



HAL
open science

Organisation des contrôles descendants hypothalamiques de la nociception trigéminal chez le rat

Khaled Abdallah

► **To cite this version:**

Khaled Abdallah. Organisation des contrôles descendants hypothalamiques de la nociception trigéminal chez le rat. Médecine humaine et pathologie. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2012. Français. NNT : 2012CLF1DD04 . tel-04498214

HAL Id: tel-04498214

<https://theses.hal.science/tel-04498214>

Submitted on 11 Mar 2024

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 20 Décembre 2012
par

Khaled ABDALLAH

**ORGANISATION DES CONTROLES
DESCENDANTS HYPOTHALAMIQUES DE
LA NOCICEPTION TRIGEMINALE
CHEZ LE RAT**

Directeur de thèse : Professeur Philippe LUCCARINI

JURY

**Pr Pierrick POISBEAU rapporteur
Dr Pierre Hervé LUPPI rapporteur
Dr Fabien MARCHAND
Pr Philippe LUCCARINI**

INSERM U1107 « Neuro-Dol » Douleur Trigéminal et Migraine,
Faculté de Chirurgie Dentaire,
11 bd Charles de Gaulle - 63000 Clermont-Ferrand

Remerciements

Très honoré de leur présence, je souhaite remercier sincèrement les membres du jury de thèse : le Docteur Pierre Hervé Luppi et le Professeur Pierrick Poisbeau qui ont accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs, ainsi que le Docteur Fabien Marchand et le Professeur Philippe Luccarini qui ont accepté d'examiner ce travail.

Je tiens particulièrement à adresser ma profonde gratitude et toute mon estime au Professeur Radhouane Dallel pour m'avoir accueilli au sein de son équipe, ainsi que pour son soutien à toute épreuve.

Je remercie également le Professeur Philippe Luccarini pour m'avoir encadré et soutenu pendant ces trois années de thèse ainsi que pour son aide précieuse dans la lecture et la correction de ce manuscrit.

Je voudrais aussi remercier tous les membres du laboratoire Inserm U1107 pour leur soutien au quotidien. Je tiens à remercier tout particulièrement Alain Artola pour ses précieux conseils et son aide dans l'écriture du manuscrit, Lénaïc Monconduit pour ses conseils utiles sur le plan technique et scientifique, Anne-Marie Gaydier pour sa gestion parfaite de tous les types de situations que j'ai pu rencontrer au cours de ma thèse ainsi que pour son soutien pendant les moments les plus stressants, Amélie Descheemaeker pour son aide sur le plan technique, Jean-Louis Mollat pour ses conseils utiles en électrophysiologie. Je tiens à remercier également Nelly Boyer, Myriam Antri, Christelle Gremeau-Richard, Paul Piochon et Audrey Normandin pour tous les bons moments qu'on a pu partager.

Ces remerciements ne seraient pas complets sans une pensée pour mes amis Cédric Peirs, Céline Melin et Eric Ducret ; avec qui j'espère garder un lien très fort. Merci de m'avoir aidé et encouragé, et pour m'avoir changé les idées quand j'en avais besoin.

Enfin, je voudrais remercier mes parents et ma famille pour m'avoir soutenu, encouragé et permis d'arriver jusqu'au bout.

Sommaire

INTRODUCTION.....	7
1. La nociception.....	8
1.1 De la périphérie vers la moelle.....	8
1.2 Transduction.....	9
1.3 Transmission	9
1.3.1 Organisation segmentaire spinale	9
1.3.2 Neurones nociceptifs spinaux	12
1.3.3 Organisation du complexe sensitif du trijumeau.....	13
1.4 Intégration suprasegmentaire	16
1.4.1 Les voies ascendantes	16
1.4.2 Relais.....	16
2. Contrôles de la nociception.....	18
2.1 Mécanismes Périphériques.....	18
2.2 Mécanismes segmentaires	19
2.3 Mécanismes supra-segmentaire	19
3. Anatomie fonctionnelle de l'hypothalamus.....	22
3.1 Les principales efférences de l'hypothalamus	24
3.2 Les principales afférences de l'hypothalamus	24
3.3 Relations hypothalamo-spinales.....	25
3.3.1 Noyau paraventriculaire	25
3.3.1.1 Ocytocine	29
a) Récepteurs à l'ocytocine	29
b) Implication de l'ocytocine dans la douleur.....	29
3.3.1.2 Vasopressine	32
a) Récepteurs à la vasopressine.....	32
b) Implication de la vasopressine dans la douleur.....	33
3.3.1.3 Corticotropin-releasing factor (CRF).....	35
3.3.2 Noyau rétrochiasmatique	38
3.3.2.1 Peptide CART	40
3.3.2.2 Alpha-Melanocyte stimulating hormone (α -MSH).....	40
a) Implication des mélanocortines dans la douleur	41
3.3.3 L'aire latérale et périfornicale de l'hypothalamus	42

