



HAL
open science

Etude de la fonction et des mécanismes du wind-up des neurones nociceptifs trigéminaux chez le rat: rôle des récepteurs NMDA et des récepteurs NK1

Jérôme Coste

► **To cite this version:**

Jérôme Coste. Etude de la fonction et des mécanismes du wind-up des neurones nociceptifs trigéminaux chez le rat: rôle des récepteurs NMDA et des récepteurs NK1. Neurosciences [q-bio.NC]. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2006. Français. NNT : 2006CLF1D038 . tel-00984593

HAL Id: tel-00984593

<https://theses.hal.science/tel-00984593v1>

Submitted on 28 Apr 2014

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

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

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

THESE

**Présentée à l'Université d'Auvergne
Pour obtenir le grade de**

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité : Neurosciences

**Présentée et soutenue publiquement le 19 décembre 2006
par**

Jérôme COSTE

**ETUDE DE LA FONCTION ET DES MECANISMES DU WIND-UP DES NEURONES
NOCICEPTIFS TRIGEMINAUX CHEZ LE RAT: ROLE DES RECEPTEURS NMDA
ET DES RECEPTEURS NK1**

Directeur de thèse : Professeur Philippe LUCCARINI

JURY

**Monsieur le Professeur Yves BOUCHER, Rapporteur
Monsieur le Professeur Radhouane DALLEL
Monsieur le Professeur Claude DUBRAY
Monsieur le Professeur Marc LANDRY, Rapporteur
Monsieur le Professeur Philippe LUCCARINI, Directeur de thèse**

REMERCIEMENTS

Je dédie ce travail à la mémoire de Rodolphe Weber.

Aux membres du jury

Monsieur Yves Boucher

Docteur en chirurgie dentaire,
Professeur d'Université
Laboratoire de Physiologie de la Manducation
Université Paris VII

Monsieur Claude Dubray

Docteur en médecine,
Professeur d'Université
Centre d'Investigation Clinique de Clermont Ferrand CIC501
INSERM U766
Pharmacologie Fondamentale et Clinique de la Douleur
Université Clermont 1

Monsieur Radhouane Dallel

Docteur en chirurgie dentaire,
Professeur d'Université
INSERM E216
Neurobiologie de la Douleur Trigéminal
Université Clermont 1

Monsieur Marc Landry

Professeur d'Université
INSERM E358
Physiopathologie des Réseaux Neuronaux Médullaires
Université Bordeaux 2

Monsieur Philippe Luccarini

Professeur d'Université
INSERM 0216
Neurobiologie de la Douleur Trigéminal
Université Clermont 1

Me sentant très honoré de votre présence et extrêmement reconnaissant d'avoir accepté de juger mon travail, je tiens à vous exprimer mes sincères remerciements

Etude de la fonction et des mécanismes du wind-up des neurones nociceptifs trigéminaux chez le rat: rôle des récepteurs NMDA et des récepteurs NK1

SOMMAIRE

ABREVIATIONS.....	4
INTRODUCTION.....	5
I- Le complexe sensitif du trijumeau et ses afférences.....	8
1. Le noyau principal (Pr5).....	9
2. Le noyau spinal.....	10
A. Le sous-noyau oral (Sp5O).....	10
B. Le sous-noyau interpolaire (Sp5I).....	10
C. Le sous-noyau caudal (Sp5C).....	11
3. Les afférences trigéminales.....	11
II-La nociception trigéminal.....	12
1. Implication du Sp5C.....	12
2. Implication du Sp5O.....	14
A. Les données cliniques et expérimentales.....	14
B. Les fibres afférentes primaires du Sp5O.....	15
C. Caractéristiques des neurones du Sp5O.....	16
D. Efférences du Sp5O.....	21
E. Connexions intratrigéminales.....	21
III- Le CST, un modèle d'étude des mécanismes segmentaires d'intégration de l'information nociceptive.....	22
IV-Le wind-up.....	23
1. Définition.....	23
2. Enregistrement du wind-up chez l'animal.....	23
A. Enregistrements extracellulaires in vivo.....	23
B. Enregistrements intracellulaires.....	24
C. Potentiels de champs.....	24
D. Réflexes spinaux.....	24
E. Enregistrements in vitro.....	24
3. Le wind-up et le CST.....	25
4. La signification du wind-up.....	25
A. Le wind-up comme mécanisme d'amplification.....	26
B. Le wind-up et la sensibilisation centrale.....	26
C. Le wind-up et l'hyperalgésie secondaire.....	27
D. D'un phénomène expérimental à une perception chez l'homme.....	27
IV- Les récepteurs opioïdes et la modulation du wind-up.....	28
V- Les récepteurs NMDA et la modulation du wind-up.....	29
1. Les acides aminés excitateurs (AAE).....	29
2. Le récepteur NMDA.....	30
A. Structure et distribution.....	30
B. Propriétés.....	31
3. Les rNMDA et la douleur.....	32
4. Les rNMDA et le wind-up.....	32
VI- Les récepteurs NK1 et la modulation du wind-up.....	34
1. Les neurokinines et la substance P.....	34
2. Les récepteurs.....	34
A. Distribution du rNK1.....	34

B. Structure et propriétés	35
3. Les rNK1 et la douleur	35
4. Les rNK1 et le wind-up	36
MATERIEL ET METHODES	38
I- Electrophysiologie	38
1. Préparation chirurgicale.....	38
A. Animaux	38
B. Anesthésie	38
C. Chirurgie	38
D. Contrôle de l'état physiologique de l'animal.....	39
2. Enregistrements	39
A. Microélectrodes d'enregistrement	39
B. Sites d'enregistrement.....	39
C. Traitement du signal	40
3. Stimulations périphériques	40
4. Micro-injections	41
5. Analyse histologique des sites d'enregistrement et de micro-injection	43
6. Traitement des données et analyse statistique	43
II- Traçage rétrograde et immunocytochimie.....	43
1. Traçage rétrograde et immunocytochimie Fos	43
2. Traçage rétrograde et marquage des rNK1	44
3. Montage des coupes et analyse.....	45
RESULTATS	46
I- Caractéristiques du wind-up des neurones WDR.....	46
1. Propriétés générales des neurones WDR du Sp5O.....	46
2. Influence de l'intensité de stimulation sur le wind-up	47
3. Le wind-up augmente transitoirement l'excitabilité des neurones WDR.....	50
4. Discussion.....	52
II- Role des rNMDA dans la modulation du wind-up.....	54
1. Voies d'activation des neurones WDR par les fibres C	54
2. Les rNMDA situés dans le Sp5O sont impliqués dans le phénomène de wind-up	56
3. L'activation des rNMDA dans le Sp5C diminue le wind-up des neurones du Sp5O	59
4. Discussion.....	63
III- Les rNK1 dans la modulation du wind-up	66
1. Le wind-up est dépendant des récepteurs NK1	66
2. Une population d'interneurones exprimant le rNK1 connectent le Sp5C au Sp5O	67
A. Approche neuroanatomique.....	67
B. Modulation du wind-up des neurones du Sp5O par des interneurones rNK1- dépendants localisés dans le Sp5C	71
3. Discussion.....	73
CONCLUSION GENERALE	76
BIBLIOGRAPHIE	78
PUBLICATIONS DE THESE	104

FIGURES

Figure 1	Représentation du complexe sensitif du trijumeau (CST).	9
Figure 2	Lamination du Sp5C chez le rat.	11
Figure 3	Réponse d'un neurone WDR du Sp5O à des stimulations mécaniques d'intensité croissante de son champ récepteur.	18
Figure 4	Exemple de l'effet inhibiteur d'une stimulation nociceptive thermique (48°C) d'une patte postérieure sur la réponse d'un neurone WDR du Sp5O, accompagné d'une augmentation transitoire de la pression artérielle moyenne.	20
Figure 5	Une stimulation hétérotopique nociceptive thermique chaude (48°C) diminue la réponse C des neurones WDR du Sp5O et augmente la pression artérielle moyenne.	48
Figure 6	Exemple individuel illustrant les variations des réponses neuronales et cardiovasculaires lors de l'application répétitive de stimulations électriques nociceptives.	49
Figure 7	Influence de l'intensité et de la fréquence de stimulation sur le wind-up des neurones WDR du Sp5O.	52
Figure 8	Le wind-up augmente transitoirement l'excitabilité des neurones WDR du Sp5O.	56
Figure 9	Voies d'activation des neurones WDR par les fibres C.	56
Figure 10	Les neurones WDR du Sp5O présentent un wind-up en réponse à des stimulations nociceptives répétitives des fibres C.	58
Figure 11	Le wind-up des neurones WDR du Sp5O dépend des rNMDA situés localement.	59
Figure 12	Les rNMDA du Sp5O sont impliqués dans le wind-up des neurones WDR du Sp5O.	61
Figure 13	Le wind-up des neurones WDR du Sp5O est diminué par activation des rNMDA situés dans les couches superficielles du Sp5C.	62
Figure 14	L'activation des rNMDA localisés dans les couches superficielles du Sp5C inhibe le wind-up des neurones WDR du Sp5O.	63
Figure 15	Des injections intraveineuses de l'antagoniste des rNK1 SR140333 diminuent le phénomène de wind-up des neurones WDR du Sp5O de façon dose dépendante.	69
Figure 16	Une population d'interneurones qui connectent le Sp5C au Sp5O exprime le récepteur NK1.	70
Figure 17	L'internalisation des rNK1 dans les interneurones connectant le Sp5C au Sp5O à la suite d'une stimulation nociceptive.	71
Figure 18	La micro-injection d'antagonistes des rNK1 dans le Sp5C diminue transitoirement le phénomène de wind-up des neurones WDR du Sp5O.	73
Illustration	Microélectrode d'enregistrement couplée à une micropipette d'injection graduée.	43
Schéma de synthèse	Modèle trigéminal figurant la modulation rNK1 et rNMDA dépendante de l'activité nociceptive des neurones WDR du Sp5O.	79

ABREVIATIONS

V	nerf trijumeau
V1	branche ophtalmique du nerf trijumeau
V2	branche maxillaire du nerf trijumeau
V3	branche mandibulaire du nerf trijumeau
VII	nerf facial
IX	nerf glosso-pharyngien
X	nerf vague
CST	complexe sensitif du trijumeau
Pr	noyau principal du complexe sensitif du trijumeau
Sp5O	sous-noyaux: oral du noyau spinal du complexe sensitif du trijumeau
Sp5I	sous-noyaux: interpolaire du noyau spinal du complexe sensitif du trijumeau
Sp5C	sous-noyaux: caudal du noyau spinal du complexe sensitif du trijumeau
Me5	noyau mésencéphalique
Mo5	noyau moteur du trijumeau
PAG	substance grise périaqueducule
SRD	subnucleus reticularis dorsalis
NS	neurones nociceptifs spécifiques
WDR	neurones à convergence (<i>wide dynamic range</i>)
APV	<i>DL-2-amino-5-phosphonovaleric acid</i>
CGRP	<i>calcitonin gene related peptide</i>
DAG	diacyl-glycérol
FRAP	<i>fluoride resistant acid phosphatase</i>
IP3	inositol 1,4,5-tri-phosphate
MK-801	(5S,10R)-(-)-5-méthyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo(a,d)-cyclohepten-5,10-imine
PKC	protéine kinase C
rNK1	récepteurs à la substance P de type NK1
rNMDA	récepteurs ionotropiques sensibles au N-méthyl-D-aspartate
RP67580	7,7-diphényl-2 [1-imino-2 (2-méthoxy-phényl)-éthyl] perhydroisoindol-4-one (3 aR, 7 aR)
SP-SAP	substance P conjuguée à une cytokine, la saporine
SR140333	((S)-1-{2-[3-(3,4-dichlorophényl)-1(3-isopropoxyphénylacétyl)piperidin-3-yl]éthyl}-4-phényl-1 azaniabicyclo [2.2.2]octane

IASP *International Association for the Study of Pain*

INTRODUCTION

La douleur est définie, d'après l'*International Association for the Study of Pain* (IASP), comme « une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable liée à une lésion tissulaire existante ou potentielle ou décrite en terme d'une telle lésion ». Cette définition exprime les différentes composantes de la perception et de l'expression de la douleur face à une même stimulation nociceptive. Les aspects psychologiques, culturels et sociaux de la perception et de l'expression de la douleur rendent complexe l'évaluation de son impact à l'échelle des populations. Cependant, d'un enjeu économique indéniable, la douleur fait l'objet de plans de lutte et de nombreuses recherches.

La douleur peut être un phénomène aigu ou devenir chronique. Les douleurs chroniques sont habituellement classées en douleurs nociceptives ou inflammatoires, et douleurs neuropathiques (Wall, 1999). Les premières résultent d'une lésion tissulaire associée à une inflammation, les secondes sont initiées ou causées par une lésion ou un dysfonctionnement du système nerveux. Plus récemment les douleurs chroniques d'origine cancéreuse ont été différenciées des douleurs inflammatoires, car leurs mécanismes moléculaires sont différents (Mantyh *et al.*, 2002).

Il existe néanmoins des stimuli nociceptifs, capables d'endommager un tissu sain. Ils sont détectés à la périphérie, au niveau des nocicepteurs, constitués des terminaisons libres de fibres de petit calibre, myélinisées (A δ) ou non (C). Bien que les fibres myélinisées de gros calibre de type A β ne répondent pas aux stimuli nociceptifs, elles sont nécessaires pour percevoir normalement la douleur. En leur absence, toute douleur est ressentie indistinctement comme une sensation cuisante (Basbaum & Jessell, 2000).

Les terminaisons centrales de ces fibres aboutissent au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière, ou son équivalent dans le tronc cérébral pour les fibres trigéminales. La corne dorsale possède une structure laminaire. Les cellules nerveuses qui répondent aux stimuli nociceptifs sont principalement localisées au niveau des couches I, II et V. Certains neurones répondent de façon spécifique aux stimulations nociceptives, d'autres répondent également à des stimulations indolores : on les appelle neurones à convergence ou *wide dynamic range* (WDR). Ils sont surtout localisés au niveau de la couche V (Basbaum & Jessell, 2000).

A partir de la corne dorsale de la moelle épinière les messages nociceptifs sont transmis vers le cortex cérébral, l'amygdale, ou l'hypothalamus, par l'intermédiaire de relais situés dans le thalamus, la formation réticulée bulbaire, le noyau parabrachial ou le noyau du

faisceau solitaire. Toutes ces structures participent à l'intégration des différents « visages » de la douleur : sensori-discriminatif, moteur, végétatif, émotionnel (Basbaum & Jessell, 2000).

Il est cependant important de noter que la douleur ne résulte pas du transfert passif d'une information nociceptive détectée à la périphérie et véhiculée jusqu'à d'éventuels centres de la douleur, mais d'un traitement actif de l'information par les systèmes nerveux périphérique et central. Ainsi, à tous les niveaux, le message nociceptif est modulé, amplifié ou inhibé en fonction de la situation physiologique, émotionnelle, cognitive du sujet et des autres messages sensoriels qu'il reçoit. Les mécanismes de contrôle du message douloureux existent dès l'étage segmentaire, comme par exemple le mécanisme du gate-control, ou émanent de structures suprasegmentaires (Millan, 2002).

Enfin, la sensibilité nociceptive peut évoluer de façon complexe dans le temps en fonction de la durée ou de la répétition éventuelle de la stimulation. Cette évolution traduit la mise en jeu de phénomènes de sensibilisation, qui concernent le système nerveux périphérique comme le système nerveux central (Woolf & Salter, 2000). Ils peuvent conduire dans un délai bref à des douleurs exagérées.

Progrès et questions soulevées par la recherche sur la douleur

Au cours de ces dernières années, des progrès remarquables ont été accomplis dans le domaine de la recherche fondamentale sur la douleur, de l'échelon moléculaire à la maladie. Rappelons brièvement les faits les plus marquants. Au niveau des nocicepteurs, les mécanismes de la transduction thermique ont été en partie élucidés grâce aux approches de la biologie moléculaire, le rôle des canaux sodiques des fibres périphériques dans la douleur chronique souligné, ainsi que celui de récepteurs ioniques (à l'ATP) et des facteurs neurotrophiques (Levine, 1998); les systèmes de second messagers impliqués dans l'inflammation ont été identifiés (Woolf & Salter, 2000). Au niveau du premier relais sensoriel se produisent des phénomènes complexes de plasticité fonctionnelle, qui se traduisent par une modification de l'excitabilité des neurones nociceptifs de second ordre des cornes dorsales (Woolf & Salter, 2000). Les mécanismes synaptiques de cette plasticité (Woolf & Salter, 2000), les voies de signalisation intracellulaires impliquées (Woolf & Salter, 2000) et le rôle des propriétés intrinsèques des neurones post-synaptiques (Woolf & Salter, 2000) ont été en partie révélés. A tous les niveaux, les systèmes de modulation exercent une action fondamentale. Les études en imagerie cérébrale ont permis de dévoiler la complexité des mécanismes suprasegmentaires dans le traitement de l'information douloureuse (Millan,

2002) et l'importance des contrôles descendants exercés par le cerveau (Millan, 2002). L'intérêt de la recherche sur la douleur se porte également sur l'influence du terrain génétique (Mogil *et al.*, 2000), du milieu hormonal (Marcus, 2002) et du sexe (Berkley *et al.*, 2006).

Sur le plan de la recherche clinique, les avancées ont été moins nombreuses : elles concernent en premier lieu l'amélioration de la prise en charge des patients (prescription d'antalgiques en fonction d'une échelle analgésique, utilisation de moyens non-pharmacologiques). Mais un nombre relativement important de malades douloureux chroniques demeurent insuffisamment soulagés, malgré l'emploi optimal de traitements antalgiques. Et il est peu probable que de nouvelles découvertes pharmacologiques dévoilent l'existence d'une nouvelle molécule « magique » (Besson, 1999). La deuxième avancée a donc été de constater que le choix thérapeutique en matière de douleur doit reposer sur l'analyse précise des mécanismes physiopathologiques qui sous-tendent le syndrome douloureux. En effet, la principale cause des échecs tient aux difficultés à établir un diagnostic précis des mécanismes à l'origine de la douleur (Scholz & Woolf, 2002). Ainsi, sont souvent pris en compte les seuls critères étiologiques ou symptomatiques. Or une pathologie peut donner lieu à différents symptômes par l'intermédiaire de différents mécanismes et un même symptôme douloureux peut dépendre de plusieurs mécanismes. Des symptômes différents peuvent être également sous-tendus par le même mécanisme. Il est donc nécessaire d'utiliser devant ces douleurs réfractaires des outils qui permettront le diagnostic des mécanismes : analyse précise de la symptomatologie avec évaluation sensorielle quantitative de toutes les modalités ; identification des tissus (cutané, musculaire ou viscéral) en souffrance ; utilisation éventuelle de tests pharmacologiques comme outils diagnostiques. Aucun modèle animal ne reproduit avec fidélité la pathologie humaine. Mais on peut supposer que quelques uns des mécanismes élémentaires observés sur les modèles animaux sont à l'œuvre quand un être humain souffre. Malgré la complexité des données fondamentales, toujours plus nombreuses, on peut donc espérer que des progrès thérapeutiques suivront notre meilleure compréhension des mécanismes de la douleur.

Les douleurs orofaciales

Parmi les douleurs aiguës ou chroniques les plus communément rencontrées, on retrouve les douleurs dentaires et plus largement celles de la sphère orofaciale. En 1989, des études évaluèrent que 12% des adultes américains interrogés avaient ressenti une douleur dentaire dans les six mois précédents l'enquête du National Health Interview Survey (Lipton *et al.*, 1993; Carlsson & LeResche, 1995).

Alors que des progrès remarquables ont été effectués dans la compréhension des mécanismes médullaires de la douleur, les modes de contrôle et de transmission des informations nociceptives dans les structures trigéminales du tronc cérébral restent à découvrir. Les raisons d'étudier la physiologie de la nociception trigéminal sont donc spécifiques, mais le système trigéminal représente aussi un modèle intéressant pour l'étude de la douleur en général. Plusieurs indices soulignent l'importance de la somesthésie orale et péri-orale dans l'économie générale de l'individu. En effet, la densité des récepteurs est plus grande au niveau des lèvres ou de la langue que partout ailleurs dans le corps (Dubner, 1978). De même, l'étendue de la représentation thalamique ou corticale et les implications comportementales et psychologiques de la sphère oro-faciale sont plus importantes que celles des autres régions corporelles (Light *et al.*, 1992; Sessle, 2000). De plus, certaines particularités anatomiques et fonctionnelles distinguent les systèmes trigéminal et spinal. Le trijumeau possède par exemple des structures spécialisées, la pulpe dentaire, la cornée ou les méninges, qui sont essentiellement innervées par des fibres fines myélinisées ou amyéliniques. La stimulation de ces tissus permet donc de recruter un groupe homogène de fibres afférentes. La douleur est généralement considérée comme la seule sensation évoquée par la stimulation de ces tissus.

I- Le complexe sensitif du trijumeau et ses afférences

La sensibilité somatique de la face et des cavités nasales et buccale est assurée pour l'essentiel par les trois branches du nerf trijumeau (V): les branches ophtalmique (V1), maxillaire (V2) et mandibulaire (V3). La cavité buccale étant innervée dans sa moitié supérieure par le nerf V2 et dans sa moitié inférieure par le nerf V3. Le nerf V innerve également les cavités nasales, les sinus frontaux et maxillaires et une partie des méninges céphaliques. Quelques afférences somesthésiques générales des nerfs facial (VII), glossopharyngien (IX) et vague (X) participent à l'innervation d'une petite région cutanée centrée sur le pavillon de l'oreille et du fond de la cavité buccale. Les fibres nerveuses issues de l'ensemble de ces régions cutanéomuqueuses se projettent sur le complexe sensitif du trijumeau (CST). Il constitue le premier relais du système nerveux central pour les informations somesthésiques oro-faciales. Ce noyau sensitif s'étend à travers le tronc cérébral, des premiers segments cervicaux de la moelle jusqu'à la limite caudale du mésencéphale. Il a

été divisé en deux noyaux : rostralement, le noyau principal et caudalement, le noyau spinal (figure 1) (Waite & Tracey, 1995).

1. Le noyau principal (Pr5)

Dans le plan transversal, le noyau principal est réniforme dans sa partie médiane, le noyau moteur du trijumeau (Mo5) s'inscrivant dans sa concavité. Il est bordé latéralement par les racines ascendante et descendante du trijumeau. Caudalement, il forme une limite oblique avec le sous-noyau oral. Il est généralement considéré comme l'homologue trigéminal des noyaux cunéiforme et gracile.

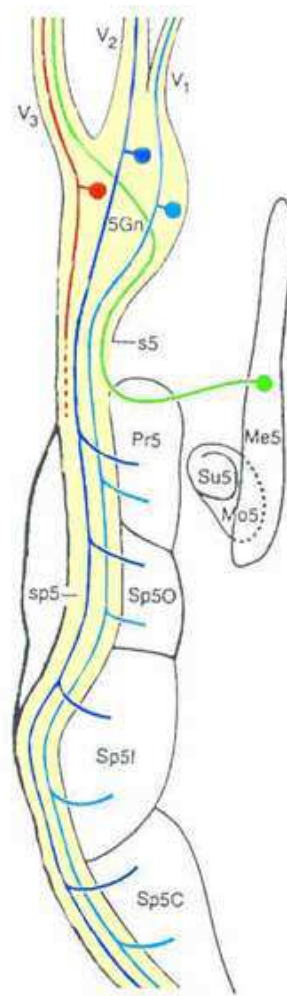


Figure 1

Représentation du complexe sensitif du trijumeau (CST).

Les protoneurones afférents, dont le corps cellulaire est situé dans le ganglion de Gasser (5Gn) dirigent leurs fibres vers le CST. Après avoir cheminé dans le tract (sp5), celles ci rejoignent le noyau principal et les trois sous unités du noyau spinal : les sous-noyaux oral (Sp5O), interpolaire (Sp5I) et caudal (Sp5C). Les noyaux moteur (Mo5) et mésencéphalique (Me5) du trijumeau sont représentés. D'après Waite & Tracey (1995).

2. Le noyau spinal

Il prolonge rostralement la corne dorsale de la moelle épinière, traverse toute la hauteur du bulbe et pénètre dans le tiers inférieur du Pont de Varole. Il fait suite caudalement au noyau principal (figure 1). Le noyau spinal a été subdivisé chez l'homme et le singe en trois sous-noyaux: oral (**Sp5O**), interpolaire (**Sp5I**) et caudal (**Sp5C**) (Olszewski, 1950). Cette nomenclature a été reprise notamment chez le rat (Torvik, 1956). D'autres terminologies ont été proposées pour décrire ce noyau chez le lapin (Meessen & Olszewski, 1966) et le chat (Eisenman *et al.*, 1963; Berman, 1968). La terminologie d'Olszewski pour le noyau spinal sera préférée : elle est d'une part plus commune et, de plus, elle individualise anatomiquement des structures qui ont été distinguées physiologiquement.

A. Le sous-noyau oral (Sp5O)

Le Sp5O constitue la division la plus rostrale du noyau spinal du complexe sensitif du trijumeau. Il s'étend à peu près sur toute la hauteur du noyau moteur du facial. Il peut être aisément distingué du Pr5 par la présence des faisceaux intranucléaires, les *deep bundles* de Gobel et Purvis (Gobel & Purvis, 1972) qui s'étendent rostro-caudalement à travers lui. D'un point de vue histologique, le Sp5O est d'une relative homogénéité dans la forme et l'organisation des types cellulaires. Toutefois, si la majorité des neurones ont un périkaryon de taille petite à moyenne (10-30 µm), il existe chez le rat des neurones de grande taille (> 30µm), situés dans la partie ventrale et caudale du Sp5O (Bates & Killackey, 1985; Falls *et al.*, 1985; Ide & Killackey, 1985). Le Sp5O se distingue des autres sous-noyaux par une plus faible densité de neurones, et, de façon générale, l'augmentation de la densité neuronale et la disparition des neurones de grande taille marquent caudalement la fin du Sp5O.

B. Le sous-noyau interpolaire (Sp5I)

Grossièrement semi-circulaire dans un plan frontal, il est bordé latéralement par la racine descendante du trijumeau et médialement par la formation réticulée parvocellulaire. L'extension rostrocaudale du Sp5I correspond environ à celle de l'olive inférieure.

Il est généralement décrit comme la structure la plus homogène du CST (Olszewski, 1950; Brodal *et al.*, 1956; Berman, 1968) bien qu'une étude anatomique (Phelan & Falls, 1989) ait mis en évidence l'existence de six régions cytoarchitectoniquement différentes à l'intérieur de ce noyau.

C. Le sous-noyau caudal (Sp5C)

Il prolonge rostralement, sans interruption, la corne dorsale de la moelle. Sa limite caudale se situe entre les segments cervicaux C2 et C3 de la moelle chez le rat.

Il présente une lamination en trois zones (figure 2) :

- la zone marginale [*pars marginalis*], la plus externe, est située au contact de la racine descendante et prolonge la couche I de Rexed de la corne dorsale de la moelle (Torvik, 1956; Darian-Smith, 1966; Kerr, 1970; Bates & Killackey, 1985).

- la substance gélatineuse [*pars ou substantia gelatinosa*] prolonge rostralement la substance gélatineuse de Rolando. Elle est identifiée selon les auteurs, soit à la couche II, soit aux couches II et III de Rexed (Kerr, 1970).

- la zone magnocellulaire [*pars magnocellularis, nucleus proprius*] forme le corps du Sp5C. C'est une structure à peu près homogène bien qu'il semble que les neurones de la partie profonde soient de plus grande taille et plus isolés. Elle correspondrait aux couches IV et V de Rexed (Fukushima & Kerr, 1979). Ses limites médiales avec la formation réticulée parvocellulaire sont indistinctes.

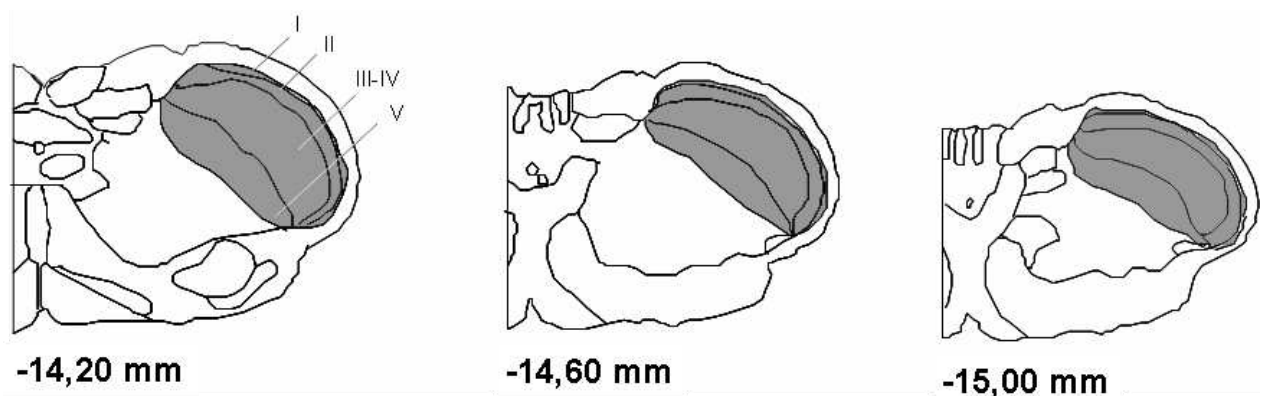


Figure 2

Lamination du Sp5C chez le rat.

Les couches I, II, III-IV et V sont représentées à trois niveaux du Sp5C sur des coupes frontales chez le rat. La distance de la coupe au Bregma est indiquée.

3. Les afférences trigéminales

Les deux racines, motrice et sensitive, du nerf trijumeau pénètrent dans le tronc cérébral dans la partie moyenne du Pont de Varole : la racine motrice est médiale alors que la racine sensitive, de plus grande taille, est latérale. Les corps cellulaires des afférences primaires trigéminales sont localisés dans le ganglion de Gasser ou dans le noyau

mésencéphalique (Me5). La racine sensitive se dirige en direction du Pr5 et se sépare en une racine ascendante (qui se rend au Pr5) et une racine descendante (appelée tractus spinal) qui fusionne avec le faisceau de Lissauer au niveau du pôle caudal du bulbe. Le tractus spinal émet des collatérales médialement, en direction du noyau spinal (figure 1).

Il existe une différence dans le mode de projection des afférences primaires au niveau du CST selon la nature des tissus :

- les fibres musculaires de gros diamètre (groupes I et II) ont leurs corps cellulaires situés dans le Me5 et se projettent principalement au Pr5, au Sp5O et au Sp5I (Shigenaga *et al.*, 1988; Capra & Wax, 1989; Dessem & Luo, 1999).

- les fibres musculaires (groupe III) (Nishimori *et al.*, 1986) ainsi que les fibres A δ méningées (Bove & Moskowitz, 1997) ont leurs corps cellulaires dans du ganglion de Gasser, et se projettent majoritairement au niveau du Sp5C.

- les fibres cutanées A β de gros diamètre ont leurs corps cellulaires situés dans le ganglion de Gasser et se projettent sur l'ensemble du CST (Shortland *et al.*, 1995).

- les fibres cutanées A δ ont, elles aussi, leurs corps cellulaires dans le ganglion de Gasser et se projettent sur les trois sous-noyaux du noyau spinal (Hayashi, 1982; Falls, 1988).

- les fibres afférentes amyéliniques, quelles que soient leurs origines, ont leurs corps cellulaires dans le ganglion de Gasser, et se projettent principalement au niveau du Sp5C (Windle, 1926; Crissman *et al.*, 1996; Kobayashi & Matsumura, 1996). Cependant, les fibres cutanées se projettent essentiellement au niveau de la couche II, alors que les fibres nerveuses des tissus profonds se projettent au niveau des couches I et V (Nishimori *et al.*, 1986; Capra, 1987; Strassman *et al.*, 1994; Burstein *et al.*, 1998).

II-La nociception trigéminal

1. Implication du Sp5C

Les premières données concernant la nociception trigéminal ont été fournies par la clinique neurologique et neurochirurgicale. En 1923, Margaret E. Gerard décrit chez 39 cas cliniques victimes d'une occlusion de l'artère cérébelleuse postéro-inférieure, une forte diminution ou une abolition de la sensibilité thermique et douloureuse sur tout le territoire d'innervation trigéminal du côté atteint par l'ischémie alors que la sensibilité tactile était préservée. L'examen post mortem effectué sur 12 des 39 cas révéla une destruction du Sp5C avec préservation du Pr5 (Gerard, 1923). L'extension caudale de la lésion est également bien

marquée par les troubles consécutifs à la lésion des noyaux moteurs des nerfs crâniens: troubles de la position de la tête, paralysie des muscles du pharynx, du larynx et de la langue qui traduisent l'atteinte des noyaux moteurs des IX, X, XII^{èmes} nerfs crâniens. Ces déficits contrastent avec le respect des fonctions assurées par les muscles masticateurs; le noyau moteur du trijumeau qui les commande étant situé au niveau du noyau principal.

Ces observations, retrouvées dans des pathologies comme la sclérose en plaque ou la syringomyélie (Smyth, 1939), ont appuyé la théorie selon laquelle le Sp5C est essentiel pour les sensations thermiques et algiques et le Pr5 pour les sensations tactiles (Spiller, 1915; Winkler, 1915).

La désafférentation du Sp5C par section ou coagulation du tractus spinal du trijumeau (tractotomie) entraîne à elle seule une thermo-analgésie de la face tout en préservant la sensibilité tactile (Sjöqvist, 1938). Ce fait expérimental, confirmé à de nombreuses reprises, a permis d'imputer au seul Sp5C la responsabilité de la sensibilité thermoalgique de la face, préalablement attribuée à l'ensemble du noyau spinal. Ainsi chez l'homme, l'observation de lésions pathologiques et chirurgicales montre que le respect du Pr5 suffit à préserver l'essentiel de la sensibilité tactile de la face, et que le Sp5C est indispensable à l'existence de sensations douloureuses d'origine faciale.

Des enregistrements électrophysiologiques du Sp5C ont révélé l'existence de neurones répondant à la stimulation nociceptive de la sphère oro-faciale (dents, méninges, cornée et revêtement cutanéomuqueux oro-facial) chez le chat (Nord, 1976; Dickenson *et al.*, 1981; Azerad *et al.*, 1982; Amano *et al.*, 1986; Sessle *et al.*, 1986), le rat (Dickenson *et al.*, 1981; Meng *et al.*, 1997; Burstein *et al.*, 1998) et le singe (Gordon *et al.*, 1961; Price *et al.*, 1976; Hoffman *et al.*, 1981; Bushnell *et al.*, 1984; Carstens *et al.*, 1998).

Les données neuro-anatomiques indiquent que beaucoup de ces neurones projettent directement sur des structures impliquées dans la nociception, comme le thalamus (Hu *et al.*, 1981; Li *et al.*, 1999a), ou l'aire parabrachiale (Slugg & Light, 1994; Wang *et al.*, 1994; Feil & Herbert, 1995; Allen *et al.*, 1996).

Pour ces différentes raisons, le Sp5C a été considéré comme la prolongation rostrale de la corne dorsale de la moelle (Gobel *et al.*, 1981; Hoffman *et al.*, 1981; Hu *et al.*, 1981). Ainsi, l'organisation anatomo-fonctionnelle du Sp5C apparaissait comme analogue à celle de la corne dorsale de la moelle ce qui renforçait l'hypothèse élaborée à partir des résultats obtenus chez l'homme.

2. Implication du Sp5O

A. Les données cliniques et expérimentales

Certaines observations réalisées chez l'homme et l'animal suggèrent que la partie rostrale du CST est également impliquée dans les mécanismes de la douleur trigéminal. Lors d'anciennes études cliniques, la cavité buccale semblait échapper souvent à l'analgésie produite par la tractotomie (Grant *et al.*, 1940; Weinberger & Grant, 1942), (Hamby *et al.*, 1948; Grant, 1955; McKenzie, 1955). Ces observations étaient également retrouvées en expérimentation animale. En effet, après tractotomie au niveau de l'obex, les réponses réflexes ou comportementales induites par des stimulations nociceptives dentaires (Ikegami & Kawamura, 1979; Young *et al.*, 1981; Dallel *et al.*, 1989; Dallel *et al.*, 1990), buccales ou péri-buccales étaient toujours observées (Young & Perryman, 1984; Broton & Rosenfeld, 1985; Young & Perryman, 1986).

Inversement, deux cas de patients présentant des lésions pontiques impliquant le Sp5O et le Sp5I ont présenté une diminution marquée des sensations douloureuses et thermiques ipsilatérales intraorales avec préservation plus ou moins complète des sensations faciales (Graham *et al.*, 1988). Chez l'animal, la destruction de la partie rostrale du complexe sensitif trigéminal, sans lésion de la racine descendante du trijumeau, provoque une élévation significative des seuils des réactions d'évitement en réponse à la stimulation électrique de la pulpe dentaire et dans une moindre mesure à la stimulation mécanique et électrique du revêtement cutané facial (Young & Perryman, 1984). La destruction du Pr5 et du Sp5O induit une analgésie irréversible de la partie rostrale de la face (Denny-Brown & Yanagisawa, 1973). Enfin, Rosenfeld et ses collaborateurs ont montré que la coagulation du Pr5 et du Sp5O (Rosenfeld *et al.*, 1978) ou la section des voies efférentes au Sp5O (Broton & Rosenfeld, 1985; Broton & Rosenfeld, 1986) réduisent de façon significative les réponses comportementales induites par des stimulations nociceptives thermiques des régions périorales.

Enfin, des neurones répondant à une stimulation nociceptive de la pulpe dentaire (Greenwood, 1973; Campbell *et al.*, 1984; Hu & Sessle, 1984), des régions cutanées buccales et péri-buccales (Eisenman *et al.*, 1963; Sessle & Greenwood, 1976; Azerad *et al.*, 1982; Young & Perryman, 1986), ont été enregistrés dans le Sp5O d'animaux anesthésiés ou après tractotomie. Ces observations ont été récemment confortées par une série d'études électrophysiologiques et pharmacologiques réalisées dans notre laboratoire montrant la

présence dans le Sp5O de nombreux neurones nociceptifs activés par la stimulation des tissus cutanés et muqueux de la région orofaciale (voir ci-dessous).

Ces différents résultats cliniques, comportementaux et électrophysiologiques suggèrent que la transmission des messages nociceptifs provenant des régions orales et péri-orales pourrait être assurée par des neurones localisés dans la partie rostrale du noyau spinal et remettent donc en cause l'exclusivité du rôle du Sp5C dans les voies de la nociception trigéminal.

