muscles de la mâchoire durant une séquence masticatoire chez le lapin.

**Figure 3 :** Organisation topographique des motoneurones de noyau moteur du Trijumeau (NVmt) chez le rat présenté sur trois coupes coronales allant de rostral (A) à caudal (C).

**Figure 4 :** Schéma du tronc cérébral et des noyaux impliqués dans la mastication.

**Figure 5 :** Modèle fonctionnel de la rythmogenèse dans le NVsnpr.

**Figure 6 :** La microscopie électronique montre la proximité entre les élément neuronaux pré et post synaptique (en rose) et les prolongements astrocytaires (en bleu).

**Figure 7 :** Modèle de la séquence d'évènements menant à la rythmogenèse dans le GPC masticatoire.

**Figure 8 :** Effet de la stimulation optogénétique sur les astrocytes du NVsnpr de souris S100 $\beta$ -Cre/ChR2-lox.

**Figure 9 :** Effet de la stimulation optogénétique sur les neurones du NVsnpr de souris Aldh111-Cre/ ChR2-lox.

**Figure 10 :** Effet de la stimulation optogénétique des astrocytes de souris S100 $\beta$ -Cre/ChR2-lox sur les neurones du NVsnpr.

**Figure 11 :** Effet de la surmamine sur l'effet de la stimulation optogénétique sur des neurones du NVsnpr de souris S100 $\beta$ -Cre/ChR2-lox.

**Figure 12 :** Effet de la stimulation simple du tractus trigéminal de souris S100 $\beta$ -Cre/ChR2-lox sur les neurones du NVsnpr.

**Figure 13 :** Effet de la stimulation électrique à haute fréquence (40 Hz) du tractus trigéminal de souris S100 $\beta$ -Cre/ChR2-lox sur les neurones du NVsnpr.



**Figure 14 :** Interaction entre de la réponse évoquée par une stimulation simple du tractus trigéminal et la stimulation optogénétique des astrocytes de souris S100 $\beta$ -Cre/ChR2-lox sur les neurones du NVsnpr.

**Figure 15 :** Implication de la protéine S100 $\beta$  sur la diminution de l'effet de la stimulation simple du tractus trigéminal par la stimulation optogénétique des astrocytes de souris S100 $\beta$ -Cre/ChR2-lox sur les neurones du NVsnpr.

**Figure 16 :** Enregistrement de paires de neurones du NVsnpr lors de la stimulation optogénétique de souris S100 $\beta$ -Cre/ChR2-lox.

**Figure 17 :** La photostimulation des astrocytes cause une décharge synchrone dans une paire de neurones du NVsnpr rapprochés mais pas dans une paire de neurones éloignés.

**Figure 18 :** La stimulation à haute fréquence (45 Hz) cause une synchronisation dans les décharges d'une paire de neurones du NVsnpr.

## 5 Listes des sigles

ACM: Aire corticale masticatoire

aCSF : Liquide céphalo-rachidien artificiel

AD : Digastrique antérieur (AD)

Aldh1L1: Aldehyde Dehydrogenase 1 Family Member L1

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

ATP: Adénosine-5'-triphosphate

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

B<sub>KCa</sub>: Grands courants potassiques dépendants du calcium

GABA: Acide gamma-aminobutyrique

GCP: Générateurs de patrons centraux

GFAP: Glial fibrillary acidic protein

I<sub>nap</sub>: Courant sodique persistant

IP3: Inositol 1,4,5-triphosphate

JuxtV : Aire juxtatriginale

Ma : Masséter profond antérieur

Ms : Masseter superficiel

MY : Mylohyoïdien

Nint V : Noyau intertrigéminal Nint V

NMDA: N-méthyl-D,-aspartate

NPb : Noyau parabrachial

NVmt: Noyau moteur du Trijumeau

NVsnpr: Noyau sensoriel principal du Trijumeau

NVsnpr-D: Partie dorsale du noyau sensoriel principal du Trijumeau

NsV : Noyau supratrigéminal

PA : Potentiel d'action

PCRt : Formation réticulée parvocellulaire

PeriV : Aire pérित्रigéminal

Pl : Ptérygoïde latéral

PLC: Phospholipase C

Pm : Ptérygoïde médian

PMR : Potentiel de membrane au repos

PPSE : Potentiel post synaptique exciteur

PPSI : Potentiel post synaptique inhibiteur

$S_{KCa}$ : Petits courants potassiques dépendants du calcium

SNC: Système nerveux central

T : Muscle temporal

TEA : Tétréthylamonium

TTX: Tétrodotoxine

*Dans la communication, le plus compliqué n'est ni le message, ni la technique, mais le récepteur.*

*"Dominique Wolton"*

## 6 Remerciements

Je tiens d'abord à exprimer mes remerciements à ma directrice de recherche, Dre Arlette Kolta, pour m'avoir donné l'opportunité de faire ma maîtrise dans son laboratoire de recherche. Son encadrement et son support tout au long de mon parcours universitaire ont été incroyables et m'ont permis de développer un esprit scientifique. Elle a aussi toujours veillé à me fournir les outils nécessaires pour l'avancée de mes projets, ainsi que du soutien moral lorsque j'en avait besoin.

Merci à Dorly pour son soutien extraordinaire, aux longues heures qu'elle a passées à régler les problèmes que je rencontrais et aux multiples conseils qu'elle m'a donnés qui m'ont permis de m'améliorer.

Merci au docteur Richard Robitaille et au docteur Pierre Drapeau d'avoir été mes parrains et de m'avoir apporté leurs conseils avisés.

Merci à mes nombreux collègues du pavillon Paul G. Desmarais pour les échanges scientifiques et non scientifiques tout au long de ces années : Julien, Simon, Thomas, Alexie-Emma, Sandrine, Frédéric, Phillippe-Antoine et bien d'autres.

Merci aux membres du laboratoire que j'ai côtoyés durant toutes ces années : Steven, Danielle, Dominic, Fanny, Marwa, Dimitri, Philippe, Mohammed, Julia et Yanis pour avoir rendu l'atmosphère du laboratoire aussi chaleureux.

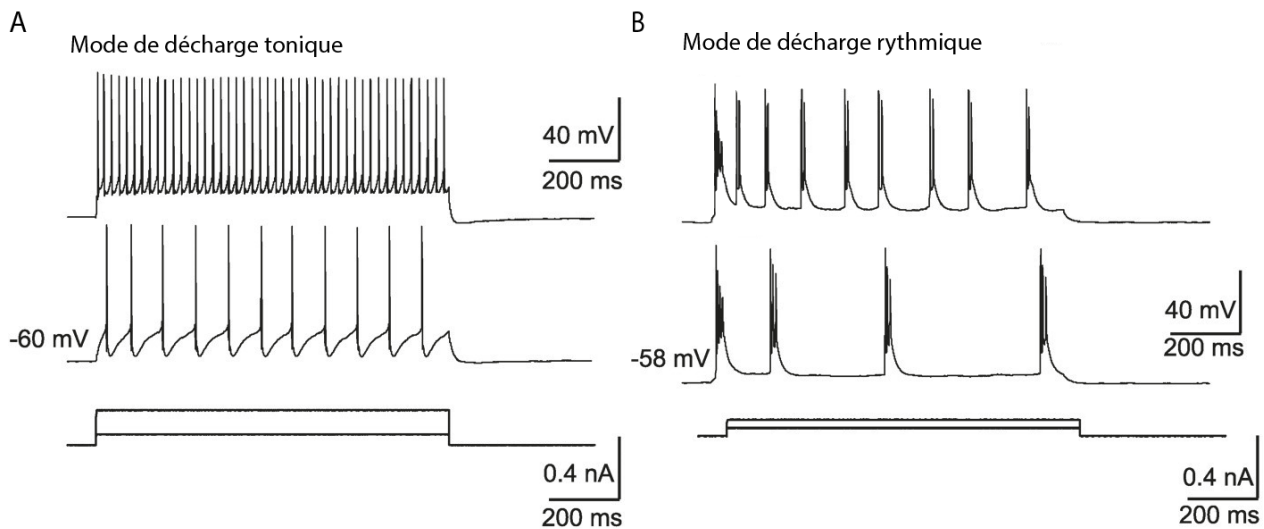
Merci à ma famille pour leur soutien continu et inconditionnel tout au long de mon parcours académique.

## 7 Introduction

### 7.1 Mise en contexte

Le patron d'activité électrique des neurones composant les circuits et réseaux du système nerveux reflètent leur fonction. Plusieurs fonctions cérébrales dépendent de la capacité des neurones de générer un patron d'activité rythmique ou d'alterner entre un mode de décharge tonique (décharge de potentiels d'actions singuliers occasionnels ou répétitifs) et un mode de décharge rythmique (Kadala et al., 2015). Ce mode de décharge rythmique est caractérisé « par des regroupements de potentiels d'actions récurrents appelés bouffées, se produisant à des intervalles de courtes durées surmontant un plateau de dépolarisation et séparées par des périodes de repolarisation relativement courtes » (Kadala et al., 2015) (Figure 1). De nombreuses fonctions, comme l'intégration sensorielle (Huh and Cho, 2013), le contrôle hormonal (MacGregor and Leng, 2012), l'attention (Crick, 1984), le sommeil (Mirmiran and Corner, 1982; Sederberg et al., 2007), ou la coordination motrice (Lee, 2003) ne nous semblent pas nécessairement liées à une activité rythmique, mais le sont pourtant. Toutefois, dans le cas des réseaux responsables de générer des mouvements rythmiques tels que la locomotion, la respiration et la mastication le lien avec la capacité de générer une activité rythmique est bien évident.

Les mouvements rythmiques comme la locomotion, la respiration et la mastication sont des mouvements répétitifs et stéréotypés. Pour pouvoir générer un patron moteur rythmé, les réseaux neuronaux qui en sont responsables doivent, selon Feldman et Grillner (Feldman and Grillner, 1983) posséder certaines caractéristiques: Une structure à un niveau supérieur du système nerveux pour contrôler l'initiation et le maintien du patron d'activation approprié, une structure de sortie permettant de transmettre le patron d'activité aux motoneurones contrôlant les muscles, une structure pouvant produire un patron rythmique, appelé générateur de patron central (GPC) et des récepteurs permettant d'envoyer de l'information lors du mouvement pour ajuster celui-ci. Ces réseaux se situent au niveau de la moelle épinière pour la locomotion (Kiehn and Butt, 2003) au niveau du tronc cérébral pour la mastication et la respiration (Feldman and Grillner, 1983; Lund, 1991; Bellingham, 1998).



**Figure 1. Les neurones du NVsnpr peuvent décharger de façon tonique ou rythmique.** A : Durant une décharge tonique, la décharge reste soutenue durant toute la dépolarisation. B : La décharge rythmique est caractérisée par des bouffées récurrentes de potentiels d'action alternant avec des phases de silence. Figure adaptée de (Brocard et al., 2006)

## 7.2 Mouvement masticatoire

Comme les autres mouvements rythmiques, la mastication est une fonction nécessaire et vitale chez la plupart des animaux. Elle constitue la première étape de la digestion, en permettant de préparer l'ingestion des aliments en broyant et segmentant le bol alimentaire avant la déglutition. Même si le mouvement masticatoire peut parfois sembler être composé d'une simple alternance entre l'ouverture et la fermeture de la mâchoire, il nécessite en fait un haut niveau de coordination entre les muscles de la langue, la mâchoire et du visage.

Le mouvement masticatoire a été beaucoup étudié chez le lapin et est composé de différentes périodes au cours desquelles les cycles masticatoires varient selon la tâche à accomplir. Schwartz et al. (1989) ont identifié trois périodes distinctes définies selon la forme de leurs mouvements (Figure 2). La période préparatoire, la période de réduction et la période de pré-déglutition (Schwartz et al., 1989).

Durant la période préparatoire, la nourriture est acheminée vers le fond de la bouche principalement par des mouvements de la langue. Les cycles durant cette période sont constitués de deux phases, d'une phase d'ouverture pour recevoir la nourriture puis d'une phase

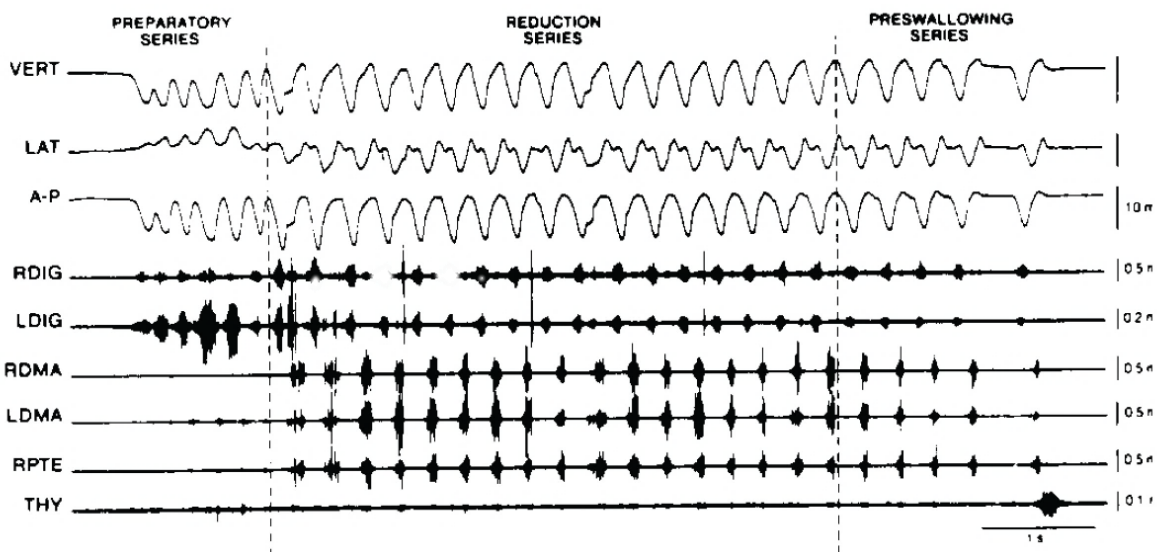
de fermeture avec très peu de mouvements latéraux. Cette période est aussi la plus courte des trois.

Les cycles de la période de réduction sont composés de trois phases, une phase d'ouverture, une phase de fermeture rapide et une phase de fermeture lente. Durant la phase de fermeture lente, les muscles de la mâchoire sont fortement activés et produisent des oscillations latérales de la mâchoire produisant un mouvement d'écrasement et de réduction (Lavigne et al., 1987; Hidaka et al., 1997). Ceci permet de broyer la nourriture entre les dents. Cette période est d'une durée intermédiaire (Lund, 1991).

Les cycles de la période de pré-déglutition sont composés de cinq phases, trois phases d'ouverture (O<sub>1</sub>, O<sub>2</sub> et O<sub>3</sub>), une phase de fermeture rapide et une phase de fermeture lente. La phase O<sub>1</sub> débute dans une position où les dents sont en contact, elle est suivie d'une pause constituant la phase O<sub>2</sub> et d'un mouvement d'ouverture maximale formant la phase O<sub>3</sub>. Les phases de fermeture rapide et lente sont semblables à celles des cycles observés durant la période de réduction, avec cependant une moins grande activité musculaire (Schwartz et al., 1989).

Le mouvement masticatoire varie beaucoup selon l'espèce pour être adapté à l'alimentation et aux contraintes physiques de l'animal. Cependant le lapin est très étudié car son patron de mouvements masticatoires se rapproche beaucoup de celui de l'humain. De plus, des études ont montré que bien que le mouvement peut varier, l'organisation du système contrôlant la mastication, le système trigéminal, semble bien conservée d'une espèce à l'autre (Huard et al., 1999). Le mouvement masticatoire varie aussi beaucoup selon la nourriture ingérée et le changement des propriétés physiques du bol alimentaire au cours de la séquence masticatoire. La longueur des cycles et la forme des mouvements semblent fortement influencées par un système de rétrocontrôle sensoriel (Lavigne et al., 1987; Mioche et al., 1999).





**Figure 2. Patrons des mouvements de la mâchoire et électromyogrammes des muscles de la mâchoire durant une séquence masticatoire chez le lapin.** Une croquette est introduite dans la gueule du lapin. Elle est transportée au niveau des molaires pendant la phase de préparation (preparatory series) puis mâchée pendant la phase de réduction (reduction series) et préparée pour la phase de déglutition (pre-swallowing series). Les trois premiers tracés représentent les mouvements de la mâchoire dans l'axe vertical (VERT), latéral (LAT) et antéro-postérieur (A-P). Les 5 autres tracés représentent les électromyogrammes de différents muscles impliqués dans la mastication : les digastriques droit et gauche (RDIG et LDIG), le masséters profonds droit et gauche (RDMA et LDMA), les muscles ptérygoïdes médians droit (RPTE) et le muscle thyrohyoïde (THY). Figure adaptée de (Schwartz et al., 1989)

### 7.3 Muscles de la mastication

Une caractéristique commune chez les mammifères est la complexité des muscles masticatoires qui occupent une partie importante de la tête (Herring, 2007). Ceux-ci peuvent être séparés en deux catégories de muscles principaux, les muscles d'ouverture de la mâchoire et ceux de fermeture, et en une catégorie de muscles accessoires. Chez le lapin, les muscles d'ouverture principaux sont le ptérygoïdien latéral et le digastrique (Aman et al., 2009). Les muscles de fermeture principaux sont le masséter, le temporal, et le ptérygoïdien médian. Les muscles accessoires de la mastication sont le mylohyoïdien, le géniohyoïdien et l'infrahyoïdien (Byrd, 1981; Hannam and McMillan, 1994). Il est à noter que bien que la même terminologie soit utilisée pour tous les animaux, celle-ci est basée sur la position de l'attachement de chaque muscle sur les os, il peut donc y avoir beaucoup de variations d'un

même muscle selon l'alimentation et la forme de la tête de l'animal (Herring, 2007). En effet, ces muscles possèdent une anatomie bien spécifique à leur fonction et certains d'entre eux présentent différents compartiments distincts pouvant être activés de façon indépendante. Un compartiment musculaire est une plus petite division anatomique d'un muscle permettant un mouvement distinct des autres (Widmer and Morris-Wiman, 2010). Par exemple, le muscle digastrique est formé de deux compartiments attachés au même tendon, la ceinture antérieure et la ceinture postérieure (Kim and Loukas, 2019), le muscle temporal est aussi formé d'une portion antérieure et une postérieure (Basit et al., 2020) et le masséter est formé de deux compartiments un superficiel et un profond (Herring et al., 1979; Corcoran and Goldman, 2020). Ces différents compartiments peuvent être activés à différents moments, par exemple des activations asynchrones des deux compartiments du muscle digastrique ont été reportées dans la littérature où, lors du contact entre les dents seulement la ceinture postérieure présente de l'activité (Munro, 1974). Aussi, durant un mouvement rétrusif, la portion postérieure du muscle temporal et la portion profonde du muscle masséter sont beaucoup plus actives que les portions antérieure et superficielle de ces mêmes muscles (Belser and Hannam, 1986).

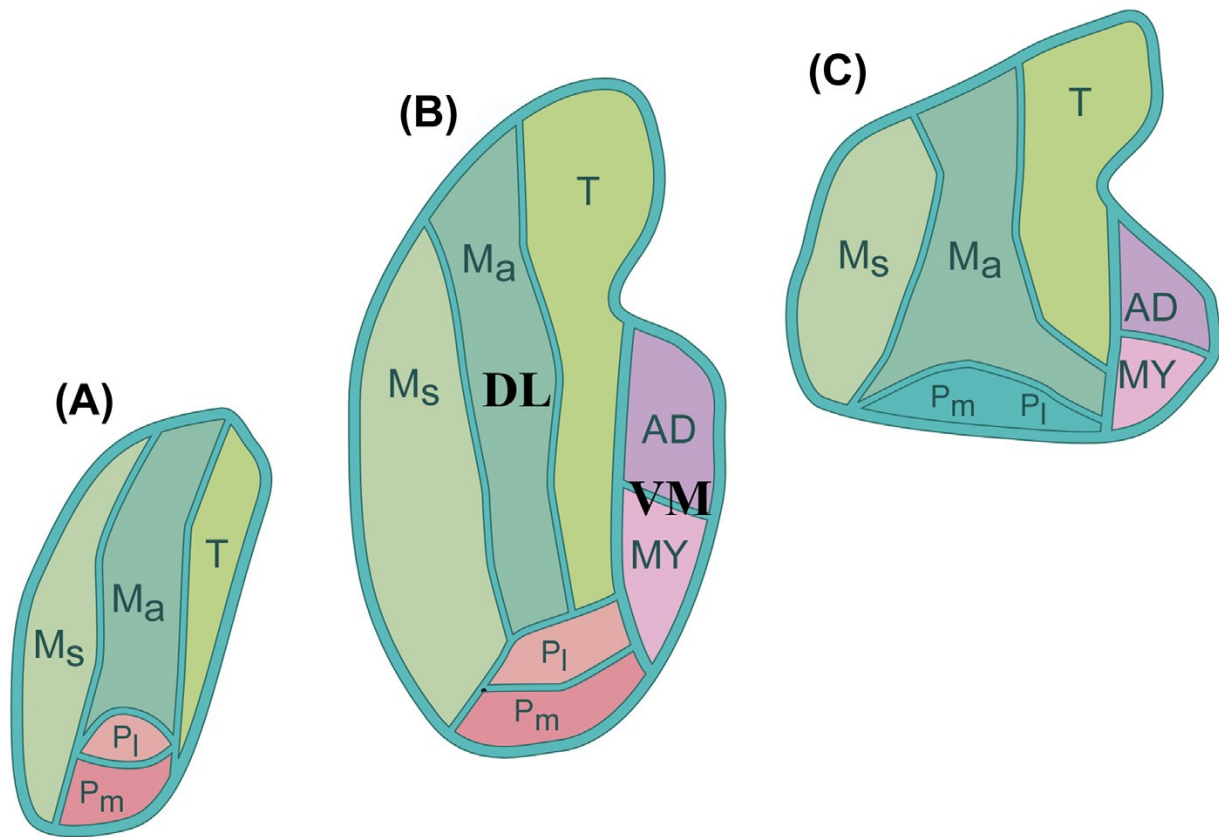
Cependant, la compartimentalisation des muscles de la mastication ne s'arrête pas à une simple division anatomique, elle peut aussi être fonctionnelle. En effet, des études chez le lapin ont démontré que le masséter pouvait compter jusqu'à 23 compartiments différents et indépendants (Saad et al., 1997; Widmer et al., 1997; Widmer et al., 2003). Il a été démontré que chacun de ces compartiments est activé par une unité motrice axonale différente et qu'ils peuvent être distingués par la trajectoire des forces produites qui est unique à chacun (Widmer et al., 2003). Ceci implique que chaque compartiment s'active pour produire une activité mécanique différentes des autres. Un autre exemple de cette partition fonctionnelle est que le muscle digastrique possède lui aussi différentes régions fonctionnelles (Tsuruyama et al., 2002).

#### **7.4 Noyau moteur du Trijumeau**

Le noyau moteur du Trijumeau (NVmt), un noyau situé dans le pont du tronc cérébral (Mizuno et al., 1975; Price and Daly, 2020), contenant la majorité des motoneurones innervant les muscles de la mastication constituerait la composante de sortie postulée par Feldman et Grillner (Feldman and Grillner, 1983) (Figure 3). Les motoneurones du NVmt peuvent être séparés en deux grandes populations fonctionnelles. La première population occupe environ le

deux-tiers du noyau et se situe dans la partie dorso-latérale rostrale. Cette population contrôle les muscles de fermeture de la mâchoire, le masséter, le temporal, et le ptérygoïdien médian. Les motoneurones de cette population sont organisés précisément de façon topographique. La deuxième population plus restreinte de motoneurones se situe dans la partie ventro-médiane et contrôle les muscles d'ouverture de la mâchoire (Limwongse and DeSantis, 1977; Jacquin et al., 1983). Les motoneurones du NVmt sont majoritairement cholinergique et peuvent être catégorisés comme de type motoneurones- $\alpha$  (Limwongse and DeSantis, 1977). Cependant, les motoneurones du NVmt ne sont pas les seuls motoneurones innervant les muscles de la mastication directement. Un autre groupe de motoneurones de type  $\gamma$  nommé groupe K localisé ventro-latéralement au NVmt innerve le masséter (Donga et al., 1992; Saad et al., 1997) et la partie postérieure du muscle digastrique est innervé par la branche digastrique du nerf facial (Kim and Loukas, 2019).