3.3.3.1. Les Orexine A et B.....	42
a) Projections vers le système nerveux central.....	43
b) Les récepteurs aux orexines	43
c) Rôle de l'orexine dans le système nerveux central	44
d) Orexine : dichotomie anatomo-fonctionnelle	45
e) Implication des orexines dans la douleur	46
f) Rôle de l'orexine dans l'analgésie induite par un stress	46
3.3.4 Hypothalamus postérieur dorsal : Noyau A11	47
3.3.4.1 Dopamine	47
a) Distribution des noyaux dopaminergiques.....	47
b) Récepteurs dopaminergiques	49
c) Rôle de la dopamine dans la douleur	49
d) Contrôles dopaminergiques	51
3.3.4.2 Dopamine et douleurs chez l'homme.....	53
a) La Fibromyalgie	53
b) Syndrome des jambes sans repos	53
c) La maladie de Parkinson	54
4. Les objectifs	54
4.1 Organisation des contrôles descendants hypothalamiques sur le complexe sensitif du trijumeau	55
4.2 Organisation du Contrôle descendant dopaminergique	56
4.3 Contrôle descendant orexinergique	57
CHAPITRE 1 : Organisation des contrôles descendants hypothalamiques sur complexe sensitif du trijumeau	59
CHAPITRE 2 : Organisation des contrôles descendants hypothalamiques sur complexe sensitif du trijumeau	101
CHAPITRE 3 : Organisation des contrôles descendants hypothalamiques sur complexe sensitif du trijumeau	137
SYNTHESE - DISCUSSION GENERALE	172
1. Organisation des projections hypothalamo-trigéminales	173
2. Rôle des neurones dopaminergiques du noyau A11 dans la modulation de la nociception trigéminale.....	177
3. Rôles des neurones orexines des noyaux latéral et périfornical dans la nociception	182
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	186

INTRODUCTION

La douleur est une expérience sensorielle et émotionnelle liée aux dommages réels ou potentiels de tissus, ou décrite en termes de tels dommages. Qu'un stimulus donné soit perçu comme douloureux ou non dépend de sa nature, de l'état physiologique, émotionnel et cognitif et de l'expérience du sujet qui reçoit ce stimulus. Ainsi, deux composantes principales rendent compte du message douleur : une composante sensori-discriminative et une composante affectivo-émotionnelle et cognitive.

La douleur est perçue à la suite de la mise en jeu de mécanismes neurophysiologiques conduisant à l'intégration de messages nociceptifs. L'ensemble de ces mécanismes représente la nociception.

1. La nociception

1.1 De la périphérie vers la moelle

La peau, les articulations, les muscles et les viscères sont innervés par différentes catégories de récepteurs qui sont situés sur les terminaisons nerveuses périphériques des neurones sensoriels dont les corps cellulaires se trouvent dans les ganglions périphériques. Ces neurones possèdent un axone dit « en T » avec une branche périphérique qui capte le stimulus et une branche centrale qui transfère l'information vers la première synapse au niveau segmentaire. Ces fibres périphériques sont de trois types:

- Les fibres myélinisées de gros diamètre A β correspondant aux mécanorécepteurs cutanés à bas seuil présentent une grande vitesse de conduction (30-80 m/s) et conduisent les informations tactiles
- les fibres faiblement myélinisées de petit diamètre A δ ont une vitesse de conduction moins grande (5-30 m/s) et transmettent les informations tactiles et nociceptives
- les fibres non-myélinisées de petit diamètre (C) conduisent lentement (0,5-2m/s) les informations nociceptives et thermiques.

Ainsi, la nociception fait suite à l'activation des nocicepteurs qui constituent les terminaisons libres de fibres de petit calibre, myélinisées (fibres A-delta) ou non (fibres C). La nociception implique de nombreux mécanismes au cours desquels trois étapes se succèdent (Basbaum et al., 2009).