B. Les fibres afférentes primaires du Sp5O

Comme nous l'avons indiqué précédemment, les neurones du Sp5O sont directement innervés par des fibres cutanées myélinisées du type A β (Capra & Dessem, 1992; Shortland *et al.*, 1995) et A δ (Hayashi, 1982; Falls, 1988; Lapa *et al.*, 1996), mais également par des fibres myélinisées musculaires des groupes I et II (Capra & Wax, 1989; Dessem & Luo, 1999). Le Sp5O reçoit la plus grande partie des afférences pulpaire essentiellement composées de fibres myélinisées fines de type A δ , comme cela a été montré chez le chat (Arvidsson & Gobel, 1981) puis le rat (Marfurt & Turner, 1984). En revanche, le Sp5O ne semble recevoir que peu ou pas de projection directe de fibres C (Young & King, 1973; Falls, 1988; Ambalavanar & Morris, 1992; Crissman *et al.*, 1996; Kobayashi & Matsumura, 1996). Les fibres afférentes amyéliniques C sont principalement divisées en deux contingents selon leur nature neurochimique : les premières, peptidergiques, contiennent des peptides comme la substance P ou le *calcitonin gene related peptide* (CGRP) (Sugimoto *et al.*, 1997b), les secondes, non peptidergiques, expriment un marqueur, la *fluoride resistant acid phosphatase* (FRAP), et sont également capables de se lier à une lectine, l'isolectine B4 (Sugimoto *et al.*, 1997a). Cependant, ces groupes, établis sur des critères neurochimiques, utilisent très probablement le glutamate comme neurotransmetteur principal et n'ont pas permis de mettre en évidence deux classes fonctionnelles de nocicepteurs (Julius & Basbaum, 2001). La présence de ces fibres a été rapportée essentiellement dans la partie dorsomédiane du Sp5O et latéralement à proximité du tractus spinal (Sugimoto *et al.*, 1997a; Sugimoto *et al.*, 1997b). Il faut toutefois signaler qu'une origine purement trigéminal de ces marquages n'est pas certaine car il a été montré que les nerfs crâniens VII (Whitehead & Frank, 1983; Hamilton & Norgren, 1984; Takemura *et al.*, 1998), IX et X (Altschuler *et al.*, 1989) envoient des projections dans la région dorsale du Sp5O. En outre, la rhizotomie trigéminal réduit partiellement l'expression de la substance P (Sugimoto *et al.*, 1997b). Il faut noter que le marquage situé dans la partie dorsomédiane du Sp5O, coïncide avec la localisation des

terminaisons des afférences pulpaire (Marfurt & Turner, 1984; Takemura *et al.*, 1991). Les données anatomiques et électrophysiologiques ont préalablement démontré que les fibres pulpaire sont majoritairement des fibres myélinisées de type A δ (Dickenson *et al.*, 1981; Jiffry, 1981; Engstrand *et al.*, 1983).

En revanche, de nombreux travaux ont montré la présence dans la partie dorsale du Sp5O d'un fort contingent de terminaisons à CGRP (Skofitsch & Jacobowitz, 1985; Kruger *et al.*, 1988; Tashiro *et al.*, 1991; Sugimoto *et al.*, 1997a). Ce marquage était fortement atténué après rhizotomie, confirmant l'origine trigéminale de ces fibres. Cependant, les résultats de ces études ne permettent pas de connaître exactement le type de fibres, car les données immuno-histochimiques ont montré que les fibres A δ et C expriment le CGRP (Levine *et al.*, 1993). Là aussi, la localisation des fibres à CGRP correspond au site de projection des fibres afférentes pulpaire.

C. Caractéristiques des neurones du Sp5O

Les données anatomiques ont montré que le Sp5O reçoit des afférences provenant principalement des tissus situés dans et autour de la cavité buccale, notamment des dents, du parodonte, de la langue, du palais, de la face interne des joues, des lèvres inférieure et supérieure, des vibrisses et des régions périnasales. Des afférences issues des tissus profonds tels que le masséter (Appenteng *et al.*, 1985; Shigenaga *et al.*, 1988; Arvidsson & Raappana, 1989; Capra & Wax, 1989; Dessem & Luo, 1999), les muscles extraoculaires (Alvarado-Mallart *et al.*, 1975; Durand *et al.*, 1983) et de l'articulation temporo-mandibulaire (Capra, 1987) ont été également décrites.

L'étude des réponses des neurones du Sp5O à des stimuli de différents types de leurs champs récepteurs, ont permis d'étudier leurs caractéristiques (Wall & Taub, 1962; Eisenman *et al.*, 1963; Khayyat *et al.*, 1975; Sessle & Greenwood, 1976; Azerad *et al.*, 1982; Cadden, 1982; Hu & Sessle, 1984; Young & Perryman, 1986). Plus récemment, dans une série d'études électrophysiologiques réalisée dans notre laboratoire, les propriétés électrophysiologiques de ces neurones ont été précisées et, pour la première fois, l'existence de neurones nociceptifs dans le Sp5O du rat a été montrée (Dallel *et al.*, 1990; Raboisson *et al.*, 1991; Hu *et al.*, 1992; Raboisson *et al.*, 1995).

Ces études montrent une organisation somatotopique dans le Sp5O : les afférences issues du territoire cutané du V3 se termineraient préférentiellement dans la partie dorsale du Sp5O, celles du V2 en position plus ventrale et enfin les quelques neurones à champ ophthalmique (V1) ont été localisés dans la partie la plus ventrale du noyau. La proportion des

neurones à champ innervé par le V3 est de 32%, par le V2 68% et par le V1 6%. Cette organisation confirme les résultats d'un grand nombre d'études anatomiques (Torvik, 1956; Kerr, 1963; Marfurt, 1981; Jacquin *et al.*, 1983; Nishimori *et al.*, 1986; Falls, 1988) et physiologiques (Wall & Taub, 1962; Eisenman *et al.*, 1963; Khayyat *et al.*, 1975; Sessle & Greenwood, 1976; Azerad *et al.*, 1982; Cadden, 1982; Hu & Sessle, 1984; Young & Perryman, 1986). Une distribution similaire apparaît également si l'on prend en considération, non pas la branche d'innervation mais la localisation du champ (intra-orale, peri-orale et faciale). Les neurones répondant à la stimulation des régions intra-orale apparaissent alors en position essentiellement dorsale, ceux des parties les plus périphériques de la face en position la plus ventrale, et ceux des régions péri-orales en position intermédiaire. L'analyse de la répartition topographique des champs récepteurs a révélé un point essentiel : environ 90% d'entre eux (toutes catégories de neurones confondues), étaient strictement localisés à l'intérieur des régions dites intra-orales et péri-orales, contre 4% au maximum dans la région faciale. Des neurones répondant à la stimulation des muscles masticateurs (Azerad *et al.*, 1982; Capra & Dessem, 1992) et des muscles extraoculaires (Manni *et al.*, 1971; Alvarado-Mallart *et al.*, 1975; Durand *et al.*, 1983) ont été également enregistrés dans le Sp5O.

Trois types de neurones ont été identifiés dans le Sp5O en fonction de leurs réponses à la stimulation mécanique de leur champ récepteur: neurones non-nociceptifs, neurones nociceptifs spécifiques (NS) et neurones nociceptifs non spécifiques ou WDR. Les neurones nociceptifs représentaient environ 17% de l'échantillon (Dallel *et al.*, 1990). La majorité des neurones nociceptifs du Sp5O ne présentent pas d'activité spontanée en l'absence de stimulus. Les neurones nociceptifs du Sp5O répondent aux stimulations nociceptives mécaniques, thermiques et chimiques (Dallel *et al.*, 1990; Raboisson *et al.*, 1991; Raboisson *et al.*, 1995). L'application de stimulations électriques percutanées a montré que ces neurones répondent lors de la mise en jeu des fibres myélinisées de type A, puis, pour des intensités de stimulation plus fortes, à celle des fibres amyéliniques C (figure 3A). De plus, ils codent de façon remarquable l'intensité des stimulations appliquées sur leur champ récepteur qu'elles soient non nociceptive ou nociceptive (figure 3B) (Dallel *et al.*, 1999). L'augmentation de pression artérielle moyenne est elle-même fonction de l'intensité de la stimulation.

Comme au niveau de la moelle, les réponses neuronales du Sp5O peuvent être modulées par différentes manipulations physiologiques et pharmacologiques. En effet, les réponses des neurones du Sp5O sont facilitées par l'administration d'une substance irritante (l'huile de moutarde) dans le masséter (Hu *et al.*, 1992), par une inflammation pulpaire

(Torneck *et al.*, 1996) ou par l'application de stimulations électriques répétitives (Parada *et al.*, 1997; Dallel *et al.*, 1999).

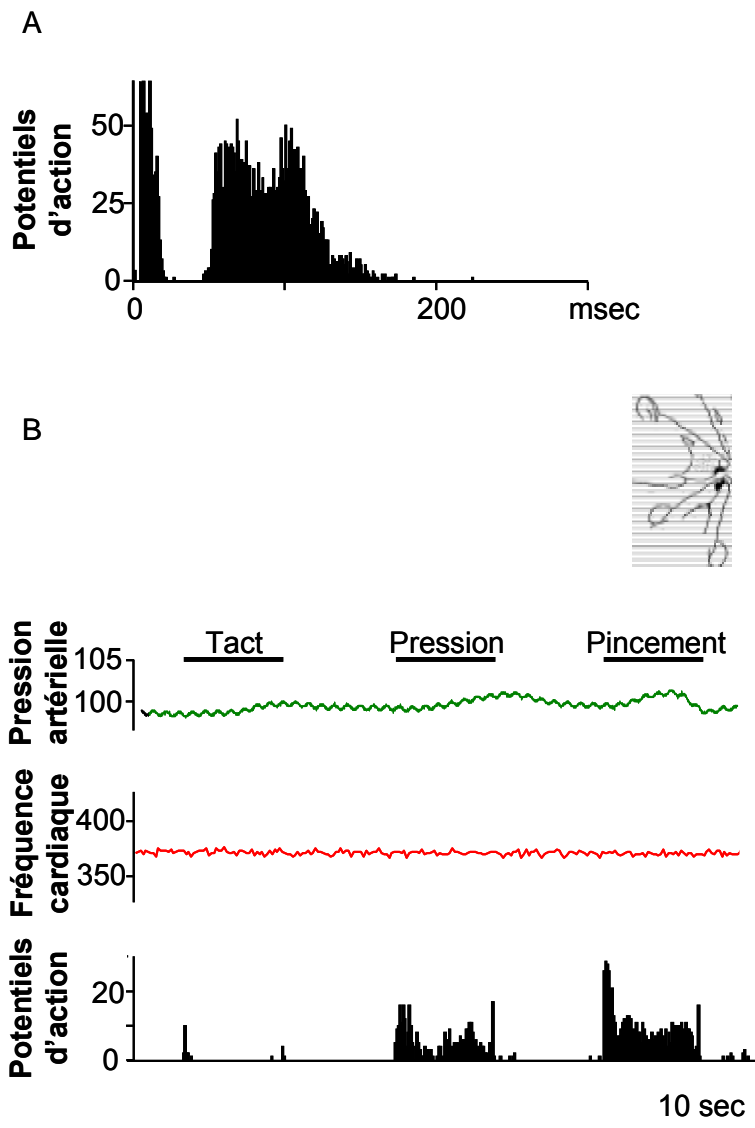


Figure 3

Réponse d'un neurone WDR du Sp50 à des stimulations mécaniques d'intensité croissante de son champ récepteur.

A. Exemple individuel montrant les réponses cumulées de 30 stimulations électriques (durée : 2msec; fréquence : 0,66Hz ; intensité : 3x seuil de réponse C) enregistrées à partir d'un neurone WDR isolé.

B. Réponses d'un neurone WDR à des stimulations mécaniques d'intensité croissante appliquées au niveau de son champ récepteur cutané. Variations simultanées de la pression artérielle (en vert) et de la fréquence cardiaque (en rouge).

Les études réalisées chez l'animal ont montré que les lésions nerveuses périphériques induisaient des modifications histologiques et électrophysiologiques au niveau du Sp5O. Sur le plan histologique, des signes de dégénérescence des terminaisons des afférences primaires ont été mis en évidence (Sugimoto *et al.*, 1999). Sur le plan fonctionnel, des signes évoquant une modification de l'excitabilité des neurones du Sp5O, notamment une expansion de la taille des champs récepteurs, ont été rapportés. Ces phénomènes ont été observés à la suite d'une désafférentation pulpaire (Hu *et al.*, 1986; Kwan *et al.*, 1993; Hu *et al.*, 1999) ou après un traitement neonatal avec de la capsaïcine (Kwan *et al.*, 1996).

A l'opposé, les réponses des neurones du Sp5O sont inhibées par l'application d'une stimulation hétérotopique (figure 4), c'est à dire une seconde stimulation nociceptive appliquée en un point quelconque du corps mais différent de leur champ récepteur (Dallel *et al.*, 1990; Raboisson *et al.*, 1995; Dallel *et al.*, 1999). Ces neurones sont donc sensibles à la mise en jeu des contrôles inhibiteurs diffus nociceptifs (CIDN) (Le Bars *et al.*, 1979).

Enfin, la morphine injectée par voie systémique déprime de façon dose-dépendante et naloxone-réversible les réponses de ces neurones à la stimulation des fibres C (Dallel *et al.*, 1996; Dallel *et al.*, 1998).

Dans le domaine de la nociception, Hunt a proposé l'utilisation de l'expression de la protéine Fos comme outil pour l'étude de la nociception (Hunt *et al.*, 1987). Il a montré que les neurones Fos-immunoréactifs, après stimulation nociceptive, sont préférentiellement localisés au niveau des couches I-II et V de la moelle, régions qui contiennent effectivement des neurones répondant exclusivement ou non à des stimulations nociceptives (Besson & Chaouch, 1987; Willis & Coggeshall, 1991). Une proportion de ces neurones Fos-immunoréactifs se projette sur le thalamus (Menetrey *et al.*, 1989) et le noyau parabrachial (Jasmin *et al.*, 1994), structures suprasegmentaires relais de l'information nociceptive. Enfin, la morphine réduit de façon dose-dépendante et réversible sous naloxone l'expression de la protéine Fos induite par différentes stimulations nociceptives (Abbadie & Besson, 1993).

Des résultats très similaires ont été obtenus au niveau du Sp5C à la suite de diverses stimulations nociceptives : chimiques, électriques, chirurgicales et physiologiques de différents types de tissus (pulpe dentaire, peau, muscle, articulation temporo-mandibulaire ou méninges) (Strassman & Vos, 1993; Carstens *et al.*, 1995). Une proportion de ces neurones se projette sur le thalamus (Li & Mizuno, 1997) ou le noyau parabrachial (Wang *et al.*, 1994; Allen *et al.*, 1996; Li & Mizuno, 1997).

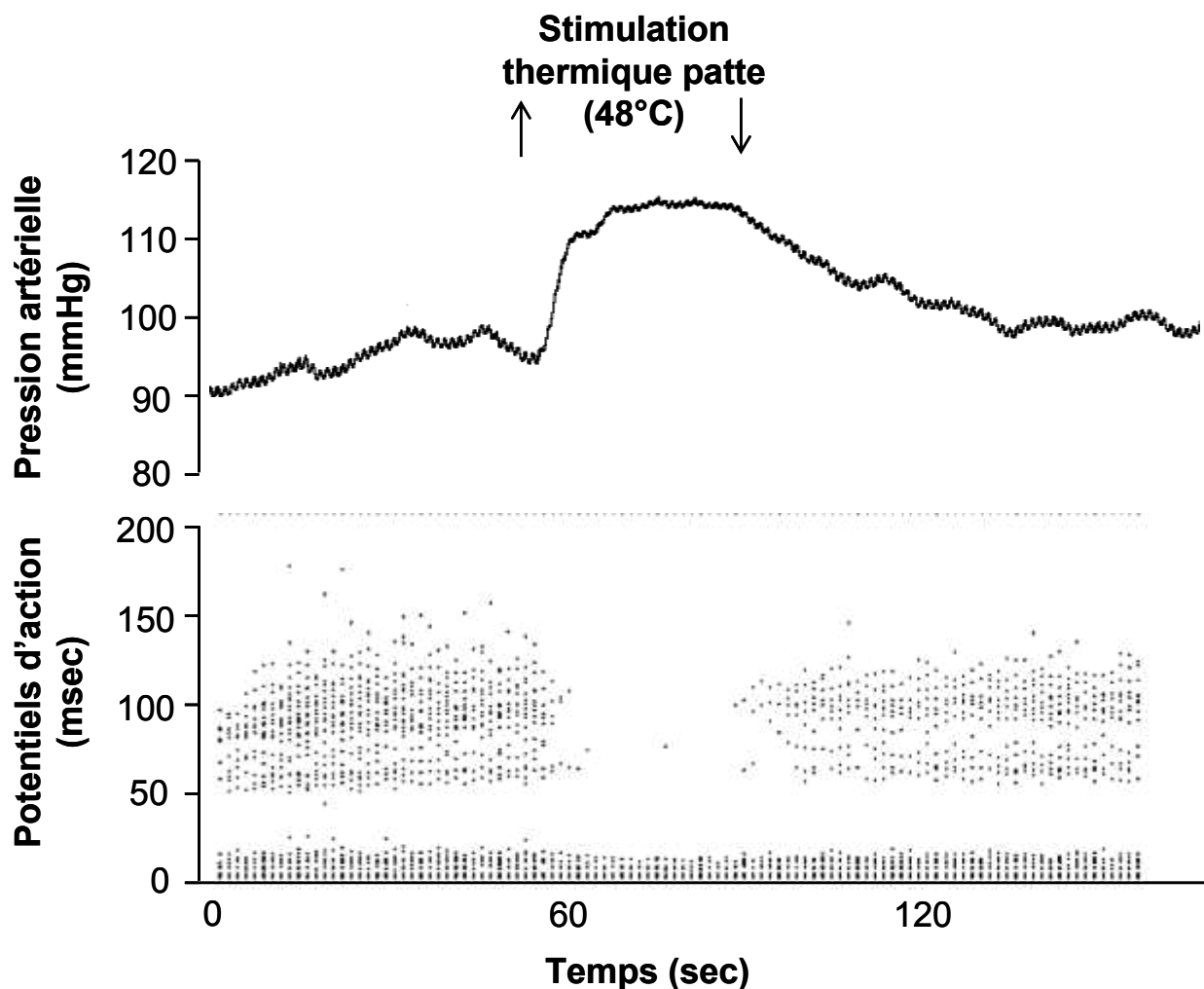


Figure 4

Exemple de l'effet inhibiteur d'une stimulation nociceptive thermique (48°C) d'une patte postérieure sur la réponse d'un neurone WDR du Sp5O, accompagné d'une augmentation transitoire de la pression artérielle moyenne.

Application d'un train de 105 stimulations électriques de 2msec répétées à 0,66Hz pour une intensité de stimulation de 2 fois le seuil de réponse des fibres C au niveau du champ récepteur d'un neurone WDR du Sp5O. De la 35^{ème} à la 60^{ème} stimulation électrique, une patte postérieure du rat est plongée dans une solution aqueuse à 48°C.

Des neurones Fos immunoréactifs ont été aussi notés au niveau du Sp5O (Allen *et al.*, 1996; Oakden & Boissonade, 1998; Sugimoto *et al.*, 1998; Takemura *et al.*, 2000). Toutefois il est intéressant de noter que seule la stimulation électrique ou chimique de la pulpe dentaire était capable d'induire cette expression (Strassman & Vos, 1993; Carstens *et al.*, 1995; Allen *et al.*, 1996). Ces études ont, par ailleurs, révélé que l'expression de Fos n'intéresse que les neurones localisés au niveau de la partie dorsale du Sp5O. Une partie de ces neurones se projettent sur le noyau parabrachial (Allen *et al.*, 1996).

D. Efférences du Sp5O

Le Sp5O envoie des projections ascendantes et descendantes vers de nombreuses structures cérébrales telles que les noyaux moteurs du trijumeau (Travers & Norgren, 1983), du facial (Erzurumlu & Killackey, 1979), l'aire antérieure prétectale (Yoshida *et al.*, 1992), le colliculus supérieur (Killackey & Erzurumlu, 1981) et la corne ventrale de la moelle cervicale (Dallel *et al.*, 1994). Ces projections mises en évidence chez le rat suggèrent une implication du Sp5O dans de nombreuses fonctions motrices telles que la mastication, l'expression faciale ou l'orientation de la tête.

Des projections vers des régions du cerveau impliquées dans la nociception ont été également rapportées. Ainsi, le Sp5O envoie des projections vers le thalamus (De Chazeron *et al.*, 2004 ;Guy *et al.*, 2005), l'hypothalamus (Malick & Burstein, 1998) et l'aire parabrachiale (Feil & Herbert, 1995; Dallel *et al.*, 2004).

Tous ces résultats montrent que la transmission des messages nociceptifs provenant des régions orales et périorales peut être assurée par des neurones localisés dans le Sp5O, le rôle du Sp5C n'étant plus exclusif dans les voies de la nociception trigéminal.

E. Connexions intratrigéminales

Les études anatomiques ont démontré l'existence de connexions intranucléaires ascendantes et descendantes entre les différents noyaux du CST chez le chat (Kruger *et al.*, 1977; Nasution & Shigenaga, 1987), le singe (Tiwari & King, 1974; Ganchrow, 1978) et le rat (Gobel & Purvis, 1972; Kruger *et al.*, 1977; Silverman & Kruger, 1985; Jacquin *et al.*, 1990; Esser *et al.*, 1998). Recemment, les connexions intratrigéminales ont été révélées à l'aide d'un traceur rétrograde (Voisin *et al.*, 2002). Ainsi les corps cellulaires des neurones marqués de façon rétrograde depuis le Sp5O sont localisés principalement au sein des couches III-IV et V du Sp5C et de façon moindre dans la couche I. Les connexions intratrigéminales conservent l'organisation somatotopique des afférences primaires. La signification exacte de ces connexions n'est pas connue mais certains travaux électrophysiologiques suggèrent l'existence de mécanismes de contrôle réciproque entre ces structures.

Les données électrophysiologiques indiquent que le Sp5C influence considérablement l'activité des cellules de la partie rostrale du complexe. Ce fait a été démontré par l'observation des effets de la manipulation du Sp5C sur les activités unitaires ou sur l'excitabilité des afférences primaires du Sp5O et du Pr5. Il a été montré que le blocage par le froid du Sp5C ou la tractotomie effectuée au niveau de l'obex inhibe les réponses de 90% des cellules de la partie rostrale du complexe et réduit l'étendue du champ périphérique de ces

neurones (revue Sessle, 2000; Sessle & Greenwood, 1975; Sessle & Greenwood, 1976). Les données suggèrent un effet facilitateur du Sp5C sur le Sp5O. Une facilitation des cellules de la partie rostrale du complexe a été obtenue par injection de strychnine dans le Sp5C (Khayyat *et al.*, 1975). Cette action excitatrice du Sp5C sur le Sp5O est parfaitement démontrée pour les cellules activées par des stimulations mécaniques légères appliquées à la périphérie. Plus récemment, il a été établi que l'activation des neurones WDR du Sp5O par les fibres nociceptives C se fait par l'intermédiaire du Sp5C, qui seul reçoit des projections directes d'afférences cutanées non myélinisées (Dallel *et al.*, 1998).

III- Le CST, un modèle d'étude des mécanismes segmentaires d'intégration de l'information nociceptive

Les propriétés des neurones WDR du Sp5O sont très similaires à celles des neurones de la couche V de la corne dorsale de la moelle épinière (Dallel *et al.*, 1999). Sp5O et couche V présentent également d'autres points communs, tant anatomiques: absence de récepteurs opioïdes, présence d'un très faible nombre de terminaisons de fibres C, que fonctionnels (cf Dallel *et al.*, 1998, 1999). Alors que la morphine n'a pas d'effet direct sur les réponses des neurones du Sp5O (Dallel *et al.*, 1998) ou de ceux de la couche V lors de la stimulation des fibres C, elle inhibe ces mêmes réponses lorsqu'elle est injectée dans les couches superficielles correspondantes du Sp5C ou de la corne dorsale de la moelle (Dallel *et al.*, 1998). En accord avec ces données, la lésion du Sp5C (Luccarini *et al.*, 1998; Pajot *et al.*, 2000) inhibe de façon préférentielle les réponses comportementales toniques dues à l'activation des fibres C, sans modifier les réponses phasiques sous-tendues par la mise en jeu des fibres A δ . L'ensemble de ces résultats suggère que, comme au niveau spinal, l'information dépendant de la mise en jeu des fibres nociceptives de type C parvient aux neurones WDR trigéminaux de façon polysynaptique, après relais au niveau des couches superficielles. Cette hypothèse a été validée sur le plan anatomique en montrant que les neurones qui assurent les connexions entre Sp5C et Sp5O, et qui répondent aux stimulations nociceptives sont localisés dans les couches superficielles du Sp5C, où se terminent les fibres trigéminales de type C. En résumé, l'activation des neurones WDR du Sp5O par les fibres C se fait de façon indirecte, par l'intermédiaire du Sp5C (Dallel *et al.*, 2003).

Un tel système reproduit de façon verticale l'organisation horizontale de la corne dorsale de la moelle épinière, où les fibres C se terminent dans les couches superficielles à partir desquelles le relais vers la couche V est assuré par des interneurons. A la différence de

la moelle toutefois, où couches superficielles et couche V sont très proches, le Sp5O est séparé d'au moins 3mm (chez le rat) des couches superficielles du sous-noyau caudal. Cette situation offre des perspectives très intéressantes sur le plan expérimental. Elle permet en effet de moduler le transfert de l'information nociceptive au niveau du relais des couches superficielles, sans agir directement sur les neurones WDR, une tâche difficilement réalisable au niveau de la moelle en raison de la proximité des couches. Le système trigéminal constitue donc un modèle d'étude qui devrait permettre de mieux comprendre les mécanismes segmentaires d'intégration de l'information nociceptive.

IV-Le wind-up

1. Définition

Le wind-up est une augmentation progressive, fréquence dépendante, de la réponse d'un neurone lors de l'application répétitive de stimuli nociceptifs identiques sur un même territoire. Ce phénomène a été décrit pour la première fois par Lorne Mendell ([Mendell & Wall, 1965](#)) lors d'enregistrements extracellulaires de neurones de la corne dorsale de moelle chez le chat. Il a été proposé que le wind-up pourrait être le mécanisme sous-tendant le phénomène de sommation temporelle ([Price et al., 1977](#)).

2. Enregistrement du wind-up chez l'animal

A. Enregistrements extracellulaires in vivo

Les travaux de Mendell ([Mendell & Wall, 1965](#)) ont mis en évidence que le wind-up requiert l'activation des fibres amyéliniques de type C, pour des fréquences de stimulation supérieures ou égales à 0,3Hz. Ces constatations sont confirmées lors d'enregistrements extracellulaires de neurones de la corne dorsale chez le singe ([Wagman & Price, 1969](#); [Chung et al., 1979](#)). Chez le rat anesthésié, le wind-up concerne plus particulièrement les neurones WDR des couches profondes de la corne dorsale ([Schouenborg & Sjölund, 1983](#)). De plus, il a été mis en évidence la présence d'un plateau obtenu après la 16^{ème} stimulation, voire même une diminution du nombre de potentiels d'action au delà. Dans toutes les études, le wind-up est obtenu pour des stimulations cutanées ou de nerfs mixtes somatiques mais pas pour la stimulation des viscères ([Alarcon & Cervero, 1990](#)).

B. Enregistrements intracellulaires

Au cours d'enregistrements intracellulaires de neurones spinaux, une augmentation progressive du potentiel postsynaptique exciteur a été observée lors de stimulations répétitives des afférences primaires nociceptives non myélinisées (Price *et al.*, 1971). D'autres études ont porté sur le wind-up des réponses des neurones de la couche V de la moelle lombaire de rat au cours de stimulations du nerf sciatique (Woolf & King, 1987) avec mise en évidence d'une augmentation de taille et de durée des potentiels post synaptiques des fibres C. Cependant, lors du wind-up des réponses des neurones WDR spinothalamiques dans la moelle lombo-sacrée de singe, la dépolarisation cumulative n'est pas systématiquement observée (Zhang *et al.*, 1991).

C. Potentiels de champs

La stimulation des afférences C nociceptives produit un potentiel de champs au niveau de la corne dorsale.

Cependant, Liu et Sandkuher ne montrent pas de wind-up au niveau de ces potentiels de champs (Liu & Sandkühler, 1997) alors que (Schouenborg, 1984) décrit un wind-up du potentiel de champs dans les couches II et pas dans les couches V. Ce dernier résultat est en désaccord avec les données obtenues par des enregistrements extracellulaires unitaires, qui montrent que le wind-up est exprimé essentiellement par les neurones des couches profondes.

D. Réflexes spinaux

Une facilitation du réflexe aux fibres C a été constatée lors de l'application répétitive de stimulations nociceptives à une fréquence supérieure ou égale à 0,3Hz (Price, 1972). La potentialisation à des stimulations répétées est exclusivement observée sur la réponse tardive du réflexe (supposée être conduite par les fibres C) et a les caractéristiques du wind-up (Schouenborg & Sjölund, 1983). Il est à noter que le wind-up est observé pour les réflexes somato-somatiques (stimulations de la peau ou des muscles) et pas pour les réflexes viscéro-somatiques (stimulations des afférences viscérales du nerf splanchnique) (Laird *et al.*, 1995).

E. Enregistrements in vitro

Les études menées sur des tranches de corne dorsale lombo-sacrée ont montré que l'application de stimuli (répétés entre 0,1 à 2Hz) de forte intensité des afférences primaires (stimulation des fibres C) déclenche une facilitation (wind-up) des réponses des neurones de la corne dorsale (Jeftinija & Urban, 1994) et ventrale, incluant les motoneurones (Thompson *et al.*, 1990; Baranauskas *et al.*, 1995; Baranauskas & Nistri, 1996). De plus, cette approche a permis de montrer une population de neurones de la moelle exprimant une dépolarisation

cumulative progressive qui se manifeste par des potentiels postsynaptiques excitateurs subliminaires [EPSPs], autrement dit, qui présente un wind-up subliminaire : aucune transmission du signal ne se produit alors. Sous certaines conditions d'excitabilité, ces dépolarisations cumulatives pourraient cependant engendrer un wind-up.

Plus récemment, il est apparu que des propriétés électriques membranaires propres aux neurones secondaires de la corne dorsale étaient également impliquées dans cette sensibilisation. Ces neurones peuvent notamment produire des dépolarisations prolongées (potentiels de plateau), un mécanisme endogène d'amplification qui contrôle les patrons de décharge des neurones, influence leur capacité à intégrer les messages nociceptifs et intervient dans un phénomène de sensibilisation activité-dépendante, le « wind-up » (Morisset & Nagy, 1998; Morisset & Nagy, 2000). Ces propriétés endogènes sont vraisemblablement soumises à un contrôle tonique inhibiteur permanent (Voisin & Nagy, 2001).

Sur la préparation de tranche de moelle épinière, il a été démontré que l'expression des propriétés de plateau était une composante critique du wind-up opérant en aval des mécanismes synaptiques (Morisset & Nagy, 2000).

3. Le wind-up et le CST

Nous disposons de peu d'information concernant le wind-up des neurones nociceptifs trigéminaux. Ce phénomène a été décrit au niveau des neurones WDR du Sp5C après stimulation cutanée (Hu, 1990; Bolton *et al.*, 2005) et de la pulpe dentaire (Hamba *et al.*, 1992) ainsi qu'au niveau du Sp5O après stimulation cutanée nociceptive (Dallel *et al.*, 1990; Dallel *et al.*, 1999). La stimulation des fibres nociceptives méningées n'est pas capable de déclencher le phénomène de wind-up au niveau des neurones WDR du Sp5C (Bolton *et al.*, 2005).

4. La signification du wind-up

Le phénomène de wind-up a été décrit initialement en termes de réponses neuronales à une stimulation électrique répétée. Par la suite, il a été montré que des stimuli répétitifs thermiques (Price *et al.*, 1977), électriques (Lundberg *et al.*, 1992) ou mécaniques (Magerl *et al.*, 1998) produisent chez l'homme une sommation temporelle de la sensation douloureuse très similaire au wind-up. Dès lors, il semblait possible de rechercher une fonction physiologique à ce phénomène et de proposer des hypothèses sur sa signification.

A. Le wind-up comme mécanisme d'amplification

Chez le volontaire sain, une étude en psychophysique a été menée en évaluant la douleur résultant de 5 stimuli mécaniques nociceptifs d'intensité constante appliqués sur le dos de la main (Koltzenburg & Handwerker, 1994). L'activité neuronale des afférences primaires a été mesurée simultanément par microneurographie au niveau du nerf radial superficiel ainsi que la vitesse de conduction des fibres. L'intensité de la douleur ressentie augmente lorsque la fréquence de stimulation augmente dans une gamme de 1/32 à 2Hz. Cependant, le nombre de potentiels d'actions générés par les nocicepteurs enregistrés pendant le même temps est inversement proportionnel à la fréquence de stimulation. Donc le nombre de potentiels d'action total diminue quand la douleur rapportée par le sujet augmente, suggérant qu'un mécanisme d'amplification centrale, comme le wind-up, pourrait être impliqué.

Le wind-up est donc nécessaire à la perception de l'intensité des stimuli externes. De plus, lorsque la fréquence de stimulation est augmentée, la vitesse de conduction des fibres afférentes diminue jusqu'à un blocage complet pour les très hautes fréquences (Schouenborg, 1984). Ceci est plus particulièrement avéré pour les fibres C (Raymond *et al.*, 1990; Gee *et al.*, 1996). Dans ce contexte, un mécanisme d'amplification, fréquence dépendant et à court terme, peut être particulièrement important pour l'information véhiculée par les afférences nociceptives de type C : le wind-up pourrait représenter ce mécanisme de compensation.

B. Le wind-up et la sensibilisation centrale

La sensibilisation centrale désigne l'augmentation d'excitabilité des neurones nociceptifs du système nerveux central déclenchée par une lésion périphérique (Woolf, 1983). La sensibilisation centrale est caractérisée par une augmentation de l'activité spontanée des neurones, une expansion de leurs champs récepteurs cutanés et une réduction des seuils d'activation. Cependant cette sensibilisation centrale peut survenir sans wind-up. En effet, une réduction des seuils de stimulation, une expansion des champs récepteurs cutanés et une augmentation de l'activité basale des neurones ont été observées mais sans l'apparition d'un wind-up lors de stimulations électriques répétées des afférences viscérales de type C (Alarcon & Cervero, 1990; Laird *et al.*, 1995). De la même manière, le wind-up des neurones nociceptifs du Sp5C n'est pas observé lors du développement de la sensibilisation centrale par stimulation des méninges (Bolton *et al.*, 2005).

Par ailleurs, une étude précédente (Li *et al.*, 1999b) a montré que le wind-up produit des changements dans les propriétés de réponses des neurones de la corne dorsale comme par

exemple un accroissement de la taille du champ récepteur et une augmentation des réponses neuronales induites par des stimuli supramaximaux. Mais à la différence de la sensibilisation centrale, consécutive à une lésion périphérique ou une inflammation, la durée des effets est plus courte. Par exemple, l'augmentation de taille du champ récepteur produite lors du wind-up ne perdure pas plus de quelques secondes. Il apparaît donc que le wind-up est suffisant pour évoquer une forme d'hyperexcitabilité centrale qui n'a cependant pas toutes les caractéristiques d'une sensibilisation centrale, notamment en termes de durée et de modifications des propriétés neuronales (allodynie et hyperalgésie secondaire).

C. Le wind-up et l'hyperalgésie secondaire

On différencie classiquement une zone d'hyperalgésie primaire qui se superpose à la zone de lésion tissulaire et la zone d'hyperalgésie secondaire où prédominent les mécanismes centraux. L'hyperalgésie secondaire est une douleur excessive déclenchée par une stimulation mécanique (statique ou dynamique) appliquée au niveau de la périphérie de la lésion, même lorsque celle-ci est cicatrisée (Treede *et al.*, 1992). L'hyperalgésie mécanique à la pression s'étend et dure plus longtemps que l'hyperalgésie au toucher. Elle serait due à une modification de l'excitabilité centrale des neurones nociceptifs. Cependant, chez l'animal, l'hyperalgésie secondaire déclenchée par une inflammation méningée, peut exister sans wind-up (Bartsch & Goadsby, 2003). De même chez l'homme, il a été constaté qu'une inflammation périphérique induit une hyperalgésie secondaire sans altération de la sommation temporelle (Magerl *et al.*, 1998). Ainsi, il semble que le wind-up et l'hyperalgésie secondaire sont sous-tendus par des mécanismes indépendants.

D. D'un phénomène expérimental à une perception chez l'homme

L'existence de deux catégories de fibres, A δ et C, permet d'expliquer le phénomène de double douleur déclenchée chez l'homme par l'application d'un stimulus nociceptif. La première douleur, à type de piqûre, est bien localisée (Price, 1972). Elle apparaît très rapidement après le stimulus et correspond à l'activation de nocicepteurs connectés aux fibres A δ . La seconde, souvent à type de brûlure, survient plus tardivement. Elle est diffuse, mal localisée et correspond à l'activation de nocicepteurs connectés aux fibres plus lentes, amyéliniques (Hardy *et al.*, 1950; Besson & Chaouch, 1987). Il a été montré que l'application de stimulations électriques cutanées à une fréquence supérieure ou égale à 0,33Hz (Price, 1972) entraînait une augmentation de l'intensité et de la durée de la sensation de brûlure. Une sommation temporelle de la douleur a été également mise en évidence après stimulation électrique des tissus musculaires (Arendt-Nielsen *et al.*, 1997) et, de façon plus surprenante,

des tissus viscéraux (Frobert *et al.*, 1995). La sommation temporelle des réponses à des stimuli naturels répétés cutanés a été testée également chez l'homme par application de stimulations thermiques chaudes nociceptives. Ces stimulations (durée 0,7 secondes) sont appliquées à des fréquences comprises entre 0,1 et 0,4Hz et provoquent une sommation temporelle à partir de 0,33Hz (Price *et al.*, 1977). Un résultat similaire a été obtenu lors d'un blocage des fibres A, montrant que seules les afférences des fibres C sont requises pour cette sommation temporelle (Price *et al.*, 1977; Vierck. *et al.*, 1997).

La sommation temporelle à des stimulations nociceptives mécaniques (à l'aide de piqûres d'aiguilles) a été observée dans plusieurs études chez des sujets sains (Koltzenburg & Handwerker, 1994; Magerl *et al.*, 1998) et des patients souffrant de douleurs neuropathiques (Price *et al.*, 1992). Elle se produit pour un seuil supérieur à celui requis pour exciter les nocicepteurs cutanés de type C chez l'homme ou pour évoquer une douleur (Magerl *et al.*, 1998). Les stimulations répétées à une fréquence comprise entre 0,2 et 0,6Hz avec un poil de Von Frey de 256mN ne produisent pas de sommation temporelle alors que des sensations douloureuses évidentes sont ressenties. Par contre, des piqûres d'aiguilles exerçant des pressions de 20, 40 et 80mN produisent une sommation temporelle à une fréquence de 0,6Hz.

Des travaux (Magerl *et al.*, 1998; Pedersen *et al.*, 1998) ont étudié les effets des états hyperalgiques sur la perception du wind-up. Après avoir déclenché une hyperalgésie par application topique de capsaïcine, une diminution du seuil requis pour évoquer une sommation temporelle a été montrée dans la région de l'hyperalgésie secondaire lors de 5 stimulations électriques appliquée à 2Hz (Arendt-Nielsen *et al.*, 1996). Cependant, la sommation temporelle existe dans une région cutanée saine aussi bien que dans la zone d'hyperalgésie secondaire (Arendt-Nielsen *et al.*, 1996). Un simple déplacement de la pente de la sommation temporelle vers la gauche est enregistré (Magerl *et al.*, 1998).