Le NVmt est sous le contrôle direct et indirect de plusieurs structures à différents niveaux du système nerveux central. Ses motoneurones reçoivent des inputs directs de trois groupes de pré-motoneurones : un groupe, composé des neurones du noyau intertrigéminal (Nint V) et de la partie dorsale du noyau sensoriel principal du Trijumeau (NVsnpr-D), innerve principalement, mais pas exclusivement, la partie dorso-latérale rostrale du NVmt. Un deuxième, provenant de la formation réticulée parvocellulaire (PCRt) et de la partie intermédiaire du noyau sensoriel principal du Trijumeau, innerve majoritairement la partie ventro-médiane du NVmt. Un troisième composé du noyau parabrachial (NPb), du noyau supratrigéminal (NsV) et l'aire juxtatrégeminale (JuxtV), innerve les deux parties du NVmt (Li et al., 1993; Yoshida et al., 2009). Ces régions sont composées principalement de neurones excitateurs exprimant le glutamate ou de neurones inhibiteurs exprimant le GABA ou la glycine. Le NVmt est aussi sous un contrôle indirect de plusieurs structures différentes comme le cortex moteur, l'amygdale et l'hypothalamus qui recrutent les pré-motoneurones masticatoires dans d'autres structures comme la formation réticulé latérale.



**Figure 3. Organisation topographique des motoneurones de noyau moteur du Trijumeau (NVmt) chez le rat présenté sur trois coupes coronales allant de rostral (A) à caudal (C).** Les motoneurones innervant les muscles de fermeture de la mâchoire se retrouvent dans la partie dorso-latérale (DL), le masséter superficiel (Ms), le masséter profond antérieur (Ma), le temporal (T), le ptérygoïde médian (Pm) et latéral (Pl). Les motoneurones innervant les muscles d'ouverture de la mâchoire se retrouve dans le digastrique antérieur (AD) et le mylohyoïdien (MY). Figure provenant de (Travers, 2015).

### 7.5 L'aire corticale masticatoire

Le cortex est une des premières structures de contrôle de la mastication identifié dans la littérature. Différentes études sur différentes espèces animales, comme le lapin et le cochon d'inde, ont montré que la stimulation électrique du cortex pouvait mener à des mouvements de la mâchoire semblables aux mouvements rythmiques de la mastication (Ferrier, 1886; Rioch,

1934; Chase and McGinty, 1970; Nakamura et al., 1976). Par la suite, l'aire corticale masticatoire (ACM) fût rapidement identifiée comme se trouvant dans le cortex sensori-moteur pour le lapin et le cochon-d'inde (Bremer, 1923; Lund et al., 1984; Nozaki et al., 1986a; Liu et al., 1993) et latéral au cortex péricentral pour le singe (Martin et al., 1999). La stimulation électrique de différentes parties de l'ACM permet de produire différents patrons de mouvement masticatoires, les stimulations de la partie antérieure causent des mouvements similaires à ceux de la période préparatoire et des stimulations de la partie postérieure causent des mouvements similaires à ceux de la période de réduction (Lund et al., 1984),

Cependant, l'ACM n'innervent pas directement les motoneurones responsables du contrôle des muscles de la mastication. En effet, chez le lapin, la fréquence de stimulation dans l'ACM n'affecte pas la fréquence du mouvement masticatoire, le début et la fin du mouvement se produisent avec un important délai (pouvant aller jusqu'à 10 sec) après le début et la fin de la stimulation et un lapin paralysé et décérébré peut continuer de produire un rythme neuronal masticatoire (Bremer, 1923; Dellow and Lund, 1971) . Ces observations pointent vers une génération du rythme masticatoire par une autre structure du système nerveux sous le contrôle de l'ACM, un GPC.

## 7.6 Générateur de Patron Central

Les GPC sont étudiés depuis que leur concept a été proposé par Thomas Graham Brown en 1911, à la suite de ses études chez le chat et le cochon d'Inde (Brown, 1911). Ce sont des réseaux de neurones capables de produire une activité rythmique permettant une alternance entre l'excitation et l'inhibition des motoneurones innervant les muscles lors d'un mouvement. Cependant, le mécanisme exact leur permettant de générer une activité rythmique et d'adapter cette activité selon les informations transmises par les afférences sensorielles reste encore partiellement incompris. Deux grands mécanismes généraux ont été proposés pour expliquer cette capacité de produire une activité rythmée, le premier se concentrant sur les propriétés intrinsèques de neurones «pacemaker», alors que le second se concentre sur les connexions synaptiques du réseau (Harris-Warrick, 2010). En principe, un GPC peut continuer de produire son activité rythmique même s'il est isolé des centres supérieurs ou des afférences sensorielles périphériques (McCrea and Rybak, 2008). Dans le premier concept de GPC proposé par Thomas Graham Brown, le GPC est séparé en deux demi-centres composés d'interneurones contrôlant les motoneurones fléchisseurs ou extenseurs d'un côté du corps. Une inhibition

croisée empêche les deux demi-centres de décharger en même temps, le rythme est produit grâce à l'alternance entre les deux lorsque l'activité de celui qui décharge s'abaisse par fatigue et que l'inhibition de l'autre diminue en dessous d'un certain seuil (Brown, 1911). Cependant, depuis, le concept de GPC a beaucoup évolué dû aux limitations présentées par ce modèle.

Tout d'abord, Miller et Scott (1977) ont proposé que l'alternance entre les fléchisseurs et les extenseurs n'était pas causée par la fatigue, mais par les cellules de Renshaw. L'augmentation de l'activité dans un groupe de motoneurones serait accompagnée de l'augmentation d'une inhibition récurrente venant diminuer cette activité. Durant un mouvement rythmique, les cellules de Renshaw viendraient progressivement retirer l'inhibition réciproque des motoneurones des muscles antagonistes en inhibant les neurones inhibiteurs la facilitation récurrente (Miller and Scott, 1977). Ce modèle prenait bien en compte l'architecture neuronale connue à l'époque, cependant il possède de nombreuses failles, notamment, les cellules de Renshaw peuvent être inhibées durant une activité motrice (Orlovskii et al., 1966; Bergmans et al., 1969).

Une des limitations de ces modèles est l'impossibilité d'expliquer l'existence de patrons locomoteurs complexes. Un des premiers modèles tentant d'expliquer de tels patrons, est le « ring model ». Ce modèle très conceptuel, proposait l'existence de chaînes d'au moins cinq groupes de neurones extenseurs, fléchisseurs ou bifonctionnels, projetant vers les motoneurones. Les patrons moteurs sont donc créés par la séquence d'activation des groupes dans ces chaînes (Szekely et al., 1969). Un autre modèle s'attaquant à cette limitation a été proposé par Grillner dans les années 80. Ce modèle propose l'existence de modules séparés d'interneurones générateurs de rythme pour contrôler différents groupes de motoneurones (Grillner, 1981). Un tel modèle permet d'expliquer comment des groupes de motoneurones, comme pour le muscle semitendineux, peuvent être actifs durant les phases d'extension et de flexion (Grillner and Zangger, 1975; Edgerton et al., 1976; Rossignol, 1996)

Bien qu'un pas dans la bonne direction, ce modèle ne permet pas d'expliquer parfaitement la génération de patron moteur rythmique. Durant le mouvement, des groupes de motoneurones peuvent devenir silencieux, un phénomène appelé délétion, alors que les motoneurones antagonistes sont actifs (McCrea and Rybak, 2008). Aussi, dans les modèles précédents, les neurones produisant le rythme sont connectés directement aux motoneurones, une telle

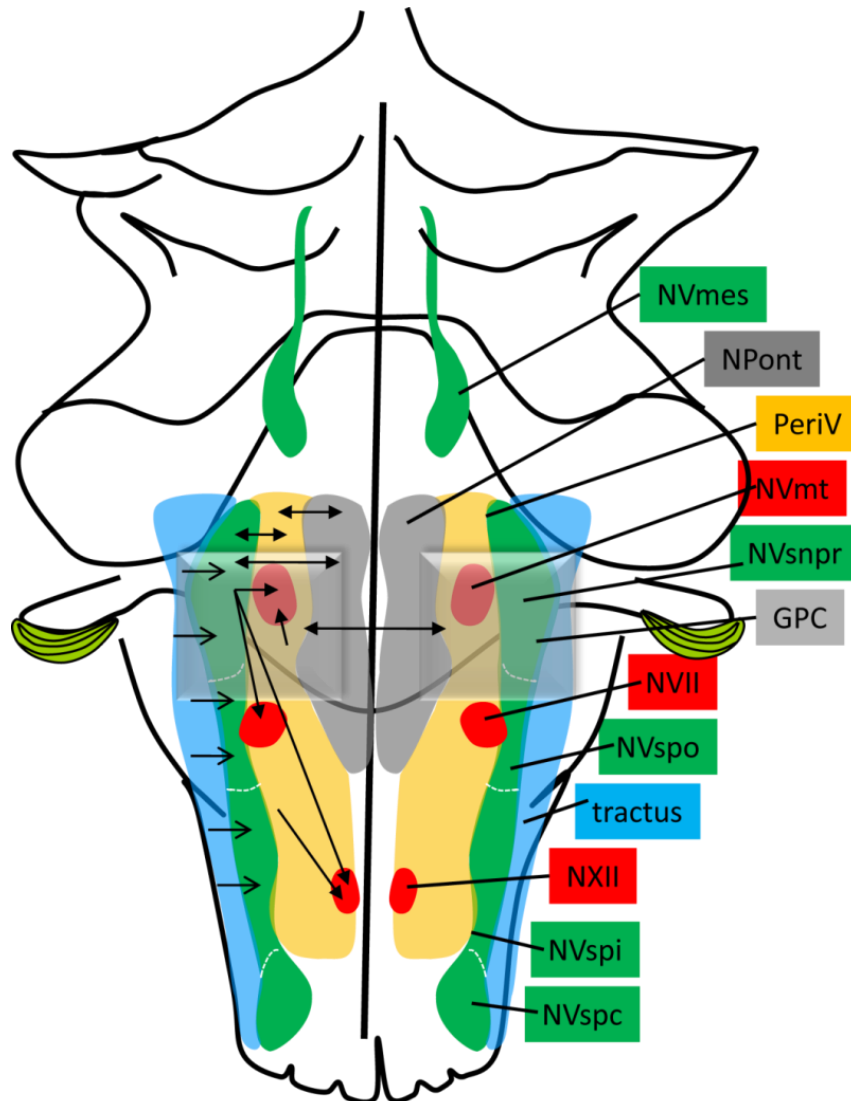
configuration causerait un changement dans le patron de décharge des motoneurones au moindre changement d'excitabilité dans les demi-centres. Ces limitations ont poussé Perret et Cabelguen à proposer un modèle de GPC à 2 niveaux, où un niveau génère l'activité des motoneurones (générateur de patron) et un autre gère le rythme (générateur de rythme), un modèle par la suite affiné par d'autres (Perret and Cabelguen, 1980; Kriellaars et al., 1994; Rybak et al., 2006b; Rybak et al., 2006a). Une telle séparation du contrôle du rythme et du patron permet aussi d'expliquer comment une stimulation sensorielle peut affecter les cycles moteurs sans pour autant affecter le niveau d'activité des motoneurones (Kriellaars et al., 1994; Guertin et al., 1995; Perreault et al., 1995)

### 7.6.1 Le GPC de la mastication

La circuiterie du GPC de la locomotion reste encore aujourd'hui grandement étudiée, cependant sa complexité chez le mammifère en limite encore la compréhension. Ce qui a mené certains chercheurs à se pencher sur des circuiteries plus simples, comme celle du GPC de la mastication pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la rythmogénèse et les principes d'organisation des GPC.

La composition exacte des éléments formant le GPC de la mastication reste encore à définir aujourd'hui. Toutefois, sa localisation est connue de façon plus approximative. Il a d'abord été localisé dans le tronc cérébral de lapins paralysés et décérébrés par Lund et Dellow (Dellow and Lund, 1971). Ceux-ci ont démontré qu'une activité rythmique dans les nerfs de la mâchoire et de la langue était produite par des stimulations électriques dans les voies descendantes cortico-bulbaires de ces lapins (Dellow and Lund, 1971). Une expérience similaire chez le chat montre que la paralysie pouvait diminuer l'amplitude et la fréquence du rythme sans toutefois pouvoir l'éliminer complètement (Nakamura et al., 1976). Plus tard, des études *in vitro* et *in vivo* ont permis de restreindre la localisation du GPC à une zone du tronc cérébral entre la partie rostrale du NVmt et la partie rostrale du noyau facial (Nozaki et al., 1986b; Kogo et al., 1996; Tanaka et al., 1999) (Figure 4). Cette région comprend plusieurs structures comme le NVsnpr, le noyau pontis caudalis et l'aire péritrigéminal (PeriV) entourant le NVmt et comprenant quatre des régions contenant des neurones pré moteurs ci-haut mentionnées; soit IntV latéralement au NVmt; SupV dorsalement; JuxtV médialement et PCRt ventralement et caudalement. Cependant, seulement les neurones de la partie dorsale du NVsnpr et un faible

pourcentage des interneurons de Sup V présentent des propriétés rythmogéniques (Sandler et al., 1998; Bourque and Kolta, 2001)



**Figure 4. 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 sensoriel du trijumeau (NVsnpr) au pôle rostral de la bande verte possède des neurones rythmogènes et est contacté par les afférences sensorielles dont les axones forment le tractus trigéminal (bande bleue). Les noyaux moteurs (NVmt) contenant les motoneurones sont représentées dans les zones rouges, alors que les interneurons prémoteurs de la région péri-trigéminal (PeriV) sont dans la bande jaune. Les flèches représentent les connexions et projections entre les différents noyaux. Figure adaptée de (Kolta et al., 2010).



## 7.7 Noyau sensoriel principal du trijumeau

Longtemps considéré comme un relais sensoriel vers le thalamus, le NVsnpr se situe latéralement à la région IntV et s'étend de la limite entre le rhombomère 1 et 2 jusqu'à la jonction des rhombomères 3 et 4 (Watson, 2012). Il peut être séparé en deux divisions anatomiques, une division dorsomédiale (NVsnpr-D) et une division ventrolatérale (NVsnpr-V) (Franklin and Paxinos, 2019). Le NVsnpr reçoit des inputs des trois branches du nerf du trijumeau qui y projettent de façon topographique, avec une représentation inversée de la face, c'est-à-dire les régions supérieures du visage y sont représentées ventralement et les régions inférieures dorsalement (Eisenman et al., 1963; Shigenaga et al., 1986). La branche mandibulaire du nerf trijumeau innerve donc la partie dorsale du NVsnpr, la branche ophtalmique innerve la partie ventrale et la branche maxillaire innerve autour de la division du NVsnpr ((Eisenman et al., 1963; Gregg and Dixon, 1973; Marfurt, 1981). Toutes les parties du NVsnpr sont peuplées de neurones transmettant l'information sensorielle jusqu'au cortex sensoriel primaire en passant par le noyau ventral postéromédian du thalamus tout en conservant la somatotopie (Eisenman et al., 1964).

En plus d'être un relai de l'information sensorielle vers le thalamus, le NVsnpr est impliqué dans la production de patron masticatoire rythmique. *In vivo*, l'activité rythmique correspondant au rythme de la mastication peut être observée dans plusieurs structures du système trigéminal entourant le NVmt ((Moriyama, 1987; Donga and Lund, 1991; Inoue et al., 1992; Westberg et al., 1998; Tsuboi et al., 2003). Cependant, *in vitro*, seuls les neurones du NVsnpr-D et quelques interneurons de la zone supratrigéminal présente des propriétés rythmogéniques, dans des préparations de tranches aiguës du tronc cérébral de cochons d'indes (Sandler et al., 1998) ou de rats (Brocard et al., 2006). Une étude *in vivo* chez le lapin anesthésié et paralysé montre une augmentation de l'expression de c-fos, un marqueur d'activité, dans le NVsnpr-D à la suite de la mastication fictive (Athaniassiadis et al., 2005a). Une étude plus détaillée chez le rat montre que les bouffées rythmiques étaient encore une fois produites dans les neurones du NVsnpr-D et que celles-ci se produisaient dans environ le tiers des neurones (Athaniassiadis et al., 2005b; Pastor-Bernier et al., 2010). L'apparition de la capacité de produire une activité rythmique dans les neurones du NVsnpr-D coïncide avec

l'apparition des premiers mouvements masticatoires, c'est-à-dire environ 12 jours après la naissance (Westneat and Hall, 1992; Brocard et al., 2006).

## 7.8 Rythmogénèse du Noyau sensoriel principal du trijumeau

### 7.8.1 Rythmogénèse du Noyau sensoriel principal du trijumeau

La rythmogénèse est le processus cellulaire par lequel un mode rythmique de décharges ou de rafales est généré au niveau cellulaire. Dans les neurones du NVsnpr, ce mode rythmique est caractérisé par des décharges en bouffées récurrentes, d'au moins 3 potentiels d'action se produisant à de courts intervalles durant une dépolarisation en plateau et séparées par une courte période de repolarisation (Kadala et al., 2015). Chez le rat, la fréquence moyenne de ces bouffées rythmiques,  $8.56 \text{ Hz} \pm 1.02$ , est semblable à la fréquence des bouffées observées par électromyographie dans les muscles de la mâchoire lors de la mastication (5-11Hz)(Westneat and Hall, 1992). Cette activité rythmique est causée par les propriétés intrinsèque des neurones, car elle persiste même lorsque la solution perfusant les préparations de tranches *in vitro* est dépourvue de  $\text{Ca}^{2+}$ , empêchant ainsi toute transmission synaptique (Brocard et al., 2006). Une telle activité rythmique intrinsèque suggère une implication de plus d'une conductance ionique dans un même neurone, une dépolarisante pour causer la décharge en bouffée et une hyperpolarisante pour l'arrêter (Harris-Warrick, 2010).

De nombreuses évidences suggèrent que la conductance dépolarisante impliquée dans les décharges en bouffées dans les neurones du NVsnpr est un courant sodique persistant ( $I_{\text{Nap}}$ ) :

- 1) L'activité rythmique de ces neurones n'est pas seulement possible en absence de calcium extracellulaire, elle est en fait favorisée par la baisse de calcium (Brocard et al., 2006). Un tel lien entre la diminution de la concentration de calcium extracellulaire et une augmentation du courant  $I_{\text{Nap}}$  a déjà été démontré dans plusieurs structures du système nerveux chez le rat comme dans l'hippocampe (Li and Hatton, 1996; Su et al., 2001), dans la moelle (Brocard et al., 2013) et dans le NVsnpr (Tsuruyama et al., 2013; Morquette et al., 2015)
- 2) L'activité rythmique est abolie par la présence de tétrodotoxine (TTX), un bloqueur spécifique des canaux sodiques (Brocard et al., 2006). Une faible concentration de

TTX (1 $\mu$ M) empêche la production de bouffées rythmiques dans les neurones du NVsnpr sans bloquer la production de potentiels d'action, une faible concentration de cette drogue agit d'abord sur les canaux sodiques sous-tendant le courant persistant suggérant leur implication dans les bouffées. Des résultats similaires sont produits lors de l'application de riluzole, un inhibiteur des canaux sodiques persistants (Urbani and Belluzzi, 2000; Brocard et al., 2006)

- 3) Les bouffées dans les neurones du NVsnpr sont voltage-dépendantes, en effet, chez le rat, les bouffées se produisent seulement entre un potentiel cellulaire entre -60 mV et -50 mV, ce qui correspond au potentiel d'activation de  $I_{NaP}$  dans ces cellules (Crill, 1996; Brocard et al., 2006)

Différents courants potassiques contribuent aussi à l'activité rythmique en bouffée dans les neurones, principalement en affectant la durée des bouffées et leur fréquence (Brocard et al., 2006). Par exemple l'application de Tétréthylamonium (TEA), un inhibiteur non spécifique des canaux potassiques, augmente la durée des bouffées (Brocard et al., 2006). L'application d'apamine un bloqueur des petits courants potassiques dépendants du calcium ( $S_{KCa}$ ) diminue l'amplitude de l'hyperpolarisation suivant les potentiels d'action sans affecter la bouffée elle-même. De façon similaire la charybdotoxine, un bloqueur des grands courants potassiques dépendants du calcium ( $B_{KCa}$ ), empêche totalement l'hyperpolarisation suivant le potentiel d'action dont l'abolition laisse paraître une petite dépolarisation suivant le potentiel d'action pouvant parfois donner naissance à un second potentiel d'action (Brocard et al., 2006).

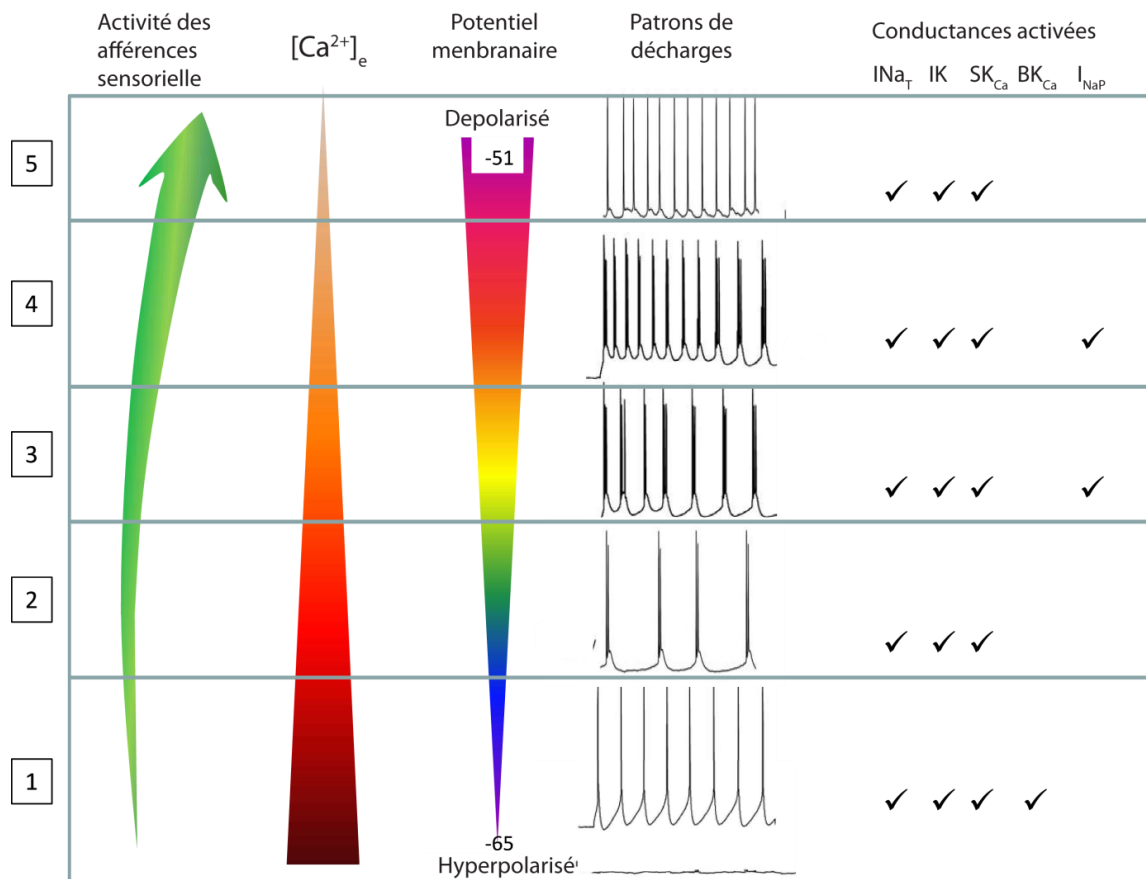
À la lumière de ces données, Kolta et al. ont proposé un modèle pour expliquer l'apparition et l'arrêt de l'activité rythmique dans les neurones du NVsnpr (Kolta et al., 2010);

- 1) Tout d'abord, une faible activation des afférences sensorielles cause une faible décharge tonique accompagnée d'une faible dépolarisation et d'une faible baisse de la concentration de calcium extracellulaire qui ne sont pas suffisantes pour activer  $I_{NaP}$ , mais pouvant affecter les  $B_{KCa}$  qui sont beaucoup plus sensibles aux variations de  $Ca^{2+}$  que les  $S_{KCa}$  menant à des décharges en doublet (Figure 5, étape 2).