1.2 Transduction

En premier lieu, la transduction correspond à la détection d'un stimulus mécanique, chimique et/ou thermique appliqué à la périphérie (la peau, des muscles, des viscères etc...). Le stimulus nociceptif est capté via les nocicepteurs qui constituent les terminaisons libres des fibres de fin diamètre (fibre A δ ou C) des neurones ganglionnaires. Le stimulus est détecté par la transduction de la modalité thermique, mécanique ou chimique en message électrique. Ce mécanisme repose sur la présence de récepteurs canaux (ex : TRPV1,...) dont l'ouverture ou la fermeture va induire, par changement du flux ionique entrant (ions Na⁺) ou sortant (ions K⁺), une dépolarisation membranaire. L'influx nerveux ainsi créé va ensuite se propager le long de l'axone notamment grâce à la présence de canaux voltages dépendants (canaux sodium). Le message va ainsi atteindre le premier relais central (niveau spinal ou trigéminal) au niveau de la première synapse entre la terminaison de la fibre afférente primaire et le neurone de second ordre (deutoneurone) pour accéder aux voies ascendantes aboutissant aux centres supraspinaux d'intégration.

1.3 Transmission

Après l'étape de transduction, succède celle dite de la transmission, où l'influx parvient jusqu'à la corne dorsale de la moelle épinière, ou l'équivalent trigéminal (noyau spinal du trijumeau). A ces niveaux existe une organisation cytoarchitecturale laminaire en cinq couches (Figure 1).

1.3.1 Organisation segmentaire spinale

Les couches I et II sont aussi appelées couches superficielles et constituent la cible principale des afférences nociceptives (Molander et al., 1989). La couche I ou couche marginale, très fine, comprend des interneurones de petite taille, et des neurones de projection de plus grande taille. Bien que la couche I contienne la plus forte densité de neurones de projection de la corne dorsale, ceux-ci ne représentent que 5 % du nombre total de ses neurones (Spike et al., 2003). La couche II est principalement composée d'interneurones. Ils sont particulièrement denses dans la partie externe de la couche II. La couche III comporte également une forte densité de neurones ; la plupart sont des interneurones de taille plus importante que ceux de la couche II, mais on trouve également des neurones de projection. Les couches IV et V sont beaucoup plus hétérogènes, avec des neurones de tailles variées. Certains sont des neurones de projection.

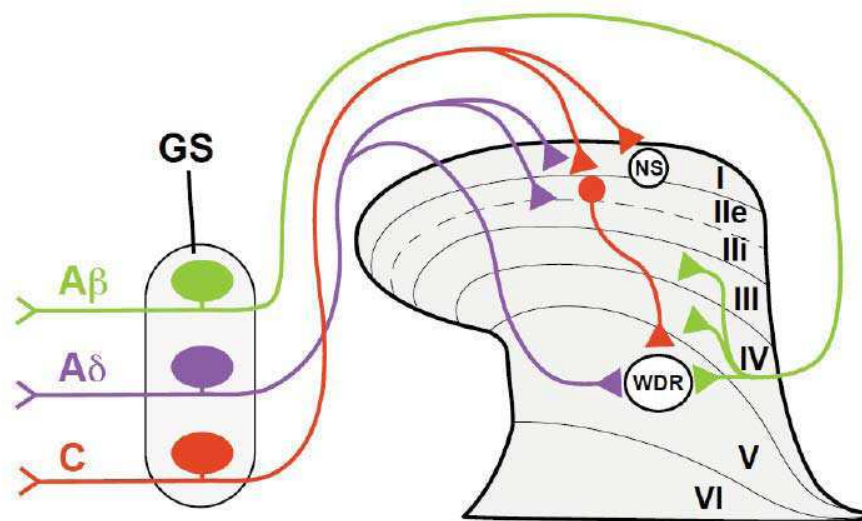


Figure 1. Représentation schématique illustrant les sites de projection des fibres afférentes primaires selon leur type ($A\beta$, $A\delta$ et C), dans les différentes couches (I-V) de la corne dorsale de la moelle épinière. GS : ganglion spinal, NS : neurone nociceptif spécifique, WDR : neurone «wide dynamic range» (d'après D'Mello and Dickenson, 2008).

Les fibres A β qui véhiculent les informations non nociceptives tactiles et proprioceptives (Popova et al., 1995; Petko and Antal, 2000) forment des collatérales qui pénètrent sur plusieurs segments rostraux et caudaux de la moelle épinière et s'arborescent globalement dans les couches III-V de la corne dorsale (REXED, 1952). Il a toutefois été démontré de façon plus fine chez le rat que cette arborisation pouvait s'étendre jusqu'aux interneurons de la couche II interne (Woolf, 1987; Hughes et al., 2003).