En résumé, le phénomène de wind-up dépend de la mise en jeu des fibres C et constitue un mécanisme d'amplification des réponses neuronales qui ne peut expliquer à lui seul la génération d'une sensibilisation centrale ou l'apparition d'une hyperalgésie secondaire. Sa signification fonctionnelle reste encore non établie.

IV- Les récepteurs opioïdes et la modulation du wind-up

Les études électrophysiologiques ont montré que la morphine avait une action différentielle sur les réponses des neurones nociceptifs. En effet, elle déprime très fortement les réponses dues à l'activation des fibres C et, dans une moindre mesure, celles des fibres A δ ,

mais n'a aucun effet sur les réponses de type A β (Le Bars *et al.*, 1976; Le Bars *et al.*, 1980b). Des travaux réalisés chez le rat ont montré que la morphine, administrée par voie intraveineuse, déprimait de façon dose-dépendante et réversible par la naloxone les réponses à longue latence (dues à l'activation des fibres C) des neurones nociceptifs du Sp5O (Dallel *et al.*, 1996).

De plus, des travaux récents du laboratoire ont montré que la morphine administrée par voie intraveineuse pouvait diminuer, de façon naloxone réversible, le wind-up des neurones WDR du Sp5O chez le rat (Duale *et al.*, 2001). Des résultats analogues avaient été rapportés notamment pour des réflexes nociceptifs chez le rat spinalisé (Woolf & Fitzgerald, 1981; Gozariu *et al.*, 2000) et des travaux de psychophysique étudiant la perception de la sommation temporelle chez l'homme (Price *et al.*, 1985). Par injection intrathécale de naloxone ou en utilisant des souris KO pour le récepteur opioïdérique mu, le wind-up des neurones WDR de la corne dorsale de la moelle peut être facilité (Guan *et al.*, 2006).

V- Les récepteurs NMDA et la modulation du wind-up

1. Les acides aminés excitateurs (AAE)

Le glutamate est le neuromédiateur excitateur principal dans le système nerveux central des mammifères. Il se fixe sur différents types de récepteurs spécifiques: les récepteurs de type NMDA (**rNMDA**), les récepteurs de type AMPA/kainate (AMPA: acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolépropionique), qui sont des canaux cationiques, et les récepteurs de type métabotrope, ces derniers n'étant pas des récepteurs associés à des canaux ioniques. Le glutamate représente le neuromédiateur le plus abondant dans le système nerveux central des mammifères. Il serait utilisé par environ un tiers de l'ensemble des synapses cérébrales et par la grande majorité de celles responsables de la neurotransmission excitatrice rapide (Watkins & Evans, 1981; Cotman & Iversen, 1987). L'action excitatrice du glutamate dans le système nerveux central a été décrite pour la première fois à la fin des années cinquante. En utilisant la technique d'iontophorèse, il a été démontré que l'application de glutamate provoquait une dépolarisation de la membrane neuronale (Engberg *et al.*, 1979). Le glutamate est notamment libéré dans les couches superficielles de la corne dorsale ou du CST par les afférences primaires de type C (Basbaum & Jessell, 2000).

En plus du glutamate, il existe un autre acide aminé essentiel, l'aspartate, et divers acides aminés d'origine végétale (les acides quisqualique, kainique et domoïque) ou synthétique, tel que l'acide N-méthyl-D-aspartique (NMDA).

Ces substances jouent un rôle important dans la transmission des messages nociceptifs. Ils agissent via deux types de récepteurs présents au niveau des neurones nociceptifs : des rNMDA et des récepteurs non-NMDA. Parmi ces récepteurs, ceux de type NMDA semblent avoir un rôle subtil dans la nociception. En effet, ils ne sont pas impliqués dans la transmission de la douleur aiguë, par contre, ils mettent en jeu des phénomènes de plasticité synaptique qui se développent lorsque la stimulation devient chronique.

2. Le récepteur NMDA

A. Structure et distribution

Le rNMDA est une protéine hétéro-oligomérique qui serait composée à partir d'une sous-unité NR1 et au moins d'une isoforme d'une sous-unité NR2 (Sucher *et al.*, 1996). Il a été proposé que ces sous-unités soient assemblées dans un holomère pentamérique (Ferrer-Montiel & Montal, 1996). La sous-unité NR1 est la première à avoir été découverte (Moriyoshi *et al.*, 1991). L'expression neuronale de cette sous-unité semble être ubiquitaire, y compris dans des neurones qui ne contiennent pas de rNMDA fonctionnels. NR1 serait ainsi un composant obligatoire de tous les rNMDA, sa présence étant nécessaire pour le fonctionnement neuronal normal (Forrest *et al.*, 1994). Cette sous-unité porterait les sites de liaison pour la glycine et les anesthésiques dissociatifs (Chazot *et al.*, 1992; Lynch *et al.*, 1994; Grimwood *et al.*, 1995). Dans les ovocytes de xénope, l'expression de la sous-unité NR1 en l'absence de sous-unité NR2 donne lieu à des canaux cationiques qui peuvent être activés par le NMDA, ce qui suggère que la sous-unité NR1 porte également le site de liaison du glutamate (Moriyoshi *et al.*, 1991). La sous-unité NR2, découverte en 1992 (Meguro *et al.*, 1992) est essentielle pour l'assemblage des rNMDA fonctionnels dans les cellules de mammifères. Il en existe quatre isoformes (NR2A à NR2D), dont la plus abondante est l'isoforme NR2B (Kutsuwada *et al.*, 1992; Monyer *et al.*, 1992; Ishii *et al.*, 1993). L'isoforme de la sous-unité NR2 utilisée détermine à la fois les propriétés biophysiques du canal cationique, et les propriétés pharmacologiques des divers sites de liaison du récepteur (Kutsuwada *et al.*, 1992; Monyer *et al.*, 1992; Sucher *et al.*, 1996). Contrairement à la sous-unité NR1, la sous-unité NR2 est exprimée dans le système nerveux de façon hétérogène (Monyer *et al.*, 1992). Par exemple, l'isoforme NR2C n'est présente que dans le cervelet. En outre, l'expression des différentes isoformes est soumise à une régulation différentielle au cours du développement ontogénétique (Watanabe *et al.*, 1992; Sheng *et al.*, 1994). L'isoforme NR2B est la plus largement répandue, et son expression serait essentielle pour le bon fonctionnement du système nerveux central (Kutsuwada *et al.*, 1996). Par contre, des

souris transgéniques n'exprimant pas la sous-unité NR2A survivent, mais présentent des troubles d'apprentissage (Sakimura *et al.*, 1995). L'ensemble de ces observations indique que l'expression de la sous-unité NR1 est indispensable pour la formation de récepteurs fonctionnels et qu'il existe une importante diversité des rNMDA due à l'existence de plusieurs variantes d'épissage de la sous-unité NR1 et à leurs combinaisons avec différentes sous-unités NR2. Dans le CST, la sous-unité NR1 a été retrouvée à la fois dans le Sp5O et les couches superficielles et profondes du Sp5C (Petrulia *et al.*, 1994).

B. Propriétés

Le rNMDA est un canal ionique perméable principalement aux ions calcium et dont les agonistes endogènes sont le glutamate et l'aspartate, deux acides aminés de structure proche. Quatre différents sites de liaison ont été identifiés sur le récepteur. Il existerait deux sites de liaison pour le glutamate, dont l'occupation simultanée active le récepteur et provoque ainsi l'ouverture du canal cationique. Parmi les agonistes sélectifs pour ce site, on trouve bien entendu le NMDA lui-même, ainsi que les acides iboténique, quinolinique et homocystéïque. Plusieurs antagonistes compétitifs (dont APV) agissant au niveau du site de liaison du glutamate ont été synthétisés. Le rNMDA porte à l'intérieur du canal cationique un site de liaison pour les anesthésiques dissociatifs (Lodge & Johnson, 1990). Son occupation par la kétamine (MacDonald *et al.*, 1987) ou le MK-801 (Wong *et al.*, 1986), par exemple, produit un blocage de longue durée du récepteur de type NMDA. Des produits agissant à ce niveau présentent des effets psychotropes très puissants.

Une autre classe d'antagonistes du récepteur de type NMDA, dont l'ifenprodil (Carter *et al.*, 1988), se fixe au niveau d'un autre site de liaison, qui se trouverait sur la sous-unité NR2B du récepteur. L'ifenprodil entraîne un bloc activité-dépendant du récepteur, qui peut être expliqué par la stabilisation de l'état inactivé du canal ionique (Legendre & Westbrook, 1991). D'après des études menées sur des récepteurs recombinants, il s'avère que l'ifenprodil se fixe sélectivement aux récepteurs qui contiennent l'isoforme NR2B de la sous-unité NR2 (Williams, 1993). Par ailleurs, il a été proposé qu'il existe des ligands endogènes pour le site de fixation de l'ifenprodil, des polyamines telles que la spermine (Carter *et al.*, 1989). Celles-ci pourraient ainsi moduler l'activation du récepteur par le glutamate.

Une des particularités du récepteur de type NMDA est le fait que l'activation du récepteur nécessite la présence d'un co-agoniste obligatoire, la glycine (Johnson & Ascher, 1987). Cet acide aminé se fixe sur un site différent de celui du glutamate, sur la sous-unité NR1 (Lynch *et al.*, 1994), dont l'occupation est nécessaire pour l'activation du récepteur

(Kleckner & Dingledine, 1988). Des antagonistes ont aussi été décrits, mais leur puissance est relativement faible (Fletcher & Lodge, 1988). De plus, le rNMDA est soumis à une inhibition voltage-dépendante par les ions magnésium (Nowak *et al.*, 1984). Les ions Mg^{2+} bloquent le canal du récepteur à des potentiels négatifs proches du potentiel membranaire de repos (Ascher & Nowak, 1988).

Les phosphorylations post-traductionnelles du rNMDA par l'intermédiaire des protéines kinase A et C modifient ses propriétés fonctionnelles (Tingley *et al.*, 1993). La protéine kinase C va potentialiser les courants induits par le NMDA en augmentant la probabilité d'ouverture du canal et en diminuant l'affinité du magnésium pour son site de liaison sur le canal (Chen & Huang, 1992).

L'histamine semble également avoir un rôle potentialisateur sur les courants induits par le NMDA (Bekkers, 1993; Vorobjev *et al.*, 1993; Faucard *et al.*, 2006).

3. Les rNMDA et la douleur

Dans les études électrophysiologiques, il a été montré que l'administration iontophorétique de NMDA entraîne une expansion des champs récepteurs des neurones nociceptifs médullaires (Dougherty & Willis, 1991) et trigéminaux (Zhang *et al.*, 1996; Wang & Mokha, 1996) ainsi qu'une augmentation de leur sensibilité à l'application de stimulations nociceptives. Par ailleurs, l'implication des récepteurs NMDA dans l'amplification des réponses à des stimuli prolongés est aussi mise en évidence par le fait que les réponses des neurones de la corne dorsale de la moelle après l'injection de formol, sont réduites par les antagonistes du récepteur NMDA (Haley *et al.*, 1990; Dickenson & Aydar, 1991). Des études ont indiqué que l'administration systémique ou intrathécale d'antagonistes des récepteurs NMDA était susceptible de réduire l'hyperalgésie ou le comportement nociceptif spontané induits par constriction du nerf sciatique (Yamamoto & Yaksh, 1992) ou par ligature serrée du nerf spinal (Chaplan *et al.*, 1997). De tels résultats tendent à confirmer l'importance de l'activation des récepteurs NMDA dans la symptomatologie douloureuse associée aux neuropathies.

4. Les rNMDA et le wind-up

L'injection intrathécale de NMDA chez le rat a un effet facilitateur sur le phénomène de wind-up des neurones WDR enregistrés dans la corne dorsale (Chapman *et al.*, 1994). De même, des inhibitions pharmacologiques du wind-up des neurones WDR de la corne dorsale de la moelle ont été obtenues à l'aide d'antagonistes des rNMDA, comme APV (Dickenson &

Sullivan, 1987) ou la kétamine (Davies & Lodge, 1987). Au niveau trigéminal, le même résultat a été retrouvé dans le Sp5O avec un antagoniste non-compétitif, le MK801 (Parada *et al.*, 1997).

Le modèle expliquant la contribution des rNMDA dans le wind-up repose sur le blocage du canal du rNMDA par le Mg^{2+} extracellulaire au potentiel de repos de la membrane (Nowak *et al.*, 1984; Dickenson, 1990; Dickenson *et al.*, 1997). Lorsque l'input des afférences C est suffisamment intense pour dépolariser la membrane cellulaire par l'activation des récepteurs AMPA post-synaptiques, levant ainsi le blocage du canal du rNMDA par les ions Mg^{2+} , la co-activation de ces récepteurs par le glutamate se produit. La dépolarisation cumulative qui résulte de l'activation des rNMDA permet la génération du wind-up. Il convient cependant de noter que le wind-up peut être généré sans cette dépolarisation cumulative (Thompson *et al.*, 1990) et qu'à l'inverse lorsque cette dépolarisation cumulative est mesurée, le wind-up ne s'en suit pas forcément (Woolf & King, 1987; Zhang *et al.*, 1991; Russo & Hounsgaard, 1994). Un mécanisme d'amplification secondaire est également envisageable (Chen & Huang, 1992). Ainsi une entrée de Ca^{2+} par les ionophores NMDA et d'autres canaux calciques pendant la dépolarisation peut activer les protéines kinases C qui, en retour, vont renforcer l'efficacité des rNMDA en augmentant la probabilité d'ouverture des canaux et en réduisant la voltage-dépendance du blocage Mg^{2+} du canal rNMDA.

Chez l'homme, la sommation temporelle de trains de stimulations nociceptives cutanées électriques ou thermiques peut être inhibée de façon dose dépendante par des antagonistes des rNMDA comme le dextrométhorphan (Price *et al.*, 1994) ou la kétamine (Arendt-Nielsen *et al.*, 1995; Guirimand *et al.*, 2000). Le dextrométhorphan et la kétamine ne réduisent pas les seuils de la douleur sur une peau saine (douleur estimée par le sujet à la première stimulation) mais produisent une diminution dose dépendante du gain du wind-up. La kétamine réduit le wind-up évoquée par des piqûres dans les régions d'hyperalgésie secondaire induite par des brûlures expérimentales (Warncke *et al.*, 1997) ou consécutive à une chirurgie (Stubhaug *et al.*, 1997).

L'inhibition de la douleur par des antagonistes des rNMDA a été rapportée dans plusieurs études cliniques portant sur des douleurs neuropathiques: l'administration intrathécale d'acide (\pm) -2-carboxypiperazine-4-yl-propyl-1-phosphonique (CPP), un antagoniste compétitif pour le site de liaison au glutamate sur le rNMDA, inhibe le wind-up produit par l'application répétitive de stimulation mécanique mais reste sans effet sur la douleur spontanée et l'allodynie chez des patients atteints de neuropathies périphériques (Kristensen *et al.*, 1992). D'autres études portant sur des patients atteints de névralgie post-

herpétique (Eide *et al.*, 1994), de lésions du cordon médullaire (Eide *et al.*, 1995) et de douleurs post amputations (du moignon et du membre fantôme) (Nikolajsen *et al.*, 1996) mettent en évidence que la kétamine réduit le phénomène de wind-up mais aussi l'allodynie mécanique dynamique observée dans les régions lésées. Enfin, après blocage des rNMDA par la kétamine, il est toujours possible d'obtenir une sommation temporelle des sensations douloureuses dans les aires d'hyperalgésies secondaires induites par une application topique de capsaïcine, mais ceci après augmentation des seuils de stimulation (Andersen *et al.*, 1996).

Il faut cependant noter que l'inhibition du wind-up par les antagonistes des rNMDA est partielle *in vivo* (Davies & Lodge, 1987; Dickenson & Sullivan, 1987), comme *in vitro* (Thompson *et al.*, 1990; Jęftinija & Urban, 1994), ce qui suggère que d'autres neuromédiateurs pourraient contribuer à ce phénomène.

VI- Les récepteurs NK1 et la modulation du wind-up

1. Les neurokinines et la substance P

La substance P est un neuropeptide isolé en 1931 par Von Euler et Gaddum depuis le cerveau et l'intestin de cheval. Sa séquence en acides aminés est déterminée en 1971 (Chang *et al.*, 1971). Cinquante ans après la découverte de la substance P, les neurokinines A et B (Kimura *et al.*, 1984) et les neuropeptides K et γ (Tatemoto *et al.*, 1985; Kage *et al.*, 1988) ont été identifiés. Ces cinq peptides ont le pouvoir de provoquer une contraction rapide des muscles lisses et constituent de ce fait la famille des tachykinines (Henry, 1987).

2. Les récepteurs

Trois récepteurs ont été découverts (Erspamer, 1981; Lee *et al.*, 1982; Mussap *et al.*, 1993). Le rNK2 (Masu *et al.*, 1987), puis le rNK1 (Hershey & Krause, 1990) et enfin le rNK3 (Shigemoto *et al.*, 1990) ont été clonés, mettant ainsi en évidence leur appartenance à une même famille de récepteurs. La nomenclature rNK1, rNK2 et rNK3 a été établie en 1987 (Henry, 1987) en fonction de l'affinité de ces récepteurs pour la substance P: les rNK2 et rNK3 sont préférentiellement liés aux NKA et NKB respectivement et le rNK1 est celui de plus forte affinité pour la substance P qui représente un des neuromédiateurs principaux libérés par les fibres C (Hökfelt *et al.*, 1975).

A. Distribution du rNK1

Le rNK1 est rencontré dans les organes périphériques (principalement dans le tractus gastro-intestinal et la vessie) mais aussi dans le système nerveux, essentiellement dans le

striatum, l'habenula, le noyau accumbens, l'hippocampe, le noyau latéral de l'hypothalamus, le noyau interpédonculaire, le noyau du tractus solitaire, le noyau du raphe, la medulla oblongata (Kanazawa & Jessell, 1976; Otsuka & Yoshioka, 1993). Dans la corne dorsale, les rNK1 sont présents au niveau des neurones des couches I ou sur les dendrites localisées au niveau de la couche II des neurones des couches III et IV de la moelle (Liu *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1995; Marshall *et al.*, 1996; Naim *et al.*, 1997).

B. Structure et propriétés

Les rNK1 sont des récepteurs à 7 hélices alpha transmembranaires couplés à une protéine G. Le ligand endogène vient se loger sur le domaine de liaison hydrophobe (région transmembranaire) et active la protéine G couplée au récepteur. A son tour, cette dernière active une enzyme intracellulaire, la phospholipase C qui hydrolyse le phosphatidyl inositol biphosphate en inositol triphosphate et diacylglycérol. Conjointement, ces deux molécules provoquent une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire. L'inositol triphosphate agit au niveau des canaux ioniques du réticulum endoplasmique pour libérer du calcium. Le diacylglycérol active une protéine kinase C qui pourra potentialiser l'ouverture des récepteurs membranaires comme le rNMDA.

3. Les rNK1 et la douleur

Plusieurs arguments plaident en faveur d'un rôle de la substance P et des rNK1 dans la nociception. La substance P est libérée en abondance dans les couches superficielles du sous-noyau caudal à la suite de stimulations nociceptives intenses ou d'une inflammation (Jessell & Iversen, 1977; Duggan *et al.*, 1988; Kuraishi *et al.*, 1989). Lorsqu'elle est appliquée par microélectrophorèse ou par voie intrathécale, la substance P active préférentiellement les neurones nociceptifs (Radhakrishnan & Henry, 1991; Salter & Henry, 1991) et induit un comportement de douleur chez le rat (Piercey *et al.*, 1981). A l'inverse, l'utilisation d'antagonistes des rNK1 inhibe la réponse des neurones à des stimulations nociceptives (Radhakrishnan & Henry, 1991; Snider *et al.*, 1991).

L'injection intra-plantaire de capsaïcine, qui induit une libération de substance P, produit une endocytose des rNK1 au niveau de neurones de la corne dorsale de la moelle (Mantyh *et al.*, 1995). Ce phénomène connu sous le terme d'internalisation (qui est le reflet d'une fixation de la substance P sur son récepteur) atteint un pic au bout de 5 à 10 min après l'application d'un stimulus nociceptif. L'apparition de ce phénomène est parfaitement corrélée avec l'apparition de comportements nociceptifs (Liu *et al.*, 1997). Les différents types de

stimulations nociceptives sont capables d'induire l'endocytose des rNK1. Par ailleurs, le nombre de neurones qui internalisent la substance P ainsi que le nombre d'endosomes présents à l'intérieur d'un neurone augmentent avec l'intensité de stimulation (Allen *et al.*, 1997), suggérant une aptitude à coder l'intensité de stimulation.

4. Les rNK1 et le wind-up

Sachant que le wind-up est dû à une sommation de potentiels lents *in vitro* (Price *et al.*, 1971), et que la substance P est capable d'induire les mêmes potentiels, son implication dans le phénomène de wind-up a été ainsi suggérée. De plus, les antagonistes des récepteurs de la substance P inhibent les potentiels lents provoqués par une stimulation des racines dorsales (Urban & Randic, 1984).

Des études électrophysiologiques *in vivo* ont montré que l'administration intrathécale d'antagonistes des rNK1, le peptide DPDT (Kellstein *et al.*, 1990) ou le RP67580 (Chapman & Dickenson, 1993) entraînait une diminution du wind-up des neurones WDR de la corne dorsale de la moelle. De même chez le rat, l'administration intrathécale d'antagonistes des rNK1 (CP96345) réduit le wind-up des réflexes aux fibres C (Xu *et al.*, 1992). Une réduction du niveau de dépolarisations cumulatives de motoneurones, évoquée par des stimulations répétitives des afférences, a été constatée après administration d'antagonistes des rNK1 (Baranauskas *et al.*, 1995). Dans cette étude *in vitro*, les auteurs estiment que 33% du taux de ces potentiels de membranes qui sous-tendent le wind-up seraient dépendant de l'activation des rNK1. Ils émettent l'hypothèse que la substance P serait libérée par des interneurones au niveau de relais spinaux polysynaptiques, favorisant ainsi le wind-up des motoneurones.

Les rNK1 pourraient aussi moduler les canaux calciques de type L et donc, par voie de conséquence, les potentiels de plateau observés en enregistrement intracellulaire des neurones de la corne dorsale. En effet, ces potentiels de plateau ont été proposés comme sous-tendant le phénomène de wind-up (Russo *et al.*, 1997; Morisset & Nagy, 2000).

Le rôle des rNK1 a été récemment évalué chez la souris génétiquement modifiée (De Felipe *et al.*, 1998). Les souris KO pour le rNK1 ne présentent pas de wind-up des réponses réflexes aux fibres C, contrairement aux sauvages. Une forte réduction du wind-up des neurones WDR a été également rapportée (Suzuki *et al.*, 2003). Une autre approche permettant de s'affranchir des mécanismes compensateurs, inhérent à l'utilisation de souris transgéniques, consiste à utiliser la substance P conjuguée avec la saporine, une cytotoxine (SP-SAP) qui produit une destruction sélective des neurones exprimant le rNK1 après internalisation du récepteur (Mantyh *et al.*, 1997). Chez le rat traité par injection intrathécale

de SP-SAP (destruction des neurones des couches I à III exprimant le rNK1), une réduction du wind-up des neurones WDR enregistrés dans les couches plus profondes de la moelle est observée (Suzuki *et al.*, 2002).

En conclusion, le phénomène de wind-up se caractérise par l'augmentation progressive de la réponse de certains neurones à une stimulation répétée à basse fréquence des fibres nociceptives C (Herrero *et al.*, 2000). Ce phénomène est essentiellement exprimé par les neurones WDR des couches profondes. Il dépend en partie de l'activation des rNMDA et des rNK1. Le wind-up a des conséquences en termes de douleur chez l'homme. Ainsi, la seconde douleur produite par de stimulations électriques et thermiques nociceptives augmente avec le nombre de stimulations lorsque la fréquence de stimulation est supérieure ou égale à 0,3Hz. La signification fonctionnelle du wind-up n'est pas encore clairement établie.

Le wind-up a été récemment mis en évidence dans le complexe sensitif du trijumeau. Plus particulièrement, il a été montré que la majorité des neurones WDR du Sp5O expriment le phénomène de wind-up. L'objectif de ce travail est

- d'analyser les caractéristiques et la fonction du wind-up des neurones WDR trigéminaux
- d'identifier les réseaux neuronaux sous tendant le wind-up
- d'établir le rôle des rNMDA et des rNK1 dans le wind-up

Pour répondre à ces questions, nous utiliserons le modèle trigéminal qui présente une particularité anatomique très intéressante. A la différence de la moelle épinière où couches superficielles et couche V sont très proches, le Sp5O est séparé d'au moins 3 mm des couches superficielles du Sp5C (figure 1). On peut ainsi moduler le transfert de l'information nociceptive au niveau du relais des couches superficielles, sans interférer directement sur les neurones WDR. Le système trigéminal constitue donc un excellent modèle pour étudier les mécanismes segmentaires de la nociception sur lequel nous avons utilisé des approches immunohistochimiques et électrophysiologiques *in vivo* chez le rat.

MATERIEL ET METHODES

I- Electrophysiologie

1. Préparation chirurgicale

A. Animaux

Les travaux ont été réalisés chez des rats mâles de souche Sprague-Dawley (Elevage Charles River Laboratories, St Germain – L'Arbresle, France) pesant entre 250 et 300g. Les expérimentations ont été menées conformément aux recommandations éthiques de l'International Association for the Study of Pain (IASP) et aux directives européennes en la matière (European Council directive of November, 24 1986 -86/609/EEC). Cette gamme de poids permet en outre l'utilisation des coordonnées stéréotaxiques de l'atlas de Paxinos et Watson (Paxinos & Watson, 1986). Les animaux sont maintenus en environnement contrôlé (lumière de 7 heures à 21 heures ; température de 22°C) dans l'animalerie du laboratoire avec nourriture et eau *ad libitum*. Les animaux sont maintenus une semaine dans notre animalerie pour habitude avant leur utilisation en expérimentation.

B. Anesthésie

Pour la chirurgie, les animaux sont anesthésiés par inhalation d'un mélange de protoxyde d'azote/oxygène (2/3-1/3) et d'halothane (2% pour l'induction et 1,5% pour la chirurgie). A la fin de la chirurgie, le niveau d'halothane est alors ajusté et maintenu à 0,6% pendant toute la durée des enregistrements. Ce pourcentage, tout en assurant un niveau d'anesthésie en adéquation avec les règles d'éthique, ne déprime pas de façon excessive les réponses des neurones aux stimuli nociceptifs appliqués sur leur champ récepteur périphérique (Le Bars *et al.*, 1980a; Le Bars & Villanueva, 1988).

C. Chirurgie

Après l'injection intra musculaire de 100µg d'atropine sulfate, une trachéotomie est effectuée pour permettre une ventilation artificielle grâce à une pompe à volume contrôlé (55 cycles/min) connectée à la canule trachéale. Un cathéter est mis en place dans la veine jugulaire gauche pour assurer les injections et perfusion en cours d'expérimentation. Au cours des enregistrements électrophysiologiques, les animaux sont paralysés par l'administration intraveineuse continue de bromure de vecuronium (Norcuron®, 0,6mg/h). Un second cathéter, permettant la mesure de la pression artérielle est ensuite inséré dans la carotide gauche. Le cathéter est relié à un transducteur de pression (UFI, Morro Bay, CA, USA)

connecté à un amplificateur (Stoelting, Wood Dale, IL, USA). La fréquence cardiaque est également mesurée à l'aide d'un moniteur.

Les animaux sont ensuite placés dans un appareil de contention stéréotaxique de type de Horsley-Clarke, pour l'utilisation des coordonnées tridimensionnelles stéréotaxiques (Paxinos & Watson, 1986). Afin d'avoir accès aux noyaux du trijumeau, une craniotomie est réalisée à l'aide d'une fraise sur le côté droit, au niveau de la suture occipito-pariétale, et la dure-mère est disséquée à ce niveau, afin de pouvoir implanter l'électrode d'enregistrement. Un délai d'environ une heure sépare la préparation des animaux des enregistrements neuronaux.

D. Contrôle de l'état physiologique de l'animal

La température centrale de l'animal est maintenue constante à $37,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ grâce à une couverture homéotherme. Le rythme cardiaque (350-450 battements/min) et la pression artérielle (80-130 mmHg) sont également surveillés. Un analyseur de gaz (Artema MM 200, Sunbyberg, Suède) connecté à la canule trachéale permet de mesurer en permanence le volume et la fréquence respiratoire. La fréquence est ajustée à 55 cycles/min de manière à maintenir un équilibre acido-basique correct : les gaz expirés contiennent toujours entre 3,3 et 4,0% de CO_2 . L'analyseur de gaz permet également de contrôler les paramètres d'anesthésie. Ainsi, le taux d'halothane inspiré est de 1,2 à 1,5% pendant toute la chirurgie et de 0,6% pendant l'enregistrement. Les taux d'oxygène et de protoxyde d'azote sont maintenus à 25-35% et 60-70%, respectivement.

2. Enregistrements

A. Microélectrodes d'enregistrement

Des enregistrements unitaires extracellulaires sont réalisés dans le Sp5O, à l'aide de micro pipettes de verre (diamètre interne/externe : 0,58/1mm ; longueur : 150mm) étirées (étireuse PE-2, Narishige Instruments) puis remplies d'une solution de chlorure de sodium à 0,9% et de bleu de Pontamine à 5%. Leur pointe est cassée de façon à ce que l'impédance soit comprise entre 7 et $10\text{M}\Omega$.

B. Sites d'enregistrement

Pour atteindre le Sp5O, le tronc cérébral est exploré entre 2,4 et 3,0mm latéralement à la ligne médiane et entre 1,5 et 2,6mm postérieurement à la ligne inter auriculaire (Paxinos & Watson, 1986). La micro électrode est descendue à 5mm au-dessous de la surface du cervelet, position à partir de laquelle on commence la recherche des champs récepteurs en appliquant

un léger stimulus mécanique dans la région orale et péri orale. La micro électrode est descendue lentement dans le Sp5O.

C. Traitement du signal

L'électrode est connectée par un fil d'argent à un adaptateur d'impédance. Le signal détecté, correspondant à l'activité des neurones enregistrés, est amplifié puis visualisé sur un oscilloscope cathodique. Il est également transmis à un discriminateur connecté à une interface CED 1401plus® (Cambridge Electronic Design) puis à un ordinateur (logiciels Spike 2.3 et 2.5 software®) permettant l'enregistrement et l'analyse des activités neuronales spontanées et provoquées. Le logiciel utilisé permet d'analyser les résultats en temps réel sous différentes formes : signaux bruts et post-stimulus histogrammes (PSTH). Il permet également de suivre en temps réel l'évolution du rythme cardiaque et de la pression artérielle.

3. Stimulations périphériques

Les neurones analysés sont caractérisés par leurs réponses à la fois à des stimulations mécaniques et à des stimulations électriques appliquées sur leur champ récepteur périphérique. Parmi les stimuli mécaniques non nociceptifs appliqués sur le museau, sont utilisés le brossage à l'aide d'un pinceau, des jets d'air, le tact léger, ainsi que des pressions modérées exercées avec une pince à griffes. D'autre part, les stimulations mécaniques nociceptives correspondent à des pressions importantes, des piqûres ou pincements modérés à intenses, appliqués avec de fines précelles. Ces stimulations évoquent une sensation douloureuse lorsqu'elles sont appliquées sur la peau de l'expérimentateur. Une fois le neurone identifié, les limites de son champ récepteur sont déterminées et représentées graphiquement, ce qui permet de définir son appartenance aux régions intra orale, péri orale ou faciale, ou plus particulièrement qualifiées : ophtalmique, maxillaire ou mandibulaire (Dallel *et al.*, 1990).

Les stimuli électriques sont appliqués à l'aide d'une paire d'électrodes (0,35x 15mm) reliées à un générateur de courant, insérées sous la peau au centre du champ récepteur préalablement délimité. Plusieurs potentiels d'action sont généralement observés après une stimulation électrique (durée 0,1 ou 2msec), en réponse à l'activation respective des fibres A et C. Le seuil d'obtention de chacune de ces réponses est déterminé par l'application répétitive d'une stimulation d'intensité croissante, jusqu'à atteindre une valeur supraliminaire induisant des réponses reproductibles. Les PSTH sont analysés, afin de distinguer les réponses dues à la

mise en jeu des fibres A et celles liées à l'activation des fibres C, en fonction de leurs latences et en utilisant la classification de (Gasser & Erlanger, 1927) et (Burgess & Perl, 1973).

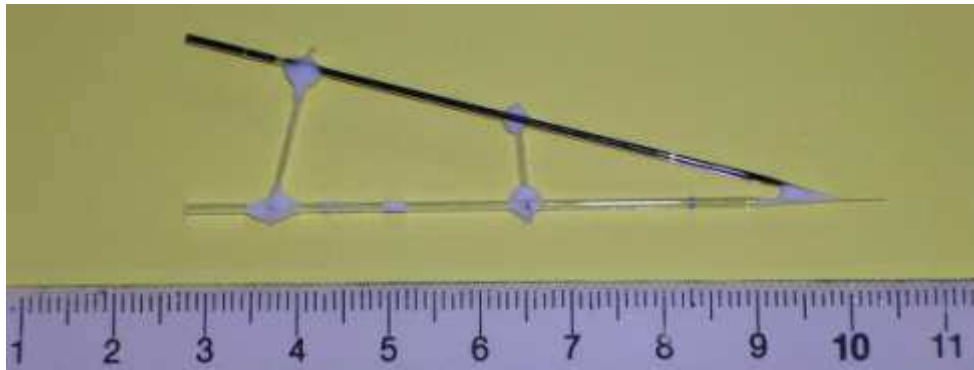
La latence des réponses est utilisée pour déterminer la vitesse de conduction des fibres, en tenant compte de la distance de conduction (~50mm entre le champ récepteur cutané et le corps cellulaire du neurone enregistré), du délai synaptique central, du délai d'activation des axones périphériques et de la réduction des afférences dans le tract trigéminal.

Les stimulations thermiques de la patte postérieure de l'animal sont obtenues par immersion de celle-ci dans un béccher d'eau à 48°C pendant 38 secondes en agitant légèrement le béccher.

4. Micro-injections

Pour les injections dans le Sp5C, la peau est incisée depuis la région occipitale jusqu'à l'apophyse épineuse de l'axis. Les muscles du cou sont désinsérés de la protubérance occipitale et de l'atlas, la membrane atlanto-occipitale est fendue horizontalement et les plans peauciers écartés. La micropipette d'injection montée sur un micro descendeur « trois axes » est insérée par visée directe dans la zone superficielle latérale du Sp5C. Les micropipettes de verre simples (diamètre interne/externe : 0,58/1mm ; longueur : 150mm) ou triples (diamètre unitaire interne/externe : 0,69/1,2mm ; longueur : 150mm) sont étirées puis cassées de façon à obtenir une pointe d'un diamètre externe supérieur ou égal à 40µm. Chaque pipette a été reliée à une seringue Hamilton® par un cathéter de polyéthylène. Les seringues sont connectées à un pouce seringue (UltraMicroPump II et Micro4™, WPI) permettant une injection lente de très petits volumes afin d'éviter les lésions tissulaires. Les micropipettes de verre triples sont préférées au simples car permettant en fin d'expérimentation un marquage du site d'injection par le bleu de Pontamine se trouvant dans l'une des pipettes.

Pour injecter à proximité du site d'enregistrement dans le Sp5O, la microélectrode d'enregistrement est couplée à une micropipette d'injection graduée (illustration). La micropipette d'injection est remplie préalablement à sa mise en place sur l'animal et une électrovanne connectée à de l'air comprimé permet d'injecter précisément un très petit volume. Cette méthode permettant l'injection d'une solution et l'enregistrement simultané à proximité est inspirée du travail de Akaoka (Akaoka *et al.*, 1992).



Illustration

Microélectrode d'enregistrement couplée à une micropipette d'injection graduée. La microélectrode d'enregistrement est étirée puis coudée à 3mm de son extrémité d'un angle de 20° à l'aide d'une microforge. Elle est ensuite remplie d'une solution de chlorure de sodium à 0,9% et de bleu de Pontamine à 5% avant d'être cassée de façon à ce que l'impédance soit comprise entre 7 et 10MΩ. La microélectrode d'enregistrement ainsi préparée est collée avec une micropipette de verre simple (décrite précédemment) à l'aide d'un micromanipulateur et sous loupe binoculaire de façon à ce que l'extrémité de la micropipette d'injection soit en retrait de 120 à 160μm de l'extrémité de la microélectrode d'enregistrement et en veillant à ce qu'elles soient strictement parallèles. Une petite goutte de colle cyanoacrylate est employée à cet effet et des renforts de verre ont été ajoutés à l'aide d'une colle composite polymérisable pour assurer la cohésion de l'ensemble.

Deux antagonistes des récepteurs NMDA ont été utilisés dans ce travail :

- MK-801 ou (5S,10R)-(-)-5-méthyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo(a,d)-cyclohepten-5,10-imine (MM : 337g.mol⁻¹), ([Wong et al., 1986](#))
- APV ou DL-2-amino-5-phosphonovaleric acid (MM : 197,1g.mol⁻¹),([McLennan, 1981](#)).

Deux antagonistes des rNK1 ont également été utilisés :

- SR140333, ((S)-1-{2-[3-(3,4-dichlorophenyl)-1(3-isopropoxyphenylacetyl)piperidin-3-yl]ethyl}-4-phenyl-1 azaniabicyclo [2.2.2]octane (MM : 656,1g.mol⁻¹), ([Edmonds-Alt et al., 1993](#))
- RP67580 ou encore 7,7-diphényl-2 [1-imino-2 (2-méthoxy-phényl)-éthyl]perhydroisoindol-4-one (3 aR, 7 aR) (MM :4381g.mol⁻¹), ([Garret et al., 1991](#)).
- La substance P (MM : 1393 g.mol⁻¹ ; [Sar⁹, Met(O₂)¹¹]-Substance P ; titration : ≥98%) et le NMDA (MM : 147g.mol⁻¹ ; titration : ≥98%) sont également utilisés.

Les doses utilisées pour les injections intraveineuses sont de 0,15mg.kg⁻¹ pour NMDA, 2mg.kg⁻¹ en ce qui concerne RP67580 et 6 à 108μg.kg⁻¹ pour SR140333. Les micro-injections

dans Sp5O sont effectuées en 50msec en employant les quantités suivantes : NMDA, 1nmol et APV, 2fmol dans un volume de 5 à 10nL ; RP67580, 0,2nmol et SR140333, 0,01nmol dans un volume de 20nL. Les micro-injections dans Sp5C sont effectuées en perfusion lente pendant 2min avec les quantités suivantes : NMDA, 0,01 à 5nmol et APV, 1fmol dans un volume de 0,25µL ; RP67580, 4nmol, SR140333, 0,3nmol et substance P, 0,09nmol dans un volume de 0,5µL.

Les substances utilisées proviennent de la société Sigma, hormis SR140333 et RP67580 obtenus auprès de Sanofi Aventis.