- 2) Si l'activité des afférences sensorielles augmente, la baisse de calcium extracellulaire se poursuit et la dépolarisation induite atteint un niveau suffisant pour amener le potentiel

membranaire des neurones dans la fenêtre d'activation de  $I_{NaP}$  (-60mV à -50mV) et provoquer ainsi la décharge en bouffées rythmiques (Figure 5, étape 3 et 4).

3) Si l'activité des afférences sensorielles continue d'augmenter, cela accentue la dépolarisation des neurones du NVsnpr les faisant sortir hors de la fenêtre d'activation de  $I_{NaP}$ , mettant fin aux bouffées (Figure 5, étape 5).



**Figure 5. Modèle fonctionnel de la rythmogénèse dans le NVsnpr.** Ce modèle représente les différentes étapes du mécanisme de la rythmogénèse dans le NVsnpr-D. Ce mécanisme comprend l'activation des afférences sensorielles et une baisse de calcium extracellulaire permettant l'activation de conductances particulières provoquant un changement de patron de décharge. Adaptée de (Kolta et al., 2012).

### 7.8.2 Stimuli invoquant la rythmogénèse dans le NVsnpr

Différents stimuli sont capables de produire des bouffées rythmiques dans les neurones du NVsnpr.

La stimulation des afférences sensorielles projetant au NVsnpr peut causer une activité rythmique dans les neurones de celui-ci. Des stimulations électriques du tractus sensoriel à faible fréquence (<1Hz) vont seulement mener à une activité tonique ou une inhibition (Pastor-Bernier et al., 2010). Par contre, une stimulation à plus haute fréquence (entre 40 et 60 Hz) peut provoquer des bouffées rythmiques dans 28% des neurones (Pastor-Bernier et al., 2010). La fréquence de 40 Hz correspond à la fréquence naturelle d'activité des afférences sensorielles pendant la mastication réelle (Trulsson and Johansson, 2002). Il a aussi été démontré que la stimulation répétitive du tractus sensoriel à cette fréquence produit une diminution de la concentration de calcium extracellulaire dans le NVsnpr (Morquette et al., 2015).

En effet, la baisse de la concentration de calcium extracellulaire est un autre moyen utilisé pour provoquer des décharges en bouffée dans le NVsnpr. La perfusion d'un milieu extracellulaire avec une faible concentration de calcium provoque de la rythmicité (Brocard et al., 2006). Aussi, la diminution locale de la concentration de calcium extracellulaire grâce à l'application locale de chélateurs de calcium comme le BAPTA ou le S100 $\beta$ , une protéine astrocytaire, provoque aussi des décharges en bouffées (Morquette et al., 2015).

## 7.9 Implication des astrocytes dans la rythmogénèse du Noyau sensoriel principal du trijumeau

À la lumière de ces résultats, Morquette et al. ont investigué l'implication des astrocytes dans la genèse des bouffées rythmiques dans les neurones du NVsnpr (Morquette et al., 2015).

### 7.9.1 Les astrocytes

Les astrocytes sont un sous-type de cellules gliales retrouvé partout dans le système nerveux central. Dès le début des années 1900, les astrocytes étaient déjà séparés en deux groupes se distinguant selon leur morphologie et leur localisation anatomique (Cajal, 1909). Les astrocytes protoplasmiques se retrouvent partout dans la matière grise. Chez les rongeurs, ils ont un diamètre de 4 à 6  $\mu\text{m}$  et possèdent un soma avec plusieurs prolongements majeurs (4 à 10) et de nombreux prolongements plus fins qui s'étendent sur un large domaine (Cajal, 1909; Miller and Raff, 1984; Bushong et al., 2002; Ogata and Kosaka, 2002). Les astrocytes fibreux se retrouvent partout dans la matière blanche et possèdent plusieurs prolongements à l'aspect

fibreuse (Cajal, 1909; Miller and Raff, 1984). D'autres types d'astrocytes ont aussi été identifiés au cours des années, comme les astrocytes péri-vasculaires qui ont leur soma et leur prolongement en contact avec les vaisseaux sanguins et les astrocytes marginaux qui se retrouvent à la limite entre le tissu neuronal et non neuronal (Winberg et al., 1992; Sofroniew and Vinters, 2010). Aussi, certaines populations d'astrocytes dans des structures spécifiques du système nerveux ont été caractérisés de façon plus précise, comme les cellules de Muller dans la rétine, les cellules de Bergman dans le cervelet, les tanocytes à la base du troisième ventricule, les pituicytes dans la neurohypophyse, etc (Bringmann et al., 2006; Sofroniew and Vinters, 2010). Cette variété indique une grande hétérogénéité entre les astrocytes, pouvant refléter une différence entre les fonctions de chacun, et cette thèse se concentre sur les astrocytes protoplasmiques du NVsnpr.

Il existe plusieurs marqueurs spécifiques permettant de marquer les astrocytes. Un de ces marqueurs qui était le premier identifié et qui est un des plus utilisés est la « glial fibrillary acidic protein » (GFAP) (Uyeda et al., 1972; Eng et al., 2000). Cependant, ce marqueur présente plusieurs limites. Premièrement, la GFAP est majoritairement exprimée dans les prolongements des astrocytes plutôt que dans le soma, ce qui peut rendre difficile l'identification de cellules spécifiques (Chen and Liem, 1994; Cahoy et al., 2008). Deuxièmement, le niveau de marquage de la GFAP n'est pas constant tout au long de la vie d'un animal, plusieurs facteurs peuvent venir la faire varier. Des lésions, de l'inflammation ou certaines pathologies peuvent augmenter ce marquage (Smith et al., 1983; Zhang et al., 2017). Certaines populations d'astrocytes vont même seulement exprimer la GFAP suite à une telle perturbation (Nishiyama et al., 2005). L'âge des animaux aussi peut faire varier ce niveau d'expression, en effet, la quantité de GFAP augmente graduellement avec l'âge (Nichols et al., 1993). Aussi, la GFAP peut être exprimée par d'autres cellules du SNC comme les cellules radiales (Garcia et al., 2004), certaines cellules neurales progénitrices (Liu et al., 2010) ou dans les cellules cancéreuses d'oligodendrogliomes (Herpers and Budka, 1984). Finalement, la GFAP n'est pas exprimée uniformément dans toutes les populations d'astrocytes du cerveau et d'autres marqueurs peuvent déceler des astrocytes qui ne sont même pas marqués par la GFAP (Cahoy et al., 2008). Il est donc important d'utiliser le marqueur GFAP avec précaution, et, en effet, l'expression de la GFAP dans le NVsnpr semble inexistante (reformuler avec figure d'immuno montrant peu de marquage)

Un autre marqueur astrocytaire utilisé fréquemment est la protéine S100 $\beta$ . La sous-unité  $\beta$  de cette protéine dimérique est exprimée par les astrocytes, cependant cette protéine semble aussi être exprimée dans certaines populations de neurones et d'oligodendrocytes (Donato et al., 2009). La protéine Aldh1L1 (Aldehyde Dehydrogenase 1 Family Member L1) est aussi un marqueur intéressant des astrocytes, elle est plus spécifique aux astrocytes et marque un nombre plus important d'astrocytes que la GFAP (Cahoy et al., 2008; Zhang et al., 2014). D'autres protéines sont utilisées comme marqueurs astrocytaire comme la protéine SOX9, un facteur de transcription,(Sun et al., 2017), GS, une glutamine synthétase,(Anlauf and Derouiche, 2013) et Rab6, une GTPase (Melzer et al., 2021).

### 7.9.2 **Activité astrocytaire et couplage**

Les astrocytes, comme les autres types de cellules gliales, ne produisent pas d'activité électrique. À la place, les astrocytes utilisent les ions calciques pour produire une grande variété de signaux (Nedergaard and Cotrina, 2005). Des augmentations transitoires de calcium intracellulaire ont été observées de façon spontanée, en réaction à de l'activité neuronale ou une stimulation mécanique (Cornell-Bell et al., 1990; Charles et al., 1991; Hirase et al., 2004). Le calcium impliqué initialement dans ces augmentations provient majoritairement du calcium entreposé dans le réticulum endoplasmique et est relâché lorsque l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>) se lie à son récepteur sur le réticulum (Nedergaard and Cotrina, 2005). La protéine IP<sub>3</sub> est libérée lors de l'activation de la phospholipase C (PLC) qui clive le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate pour produire l'IP<sub>3</sub> et du diacylglycerol. La PLC est activée par différents récepteurs couplés à des protéines G qui répondent à différents transmetteurs et hormones (Nedergaard and Cotrina, 2005). Le récepteur à la ryanodine est un autre récepteur permettant la relâche du calcium du réticulum endoplasmique (Nedergaard and Cotrina, 2005). Le calcium peut aussi provenir du milieu extracellulaire via des canaux membranaires perméables au calcium sensibles au voltage ou à différentes hormones ou transmetteurs (Barres et al., 1989; Latour et al., 2003).

Cette activité calcique peut être très localisée et ne se produire que dans des microdomaines dans les processus astrocytaires (Shigetomi et al., 2010; Shigetomi et al., 2013). Elle peut aussi se propager dans l'entièreté de l'astrocyte et produire un vague calcique (Haustein et al., 2014). Cette vague calcique peut même se propager d'un astrocyte à l'autre grâce à des jonctions communicantes entre les astrocytes. Les jonctions communicantes des

astrocytes sont formées par des protéines appelées connexines et parmi toutes les connexines, les connexines 30 et 43 sont les plus exprimées dans les astrocytes (Nagy et al., 2004; Giaume et al., 2013). Ces connexions permettent de former des réseaux d'astrocytes, appelés syncytiums, dans lesquels une activité calcique peut se propager sur une centaine d'astrocytes, ce qui peut être considéré comme une forme de communication intercellulaire (Perea and Araque, 2005; Houades et al., 2006). Cependant, l'ouverture et la fermeture de ces connexines peuvent être régulées par différents facteurs comme le voltage (Bukauskas and Verselis, 2004), la concentration de calcium intracellulaire (Peracchia et al., 2000; Zhang et al., 2006) ou extracellulaire (Gomez-Hernandez et al., 2003), la concentration de potassium extracellulaire (Roux et al., 2011) et le pH intracellulaire (Stergiopoulos et al., 1999). La grandeur de ces réseaux peut donc varier dans le temps et aussi selon la structure du SNC dans lesquels ils se retrouvent. Dans le NVsnpr, les réseaux sont composés d'une dizaine d'astrocytes repartis sur une aire d'environ 35000  $\mu\text{m}^2$  (Condamine et al., 2018b).

### 7.9.3 Gliotransmetteurs

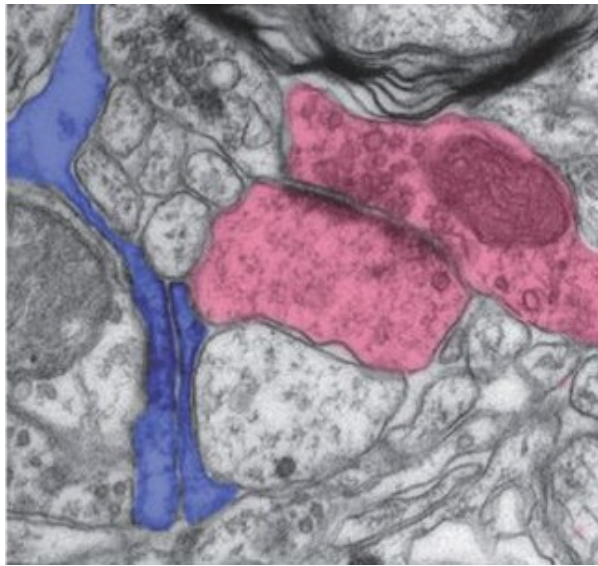
Cette activité calcique des astrocytes peut causer la relâche de molécules permettant d'interagir avec les cellules environnantes, astrocytes et neurones. Ces molécules sont donc appelées gliotransmetteurs. Le premier gliotransmetteur à avoir été identifié est le glutamate, celui-ci, lorsque relâché par les astrocytes à cause d'une augmentation de calcium intracellulaire, peut venir agir sur les récepteurs NMDA des neurones environnants (Parpura et al., 1994; Parpura et al., 2004). D'autres molécules peuvent être relâchées par les astrocytes lors de leur activation, comme la D-sérine, un co-agoniste nécessaire pour l'activation des récepteurs NMDA (Mothet et al., 2005). Le GABA, typiquement un médiateur de l'inhibition synaptique (Gallo et al., 1991), l'ATP, un agoniste des récepteurs purinergiques (Guthrie et al., 1999) et plusieurs autres. Un gliotransmetteur particulièrement important dans le cas de ce mémoire est le S100 $\beta$ . Le S100 $\beta$  peut être libéré par les astrocytes lors de leur activation (Van Eldik and Zimmer, 1987) et peut exercer différents effets dont celui de diminuer la concentration de calcium en le chélatant (Mani et al., 1982; Morquette et al., 2015). Le mécanisme exact de cette libération n'a pas encore été découvert jusqu'à ce jour.



## 7.10 10) Interaction neurone glie

### 7.10.1 La synapse tripartite

Les astrocytes peuvent libérer des molécules qui influencent les neurones, mais ils doivent aussi être capables de détecter l'activité neuronale pour adapter leur réponse. Cependant, ils ont longtemps été considérés comme ayant un rôle inférieur aux neurones avant qu'en 1999, Araque et al. développent le concept de synapse tripartite, stipulant que les astrocytes sont une partie importante du concept de synapse (Araque et al., 1999). Tout d'abord, les astrocytes doivent être suffisamment proches des synapses pour pouvoir en détecter l'activité (Figure 6). En effet, dans certaines parties du SNC, comme le cortex ou l'hippocampe, les synapses neuronales sont souvent associées avec des prolongement astrocytaires et un seul astrocyte peut être en contact jusqu'avec une centaine de milliers de synapses (Ventura and Harris, 1999; Bushong et al., 2002; Halassa et al., 2007). Cette proximité permet d'avoir des interactions multi-directionnelles entre les différentes parties de la synapse. Cependant il faut aussi que les astrocytes soient capables de détecter le signal neuronal.



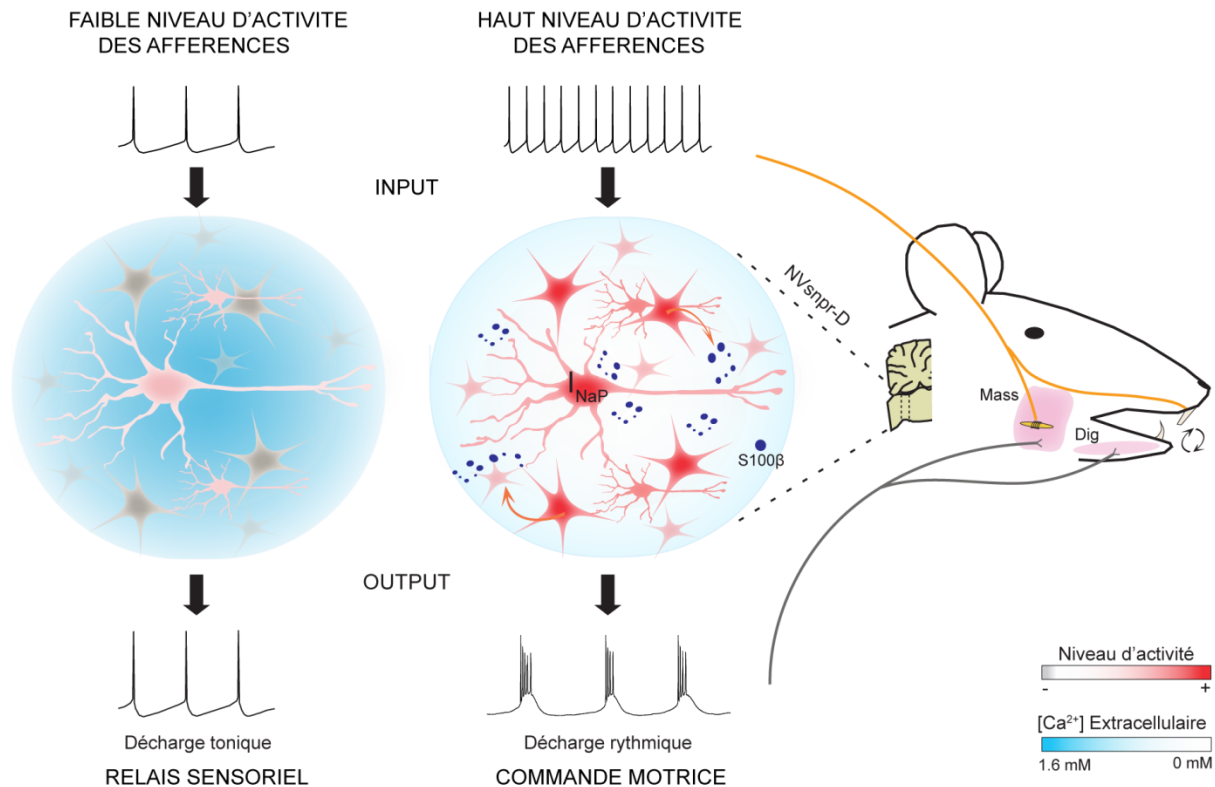
**Figure 6. La microscopie électronique montre la proximité entre les éléments neuronaux pré et post synaptique (en rose) et les prolongements astrocytaires (en bleu).** Figure adaptée de (Giaume et al., 2010)

Pour détecter ce signal les astrocytes expriment une multitude de récepteurs. Ils expriment des canaux ionotropiques comme les récepteurs AMPA et NMDA pour le glutamate (Steinhauser and Gallo, 1996), des récepteurs GABA<sub>A</sub> (Fraser et al., 1994), des récepteurs à la glycine (Kirchhoff et al., 1996), des récepteurs nicotiniques sensibles à l'acétylcholine (Araque et al., 2002; Xiu et al., 2005) et P2X sensibles à l'ATP (Ballerini et al., 1996). Ils expriment aussi de nombreux récepteurs métabotropiques sensibles au glutamate (Condorelli et al., 1999), au GABA (Fraser et al., 1994; Patte et al., 1999), à l'acétylcholine (Van Der Zee et al., 1993; Araque et al., 2002), l'ATP (Fiacco and McCarthy, 2006), aux endocannabinoïdes (Navarrete and Araque, 2010) et bien d'autres. Cette proximité à la synapse et la diversité de récepteurs exprimés permet aux astrocytes de monitorer l'activité synaptique et de relâcher différents gliotransmetteurs en réponse à celle-ci.

### **7.10.2 Rythmogénèse et astrocytes dans le NVsnpr**

Comme décrit dans la section 8.2, la stimulation à haute fréquence des afférences sensorielles peut induire une activité rythmique dans les neurones du NVsnpr ainsi qu'une baisse de la concentration du calcium extracellulaire. Une étude précédente du laboratoire a permis d'établir le lien entre le S100 $\beta$ , une protéine astrocytaire, et la diminution de la concentration du calcium extracellulaire qui accompagne le changement entre un patron de décharge tonique à un patron de décharge rythmique dans les neurones du NVsnpr (Morquette et al., 2015). Dans ce papier, ils ont démontré que l'application de S100 $\beta$  permet d'augmenter l'activation de  $I_{Nap}$  et que l'application d'un anticorps anti S100 $\beta$  vient bloquer l'apparition de l'activité rythmique dans le NVsnpr.

Avec ces données, ils ont proposé un modèle pour expliquer la transition du patron de décharge de tonique à rythmique dans les neurones du NVsnpr. Selon ce modèle, lorsque l'activité des afférences sensorielles est faible, cette activité est insuffisante pour activer les astrocytes et le courant  $I_{Nap}$  dans les neurones, les neurones déchargent donc en mode tonique. Une activité plus intense et soutenue des afférences permettrait l'activation des neurones et des astrocytes par les récepteurs NMDA. Les astrocytes libèreraient donc du S100 $\beta$  qui ferait baisser le calcium extracellulaire, ce qui favoriserait l'activation de  $I_{Nap}$  et, donc la transition en mode rythmique (Figure 7).



**Figure 7. Modèle de la séquence d'évènements menant à la rythmogénèse dans le GPC masticatoire.** Lorsque les afférences sensorielles ont un faible niveau d'activité, les neurones du NVsnpr 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, par la libération de S100 $\beta$ , diminuent la concentration de calcium extracellulaire favorisant l'activation d'INaP et la décharge rythmique des neurones qui sont alors en mode rythmique. Figure adaptée de (Morquette et al., 2015)

### 7.10.3 Rythmogénèse et astrocytes

Ce projet se concentre sur la régulation de l'activité rythmique dans le GPC de la mastication, cependant plusieurs évidences viennent suggérer l'implication des astrocytes dans d'autres GPC.

Tout comme dans le GPC de la mastication, la rythmicité dans le GPC de la locomotion est corrélée avec une diminution de la concentration de calcium extracellulaire (Brocard et al., 2010; Brocard et al., 2013). Cependant, aucune étude n'a examiné la possibilité que le

mécanisme proposé par Morquette et al. avec la libération de S100 $\beta$  par les astrocytes soit impliqué dans ce GPC.

Les astrocytes peuvent aussi être impliqué dans la régulation de l'activité rythmique des GPC grâce à d'autres gliotransmetteurs, notamment l'ATP. Dans le GPC de la respiration, certains astrocytes du noyau parafacial ventral peuvent détecter des baisses de pH dans le sang et répondre avec une libération d'ATP (Gourine et al., 2010). L'ATP relâché vient activer les récepteurs P2Y de certains neurones et ainsi augmenter la fréquence respiratoire (Gourine et al., 2010). Dans le GPC de la locomotion, il a été démontré dans un modèle *in vitro* de moelle épinière de souris néonatales, que la libération d'ATP par les astrocytes vient augmenter la fréquence de la locomotion fictive via les récepteurs P2Y (Witts et al., 2012). L'ATP est ensuite hydrolysée en adénosine et vient diminuer la fréquence de la locomotion fictive via les récepteurs à l'adénosine A<sub>1</sub> (Witts et al., 2012).

### 7.11 Objectifs de l'étude

La communication entre les neurones provient de leur capacité à encoder différentes informations selon le patron de leur décharge. Dans le NVsnpr, un de ces patrons, essentiel pour la mastication, est l'apparition d'une activité rythmique dans les neurones. Il a été démontré que cette genèse d'activité rythmique est associée avec l'activité astrocytaire, cependant il n'y a toujours pas d'étude sur l'effet de l'activation des astrocytes sur le patron de décharges des neurones du NVsnpr. De plus, pour pouvoir transmettre une commande motrice aux motoneurones de la mastication, les neurones déchargeant de façon rythmique dans le NVsnpr doivent présenter une certaine coordination. Comme la rythmogénèse semble reposer sur l'activité astrocytaire et que les astrocytes forment des réseaux pouvant englober plusieurs neurones, on peut penser que l'activation de ceux-ci pourrait permettre de synchroniser l'apparition de l'activité rythmique dans des sous-populations de neurones du NVsnpr.

Le premier objectif de cette étude était de vérifier si l'activation des astrocytes pouvait moduler le patron de décharge des neurones du NVsnpr-D ou leurs réponses aux inputs sensoriels les atteignant. Pour ce faire, le potentiel membranaire de neurones du NVsnpr-D a été enregistré. Lors de ces enregistrements, les astrocytes entourant le neurone étaient stimulés grâce à un laser activant une protéine exprimée dans les astrocytes par manipulations

génétiques. Dans un second temps nous avons aussi examiné la réponse des neurones du NVsnpr à la stimulation électrique du tractus sensoriel du trijumeau dans lequel cheminent les axones des afférences sensorielles projetant au NVsnpr avant et après stimulation optogénétique des astrocytes.