Les fibres A δ d'origine cutanée entrent au niveau segmentaire avec des collatérales s'étendant sur 2 à 3 segments et se terminent de façon préférentielle dans les couches I et II externes et également dans la couche V. Certaines collatérales se terminent aussi dans la partie ventrale de la couche IV. Les fibres nociceptives A δ d'origine viscérale et musculaire se terminent dans les couches I, IV et V.

Les fibres nociceptives non myélinisées de petit diamètre (type C) et d'origine cutanée se terminent dans les couches superficielles (I et II) de la corne dorsale de la moelle épinière (Nagy and Hunt, 1982; Hunt and Rossi, 1985 ; Hunt and Mantyh, 2001; Julius and Basbaum, 2001). Les fibres nociceptives C d'origine viscérale et musculaire se terminent dans les couches I, II, V et X. De façon générale, les projections centrales des fibres nociceptives d'origine cutanée se font de façon dense et localisée alors que celles des fibres viscérales sont beaucoup plus diffuses (celles des fibres musculaires se situant entre ces deux extrêmes). Ces différences pourraient expliquer le caractère diffus des douleurs d'origine viscérale ou musculaire (Sugiura et al., 1989).

Les fibres nociceptives A δ et C contactent soit directement les neurones dans la couche I (Craig and Kniffki, 1985), soit des interneurons dans la couche II (SZENTAGOTHAI, 1964), siège d'une importante modulation de l'information sensorielle (Lu and Perl, 2005). De plus, les fibres A δ contactent directement les cellules des couches V. Il résulte donc que les informations des fibres C parviennent aux neurones des couches V par une voie polysynaptique via les interneurons de la couche II.

Le principal neurotransmetteur exciteur du système nerveux central, le glutamate, assure la transmission synaptique entre les terminaisons des nocicepteurs et les deutoneurons de la corne dorsale. Les récepteurs mis en jeu dans cette neurotransmission sont de type ionotrope (AMPA, NMDA) ou métabotrope (mGluRs). Le glutamate est également présent à la terminaison des fibres non nociceptives. Au niveau des fibres C, le glutamate est co-libéré avec d'autres neuromédiateurs. Il existe en effet des fibres peptidergiques libérant des

neuropeptides – dont les principaux représentants sont la substance P et le calcitonin gene-related peptide (CGRP) – et des fibres non-peptidergiques marquées sélectivement par l'agglutinine de l'isolectine B4. Le récepteur des tachykinines de type NK1 (Neurokinin 1) est le principal récepteur sur lequel agit la substance P (pour revue, Hunt and Mantyh, 2001).

1.3.2 Neurones nociceptifs spinaux

Au niveau des couches cytoarchitecturales sont présents différents types de neurones (deutoneurones) nociceptifs (Figure 1). Les neurones de second ordre qui transfèrent les messages nociceptifs vers les centres supra-segmentaires sont surtout situés dans la couche I et dans les couches profondes (IV-VI). Dans ces couches se distinguent les neurones nociceptifs non spécifiques (NNS) ou neurones WDR (wide dynamic range) et les neurones nociceptifs spécifiques (NS).

Les neurones WDR, encore appelés neurones à convergence, sont principalement localisés dans la couche V. Ils reçoivent des entrées monosynaptiques des fibres A β et A δ . Ils reçoivent également des entrées cutanées indirectes de type C à partir d'interneurones superficiels, eux-mêmes contactés directement par les fibres C. Les neurones WDR peuvent être activés par des stimulations nociceptives mécaniques, thermiques, électriques ou chimiques de leur champ récepteur périphérique cutané, mettant en jeu des fibres myélinisées A β et A δ , puis, pour des intensités de stimulation plus fortes, des fibres à myéline C. Ces neurones codent d'une façon remarquable l'intensité des stimulations appliquées sur leur champ récepteur (Price et al., 2003). Au niveau individuel, comme en termes de population, ces caractéristiques leur permettent de discriminer entre messages nociceptifs et messages non nociceptifs (Coghill et al., 1993). Ils présentent aussi une excellente capacité de discrimination spatiale en termes de population (Price et al., 1978).