5. Analyse histologique des sites d'enregistrement et de micro-injection

Le repérage anatomique des neurones enregistrés est effectué par marquage électrophorétique de bleu de Pontamine au travers de l'électrode d'enregistrement en fin d'expérimentation. Un courant négatif de 5 à 10µA est imposé au travers de la microélectrode d'enregistrement remplie de bleu de Pontamine pendant 30 minutes. Les sites d'injection ont été également marqués par micro-injection de 0,25µl de bleu de Pontamine.

A la fin de l'expérience, l'animal a été sacrifié par une dose létale de pentobarbital, puis perfusé par voie transcardiaque avec une solution de formaldéhyde à 10% pendant 15 minutes. Le cerveau a ensuite été prélevé, conservé au moins 48 heures dans la même solution puis coupé à l'aide d'un microtome à congélation (modèle 1400, Leica Instruments) en coupes frontales de 100µm. Les coupes ont alors été montées sur des lames gélatinées, observées et photographiées. Une contre coloration au rouge neutre a été effectuée et la localisation du point bleu réalisée.

6. Traitement des données et analyse statistique

Les données sont représentées sous la forme : moyenne \pm erreur standard (sauf mention particulière). Le test t de Student, l'analyse de variances à une voie (ANOVA) suivie du test *posthoc* approprié (Tukey ou Dunnet) sont utilisés pour les analyses statistiques comparatives à l'aide du logiciel SigmaStat® 2.03.

II- Traçage rétrograde et immunocytochimie

1. Traçage rétrograde et immunocytochimie Fos

Les animaux (280-300g) sont anesthésiés par injection intrapéritonéale d'hydrate de chloral 400mg.kg⁻¹ et placés dans un cadre de stéréotaxie de type de Horsley-Clarke. Le

traceur rétrograde fluorescent Fluorogold (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) ou hydroxystilbamidine est préparé en solution à 4% dans du tampon phosphate sodique. Ce traceur est ensuite injecté par iontophorèse (courant positif; 5 μ A; 10-15 min) dans le Sp5O à l'aide d'une micro pipette de verre (diamètre interne/externe : 0,58/1mm ; longueur : 150mm), étirée (PE-2, Narishige Instruments) et dont la pointe est coupée à 30 μ m de diamètre interne sous loupe binoculaire. L'injection est réalisée dans la portion dorsale de la partie ventrolatérale du Sp5O (axe antéro-postérieur : -1,8 à -2,3mm par rapport à la ligne inter-aurale ; latéralité : 2,6 à 3mm de la ligne médiane ; profondeur : 7 à 8mm sous la surface du cerveau).

Deux jours après l'injection du traceur rétrograde fluorescent Fluorogold, certains rats sont anesthésiés par injection intrapéritonéale d'uréthane 1,1g.kg⁻¹ avant une injection de formol (100 μ L à 5%) ou de capsaïcine (100 μ L à 0,1%) dans la lèvre supérieure. Ces animaux sont sacrifiés et perfusés deux heures plus tard par voie trans-cardiaque à l'aide d'une solution isotonique de sérum physiologique hépariné (25UI.mL⁻¹ suivie d'une perfusion de paraformaldéhyde 4% et d'acide picrique 0,8% dans un tampon phosphate. Les tronc cérébraux sont prélevés et fixés une nuit dans du sucrose à 4°C. Des coupes coronales de 30 μ m sont effectuées à l'aide d'un microtome à congélation (modèle 1400, Leica Instruments).

Les réactions de double marquage immunohistochimique sont effectuées sur coupes flottantes qui ont été incubées en présence d'un anticorps primaire anti-fluorogold polyclonal obtenu chez le lapin (anticorps anti-fluorogold, Chemicon, Temecula, CA, USA : 1/5000 ; 48h ; 4°C). Un rinçage dans le TBS est effectué. Un anticorps secondaire biotinylé obtenu chez la chèvre et dirigé contre les anticorps de lapin (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA : 1/200, 2h ; température ambiante) est utilisé avant incubation dans un complexe avidine-biotine-peroxydase (kit Vector ABC, 90min, température ambiante). Enfin, la 3,3-diaminobenzidine tétrahydrochloride (DAB) est employée pour révéler l'immunoréactivité du fluorogold.

Les coupes flottantes sont ensuite utilisées pour le second marquage en présence d'un anticorps primaire anti-fos obtenu chez le lapin (c-fos Ab-2, Oncogene Research Products, Cambridge, MA, USA : 1/1000, 48h ; 4°C). Le même anticorps secondaire est employé à la dilution de 1/400. La nickel-DAB permet de détecter Fos.

2. Traçage rétrograde et marquage des rNK1

Un autre double marquage est effectué sur 4 rats. L'injection du traceur rétrograde est réalisée comme décrit au paragraphe précédent.

Après une semaine, les rats injectés sont sacrifiés (pentobarbital) et perfusés. Des coupes coronales de 30µm du tronc cérébral et de la moelle cervicale haute sont effectuées à l'aide d'un microtome à congélation et incubées en présence de l'anticorps primaire anti-rNK1 (1/5000; 48h ; 4°C) avant révélation par un anticorps secondaire marqué au Cy3 (1/600; 2h ; température ambiante).

3. Montage des coupes et analyse

Les coupes de 30µm sont ensuite montées sur lames gélatinées avant d'être couvertes de milieu de montage DPX. Tous les immunomarqueurs sont dilués dans du TBS contenant 0,25% de sérum albumine bovine et 0,3% de triton X-100. Les contrôles de spécificité du marquage consistent à omettre l'anticorps primaire ou à utiliser un anticorps secondaire inapproprié : aucun marquage spécifique n'est mis en évidence ainsi.

Les coupes sont analysées à l'aide d'un microscope à fluorescence (Zeiss Axioplan 2 Imaging) couplé à une caméra digitale (Hamamatsu C4742-95) afin de déterminer les sites d'injection, le marquage Fluorogold, l'immunofluorescence et l'internalisation des rNK1. Les neurones rNK1-positifs et marqués rétrogradement sont comptés à 5 niveaux du Sp5C (sur un plan rostrocaudal, de 0 à -1600µm avec un intervalle de 400µm, zéro étant la jonction entre le Sp5I et le Sp5C). Les neurones qui n'ont pas internalisé les rNK1 présentent une immunofluorescence uniforme au niveau de la surface cellulaire. A l'inverse, les neurones ayant internalisé les rNK1 contiennent dans leur cytoplasme des endosomes immunofluorescents. Nous avons considéré dans cette étude une internalisation des rNK1 lorsque 20 endosomes au moins étaient dénombrés.

RESULTATS

I- Caractéristiques du wind-up des neurones WDR

(“A role of Wind-up in sensory processing: intensity coding of nociceptive stimuli”, soumis)

L'objectif de ce travail est d'étudier les caractéristiques et la fonction du wind-up des neurones WDR trigéminaux.

1. Propriétés générales des neurones WDR du Sp50

Quarante neurones WDR ont été enregistrés au niveau du Sp50. Ces neurones n'ont pas d'activité spontanée et leur champ récepteur cutané est intra- ou péri-oral. Ils répondent aux stimulations mécaniques nociceptives et non nociceptives de leur champ récepteur. Les neurones WDR du Sp50 ont été activés par des stimulations électriques appliquées sur leur champ récepteur. Ce type de stimulation a provoqué, en fonction de l'intensité utilisée, des réponses qui apparaissent à des latences différentes, permettant ainsi l'identification des fibres nerveuses mises en jeu. La figure 6 montre sous forme de balayages uniques l'enregistrement de la réponse d'un neurone à l'application de stimulations percutanées supraliminaires au niveau de son champ récepteur excitateur. Le neurone répond par deux pics successifs de potentiels d'action de latences différentes. La premier pic d'activation est obtenu à une latence moyenne de $2,49 \pm 0,06$ msec et un seuil moyen de $0,12 \pm 0,02$ mA. Lorsqu'on augmente l'intensité de stimulation, il apparaît une réponse plus tardive à une latence moyenne de $84,32 \pm 2,34$ msec. Le seuil d'obtention de cette réponse à longue latence est en moyenne de $78,18 \pm 0,65$ mA. Etant donné que la distance entre le site d'enregistrement et le site de stimulation est de 50 mm environ, nous pouvons déterminer que les vitesses de conduction des fibres périphériques responsables du premier et du second pic sont respectivement de $20 \text{ m} \cdot \text{sec}^{-1}$ et $0,6 \text{ m} \cdot \text{sec}^{-1}$. Ces valeurs correspondent respectivement aux activités des neurones liées à la mise en jeu des contingents de fibres A et C (Gasser & Erlanger, 1927; Burgess & Perl, 1973).

Parallèlement à l'enregistrement des réponses neuronales, nous avons mesuré les variations des paramètres cardio-vasculaires lors de l'application des stimulations électriques de différentes intensités. L'application de stimulations électriques répétées à des intensités inférieures ou égales à 1,5 fois le seuil des réponses C (0,5, 1 ou 1,5) n'entraîne pas de variations importantes de la pression artérielle moyenne. En revanche, l'application de stimulations électriques supérieures ou égales à 2 fois le seuil des réponses C (figure 6 et 7A) entraîne une augmentation significative de la pression artérielle moyenne. Une augmentation

de $6,5 \pm 0,9$ mmHg a été observée à 3 fois le seuil des réponses C. Il faut remarquer que l'augmentation de pression artérielle n'apparaît qu'après un certain nombre de stimulation, suggérant qu'une certaine sommation temporelle est nécessaire pour le déclenchement des variations de pression artérielle. La fréquence cardiaque n'était pas notablement modifiée par l'application de stimulations électriques nociceptives.

Le phénomène de wind-up, qui consiste en l'augmentation progressive de la décharge du neurone lors de l'application de stimulations électriques répétitives à une fréquence de 0,66Hz, a été observé pour tous les neurones enregistrés dans cette étude. La figure 7 illustre un exemple représentatif de ce phénomène de wind-up concernant les réponses d'un neurone WDR du Sp50 lors de la stimulation de son champ récepteur. Noter que le premier stimulus ne provoque que très peu de potentiels d'action, cependant la répétition du stimulus provoque une augmentation progressive de la réponse, plafonnant vers la 10^{ème} stimulation à 3 fois le seuil des réponses C.

2. Influence de l'intensité de stimulation sur le wind-up

Nous avons d'abord étudié l'influence de l'intensité de stimulation sur le wind-up des neurones WDR. Nous avons appliqué 4 intensités de stimulations correspondant à 0,5, 1, 1,5 et 3 fois le seuil des réponses C (figure 7B). Pour une fréquence de 0,66Hz, toutes les intensités de stimulation entraînent un wind-up. L'amplitude du wind-up varie de façon linéaire en fonction de l'intensité de la stimulation (coefficients de détermination (R^2) : 0,95 - 0,99). Il est faible à basse intensité et presque maximal à 3 fois le seuil des réponses C.

Les figures 7C et 7D montrent l'évolution temporelle de la réponse neuronale lors de l'application répétitive de stimulations d'intensités différentes. Trois périodes se démarquent dans l'évolution temporelle des réponses : une augmentation progressive des réponses pendant les premières stimulations, un plateau entre les 10 et 15^{ème} stimulations et une légère diminution des réponses au-delà de la 16^{ème} stimulation. Le nombre de stimulations nécessaires pour atteindre le plateau varie en fonction de l'intensité de stimulation de façon inversement proportionnelle. L'analyse des amplitudes des réponses initiales évoquées par les différentes intensités de stimulation ne montre pas de différence significative. En revanche, à partir de la 4^{ème} stimulation, on note une nette différence dans les amplitudes des réponses neuronales en fonction de l'intensité de stimulation. Ces données suggèrent que la répétition d'une stimulation permet au neurone de coder l'intensité de stimulation.

A basse fréquence (0,1Hz), l'application de stimulations électriques répétitives n'entraîne pas de wind-up. Ce phénomène a été observé pour toutes les intensités de

stimulation (figure 7E). Les pentes initiales ne varient pas en fonction de l'intensité du stimulus électrique appliqué au niveau du champ récepteur ($R^2=0,045$).

A la fréquence de 0,66Hz, l'analyse quantitative de la capacité des neurones WDR du Sp50 à coder l'intensité de stimulation montre une différence significative entre toutes les intensités de stimulation. Il existe une relation linéaire ($r=0,70$) entre l'intensité de la stimulation électrique et l'amplitude de la décharge des neurones du Sp50. En revanche, à plus faible fréquence (0,1Hz), la capacité de codage est réduite. On note une différence significative seulement entre les réponses évoquées par 1 et 3 fois le seuil des réponses. Ceci montre que l'augmentation de la fréquence de stimulation permet au neurone d'améliorer ses capacités de discrimination de l'intensité de la stimulation.

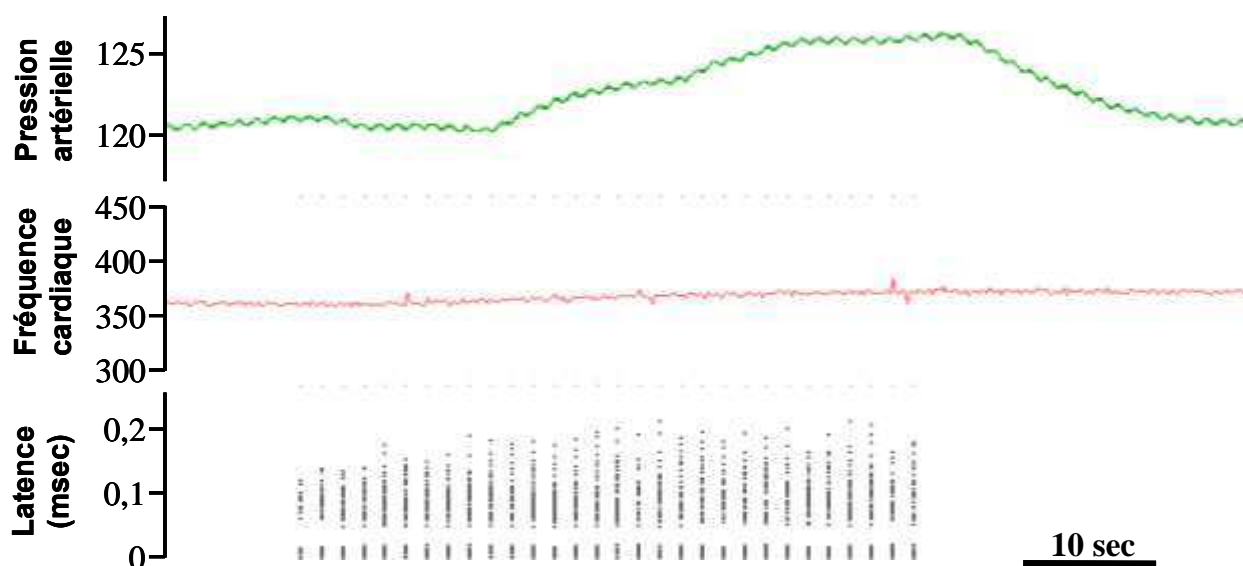


Figure 6

Exemple individuel illustrant les variations des réponses neuronales et cardiovasculaires lors de l'application répétitive de stimulations électriques nociceptives.

Le wind-up est obtenu par l'application d'une stimulation électrique supraliminaire de son champ récepteur (2 fois le seuil des réponses C, 2msec ; 0,66Hz). Chaque potentiel d'action est représenté par un point. L'enregistrement simultané des paramètres cardiovasculaires montre une augmentation de la pression artérielle.

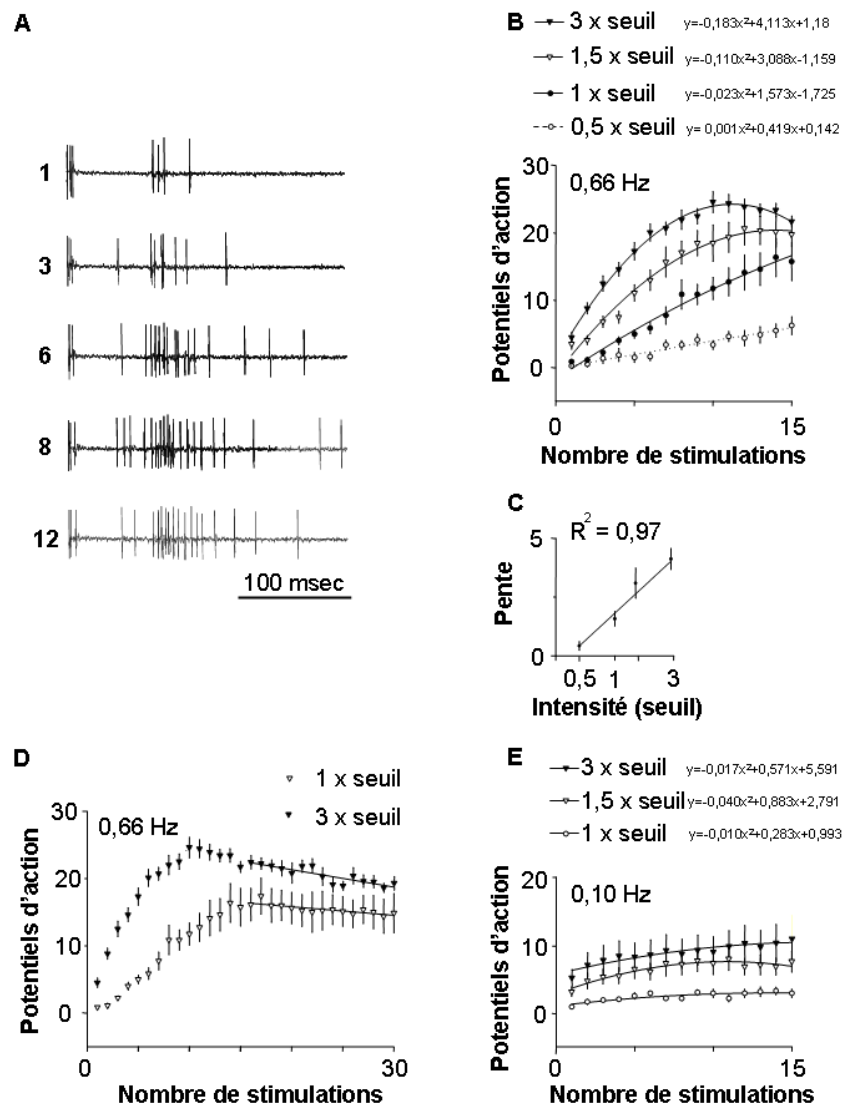


Figure 7

Influence de l'intensité et de la fréquence de stimulation sur le wind-up des neurones WDR du Sp5O.

A. Wind-up d'un neurone du Sp5O consécutif à une stimulation électrique répétée de son champ récepteur cutané (0,66Hz; 2 msec; 3x seuil de réponse des fibres C; stimulations 1, 3, 6, 8 et 12 représentées).

B. Evolution de la réponse neuronale lors de l'application répétitive (0,66Hz) de stimulations électriques d'intensité croissante. Les intensités de stimulations utilisées correspondent à 0,5, 1, 1,5 et 3 fois le seuil des réponses C. Un wind-up est observé pour toutes les intensités supraliminaire (n=10 par groupe).

C. Corrélation entre la pente du wind-up et l'intensité de stimulation. L'équation des courbes réponses est analysée par régressions polynomiales de second ordre.

D. Des séries de 30 stimulations successives à 0,66Hz mettent en évidence une stabilisation puis une baisse de la réponse au-delà de 10 stimulations.

E. Evolution de la réponse neuronale lors de l'application répétitive (0,1Hz) de stimulations électriques d'intensité croissante. Les intensités de stimulations utilisées correspondent à 1, 1,5 et 3 fois le seuil des réponses C.

3. Le wind-up augmente transitoirement l'excitabilité des neurones WDR

Il a été récemment montré que l'excitabilité centrale générée par le wind-up entraîne principalement une augmentation de la taille du champ récepteur des neurones évoqués par une stimulation à 3 fois le seuil des réponses C (Li *et al.*, 1999b). Afin d'évaluer l'influence de l'excitabilité centrale générée par le wind-up sur les réponses des neurones WDR, nous avons réalisé le protocole suivant (figure 8A). Nous avons appliqué un train de 300 stimulations répétées à 0,66Hz :

- les 15 premières stimulations à une intensité de 0,5 fois le seuil des réponses C,
- de la 16^{ème} à la 30^{ème}, à une intensité de 1,5 fois le seuil des réponses C,
- à partir de la 31^{ème} à une intensité de 0,5 fois le seuil des réponses C.

Cette étude a permis de faire 2 observations. Premièrement, l'application d'une stimulation à faible intensité suffisante pour activer les fibres C mais insuffisante pour mettre en jeu une réponse C des neurones WDR (0,5 fois le seuil) entraîne une modification de l'excitabilité centrale illustrée par une amplification des réponses évoquées par une intensité égale à 1,5 fois le seuil des réponses C. Au cours des stimulations 16 à 30, toutes les réponses (▲), y compris les réponses initiales, sont augmentées par rapport à des stimulations effectuées sans conditionnement (◆) (figure 8B). Cependant, la pente d'amplification, c'est-à-dire le wind-up, est inchangée. Deuxièmement, à partir de la stimulation 31, on note une baisse rapide de l'amplitude des réponses qui reste cependant à un niveau supérieur à celui évoqué initialement durant les 15 premières stimulations. L'hyperexcitabilité des neurones persiste pendant les 90 stimulations suivantes, soit environ 2 minutes (figure 8A).

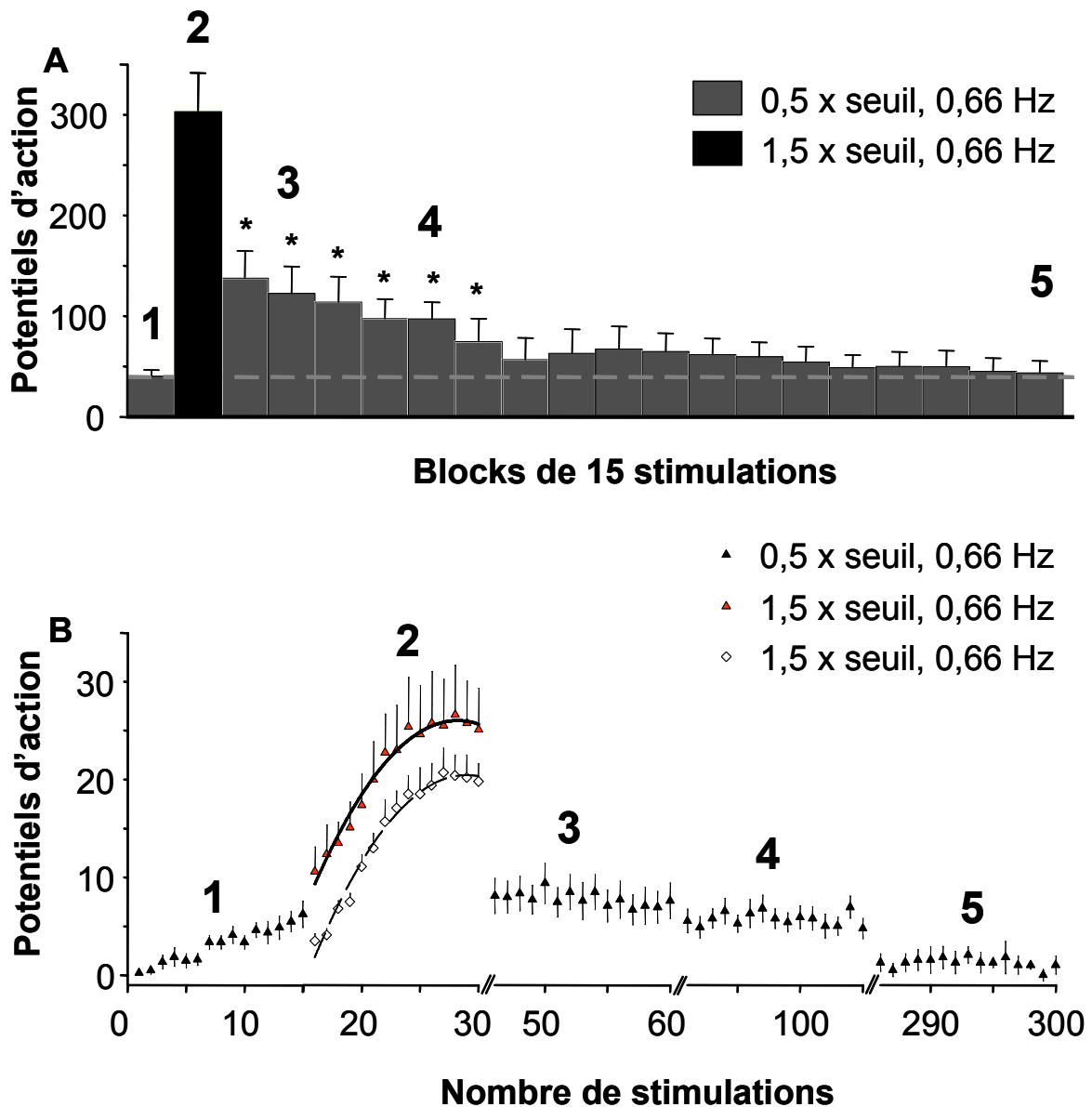


Figure 8

Le wind-up augmente transitoirement l'excitabilité des neurones WDR du Sp5O.

Application d'un train de 300 stimulations électriques répétées à 0,66Hz pour une intensité de stimulation de 0,5 fois le seuil de réponse des fibres C hormis pour les stimulations 16 à 30 pour lesquelles l'intensité est augmentée à 1,5 fois ce même seuil (n=10 par groupe).

A. Somme des potentiels d'action obtenus pour des blocs de 15 stimulations successives à 0,5 fois le seuil (en gris) et 1,5 fois le seuil (en noir).

B. Représentation du nombre de potentiels obtenus à chacune des stimulations pour les blocs 1, 2, 3, 4 et 5. Les stimulations effectuées au cours du train de 300 stimulations sont notées \blacktriangle et \blacktriangle (0,5x et 1,5x seuil, respectivement). Un train isolé de 15 stimulations à 1,5x le seuil est représenté (\diamond).

4. Discussion

Le Sp50 constitue la division la plus rostrale du noyau spinal du complexe sensitif du trijumeau. Ce noyau a été récemment impliqué dans le traitement des messages nociceptifs issus préférentiellement des régions buccales et péri-buccales. Il contient des neurones qui répondent à la fois aux stimulations tactiles et nociceptives, c'est à dire des neurones WDR. Ces neurones codent d'une façon remarquable l'intensité des stimulations électriques et mécaniques appliquées sur leur champ récepteur. Ces neurones sont activés par la mise en jeu de fibres myélinisées de type A et par des fibres amyéliniques C (Dallel *et al.*, 1999). Enfin, le phénomène de wind-up est exprimé par la majorité des neurones WDR du Sp50. Cette caractéristique a été mise à profit pour étudier les caractéristiques du wind-up, sa fonction et les conséquences du wind-up sur l'excitabilité centrale.

Dans ce travail, nous montrons que lorsque des stimulations répétitives nociceptives sont appliquées à une fréquence de 0,66Hz, il existe une relation linéaire entre l'intensité de la stimulation et la pente du wind-up. En revanche, après application de stimulations nociceptives à basse fréquence (0,1Hz), ne mettant pas en jeu le phénomène de wind-up, cette relation n'est plus vérifiée. En accord avec les travaux précédents effectués dans la corne dorsale de la moelle ou le Sp5C (Dickenson & Aydar, 1991; Meng *et al.*, 1997; Craig & Andrew, 2002), nos résultats montrent que les réponses initiales évoquées par les différentes intensités de stimulation sont très proches. De même, les études psychophysiques chez l'homme ont montré que l'intensité de la sensation initiale évoquée par des stimulations électriques ou thermiques d'intensités différentes est similaire (Lundberg *et al.*, 1992; Vierck, Jr. *et al.*, 1997; Nielsen & Arendt-Nielsen, 1998). Cependant, des différences dans l'amplitude des réponses neuronales évoquées par des intensités différentes apparaissent avec la répétition des stimuli. Une différence dans l'intensité des sensations s'observe également chez l'homme lors de la l'application de stimulations répétitives (Poulos *et al.*, 1984; Lundberg *et al.*, 1992; Vierck, Jr. *et al.*, 1997; Nielsen & Arendt-Nielsen, 1998). Ces résultats suggèrent que le wind-up permet d'améliorer les capacités de discrimination de l'intensité de stimulations nociceptives de courte durée. Il est intéressant de noter que le wind-up est une caractéristique des neurones WDR qui sont connus pour leur aptitude à coder de façon fine et notamment l'intensité des stimulations nociceptives. En revanche, les neurones nociceptifs spécifiques (NS), qui ne présentent qu'exceptionnellement un wind-up, ont une capacité de codage réduite de l'intensité du stimulus nociceptif (Schouenborg & Sjölund, 1983; Price *et al.*, 2003).

L'analyse de l'évolution temporelle des réponses neuronales lors de l'application de stimulations électriques répétitives montre que les réponses suivent trois périodes : une augmentation initiale suivie d'un plateau puis une diminution progressive des réponses. Une évolution comparable a été obtenue lors d'enregistrement dans la moelle de neurones WDR, de motoneurones (Schouenborg & Sjölund, 1983) et de réflexes aux fibres C (Gozariu *et al.*, 1997). Chez le singe, Wagman et Price ont constaté que le phénomène de wind-up initial était suivi par une diminution des réponses (Wagman & Price, 1969). Les mécanismes sous-tendant cette baisse des réponses neuronales seraient d'origine supraspinale. En effet, l'augmentation progressive des réponses d'une stimulation à la suivante serait plus marquée chez le rat spinalisé que chez le rat non spinalisé (Gozariu *et al.*, 1997). Un mécanisme similaire pourrait agir sur le wind-up des neurones WDR du Sp5O.

En ce qui concerne l'influence du wind-up sur l'excitabilité centrale, Li et collaborateurs ont montré que l'excitabilité centrale générée par le wind-up entraîne principalement une augmentation de la taille du champ récepteur des neurones évoqués par d'une stimulation à 3 fois le seuil des réponses C (Li *et al.*, 1999b). Ils ont également montré que l'excitabilité dure environ 100 secondes. Dans notre étude, nous avons évalué l'effet de l'excitabilité des neurones générée par le wind-up sur des réponses des neurones WDR évoquées par des stimulations électriques infraliminaires (égale à 0,5 fois le seuil des réponses C). Nous avons constaté, après le conditionnement, une augmentation de l'amplitude des réponses évoquées par l'application de stimulations à 0,5 fois le seuil des réponses C. Ce phénomène dure environ 2 min.

En conclusion, nos travaux suggèrent que le wind-up est un phénomène physiologique permettant le codage de l'intensité de stimulation nociceptive de courte durée. La modification d'excitabilité générée par le wind-up entraîne essentiellement une facilitation des réponses évoquées par la mise en jeu des fibres C. Elle n'induit pas de modification responsable de symptômes douloureux rencontrés en clinique tel que l'hyperalgésie secondaire. Ainsi, l'augmentation de l'excitabilité centrale générée par le wind-up et la sensibilisation centrale sont des phénomènes différents.

II- Role des rNMDA dans la modulation du wind-up

(Bidirectional modulation of wind-up by NMDA receptors in the rat spinal trigeminal nucleus, *European Journal of Neuroscience*, 2004)

Les mécanismes sous-tendant le wind-up ont fait l'objet d'une recherche très active au cours de ces dernières années ([Herrero et al., 2000](#)). Les travaux ont clairement démontré l'implication des rNMDA. Les données immunohistochimiques ont montré que les rNMDA sont présents dans les couches superficielles et profondes de la moelle et du Sp5C, ainsi que dans le Sp5O. Le rôle fonctionnel de ces récepteurs dans le wind-up n'est pas clairement établi sachant que les neurones des couches superficielles qui sont majoritairement des neurones nociceptifs ont peu ou pas de wind-up mais reçoivent directement les messages véhiculés par les fibres C alors que les neurones des couches V (moelle et Sp5C) et Sp5O présentent le phénomène de wind-up mais reçoivent indirectement les messages véhiculés par les fibres C.

Dans cette étude, nous souhaitons répondre à deux questions :

- Comment l'information nociceptive provenant des fibres C est-elle transférée vers les neurones WDR?
- Quel est le rôle des rNMDA dans la modulation du wind-up des neurones WDR?

1. Voies d'activation des neurones WDR par les fibres C

Nous avons combiné l'étude de l'expression de c-fos à la suite d'une stimulation nociceptive (capsaïcine 0,1% dans la lèvre supérieure), permettant d'identifier les neurones nociceptifs, avec celle du traçage rétrograde (Fluorogold) à partir du Sp5O, pour détecter les neurones du Sp5C projetant sur le Sp5O. Fos est fortement révélée au niveau des couches I-III du Sp5C (n=5), et très peu au sein des couches plus profondes (figure [9C](#)). Nous avons observé que les corps cellulaires des neurones marqués de façon rétrograde depuis le Sp5O (n=8) sont localisés au sein des couches III et IV du Sp5C homolatéral, également dans la couche V et moins fréquemment dans la couche II (figure [9B](#)). Les neurones doublement marqués dans Sp5C se situent dans la couche I et la zone la plus superficielle de la couche III (figures [9D et E](#)).

Ces données suggèrent que l'information nociceptive véhiculée par les fibres C parvient aux neurones WDR par l'intermédiaire d'interneurones dont les corps cellulaires sont localisés dans les couches superficielles du Sp5C.

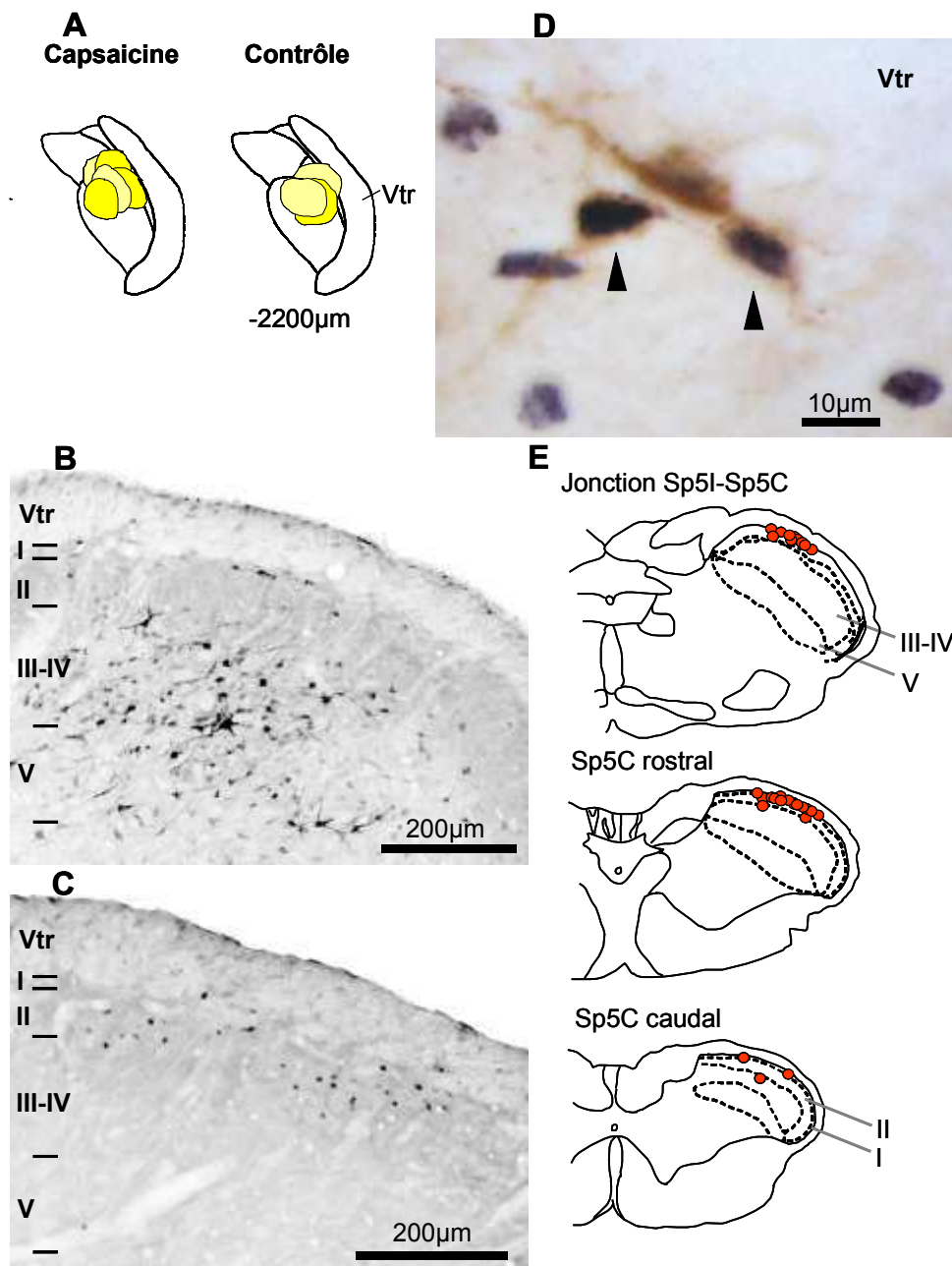


Figure 9

Voies d'activation des neurones WDR par les fibres C

A. Site d'injection du Fluorogold dans le Sp5O pour les animaux contrôles et les animaux pour lesquels les nocicepteurs C sont sélectivement activés par injection de capsaïcine (0,1%) dans la lèvre supérieure du rat.

B. Vue à faible grossissement de la partie rostrale du Sp5C montrant la présence de neurones marqués après traçage rétrograde.

C. Image de noyaux immunopositifs pour Fos dans la partie rostrale du Sp5C suite à l'injection de capsaïcine dans la lèvre supérieure de l'animal.

D. Vue au fort grossissement des neurones doublement marqués (immunopositifs pour le fluorogold et pour Fos ; ces neurones sont indiqués par des flèches).

E. Schémas illustrant la distribution des neurones doublement marqués à trois niveaux du Sp5C (n=5 rats).

Les couches I à V du Sp5C, ainsi que la racine descendante du CST (Vtr) sont indiqués.

La taille des barres de calibration est mentionnée.

2. Les rNMDA situés dans le Sp5O sont impliqués dans le phénomène de wind-up

L'objectif de cette étude est donc de préciser le rôle des rNMDA dans le wind-up. Nous avons évalué les effets de la micro-injection d'antagonistes (APV, MK801) et d'un agoniste (NMDA) des rNMDA dans le Sp5C ou le Sp5O, sur les réponses des neurones WDR du Sp5O provoquées par la stimulation électrique transcutanée de leur champ récepteur excitateur (figure 10A).

Dans ce travail, cinquante-cinq neurones ont été enregistrés dans le Sp5O. La grande majorité de ces neurones ne sont pas spontanément actifs mais répondent à des stimulations mécaniques d'intensité croissante de leur champ récepteur situé dans la région péri orale ou nasale (exclusivement maxillaire [n=43] ou ophtalmique [n=1], mixte [n=11]). Comme décrit précédemment, les neurones répondent par deux pics successifs de potentiels d'action de latences différentes (figure 10C). La premier pic d'activation est obtenu à une latence moyenne de $2.51 \pm 0,11$ msec et un seuil moyen de $0,30 \pm 0,05$ mA. Lorsqu'on augmente l'intensité de stimulation, il apparaît une réponse plus tardive à une latence moyenne de $81,18 \pm 3,49$ msec. Le seuil d'obtention de cette réponse à longue latence est en moyenne de $7,49 \pm 0,61$ mA. Ces valeurs correspondent à des vitesses de conduction périphériques de fibres A et C. Enfin, tous les neurones enregistrés présentent un phénomène de wind-up lors de l'application de stimulations électriques répétitive de leur champ récepteur (figure 10B).