Le deuxième objectif était de déterminer si l'activation des astrocytes permet une certaine coordination de l'activité rythmique des neurones du NVsnpr-D. En effet, selon le modèle de Kolta et al., l'activation des astrocytes permet la libération de S100 $\beta$  qui vient causer la genèse de l'activité rythmique dans les neurones du NVsnpr (Morquette et al., 2015). Comme les astrocytes forment des réseaux dans le NVsnpr, l'activation d'un astrocyte permettrait l'activation de tous les astrocytes du réseau et ainsi déclencher une activité rythmique dans tous les neurones présents sur le territoire de ce réseau astrocytaire au même moment. Ce déclenchement simultané de l'activité rythmique dans un sous-groupe de neurone pourrait ainsi causer une synchronisation dans l'activité rythmique de sous-groupes de neurones dans le NVsnpr. Pour cela, des paires de neurones ont été enregistrées au même moment lors de la stimulation optogénétique des astrocytes du noyau ou la stimulation électrique du tractus trigéminal.

## **8 Matériel et méthode**

### **8.1 Préparation des tranches**

Les procédures expérimentales ont été effectuées conformément aux normes du Conseil Canadien de Protection des Animaux (CCPA) et approuvées par le Comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux (CDEA) de l'Université de Montréal (numéro de protocole du CDEA : 18-122).

Des expériences ont été menées sur des souris S100 $\beta$ -Cre/ChR2-lox, Aldh111-opto, Aldh111-Cre/ChR2-lox et GFAP-Cre/ChR2-lox anesthésiées à l'isoflurane avant la décapitation. Les souris S100 $\beta$ -Cre/ChR2-lox, Aldh111-Cre/ChR2-lox et GFAP-Cre/ChR2-lox ont été obtenues par croisement entre une souris "lox" Ai32(RCL-ChR2(H134R)/EYFP) (JAX #024109) (Madisen, 2012 #187) et une souris "Cre" S100 $\beta$  (JAX #014160), Aldh111 (JAX #029655) ou GFAP (JAX #024098). Les souris Aldh111-opto (CHROMus B36) ont été fournies par le Dr Michael I. Kotlikoff. Les souris sevrées ont été logées en groupes de 2 à 5 par cage sous un cycle standard lumière/obscurité de 12 h avec libre accès à l'eau et à la nourriture. Leur cerveau a été rapidement extrait du crâne et immergé dans une solution glacée (4 ° C) à base de saccharose saturée de 95% O<sub>2</sub> et 5% CO<sub>2</sub> contenant (en mM): 3 KCl, 1,25 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4 MgSO<sub>4</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 10 Dextrose, 0,2 CaCl<sub>2</sub> et 219 Sucrose, pH 7,3–7,4, 300–320 mosmol / kg. Des tranches transversales (300-350  $\mu$ m d'épaisseur) du noyau sensoriel principal du trijumeau (NVsnpr) ont été préparées.

Les tranches ont ensuite été transférées et laissées au repos pendant une heure dans une chambre de maintien remplie de liquide céphalo-rachidien artificiel (aCSF) à température ambiante (en mM: 124 NaCl, 3 KCl, 1,25 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,3 MgSO<sub>4</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 10 dextrose et 1,6 CaCl<sub>2</sub>, pH 7,3-7,4, 290-300 mOsmol / kg).

### **8.2 Électrophysiologie**

Des enregistrements d'une ou deux cellules au même moment des enregistrements en mode cellule entière ont été obtenus à partir de tranches de tronc cérébral de 300 à 350  $\mu$ m d'épaisseur perfusées en continu avec de l'aCSF oxygéné maintenu à température ambiante. Les neurones et les astrocytes ont été visualisés avec une caméra CCD sensible aux infrarouges et affichés sur un moniteur vidéo. La caméra était montée sur un microscope Nikon Eclipse E600 équipé d'un objectif à immersion dans l'eau 40X. Des enregistrements de cellules entières ont été

réalisés en utilisant un amplificateur Axoclamp 2B et un numériseur Digidata 1322A (Axon Instruments, Downingtown, PA, USA). Des pipettes de patch ont été obtenues à partir de capillaires en verre borosilicaté (1,5 mm de diamètre extérieur, 1,12 mm de diamètre intérieur; World Precision Instruments, Sarasota, FL) chauffés sur un étireur Sutter P-97 (Sutter Instruments, Novato, CA). Les électrodes d'enregistrements (résistance 6-9 M $\Omega$ ) ont été remplies d'une solution interne contenant (en mM) 140 K-gluconate, 5 NaCl, 10 HEPES, 0,5 EGTA, 2 sel Tris ATP, 0,4 sel Tris GTP, de l'Alexa Fluor 594, pH 7,2-7,3, 280 à 300 mOsmol/kg. Les bouffées étaient définies comme des plateaux dépolarisants remplacés par au moins 3 potentiels d'action. Les cellules ont été surveillées tout au long des expériences pour évaluer leur viabilité. Les neurones dont le pic du potentiel d'action qui ne dépassait pas 0 mV ou ayant un potentiel de membrane au repos (PMR) supérieur à -40 mV ont été rejetés. Les astrocytes ont été caractérisés en effectuant un profil courant-tension de cellule entière en utilisant une commande de tension de rampe de -120 à +110 mV (durée de 600 ms) en mode voltage-clamp (Serrano et al., 2008; Panatier et al., 2011) . Les astrocytes inclus dans cette étude ont été caractérisées par un profil linéaire (en mode voltage-clamp) et l'absence de déclenchement de potentiels d'action lors d'un protocole par échelon de courant (en mode current-clamp). Le potentiel de membrane au repos a été surveillé dans une configuration current-clamp tout au long de l'expérience et les astrocytes avec un PMR au-dessus de -50 mV ont été rejetés. Dans certaines expériences, un stimulateur Isostim (model A320; WPI, Sarasota, FL, USA) et des électrodes bipolaires en tungstène ont été utilisés pour stimuler électriquement soit par pulse unitaire de 0.2 ms ou par train de pulses (0.2 ms) à 40 Hz pour 1 ou 2 secondes les fibres sensorielles du tractus trigéminal qui borde le NVsnpr.

Les drogues suivantes ont été utilisée dans le cadre de ce mémoire. La suramine a été appliquée dans le bain à une concentration de 50  $\mu$ M et provient de Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada). L'anticorps anti-S100 $\beta$  (40  $\mu$ g/ml, sodium azide salt (140  $\mu$ M); Sigma-Aldrich, S2532) a été localement appliqué en utilisant un pulse de pression positive (Picospritzer III).

### **8.3 Optogénétique**

L'optogénétique permet de stimuler spécifiquement un groupe de cellules génétiquement définies. Dans ce mémoire, pour ce faire, deux types de protéines ont été utilisées. Le gène de la Channelrhodopsine-2 (ChR2), un canal ionique réagissant à la lumière bleue, et le gène de opto-

$\alpha_1$ AR, un récepteur di-arénergique couplé à une protéine G réagissant à la lumière bleue, ont été insérés dans les cellules cibles. La transgénie a été utilisée pour insérer ces protéines dans les astrocytes de souris. Le système Cre-lox a été utilisé pour exprimer spécifiquement ces gènes dans les astrocytes en utilisant ces différents promoteurs astrocytaires S100 $\beta$ , Aldh1l1 et GFAP. Des régions d'intérêt (ROI) ont été tracées autour des cellules enregistrées électrophysiologiquement. La photostimulation en continu de ces régions a duré 30 à 60 secondes avec une puissance du laser monochromatique (473 nm) de 10 à 20%.

#### **8.4 Analyse des résultats**

Les tracés électrophysiologiques ont été enregistrés à l'aide de Clampex dans pCLAMP 8.2 (Axon Instruments) et analysés à l'aide de Clampfit dans pCLAMP 10.2 (Axon Instruments). Les paramètres suivants ont été collectés : le potentiel membranaire de repos (mV), les seuils de décharge (mV), la résistance (mOhm), les potentiels de rectification entrante et sortante (mV), l'amplitude du pic et de l'antipic des décharges (mV) et le type et rythme des décharges induites (bouffées, train, irrégulier). Les seuils de décharge sont mesurés avec un protocole de rampe qui injecte du courant allant de - 1000 pA à 1000 pA. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SigmaStat 9.0. Pour chacun des tests, la normalité de la distribution des données a été vérifiée. Une fois la loi gaussienne satisfaite, des tests t pairés ont été effectués pour évaluer les différences avant et après les paramètres mesurés.



## 9 Résultats

Des données précédentes du laboratoire ont montré que le S100 $\beta$ , une protéine libérée par les astrocytes, joue un rôle essentiel dans la genèse de l'activité rythmique dans les neurones du NVsnr et qu'il est impossible d'évoquer cette activité rythmique lorsque les astrocytes sont inactivés (Morquette et al., 2015). Cependant, l'effet de l'activation des astrocytes du NVsnr reste encore inconnu. Pour investiguer cet effet, différentes lignées de souris exprimant dans les astrocytes une protéine réagissant à une longueur d'onde spécifique ont été utilisées. La transgénèse a été utilisée pour insérer une de ces protéines devant un promoteur astrocytaire ce qui permet son expression spécifique dans les astrocytes. Pour les prochaines expériences, 3 différents promoteurs astrocytaires, le S100 $\beta$ , l'Aldh1l1 et la GFAP et 2 différentes protéines, la channelrhodopsine-2 et la protéine opto- $\alpha$ 1AR, ont été utilisés. La stimulation de ces protéines par un laser monochromatique d'une longueur d'onde de 473 nm permet en principe d'activer les astrocytes exprimant les protéines.

### 9.1 Effet de la stimulation optogénétique des astrocytes sur les astrocytes du NVsnr dans différentes lignées de souris

#### 9.1.1 Propriétés de base des astrocytes du NVsnr

Pour investiguer l'effet de la stimulation optogénétique sur les astrocytes du NVsnr, des astrocytes ont été enregistrés en mode cellule entières. Les cellules enregistrées ont été caractérisées comme des astrocytes selon leur potentiel de repos, leur relation linéaire entre le courant et le voltage et l'absence de potentiel d'action même avec l'injection de courant. Pour être acceptés, les astrocytes enregistrés devaient être conservés pour au moins 20 minutes durant lesquelles le potentiel de repos et la résistance d'entrée restaient constants. Après l'enregistrement, l'expression de la protéine ChR2 était confirmée en visualisant l'expression de GFP (green fluorescent protein) dans la cellule enregistrée. La moyenne du potentiel de repos des 34 cellules enregistrées est de  $-66 \pm 2$  mV et la moyenne de la résistance d'entrée est de  $23 \pm 3$  m $\Omega$  (Tableau I).

	Moyenne	Nombre de cellules
Potentiel de repos (mV)	-66±2	34
Résistance d'entrée (mΩ)	23±3	34

**Tableau I.** Caractéristiques électrophysiologiques des astrocytes du NVsnpr.

### 9.1.2 Réponse des astrocytes du NVsnpr de différentes lignées de souris à la stimulation optogénétique

Différentes stimulations optogénétiques ont été utilisées pour produire un effet dans les astrocytes du NVsnpr. La région entourant la cellule enregistrée était photostimulée en continu par un faisceau laser monochromatique d'une longueur d'onde de 473 nm à une puissance entre 10 et 20% pour une durée de 20 à 60 secondes. Dans les souris Aldh111-opto- $\alpha$ 1AR, aucun des 6 astrocytes du NVsnpr enregistrés n'a présenté une réponse électrophysiologique à la stimulation optogénétique (Tableau II). Dans les souris Aldh111-Cre/ ChR2-lox aucun des 5 astrocytes du NVsnpr enregistrés n'a présenté une réponse électrophysiologique à la stimulation optogénétique (Tableau II). Dans les souris GFAP-Cre/ChR2-lox, aucun des 4 astrocytes du NVsnpr enregistrés n'a présenté une réponse électrophysiologique à la stimulation optogénétique (Tableau II). Dans les souris S100 $\beta$ -Cre/ChR2-lox, 14 des 19 astrocytes du NVsnpr enregistrés ont présenté une réponse électrophysiologique à la stimulation optogénétique (Tableau II).

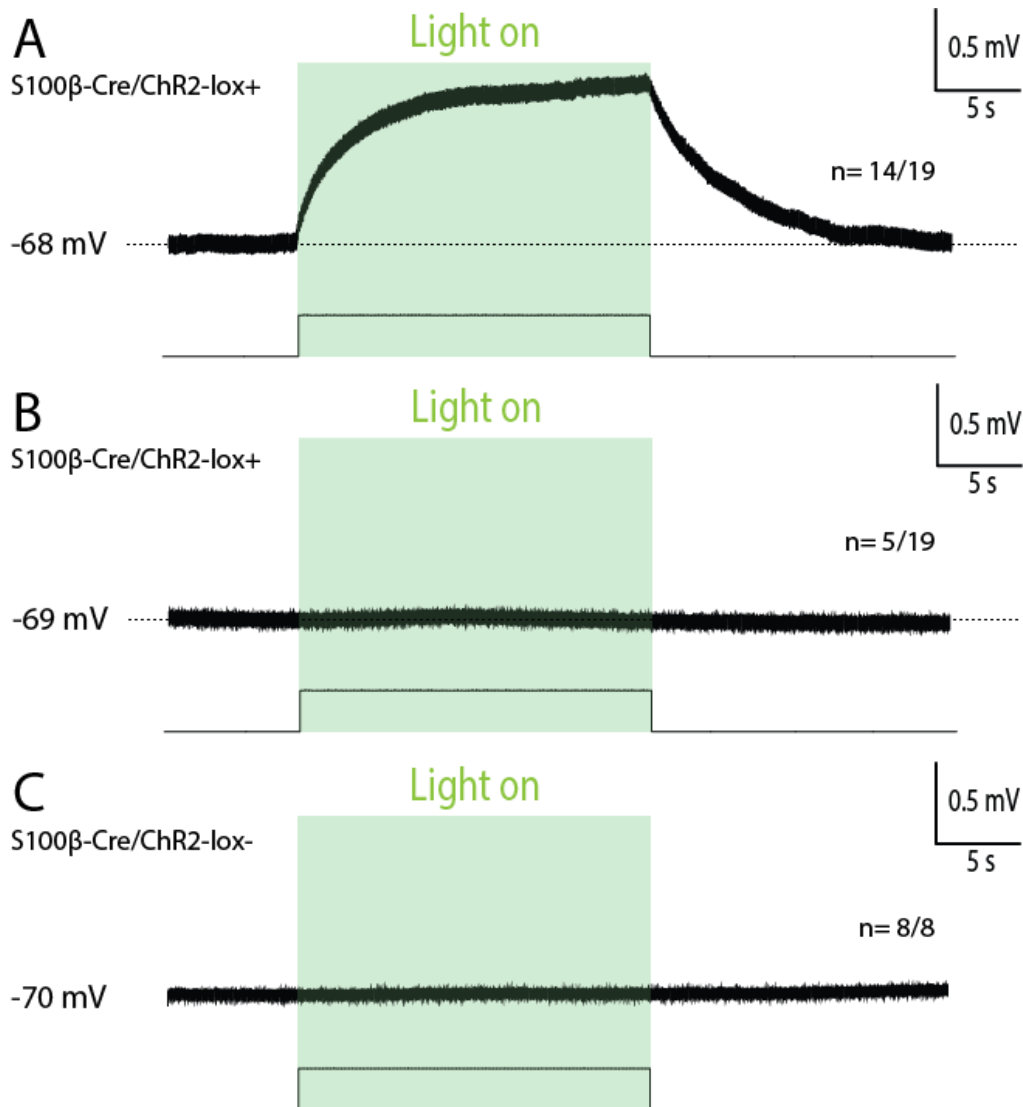
	Aldh111-opto	Aldh111-Cre/ChR2-lox	GFAP-Cre/ChR2-lox	S100 $\beta$ -Cre/ChR2-lox
Astrocytes enregistrés	6	5	4	19
Astrocytes répondant à la stimulation optogénétique	0	0	0	14

**Tableau II.** Nombre d'astrocytes du NVsnpr répondant à la stimulation optogénétique des astrocytes du NVsnpr sur ces astrocytes dans différentes souches de souris.

### 9.1.3 Souris S100 $\beta$ -Cre/ChR2-lox

Les 14 astrocytes des souris S100 $\beta$ -Cre/ChR2-lox qui présentaient une réponse électrophysiologique à la stimulation optogénétique ont tous présenté une dépolarisation de leur potentiel membranaire d'environ 1,25±0,48 mV pendant la stimulation et jusqu'à 6,23±3,04 s après la stimulation (Figure 8.A). La dépolarisation causée par la stimulation optogénétique est statistiquement significative (Test t pairé,  $p \leq 0,001$ ). Les 5 astrocytes qui ne présentaient pas de réponse électrophysiologique à la stimulation optogénétique ont gardé un potentiel membranaire constant tout au long et après la stimulation optogénétique (Figure 8.B). Ce manque de réaction

est aussi présent dans les expériences contrôles où des astrocytes du NVsnpr de souris S100 $\beta$ -Cre/ChR2-lox négative, donc qui n'expriment pas la protéine ChR2-lox (n=8) (Figure 8.C).



**Figure 8. Effet de la stimulation optogénétique sur les astrocytes du NVsnpr de souris S100 $\beta$ -Cre/ChR2-lox.** La stimulation optogénétique des astrocytes de souris S100 $\beta$ -Cre/ChR2-lox dépoliarise (A) la majorité des astrocytes du NVsnpr (n=14) ou ne produit pas d'effet (B) (n=5). La stimulation optogénétique des astrocytes de souris S100 $\beta$ -Cre/ChR2-lox négative ne produit pas d'effet (C) (n=8).

## 9.2 Effet de la stimulation optogénétique des astrocytes sur les neurones du NVsnpr dans différentes lignées de souris

### 9.2.1 Propriétés de base des neurones du NVsnpr

Pour investiguer l'effet de la stimulation optogénétique des astrocytes sur les neurones du NVsnpr, des neurones ont été enregistrés en mode cellule entière (n=90). Les neurones du NVsnpr ont un potentiel de repos de  $-54\pm 5$  mV et une résistance d'entrée de  $282\pm 38$  m $\Omega$ . Environ la moitié des neurones enregistrés (51%, n=46) déchargeaient de façon spontanée à une fréquence de  $9,2\pm 2$  Hz. Le reste des propriétés électrophysiologiques des neurones enregistrés est résumé dans le Tableau III.

	Moyenne	Nombre de cellules
Potentiel de repos (mV)	$-54\pm 5$	90
Résistance d'entrée (m $\Omega$ )	$282\pm 37$	90
Seuil d'apparition du potentiel d'action (PA) (mV)	$-41\pm 4$	90
Fréquence de décharge spontanée (Hz)	$9,2\pm 2$	46
Amplitude du PA (mV)	$62\pm 8$	90
Durée du PA (ms)	$0,85\pm 0.3$	90
Amplitude de l'hyperpolarisation après le PA (mV)	$-6,2\pm 1.4$	90

**Tableau III.** Caractéristiques électrophysiologiques des neurones du NVsnpr.

### 9.2.2 Réponse des neurones du NVsnpr à la stimulation optogénétique des astrocytes dans différentes lignées de souris

Différentes stimulations optogénétiques ont été utilisées pour essayer de produire un effet dans les neurones du NVsnpr. La région entourant la cellule enregistrée était photostimulée en continu par un laser monochromatique d'une longueur d'onde de 473 nm à une puissance entre 10 et 20% pour une durée de 20 à 60 secondes. Dans les souris Aldh111-opto- $\alpha$ 1AR, aucun des 12 neurones du NVsnpr enregistrés n'a présenté une réponse électrophysiologique à la stimulation optogénétique (Tableau IV). Dans les souris Aldh111-Cre/ ChR2-lox, un seul des 13 neurones du NVsnpr enregistrés a présenté une réponse électrophysiologique à la stimulation optogénétique (Tableau IV). Dans les souris GFAP-Cre/ChR2-lox, aucun des 12 neurones du NVsnpr enregistrés n'a présenté une réponse électrophysiologique à la stimulation optogénétique

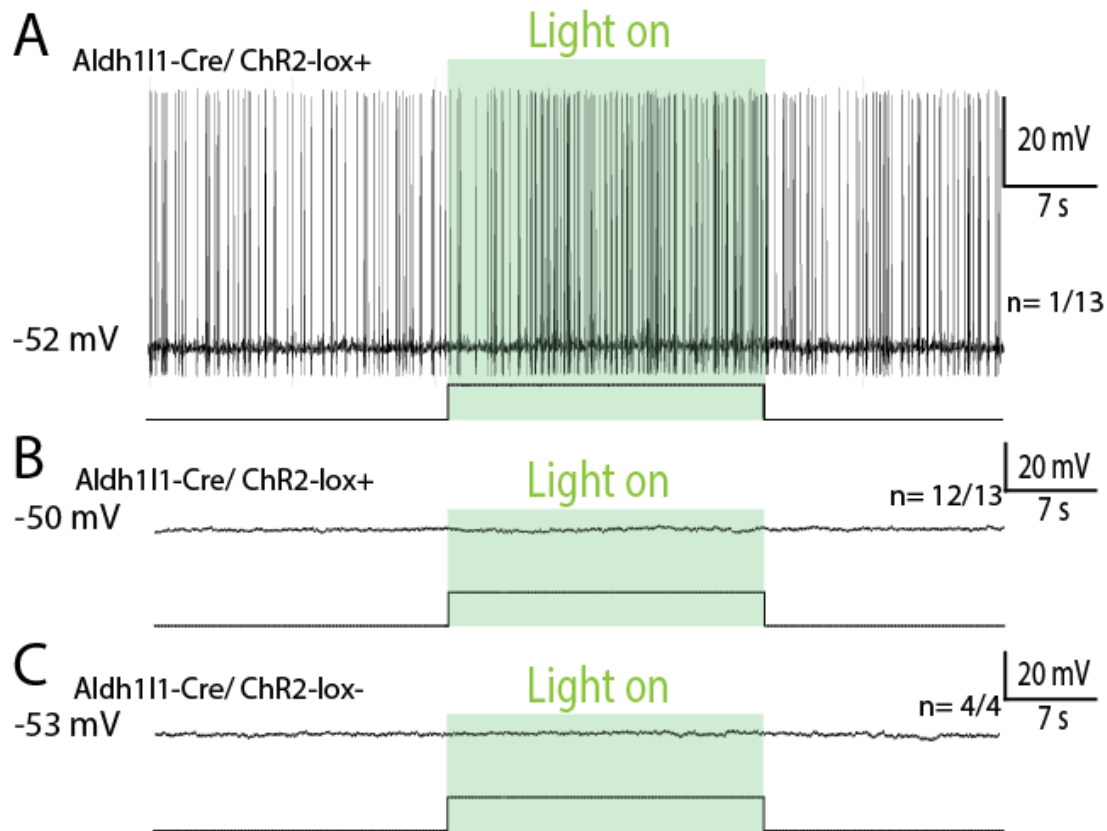
(Tableau IV). Dans les souris S100 $\beta$ -Cre/ChR2-lox, 28 des 40 neurones du NVsnpr enregistré s ont présenté une réponse électrophysiologique à la stimulation optogénétique (Tableau IV).

	Aldh111-opto	Aldh111-Cre/ChR2-lox	GFAP-Cre/ChR2-lox	S100 $\beta$ -Cre/ChR2-lox
Neurones enregistrés	12	13	12	40
Neurones répondant à la stimulation optogénétique	0	1	0	28

**Tableau IV.** Nombre de neurones du NVsnpr répondant à la stimulation optogénétique des astrocytes du NVsnpr sur les neurones u NVsnpr dans différentes souches de souris.

### 9.2.3 Souris Aldh111-Cre/ ChR2-lox

Dans le seul neurone où une réponse fût obtenue dans une souris Aldh111-Cre/ ChR2-lox la stimulation optogénétique a causé une augmentation de la fréquence de décharge du neurone de  $6,4 \pm 1,82$  Hz à  $1,4 \pm 1,23$  Hz (Figure 9.A). Dans les 12 autres neurones, la stimulation optogénétique n'a eu aucun effet sur le potentiel membranaire ni sur la décharge. Cette absence d'effet a également été obtenue dans les expériences contrôles où des neurones du NVsnpr de souris Aldh111-Cre/ ChR2-lox négative (n=4).