Les neurones nociceptifs spécifiques (NS) sont situés surtout dans la couche I, plus rarement dans les couches profondes, et répondent de façon exclusive à des stimulations nociceptives. Ils ne reçoivent pas d'entrées directes des mécanorécepteurs de type A β . La plupart reçoivent de façon exclusive des entrées de type A δ ou des entrées de type C. Ils sont distribués de façon somatotopique dans la corne dorsale. De plus, leurs champs récepteurs de petite taille leur confèrent des capacités de localisation spatiale remarquables (Craig, 2003). Selon Craig, la classification des neurones de la couche I se ferait, au moins chez le chat et chez le primate, selon un schéma qui associe de façon étroite fonction et morphologie neuronale. En effet, les neurones nociceptifs spécifiques, qui répondent uniquement au

pincement et à la chaleur nociceptive, sont fusiformes, parfois multipolaires ; les neurones polymodaux, qui répondent à la chaleur nociceptive, au pincement et au froid nociceptif sont multipolaires ; les neurones thermoceptifs, qui répondent uniquement au froid non nociceptif, sont pyramidaux. Cette classification est en faveur d'une organisation des réseaux de la nociception sous la forme de lignes dédiées au traitement de sous-modalités définies (Craig, 2003). Elle implique un rôle prépondérant des neurones de la couche I dans le traitement et la transmission de l'information nociceptive dans les cornes dorsales, au détriment des neurones WDR. Un grand nombre d'auteurs s'accordent néanmoins à penser que neurones à convergence et neurones NS jouent les uns comme les autres un rôle important et qu'ils interagissent de façon coordonnée pour analyser et transmettre les caractéristiques sensorielles (nature, intensité, localisation, durée) de l'information nociceptive.

1.3.3 Organisation segmentaire du complexe sensitif du trijumeau

Les fibres du nerf trijumeau assurent la détection et la transmission périphérique des messages somesthésiques en provenance de la face, des cavités buccales, nasales et des méninges (Dallel et al., 2003). Ces fibres afférentes primaires, dont les corps cellulaires sont regroupés au sein du ganglion de Gasser, pénètrent dans le tronc cérébral au niveau du pont par la racine sensitive trigéminal et se terminent dans le complexe sensitif du trijumeau (Figures 2, 3). Ce dernier est composé de deux noyaux, le noyau principal (spécifiquement dédié aux messages non nociceptifs) et le noyau spinal lui-même subdivisé en trois sous-noyaux, qui sont du plus rostral au plus caudal : les sous noyaux oral (Sp5O), interpolaire (Sp5I) et caudal (Sp5C).

Dans le Sp5C, on retrouve sensiblement la même organisation anatomo-fonctionnelle que dans la moelle épinière car il constitue un équivalent fonctionnel de la corne dorsale (Figure 4). En effet, il est organisé en 5 couches cytoarchitecturales sur lesquelles s'articulent, comme dans la corne dorsale, les connexions entre neurones des couches superficielles et profondes et fibres afférentes primaires nociceptives et non nociceptives. Cependant le noyau spinal du trijumeau présente une double représentation de la nociception orofaciale puisqu'il existe un relais supplémentaire dans le Sp5O (Dallel et al., 1990). Ce noyau reçoit directement des messages nociceptifs par les fibres A δ et indirectement par les fibres C via des interneurons des couches superficielles du Sp5C (Voisin et al., 2002; Woda et al., 2004; Coste et al., 2008). Le transfert des informations nociceptives vers les structures supra-segmentaires est assuré par les neurones des couches I et V du Sp5C et aussi par les neurones du Sp5O (Dallel et al., 2004; De, I et al., 2004; Guy et al., 2005; Voisin et al., 2005). Il en résulte que le

Sp5O peut être considéré comme un équivalent fonctionnel d'une couche V spinale (Dallel et al., 1998).