La micro-injection d'APV (2fmol) dans le Sp5O (n=7) a provoqué une diminution du wind-up des neurones du Sp5O de $24 \pm 6\%$ après 40min ($p < 0,05$) avec un retour progressif et presque complet obtenu 75min après injection. Ce résultat montre que le wind-up des neurones WDR du Sp5O dépend des rNMDA situés localement (figure 11A et B). La réponse initiale aux latences C est diminuée de façon non significative de $8,1 \pm 2,5$ à $5,3 \pm 2,4$ potentiels d'action (n=7). Les réponses aux latences A ne sont pas significativement modifiées par l'injection d'APV.

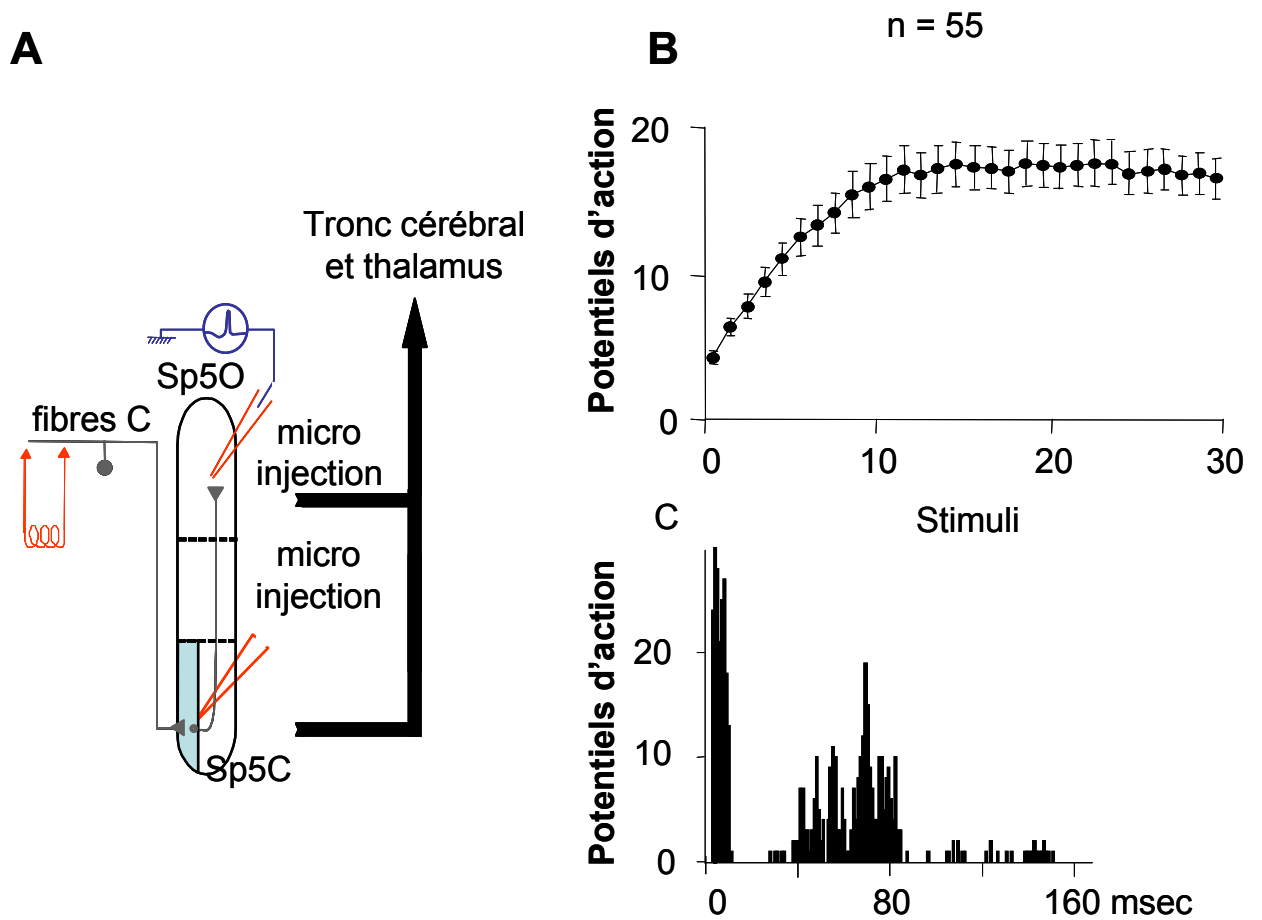


Figure 10

Les neurones WDR du Sp50 présentent un wind-up en réponse à des stimulations nociceptives répétitives des fibres C

A. Diagramme schématique illustrant le protocole expérimental suivi en électrophysiologie.

B. Evolution au cours des 30 stimulations successives du nombre moyen de potentiels d'action obtenus aux latences des fibres C (\pm erreur standard) pour les 55 neurones enregistrés.

C. Exemple individuel montrant les réponses cumulées de 30 stimulations électriques (durée : 2msec; fréquence : 0,66Hz ; intensité : 3x seuil de réponse C) enregistrées à partir d'un neurone WDR isolé.

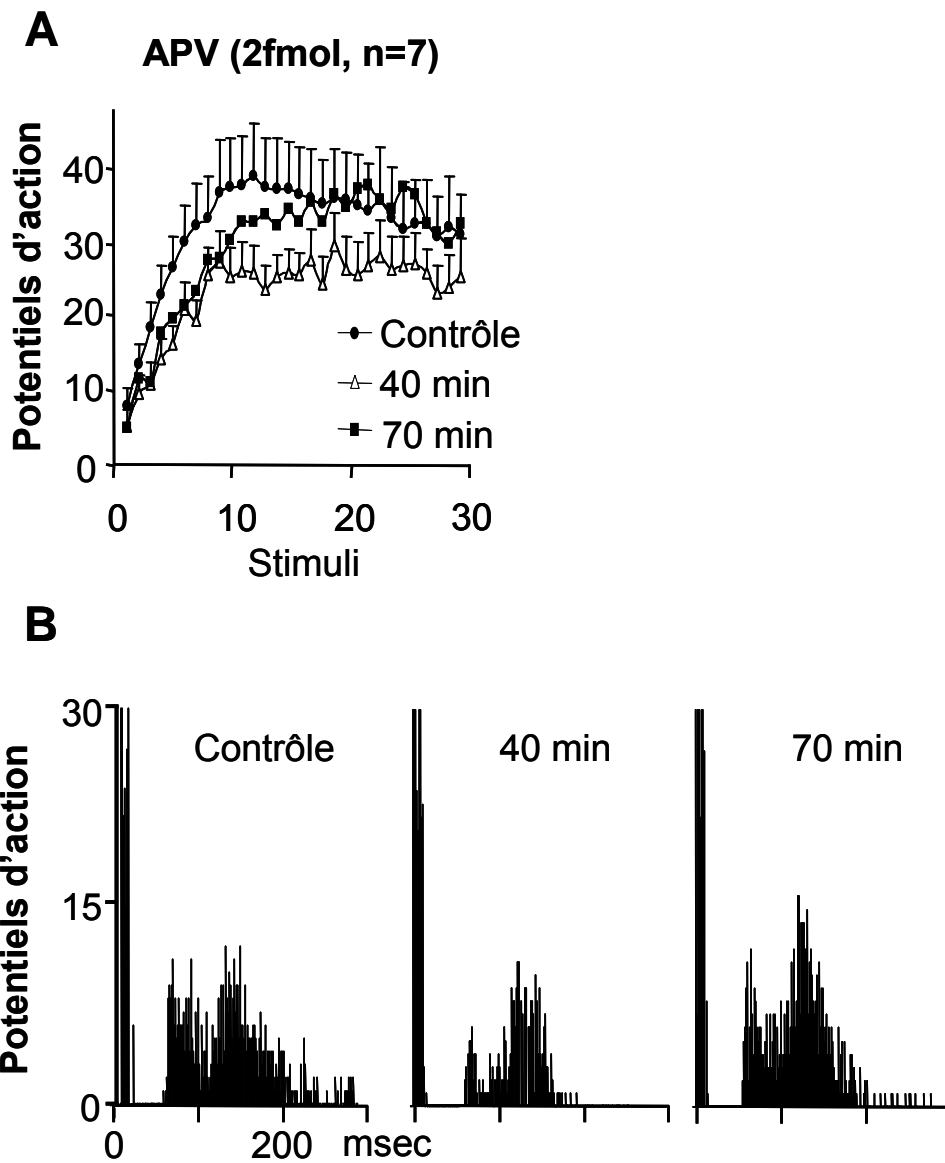


Figure 11

Le wind-up des neurones WDR du Sp5O dépend des rNMDA situés localement.

A. La micro-injection de l'antagoniste des rNMDA APV (2fmol) dans le Sp5O diminue de façon réversible le wind-up des neurones WDR du Sp5O.

B. Histogrammes post-stimulus(PSTH) illustrant le déroulement temporel de l'effet d'APV sur les réponses cumulées d'un neurone du Sp5O.

Les micro-injections de NMDA (1nmol) provoquent un déclenchement immédiat et systématique de bouffées de potentiels d'actions pendant une minute (1746 ± 46 potentiels d'action). Elles provoquent également une augmentation réversible du wind-up de $62 \pm 19\%$ à 5min ($p < 0,001$) pour 12 des 17 neurones enregistrés dans le Sp5O, avec un retour constaté 15 minutes après injection (figures 12A et B). Pour 5 autres neurones, les micro-injections de NMDA sont restées sans effet sur le wind-up. La réponse initiale n'est pas augmentée de façon significative par l'administration de NMDA dans le Sp5O (de $4,7 \pm 0,7$ à $6,1 \pm 1,3$ potentiels d'action ; $n=12$).

Des micro-injections répétées de NMDA entraînent une augmentation progressive des décharges de potentiels d'action des neurones WDR (figure 12C). Cet effet est bloqué par injection intraveineuse de MK-801 ($0,15\text{mg.kg}^{-1}$). Les résultats montrent que l'activation des rNMDA présents dans le Sp5O peut faciliter le phénomène du wind-up.

3. L'activation des rNMDA dans le Sp5C diminue le wind-up des neurones du Sp5O

Cette série d'expérimentations a pour objectif l'évaluation de l'influence des récepteurs NMDA du Sp5C sur le wind-up des neurones WDR du Sp5O. Contrairement aux effets constatés lors de micro-injections dans le Sp5O, nous avons observé que la micro-injection d'APV (1fmol) dans les couches superficielles du Sp5C provoquait, après un délai de 10 minutes, une augmentation de $83 \pm 44\%$ ($p < 0,05$, $n=9$) du wind-up des neurones du Sp5O avec un retour obtenu au bout de 35 minutes (figures 13A et B). La réponse initiale n'était pas affectée par la micro-injection d'APV (de $4,4 \pm 0,7$ à $6,0 \pm 0,9$ potentiels d'action ; $n=9$). De même, les réponses dues à la mise en jeu des fibres A ne sont pas modifiées par la micro-injection d'APV. En revanche, la micro-injection de NMDA dans les couches superficielles du Sp5C entraîne une diminution dose dépendante du wind-up des neurones du Sp5O (figures 14A à C) sans affecter la réponse C initiale et les réponses dues à la mise en jeu des fibres A. L'effet du NMDA varie en fonction de la localisation du site d'injection (figure 14D). Les micro-injections de NMDA dans les couches superficielles (I-II, $n = 5$) entraînaient une abolition totale et rapide de la réponse après 5 min. Dans les couches III-IV, ($n = 4$), le NMDA entraînait une abolition partielle des réponses. Dans les couches profondes (V-VI, $n = 4$), le NMDA n'induisait de réduction des réponses C qu'au bout de 25 minutes. Ces résultats suggèrent que l'effet du NMDA micro-injecté dans les couches profondes est lié à une diffusion de la molécule vers les couches superficielles.

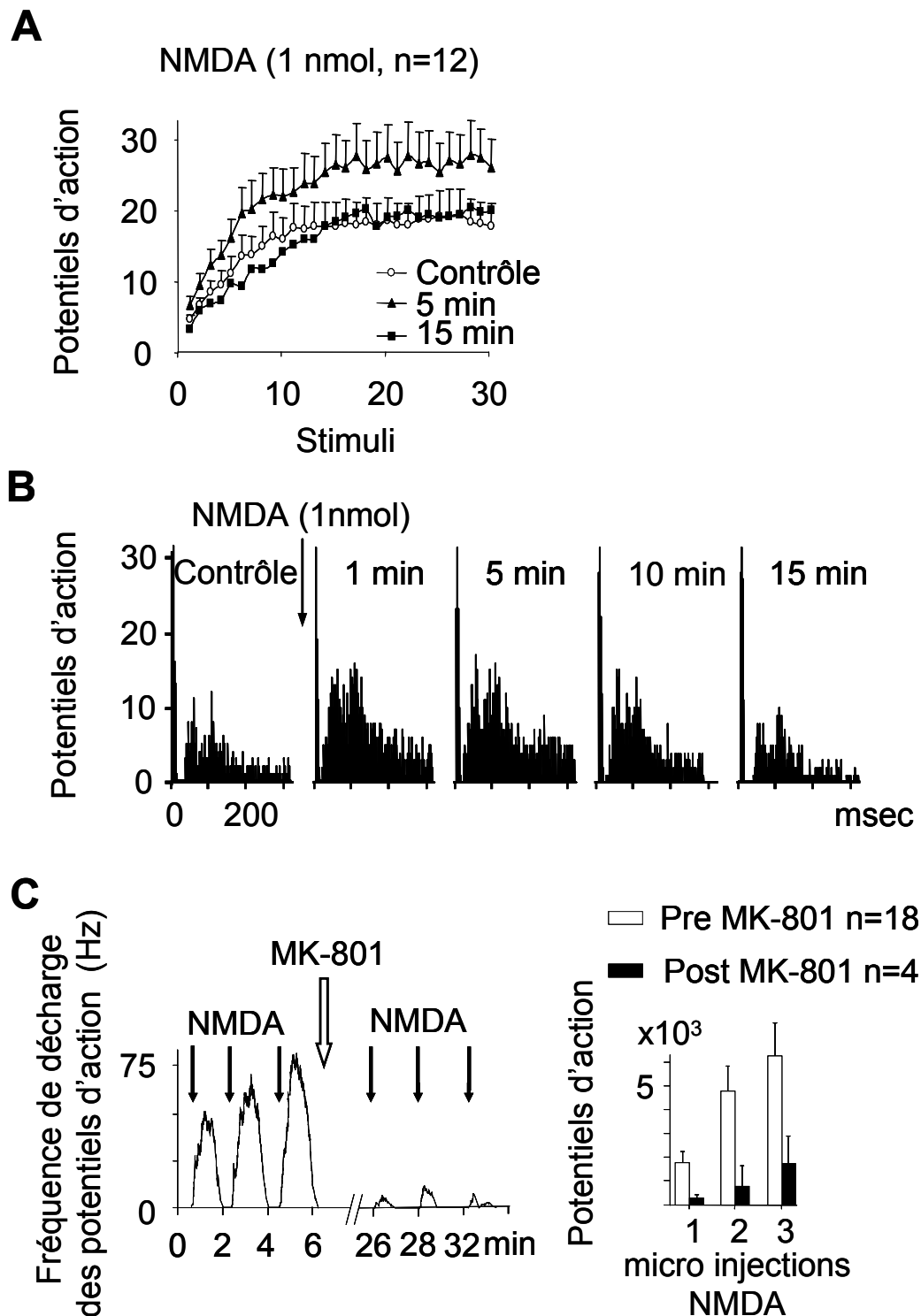


Figure 12

Les rNMDA du Sp5O sont impliqués dans le wind-up des neurones WDR du Sp5O.

A. Une micro-injection de 1nmol de NMDA dans le Sp5O provoque une augmentation réversible du wind-up du neurone enregistré dans le Sp5O.

B. Histogrammes post-stimulus illustrant le déroulé temporel de l'effet de NMDA sur les réponses cumulées d'un neurone isolé dans le Sp5O.

C. L'activation à faible fréquence des rNMDA par micro injections répétées de NMDA (1nmol) dans le Sp5O est capable de reproduire le wind-up. Cette réponse est bloquée par injection intraveineuse de MK-801 ($0,15\text{mg.kg}^{-1}$). Un exemple individuel est illustré à gauche et les résultats moyens sont figurés à droite.

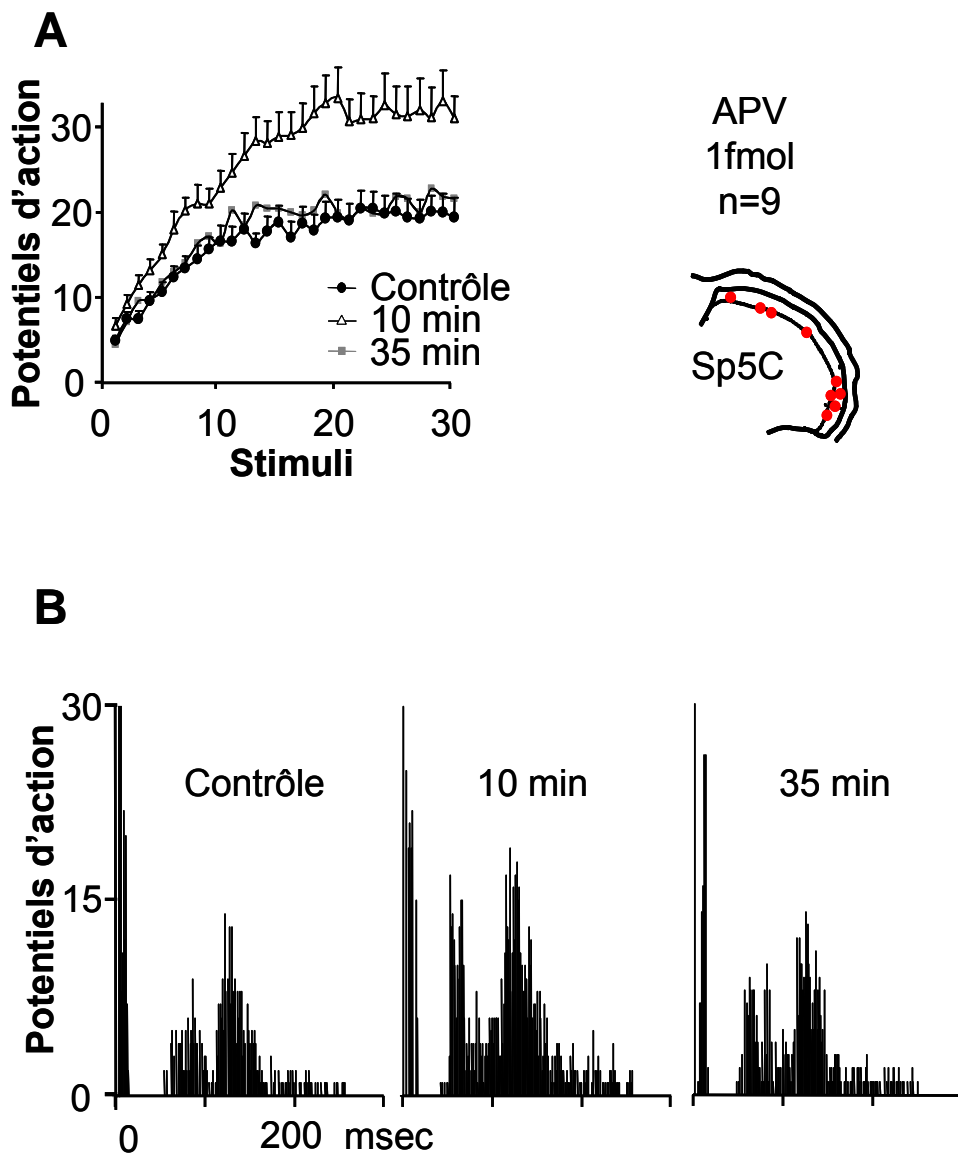


Figure 13

Le wind-up des neurones WDR du Sp5O est diminué par activation des rNMDA situés dans les couches superficielles du Sp5C.

A. La micro-injection de l'antagoniste APV (1fmol) dans les couches superficielles du Sp5C augmente le wind-up des neurones WDR du Sp5O de façon réversible. Les sites d'injection sont figurés à droite.

B. PSTH illustrant le déroulement temporel de l'effet de l'injection d'APV dans le Sp5C sur les réponses cumulées d'un neurone du Sp5O.

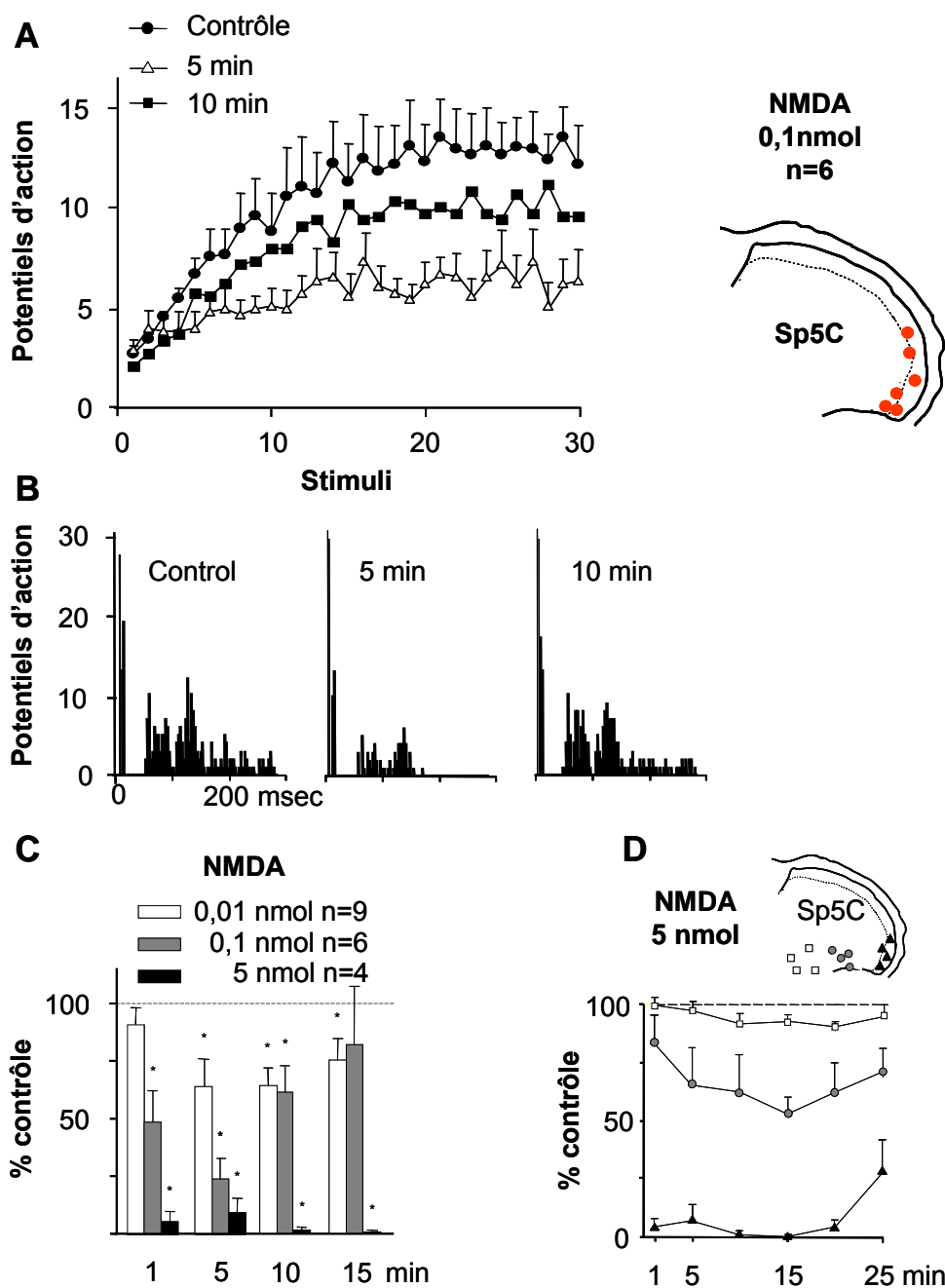


Figure 14

L'activation des rNMDA localisés dans les couches superficielles du Sp5C inhibe le wind-up des neurones WDR du Sp5O.

A. La micro-injection de NMDA (0,1nmol) dans les couches superficielles du Sp5C diminue le wind-up des neurones WDR du Sp5O de façon réversible. Par soucis de lisibilité, les barres d'erreur ont été omises pour la courbe de retour, 10min après injection de NMDA. Les sites d'injection sont figurés à droite.

B. Histogramme post-stimulus illustrant le déroulé temporel de l'effet de l'injection de NMDA dans le Sp5C sur les réponses cumulées d'un neurone du Sp5O.

C. L'effet inhibiteur du NMDA appliqué dans les couches superficielles du Sp5C est dose dépendant. (* significativement différent des contrôles qui précèdent l'injection)

D. L'effet inhibiteur du NMDA dépendant du site de la micro-injection.

4. Discussion

Nos résultats montrent qu'un nombre important de neurones nociceptifs WDR situés dans le Sp5O sont contactés par une sous population d'interneurones qui conduisent l'information nociceptive depuis les couches superficielles du Sp5C où aboutissent les afférences de type C. D'autre part, la fonction des rNMDA dans le phénomène de wind-up dépend de leur localisation dans les réseaux neuronaux segmentaires de la nociception. Ainsi, l'activation des rNMDA situés dans le Sp5O amplifie le phénomène de wind-up des neurones nociceptifs WDR situés dans le Sp5O, alors que l'activation des rNMDA situés dans les couches superficielles du Sp5C met en jeu un mécanisme inhibiteur de ce phénomène. Nous pouvons ainsi proposer un nouveau rôle inhibiteur des rNMDA dans les mécanismes de la nociception au niveau segmentaire. Ce mécanisme inhibiteur est activé de façon non tonique, car APV n'a pas d'effet sur l'activité spontanée.

Comme lors de travaux antérieurs, la distribution du marquage de Fos, induit par la capsaïcine, se situe dans les couches I et II du Sp5C où aboutissent les terminaisons des fibres C (Hunt *et al.*, 1987; Strassman & Vos, 1993). Compte tenu de la faible dose de capsaïcine employée (0,1%), on peut penser que seules les fibres C ont été activées (Holzer, 1991) et que l'expression de Fos résulte donc de l'activation des afférences nociceptives de type C. Le co-marquage Fos avec le traceur rétrograde (fluorogold) a montré l'existence d'interneurones des couches superficielles du Sp5C qui véhiculent les messages des afférences de type C vers les cellules WDR du Sp5O. Ce résultat est en accord avec ceux publiés auparavant (Dallel *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2001; Chiang *et al.*, 2002). Cette relation anatomo-fonctionnelle Sp5C-Sp5O est retrouvée au niveau de la corne dorsale de la moelle où il a été montré que les neurones WDR des couches profondes étaient contactés par une voie polysynaptique véhiculant les messages de type C depuis les couches superficielles (Ritz & Greenspan, 1985; Light & Kavookjian, 1988; Li *et al.*, 1999c; Nakatsuka *et al.*, 2002).

Nos travaux indiquent qu'à l'aboutissement du réseau nociceptif segmentaire, c'est à dire dans le Sp5O, le wind-up des neurones WDR est élaboré en partie par des rNMDA de ce noyau. Ils confirment ceux, antérieurs, sur l'implication des rNMDA dans l'élaboration du wind-up des neurones de la corne dorsale de la moelle (Davies & Lodge, 1987; Dickenson & Sullivan, 1990) et du CST (Parada *et al.*, 1997; Luccarini *et al.*, 2001; Woda *et al.*, 2001). Au niveau cellulaire, la sommation temporelle des potentiels lents excitateurs post synaptiques peut conduire à une dépolarisation cumulative (Sivilotti *et al.*, 1993) engendrant des

ouvertures supplémentaires des récepteurs canaux (Mg^{2+} dépendant) et peut ainsi promouvoir un wind-up (Woolf & Salter, 2000). Il est improbable que la libération de glutamate par les fibres C atteigne directement les récepteurs NMDA postsynaptiques des neurones WDR du Sp5O, comme ceux de la couche V de la corne dorsale de la moelle (Light & Perl, 1979b; Ralston, III & Ralston, 1982; Sugiura *et al.*, 1986; Dallel *et al.*, 1998). On peut penser que le glutamate qui active les rNMDA des cellules WDR du Sp5O ou des couches profondes de la corne dorsale est libéré par des interneurons transmettant le message nociceptif depuis les neurones des couches superficielles.

Cependant malgré l'amplification de la réponse de type C durant le wind-up, ce dernier demeure sous un contrôle inhibiteur NMDA dépendant. Cette inhibition dépend des rNMDA localisés dans les couches superficielles comme cela avait été suggéré par des travaux antérieurs (Luccarini *et al.*, 2001; Woda *et al.*, 2001). Ce mécanisme est différent des contrôles inhibiteurs hétérotopiques (comme le CIDN) car il est mis en jeu lors de la stimulation du champ récepteur du neurone WDR enregistré ; il n'est pas tonique mais consécutif à une stimulation nociceptive périphérique au niveau du champ récepteur du neurone considéré.

Il ne semble pas dépendre de la mise en jeu des fibres de gros diamètre myélinisées (type A β) car l'inhibition n'est pas mise en jeu à partir des couches III–IV de la corne dorsale de la moelle où sont retrouvées la plupart des terminaisons des fibres A β (Light & Perl, 1979a; Willis & Coggeshall, 1991). De plus, au niveau de la corne dorsale de la moelle, les rNMDA sont impliqués dans la neurotransmission des messages nociceptifs (via les fibres C) et non pas ceux d'origine non-nociceptive (Morris, 1989; King & Lopez-Garcia, 1993). Plusieurs types d'interneurones inhibiteurs contenant du GABA, de la glycine ou des enképhalines (Hunt *et al.*, 1981; Todd & Lochhead, 1990) ont été décrits dans les couches superficielles de la corne dorsale du rat. Ces interneurons pourraient être impliqués dans l'inhibition du wind-up NMDA dépendante. En effet, les terminaisons des afférences primaires amyéliniques contactent des neurones GABAergiques (Bernardi *et al.*, 1995). De plus, certains de ces neurones inhibiteurs expriment Fos lors de stimulations nociceptives (Todd *et al.*, 1994). Cette expression de Fos, induite par injection intradermique de capsaïcine, au niveau des neurones GABAergiques peut être diminuée par administration d'antagoniste des rNMDA (Zou *et al.*, 2001).

En conclusion, le rôle des rNMDA segmentaires dépend donc étroitement de leur localisation au sein des réseaux nociceptifs segmentaires. Alors que certains rNMDA contribuent effectivement à l'amplification du message douloureux, d'autres agissent

simultanément dans le sens opposé. Le modèle trigéminal permet donc de montrer que, dès l'étage segmentaire, existe un ajustement permanent de l'amplification du message douloureux.

En situation physiologique, un tel mécanisme pourrait prévenir la sensibilisation à la douleur, c'est à dire la transformation d'une douleur normale en douleur anormale. En situation pathologique, l'atteinte de ce mécanisme pourrait aboutir à l'expression d'une douleur exagérée. De façon plus générale, ce mécanisme pourrait constituer une cible permettant d'intervenir dans la modulation du processus d'amplification de la douleur.

III- Les rNK1 dans la modulation du wind-up

En accord avec les données de la littérature, l'étude précédente a démontré l'implication des rNMDA dans le wind-up des neurones WDR. Toutefois, le blocage des rNMDA diminue partiellement le wind-up mais ne le supprime pas (Russo & Hounsgaard, 1994; Baranauskas & Nistri, 1996; Morisset & Nagy, 1996). Ceci fait supposer la mise en jeu d'autres récepteurs impliqués dans ce phénomène. Plusieurs arguments plaident en faveur d'un rôle des rNK1 dans la modulation du wind-up (Kellstein *et al.*, 1990; Xu *et al.*, 1992; Laird *et al.*, 1993; Budai & Larson, 1996; Baranauskas & Nistri, 1998; De Felipe *et al.*, 1998). Par exemple, l'administration intrathécale ou intraveineuse d'antagonistes des rNK1 réduit le wind-up des neurones WDR et des motoneurones de la moelle. De même, l'ablation sélective des neurones rNK1-positifs des couches superficielles par administration intrathécale du complexe substance P/saporine (Mantyh *et al.*, 1997) réduit le wind-up des neurones WDR. Enfin, les résultats obtenus au cours de ces dernières années chez des souris transgéniques mutantes pour le gène du précurseur de la substance P (préprotachychinine A) ou pour le récepteur NK1 montrent que le wind-up dépend en partie des rNK1 (De Felipe *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 2003). Récemment, l'équipe de Suzuki a montré que le wind-up des neurones WDR de la couche V de la moelle ne dépend pas des rNK1 des neurones de projection de la couche I suggérant que ce phénomène dépend d'un mécanisme segmentaire (Suzuki *et al.*, 2002). L'objectif de cette étude est d'identifier le réseau neuronal segmentaire sous-tendant le wind-up des neurones WDR trigéminaux. Il est intéressant de noter que la majorité des neurones qui expriment le wind-up n'expriment pas le rNK1 suggérant que l'effet de la substance P sur le wind-up est indirect ou met en jeu un mécanisme de transmission volumique.

1. Le wind-up est dépendant des récepteurs NK1

Dans un premier temps, nous avons évalué l'effet de l'administration intraveineuse d'antagonistes des rNK1 sur les réponses des neurones WDR du Sp5O. Compte tenu de la faible spécificité de certains antagonistes (Rupniak *et al.*, 2003), nous avons utilisé deux molécules, le SR140333 et le RP67580. L'administration intraveineuse de SR140333 a provoqué une inhibition dose-dépendante du wind-up des neurones WDR du Sp5O. L'effet maximal est obtenu pour une dose de $36\mu\text{g.kg}^{-1}$, 45 minutes après injection : le wind-up est inhibé de $69 \pm 9\%$ (figure 15A et B). L'effet de SR140333 dure 45 min pour une dose de $12\mu\text{g.kg}^{-1}$, 60 min pour des doses de 36 et $108\mu\text{g.kg}^{-1}$. La plus faible dose de SR140333

($6\mu\text{g.kg}^{-1}$) reste sans effet significatif. De plus, cet antagoniste des rNK1 affecte aussi la réponse globale de façon réversible ($42 \pm 4\%$) (figure 15C). Une faible proportion de neurones (17%) n'est pas sensible au SR140333.

Les injections intraveineuses de RP67580 (2mg. kg^{-1}) produisent également une inhibition significative du wind-up ($63 \pm 6\%$) pour 7 des 13 neurones WDR enregistrés dans le Sp5O. L'effet est maximum 40min après l'injection et dure environ 1h30.

2. Une population d'interneurones exprimant le rNK1 connectent le Sp5C au Sp5O

A. Approche neuroanatomique

Les neurones du Sp5O n'expriment pas ou très peu le rNK1. De plus, les afférences des fibres C peptidergiques ne se terminent pas dans le Sp5O, hormis dans sa portion dorsomédiale. En revanche, nous avons précédemment montré que des interneurones connectent le Sp5O depuis les couches superficielles du Sp5C. Les afférences des fibres C aboutissent dans cette région et des neurones exprimant le rNK1 y sont présents (Voisin *et al.*, 2002).

La question est de savoir si des neurones trigéminaux exprimant le rNK1 peuvent véhiculer l'information nociceptive transmise par la substance P depuis les couches superficielles du Sp5C vers les neurones WDR du Sp5O. Pour répondre à cette question, des micro-injections localisées du marqueur rétrograde Fluorogold sont effectuées dans le Sp5O de 6 rats (les sites d'injection du traceur sont illustrés en haut et à droite des figures 16A et 17A). Les corps cellulaires des neurones marqués de façon rétrograde sont présents dans les couches I, II externes et, pour la plus grande part, dans les couches III, IV et V du Sp5C du côté ipsilatéral. Une immunodétection des rNK1 a été effectuée sur les mêmes coupes. Dans le Sp5C, les neurones contenant les rNK1 sont retrouvés préférentiellement dans la couche I, la couche II externe, faiblement dans la couche IV et sont absents de la couche II interne (figures 16A et B).

Chez quatre rats, les cellules doublement marquées ont été retrouvés essentiellement dans la couche III dans la partie rostrale du noyau : $18 \pm 8\%$ des neurones doublement marqués sont dans les couches III-IV (figure 16A).

Afin de s'assurer que l'information véhiculée par cette population de neurones exprimant le rNK1 peut être de nature nociceptive, une dernière expérience est menée sur 3

rats par une injection de 100 μ L de formol 5% dans la lèvre supérieure 6 minutes avant sacrifice et perfusion des animaux.

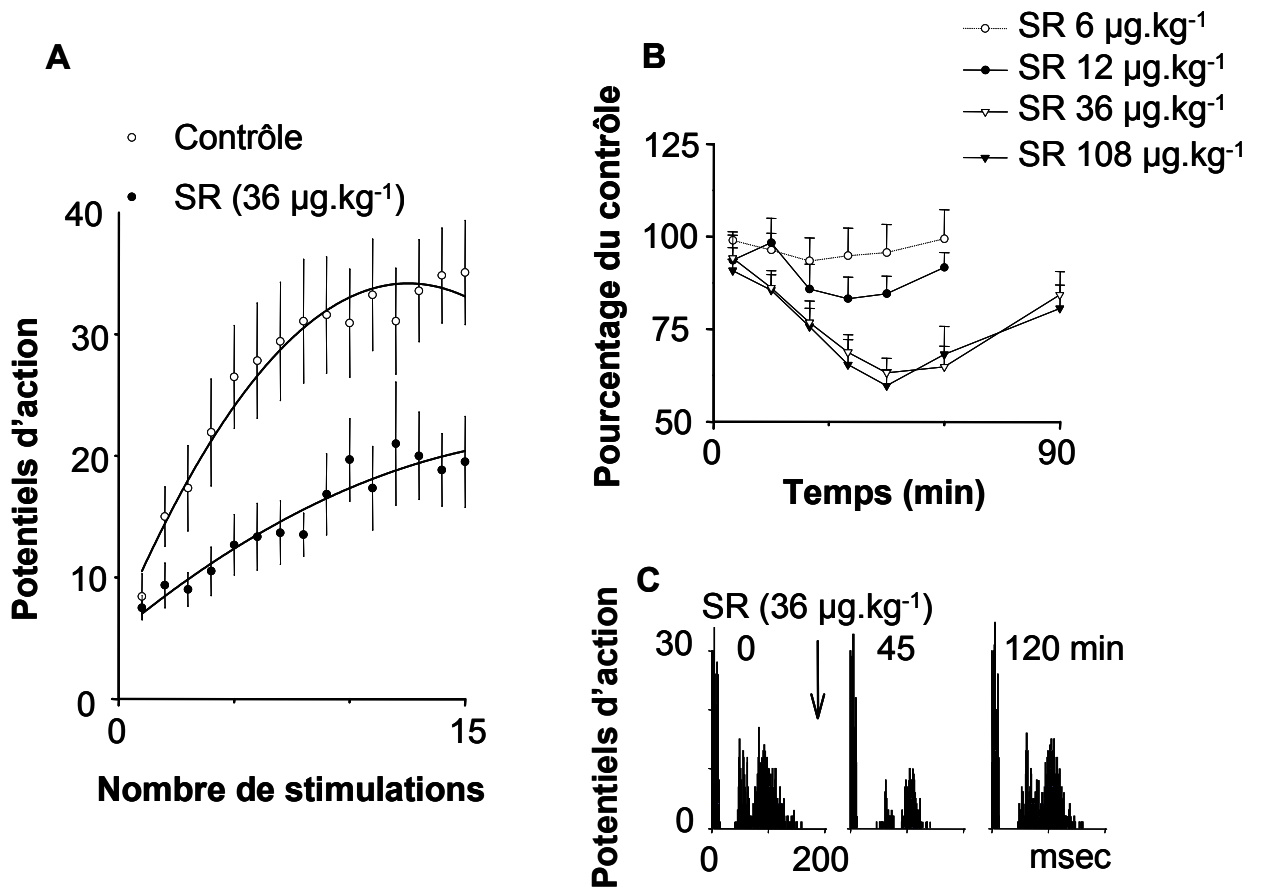


Figure 15

Des injections intraveineuses de l'antagoniste des rNK1 SR140333 diminuent le phénomène de wind-up des neurones WDR du Sp5O de façon dose dépendante.