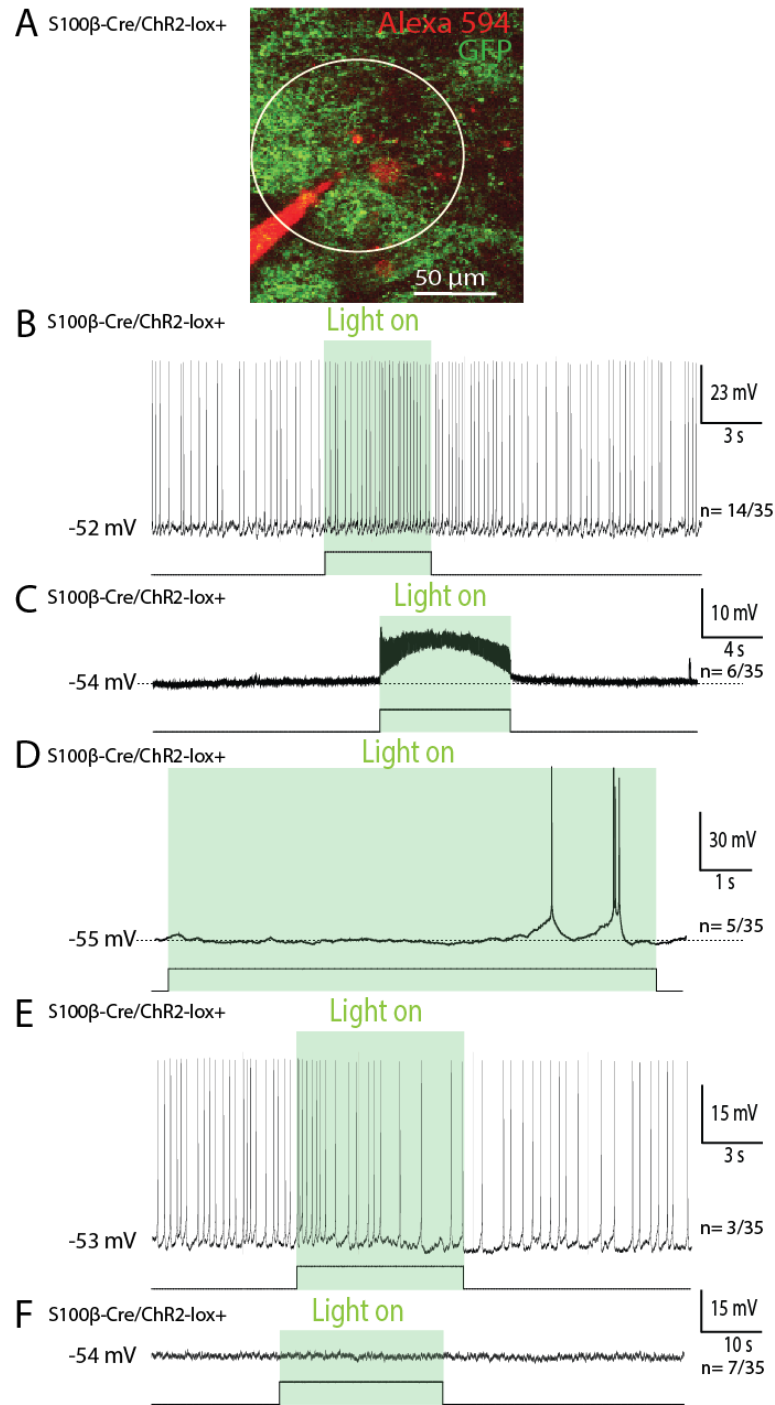


**Figure 9. Effet de la stimulation optogénétique sur les neurones du NVsnpr de souris Aldh111-Cre/ ChR2-lox.** La stimulation optogénétique des astrocytes de souris a causé l’augmentation de la fréquence de décharge dans 1 neurone du NVsnpr (A) (n=1) ou n’a pas produit d’effet (B) (n=12). La stimulation optogénétique des astrocytes de souris Aldh111-Cre/ ChR2-lox négative ne produit pas d’effet (C) (n=4).

#### 9.2.4 Souris S100 $\beta$ -Cre/ChR2-lox

Contrairement aux autres lignées de souris, les neurones du NVsnpr des souris S100 $\beta$ -Cre/ChR2-lox ont présenté différents types de réponse à la stimulation optogénétique des astrocytes (Figure 10.A). La réponse la plus fréquente, de 14 des 40 neurones, est une augmentation de la fréquence de décharge de  $3,57 \pm 0,81$  Hz en moyenne (Test t pairé,  $p \leq 0,001$ ) (Figure 10.C). La latence moyenne de l’apparition de cet effet durant la stimulation était de  $3,47 \pm 0,94$  sec et la durée de l’effet était de  $116,3 \pm 94,61$  sec. Dans 6 autres cas, la réponse évoquée a été une dépolarisation d’environ  $3,79 \pm 2,29$  mV (Test t pairé,  $p = 0,003$ ) du potentiel membranaire des neurones sans apparition de décharges (Figure 10.B). La latence moyenne de

l'apparition de cet effet durant la stimulation était de  $4,01 \pm 0,81$  sec et la durée de l'effet était de  $5,32 \pm 1,2$  sec. Dans 5 cas, la stimulation optogénétique a évoqué des bouffées pendant ou suivant la stimulation optogénétique (Figure 10.D). La latence moyenne de l'apparition de cet effet durant la stimulation était de  $7,31 \pm 1,34$  sec et la durée de l'effet était de  $10,2 \pm 7,5$  sec. À l'inverse, dans certains neurones ( $n=3$ ), la stimulation optogénétique a causé une diminution de la fréquence de décharge d'environ  $2,35 \pm 1,04$  Hz (Figure 10.E). La latence moyenne de l'apparition de cet effet durant la stimulation était de  $4,31 \pm 0,94$  sec et la durée de l'effet était de  $95,33 \pm 59,56$  sec. Le reste des neurones ( $n=12$ ) n'ont pas réagi à la stimulation optogénétique (Figure 10.F). Tout comme les neurones des souris S100 $\beta$ -Cre/ChR2-lox négative ( $n=9$ ).

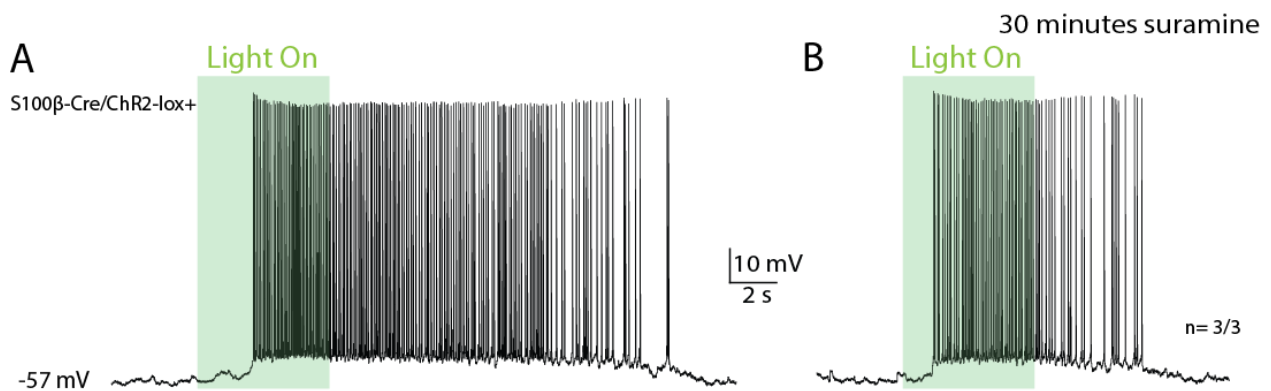


**Figure 10. Effet de la stimulation optogénétique des astrocytes de souris S100 $\beta$ -Cre/ChR2-lox sur les neurones du NVsnpr.** Image confocale d'un neurone du NVsnpr rempli d'une solution intracellulaire contenant le fluorochrome Alexa 594 (rouge) et des astrocytes exprimant la ChR2-lox associés à la protéine yGFP (vert) avec la zone de photostimulation délimitée par le cercle blanc (A). La stimulation optogénétique des astrocytes de souris S100 $\beta$ -Cre/ChR2-lox a



causé l'augmentation de la fréquence de décharge dans les neurones du NVsnpr (**B**) (n=14), la dépolarisation des neurones (**C**) (n=6), la production de bouffées (**D**) (n=5), la diminution de la fréquence de décharge (**E**) (n=3) ou n'a pas produit d'effet (**F**) (n=12).

L'effet de la stimulation optogénétique sur les neurones du NVsnpr pourrait être causée par la libération de différents gliotransmetteurs. Pour s'assurer qu'elle n'est pas due à la libération d'ATP par les astrocytes, une libération causant l'activation de récepteurs purinergiques neuronaux, de la suramine, un antagoniste des récepteurs purinergiques, a été appliqué dans le bain contenant la tranche (50  $\mu$ M pour >30 min). Un total de 3 neurones réagissant à la stimulation optogénétique en augmentant leur fréquence de décharge ont été enregistrés avant (Figure 11.A) et après (Figure 11.B) l'application de la suramine. Dans les 3 cas, l'application de suramine n'empêchait pas l'augmentation de la fréquence de décharge des neurones. Cependant, sans éliminer l'effet de la stimulation optogénétique, l'application de suramine vient moduler cet effet. Avant l'application de suramine, la stimulation optogénétique augmentait la décharge des neurones d'environ  $4,2 \pm 1,2$  Hz pour environ  $18 \pm 4$  s après la stimulation. Après l'application de suramine l'augmentation de décharge était diminuée à environ  $2,3 \pm 1,1$  Hz et perdurait moins longtemps  $10 \pm 2$  s. De plus, l'application de suramine causait une dépolarisation du potentiel membranaire des neurones, les neurones étaient donc maintenus à leur potentiel membranaire de repos d'origine pour tester l'effet de la stimulation optogénétique.



**Figure 11. Effet de la suramine sur l'effet de la stimulation optogénétique sur des neurones du NVsnpr de souris S100 $\beta$ -Cre/ChR2-lox.** L'apparition de la décharge dans un neurone du NVsnpr dû à la stimulation optogénétique des astrocytes de souris S100 $\beta$ -Cre/ChR2-lox (**A**) persiste après l'application de suramine (50 $\mu$ M), un antagoniste des récepteurs P2Y, pendant 30 minutes (**B**) (n=3).

Nous avons ensuite caractérisé la réponse des neurones du NVsnpr à la stimulation de leur inputs sensoriels, acheminés dans le tractus sensoriel du Trijumeau, afin de voir si la stimulation optogénétique des astrocytes modulait ces réponses.

### 9.3 Effet de la stimulation électrique du tractus trigéminal sur les neurones du NVsnpr

#### 9.3.1 Propriétés de base des neurones du NVsnpr

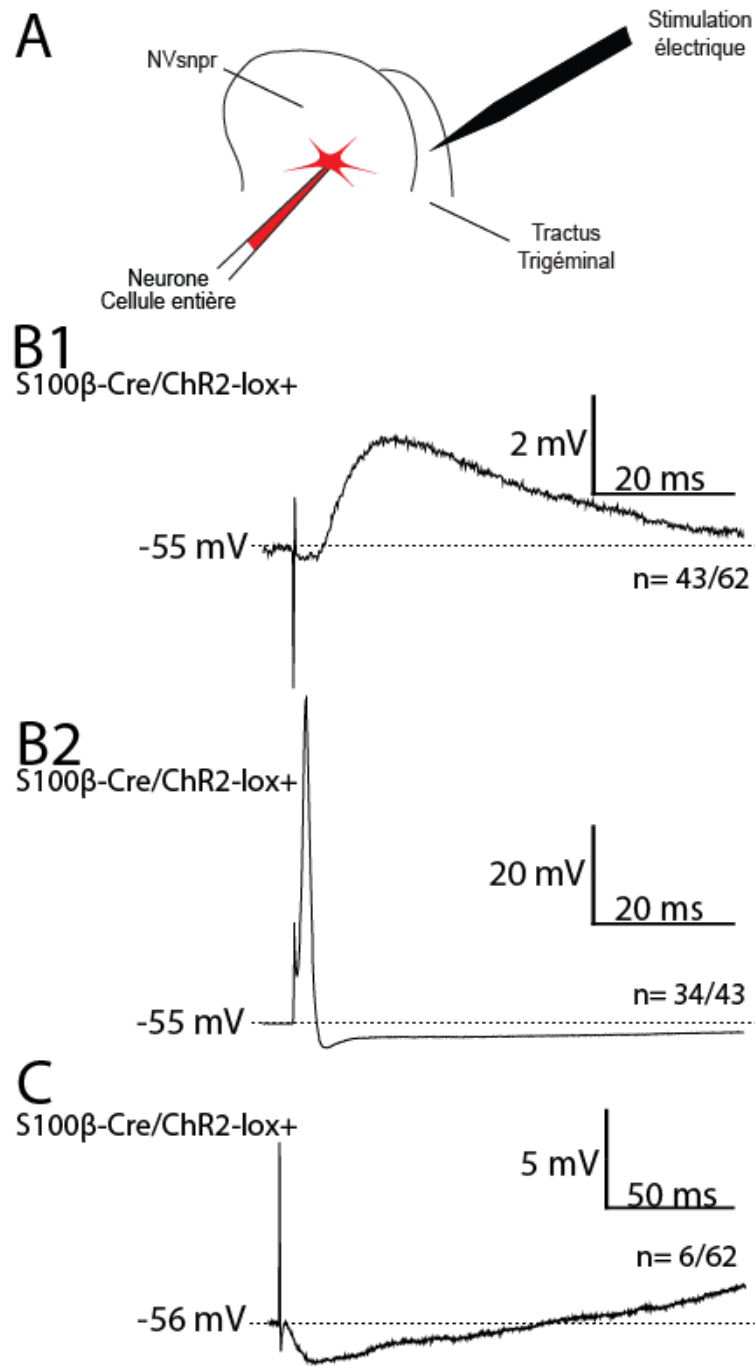
Les caractéristiques de base de 62 neurones enregistrés en mode cellule entière pour investiguer l'effet de la stimulation électrique du tractus trigéminal ressemblent à celle rapporté ci-haut et sont résumées dans le Tableau V.

	Moyenne	Nombre de cellules
Potentiel de repos (mV)	-56±4	62
Résistance d'entrée (mΩ)	278±38	62
Seuil d'apparition des décharges (mV)	-43±4	62
Fréquence de décharge (Hz)	8,2±3	?29?
Amplitude des décharges (mV)	64±7	62
Durée d'une décharge (ms)	0,99±0.2	62
Amplitude de l'hyperpolarisation après la décharge (mV)	-5,3±2.1	62

**Tableau V.** Caractéristiques électrophysiologiques des neurones du NVsnpr.

#### 9.3.2 Effet de la stimulation simple du tractus trigéminal sur les neurones du NVsnpr

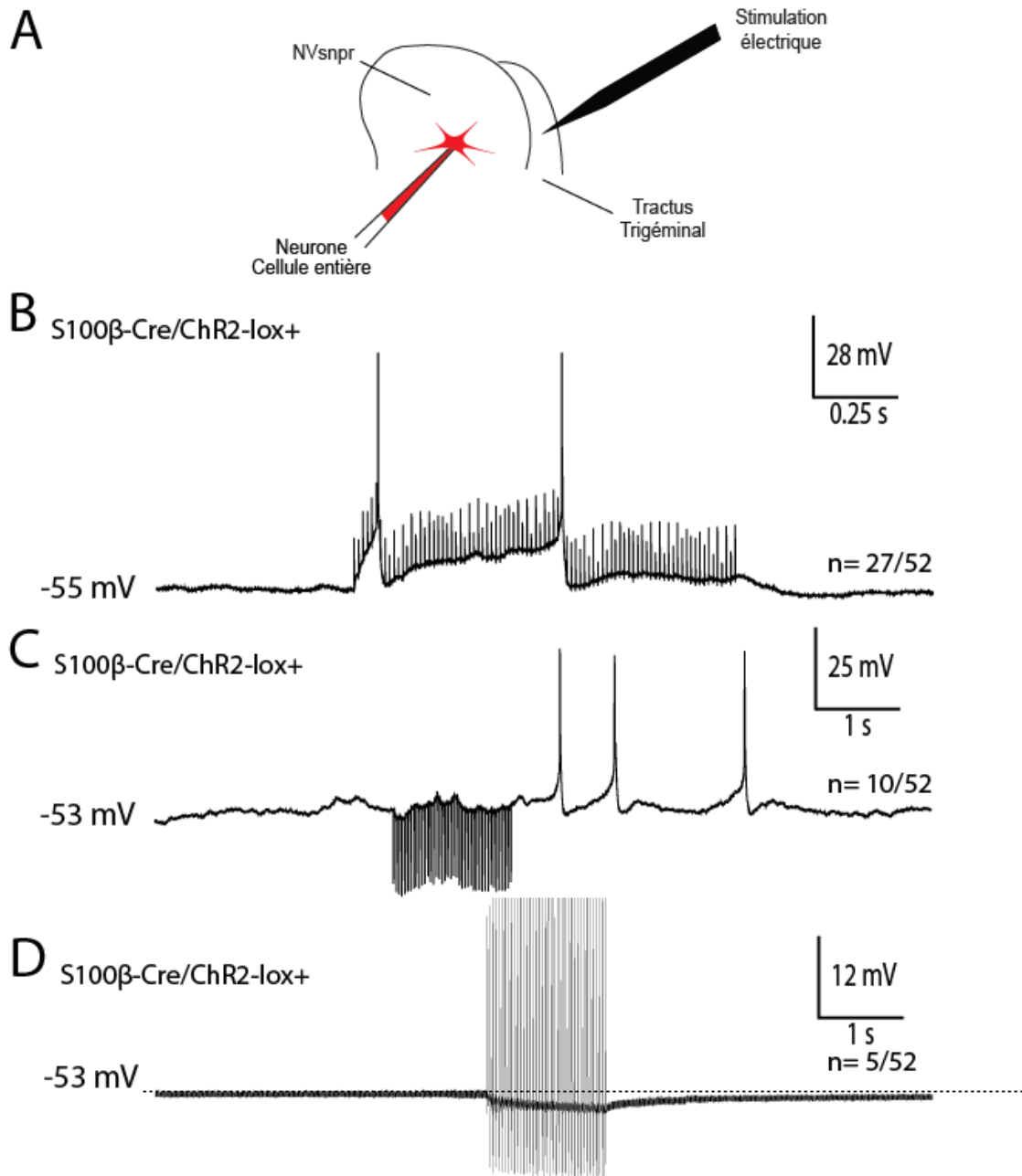
Différents effets furent observés à la suite de la stimulation simple (durée du pulse : 0.2 ms, intensité : 10-300  $\mu$ A fréquence : <1Hz) du tractus sensoriel. De légères dépolarisations ou des potentiels postsynaptiques excitateurs (PPSE), furent observés dans 43 des 62 neurones (Figure 12.B1). Ces PPSE ont une latence moyenne de 1,8±0,5 ms et une amplitude moyenne de 2,9±1,2 mV. Dans 34 de ces neurones, l'augmentation de l'intensité de la stimulation simple mène à la production d'un potentiel d'action (Figure 12.B2). Ces potentiels d'action se produisent à une latence de 0,5±0,1 ms, ont une amplitude moyenne de 63±6 mV et une durée de 1,2±0,2 ms. À l'inverse, dans une minorité de neurones (n=6) un potentiel postsynaptique inhibiteur (PPSI) est observé à la suite de la stimulation simple (Figure 12.C). Ces PPSI ont une latence moyenne de 2,4±0,8 ms et une amplitude moyenne de 1,8±0,7 mV. Aucun effet n'est observé dans les 13 autres neurones.



**Figure 12. Effet de la stimulation simple du tractus trigéminal de souris S100 $\beta$ -Cre/ChR2-lox sur les neurones du NVsnpr.** Schéma de la position des électrodes de stimulation (noire) et d'enregistrement (rouge) (A). La stimulation simple a causé un PPSE (B1) (n= 43), un potentiel d'action lorsque l'intensité était augmentée (B2) (n=34) ou un PPSI (C) (n=6).

### **9.3.3 Effet de la stimulation électrique à haute fréquence du tractus trigéminal sur les neurones du NVsnpr**

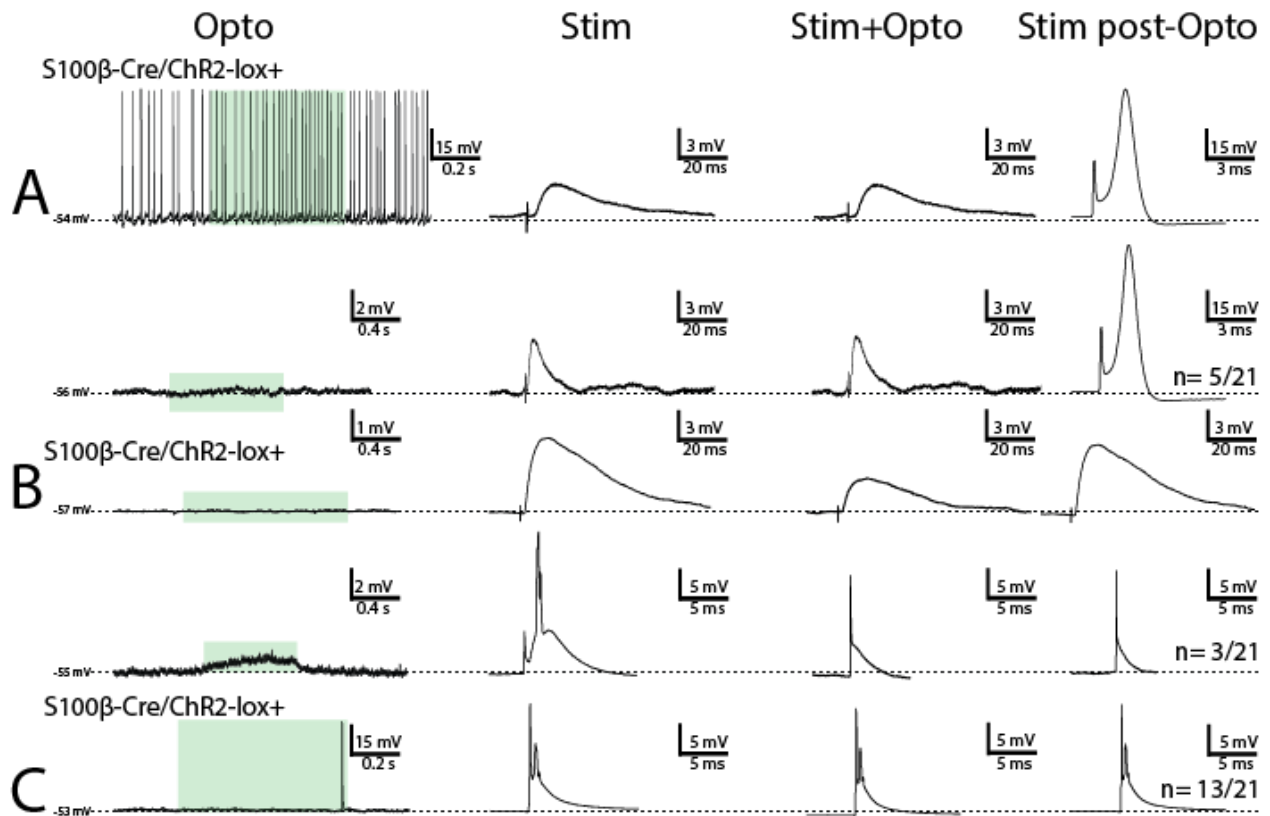
La fréquence de décharge naturelle des afférences sensorielles projetant au neurone du NVsnpr est d'environ 40 Hz pendant la mastication (Trulsson and Johansson, 2002). Pour mieux comprendre les effets d'un tel patron d'activité, les effets de la stimulation électrique à haute fréquence (40 Hz) du tractus trigéminal (Figure 13.A). La réponse la plus fréquente, avec 27 des 53 neurones, est une dépolarisation de  $4,27 \pm 2,63$  mV (Test t pairé,  $p \leq 0,001$ ) (Figure 13.B). La latence moyenne de l'apparition de cet effet durant la stimulation était de  $10,6 \pm 1,2$  ms et la durée de l'effet était de  $4,41 \pm 1,21$  s. Dans 10 autres cas, les neurones vont se mettre à décharger ou augmenter leur fréquence de décharge de  $3,6 \pm 3,9$  Hz (Test t pairé,  $p \leq 0,001$ ) immédiatement suivant la stimulation à haute fréquence avec une latence de  $0,93 \pm 2,33$  sec (Figure 13.C). La durée de l'effet est de  $98,34 \pm 63,11$  s. Dans 5 autres cas, les neurones vont s'hyperpolarisé de  $-3,3 \pm 0,6$  mV (Test t pairé,  $p = 0,002$ ). La latence moyenne de l'apparition de cet effet durant la stimulation était de  $1,32 \pm 0,45$  s et la durée de l'effet était de  $5,55 \pm 1,42$  s. Le reste des neurones ( $n=11$ ) la stimulation électrique à haute fréquence ne produit aucun effet à une intensité ne causant pas de dommage à la tranche.