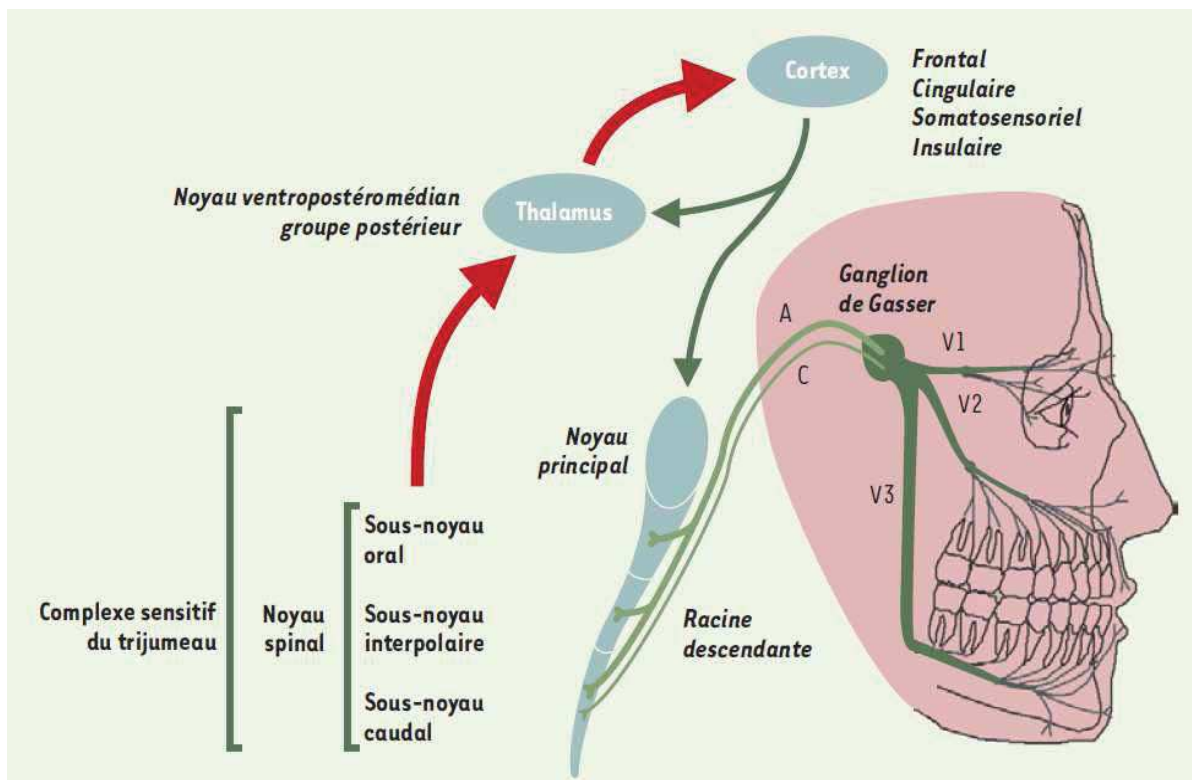


Figure 2. Organisation du complexe sensitif du trijumeau. V1 : nerf ophtalmique, V2 : nerf maxillaire, V3 : nerf mandibulaire. A noter que les fibres C p arrivent sélectivement au niveau du sous noyau caudal (Sp5C) (Dallel et al., 2003).

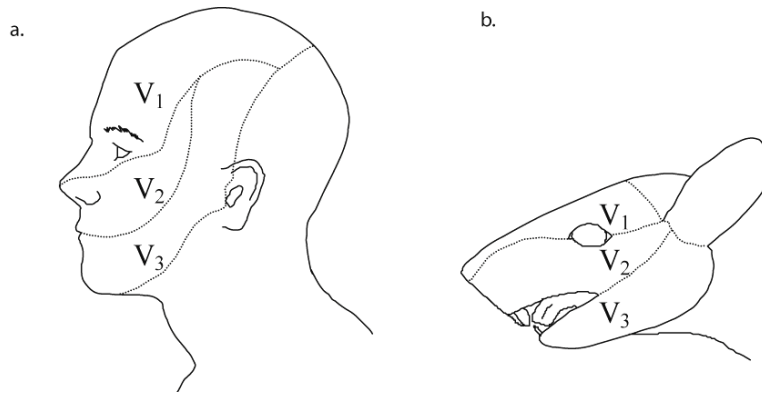


Figure 3. Territoires cutanés innervés par le nerf trijumeau. Schéma illustrant chez l'homme (a) et chez le rat (b) les territoires cutanés innervés par les trois branches sensibles du nerf trijumeau (V1 nerf ophtalmique ; V2 nerf maxillaire et V3 nerf mandibulaire) (d'après Kandel et Schwartz, 1985 et Waite et Tracey, 1995).