A. L'injection intraveineuse de SR140333 (36 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) entraîne une diminution du wind-up des neurones WDR du Sp5O de 69% 45min après injection par rapport au contrôle préalable à l'administration (n=6).

B. Effet dose réponse du SR140333 montrant un effet inhibiteur réversible de la réponse C des neurones WDR du Sp5O maximum à partir de 36 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (n=6 par groupe).

C. PSTH illustrant le décours temporel de l'effet de l'injection intraveineuse de SR140333 (36 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) sur les réponses cumulées d'un neurone du Sp5O isolé.

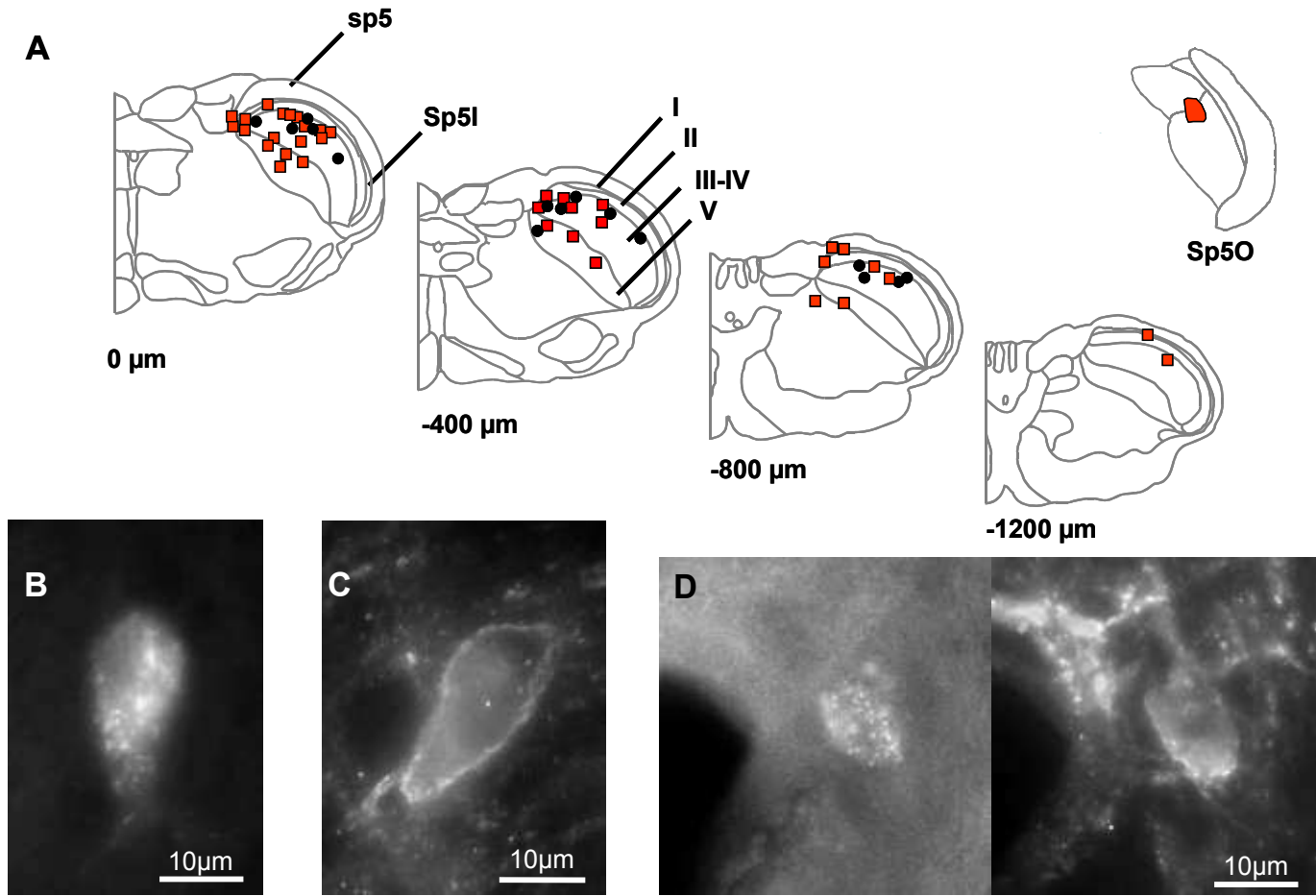


Figure 16

Une population d'interneurones qui connectent le Sp5C au Sp5O exprime le récepteur NK1.
A. Distribution des cellules qui connectent le Sp5C au Sp5O et qui expriment (●) ou non (■) le récepteur NK1 à 4 niveaux du Sp5C chez un rat représentatif. Le site d'injection du fluorogold (Sp5O) est figuré en haut à droite.

Images numériques montrant des exemples de neurones du Sp5C:

- B.** marqué rétrogradement.
- C.** immunopositif pour le rNK1.
- D.** doublement marqués.

Ce stimulus nociceptif entraîne une internalisation des rNK1 dans les corps cellulaires des neurones présents dans les couches I, dans les dendrites situés dans les couches I et II, mais aussi dans les neurones situés dans les couches II et III (figure 17). La quasi-totalité des neurones doublement marqués est rencontrée dans la partie ventrale de la couche III, à un niveau caudal (figure 17A).

Ces résultats montrent qu'il existe dans la couche III du Sp5C une sous population d'interneurones exprimant le rNK1, qui est capable de véhiculer une information nociceptive vers les neurones WDR du Sp5O.

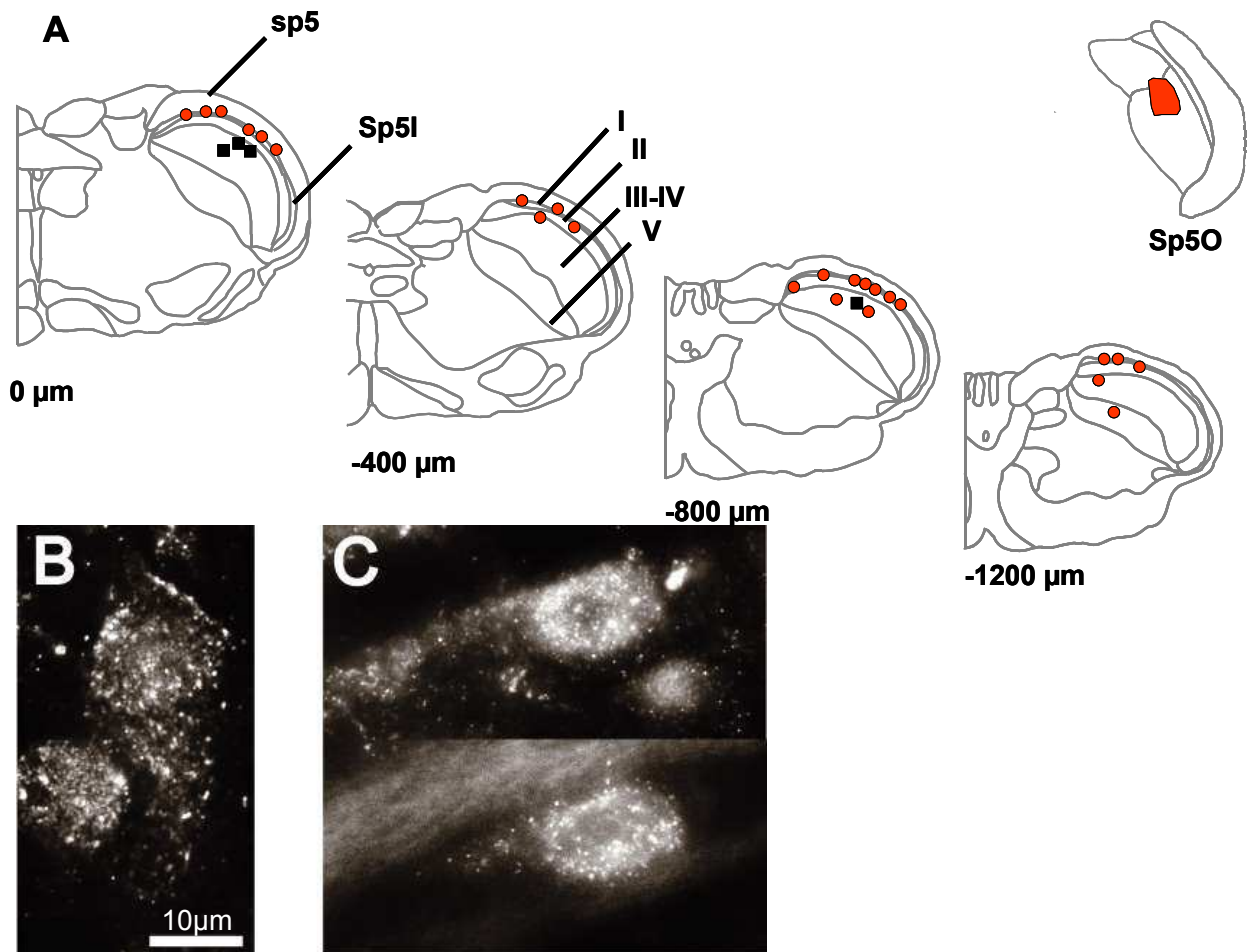


Figure 17

L'internalisation des rNK1 dans les interneurons connectant le Sp5C au Sp5O à la suite d'une stimulation nociceptive.

A. Distribution des neurones internalisant le récepteur NK1 en réponse à une injection de formol dans la lèvre supérieure à 4 niveaux du Sp5C chez un rat représentatif. Les cellules projetant (■) ou non (●) sur le Sp5O sont figurées. Le site d'injection (Sp5O) est visualisé en haut à droite.

B. Image numérique montrant un exemple de neurones du Sp5C internalisant les récepteurs NK1 suite à une injection de formol dans la lèvre supérieure.

C. Image numérique montrant un exemple d'un même neurone marqué par le traceur rétrograde et qui internalise le récepteur NK1.

B. Modulation du wind-up des neurones du Sp5O par des interneurones rNK1-dépendants localisés dans le Sp5C

Pour déterminer l'implication des interneurones mis en évidence dans la modulation rNK1 dépendante du wind-up des neurones WDR du Sp5O, des micro-injections d'antagonistes des rNK1 sont réalisées localement dans les couches superficielles (I à III) du Sp5C tandis que l'on enregistre l'activité de neurones WDR du Sp5O : le protocole expérimental est schématisé sur la figure 18C. Les micro-injections de 0,5µL de SR140333 (0,3nmol) produisent une inhibition réversible et significative pour 7 des 15 neurones WDR enregistrés dans le Sp5O et l'effet dure 50min (figure 18A). Une diminution maximale de $47 \pm 2\%$ du wind-up est obtenue 25min après injection de SR140333. Comme précédemment, cette substance affecte plus généralement la réponse C qui est inhibée de $39 \pm 4\%$ (figure 18B). Les micro-injections du second antagoniste RP67580 (4nmol, dans 0,5µL) entraînent une diminution significative de $57 \pm 2\%$ du wind-up 25min après administration pour 10 des 23 neurones WDR étudiés (figure 18A). La réponse C est elle-même affectée par cette substance ($48 \pm 8\%$).

Les micro-injections de 20nL de SR140333 (0,01nmol ; n=4) et de RP67580 (0,2nmol ; n=3) à proximité du site d'enregistrement dans le Sp5O n'ont aucun effet sur le wind-up des neurones enregistrés.

Ces résultats montrent que la modulation du wind-up dépendant de l'activité des rNK1 des neurones des couches superficielles du Sp5C.

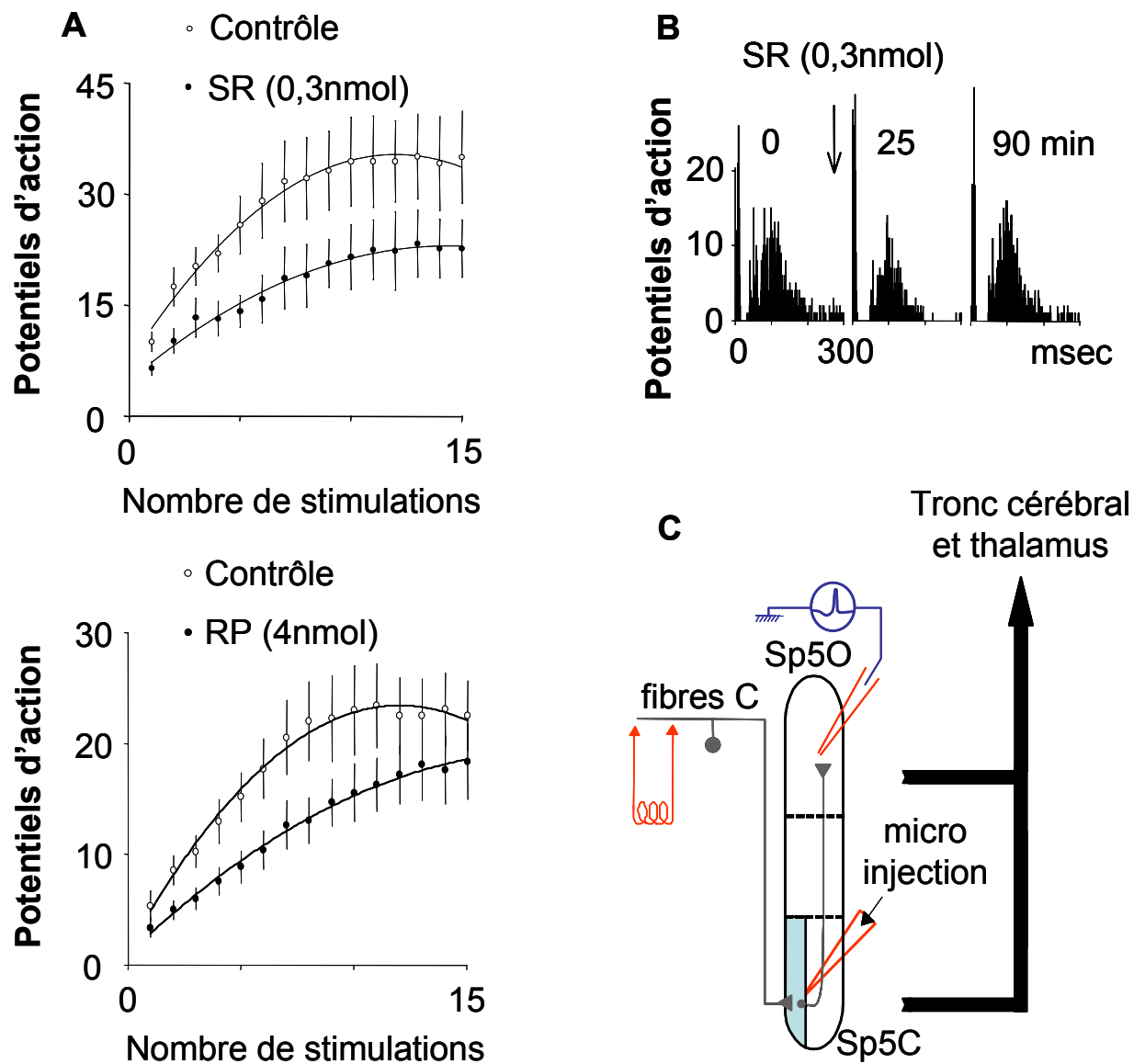


Figure 18

La micro-injection d'antagonistes des rNK1 dans le Sp5C diminue transitoirement le phénomène de wind-up des neurones WDR du Sp5O.

A. L'injection de SR140333 dans le Sp5C 0,3nmol entraîne une diminution du wind-up des neurones WDR du Sp5O de $47 \pm 2\%$ 25min après injection (n=7). L'injection de RP67580 dans le Sp5C 4nmol entraîne une diminution du wind-up des neurones WDR du Sp5O de $57 \pm 2\%$ 25min après injection (n=10).

B. PSTH illustrant le déroulé temporel de l'effet de SR140333 0,3nmol injecté dans le Sp5C sur les réponses cumulées d'un neurone du Sp5O isolé.

C. Diagramme schématique illustrant le protocole expérimental suivi en électrophysiologie.

3. Discussion

Nos résultats ont permis d'une part d'identifier un mécanisme de modulation du wind-up des neurones WDR trigéminaux et d'autre part de localiser au niveau segmentaire un tel mécanisme.

En premier lieu, nous avons montré que le wind-up des neurones nociceptifs du Sp5O était modulé par la mise en jeu des rNK1 de la substance P. Ce résultat est conforme à ceux de la littérature qui ont montré l'implication du rNK1 dans le phénomène de wind-up au niveau spinal. En effet, les administrations systémique ou intrathécale d'antagonistes des rNK1 ont pu entraîner une réduction du wind-up (cf introduction) et, plus particulièrement, cette réduction a été obtenue au niveau des neurones de la corne dorsale après blocage du récepteur par le RP67580 chez le rat (Chapman & Dickenson, 1993). De même, l'utilisation d'un modèle de souris KO a permis de montrer que le wind-up des neurones WDR de la corne dorsale était significativement réduit chez les animaux dont le gène codant pour le rNK1 avait été inactivé (De Felipe *et al.*, 1998; Weng *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2003).

Dans un deuxième temps, par les micro-injections d'antagonistes des rNK1 et l'approche morphofonctionnelle, nous avons montré que le wind-up des neurones du Sp5O était dépendant de l'activation des rNK1 d'interneurones ascendants situés dans les couches superficielles du Sp5C (principalement dans la couche III). Des travaux antérieurs ont obtenu un résultat similaire lors de l'administration d'un conjugué saporine-substance P, provoquant l'ablation sélective des neurones des couches superficielles exprimant le rNK1. Dans ces conditions, le wind-up des neurones WDR des couches profondes était significativement diminué (Khasabov *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2002).

Des travaux ont montré que l'ablation toxique des neurones rNK1 alterait non seulement le wind-up mais également les codages mécanique et thermique, les réponses à la formaline des neurones WDR ainsi que l'allodynie induite par l'adjuvant de Freund (Suzuki *et al.*, 2002). Ces résultats montrent que l'activation de ces neurones est impliquée dans les mécanismes de sensibilisation centrale du message nociceptif. De plus, l'inhibition de la sensibilisation centrale a été reproduite par un blocage pharmacologique des contrôles facilitateurs descendants serotonergiques au niveau des récepteurs 5HT3 (r5HT3). Au final, les auteurs suggèrent ainsi que la sensibilisation centrale nociceptive est liée à l'activation d'une boucle spino-bulbo-spinale mettant en jeu des neurones ascendants rNK1-positifs de la couche I et une voie descendante facilitatrice agissant via la sérotonine sur des r5HT3. Cependant, les auteurs rapportent que le blocage des r5HT3 (par l'ondansetron) n'affecte pas

le wind-up. Ceci suggère que le wind-up n'est pas modulé par la boucle décrite précédemment mais qu'il constitue plutôt un phénomène segmentaire spinal (trigéminal).

En effet ce phénomène a été mis en évidence pour la première fois en 1966 par Mendell chez l'animal décérébré-spinalisé (Mendell, 1966 ; Cf Herrero *et al.*, 2000). Par ailleurs, il apparaît que le wind-up est caractéristique des neurones WDR qui n'expriment pas le rNK1 (Sp5O ou couche V de la corne dorsale). Au niveau segmentaire le wind-up dépendrait ainsi d'un réseau reliant les neurones rNK1-positifs des couches superficielles et les neurones WDR des couches profondes. Les données de l'anatomie fonctionnelle nous montrent, en effet, que les neurones WDR des couches profondes de la corne dorsale de la moelle, équivalents à ceux du Sp5O, sont contactés de façon polysynaptique depuis les couches superficielles et que ces voies véhiculent des messages nociceptifs liés à l'activation des afférences de type C (Ritz & Greenspan, 1985). De même, au niveau trigéminal, des résultats montrent que les neurones du Sp5O reçoivent des informations nociceptives indirectement via le Sp5C (Dallel *et al.*, 1998). De plus nos résultats par immunodétection de l'internalisation des rNK1 ont permis d'identifier une population d'interneurones dans la couche III du Sp5C, exprimant le rNK1, qui peut véhiculer le message nociceptif vers les neurones WDR du Sp5O. Ce résultat est conforme aux données obtenues par d'autres groupes au niveau trigéminal. Ainsi l'internalisation atteint les couches III – V dans le Sp5C lors d'une extraction dentaire chez le rat (Sabino *et al.*, 2002). Sachant que la substance P est libérée par les afférences primaires peptidergiques au niveau des couches I et II (Todd & Spike, 1993), la mise en jeu, par la substance P, des interneurones rNK1-positifs des couches III peut se concevoir par une activation directe des dendrites de ces cellules projetant au niveau des couches I (Olave & Maxwell, 2003). Plus probablement, cette activation pourrait se réaliser par transmission volumique jusqu'à la couche III (Fuxe & Agnati, 1991; Marvizon *et al.*, 2003). Pour renforcer cette hypothèse, des travaux ont montré, au niveau spinal, que l'internalisation des rNK1 au niveau des neurones des couches superficielles de la corne dorsale dépendait de la durée du stimulus nociceptif (Abbadie *et al.*, 1997; Allen *et al.*, 1999; Honore *et al.*, 1999). En effet, l'internalisation se situe dans les couches I et II externe lors d'une inflammation de courte durée et elle atteint les couches III à IV pour des inflammations de longue durée. De plus les stimuli nociceptifs cutanés d'intensité croissante entraînent une libération de substance P endogène en quantité grandissante (Allen *et al.*, 1997). On peut donc penser qu'à la suite de stimulations répétitives des fibres C, la substance P libérée pourrait atteindre, par diffusion, les rNK1 exprimés par les interneurones de la couche III de la corne dorsale de la moelle ou du Sp5C et participer ainsi à la modulation du wind-up.

Cependant, nous ne pouvons pas exclure l'hypothèse d'une modulation par des structures supraspinales. En effet, nous avons observé une meilleure efficacité des antagonistes administrés par voie systémique que par des micro-injections (70 versus ~57%).

Enfin, notre travail a permis de montrer que les capacités de codage des neurones WDR dépendaient du wind-up segmentaire rNK1-dépendant. Cependant, alors que d'autres travaux ont montré que les capacités de codage étaient réduites lors d'une altération de la signalisation par la substance P (Weng *et al.*, 2001), le même résultat était obtenu après inactivation de contrôles descendant sérotoninergique via le blocage des r5HT3 (Suzuki *et al.*, 2002). Nous suggérons que le codage de l'intensité de stimuli de courte durée dépend en partie du wind-up segmentaire rNK1-dépendant.

CONCLUSION GENERALE

Le phénomène de wind-up se caractérise par l'augmentation progressive de la réponse de certains neurones à une stimulation répétée à basse fréquence des fibres nociceptives C. Ce phénomène est exprimé par la majorité des neurones WDR trigéminaux. Nous avons montré que l'amplitude du wind-up dépend de la fréquence et de l'intensité de stimulation. Ce travail a montré que le wind-up permet d'améliorer les capacités de codage de stimuli nociceptifs de courte durée. Par ailleurs, nous montrons que le wind-up entraîne une modification transitoire (environ 2min) de l'excitabilité des neurones WDR. La modification d'excitabilité générée par la wind-up est responsable uniquement de la facilitation des réponses évoquées par la mise en jeu des fibres C. Elle n'est pas à l'origine d'un état de sensibilisation centrale qui est caractérisé par l'apparition d'une allodynie et d'une hyperalgésie secondaire. Ainsi, l'augmentation de l'excitabilité centrale générée par le wind-up et la sensibilisation centrale sont des phénomènes différents.

Nous avons montré que le développement du wind-up des neurones WDR du Sp5O dépend de l'activation des rNMDA localisés dans le Sp5O. Cependant, nous avons également découvert que, de façon simultanée, le message nociceptif met aussi en jeu des rNMDA localisés dans les couches superficielles du Sp5C. Dans ce cas, l'activation des rNMDA inhibe, au contraire, le wind-up des neurones WDR du Sp5O. Le rôle des rNMDA au niveau segmentaire dépend donc étroitement de leur localisation au sein des réseaux nociceptifs segmentaires. Alors que certains rNMDA contribuent effectivement à l'amplification du message douloureux, d'autres agissent simultanément dans le sens opposé. Le modèle trigéminal permet donc de montrer que, dès l'étage segmentaire, il existe un ajustement permanent de l'amplification du message douloureux.

Le développement du wind-up des neurones WDR du Sp5O dépend également de l'activation des rNK1. Nous montrons que 15 % de l'ensemble des cellules du Sp5C, marquées par le Fluorogold, expriment le rNK1; ces neurones sont localisés dans la couche III du Sp5C. De plus, certains d'entre eux internalisent le récepteur NK1 en réponse à une stimulation douloureuse, traduisant une libération de substance P. La microinjection d'antagonistes des rNK1 (SR 140333, RP67580) dans le Sp5C réduit le wind-up des neurones du Sp5O, alors qu'injecté directement dans le Sp5O, les antagonistes sont sans effet. Ces données suggèrent que l'activation des récepteurs NK1 d'interneurones localisés dans la couche III du Sp5C contribue au wind-up des neurones nociceptifs du Sp5O.

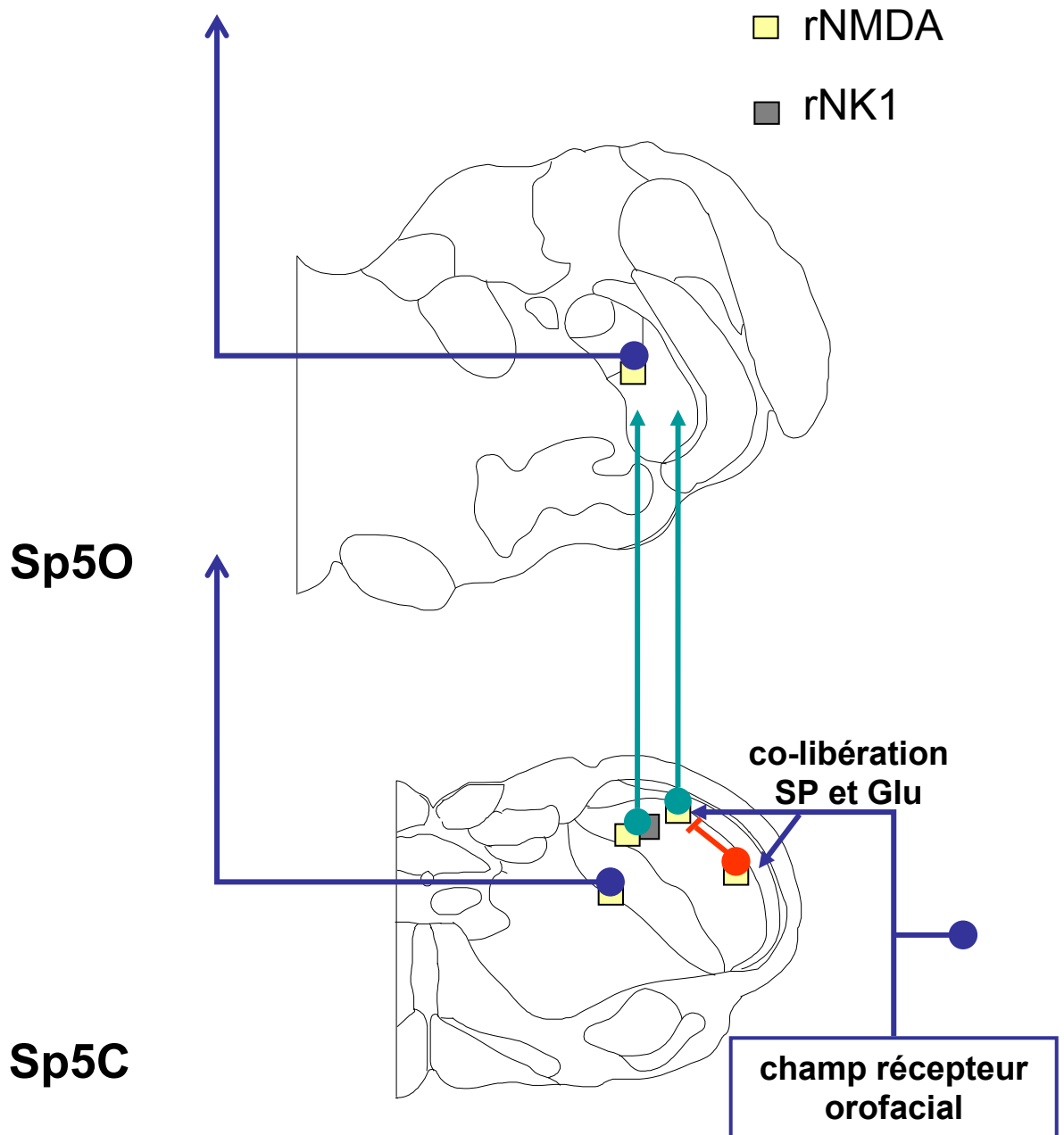


Schéma de synthèse

Modèle trigéminal figurant la modulation rNK1 et rNMDA dépendante de l'activité nociceptive des neurones WDR du Sp50.

Les informations nociceptives véhiculées par les fibres C parviennent aux neurones WDR du Sp50 après avoir fait relais dans les couches superficielles du Sp5C. A cet étage, la mise en jeu des rNMDA par le glutamate et des rNK1 par la substance P peut entraîner deux mécanismes de modulation du wind-up, inhibiteur et facilitateur, des neurones WDR. La modulation négative fait probablement intervenir des interneurons inhibiteurs exprimant le rNMDA, localisés dans les couches II du Sp5C. L'action facilitatrice est dépendante de la mise en jeu d'interneurones ascendants rNK1-positifs localisés dans les couches III. Il est à noter qu'il existe probablement aussi une voie facilitatrice du wind-up faisant intervenir directement des neurones ascendants facilitateurs exprimant le rNMDA.

Deux coupes frontales du CST sont figurées, illustrant le Sp5C (-14,2mm du bregma) et le Sp50 (-10,6mm).

BIBLIOGRAPHIE

- Abbadie, C. & Besson, J.-M. (1993). Fos-like immunoreactivity in the rat spinal cord during the development of polyarthritis: pharmacological investigations. In *New Trends in Referred Pain and Hyperalgesia*, eds. Vecchiet, L., Albe-Fessard, D., Lindblom, U., & Giamberardino, M. A., pp. 205-222. Elsevier Science Publishers B.V. All rights reserved.
- Abbadie, C., Trafton, J., Liu, H., Mantyh, P. W., & Basbaum, A. I. (1997). Inflammation increases the distribution of dorsal horn neurons that internalize the neurokinin-1 receptor in response to noxious and non-noxious stimulation. *J Neurosci* **17**, 8049-8060.
- Akaoka, H., Saunier, C. F., Chergui, K., Charléty, P., Buda, M., & Chouvet, G. (1992). Combining in vivo volume-controlled pressure microejection with extracellular unit recording. *Journal of Neuroscience Methods* **42**, 119-128.
- Alarcon, G. & Cervero, F. (1990). The effects of electrical stimulation of A and C visceral afferent fibres on the excitability of viscerosomatic neurones in the thoracic spinal cord of the cat. *Brain Research* **509**, 24-30.
- Allen, B. J., Li, J., Menning, P. M., Rogers, S. D., Ghilardi, J., Mantyh, P. W., & Simone, D. A. (1999). Primary afferent fibers that contribute to increased substance P receptor internalization in the spinal cord after injury. *J Neurophysiol.* **81**, 1379-1390.
- Allen, B. J., Rogers, S. D., Ghilardi, J. R., Menning, P. M., Kuskowski, M. A., Basbaum, A. I., Simone, D. A., & Mantyh, P. W. (1997). Noxious cutaneous thermal stimuli induce a graded release of endogenous substance P in the spinal cord: imaging peptide action in vivo. *Journal of Neuroscience* **17**, 5921-5927.
- Allen, G. V., Barbrick, B., & Esser, M. J. (1996). Trigeminal-parabrachial connections: Possible pathway for nociception-induced cardiovascular reflex responses. *Brain Research* **715**, 125-135.
- Altschuler, S. M., Bao, X. M., Bieger, D., Hopkins, D. A., & Miselis, R. R. (1989). Viscerotopic representation of the upper alimentary tract in the rat: sensory ganglia and nuclei of the solitary and spinal trigeminal tracts. *J Comp.Neurol* **283**, 248-268.
- Alvarado-Mallart, M. R., Batini, C., Buisseret-Delmas, C., & Corvisier, J. (1975). Trigeminal representations of the masticatory and extraocular proprioceptors as revealed by horseradish peroxidase retrograde transport. *Experimental Brain Research* **23**, 167-179.
- Amano, N., Hu, J. W., & Sessle, B. J. (1986). Responses of neurons in feline trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn) to cutaneous, intraoral, and muscle afferent stimuli. *Journal of Neurophysiology* **55**, 227-243.
- Ambalavanar, R. & Morris, R. (1992). The distribution of binding by isolectin I-B4 from *Griffonia simplicifolia* in the trigeminal ganglion and brainstem trigeminal nuclei in the rat. *Neuroscience* **47**, 421-429.
- Andersen, O. K., Felsby, S., Nicolaisen, L., Bjerring, P., Jensen, T. S., & Arendt-Nielsen, L. (1996). The effect of Ketamine on stimulation of primary and secondary hyperalgesic areas

induced by capsaicin - A double-blind, placebo-controlled, human experimental study. *Pain* **66**, 51-62.

Appenteng, K., Donga, R., & Williams, R. G. (1985). Morphological and electrophysiological determination of the projections of jaw-elevator muscle spindle afferents in rats. *Journal of Physiology* **369**, 93-113.

Arendt-Nielsen, L., Andersen, O. K., & Jensen, T. S. (1996). Brief, prolonged and repeated stimuli applied to hyperalgesic skin areas: a psychophysical study. *Brain Research* **712**, 165-167.

Arendt-Nielsen, L., Graven-Nielsen, T., Svensson, P., & Jensen, T. S. (1997). Temporal summation in muscles and referred pain areas: An experimental human study. *Muscle and Nerve* **20**, 1311-1313.

Arendt-Nielsen, L., Petersen-Felix, S., Fischer, M., Bak, P., Bjerring, P., & Zbinden, A. M. (1995). The effect of N-methyl-D-aspartate antagonist (ketamine) on single and repeated nociceptive stimuli: a placebo-controlled experimental human study. *Anesth.Analg.* **81**, 63-68.

Arvidsson, J. & Gobel, S. (1981). An HRP study of the central projections of primary trigeminal neurons which innervate tooth pulps in the cat. *Brain Research* **210**, 1-16.

Arvidsson, J. & Raappana, P. (1989). An HRP study of the central projections from primary sensory neurons innervating the rat masseter muscle. *Brain Research* **480**, 111-118.

Ascher, P. & Nowak, L. (1988). The role of divalent cations in the N-methyl-D-aspartate responses of mouse central neurones in culture. *J.Physiol* **399**, 247-266.

Azerad, J., Woda, A., & Albe-Fessard, D. (1982). Physiological properties of neurons in different parts of the trigeminal sensory complex. *Brain Res* **246**, 7-21.

Baranauskas, G. & Nistri, A. (1996). NMDA receptor-independent mechanisms responsible for the rate of rise of cumulative depolarization evoked by trains of dorsal root stimuli on rat spinal motoneurons. *Brain Research* **738**, 329-332.

Baranauskas, G. & Nistri, A. (1998). Sensitization of pain pathways in the spinal cord: Cellular mechanisms. *Progress in Neurobiology* **54**, 349-365.

Baranauskas, G., Traversa, U., Rosati, A. M., & Nistri, A. (1995). An NK1 receptor-dependent component of the slow excitation recorded intracellularly from rat motoneurons following dorsal root stimulation. *European Journal of Neuroscience* **7**, 2409-2417.

Bartsch, T. & Goadsby, P. J. (2003). Increased responses in trigeminocervical nociceptive neurons to cervical input after stimulation of the dura mater. *Brain* **126**, 1801-1813.

Basbaum, A. I. & Jessell, T. (2000). The perception of pain. In *Principles of Neural Science*, eds. Kandel, E. R., Schwartz, J., & Jessell, T., pp. 472-491. Appleton and Lange, New York.

Bates, C. A. & Killackey, H. P. (1985). The organization of the neonatal rat's brainstem trigeminal complex and its role in the formation of central trigeminal patterns. *Journal of Comparative Neurology* **240**, 265-287.