**Figure 13. Effet de la stimulation électrique à haute fréquence (40 Hz) du tractus trigéminal de souris S100 $\beta$ -Cre/ChR2-lox sur les neurones du NVsnpr.** Schéma de la position des électrodes de stimulation (noire) et d'enregistrement (rouge) (A). La stimulation à haute fréquence a causé une dépolarisation (B) (n= 27), une décharge suivant la stimulation (C) (n=10) ou une hyperpolarisation (D) (n=5).

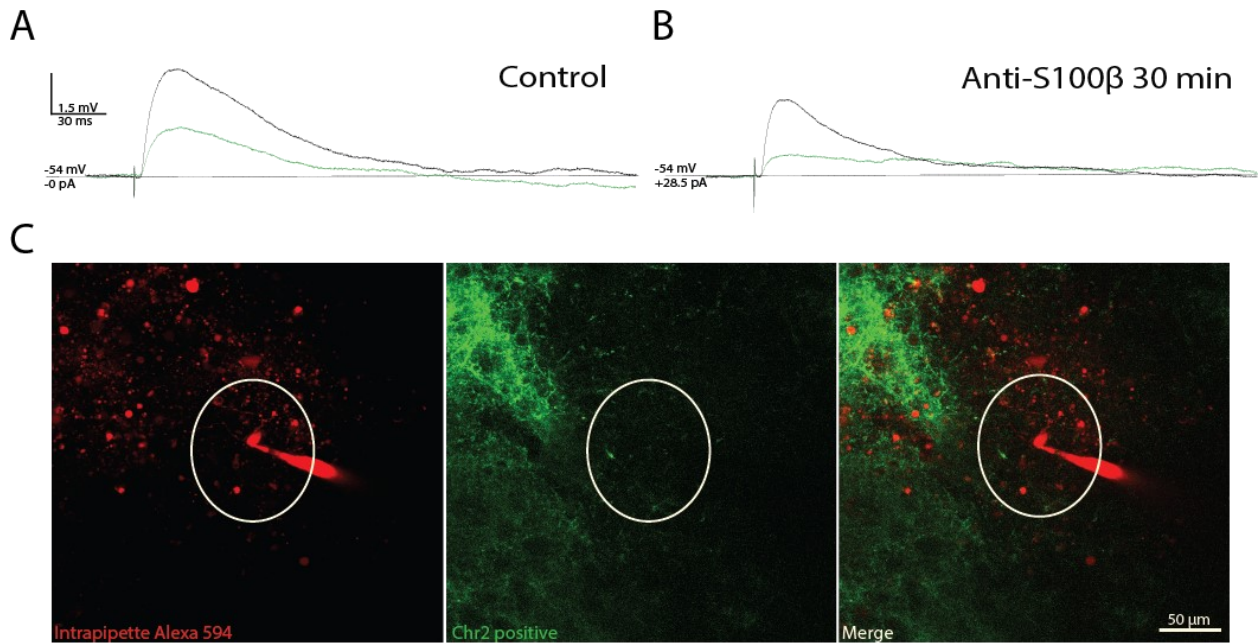
#### **9.4 Interaction entre la stimulation électrique du tractus trigéminal et de la stimulation optogénétique des astrocytes sur les neurones du NVsnpr**

La stimulation optogénétique des astrocytes peut aussi avoir un effet sur la façon dont les neurones du NVsnpr répondent à la stimulation électrique du tractus trigéminal. À quelques reprises ( $n=5/21$ ), la stimulation optogénétique vient causer une augmentation de la réponse du neurone à une stimulation électrique identique (Figure 14.A). Cet effet peut se produire pendant la stimulation optogénétique et peut persister quelques minutes après celle-ci. Dans ces cas, une stimulation simple électrique du tractus trigéminal qui produisait un PPSE avant la stimulation optogénétique produisait des potentiels d'action après. Ces PPSE avait une latence moyenne de  $1,6\pm 0,6$  ms et une amplitude moyenne de  $2,6\pm 1,3$  mV. Ces potentiels d'action ont une amplitude moyenne de  $65\pm 7$  mV et une durée  $1,1\pm 0,3$  ms. Dans 2 de ces 5 neurones, la stimulation optogénétique ne semblait avoir aucun effet, aucun changement de potentiel membranaire avant ou après la stimulation, mais produisait tout de même cet effet de potentialisation de la stimulation électrique. À l'inverse, la stimulation optogénétique peut venir parfois ( $n=3$ ) causer une diminution de la réponse du neurone à une stimulation électrique identique (Figure 14.B). Dans 2 cas sur 3, une stimulation qui produisait un PPSE d'une certaine amplitude avant la stimulation optogénétique, causait un PPSE d'une amplitude diminuée après la stimulation optogénétique. Les PPSE d'origine avaient une latence moyenne de  $1,3\pm 0,6$  ms et une amplitude moyenne de  $2,8\pm 1,2$  mV, alors que les PPSE après la stimulation optogénétique avaient une latence moyenne de  $1,4\pm 0,7$  ms et une amplitude moyenne de  $1,2\pm 0,9$  mV. Encore une fois, cet effet peut se produire durant ou après la stimulation électrique et peut être présent même si la stimulation optogénétique initiale ne causait pas de changement apparent au potentiel membranaire du neurone. La stimulation optogénétique pouvait aussi ne pas avoir d'effet ( $n=13$ ) sur la stimulation (Figure 14.C), même si elle avait un effet sur le potentiel membranaire du neurone.



**Figure 14. Interaction entre de la réponse évoquée par une stimulation simple du tractus trigéminal et la stimulation optogénétique des astrocytes de souris *S100β-Cre/ChR2-lox* sur les neurones du NVsnpr.** La stimulation optogénétique peut avoir un effet potentiateur (A) ( $n=5$ ), diminuer l'effet (B) ( $n=3$ ) ou n'avoir aucun effet (C) ( $n=13$ ) sur la réponse évoquée par une stimulation simple.

Dans un des cas où la stimulation optogénétique a causé une diminution de l'amplitude du PPSE causé par la stimulation simple électrique du tractus (Figure 15.A), un anticorps anti-*S100β* a été appliqué pendant 30 minutes pour s'assurer que cet effet inhibiteur n'est pas dû au *S100β*. Dans ce cas, les PPSE passaient d'une amplitude d'environ  $3,1 \pm 0,4$  mV à une amplitude d'environ  $1,4 \pm 0,3$  mV durant la stimulation optogénétique, une diminution d'environ 55%. L'application de l'anticorps n'a pas empêché l'effet de diminution de la stimulation simple par la stimulation optogénétique (Figure 15.B). Les PPSE passaient d'une amplitude d'environ  $1,7 \pm 0,3$  mV à une amplitude d'environ  $0,4 \pm 0,1$  mV durant la stimulation optogénétique, une diminution d'environ 76%.



**Figure 15. Implication de la protéine S100β sur la diminution de l'effet de la stimulation simple du tractus trigéminal par la stimulation optogénétique des astrocytes de souris S100β-Cre/Chr2-lox sur les neurones du NVsnpr.** La stimulation optogénétique vient diminuer l'amplitude du PPSE produit par la stimulation simple (A). Après 30 minutes d'application de l'anticorps anti-S100β, la stimulation optogénétique vient encore diminuer l'amplitude du PPSE produit par la stimulation simple (B) (n=1). Image confocale d'un neurone du NVsnpr rempli d'une solution intracellulaire contenant le fluorochrome Alexa 594 (rouge) et es astrocytes exprimant la Chr2-lox associé à la protéine GFP (vert) avec la zone de photostimulation délimitée par le cercle blanc (C).

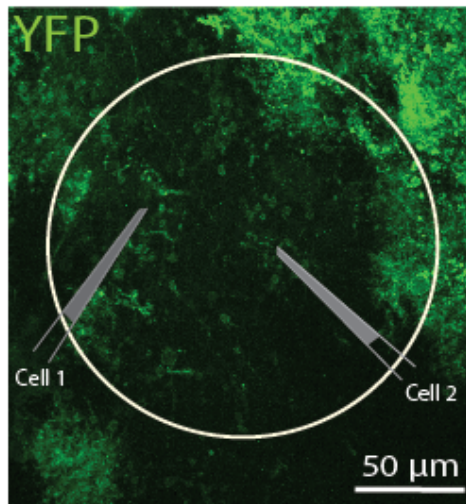
### 9.5 Synchronisation de paires de neurones par la stimulation optogénétique des astrocytes sur les neurones du NVsnpr.

Afin de voir les effets de la stimulation optogénétique des astrocytes sur la synchronisation de l'activité des neurones du NVsnpr, 12 paires de neurones du NVsnpr ont été enregistrées. Sur ces 12 paires aucune n'a présenté une synchronisation des neurones lors de la stimulation optogénétique des astrocytes (Figure 16). Seulement 2 des neurones enregistrés ont présenté une réponse à la stimulation optogénétique, ces neurones étaient de différentes paires. Dans les 2 cas, la stimulation optogénétique a causé une faible augmentation de la fréquence de décharge de ces neurones ( $\approx 1$  Hz). La stimulation électrique du tractus trigéminal à produit des résultats similaires à ceux obtenus dans les neurones non-pairés. La stimulation simple a causé un

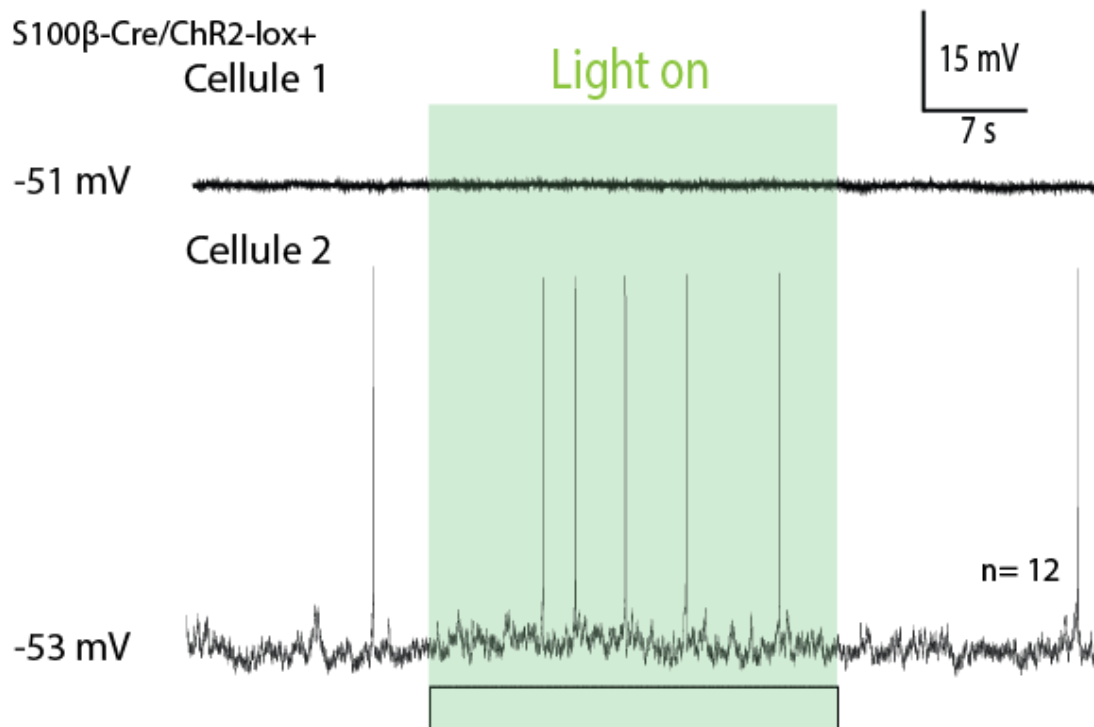


PPSE dans 18 neurones, l'augmentation de l'intensité de la stimulation mène à la production d'un potentiel d'action dans 11 de ces neurones et les 6 neurones restant n'ont présenté aucun effet à la simple stimulation. Les paires de neurones n'ont pas présenté de synchronisation lors de la stimulation à haute fréquence (40 Hz) du tractus sensoriel. Individuellement, les neurones ont aussi répondu de façon similaire aux neurones non-pairés, avec 13 neurones qui ont dépolarisé pendant la stimulation ( $3,8 \pm 1,7$  mV), 5 qui ont augmenté leur fréquence de décharge et 6 neurones qui n'ont pas eu d'effet. Les neurones étaient séparés d'une distance entre 25 et 200  $\mu\text{m}$  dans des souris S100 $\beta$ -Cre/ChR2-lox positives.

**A** S100 $\beta$ -Cre/ChR2-lox+



**B** S100 $\beta$ -Cre/ChR2-lox+  
Cellule 1



**Figure 16. Enregistrement d'une paire de neurones du NVsnpr lors de la stimulation optogénétique de souris S100 $\beta$ -Cre/ChR2-lox.** Image confocale de deux neurones du NVsnpr et d'astrocytes exprimant la ChR2-lox associée à la protéine YFP (vert) avec la zone de photostimulation délimitée par le cercle blanc (**A**). La stimulation optogénétique des astrocytes ne produit pas de réponses synchrones dans les paires de neurones enregistrées (**B**) (n=12)

## 10 Discussion

L'implication d'une interaction entre les neurones et les astrocytes du NVsnpr dans la rythmogénèse ayant déjà été étudiée et démontrée par une étude antérieure du laboratoire (Morquette et al., 2015), les objectifs de ce travail étaient d'étudier l'effet d'une activation directe des astrocytes sur les neurones. Aussi, nous voulions étudier si l'activation de ces astrocytes pouvait mener à une synchronisation de l'activité rythmique des neurones nécessaire au contrôle des muscles de la mâchoire durant la mastication. Les résultats démontrent une variété d'effets sur les neurones causés par l'activation optogénétique des astrocytes du NVsnpr, mais ne semblent pas concluant pour la synchronisation des neurones.

### 10.1 Les astrocytes réagissent à la stimulation optogénétique

Les expériences d'enregistrement en cellule entière d'astrocytes du NVsnpr montrent une dépolarisation du potentiel membranaire des astrocytes à la stimulation optogénétique seulement chez les souris exprimant la channelrhodopsine-2 sous le promoteur astrocytaire S100 $\beta$ . En effet, la majorité des astrocytes des souris S100 $\beta$ -Cre/ChR2-lox répondent à la stimulation optogénétique en dépolarisant alors qu'aucune des trois autres lignées n'a présenté un changement de potentiel à la stimulation.

Cependant l'utilisation de l'optogénétique pour causer l'activation des astrocytes présente plusieurs limitations importantes. Si d'un point de vue théorique, l'utilisation de marqueurs astrocytaires spécifiques permettrait d'activer spécifiquement les astrocytes, cela n'est pas si simple en pratique. Premièrement, comme le suggère la présence d'une dépolarisation chez les souris exprimant la ChR2 sous le promoteur S100 $\beta$ , mais pas chez les souris exprimant la ChR2 sous le promoteur Aldh111 ou GFAP, tous les marqueurs astrocytaires ne sont pas aussi efficaces. Par exemple, la GFAP n'est pas exprimée dans toutes les populations d'astrocytes (Walz and Lang, 1998; Simard et al., 2003). De plus, le soma et les prolongements fins des astrocytes n'expriment pas la GFAP résultant en une expression dans environ seulement 15% du volume total des astrocytes chez le rongeur (Bushong et al., 2002). Finalement, l'expression de GFAP dans les astrocytes n'est pas constante et peut varier en cas de lésion ou d'inflammation (Zhang et al., 2017). Le S100 $\beta$  présente des limites similaires étant parfois exprimé dans d'autres cellules que les astrocytes (Donato et al., 2009). Le Aldh111 semble plus spécifique et répandu dans son expression dans les astrocytes, mais son expression a déjà été

démontrée dans une sous population d'oligodendrocytes (Yang et al., 2011). Ces différences dans l'expression des marqueurs astrocytaires peuvent venir expliquer l'absence d'effet dans 2 des 3 lignées de souris. Une absence de l'expression de ChR2 dans les astrocytes enregistrés causerait une absence d'effet à la photostimulation. Une autre raison pouvant expliquer l'absence d'effet sur le potentiel membranaire, est la localisation de l'expression au sein de l'astrocyte même. Les astrocytes étaient enregistrés au niveau du soma, alors si la ChR2 était seulement exprimée au niveau des prolongements, un changement de potentiel dans ceux-ci pourraient ne pas être suffisamment intense pour affecter le soma, mais tout de même potentiellement produire un relâche de gliotransmetteur au niveau de ces prolongements.

Une autre limitation majeure de l'utilisation de l'optogénétique et plus spécifiquement de ChR2 pour activer les astrocytes est que l'activité calcique produite par l'activation de ChR2 est différente de celle présente physiologiquement dans les astrocytes. L'activation de ChR2 par une photostimulation produit un large influx calcique de l'extérieur de la cellule (Gourine et al., 2010) et, théoriquement, pourrait ainsi théoriquement activer les voies de signalisations internes permettant d'activer l'astrocyte. Cependant, physiologiquement les augmentations calciques impliquent l'activation de récepteurs couplés à des protéine G permettant la libération du calcium par le réticulum endoplasmique (Nedergaard and Cotrina, 2005). Il est donc possible que l'activité astrocytaire induite par l'activation de ChR2 ne représente pas la régulation calcique physiologique des astrocytes. De plus, dans cette activité physiologique des astrocytes, ceux-ci ne produisent pas d'activité électrique, alors l'utilisation du changement de potentiel membranaire ne permet pas de réellement confirmer l'activation des astrocytes. Cependant, comme la ChR2 est un canal à cation membranaire, son activation devrait causer une dépolarisation.

Ces limitations de ChR2 en particulier sont la raison pour lesquelles la quatrième lignée de souris a été utilisée dans ces expériences. En effet, cette lignée exprime la protéine  $\alpha 1AR$ , un récepteur adrénergique couplé à une protéine G. L'utilisation d'un récepteur couplé à une protéine G permet de se rapprocher d'une activité calcique physiologique lorsqu'on le compare à l'utilisation de ChR2. Cette fois encore, aucun changement du potentiel membranaire des astrocytes n'a été détecté lors de la photostimulation. Cependant, ceci était à prévoir considérant l'utilisation d'un récepteur couplé à une protéine G par rapport à ChR2.

Une méthode plus appropriée pour visualiser l'activation des astrocytes par la photostimulation serait d'utiliser l'imagerie calcique. L'imagerie calcique permettrait de visualiser non seulement l'activation de l'astrocyte, mais aussi, potentiellement, l'intensité de cette activation ainsi que si l'activation est limitée à une certaine partie de l'astrocyte. C'est pourquoi au cours de cette maîtrise, nous avons tenté de développer un modèle optogénétique permettant de faire de l'imagerie calcique. Cependant aucun des modèles n'a permis d'obtenir des résultats analysables, c'est pourquoi les résultats de ces expériences n'ont pas été présentés dans ce mémoire.

## **10.2 Les neurones réagissent à la stimulation optogénétique des astrocytes**

Nos expériences d'enregistrement de neurone du NVsnpr montrent une variété d'effets sur les neurones lors de la stimulation optogénétique des astrocytes. Ces effets sont principalement présents chez les souris S100 $\beta$ -Cre/ChR2-lox, ce qui correspond avec le fait que seulement les astrocytes du NVsnpr de cette lignée semblait répondre à la photostimulation. Le but de ces expériences était de produire des décharges en bouffée dans les neurones lors de l'activation des astrocytes. Cependant, ces effets incluent une augmentation de la fréquence de décharge, une dépolarisation, une production de bouffées ou une diminution de la fréquence de décharge. Cette variété d'effets s'explique peut-être par la variété de gliotransmetteurs pouvant être libérés par les astrocytes.

En effet, les astrocytes expriment une grande variété de molécules, comme le S100 $\beta$ , le glutamate, l'ATP, le GABA, la D-serine et du lactate (MacDonald et al., 2019), pouvant être libérées et chacune de ces molécules peut produire un effet différent sur les neurones. Chacun des effets obtenus peut être expliqués par un ou plusieurs gliotransmetteurs. La production de bouffées est probablement causée par la relâche de S100 $\beta$ . Comme expliqué dans la section 5.8.1, la relâche de S100 $\beta$  cause une diminution de la concentration de calcium extracellulaire qui cause une augmentation du courant  $I_{Nap}$  dans les neurones permettant ainsi l'apparition de bouffées (Morquette et al., 2015). L'augmentation de la fréquence de décharge et la dépolarisation pourrait être causées par une relâche de glutamate ou d'ATP par les astrocytes. Les astrocytes peuvent relâcher du glutamate par une exocytose induite par une augmentation de calcium intracellulaire (Parpura et al., 2004; Parpura and Zorec, 2010). L'ATP peut être relâché par les astrocytes par l'ouverture de connexons (Torres et al., 2012) ou encore par une libération calcium-dépendante de lysosomes (Oya et al., 2013). Une faible libération de S100 $\beta$

pourrait aussi expliquer ces effets, en effet une diminution de la concentration de calcium extracellulaire augmente l'excitabilité des neurones (Hille, 2001). Une diminution de la fréquence de décharge pourrait être causée par une relâche de GABA. Les astrocytes peuvent relâcher du GABA par leur système de transport dépendant du Na<sup>+</sup> (Gallo et al., 1991) ou par un canal à anion, Best-1 (Lee et al., 2010).

Une autre possibilité pouvant expliquer certains des effets de la photostimulation des astrocytes sur les neurones est un déséquilibre ionique causé par l'activation de ChR2. En effet, il a récemment été prouvé que l'excitation optogénétique de ChR2 est accompagnée d'une augmentation transitoire de la concentration de K<sup>+</sup> extracellulaire pouvant augmenter jusqu'à environ 5 mM (Octeau et al., 2019). Une telle augmentation de la concentration de K<sup>+</sup> pourrait donc venir augmenter l'excitabilité des neurones adjacents aux astrocytes stimulés sans que des gliotransmetteurs soient impliqués. Aussi, il a été démontré que l'activation de la ChR2 par la lumière cause une diminution transitoire du pH dans le milieu extracellulaire (Nack et al., 2012). Une telle diminution du pH pourrait, encore une fois, affecter l'excitabilité des neurones sans l'implication de gliotransmetteurs.

Pour identifier l'origine des différents effets causés par l'activation optogénétique des astrocytes, il est donc nécessaire d'effectuer des expériences pharmacologiques. Cependant, par manque de temps durant la maîtrise, toutes les expériences nécessaires n'ont pu être effectuées. Seule la suramine, un antagoniste des récepteurs purinergiques, a été testée. L'application de la suramine permet d'éliminer la contribution de l'effet de l'ATP qui pourrait potentiellement être libéré lors de l'activation des astrocytes. Dans les 3 cas où la suramine a été appliquée, celle-ci n'a pas empêché l'augmentation de la fréquence de décharges dans les neurones causée par la photostimulation des astrocytes suggérant que cet effet excitateur de la photostimulation des astrocytes n'est pas principalement causé par la relâche d'ATP par les astrocytes. D'autres études pharmacologiques seront nécessaires dans le futur pour identifier le rôle des différents gliotransmetteurs, principalement celui du S100β.