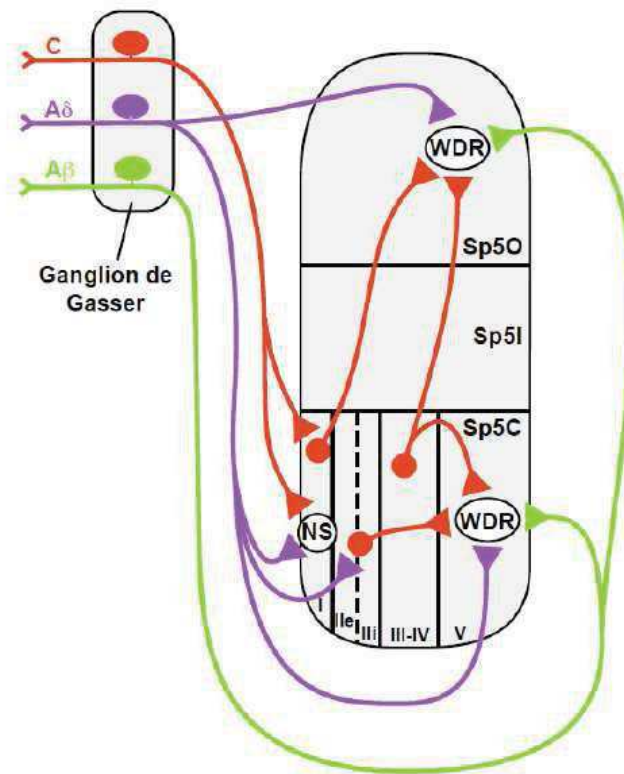


Figure 4. Illustration schématique de l'organisation du complexe sensitif du trijumeau. Sp5C : sous noyau caudal, Sp5I : sous noyau interpolaire, Sp5O : sous noyau oral, NS : noyau nociceptif spécifique, WDR : neurone « wide dynamic range ». Le Sp5C présente une organisation laminaire semblable à celle de la corne dorsale avec 5 couches (I à V). Les messages véhiculés par les fibres C parviennent uniquement au niveau des couches superficielles du Sp5C et sont transférés aux neurones de projection ascendante NS et WDR. A noter que les messages liés aux fibres C sont transférés indirectement (via des interneurons) vers les WDR des couches V du Sp5C et les WDR du Sp5O (d'après Lapirot 2009).

1.4 Intégration suprasegmentaire

1.4.1 Principales voies ascendantes

A partir des neurones de projection (spinaux ou trigéminaux) commence l'étape d'intégration durant laquelle le message nociceptif sera véhiculé via des voies ascendantes vers les centres supraspinaux (Figure 5a). On distingue trois principaux faisceaux ascendants le faisceau spino-thalamique, le faisceau spino-réticulaire et le faisceau spino-mésencéphalique (Cf Le Bars et Willer, 2004).

- Le faisceau spino-thalamique rassemble les axones des neurones issus de la corne dorsale qui se projettent sur le thalamus latéral et ceux des neurones des couches VII et VIII de la corne ventrale qui se terminent dans les régions médianes du thalamus. Un contingent de neurones de la couche I se projette sur le nucleus submedius et la partie postérieure du noyau ventromédian.

- Le faisceau spino-réticulaire regroupe les fibres issues des mêmes régions de la corne dorsale. Ces fibres se projettent sur les noyaux gigantocellulaire et réticulaire, ainsi que sur le subnucleus reticularis dorsalis (SRD) à partir des couches I et V-VII.

- Le faisceau spino- (ponto) mésencéphalique projette principalement sur deux structures du tronc cérébral : la substance grise périaqueducale et le noyau parabrachial (PB), située dans la région dorsolatérale du pont. Le PB reçoit des informations en provenance de la couche I de la moelle par des fibres qui cheminent dans le funiculus dorsolatéral.

1.4.2 Relais

- Le relais réticulaire : Les messages nociceptifs peuvent donc atteindre le niveau thalamique via une voie indirecte après relais dans la formation réticulaire. Le noyau SRD, situé dans la région la plus caudale du bulbe, est activé quasi exclusivement par des messages nociceptifs (Villanueva et al., 1996). Ce noyau se projette sur le thalamus médian formant ainsi la voie spino-réticulo-thalamique dont le rôle est de coder l'intensité de la douleur.

- Le relais ponto-mésencéphalique: La région bulbaire rostroventrale (RVM), la PAG et le PB sont les principaux noyaux sur lesquels aboutissent des fibres issues des neurones spinaux des couches superficielles (notamment couche I). Alors que les deux premiers envoient principalement des projections descendantes vers les neurones segmentaires, le PB relaie l'information plus rostralement vers l'hypothalamus et l'amygdale, conférant à cette voie un rôle dans les aspects végétatifs, endocriniens et émotionnels liés à la nociception.