- Bekkers, J. M. (1993). Enhancement by histamine of NMDA-mediated synaptic transmission in the hippocampus. *Science* **261**, 104-106.
- Berkley, K. J., Zalcman, S. S., & Simon, V. R. (2006). Sex and gender differences in pain and inflammation: a rapidly maturing field. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* **291**, R241-R244.
- Berman, A. L. (1968). *The brain stem of the cat: a cytoarchitectonic atlas with stereotactic coordinates*, University of Wisconsin Press ed. Madison.
- Bernardi, P. S., Valtschanoff, J. G., Weinberg, R. J., Schmidt, H. H., & Rustioni, A. (1995). Synaptic interactions between primary afferent terminals and GABA and nitric oxid-synthesizing neurons in superficial laminae of the rat spinal cord. *J Neurosci* **15**, 1363-1371.
- Besson, J.-M. (1999). The neurobiology of pain. *Lancet* **353**, 1610-1615.
- Besson, J.-M. & Chaouch, A. (1987). Peripheral and spinal mechanisms of nociception. *Physiological Reviews* **67(1)**, 67-185.
- Bolton, S., O'Shaughnessy, C. T., & Goadsby, P. J. (2005). Properties of neurons in the trigeminal nucleus caudalis responding to noxious dural and facial stimulation. *Brain Research* **1046**, 122-129.
- Bove, G. M. & Moskowitz, M. A. (1997). Primary afferent neurons innervating Guinea pig dura. *J Neurophysiol.* **77**, 299-308.
- Brodal, A., Szabo, T., & Torvik, A. (1956). Corticofugal fibers to sensory trigeminal nuclei and nucleus of solitary tract. An experimental study in the cat. *Journal of Comparative Neurology* **106**, 527-555.
- Broton, J. G. & Rosenfeld, J. P. (1985). Effects of trigeminal tractotomy on facial thermal nociception in the rat. *Brain Research* **333**, 63-72.
- Broton, J. G. & Rosenfeld, P. (1986). Cutting rostral trigeminal nuclear complex projections preferentially affects perioral nociception in the rat. *Brain Research* **397**, 1-8.
- Brown, J. L., Liu, H., Maggio, J. E., Vigna, S. R., Mantyh, P. W., & Basbaum, A. I. (1995). Morphological characterization of substance P receptor-immunoreactive neurons in the rat spinal cord and trigeminal nucleus caudalis. *Journal of Comparative Neurology* **356**, 327-344.
- Budai, D. & Larson, A. A. (1996). Role of substance P in the modulation of C-fiber-evoked responses of spinal dorsal horn neurons. *Brain Research* **710**, 197-203.
- Burgess, P. R. & Perl, E. R. (1973). Cutaneous mechanoreceptors and nociceptors. In *Handbook of Sensory Physiology. Vol.2 Somatosensory System*, ed. Iggo, A., pp. 29-78. Springer, Berlin.
- Burstein, R., Yamamura, H., Malick, A., & Strassman, A. M. (1998). Chemical stimulation of the intracranial dura induces enhanced responses to facial stimulation in brain stem trigeminal neurons. *J Neurophysiol* **79**, 964-982.

- Bushnell, M. C., Duncan, G. H., Dubner, R., & He, L. F. (1984). Activity of trigeminothalamic neurons in medullary dorsal horn of awake monkeys trained in a thermal discrimination task. *Journal of Neurophysiology* **52**, 170-187.
- Cadden, S. W. (1982). Electrical stimulation of cat canine tooth-pulp; stimulus intensities required to evoke responses in trigeminal brainstem neurones. In *Anatomical, physiological and pharmacological aspects of trigeminal pain*, eds. Matthews, B. & Hill, R. G., pp. 145-161. Excerpta Medical, Amsterdam.
- Campbell, N. C., Clarke, R. W., & Matthews, B. (1984). Neurones and trigeminal subnucleus oralis (VSNO) with inputs from tooth-pulp in the cat. *Journal of Dental Research* **63**, 518.
- Capra, N. F. (1987). Localization and central projections of primary afferent neurons that innervate the temporomandibular joint in cats. *Somatosensory Research* **4**, 201-213.
- Capra, N. F. & Dessem, D. (1992). Central connections of trigeminal primary afferent neurons : topographical and functional considerations. *Crit.Rev.Oral Biol.Med.* **4**, 1-52.
- Capra, N. F. & Wax, T. D. (1989). Distribution and central projections of primary afferent neurons that innervate the masseter muscle and mandibular periodontium: a double-label study. *Journal of Comparative Neurology* **279**, 341-352.
- Carlsson, G. E. & LeResche, L. (1995). Epidemiology of temporomandibular disorders. In *Temporomandibular disorders and related pain conditions. Progress in pain research and management.*, eds. Sessle, B. J., Bryant, P. S., & Dionne, R. A., pp. 211-226. IASP Press, Seattle.
- Carstens, E., Kuenzler, N., & Handwerker, H. O. (1998). Activation of neurons in rat trigeminal subnucleus caudalis by different irritant chemicals applied to oral or ocular mucosa. *J Neurophysiol* **80**, 465-492.
- Carstens, E., Saxe, I., & Ralph, R. (1995). Brainstem neurons expressing c-Fos immunoreactivity following irritant chemical stimulation of the rat's tongue. *Neuroscience* **69**, 939-953.
- Carter, C., Benavides, J., Legendre, P., Vincent, J. D., Noel, F., Thuret, F., Lloyd, K. G., Arbilla, S., Zivkovic, B., MacKenzie, E. T., & . (1988). Ifenprodil and SL 82.0715 as cerebral anti-ischemic agents. II. Evidence for N-methyl-D-aspartate receptor antagonist properties. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **247**, 1222-1232.
- Carter, C., Rivy, J. P., & Scatton, B. (1989). Ifenprodil and SL 82.0715 are antagonists at the polyamine site of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor. *European Journal of Pharmacology* **164**, 611-612.
- Chang, M. M., Leeman, S. E., & Niall, H. D. (1971). Amino-acid sequence of substance P. *Nat.New Biol.* **232**, 86-87.
- Chaplan, S. R., Malmberg, A. B., & Yaksh, T. L. (1997). Efficacy of spinal NMDA receptor antagonism in formalin hyperalgesia and nerve injury evoked allodynia in the rat. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **280**, 829-838.

- Chapman, V. & Dickenson, A. H. (1993). The effect of intrathecal administration of RP67580, a potent neurokinin 1 antagonist on nociceptive transmission in the rat spinal cord. *Neuroscience Letters* **157**, 149-152.
- Chapman, V., Dickenson, A. H., & Tjolsen, A. (1994). Bi-directional effects of intrathecal NMDA and substance P on rat dorsal horn neuronal responses. *Neuroscience Letters* **178**, 90-94.
- Chazot, P. L., Cik, M., & Stephenson, F. A. (1992). Immunological detection of the NMDAR1 glutamate receptor subunit expressed in embryonic kidney 293 cells and in rat brain. *J.Neurochem.* **59**, 1176-1178.
- Chen, L. & Huang, L.-Y. M. (1992). Protein kinase C reduces Mg²⁺ block of NMDA-receptor channels as a mechanism of modulation. *Nature* **356**, 521-523.
- Chiang, C. Y., Hu, B., Hu, J. W., Dostrovsky, J. O., & Sessle, B. J. (2002). Central sensitization of nociceptive neurons in trigeminal subnucleus oralis depends on integrity of subnucleus caudalis. *J Neurophysiol* **88**, 256-264.
- Chung, J. M., Kenshalo, D. R. J., Gerhart, K. D., & Willis, W. D. (1979). Excitation of primate spinothalamic neurons by cutaneous C-fiber volleys. *J Neurophysiol.* **42**, 1354-1369.
- Cotman, C. W. & Iversen, L. L. (1987). Excitatory amino acids in the brain - focus on NMDA receptors. *Trends in Neurosciences* **10**, 263-265.
- Craig, A. D. & Andrew, D. (2002). Responses of spinothalamic lamina I neurons to repeated brief contact heat stimulation in the cat. *J Neurophysiol* **87**, 1902-1914.
- Crissman, R. S., Sodeman, T., Denton, A. M., Warden, R. J., Siciliano, D. A., & Rhoades, R. W. (1996). Organization of primary afferent axons in the trigeminal sensory root and tract of the rat. *Journal of Comparative Neurology* **364**, 169-183.
- Dallel, R., Clavelou, P., & Woda, A. (1989). Effects of tractotomy on nociceptive reactions induced by tooth pulp stimulation in the rat. *Experimental Neurology* **106**, 78-84.
- Dallel, R., Duale, C., Luccarini, P., & Molat, J. L. (1999). Stimulus-function, wind-up and modulation by diffuse noxious inhibitory controls of responses of convergent neurons of the spinal trigeminal nucleus oralis. *European Journal of Neuroscience* **11**, 31-40.
- Dallel, R., Duale, C., & Molat, J. L. (1998). Morphine administered in the substantia gelatinosa of the spinal trigeminal nucleus caudalis inhibits nociceptive activities in the spinal trigeminal nucleus oralis. *Journal of Neuroscience* **18**, 3529-3536.
- Dallel, R., Luccarini, P., Molat, J. L., & Woda, A. (1996). Effects of systemic morphine on the activity of convergent neurons of spinal trigeminal nucleus oralis in the rat. *European Journal of Pharmacology* **314**, 19-25.
- Dallel, R., Raboisson, P., Pajot, J., Aigouy, L., & Woda, A. Projections from the rat spinal trigeminal subnucleus oralis to the spinal cord studied with the PHA-1 method. Society for Neuroscience . 1994.

- Dallel, R., Raboisson, P., Woda, A., & Sessle, B. J. (1990). Properties of nociceptive and non-nociceptive neurons in trigeminal subnucleus oralis of the rat. *Brain Research* **521**, 95-106.
- Dallel, R., Ricard, O., & Raboisson, P. (2004). Organization of parabrachial projections from the spinal trigeminal nucleus oralis: an anterograde tracing study in the rat. *J.Comp Neurol* **470**, 181-191.
- Dallel, R., Villanueva, L., Woda, A., & Voisin, D. L. (2003). Neurobiologie de la douleur trigéminal. *Médecine-Science* **19**, 567-574.
- Darian-Smith, I. (1966). Neural mechanisms of facial sensation. *International Review of Neurobiology* **9**, 301-395.
- Davies, S. N. & Lodge, D. (1987). Evidence for involvement of N-methylaspartate receptors in 'wind-up' of class 2 neurones in the dorsal horn of the rat. *Brain Research* **424**, 402-406.
- De Chazeron, I., Raboisson, P., & Dallel, R. (2004). Organization of diencephalic projections from the spinal trigeminal nucleus oralis: an anterograde tracing study in the rat. *Neuroscience* **127**, 921-928.
- De Felipe, C., Herrero, J. F., O'Brien, J. A., Palmer, J. A., Doyle, C. A., Smith, A. J., Laird, J. M., Belmonte, C., Cervero, F., & Hunt, S. P. (1998). Altered nociception, analgesia and aggression in mice lacking the receptor for substance P. *Nature* **392**, 394-397.
- Denny-Brown, D. & Yanagisawa, N. (1973). The function of the descending root of the fifth nerve. *Brain* **96**, 783-814.
- Dessem, D. & Luo, P. (1999). Jaw-muscle spindle afferent feedback to the cervical spinal cord in the rat. *Exp Brain Res* **128**, 451-459.
- Dickenson, A. H. (1990). A cure for wind up: NMDA receptor antagonists as potential analgesics. *Trends in Pharmacological Sciences* **11**, 307-309.
- Dickenson, A. H. & Aydar, E. (1991). Antagonism at the glycine site on the NMDA receptor reduces spinal nociception in the rat. *Neuroscience Letters* **121**, 263-266.
- Dickenson, A. H., Chapman, V., & Green, G. M. (1997). The pharmacology of excitatory and inhibitory amino acid-mediated events in the transmission and modulation of pain in the spinal cord. *General Pharmacology* **28**, 633-638.
- Dickenson, A. H., Hellon, R. F., & Woolf, C. J. (1981). Tooth pulp input to the spinal trigeminal nucleus : a comparison of inhibitions following segmental and raphe magnus stimulation. *Brain Research* **214**, 73-87.
- Dickenson, A. H. & Sullivan, A. F. (1987). Evidence for a role of the NMDA receptor in the frequency dependent potentiation of deep rat dorsal horn nociceptive neurones following C fibre stimulation. *Neuropharmacology* **26 n°8**, 1235-1238.
- Dickenson, A. H. & Sullivan, A. F. (1990). Differential effects of excitatory amino acid antagonists on dorsal horn nociceptive neurones in the rat. *Brain Research* **506**, 31-39.

- Dougherty, P. M. & Willis, W. D. (1991). Enhancement of spinothalamic neuron responses to chemical and mechanical stimuli following combined micro-iontophoretic application of N-methyl-D-aspartic acid and substance P. *Pain* **47**, 85-93.
- Duale, C., Raboisson, P., Molat, J. L., & Dallel, R. (2001). Systemic morphine reduces the wind-up of trigeminal nociceptive neurons. *Neuroreport* **12**, 2091-2096.
- Dubner, R. (1978). Neurophysiology of pain. *Dent.Clin.North Am.* **22**, 11-30.
- Duggan, A. W., Hendry, I. A., Morton, C. R., Hutchinson, W. D., & Zhao, Z. Q. (1988). Cutaneous stimuli releasing immunoreactive substance P in the dorsal horn of the cat. *Brain Research* **451**, 261-273.
- Durand, J., Gogan, P., Gueritaud, J. P., Horcholle Bossavit, G., & Tyc Dumont, S. (1983). Morphological and electrophysiological properties of trigeminal neurones projecting to the accessory abducens nucleus of the cat. *Experimental Brain Research* **53**, 118-128.
- Edmonds-Alt, X., Doutremepuich, J.-D., Heaulme, M., Neliat, G., Santucci, V., Steinberg, R., Vilain, P., Bichon, D., Ducoux, J.-P., Proietto, V., Van Broeck, D., Soubri , P., Le Fur, G., & Breli re, J.-C. (1993). In vitro and in vivo biological activities of SR140333, a novel potent non-peptide tachikinin NK1 receptor antagonist. *European Journal of Pharmacology* **250**, 403-413.
- Eide, P. K., Jorum, E., Stubhaug, A., Bremnes, J., & Breivik, H. (1994). Relief of post-herpetic neuralgia with the N-methyl-D- aspartic acid receptor antagonist ketamine: A double-blind, cross-over comparison with morphine and placebo. *Pain* **58**, 347-354.
- Eide, P. K., Stubhaug, A., & Stenehj m, A. E. (1995). Central dysesthesia pain after traumatic spinal cord injury is dependent on N-methyl-D-aspartate receptor activation. *Neurosurgery* **37**, 1080-1087.
- Eisenman, J., Landgen, 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.* **59**, SUPPL214-SUPPL244.
- Engberg, I., Flatman, J. A., & Lambert, J. D. (1979). The actions of excitatory amino acids on motoneurons in the feline spinal cord. *J.Physiol* **288**, 227-261.
- Engstrand, P., Shyu, B. C., & Andersson, S. A. (1983). Is a selective stimulation of the rat incisor tooth pulp possible. *Pain* **15**, 27-34.
- Erspamer, V. (1981). The tachikinin peptide family. *Trends in Neurosciences* **4**, 267-269.
- Erzurumlu, R. S. & Killackey, H. P. (1979). Efferent connections of the brainstem trigeminal complex with the facial nucleus of the rat. *Journal of Comparative Neurology* **188**, 75-86.
- Esser, M. J., Pronych, S. P., & Allen, G. V. (1998). Trigeminal-reticular connections: Possible pathways for nociception-induced cardiovascular reflex responses in the rat. *Journal of Comparative Neurology* **391**, 526-544.
- Falls, W. M. (1988). Synaptic organization of primary axons in trigeminal nucleus oralis. *J Electron Microsc.Tech.* **10**, 213-227.

- Falls, W. M., Rice, R. E., & VanWagner, J. P. (1985). The dorsomedial portion of trigeminal nucleus oralis (Vo) in the rat: cytology and projections to the cerebellum. *Somatosensory Research* **3**, 89-118.
- Faucard, R., Armand, V., Heron, A., Cochois, V., Schwartz, J. C., & Arrang, J. M. (2006). N-methyl-D-aspartate receptor antagonists enhance histamine neuron activity in rodent brain. *J.Neurochem.* **98**, 1487-1496.
- Feil, K. & Herbert, H. (1995). Topographic organization of spinal and trigeminal somatosensory pathways to the rat parabrachial and Kölliker-Fuse nuclei. *Journal of Comparative Neurology* **353**, 506-528.
- Ferrer-Montiel, A. V. & Montal, M. (1996). Pentameric subunit stoichiometry of a neuronal glutamate receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**, 2741-2744.
- Fletcher, E. J. & Lodge, D. (1988). Glycine reverses antagonism of N-methyl-D-aspartate (NMDA) by 1-hydroxy-3-aminopyrrolidone-2 (HA-966) but not by D-2-amino-5-phosphonovalerate (D-AP5) on rat cortical slices. *European Journal of Pharmacology* **151**, 161-162.
- Forrest, D., Yuzaki, M., Soares, H. D., Ng, L., Luk, D. C., Sheng, M., Stewart, C. L., Morgan, J. I., Connor, J. A., & Curran, T. (1994). Targeted disruption of NMDA receptor 1 gene abolishes NMDA response and results in neonatal death. *Neuron* **13**, 325-338.
- Frobert, O., Arendt-Nielsen, L., Bak, P., Funch-Jensen, P., & Bagger, J. P. (1995). Oesophageal sensation assessed by electrical stimuli and brain evoked potentials--a new model for visceral nociception. *Gut* **37**, 603-609.
- Fukushima, T. & Kerr, F. W. L. (1979). Organization of trigeminothalamic tracts and other thalamic afferent systems of the brainstem in the rat: presence of gelatinosa neurons with thalamic connections. *Journal of Comparative Neurology* **183**, 169-184.
- Fuxe, K. & Agnati, L. (1991). Two principal modes of electrochemical communication in the brain: volume versus wiring transmission. In *Volume transmission in the brain* pp. 1-9. Raven Press, New York.
- Ganchrow, D. (1978). Intrageminal and thalamic projections of nucleus caudalis in the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*): a degeneration and autoradiographic study. *Journal of Comparative Neurology* **178**, 281-312.
- Garret, C., Carruette, A., Fardin, V., Moussaoui, S., Peyronel, J.-F., Blanchard, J.-C., & Laduron, P. M. (1991). Pharmacological properties of a potent and selective nonpeptide substance P antagonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 10208-10212.
- Gasser, H. S. & Erlanger, J. (1927). The role played by the sizes of the constituent fibers of a nerve trunk in determining the form of its action potential wave. *American Journal of Physiology* **80**, 522-547.
- Gee, M. D., Lynn, B., & Cotsell, B. (1996). Activity-dependent slowing of conduction velocity provides a method for identifying different functional classes of C-fibre in the rat saphenous nerve. *Neuroscience* **73**, 667-675.

- Gerard, MW. (1923). Afferent impulses of the trigeminal nerve. The intramedullary course of the painful thermal and tactile impulses. *Arch Neurol Psychol* **9**, 306-380.
- Gobel, S., Hockfield, S., & Ruda, M. A. (1981). Anatomical similarities between medullary and spinal dorsal horns. In *Oral-Facial Sensory and Motor Functions*, eds. Kawamura, Y. & Dubner, R., pp. 211-223. Quintessence Publishing Co, Tokyo, Berlin.
- Gobel, S. & Purvis, M. B. (1972). Anatomical studies of the organization of the spinal V nucleus: the deep bundles and the spinal V tract. *Brain Research* **48**, 27-44.
- Gordon, G., Landgren, S., & Seed, W. A. (1961). The functional characteristics of single cells in the caudal part of the spinal nucleus of the trigeminal nerve of the cat. *Journal of Physiology* **158**, 544-559.
- Gozariu, M., Bouhassira, D., Willer, J. C., & Le Bars, D. (2000). Temporal summation and a C-fibre reflex in the rat: effects of morphine on facilitatory and inhibitory mechanisms. *European Journal of Pharmacology* **394**, 75-84.
- Gozariu, M., Bragard, D., Willer, J. C., & Le Bars, D. (1997). Temporal summation of C-fiber afferent inputs: Competition between facilitatory and inhibitory effects on C-fiber reflex in the rat. *Journal of Neurophysiology* **78**, 3165-3179.
- Graham, S. H., Sharp, F. R., & Dillon, W. (1988). Intraoral sensation in patients with brainstem lesions: role of the rostral spinal trigeminal nuclei in pons. *Neurology* **38**, 1529-1533.
- Grant, F. C. (1955). Discussion on trigeminal tractotomy. *Clinical Neurosurgery* **2**, 69-70.
- Grant, F. C., Groff, R. A., & Lewy, F. H. (1940). Section of the descending spinal root of the fifth cranial nerve. *Archives of Neurology and Psychiatry* **43**, 498-509.
- Greenwood, F. (1973). An electrophysiological study of the central connections of primary afferent nerve fibers from the dental pulp in the cat. *Archives of Oral Biology* **18**, 771-781.
- Grimwood, S., Kulagowski, J. J., Mawer, I. M., Rowley, M., Leeson, P. D., & Foster, A. C. (1995). Allosteric modulation of the glutamate site on the NMDA receptor by four novel glycine site antagonists. *European Journal of Pharmacology* **290**, 221-226.
- Guan, Y., Borzan, J., Meyer, R. A., & Raja, S. N. (2006). Windup in dorsal horn neurons is modulated by endogenous spinal mu-opioid mechanisms. *Journal of Neuroscience* **26**, 4298-4307.
- Guirimand, F., Dupont, X., Brasseur, L., Chauvin, M., & Bouhassira, D. (2000). The effects of ketamine on the temporal summation (wind-up) of the R_{III} nociceptive flexion reflex and pain in humans. *Anesth Analg* **90**, 408-414.
- Guy, N., Chalus, M., Dallel, R., & Voisin, D. L. (2005). Both oral and caudal parts of the spinal trigeminal nucleus project to the somatosensory thalamus in the rat. *European Journal of Neuroscience* **21**, 741-754.

- Haley, J. E., Sullivan, A. F., & Dickenson, A. H. (1990). Evidence for spinal N-methyl-D-aspartate receptor involvement in prolonged chemical nociception in the rat. *Brain Research* **518**, 218-226.
- Hamba, M., Hisamitsu, H., & Muro, M. (1992). Wind-up of tooth pulp-evoked responses and its suppression in rat trigeminal caudal neurons. *Brain Research Bulletin* **29**, 883-889.
- Hamby, W. B., Shinnars, B. M., & Marsh, I. A. (1948). Trigeminal tractotomy. Observations on forty-eight cases. *Archives of Surgery* **57**, 171-177.
- Hamilton, R. B. & Norgren, R. (1984). Central projections of gustatory nerves in the rat. *Journal of Comparative Neurology* **222**, 560-577.
- Hardy, J. D., Wolff, H. G., & Goodell, H. (1950). Experimental evidence on the nature of cutaneous hyperalgesia. *J.Clin.Invest* **29**, 115-140.
- Hayashi, H. (1982). Differential terminal distribution of single large cutaneous afferent fibers in the spinal trigeminal nucleus and in the cervical spinal dorsal horn. *Brain Research* **244**, 173-177.
- Henry, J. L. (1987). Discussion of nomenclature for tachykinins and tachykinin receptors. In *Substance P and Neurokinins* pp. 17-18. Springer-Verlag, New York.
- Herrero, J. F., Laird, J. M. A., & Lopez-Garcia, J. A. (2000). Wind-up spinal cord neurones and pain sensation : much ado about something. *Prog Neurobiol* **61**, 169-203.
- Hershey, A. D. & Krause, J. E. (1990). Molecular characterization of a functional cDNA encoding the rat substance P receptor. *Science* **247**, 958-962.
- Hoffman, D. S., Dubner, R., Hayes, R. L., & Medlin, T. P. (1981). Neuronal activity in medullary dorsal horn of awake monkeys trained in a thermal discrimination task. I. responses to innocuous and noxious thermal stimuli. *Journal of Neurophysiology* **46**, 409-427.
- Holzer, P. (1991). Capsaicin: Cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacological Reviews* **43**, 143-201.
- Honore, P., Menning, P. M., Rogers, S. D., Nichols, M. L., Basbaum, A. I., Besson, J. M., & Mantyh, P. W. (1999). Spinal substance P receptor expression and internalization in acute, short-term, and long-term inflammatory pain states. *J Neurosci* **19**, 7670-7678.
- Hökfelt, T., Kellerth, J.-O., Nilsson, G., & Pernow, B. (1975). Substance P: Localization in the central nervous system and in some primary sensory neurons. *Science* **190**, 889-890.
- Hu, J. W. (1990). Response properties of nociceptive and non-nociceptive neurons in the rat's trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn) related to cutaneous and deep craniofacial afferent stimulation and modulation by diffuse noxious inhibitory controls. *Pain* **41**, 331-345.
- Hu, J. W., Dostrovsky, J. O., Lenz, Y. E., Ball, G. J., & Sessle, B. J. (1986). Tooth pulp deafferentation is associated with functional alterations in the properties of neurons in the trigeminal spinal tract nucleus. *Journal of Neurophysiology* **56**, 1650-1668.

- Hu, J. W., Dostrovsky, J. O., & Sessle, B. J. (1981). Functional properties of neurons in cat trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn). I. Responses to oral-facial noxious and nonnoxious stimuli and projections to thalamus and subnucleus oralis. *Journal of Neurophysiology* **45**, 173-192.
- Hu, J. W. & Sessle, B. J. (1984). Comparison of responses of cutaneous nociceptive and nonnociceptive brain stem neurons in trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn) and subnucleus oralis to natural and electrical stimulation of tooth pulp. *Journal of Neurophysiology* **52**, 39-53.
- Hu, J. W., Sessle, B. J., Raboisson, P., Dallel, R., & Woda, A. (1992). Stimulation of craniofacial muscle afferents induces prolonged facilitatory effects in trigeminal nociceptive brain-stem neurones. *Pain* **48**, 53-60.
- Hu, J. W., Woda, A., & Sessle, B. J. (1999). Effects of pre-emptive local anaesthesia on tooth pulp deafferentation-induced neuroplastic changes in cat trigeminal brainstem neurones. *Archives of Oral Biology* **44**, 287-293.
- Hunt, S. P., Kelly, J. S., Emson, P. C., Kimmel, J. R., Miller, R. J., & Wu, J.-Y. (1981). An immunohistochemical study of neuronal populations containing neuropeptides or γ -aminobutyrate within the superficial layers of the rat dorsal horn. *Neuroscience* **6(10)**, 1883-1898.
- Hunt, S. P., Pini, A., & Evan, G. (1987). Induction of *c-fos*-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature* **328**, 632-634.
- Ide, L. S. & Killackey, H. P. (1985). Fine structural survey of the rat's brainstem sensory trigeminal complex. *Journal of Comparative Neurology* **235**, 145-168.
- Ikegami, S. & Kawamura, H. (1979). Avoidance conditioning to tooth pulp stimulation in the cat after bulbar transection. *Physiology and Behavior* **23**, 593-596.
- Ishii, T., Moriyoshi, K., Sugihara, H., Sakurada, K., Kadotani, H., Yokoi, M., Akazawa, C., Shigemoto, R., Mizuno, N., Masu, M., & . (1993). Molecular characterization of the family of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *J.Biol.Chem.* **268**, 2836-2843.
- Jacquin, M. F., Chiaia, N. L., Haring, J. H., & Rhoades, R. W. (1990). Intersubnuclear connections within the rat trigeminal brainstem complex. *Somatosensory and Motor Research* **7**, 399-420.
- Jacquin, M. F., Semba, K., Egger, M. D., & Rhoades, R. W. (1983). Organization of HRP-labeled trigeminal mandibular primary afferent neurons in the rat. *Journal of Comparative Neurology* **215**, 397-420.
- Jasmin, L., Gogas, K. R., Ahlgren, S. C., Levine, J. D., & Basbaum, A. I. (1994). Walking evokes a distinctive pattern of Fos-like immunoreactivity in the caudal brainstem and spinal cord of the rat. *Neuroscience* **58**, 275-286.
- Jeftinija, S. & Urban, L. (1994). Repetitive stimulation induced potentiation of excitatory transmission in the rat dorsal horn: An in vitro study. *Journal of Neurophysiology* **71**, 216-228.

- Jessell, T. M. & Iversen, L. L. (1977). Opiate analgesics inhibit substance P release from rat trigeminal nucleus. *Nature* **268**, 549-551.
- Jiffry, M. T. M. (1981). Afferent innervation of the rat incisor pulp. *Experimental Neurology* **73**, 209-218.
- Johnson, J. W. & Ascher, P. (1987). Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* **325**, 529-531.
- Julius, D. & Basbaum, A. I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature* **413**, 203-210.
- Kage, R., McGregor, G. P., Thim, L., & Conlon, J. M. (1988). Neuropeptide-gamma: a peptide isolated from rabbit intestine that is derived from gamma-preprotachykinin. *J. Neurochem.* **50**, 1412-1417.
- Kanazawa, I. & Jessell, T. (1976). Post mortem changes and regional distribution of substance P in the rat and mouse nervous system. *Brain Research* **117**, 362-367.
- Kellstein, D. E., Price, D. D., Hayes, R. L., & Mayer, D. J. (1990). Evidence that substance P selectively modulates C-fiber-evoked discharges of dorsal horn nociceptive neurons. *Brain Research* **526**, 291-298.
- Kerr, F. W. L. (1963). The divisional organization of afferent fibres of the trigeminal nerve. *Brain* **86**, 721-732.
- Kerr, F. W. L. (1970). The fine structure of the subnucleus caudalis of the trigeminal nerve. *Brain Research* **23**, 129-145.
- Khasabov, S. G., Rogers, S. D., Ghilardi, J. R., Peters, C. M., Mantyh, P. W., & Simone, D. A. (2002). Spinal neurons that possess the substance P receptor are required for the development of central sensitization. *J Neurosci* **22**, 9086-9098.
- Khayyat, G. F., Yu, U. J., & King, R. B. (1975). Response patterns to noxious and non-noxious stimuli in rostral trigeminal relay nuclei. *Brain Research* **97**, 47-60.
- Killackey, H. P. & Erzurumlu, R. S. (1981). Trigeminal projections to the superior colliculus of the rat. *Journal of Comparative Neurology* **201**, 221-242.
- Kimura, S., Goto, K., Ogawa, T., Sugita, Y., & Kanazawa, I. (1984). Pharmacological characterization of novel mammalian tachykinins, neurokinin alpha and neurokinin beta. *Neuroscience Research* **2**, 97-104.
- King, A. E. & Lopez-Garcia, J. A. (1993). Excitatory amino acid receptor-mediated neurotransmission from cutaneous afferents in rat dorsal horn *in vitro*. *Journal of Physiology* **472**, 443-457.
- Kleckner, N. W. & Dingledine, R. (1988). Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science* **241**, 835-837.
- Kobayashi, Y. & Matsumura, G. (1996). Central projections of primary afferent fibers from the rat trigeminal nerve labeled with isolectin B4-HRP. *Neuroscience Letters* **217**, 89-92.

- Koltzenburg, M. & Handwerker, H. O. (1994). Differential ability of human cutaneous nociceptors to signal mechanical pain and to produce vasodilatation. *Journal of Neuroscience* **14**, 1756-1765.
- Kristensen, J. D., Svensson, B., & Gordh, T., Jr. (1992). The NMDA-receptor antagonist CPP abolishes neurogenic 'wind-up pain' after intrathecal administration in humans. *Pain* **51**, 249-253.
- Kruger, L., Saporta, S., & Feldman, S. G. (1977). Axonal transport studies of the sensory trigeminal complex. In *Pain in the trigeminal region.*, eds. Anderson, D. J. & Matthews, B., pp. 191-201. Elsevier, Amsterdam.
- Kruger, L., Sternini, C., Brecha, N. C., & Mantyh, P. W. (1988). Distribution of calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in relation to the rat central somatosensory projection. *Journal of Comparative Neurology* **273**, 149-162.
- Kuraishi, Y., Hirota, N., Sato, Y., Hanashima, N., Takagi, H., & Satoh, M. (1989). Stimulus specificity of peripherally evoked substance P release from the rabbit dorsal horn *in situ*. *Neuroscience* **30**, 241-250.
- Kutsuwada, T., Kashiwabuchi, N., Mori, H., Sakimura, K., Kushiya, E., Araki, K., Meguro, H., Masaki, H., Kumanishi, T., Arakawa, M., & . (1992). Molecular diversity of the NMDA receptor channel. *Nature* **358**, 36-41.
- Kutsuwada, T., Sakimura, K., Manabe, T., Takayama, C., Katakura, N., Kushiya, E., Natsume, R., Watanabe, M., Inoue, Y., Yagi, T., Aizawa, S., Arakawa, M., Takahashi, T., Nakamura, Y., Mori, H., & Mishina, M. (1996). Impairment of suckling response, trigeminal neuronal pattern formation, and hippocampal LTD in NMDA receptor epsilon 2 subunit mutant mice. *Neuron* **16**, 333-344.
- Kwan, C. L., Hu, J. W., & Sessle, B. J. (1993). Effects of tooth pulp deafferentation on brainstem neurons of the rat trigeminal subnucleus oralis. *Somatosensory and Motor Research* **10**, 115-131.
- Kwan, C. L., Hu, J. W., & Sessle, B. J. (1996). Neuroplastic effects of neonatal capsaicin on neurons in adult rat trigeminal nucleus principalis and subnucleus oralis. *Journal of Neurophysiology* **75**, 298-310.
- Laird, J. M., de la Rubia, P. G., & Cervero, F. (1995). Excitability changes of somatic and viscerosomatic nociceptive reflexes in the decerebrate-spinal rabbit: role of NMDA receptors. *J.Physiol* **489** (Pt 2), 545-555.
- Laird, J. M. A., Hargreaves, R. J., & Hill, R. G. (1993). Effect of RP 67580, a non-peptide neurokinin₁ receptor antagonist, on facilitation of a nociceptive spinal flexion reflex in the rat. *British Journal of Pharmacology* **109**, 713-718.
- Lapa, R. C., Bauer, J. A., & Lindsey, C. J. (1996). A comparative and ultrastructural study of synaptic contacts established by primary sensory fibers in the spinal trigeminal nucleus of the rat. *Tissue and Cell* **28**, 569-576.
- Le Bars, D., Dickenson, A. H., & Besson, J.-M. (1979). Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). I. Effects on dorsal horn convergent neurones in the rat. *Pain* **6**, 283-304.

- Le Bars, D., Dickenson, A. H., & Besson, J.-M. (1980a). Microinjection of morphine within nucleus raphe magnus and dorsal horn neurone activities related to nociception in the rat. *Brain Research* **189**, 467-481.
- Le Bars, D., Guilbaud, G., & Besson, J.-M. (1976). Differential effects of morphine on responses of dorsal horn lamina V type cells elicited by A and C fibre stimulation in the spinal cat. *Brain Research* **115**, 518-524.
- Le Bars, D., Guilbaud, G., Chitour, D., & Besson, J.-M. (1980b). Does systemic morphine increase descending inhibitory controls of dorsal horn neurones involved in nociception ? *Brain Research* **202**, 223-228.
- Le Bars, D. & Villanueva, L. (1988). Electrophysiological evidence for the activation of descending inhibitory controls by nociceptive afferent pathways. *Progress in Brain Research* **77**, 275-299.
- Lee, C. M., Iversen, L. L., Hanley, M. R., & Sandberg, B. E. (1982). The possible existence of multiple receptors for substance P. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* **318**, 281-287.
- Legendre, P. & Westbrook, G. L. (1991). Ifenprodil blocks N-methyl-D-aspartate receptors by a two-component mechanism. *Mol.Pharmacol.* **40**, 289-298.
- Levine, J. D. (1998). New directions in pain research: molecules to maladies. *Neuron* **20**, 649-654.
- Levine, J. D., Fields, H. L., & Basbaum, A. I. (1993). Peptides and the primary afferent nociceptor. *Journal of Neuroscience* **13**, 2273-2286.
- Li, H. & Mizuno, N. (1997). Collateral projections from single neurons in the dorsal column nucleus to both the cochlear nucleus and the ventrobasal thalamus: A retrograde double-labeling study in the rat. *Neuroscience Letters* **222**, 87-90.
- Li, J.-L., Li, Y.-Q., Kaneko, T., & Mizuno, N. (1999a). Preprodynorphin-like immunoreactivity in medullary dorsal horn neurons projecting to thalamic regions in the rat. *Neuroscience Letters* **264**, 13-16.
- Li, J., Simone, D. A., & Larson, A. A. (1999b). Windup leads to characteristics of central sensitization. *Pain* **79**, 75-82.
- Li, Y. Q., Li, H., Kaneko, T., & Mizuno, N. (1999c). Substantia gelatinosa neurons in the medullary dorsal horn: An intracellular labeling study in the rat. *Journal of Comparative Neurology* **411**, 399-412.
- Light, A. R. & Kavookjian, A. M. (1988). Morphology and ultrastructure of physiologically identified substantia gelatinosa (Lamina II) neurons with axons that terminate in deeper dorsal horn laminae (III-V). *Journal of Comparative Neurology* **267**, 172-189.
- Light, A. R. & Perl, E. R. (1979a). Reexamination of the dorsal root projection to the spinal dorsal horn including observations on the differential termination of coarse and fine fibers. *J Comp.Neurol* **186**, 117-132.

- Light, A. R. & Perl, E. R. (1979b). Spinal termination of functionally identified primary afferent neurons with slowly conducting myelinated fibers. *Journal of Comparative Neurology* **186**, 133-150.
- Light, A. R., Shults, R. C., & Jones, S. L. (1992). Nociceptive neural organization in the trigeminal nuclei. In *The initial processing of pain and its descending control: spinal and trigeminal systems*, ed. Gildenberg, P. L., pp. 178-202. Karger, Houston.
- Lipton, J. A., Ship, J. A., & Larach-Robinson, D. (1993). Estimated prevalence and distribution of reported orofacial pain in the United States. *J.Am.Dent.Assoc.* **124**, 115-121.
- Liu, H., Brown, J. L., Jasmin, L., Maggio, J. E., Vigna, S. R., Mantyh, P. W., & Basbaum, A. I. (1994). Synaptic relationship between substance P and the substance P receptor: Light and electron microscopic characterization of the mismatch between neuropeptides and their receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 1009-1013.
- Liu, H., Mantyh, P. W., & Basbaum, A. I. (1997). NMDA-receptor regulation of substance P release from primary afferent nociceptors. *Nature* **386**, 721-724.
- Liu, X.-G. & Sandkühler, J. (1997). Characterization of long-term potentiation of C-fiber - Evoked potentials in spinal dorsal horn of adult rat: Essential role of NK1 and NK2. *Journal of Neurophysiology* **78**, 1973-1982.
- Lodge, D. & Johnson, K. M. (1990). Noncompetitive excitatory amino acid receptor antagonists. *Trends in Pharmacological Sciences* **11**, 81-86.
- Luccarini, P., Cadet, R., Duale, C., & Woda, A. (1998). Effects of lesions in the trigeminal oralis and caudalis subnuclei on different orofacial nociceptive responses in the rat. *Brain Res* **803**, 79-85.
- Luccarini, P., Sessle, B. J., & Woda, A. (2001). Superficial and deep convergent nociceptive neurons are differentially affected by N-methyl-D-aspartate applied on the brainstem surface of the rat medullary dorsal horn. *Neuroscience* **107**, 311-316.
- Lundberg, L. E., Jorum, E., Holm, E., & Torebjork, H. E. (1992). Intra-neural electrical stimulation of cutaneous nociceptive fibres in humans: effects of different pulse patterns on magnitude of pain. *Acta Physiol Scand.* **146**, 41-48.
- Luo, P. & Dessem, D. (1995). Inputs from identified jaw-muscle spindle afferents to trigeminothalamic neurons in the rat: A double-labeling study using retrograde HRP and intracellular biotinamide. *Journal of Comparative Neurology* **353**, 50-66.
- Lynch, D. R., Anegawa, N. J., Verdoorn, T., & Pritchett, D. B. (1994). N-methyl-D-aspartate receptors: different subunit requirements for binding of glutamate antagonists, glycine antagonists, and channel-blocking agents. *Mol.Pharmacol.* **45**, 540-545.
- MacDonald, J. F., Miljkovic, Z., & Pennefather, P. (1987). Use-dependent block of excitatory amino acid currents in cultured neurons by ketamine. *Journal of Neurophysiology* **58**, 251-266.