### **10.3 Réponse des neurones à la stimulation électrique du tractus trigéminal**

Le NVsnpr reçoit des inputs sensoriels par le tractus trigéminal dont la stimulation peut parfois provoquer une activité rythmique. Des stimulations électriques à basse fréquence (< 1Hz) ne provoquent que de l'activité tonique ou une inhibition, mais des stimulations à haute

fréquence (>40 Hz) peuvent parfois provoquer des bouffées rythmiques (Pastor-Bernier et al., 2010). En accord avec la littérature, les stimulations simples du tractus trigéminal ont majoritairement produit des PPSE, des potentiels d'action ou quelques fois des PPSI. Cependant, la stimulation à haute fréquence du tractus trigéminal n'a jamais produit de bouffées rythmiques. Comme une stimulation massive est nécessaire à la genèse des bouffées, il est possible que les stimulations effectuées n'étaient pas assez intenses pour provoquer les bouffées. En effet, la présence de S100 $\beta$  étant nécessaire à la genèse des bouffées dans le NVsnpr (Morquette et al., 2015), une stimulation trop faible pourrait ne pas être suffisante pour permettre la relâche de S100 $\beta$ . Aussi, les tranches étaient enregistrées en étant complètement immergées dans l'aCSF, ce qui pourrait causer un lavage trop rapide du S100 $\beta$  par le milieu et empêcher la genèse des bouffées. Finalement, la plupart des données dans la littérature sur la genèse des bouffées dans le NVsnpr ont été récolté chez le rat et non la souris, ce qui pourrait expliquer un changement dans l'effet d'un même protocole.

#### **10.4 La stimulation optogénétique des astrocytes affecte la réponse des neurones à la stimulation électrique du tractus trigéminal.**

Comme expliqué dans la section 8.2, les astrocytes peuvent relâcher un nombre varié de molécule pouvant potentiellement moduler la réponse des neurones à la stimulation électrique du tractus trigéminal. Comme prévu, la photostimulation des astrocytes a affecté la réponse des neurones à la stimulation électrique du tractus trigéminal de plusieurs façons différentes. Ces effets pouvaient être présents seulement pendant la photostimulation, seulement après la photostimulation ou les deux. Encore une fois, il est difficile d'identifier exactement ce qui pourrait produire de tels effets, c'est pourquoi des études pharmacologiques sont nécessaires. Dans un des cas où la stimulation optogénétique causait une diminution de l'amplitude du PPSE causé par la stimulation électrique, un anticorps anti-S100 $\beta$  a été appliqué pour s'assurer que l'effet inhibiteur de la stimulation optogénétique n'était pas dû au S100 $\beta$ . En effet, selon le modèle de Kolta et al. (2015), la libération S100 $\beta$  devrait causer une activation de  $I_{Nap}$  et non une inhibition de l'effet de la stimulation électrique. Effectivement, l'application d'un anticorps anti-S100 $\beta$  n'a pas empêché l'effet inhibiteur, suggérant que le S100 $\beta$  n'est pas impliqué dans cet effet. Encore une fois, un manque de temps dans la maîtrise a empêché l'achèvement de toutes les expériences pharmacologiques requises à l'identification des causes des effets de la

stimulation optogénétique sur les effets de la stimulation électrique du tractus trigéminal sur les neurones de NVnpr.

### **10.5 Synchronisation de l'activité des neurones du NVsnpr**

Les expériences effectuées au cours de cette maîtrise n'ont pas réussi à démontrer une synchronisation de l'activité des neurones par l'activation optogénétique des astrocytes ou par la stimulation à haute fréquence du tractus trigéminal.

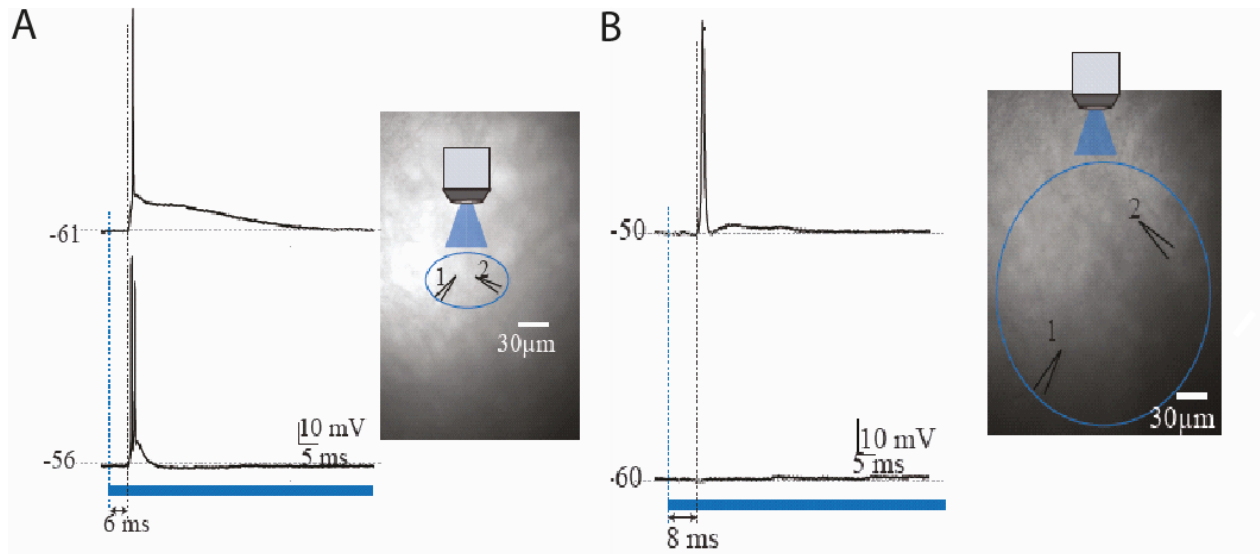
L'hypothèse que les astrocytes pourraient causer une synchronisation de l'activité rythmique des neurones du NVsnpr se base sur le modèle de la genèse de l'activité rythmique lors de la mastication proposé par Kolta et al (Morquette et al., 2015). Selon ce modèle, lorsque les afférences sensorielles ont un niveau d'activité suffisamment élevé, les astrocytes sont activés et vont, via la libération de S100 $\beta$ , diminuer la concentration de calcium extracellulaire. Cette diminution favorise l'activation d' $I_{NaP}$  dans les neurones et cause ainsi la décharge rythmique de ces neurones qui peuvent maintenant transmettre la commande motrice (Morquette et al., 2015). Comme les astrocytes forment des réseaux dans le NVsnpr, l'activation d'un seul astrocyte peut causer une activation dans tous les astrocytes du réseau (Condamine et al., 2018a). L'activation de tous ces astrocytes pourrait causer une libération simultanée de S100 $\beta$  sur tout le territoire du réseau et ainsi déclencher une activité rythmique au même moment dans les neurones présents sur ce territoire. Ce déclenchement simultané de l'activité rythmique des neurones présents sur le territoire astrocytaire pourrait ainsi causer une synchronisation dans l'activité rythmique de sous-groupes de neurones dans le NVsnpr.

Nous n'avons obtenu aucune donnée dans nos travaux pouvant supporter cette hypothèse. Cet état des faits résulte peut-être des conditions dans lesquelles nous avons mené nos expériences. En effet pour pouvoir enregistrer les neurones en mode cellule entière, nous avons dû faire nos enregistrements dans des tranches submergées. Or selon l'hypothèse, l'activation d'un réseau astrocytaire favoriserait l'activation synchrone d'une population neuronale en libérant une quantité suffisante de S100 $\beta$  pour diminuer la concentration de  $Ca^{2+}$  extracellulaire et activer  $I_{NaP}$ . Or il est possible que dans les tranches submergées, le calcium soit renouvelé trop rapidement et que sa concentration ne soit jamais suffisamment abaissée pour permettre l'activation d' $I_{NaP}$ . Ceci est supporté par le fait que la stimulation électrique à haute fréquence du tractus trigéminal n'a jamais produit d'activité rythmique en conditions submergées, alors



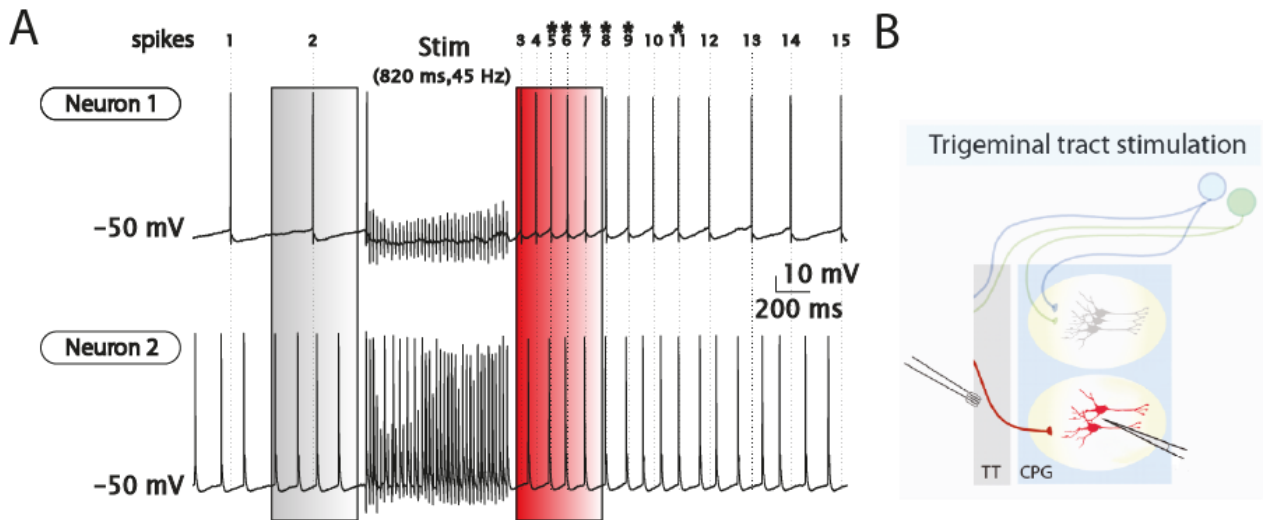
qu'elle le fait couramment lorsque les tranches utilisées sont maintenues dans une chambre à interface où elles ne sont pas submergées. De plus, aucun des neurones enregistrés en paires n'ont produit des bouffées à la suite de la stimulation optogénétique, et seulement 2 neurones sur 24 ont répondu à la stimulation optogénétique. Cette réponse de seulement 8% des neurones enregistrés en paire par rapport à une réponse d'environ 70% des neurones enregistrés dans la même lignée de souris auparavant suggère un problème avec la stimulation des astrocytes. Effectivement, il a été plus tard découvert que le laser utilisé dans ces dernières manquait de puissance durant la période où les paires de neurones ont été enregistré. Alors si le laser n'était pas suffisamment puissant pour activer les astrocytes, il est normal de ne pas avoir observé de synchronisation.

Plus positivement, des données préliminaires du laboratoire prises avec un laser fonctionnel, semblent suggérer la validité du modèle de synchronisation. En effet, 2 paires de neurones ont été enregistrées durant la stimulation optogénétiques des astrocytes et dans le cas des neurones plus rapprochés ( $\approx 30\mu\text{m}$  de distance) la stimulation optogénétique a causé une décharge synchronisée dans les 2 neurones (Figure 17.A). Alors que dans la paire de neurones plus éloignée ( $\approx 150\mu\text{m}$  de distance), la stimulation optogénétique ne produit pas de décharge synchronisée (Figure 17.B). Les réseaux astrocytaires dans le NVnpr sont relativement restreint (Condamine et al., 2018a), alors les chances que deux neurones soient localisés dans le territoire d'un même réseau diminuent avec l'augmentation de la distance qui les sépare. Si les réseaux astrocytaires sont bien la cause de la synchronisation des neurones, il est donc prometteur que la synchronisation soit causée par l'activation optogénétique des astrocytes chez les neurones rapprochés et non dans les neurones éloignés



**Figure 17. La photostimulation des astrocytes cause une décharge synchrone dans une paire de neurones du NVsnpr rapprochés mais pas dans une paire de neurones éloignés.** La photostimulation d'une petite aire (cercle bleu) cause une décharge dans une paire de neurones à environ 30μm de distance (A). La photostimulation d'une plus grande aire (cercle bleu) cause une décharge dans seulement un neurone d'une paire de neurone à environ 150 μm de distance (B)

Une autre donnée préliminaire du laboratoire corroborant le modèle de synchronisation de l'activité rythmique est l'enregistrement de paires de neurones synchronisant leur activité avec la stimulation électrique à haute fréquence du tractus trigéminal. Durant cet enregistrement, le tractus trigéminal était stimulé à 5 Hz pour 820 ms, à la suite de la stimulation l'activité des neurones qui était asynchrone est devenue synchrone pour environ 500 ms (Figure 18).



**Figure 18.** La stimulation à haute fréquence (45 Hz) cause une synchronisation dans les décharges d'une paire de neurones du NVsnpr. Des enregistrements en mode cellules entières d'une paire de neurones montre une décharge asynchrone avant la stimulation du tractus trigéminal à 45 Hz et une synchronisation de ces décharges jusqu'à 500 ms à la suite de la stimulation (A). Schéma des arrangements d'enregistrement et de stimulation électrique du tractus trigéminal (B)

### 10.6 Perspectives futures

Plusieurs suites logiques pourraient être proposées pour ce projet. Premièrement, comme discuté, l'utilisation de la protéine ChR2 pour activer les astrocytes est problématique sous plusieurs aspects. C'est pourquoi remplacer ChR2 par une protéine couplée à une protéine G comme opto- $\alpha_1$ AR serait bénéfique pour le projet. Pour ce faire, il faudrait tester différentes lignées de souris exprimant la protéine sous différents promoteurs astrocytaires pour identifier laquelle permet d'obtenir les meilleurs résultats.

Une autre avenue importante pour la continuation du projet est le développement d'une technique d'imagerie calcique permettant d'observer les changements de concentration du calcium intracellulaire des astrocytes lors de leur stimulation. Présentement, les croisements de lignées de souris visant à exprimer une protéine indicatrice du calcium (GCamp6S) sous différents promoteurs astrocytaires (GFAP, S-100 $\beta$  et Aldh1L1) n'ont donné aucun résultat et les expériences d'immunohistochimie menées sur des tranches de tronc cérébral provenant de ces animaux suggèrent que l'expression de GCamp6S est soit absente ou très faible. Une alternative pourrait être l'utilisation des injections de virus pour augmenter l'expression de la protéine

indicateur du calcium. Il faudra dans ce cas veiller à utiliser un indicateur dont la détection impliquerait une longueur d'onde compatible, distincte de celle utilisée pour la photostimulation. Une approche similaire, mais pour les neurones du NVsnpr, permettrait possiblement de visualiser la synchronisation d'un plus grand nombre de neurones au même moment, plutôt que d'essayer d'enregistrer électrophysiologiquement seulement 2 neurones à la fois.

Finalement, une autre avenue qui a été entamée, mais pas encore complétée est une caractérisation pharmacologique des effets de l'activation des astrocytes. Comme discuté plutôt, une grande variété de molécules pourrait jouer un rôle dans les effets de l'activation des astrocytes sur les neurones et il serait important de bien identifier chacun de ces effets.

## **10.7 Conclusion**

Les travaux présentés dans ce mémoire démontrent des effets variés de la stimulation des astrocytes sur la réponse des neurones du NVsnpr. Nos résultats permettent d'identifier le modèle de souris optogénétique S100 $\beta$ -Cre/ChR2-lox comme le modèle le plus efficace pour activer les astrocytes dans le NVsnpr parmi les 4 modèles utilisés. Nos résultats décrivent les différents effets produits par cette stimulation dans différents modèles de souris transgéniques permettant d'identifier quel modèle est le plus approprié pour l'utilisation dans le NVsnpr. Comparé aux autres modèles, le modèle S100 $\beta$ -Cre/ChR2-lox permet de produire des effets discernables dans les astrocytes et les neurones lors de la stimulation optogénétique. Cependant, plus d'études pharmacologiques seront nécessaires dans le futur pour identifier les causes exactes de ces différents effets. De plus, nos résultats n'ont pas permis de confirmer le rôle de l'activation des astrocytes dans la synchronisation de l'activité rythmique des neurones du NVsnpr, cependant, d'autres données préliminaires semblent appuyer cette théorie. Le fait de caractériser différents modèles de souris transgénique et leurs effets a permis de contribuer à l'amélioration de la compréhension du rôle des astrocytes dans la rythmogénèse du NVsnpr impliquée dans la production des mouvements oraux ainsi qu'au développement de modèles permettant d'étudier les astrocytes dans le système trigéminale.

# 11 Références

- Aman TK, Grieco-Calub TM, Chen C, Rusconi R, Slat EA, Isom LL, Raman IM (2009) Regulation of persistent Na current by interactions between beta subunits of voltage-gated Na channels. *J Neurosci* 29:2027-2042.
- Anlauf E, Derouiche A (2013) Glutamine synthetase as an astrocytic marker: its cell type and vesicle localization. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4:144.
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG (1999) Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* 22:208-215.
- Araque A, Martin ED, Perea G, Arellano JI, Buno W (2002) Synaptically released acetylcholine evokes Ca<sup>2+</sup> elevations in astrocytes in hippocampal slices. *J Neurosci* 22:2443-2450.
- Athanassiadis T, Olsson KA, Kolta A, Westberg KG (2005a) Identification of c-Fos immunoreactive brainstem neurons activated during fictive mastication in the rabbit. *Exp Brain Res* 165:478-489.
- Athanassiadis T, Westberg KG, Olsson KA, Kolta A (2005b) Physiological characterization, localization and synaptic inputs of bursting and nonbursting neurons in the trigeminal principal sensory nucleus of the rat. *Eur J Neurosci* 22:3099-3110.
- Ballerini P, Rathbone MP, Di Iorio P, Renzetti A, Giuliani P, D'Alimonte I, Trubiani O, Caciagli F, Ciccarelli R (1996) Rat astroglial P2Z (P2X7) receptors regulate intracellular calcium and purine release. *Neuroreport* 7:2533-2537.
- Barres BA, Chun LL, Corey DP (1989) Calcium current in cortical astrocytes: induction by cAMP and neurotransmitters and permissive effect of serum factors. *J Neurosci* 9:3169-3175.
- Basit H, Eovaldi BJ, Siccardi MA (2020) Anatomy, Head and Neck, Mastication Muscles. In: StatPearls. Treasure Island (FL).
- Bellingham MC (1998) Driving respiration: the respiratory central pattern generator. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 25:847-856.
- Belser UC, Hannam AG (1986) The contribution of the deep fibers of the masseter muscle to selected tooth-clenching and chewing tasks. *J Prosthet Dent* 56:629-635.
- Bergmans J, Burke R, Lundberg A (1969) Inhibition of transmission in the recurrent inhibitory pathway to motoneurons. *Brain Res* 13:600-602.
- Bourque MJ, Kolta A (2001) Properties and interconnections of trigeminal interneurons of the lateral pontine reticular formation in the rat. *J Neurophysiol* 86:2583-2596.
- Bremer F (1923) Physiologie nerveuse de la mastication chez le chat et le lapin. *Archs Internat Physiol*:308-352.
- Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, Francke M, Wiedemann P, Skatchkov SN, Osborne NN, Reichenbach A (2006) Muller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res* 25:397-424.
- Brocard F, Tazerart S, Vinay L (2010) Do pacemakers drive the central pattern generator for locomotion in mammals? *Neuroscientist* 16:139-155.
- Brocard F, Verdier D, Arsenault I, Lund JP, Kolta A (2006) Emergence of intrinsic bursting in trigeminal sensory neurons parallels the acquisition of mastication in weanling rats. *J Neurophysiol* 96:2410-2424.
- Brocard F, Shevtsova NA, Bouhadfane M, Tazerart S, Heinemann U, Rybak IA, Vinay L (2013) Activity-dependent changes in extracellular Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> reveal pacemakers in the spinal locomotor-related network. *Neuron* 77:1047-1054.
- Brown TG (1911) The intrinsic factors in the act of progression in the mammal. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 84.
- Bukauskas FF, Verselis VK (2004) Gap junction channel gating. *Biochim Biophys Acta* 1662:42-60.

- Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH (2002) Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci* 22:183-192.
- Byrd KE (1981) Mandibular movement and muscle activity during mastication in the guinea pig (*Cavia porcellus*). *J Morphol* 170:147-169.
- Cahoy JD, Emery B, Kaushal A, Foo LC, Zamanian JL, Christopherson KS, Xing Y, Lubischer JL, Krieg PA, Krupenko SA, Thompson WJ, Barres BA (2008) A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci* 28:264-278.
- Cajal Ry (1909) *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertèbres*. Paris: Hachette.
- Charles AC, Merrill JE, Dirksen ER, Sanderson MJ (1991) Intercellular signaling in glial cells: calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate. *Neuron* 6:983-992.
- Chase MH, McGinty DJ (1970) Modulation of spontaneous and reflex activity of the jaw musculature by orbital cortical stimulation in the freely-moving cat. *Brain Res* 19:117-126.
- Chen WJ, Liem RK (1994) Reexpression of glial fibrillary acidic protein rescues the ability of astrocytoma cells to form processes in response to neurons. *J Cell Biol* 127:813-823.
- Condamine S, Verdier D, Kolta A (2018a) Analyzing the Size, Shape, and Directionality of Networks of Coupled Astrocytes. *J Vis Exp*.
- Condamine S, Lavoie R, Verdier D, Kolta A (2018b) Functional rhythmogenic domains defined by astrocytic networks in the trigeminal main sensory nucleus. *Glia* 66:311-326.
- Condorelli DF, Conti F, Gallo V, Kirchhoff F, Seifert G, Steinhauser C, Verkhratsky A, Yuan X (1999) Expression and functional analysis of glutamate receptors in glial cells. *Adv Exp Med Biol* 468:49-67.
- Corcoran NM, Goldman EM (2020) Anatomy, Head and Neck, Masseter Muscle. In: StatPearls. Treasure Island (FL).
- Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ (1990) Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science* 247:470-473.
- Crick F (1984) Function of the thalamic reticular complex: the searchlight hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:4586-4590.
- Crill WE (1996) Persistent sodium current in mammalian central neurons. *Annu Rev Physiol* 58:349-362.
- Dellow PG, Lund JP (1971) Evidence for central timing of rhythmical mastication. *J Physiol* 215:1-13.
- Donato R, Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Bianchi R, Brozzi F, Tubaro C, Giambanco I (2009) S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim Biophys Acta* 1793:1008-1022.
- Donga R, Lund JP (1991) Discharge patterns of trigeminal commissural last-order interneurons during fictive mastication in the rabbit. *J Neurophysiol* 66:1564-1578.
- Donga R, Dubuc R, Kolta A, Lund JP (1992) Evidence that the masticatory muscles receive a direct innervation from cell group k in the rabbit. *Neuroscience* 49:951-961.
- Edgerton VR, Grillner S, Sjöström A, P. Z (1976) Central Generation of Locomotion in Vertebrates. In: *Neural control of locomotion* (Herman RM, Grillner S, Stein PSG, Stuart DG, eds), pp 439-464. New York: Plenum Press.
- 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.
- 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.
- Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL (2000) Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res* 25:1439-1451.
- Feldman JL, Grillner S (1983) *v. Physiologist* 26:310-316.
- Ferrier D (1886) *The Function of the brain*. London.