- Magerl, W., Wilk, S. H., & Treede, R. D. (1998). Secondary hyperalgesia and perceptual wind-up following intradermal injection of capsaicin in humans. *Pain* **74**, 257-268.
- Malick, A. & Burstein, R. (1998). Cells of origin of the trigeminohypothalamic tract in the rat. *J Comp.Neurol* **400**, 125-144.
- Manni, E., Palmieri, G., & Marini, R. (1971). Extraocular muscle proprioception and the descending trigeminal nucleus. *Experimental Neurology* **33**, 195-204.
- Mantyh, P. W., Clohisy, D. R., Koltzenburg, M., & Hunt, S. P. (2002). Molecular mechanisms of cancer pain. *Nature Rev Cancer* **2**, 201-209.
- Mantyh, P. W., DeMaster, E., Malhotra, A., Ghilardi, J. R., Rogers, S. D., Mantyh, C. R., Liu, H., Basbaum, A. I., Vigna, S. R., & Maggio, J. E. (1995). Receptor endocytosis and dendrite reshaping in spinal neurons after somatosensory stimulation. *Science* **268**, 1629-1632.
- Mantyh, P. W., Rogers, S. D., Honore, P., Allen, B., Ghilardi, J. R., Li, J., Daughters, R. S., Lappi, D. A., Wiley, R. G., & Simone, D. A. (1997). Inhibition of hyperalgesia by ablation of lamina I spinal neurons expressing the substance P receptor. *Science* **278**, 275-279.
- Marcus, D. A. (2002). Pregnancy and chronic headache. *Expert Opin Pharmacother.* **3**, 389-393.
- Marfurt, C. F. (1981). The somatotopic organization of the cat trigeminal ganglion as determined by the horseradish peroxidase technique. *Anatomical Record* **201**, 105-118.
- Marfurt, C. F. & Turner, D. F. (1984). The central projections of tooth pulp afferent neurons in the rat as determined by the transganglionic transport of horseradish peroxidase. *Journal of Comparative Neurology* **223**, 535-547.
- Marshall, G. E., Shehab, S. A. S., Spike, R. C., & Todd, A. J. (1996). Neurokinin-1 receptors on lumbar spinothalamic neurons in the rat. *Neuroscience* **72**, 255-263.
- Marvizon, J. C., Wang, X., Matsuka, Y., Neubert, J. K., & Spigelman, I. (2003). Relationship between capsaicin-evoked substance P release and neurokinin 1 receptor internalization in the rat spinal cord. *Neuroscience* **118**, 535-545.
- Masu, Y., Nakayama, K., Tamaki, H., Harada, Y., Kuno, M., & Nakanishi, S. (1987). cDNA cloning of bovine substance-K receptor through oocyte expression system. *Nature* **329**, 836-838.
- McKenzie, K. G. (1955). Trigeminal tractotomy. *Clinical Neurosurgery* **2**, 50-69.
- McLennan, H. (1981). Actions of the optical isomers of 2-amino-5-phosphonovalerate as antagonists of excitatory amino acids. *European Journal of Pharmacology* **73**, 97-99.
- Meessen, H. & Olszewski, J. (1966). *A cytoarchitectonic atlas of the rhombencephalon of the rabbit*, Karger S ed. Little Brown and Co, Basel, New York, Boston.
- Meguro, H., Mori, H., Araki, K., Kushiya, E., Kutsuwada, T., Yamazaki, M., Kumanishi, T., Arakawa, M., Sakimura, K., & Mishina, M. (1992). Functional characterization of a heteromeric NMDA receptor channel expressed from cloned cDNAs. *Nature* **357**, 70-74.

- Mendell, L. M. & Wall, P. D. (1965). Responses of dorsal cord cell to peripheral cutaneous unmyelinated fibres. *Nature* **206**, 97-99.
- Menetrey, D., Gannon, A., Levine, J. D., & Basbaum, A. I. (1989). Expression of c-fos protein in interneurons and projection neurons of the rat spinal cord in response to noxious somatic, articular, and visceral stimulation. *J Comp Neurol.* **285**, 177-195.
- Meng, I. D., Hu, J. W., Benetti, A. P., & Bereiter, D. A. (1997). Encoding of corneal input in two distinct regions of the spinal trigeminal nucleus in the rat: Cutaneous receptive field properties, responses to thermal and chemical stimulation, modulation by diffuse noxious inhibitory controls, and projections to the parabrachial area. *Journal of Neurophysiology* **77**, 43-56.
- Millan, M. J. (2002). Descending control of pain. *Prog Neurobiol* **66**, 355-474.
- Mogil, J. S., Chesler, E. J., Wilson, S. G., Juraska, J. M., & Sternberg, W. F. (2000). Sex differences in thermal nociception and morphine antinociception in rodents depend on genotype. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **24**, 375-389.
- Monyer, H., Sprengel, R., Schoepfer, R., Herb, A., Higuchi, M., Lomeli, H., Burnashev, N., Sakmann, B., & Seeburg, P. H. (1992). Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* **256**, 1217-1221.
- Morisset, V. & Nagy, F. (1996). Modulation of regenerative membrane properties by stimulation of metabotropic glutamate receptors in rat deep dorsal horn neurons. *Journal of Neurophysiology* **76**, 2794-2798.
- Morisset, V. & Nagy, F. (1998). Nociceptive integration in the rat spinal cord: role of non-linear membrane properties of deep dorsal horn neurons. *European Journal of Neuroscience* **10**, 3642-3652.
- Morisset, V. & Nagy, F. (2000). Plateau potential-dependent windup of the response to primary afferent stimuli in rat dorsal horn neurons. *Eur J Neurosci* **12**, 3087-3095.
- Moriyoshi, K., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R., Mizuno, N., & Nakanishi, S. (1991). Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature* **354**, 31-37.
- Morris, R. (1989). Responses of spinal dorsal horn neurones evoked by myelinated primary afferent stimulation are blocked by excitatory amino acid antagonists acting at kainate/quisqualate receptors. *Neurosci Lett* **105**, 79-85.
- Mussap, C. J., Geraghty, D. P., & Burcher, E. (1993). Tachykinin receptors: a radioligand binding perspective. *J. Neurochem.* **60**, 1987-2009.
- Naim, M., Spike, R. C., Watt, C., Shehab, S. A., & Todd, A. J. (1997). Cells in laminae III and IV of the rat spinal cord that possess the neurokinin-1 receptor and have dorsally directed dendrites receive a major synaptic input from tachykinin-containing primary afferents. *J Neurosci* **17**, 5536-5548.
- Nakatsuka, T., Furue, H., Yoshimura, M., & Gu, J. G. (2002). Activation of central terminal vanilloid receptor-1 receptors and alpha beta-methylene-ATP-sensitive P2X receptors reveals

a converged synaptic activity onto the deep dorsal horn neurons of the spinal cord. *J Neurosci* **22**, 1228-1237.

Nasution, I. D. & Shigenaga, Y. (1987). Ascending and descending internuclear projections within the trigeminal sensory nuclear complex. *Brain Research* **425**, 234-247.

Nielsen, J. & Arendt-Nielsen, L. (1998). The influence of rate of temperature change and peak stimulus duration on pain intensity and quality. *Somatosensory and Motor Research* **15**, 220-229.

Nikolajsen, L., Hansen, C. L., Nielsen, J., Keller, J., Arendt-Nielsen, L., & Jensen, T. S. (1996). The effect of ketamine on phantom pain: A central neuropathic disorder maintained by peripheral input. *Pain* **67**, 69-77.

Nishimori, T., Sera, M., Suemune, S., Yoshida, A., Tsuru, K., Tsuiki, Y., Akisaka, T., Okamoto, T., Dateoka, Y., & Shigenaga, Y. (1986). The distribution of muscle primary afferents from the masseter nerve to the trigeminal sensory nuclei. *Brain Research* **372**, 375-381.

Nord, S. G. (1976). Bilateral projection of the canine tooth pulp to bulbar trigeminal neurons. *Brain Research* **113**, 517-525.

Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., & Prochiantz, A. (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* **307**, 462-465.

Oakden, E. L. & Boissonade, F. M. (1998). Fos expression in the ferret trigeminal nuclear complex following tooth pulp stimulation. *Neuroscience* **84**, 1197-1208.

Olave, M. J. & Maxwell, D. J. (2003). Neurokinin-1 projection cells in the rat dorsal horn receive synaptic contacts from axons that possess alpha2C-adrenergic receptors. *Journal of Neuroscience* **23**, 6837-6846.

Olszewski, J. (1950). On the anatomical and functional organization of the spinal trigeminal nucleus. *J.Comp Neurol.* **92**, 401-413.

Otsuka, M. & Yoshioka, K. (1993). Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. *Physiol Rev.* **73**, 229-308.

Pajot, J., Pelissier, T., Sierralta, F., Raboisson, P., & Dallel, R. (2000). Differential effects of trigeminal tractotomy on a δ - and C-fiber-mediated nociceptive responses. *Brain Res* **863**, 289-292.

Parada, C. A., Luccarini, P., & Woda, A. (1997). Effect of an NMDA receptor antagonist on the wind-up of neurons in the trigeminal oralis subnucleus. *Brain Research* **761**, 313-320.

Park, S. J., Chiang, C. Y., Hu, J. W., & Sessle, B. J. (2001). Neuroplasticity induced by tooth pulp stimulation in trigeminal subnucleus oralis involves NMDA receptor mechanisms. *J Neurophysiol.* **85**, 1836-1846.

Paxinos, G. & Watson, C. (1986). The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, New York.

- Pedersen, J. L., Andersen, O. K., Arendt-Nielsen, L., & Kehlet, H. (1998). Hyperalgesia and temporal summation of pain after heat injury in man. *Pain* **74**, 189-197.
- Petralia, R. S., Yokotani, N., & Wenthold, R. J. (1994). Light and electron microscope distribution of the NMDA receptor subunit NMDAR1 in the rat nervous system using a selective anti-peptide antibody. *Journal of Neuroscience* **14** (2), 667-696.
- Phelan, K. D. & Falls, W. M. (1989). An analysis of the cyto- and myeloarchitectonic organization of trigeminal nucleus interpolaris in the rat. *Somatosensory and Motor Research* **6**, 333-366.
- Piercey, M. F., Dobry, P. J. K., Schroeder, L. A., & Einspahr, F. J. (1981). Behavioral evidence that substance P may be a spinal cord sensory neuro-transmitter. *Brain Research* **210**, 407-412.
- Poulos, D. A., Mei, J., Horch, K. W., Tuckett, R. P., Wei, J. Y., Cornwall, M. C., & Burgess, P. R. (1984). The neural signal for the intensity of a tactile stimulus. *Journal of Neuroscience* **4**, 2016-2024.
- Price, D. D. (1972). Characteristics of second pain and flexion reflexes indicative of prolonged central summation. *Experimental Neurology* **37**, 371-387.
- Price, D. D., Dubner, R., & Hu, J. W. (1976). Trigeminothalamic neurons in nucleus caudalis responsive to tactile, thermal, and nociceptive stimulation of monkey's face. *Journal of Neurophysiology* **39**, 936-953.
- Price, D. D., Greenspan, J. D., & Dubner, R. (2003). Neurons involved in the exteroceptive function of pain. *Pain* **106**, 215-219.
- Price, D. D., Hu, J. W., Dubner, R., & Gracely, R. H. (1977). Peripheral suppression of first pain and central summation of second pain evoked by noxious heat pulses. *Pain* **3**, 57-68.
- Price, D. D., Hull, C. D., & Buchwald, N. A. (1971). Intracellular responses of dorsal horn cells to cutaneous and sural nerve A and C fiber stimuli. *Exp. Neurol* **33**, 291-309.
- Price, D. D., Long, S., & Huitt, C. (1992). Sensory testing of pathophysiological mechanisms of pain in patients with reflex sympathetic dystrophy. *Pain* **49**, 163-173.
- Price, D. D., Mao, J., Frenk, H., & Mayer, D. J. (1994). The *N*-methyl-D-aspartate receptor antagonist dextromethorphan selectively reduces temporal summation of second pain in man. *Pain* **59**, 165-174.
- Price, D. D., Von der Gruen, A., Miller, J., Rafii, A., & Price, C. (1985). A psychophysical analysis of morphine analgesia. *Pain* **22**, 261-269.
- Raboisson, P., Bourdiol, P., Dallel, R., Clavelou, P., & Woda, A. (1991). Responses of trigeminal subnucleus oralis nociceptive neurones to subcutaneous formalin in the rat. *Neuroscience Letters* **125**, 179-182.
- Raboisson, P., Dallel, R., Clavelou, P., Sessle, B. J., & Woda, A. (1995). Effects of subcutaneous formalin on the activity of trigeminal brain stem nociceptive neurones in the rat. *Journal of Neurophysiology* **73**, 496-505.

- Radhakrishnan, V. & Henry, J. L. (1991). Novel substance P antagonist CP96, 345, blocks responses of cat spinal dorsal horn neurons to noxious cutaneous stimulation and to substance P. *Neuroscience Letters* **132**, 39-43.
- Ralston, H. J., III & Ralston, D. D. (1982). The distribution of dorsal root axons to laminae IV, V, and VI of the Macaque spinal cord: a quantitative electron microscopic study. *J Comp Neurol* **212**, 435-448.
- Raymond, S. A., Thalhammer, J. G., Popitz-Bergez, F., & Strichartz, G. R. (1990). Changes in axonal impulse conduction correlate with sensory modality in primary afferent fibers in the rat. *Brain Research* **526**, 318-321.
- Ritz, L. A. & Greenspan, J. D. (1985). Morphological features of lamina V neurons receiving nociceptive input in cat sacrocaudal spinal cord. *Journal of Comparative Neurology* **238**, 440-452.
- Rupniak, N. M., Carlson, E. J., Shepherd, S., Bentley, G., Williams, A. R., Hill, A., Swain, C., Mills, S. G., & Di, S. (2003). Comparison of the functional blockade of rat substance P (NK1) receptors by GR205171, RP67580, SR140333 and NKP-608. *Neuropharmacology* **45**, 231-241.
- Russo, R. E. & Hounsgaard, J. (1994). Short-term plasticity in turtle dorsal horn neurons mediated by L-type Ca²⁺ channels. *Neuroscience* **61**, 191-197.
- Russo, R. E., Nagy, F., & Hounsgaard, J. (1997). Modulation of plateau properties in dorsal horn neurones in a slice preparation of the turtle spinal cord. *J.Physiol* **499** (Pt 2), 459-474.
- Sabino, M. A., Honore, P., Rogers, S. D., Mach, D. B., Luger, N. M., & Mantyh, P. W. (2002). Tooth extraction-induced internalization of the substance P receptor in trigeminal nucleus and spinal cord neurons: imaging the neurochemistry of dental pain. *Pain* **95**, 175-186.
- Sakimura, K., Kutsuwada, T., Ito, I., Manabe, T., Takayama, C., Kushiya, E., Yagi, T., Aizawa, S., Inoue, Y., Sugiyama, H., & . (1995). Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 subunit. *Nature* **373**, 151-155.
- Salter, M. W. & Henry, J. L. (1991). Responses of functionally identified neurones in the dorsal horn of the cat spinal cord to substance P neurokinin A and psysalaemin. *Neuroscience* **43**, 601-610.
- Scholz, J. & Woolf, C. J. (2002). Can we conquer pain. *Nature neurosci* **5**, 1062-1067.
- Schouenborg, J. (1984). Functional and topographical properties of field potentials evoked in rat dorsal horn by cutaneous c-fibre stimulation. *J.Physiol.* **356**, 169-192.
- Schouenborg, J. & Sjölund, B. H. (1983). Activity evoked by A-and C-afferent fibers in rat dorsal horn neurons and its relation to a flexion reflex. *Journal of Neurophysiology* **50**, 1108-1121.
- Sessle, B. J. (2000). Acute and chronic craniofacial pain: Brainstem mechanisms of nociceptive transmission and neuroplasticity, and their clinical correlates. *Crit.Rev.Oral Biol.Med.* **11**, 57-91.

- Sessle, B. J. & Greenwood, L. F. (1975). Effects of trigeminal tractotomy and of carbazepine on single trigeminal sensory neurones in cats. *Journal of Dental Research* **54**, 201-206.
- Sessle, B. J. & Greenwood, L. F. (1976). Inputs to trigeminal brain stem neurones from facial, oral, tooth pulp and pharyngolaryngeal tissues: I. Responses to innocuous and noxious stimuli. *Brain Research* **117**, 211-226.
- Sessle, B. J., Hu, J. W., Amano, N., & Zhong, G. (1986). Convergence of cutaneous, tooth pulp, visceral, neck and muscle afferents onto nociceptive and non-nociceptive neurones in trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn) and its implications for referred pain. *Pain* **27**, 219-235.
- Sheng, M., Cummings, J., Roldan, L. A., Jan, Y. N., & Jan, L. Y. (1994). Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature* **368**, 144-147.
- Shigemoto, R., Yokota, Y., Tsuchida, K., & Nakanishi, S. (1990). Cloning and expression of a rat neuromedin K receptor cDNA. *J.Biol.Chem.* **265**, 623-628.
- Shigenaga, Y., Sera, M., Nishimori, T., Suemune, S., Nishimura, M., Yoshida, A., & Tsuru, K. (1988). The central projection of masticatory afferent fibers to the trigeminal sensory nuclear complex and upper cervical spinal cord. *Journal of Comparative Neurology* **268**, 489-507.
- Shortland, P. J., DeMaro, J. A., & Jacquin, M. F. (1995). Trigeminal structure-function relationships: A evaluation based on long-range staining of a large sample of brainstem A β fibers. *Somatosensory and Motor Research* **12**, 249-275.
- Silverman, J. D. & Kruger, L. (1985). Projections of the rat trigeminal sensory nuclear complex demonstrated by multiple fluorescent dye retrograde transport. *Brain Research* **361**, 383-388.
- Sivilotti, L. G., Thompson, S. W. N., & Woolf, C. J. (1993). Rate of rise of the cumulative depolarization evoked by receptive stimulation of small caliber afferents is a predictor of action potential windup in rat spinal neurons in vitro. *Journal of Neurophysiology* **69**, 1621-1631.
- Sjöqvist, O. (1938). Studies on pain conduction in the trigeminal nerve. *Acta Psychiatry Neurol Scand Suppl.*, 1-139.
- Skofitsch, G. & Jacobowitz, D. M. (1985). Calcitonin gene-related peptide: detailed immunohistochemical distribution in the central nervous system. *Peptides* **6(4)**, 721-745.
- Slugg, R. M. & Light, A. R. (1994). Spinal cord and trigeminal projections to the pontine parabrachial region in the rat as demonstrated with *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin. *Journal of Comparative Neurology* **339**, 49-61.
- Smyth, G. E. (1939). The systemization and central connections of the spinal tract and nucleus of the trigeminal nerve. A clinical and pathological study. *Brain* **62**, 41-87.
- Snider, R. M., Constantine, J. W., & Lowe, J. A. (1991). A potent nonpeptide antagonist of the substance P (NK1) receptor. *Science* **251**, 435-437.

- Spiller, W. G. (1915). Remarks on the central representation of sensation. *Journal of Nervous and Mental Disease* **42**, 399-418.
- Strassman, A. M., Potrebic, S., & Maciewicz, R. J. (1994). Anatomical properties of brainstem trigeminal neurons that respond to electrical stimulation of dural blood vessels. *Journal of Comparative Neurology* **346**, 349-365.
- Strassman, A. M. & Vos, B. P. (1993). Somatotopic and laminar organization of fos-like immunoreactivity in the medullary and upper cervical dorsal horn induced by noxious facial stimulation in the rat. *Journal of Comparative Neurology* **331**, 495-516.
- Stubhaug, A., Breivik, H., Eide, P. K., Kreunen, M., & Foss, A. (1997). Mapping of punctuate hyperalgesia around a surgical incision demonstrates that ketamine is a powerful suppressor of central sensitization to pain following surgery. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* **41**, 1124-1132.
- Sucher, N. J., Awobuluyi, M., Choi, Y. B., & Lipton, S. A. (1996). NMDA receptors: from genes to channels. *Trends in Pharmacological Sciences* **17**, 348-355.
- Sugimoto, T., Fujiyoshi, Y., He, Y. F., Xiao, C., & Ichikawa, H. (1997a). Trigeminal primary projection to the rat brain stem sensory trigeminal nuclear complex and surrounding structures revealed by anterograde transport of cholera toxin B subunit-conjugated and *Bandeiraea simplicifolia* isolectin B4-conjugated horseradish peroxidase. *Neuroscience Research* **28**, 361-371.
- Sugimoto, T., Fujiyoshi, Y., Xiao, C., He, Y. F., & Ichikawa, H. (1997b). Central projection of calcitonin gene-related peptide (CGRP)- and substance P (SP)-immunoreactive trigeminal primary neurons in the rat. *J Comp Neurol* **378**, 425-442.
- Sugimoto, T., He, Y. F., Funahashi, M., & Ichikawa, H. (1998). Induction of immediate-early genes *c-fos* and *zif268* in the subnucleus oralis by noxious tooth pulp stimulation. *Brain Research* **794**, 353-358.
- Sugimoto, T., Xiao, C., Takeyama, A., He, Y. F., Takano-Yamamoto, T., & Ichikawa, H. (1999). Apoptotic cascade of neurons in the subcortical sensory relay nuclei following the neonatal infraorbital nerve transection. *Brain Research* **824**, 284-290.
- Sugiura, Y., Lee, C. L., & Perl, E. R. (1986). Central projections of identified, unmyelinated (C) afferent fibers innervating mammalian skin. *Science* **234**, 358-361.
- Suzuki, R., Hunt, S. P., & Dickenson, A. H. (2003). The coding of noxious mechanical and thermal stimuli of deep dorsal horn neurones is attenuated in NK1 knockout mice. *Neuropharmacology* **45**, 1093-1100.
- Suzuki, R., Morcuende, S., Webber, M., Hunt, S. P., & Dickenson, A. H. (2002). Superficial NK1-expressing neurons control spinal excitability through activation of descending pathways. *Nat. Neurosci.* **5**, 1319-1326.
- Takemura, M., Shimada, T., Sugiyo, S., Nokubi, T., & Shigenaga, Y. (2000). Mapping of c-Fos in the trigeminal sensory nucleus following high- and low-intensity afferent stimulation in the rat. *Experimental Brain Research* **130**, 113-123.

- Takemura, M., Sugimoto, T., & Shigenaga, Y. (1991). Difference in central projection of primary afferents innervating facial and intraoral structures in the rat. *Experimental Neurology* **111**, 324-331.
- Takemura, M., Tsujio, A., Iwase, K., Shimada, T., & Shigenaga, Y. (1998). Central terminals of orofacial primary afferents and NADPH-diaphorase activity in the trigemino-solitary complex of rats. *Brain Res* **781**, 77-89.
- Tashiro, T., Takahashi, O., Satoda, T., Matsushima, R., Uemura-Sumi, M., & Mizuno, N. (1991). Distribution of axons showing calcitonin gene-related peptide- and/or substance P-like immunoreactivity in the sensory trigeminal nuclei of the cat. *Neuroscience Research* **11**, 119-133.
- Tatemoto, K., Lundberg, J. M., Jornvall, H., & Mutt, V. (1985). Neuropeptide K: isolation, structure and biological activities of a novel brain tachykinin. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **128**, 947-953.
- Thompson, S. W. N., King, A. E., & Woolf, C. J. (1990). Activity-dependent changes in rat ventral horn neurons in vitro; Summation of prolonged afferent evoked postsynaptic depolarizations produce a D-2-amino-5--phosphonovaleric acid sensitive windup. *Europ J Neuroscience* **2**, 638-649.
- Tingley, W. G., Roche, K. W., Thompson, A. K., & Huganir, R. L. (1993). Regulation of NMDA receptor phosphorylation by alternative splicing of the C-terminal domain. *Nature* **364**, 70-73.
- Tiwari, R. K. & King, R. B. (1974). Fiber projections from trigeminal nucleus caudalis in primate (squirrel monkey and baboon). *Journal of Comparative Neurology* **158**, 191-205.
- Todd, A. J. & Lochhead, V. (1990). GABA-like immunoreactivity in type I glomeruli of rat substantia gelatinosa. *Brain Research* **514**, 171-174.
- Todd, A. J. & Spike, R. C. (1993). The localization of classical transmitters and neuropeptides within neurons in laminae I-III of the mammalian spinal dorsal horn. *Progress in Neurobiology* **41**, 609-638.
- Todd, A. J., Spike, R. C., Brodbelt, A. R., Price, R. F., & Shehab, S. A. S. (1994). Some inhibitory neurons in the spinal cord develop c-fos- immunoreactivity after noxious stimulation. *Neuroscience* **63**, 805-816.
- Torneck, C. D., Kwan, C. L., & Hu, J. W. (1996). Inflammatory lesions of the tooth pulp induce changes in brainstem neurons of the rat trigeminal subnucleus oralis. *Journal of Dental Research* **75**, 553-561.
- Torvik, A. (1956). Afferent connections to the sensory trigeminal nuclei, the nucleus of the solitary tract and adjacent structures; an experimental study in the rat. *J.Comp Neurol.* **106**, 51-141.
- Travers, J. B. & Norgren, R. (1983). Afferent projections to the oral motor nuclei in the rat. *Journal of Comparative Neurology* **220**, 280-298.

- Treede, R. D., Meyer, R. A., Raja, S. N., & Campbell, J. N. (1992). Peripheral and central mechanisms of cutaneous hyperalgesia. *Progress in Neurobiology* **38**, 397-421.
- Urban, L. & Randic, M. (1984). Slow excitatory transmission in rat dorsal horn: possible mediation by peptides. *Brain Res* **290**, 336-341.
- Vierck, C. J., Jr., Cannon, R. L., Fry, G., Maixner, W., & Whitsel, B. L. (1997). Characteristics of temporal summation of second pain sensations elicited by brief contact of glabrous skin by a preheated thermode. *Journal of Neurophysiology* **78**, 992-1002.
- Voisin, D. L., Domejean-Orliaguet, S., Chalus, M., Dallel, R., & Woda, A. (2002). Ascending connections from the caudal part to the oral part of the spinal trigeminal nucleus in the rat. *Neuroscience* **109**, 183-193.
- Voisin, D. L. & Nagy, F. (2001). Sustained L-type calcium currents in dissociated deep dorsal horn neurons of the rat : characteristics and modulation. *Neuroscience* **102**, 461-472.
- Vorobjev, V. S., Sharonova, I. N., Walsh, I. B., & Haas, H. L. (1993). Histamine potentiates N-methyl-D-aspartate responses in acutely isolated hippocampal neurons. *Neuron* **11**, 837-844.
- Wagman, I. H. & Price, D. D. (1969). Responses of dorsal horn cells of *M. mulatta* to cutaneous and sural nerve A and C fiber stimuli. *Journal of Neurophysiology* **32**, 803-817.
- Waite, P. M. E. & Tracey, D. J. (1995). Trigeminal sensory system. In *The rat nervous system*, ed. Paxinos, G., pp. 705-724. Academic Press.
- Wall, P. D. (1999). Introduction. In *Textbook of pain*, eds. Wall, P. D. & Melzack, R., pp. 1-18.
- Wall, P. D. & Taub, A. (1962). Four aspects of trigeminal nucleus and a paradox. *Journal of Neurophysiology* **25**, 110-126.
- Wang, L. G., Li, H.-M., & Li, J. S. (1994). Formalin induced FOS -like immunoreactive neurons in the trigeminal spinal caudal subnucleus project to contralateral parabrachial nucleus in the rat. *Brain Res* **649**, 62-70.
- Wang, X. M. & Mokha, S. S. (1996). Opioids modulate N-methyl-D-aspartic acid (NMDA)-evoked responses of trigeminothalamic neurons. *Journal of Neurophysiology* **76**, 2093-2096.
- Warncke, T., Stubhaug, A., & Jorum, E. (1997). Ketamine, an NMDA receptor antagonist, suppresses spatial and temporal properties of burn-induced secondary hyperalgesia in man: a double-blind, cross-over comparison with morphine and placebo. *Pain* **72**, 99-106.
- Watanabe, M., Inoue, Y., Sakimura, K., & Mishina, M. (1992). Developmental changes in distribution of NMDA receptor channel subunit mRNAs. *Neuroreport* **3**, 1138-1140.
- Watkins, J. C. & Evans, R. H. (1981). Excitatory amino acid transmitters. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* **21**, 165-204.
- Weinberger, L. M. & Grant, F. C. (1942). Experience with intramedullary tractotomy,III studies in sensation. *Archives of Neurology and Psychiatry* **48**, 371.

- Weng, H. R., Mansikka, H., Winchurch, R., Raja, S. N., & Dougherty, P. M. (2001). Sensory processing in the deep spinal dorsal horn of neurokinin-1 receptor knockout mice. *Anesthesiology* **94**, 1105-1112.
- Whitehead, M. C. & Frank, M. E. (1983). Anatomy of the gustatory system in the hamster: central projections of the Chorda tympani and the lingual nerve. *Journal of Comparative Neurology* **220**, 378-395.
- Williams, K. (1993). Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl-D-aspartate receptor: selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors. *Mol.Pharmacol.* **44**, 851-859.
- Willis, W. D. & Coggeshall, R. E. (1991). Sensory mechanisms of the spinal cord. In *Sensory mechanisms of the spinal cord* Plenum Press, New York and London.
- Windle, W. F. (1926). The distribution and probable significance of unmyelinated nerve fibers in the trigeminal nerve of the cat. *Journal of Comparative Neurology* **41**, 453-477.
- Winkler, C. A case of occlusion of the arteria cerebelli posterior inferior. 17 II, 914-926. 1915. Amsterdam. Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen - KNOW Proceedings. 28-11-1914.
- Woda, A., Molat, J. L., & Luccarini, P. (2001). Low doses of N-methyl-D-aspartate antagonists in superficial laminae of medulla oblongata facilitate wind-up of convergent neurones. *Neuroscience* **107**, 317-327.
- Wong, E. H., Kemp, J. A., Priestley, T., Knight, A. R., Woodruff, G. N., & Iversen, L. L. (1986). The anticonvulsant MK-801 is a potent N-methyl-D-aspartate antagonist. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **83**, 7104-7108.
- Woolf, C. J. (1983). Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. *Nature* **306**, 686-688.
- Woolf, C. J. & Fitzgerald, M. (1981). Lamina-specific alteration of c-fibre evoked activity by morphine in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Neuroscience Letters* **25**, 37-41.
- Woolf, C. J. & King, A. E. (1987). Physiology and morphology of multireceptive neurons with C-afferent fiber inputs in the deep dorsal horn of the rat lumbar spinal cord. *J Neurophysiol* **58**, 460-479.
- Woolf, C. J. & Salter, M. W. (2000). Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* **288**, 1765-1769.
- Xu, X.-J., Dalsgaard, C.-J., & Wiesenfeld-Hallin, Z. (1992). Spinal substance P and N-methyl-D-aspartate receptors are coactivated in the induction of central sensitization of the nociceptive flexor reflex. *Neuroscience* **51**, 641-648.
- Yamamoto, T. & Yaksh, T. L. (1992). Studies on the spinal interaction of morphine and the NMDA antagonist MK-801 on the hyperesthesia observed in a rat model of sciatic mononeuropathy. *Neuroscience Letters* **135**, 67-70.

- Yoshida, A., Dostrovsky, J. O., Sessle, B. J., & Chiang, C. Y. (1991). Trigeminal projections to the nucleus submedius of the thalamus in the rat. *Journal of Comparative Neurology* **307**, 609-625.
- Yoshida, A., Sessle, B. J., Dostrovsky, J. O., & Chiang, C. Y. (1992). Trigeminal and dorsal column nuclei projections to the anterior pretectal nucleus in the rat. *Brain Research* **590**, 81-94.
- Young, R. F. & King, R. B. (1973). Fiber spectrum of the trigeminal sensory root of the baboon determined by electron microscopy. *Journal of Neurosurgery* **38**, 65-72.
- Young, R. F., Oleson, T. D., & Perryman, K. M. (1981). Effect of trigeminal tractotomy on behavioral response to dental pulp stimulation in the monkey. *Journal of Neurosurgery* **55**, 420-430.
- Young, R. F. & Perryman, K. M. (1984). Pathways for orofacial pain sensation in the trigeminal brain- stem nuclear complex of the Macaque monkey. *Journal of Neurosurgery* **61**, 563-568.
- Young, R. F. & Perryman, K. M. (1986). Neuronal responses in rostral trigeminal brain-stem nuclei of macaque monkeys after chronic trigeminal tractotomy. *Journal of Neurosurgery* **65**, 508-516.
- Zhang, D. X., Owens, C. M., & Willis, W. D. (1991). Intracellular study of electrophysiological features of primate spinothalamic tract neurons and their responses to afferent inputs. *Journal of Neurophysiology* **65**, 1554-1566.
- Zhang, K. M., Wang, X. M., & Mokha, S. S. (1996). Opioids modulate N-methyl-D-aspartic acid (NMDA)-evoked responses of neurons in the superficial and deeper dorsal horn of the medulla (trigeminal nucleus caudalis). *Brain Research* **719**, 229-233.
- Zou, X., Lin, Q., & Willis, W. D. (2001). NMDA or non-NMDA receptor antagonists attenuate increased Fos expression in spinal dorsal horn GABAergic neurons after intradermal injection of capsaicin in rats. *Neuroscience* **106**, 171-182.

PUBLICATIONS DE THESE

Coste J., Voisin D. L., Luccarini P., Dallel R. (2008)

A role for windup in trigeminal sensory processing: intensity coding of nociceptive stimuli in the rat. *Cephalalgia* **28**[6], 631-639.

Coste J., Voisin D. L., Miraucourt L., Dallel R., Luccarini P. (2008)

Dorsal horn NK1-expressing neurons control windup of downstream trigeminal nociceptive neurons. *Pain* **137**[2], 340-351.

Woda A., Blanc O., Voisin D. L., Coste J., Molat J.-L., Luccarini P. (2004)

Bidirectional modulation of windup by NMDA receptors in the rat spinal trigeminal nucleus. *European Journal of Neuroscience* **19**, 2009-2016.

Jérôme COSTE – “ Etude de la fonction et des mécanismes du wind-up des neurones nociceptifs trigéminaux chez le rat: rôle des récepteurs NMDA et des récepteurs NK1”, 18 f, 2 ill, 138 p

Thèse: Université; Spécialité Neurosciences – Auvergne - Clermont-Ferrand I ; 2006 - N°2006CLF1D038

Résumé : Le wind-up est une augmentation progressive, fréquence dépendante, de la réponse d'un neurone lors de l'application répétitive de stimuli électriques nociceptifs identiques sur un même territoire. Ce phénomène est essentiellement exprimé par les neurones WDR de la moelle comme du trijumeau. Il dépend en partie de l'activation des récepteurs NMDA et NK1. Il est apparenté chez l'homme à la sommation temporelle et a des conséquences sur la perception de la douleur. Sa signification fonctionnelle n'est pas encore clairement établie.

Chez le rat anesthésié et au sein du complexe sensitif du trijumeau, l'objectif de ce travail est : 1) d'analyser les caractéristiques et la fonction du wind-up des neurones WDR trigéminaux, 2) d'identifier les réseaux neuronaux sous tendant le wind-up et 3) d'établir le rôle des rNMDA et des rNK1 dans le wind-up. Nous avons adopté une approche électrophysiologique lors d'enregistrements extracellulaires au sein du Sp5O associés à des micro-injections dans le Sp5C. De plus, une approche neuroanatomique a permis d'identifier des réseaux d'interneurones véhiculant le message depuis le Sp5C vers le Sp5O.

1) le wind-up des neurones WDR du Sp5O dépend de l'intensité de la stimulation nociceptive et permet d'améliorer les capacités de codage de stimuli nociceptifs de courte durée. Par ailleurs, nous montrons que le wind-up entraîne une modification transitoire (environ 2min) de l'excitabilité des neurones WDR. Cette modification d'excitabilité générée par la wind-up est responsable uniquement de la facilitation des réponses évoquées par la mise en jeu des fibres C. Nous suggérons que l'augmentation de l'excitabilité centrale générée par le wind-up et la sensibilisation centrale sont des phénomènes différents. 2) le wind-up dépend de l'activation des rNMDA locaux alors qu'il est soumis à une inhibition via les rNMDA situés dans les couches superficielles du Sp5C. Le modèle trigéminal permet donc de montrer que, dès l'étage segmentaire, il existe un ajustement permanent de l'amplification du message douloureux. 3) enfin, le développement du wind-up dépend également de l'activation des rNK1 situés sur des interneurones localisés dans la couche III du Sp5C.

En conclusion, il apparaît que le wind-up est un phénomène segmentaire permettant le codage de stimulations nociceptives de courte durée et sous tendu à la mise en jeu de voies polysynaptiques rNK1 et rNMDA dépendantes.

Abstract : Wind-up is a frequency-dependent increase of neuronal response during electrical repetitive noxious stimulation of receptive field. This phenomenon is generally expressed in spinal and trigeminal WDR neurons. It partially depends on the activation of NMDA and NK1 receptors. In human, wind-up is related with the temporal summation and has consequences on the perception of pain. Its functional significance is not yet clearly established.

In sensory trigeminal complex of anaesthetized rat, we aim at: 1) analysing the characteristics and function of the wind-up of trigeminal WDR neurons. 2) identifying the neural networks underlying the wind-up and 3) establishing the role of rNMDA and rNK1 in this phenomenon. We use an electrophysiological approach with extracellular recordings in the Sp5O associated with microinjections in the Sp5C. Moreover a neuroanatomical study allowed identifying networks of interneurons conveying the message since the Sp5C towards the Sp5O.

1) the wind-up of WDR neurons of the Sp5O depends on the intensity of noxious stimulation and makes it possible to improve the coding capacities of short duration noxious stimuli. In addition, we show that wind-up involves a transitory modification (approximately 2min duration) of the WDR neurons excitability. The modification of excitability generated by the wind-up is responsible only for the facilitation responses evoked by C fibres. We suggest that the increase in the central excitability generated by the wind-up and central sensitization are different phenomena. 2) wind-up depends on the activation of the local rNMDA whereas it is submitted to an inhibition mediated by the rNMDA located in the superficial layers of the Sp5C. The trigeminal model enables to show that, even at the segmentary level, there is a permanent adjustment of the amplification of the painful message. 3) finally, the development of the wind-up also depends on the activation of the rNK1 located on interneurons localised of the lamina III of the Sp5C.

To conclude, it appears that wind-up is a segmentary phenomenon allowing the coding of short duration noxious stimulations and triggered by rNK1 and rNMDA polysynaptic ways.

RUBRIQUE DE CLASSEMENT :
NEUROSCIENCES

MOTS - CLES : wind-up, douleur, nociception, complexe sensitif du trijumeau (CST), neurones à convergence WDR, rNK1, rNMDA, électrophysiologie, neuroanatomie, rat

KEY - WORDS : wind-up, pain, nociception, sensory trigeminal complex , WDR neurons , rNK1, rNMDA, electrophysiology, neuroanatomy, rat

JURY:

Président : M le Pr Radhouane DALLEL
Rapporteurs : M. le Pr Yves BOUCHER
M. le Pr Marc LANDRY
Assesseurs: M. le Pr Claude DUBRAY
M. le Pr Philippe LUCCARINI