- Fiacco TA, McCarthy KD (2006) Astrocyte calcium elevations: properties, propagation, and effects on brain signaling. *Glia* 54:676-690.
- Franklin K, Paxinos G (2019) Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates: Academic Press.
- Fraser DD, Mudrick-Donnon LA, MacVicar BA (1994) Astrocytic GABA receptors. *Glia* 11:83-93.
- 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* 4:245-255.
- Garcia AD, Doan NB, Imura T, Bush TG, Sofroniew MV (2004) GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat Neurosci* 7:1233-1241.
- Giaume C, Leybaert L, Naus CC, Saez JC (2013) Connexin and pannexin hemichannels in brain glial cells: properties, pharmacology, and roles. *Front Pharmacol* 4:88.
- Giaume C, Koulakoff A, Roux L, Holcman D, Rouach N (2010) Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nat Rev Neurosci* 11:87-99.
- Gomez-Hernandez JM, de Miguel M, Larrosa B, Gonzalez D, Barrio LC (2003) Molecular basis of calcium regulation in connexin-32 hemichannels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:16030-16035.
- Gourine AV, Kasymov V, Marina N, Tang F, Figueiredo MF, Lane S, Teschemacher AG, Spyer KM, Deisseroth K, Kasparov S (2010) Astrocytes control breathing through pH-dependent release of ATP. *Science* 329:571-575.
- Gregg JM, Dixon AD (1973) Somatotopic organization of the trigeminal ganglion in the rat. *Arch Oral Biol* 18:487-498.
- Grillner S (1981) Control of locomotion in bipeds, tetrapods, and fish. In: *Handbook of Physiology. The nervous system II.* (Brookhart JM, Mountcastle VB, eds), pp 1179–1236. Bethesda: American Physiological Society.
- Grillner S, Zangger P (1975) How detailed is the central pattern generation for locomotion? *Brain Res* 88:367-371.
- Guertin P, Angel MJ, Perreault MC, McCrear DA (1995) Ankle extensor group I afferents excite extensors throughout the hindlimb during fictive locomotion in the cat. *J Physiol* 487:197-209.
- Guthrie PB, Knappenberger J, Segal M, Bennett MV, Charles AC, Kater SB (1999) ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *J Neurosci* 19:520-528.
- Halassa MM, Fellin T, Takano H, Dong JH, Haydon PG (2007) Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. *J Neurosci* 27:6473-6477.
- Hannam AG, McMillan AS (1994) Internal organization in the human jaw muscles. *Crit Rev Oral Biol Med* 5:55-89.
- Harris-Warrick RM (2010) General principles of rhythmogenesis in central pattern generator networks. *Prog Brain Res* 187:213-222.
- Haustein MD, Kracun S, Lu XH, Shih T, Jackson-Weaver O, Tong X, Xu J, Yang XW, O'Dell TJ, Marvin JS, Ellisman MH, Bushong EA, Looger LL, Khakh BS (2014) Conditions and constraints for astrocyte calcium signaling in the hippocampal mossy fiber pathway. *Neuron* 82:413-429.
- Herpers MJ, Budka H (1984) Glial fibrillary acidic protein (GFAP) in oligodendroglial tumors: gliofibrillary oligodendroglioma and transitional oligoastrocytoma as subtypes of oligodendroglioma. *Acta Neuropathol* 64:265-272.
- Herring SW (2007) Masticatory muscles and the skull: a comparative perspective. *Arch Oral Biol* 52:296-299.
- Herring SW, Grimm AF, Grimm BR (1979) Functional heterogeneity in a multipinnate muscle. *Am J Anat* 154:563-576.

- Hidaka O, Morimoto T, Masuda Y, Kato T, Matsuo R, Inoue T, Kobayashi M, Takada K (1997) Regulation of masticatory force during cortically induced rhythmic jaw movements in the anesthetized rabbit. *J Neurophysiol* 77:3168-3179.
- Hille B (2001) *Ion Channels of Excitable Membranes*, 3 Edition. Sunderland MA.
- Hirase H, Qian L, Bartho P, Buzsaki G (2004) Calcium dynamics of cortical astrocytic networks in vivo. *PLoS Biol* 2:E96.
- Houades V, Rouach N, Ezan P, Kirchhoff F, Koulakoff A, Giaume C (2006) Shapes of astrocyte networks in the juvenile brain. *Neuron Glia Biol* 2:3-14.
- Huard H, Lund JP, Veilleux D, Dubuc R (1999) An anatomical study of brainstem projections to the trigeminal motor nucleus of lampreys. *Neuroscience* 91:363-378.
- Huh Y, Cho J (2013) Discrete pattern of burst stimulation in the ventrobasal thalamus for anti-nociception. *PLoS One* 8:e67655.
- 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* 14:275-294.
- Jacquin MF, Rhoades RW, Enfiejian HL, Egger MD (1983) Organization and morphology of masticatory neurons in the rat: a retrograde HRP study. *J Comp Neurol* 218:239-256.
- Kadala A, Verdier D, Morquette P, Kolta A (2015) Ion Homeostasis in Rhythmogenesis: The Interplay Between Neurons and Astroglia. *Physiology (Bethesda)* 30:371-388.
- Kiehn O, Butt SJ (2003) Physiological, anatomical and genetic identification of CPG neurons in the developing mammalian spinal cord. *Prog Neurobiol* 70:347-361.
- Kim SD, Loukas M (2019) Anatomy and variations of digastric muscle. *Anat Cell Biol* 52:1-11.
- Kirchhoff F, Mulhardt C, Pastor A, Becker CM, Kettenmann H (1996) Expression of glycine receptor subunits in glial cells of the rat spinal cord. *J Neurochem* 66:1383-1390.
- Kogo M, Funk GD, Chandler SH (1996) Rhythmical oral-motor activity recorded in an in vitro brainstem preparation. *Somatosens Mot Res* 13:39-48.
- 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.
- Kriellaars DJ, Brownstone RM, Noga BR, Jordan LM (1994) Mechanical entrainment of fictive locomotion in the decerebrate cat. *J Neurophysiol* 71:2074-2086.
- Latour I, Hamid J, Beedle AM, Zamponi GW, Macvicar BA (2003) Expression of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel subtypes in cultured astrocytes. *Glia* 41:347-353.
- Lavigne G, Kim JS, Valiquette C, Lund JP (1987) Evidence that periodontal pressoreceptors provide positive feedback to jaw closing muscles during mastication. *J Neurophysiol* 58:342-358.
- Lee D (2003) Coherent oscillations in neuronal activity of the supplementary motor area during a visuomotor task. *J Neurosci* 23:6798-6809.
- Lee S, Yoon BE, Berglund K, Oh SJ, Park H, Shin HS, Augustine GJ, Lee CJ (2010) Channel-mediated tonic GABA release from glia. *Science* 330:790-796.
- Li YQ, Takada M, Mizuno N (1993) 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* 611:160-164.
- Li Z, Hatton GI (1996) Oscillatory bursting of phasically firing rat supraoptic neurones in low-Ca<sup>2+</sup> medium: Na<sup>+</sup> influx, cytosolic Ca<sup>2+</sup> and gap junctions. *J Physiol* 496 ( Pt 2):379-394.
- Limwongse V, DeSantis M (1977) Cell body locations and axonal pathways of neurons innervating muscles of mastication in the rat. *Am J Anat* 149:477-488.
- Liu Y, Namba T, Liu J, Suzuki R, Shioda S, Seki T (2010) Glial fibrillary acidic protein-expressing neural progenitors give rise to immature neurons via early intermediate progenitors expressing both



- glial fibrillary acidic protein and neuronal markers in the adult hippocampus. *Neuroscience* 166:241-251.
- Liu ZJ, 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* 69:569-584.
- Lund JP (1991) Mastication and its control by the brain stem. *Crit Rev Oral Biol Med* 2:33-64.
- Lund JP, Sasamoto K, Murakami T, Olsson KA (1984) Analysis of rhythmical jaw movements produced by electrical stimulation of motor-sensory cortex of rabbits. *J Neurophysiol* 52:1014-1029.
- MacDonald AJ, Robb JL, Morrissey NA, Beall C, Ellacott KLJ (2019) Astrocytes in neuroendocrine systems: An overview. *J Neuroendocrinol* 31:e12726.
- MacGregor DJ, Leng G (2012) Phasic firing in vasopressin cells: understanding its functional significance through computational models. *PLoS Comput Biol* 8:e1002740.
- Mani RS, Boyes BE, Kay CM (1982) Physicochemical and optical studies on calcium- and potassium-induced conformational changes in bovine brain S-100b protein. *Biochemistry* 21:2607-2612.
- Marfurt CF (1981) The somatotopic organization of the cat trigeminal ganglion as determined by the horseradish peroxidase technique. *Anat Rec* 201:105-118.
- Martin RE, Kempainen P, Masuda Y, Yao D, Murray GM, Sessle BJ (1999) Features of cortically evoked swallowing in the awake primate (*Macaca fascicularis*). *J Neurophysiol* 82:1529-1541.
- McCrea DA, Rybak IA (2008) Organization of mammalian locomotor rhythm and pattern generation. *Brain Res Rev* 57:134-146.
- Melzer L, Freiman TM, Derouiche A (2021) Rab6A as a Pan-Astrocytic Marker in Mouse and Human Brain, and Comparison with Other Glial Markers (GFAP, GS, Aldh1L1, SOX9). *Cells* 10.
- Miller RH, Raff MC (1984) Fibrous and protoplasmic astrocytes are biochemically and developmentally distinct. *J Neurosci* 4:585-592.
- Miller S, Scott PD (1977) The spinal locomotor generator. *Exp Brain Res* 30:387-403.
- Mioche L, Bourdiol P, Martin JF, Noel Y (1999) Variations in human masseter and temporalis muscle activity related to food texture during free and side-imposed mastication. *Arch Oral Biol* 44:1005-1012.
- Mirmiran M, Corner M (1982) Neuronal discharge patterns in the occipital cortex of developing rats during active and quiet sleep. *Brain Res* 255:37-48.
- 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* 164:105-115.
- Moriyama Y (1987) Rhythmical jaw movements and lateral ponto-medullary reticular neurons in rats. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 86:7-14.
- Morquette P, Verdier D, Kadala A, Fethiere J, Philippe AG, Robitaille R, Kolta A (2015) An astrocyte-dependent mechanism for neuronal rhythmogenesis. *Nat Neurosci* 18:844-854.
- Mothet JP, 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* 102:5606-5611.
- Munro RR (1974) Activity of the digastric muscle in swallowing and chewing. *J Dent Res* 53:530-537.
- Nack M, Radu I, Schultz BJ, Resler T, Schlesinger R, Bondar AN, del Val C, Abbruzzetti S, Viappiani C, Bamann C, Bamberg E, Heberle J (2012) Kinetics of proton release and uptake by channelrhodopsin-2. *FEBS Lett* 586:1344-1348.
- Nagy JJ, Dudek FE, Rash JE (2004) Update on connexins and gap junctions in neurons and glia in the mammalian nervous system. *Brain Res Brain Res Rev* 47:191-215.
- Nakamura Y, Kubo Y, Nozaki S, Takatori M (1976) Cortically induced masticatory rhythm and its modification by tonic peripheral inputs in immobilized cats. *Bull Tokyo Med Dent Univ* 23:101-107.

- Navarrete M, Araque A (2010) Endocannabinoids potentiate synaptic transmission through stimulation of astrocytes. *Neuron* 68:113-126.
- Nedergaard M, Cotrina ML (2005) Intracellular calcium control mechanisms in glia. *Neuroglia*:229-250.
- Nichols NR, Day JR, Laping NJ, Johnson SA, Finch CE (1993) GFAP mRNA increases with age in rat and human brain. *Neurobiol Aging* 14:421-429.
- Nishiyama A, Yang Z, Butt A (2005) Astrocytes and NG2-glia: what's in a name? *J Anat* 207:687-693.
- Nozaki S, Iriki A, Nakamura Y (1986a) Role of corticobulbar projection neurons in cortically induced rhythmical masticatory jaw-opening movement in the guinea pig. *J Neurophysiol* 55:826-845.
- Nozaki S, Iriki A, Nakamura Y (1986b) Localization of central rhythm generator involved in cortically induced rhythmical masticatory jaw-opening movement in the guinea pig. *J Neurophysiol* 55:806-825.
- Octeau JC, Gangwani MR, Allam SL, Tran D, Huang S, Hoang-Trong TM, Golshani P, Rumbell TH, Kozloski JR, Khakh BS (2019) Transient, Consequential Increases in Extracellular Potassium Ions Accompany Channelrhodopsin2 Excitation. *Cell Rep* 27:2249-2261 e2247.
- Ogata K, Kosaka T (2002) Structural and quantitative analysis of astrocytes in the mouse hippocampus. *Neuroscience* 113:221-233.
- Orlovskii GN, Severin FV, Shik ML (1966) [Locomotion induced by stimulation of the mesencephalon]. *Dokl Akad Nauk SSSR* 169:1223-1226.
- Oya M, Kitaguchi T, Pais R, Reimann F, Gribble F, Tsuboi T (2013) The G protein-coupled receptor family C group 6 subtype A (GPCR6A) receptor is involved in amino acid-induced glucagon-like peptide-1 secretion from GLUTag cells. *J Biol Chem* 288:4513-4521.
- Panatier A, Vallee J, Haber M, Murai KK, Lacaille JC, Robitaille R (2011) Astrocytes are endogenous regulators of basal transmission at central synapses. *Cell* 146:785-798.
- Parpura V, Zorec R (2010) Gliotransmission: Exocytotic release from astrocytes. *Brain Res Rev* 63:83-92.
- Parpura V, Scemes E, Spray DC (2004) Mechanisms of glutamate release from astrocytes: gap junction "hemichannels", purinergic receptors and exocytotic release. *Neurochem Int* 45:259-264.
- Parpura V, Basarsky TA, Liu F, Jeftinija K, Jeftinija S, Haydon PG (1994) Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* 369:744-747.
- Pastor-Bernier A, Arsenault I, Lund JP, 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* 103:915-923.
- Patte C, Gandolfo P, Leprince J, Thoumas JL, Fontaine M, Vaudry H, Tonon MC (1999) GABA inhibits endozepine release from cultured rat astrocytes. *Glia* 25:404-411.
- Peracchia C, Sotkis A, Wang XG, Peracchia LL, Persechini A (2000) Calmodulin directly gates gap junction channels. *J Biol Chem* 275:26220-26224.
- Perea G, Araque A (2005) Glial calcium signaling and neuron-glia communication. *Cell Calcium* 38:375-382.
- Perreault MC, Angel MJ, Guertin P, McCrea DA (1995) Effects of stimulation of hindlimb flexor group II afferents during fictive locomotion in the cat. *J Physiol* 487:211-220.
- Perret C, Cabelguen JM (1980) Main characteristics of the hindlimb locomotor cycle in the decorticate cat with special reference to bifunctional muscles. *Brain Res* 187:333-352.
- Price S, Daly DT (2020) Neuroanatomy, Nucleus Trigeminal. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL).
- Rioch JMK (1934) The neural mechanism of mastication. *American Journal of Physiology*.
- Rossignol S (1996) Neural Control of Stereotypic limb movements. In: *Handbook of Physiology, Exercise: Regulation and Integration of Multiple Systems* (Rowell LB, Shepherd JT, eds), pp 173-216: American Physiological Society.
- Roux L, Benchenane K, Rothstein JD, Bonvento G, Giaume C (2011) Plasticity of astroglial networks in olfactory glomeruli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:18442-18446.

- Rybak IA, Stecina K, Shevtsova NA, McCrea DA (2006a) Modelling spinal circuitry involved in locomotor pattern generation: insights from the effects of afferent stimulation. *J Physiol* 577:641-658.
- Rybak IA, Shevtsova NA, Lafreniere-Roula M, McCrea DA (2006b) Modelling spinal circuitry involved in locomotor pattern generation: insights from deletions during fictive locomotion. *J Physiol* 577:617-639.
- Saad M, Dubuc R, Widmer CG, Westberg KG, Lund JP (1997) Anatomical organization of efferent neurons innervating various regions of the rabbit masseter muscle. *J Comp Neurol* 383:428-438.
- Sandler VM, Puil E, Schwarz DW (1998) Intrinsic response properties of bursting neurons in the nucleus principalis trigemini of the gerbil. *Neuroscience* 83:891-904.
- Schwartz G, Enomoto S, Valiquette C, Lund JP (1989) Mastication in the rabbit: a description of movement and muscle activity. *J Neurophysiol* 62:273-287.
- Sederberg PB, Schulze-Bonhage A, Madsen JR, Bromfield EB, McCarthy DC, Brandt A, Tully MS, Kahana MJ (2007) Hippocampal and neocortical gamma oscillations predict memory formation in humans. *Cereb Cortex* 17:1190-1196.
- Serrano A, Robitaille R, Lacaille JC (2008) Differential NMDA-dependent activation of glial cells in mouse hippocampus. *Glia* 56:1648-1663.
- Shigenaga Y, Okamoto T, Nishimori T, Suemune S, Nasution ID, Chen IC, Tsuru K, Yoshida A, Tabuchi K, Hosoi M, et al. (1986) Oral and facial representation in the trigeminal principal and rostral spinal nuclei of the cat. *J Comp Neurol* 244:1-18.
- Shigetomi E, Kracun S, Khakh BS (2010) Monitoring astrocyte calcium microdomains with improved membrane targeted GCaMP reporters. *Neuron Glia Biol* 6:183-191.
- Shigetomi E, Bushong EA, Hausteiner MD, Tong X, Jackson-Weaver O, Kracun S, Xu J, Sofroniew MV, Ellisman MH, Khakh BS (2013) Imaging calcium microdomains within entire astrocyte territories and endfeet with GCaMPs expressed using adeno-associated viruses. *J Gen Physiol* 141:633-647.
- Simard M, Arcuino G, Takano T, Liu QS, Nedergaard M (2003) Signaling at the gliovascular interface. *J Neurosci* 23:9254-9262.
- Smith ME, Somera FP, Eng LF (1983) Immunocytochemical staining for glial fibrillary acidic protein and the metabolism of cytoskeletal proteins in experimental allergic encephalomyelitis. *Brain Res* 264:241-253.
- Sofroniew MV, Vinters HV (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119:7-35.
- Steinhauser C, Gallo V (1996) News on glutamate receptors in glial cells. *Trends Neurosci* 19:339-345.
- Steriopoulou K, Alvarado JL, Mastroianni M, Ek-Vitorin JF, Taffet SM, Delmar M (1999) Hetero-domain interactions as a mechanism for the regulation of connexin channels. *Circ Res* 84:1144-1155.
- Su H, Alroy G, Kirson ED, Yaari Y (2001) Extracellular calcium modulates persistent sodium current-dependent burst-firing in hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci* 21:4173-4182.
- Sun W, Cornwell A, Li J, Peng S, Osorio MJ, Aalling N, Wang S, Benraiss A, Lou N, Goldman SA, Nedergaard M (2017) SOX9 Is an Astrocyte-Specific Nuclear Marker in the Adult Brain Outside the Neurogenic Regions. *J Neurosci* 37:4493-4507.
- Szekely G, Czeh G, Voros G (1969) The activity pattern of limb muscles in freely moving normal and deafferented newts. *Exp Brain Res* 9:53-72.
- Tanaka S, Kogo M, Chandler SH, Matsuya T (1999) Localization of oral-motor rhythmogenic circuits in the isolated rat brainstem preparation. *Brain Res* 821:190-199.
- Torres A, Wang F, Xu Q, Fujita T, Dobrowolski R, Willecke K, Takano T, Nedergaard M (2012) Extracellular Ca<sup>2+</sup>(+) acts as a mediator of communication from neurons to glia. *Sci Signal* 5:ra8.
- Trulsson M, Johansson RS (2002) Orofacial mechanoreceptors in humans: encoding characteristics and responses during natural orofacial behaviors. *Behav Brain Res* 135:27-33.
- Tsuboi A, Kolta A, Chen CC, Lund JP (2003) Neurons of the trigeminal main sensory nucleus participate in the generation of rhythmic motor patterns. *Eur J Neurosci* 17:229-238.

- Tsuruyama K, Hsiao CF, Chandler SH (2013) Participation of a persistent sodium current and calcium-activated nonspecific cationic current to burst generation in trigeminal principal sensory neurons. *J Neurophysiol* 110:1903-1914.
- Tsuruyama K, Scott G, Widmer CG, Lund JP (2002) Evidence for functional partitioning of the rabbit digastric muscle. *Cells Tissues Organs* 170:170-182.
- Urbani A, Belluzzi O (2000) Riluzole inhibits the persistent sodium current in mammalian CNS neurons. *Eur J Neurosci* 12:3567-3574.
- Uyeda CT, Eng LF, Bignami A (1972) Immunological study of the glial fibrillary acidic protein. *Brain Res* 37:81-89.
- Van Der Zee EA, De Jong GI, Strosberg AD, Luiten PG (1993) Muscarinic acetylcholine receptor-expression in astrocytes in the cortex of young and aged rats. *Glia* 8:42-50.
- Van Eldik LJ, Zimmer DB (1987) Secretion of S-100 from rat C6 glioma cells. *Brain Res* 436:367-370.
- Ventura R, Harris KM (1999) Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *J Neurosci* 19:6897-6906.
- Walz W, Lang MK (1998) Immunocytochemical evidence for a distinct GFAP-negative subpopulation of astrocytes in the adult rat hippocampus. *Neurosci Lett* 257:127-130.
- Watson C (2012) The Somatosensory System. *The Mouse Nervous System*. A Press:563-570.
- Westberg K, Clavelou P, Sandstrom G, Lund JP (1998) Evidence that trigeminal brainstem interneurons form subpopulations to produce different forms of mastication in the rabbit. *J Neurosci* 18:6466-6479.
- Westneat MW, Hall WG (1992) Ontogeny of feeding motor patterns in infant rats: an electromyographic analysis of suckling and chewing. *Behav Neurosci* 106:539-554.
- Widmer CG, Morris-Wiman J (2010) Limb, respiratory, and masticatory muscle compartmentalization: developmental and hormonal considerations. *Prog Brain Res* 187:63-80.
- Widmer CG, Klugman D, English AW (1997) Anatomical partitioning and nerve branching patterns in the adult rabbit masseter. *Acta Anat (Basel)* 159:222-232.
- Widmer CG, Carrasco DI, English AW (2003) Differential activation of neuromuscular compartments in the rabbit masseter muscle during different oral behaviors. *Exp Brain Res* 150:297-307.
- Winberg ML, Perez SE, Steller H (1992) Generation and early differentiation of glial cells in the first optic ganglion of *Drosophila melanogaster*. *Development* 115:903-911.
- Witts EC, Panetta KM, Miles GB (2012) Glial-derived adenosine modulates spinal motor networks in mice. *J Neurophysiol* 107:1925-1934.
- Xiu J, Nordberg A, Zhang JT, Guan ZZ (2005) Expression of nicotinic receptors on primary cultures of rat astrocytes and up-regulation of the alpha7, alpha4 and beta2 subunits in response to nanomolar concentrations of the beta-amyloid peptide(1-42). *Neurochem Int* 47:281-290.
- Yang Y, Vidensky S, Jin L, Jie C, Lorenzini I, Frankl M, Rothstein JD (2011) Molecular comparison of GLT1+ and ALDH1L1+ astrocytes in vivo in astroglial reporter mice. *Glia* 59:200-207.
- Yoshida A, Taki I, Chang Z, Iida C, Haque T, Tomita A, Seki S, Yamamoto S, Masuda Y, Moritani M, Shigenaga Y (2009) Corticofugal projections to trigeminal motoneurons innervating antagonistic jaw muscles in rats as demonstrated by anterograde and retrograde tract tracing. *J Comp Neurol* 514:368-386.
- Zhang S, Wu M, Peng C, Zhao G, Gu R (2017) GFAP expression in injured astrocytes in rats. *Exp Ther Med* 14:1905-1908.
- Zhang X, Zou T, Liu Y, Qi Y (2006) The gating effect of calmodulin and calcium on the connexin50 hemichannel. *Biol Chem* 387:595-601.
- Zhang Y, Chen K, Sloan SA, Bennett ML, Scholze AR, O'Keefe S, Phatnani HP, Guarnieri P, Caneda C, Ruderisch N, Deng S, Liddelow SA, Zhang C, Daneman R, Maniatis T, Barres BA, Wu JQ (2014) An

RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J Neurosci* 34:11929-11947.