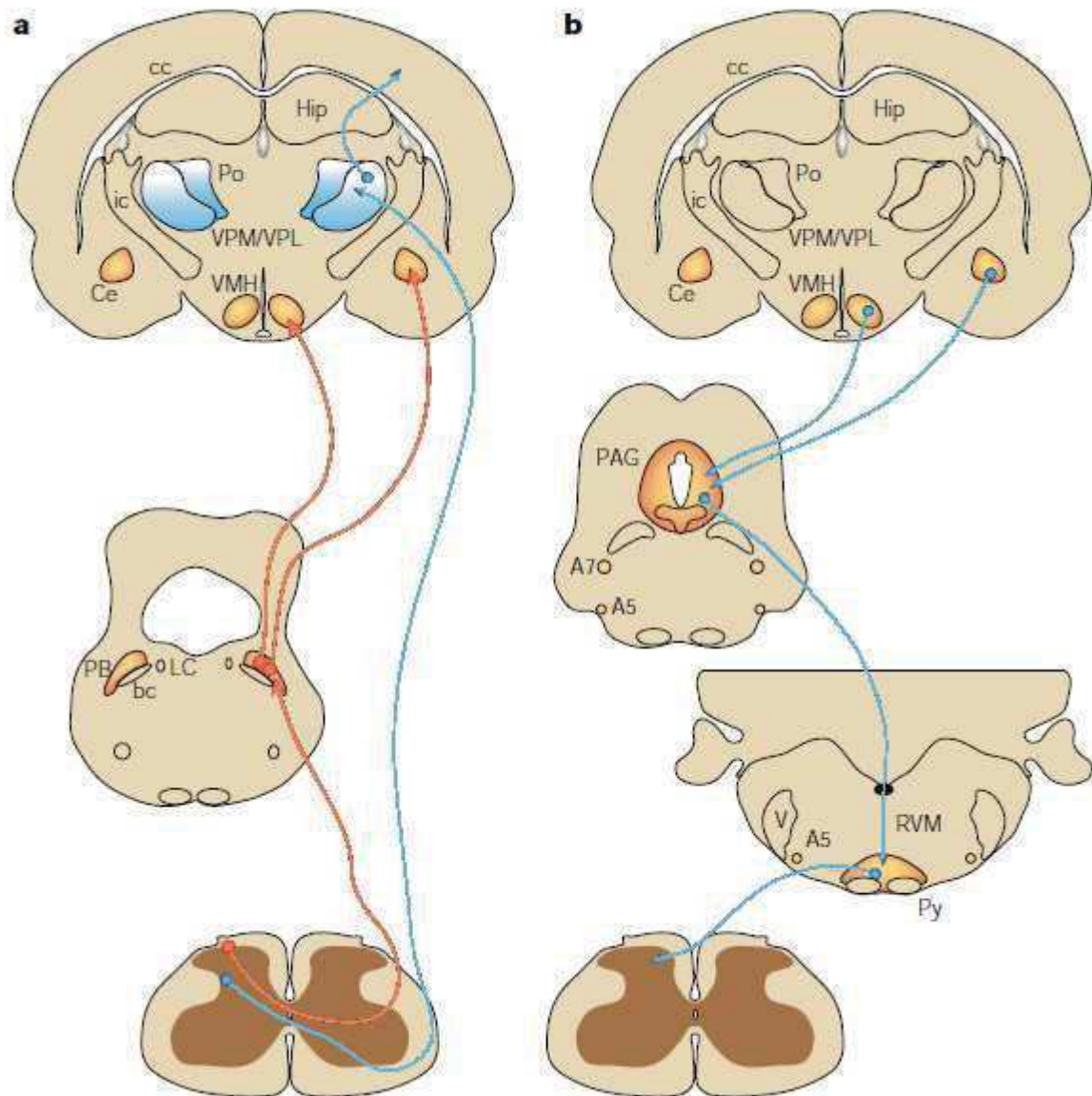


Figure 5. Représentation schématique des voies principales ascendantes et descendantes impliquées dans la nociception. (a) illustration des voies ascendantes spino- barabrachiale (en rouge) et spino-thalamique (en bleu). (b) représentation des voies descendantes issues de l'amygdale et de l'hypothalamus (en bleu) projetant sur la corne dorsale indirectement via la voie PAG- RVM. A : noyau adrénérgique, Ce : noyau central de l'amygdale, Hip : hippocampe, ic : capsule interne, LC : locus coeruleus, PAG : substance grise PB : aire parabrachiale, Po : partie postérieure du thalamus, Py : tract pyramidal, RVM : région bulbaire rostro-ventrale, VMH : noyau ventro-médian de l'hypothalamus, VPL : partie ventrale postéro-latérale du thalamus, VPM : partie ventrale postéro-médiane du thalamus (d'après Hunt and Mantyh, 2001).

- Le relais thalamique, est organisé en deux parties principales. Premièrement, le thalamus latéral avec les neurones des noyaux ventro-postéro-latéral et ventropostéro-médian, qui projettent vers les cortex somesthésiques primaire et secondaire. Deuxièmement, le thalamus médian, essentiellement avec les noyaux intralaminaires et submedius qui projettent vers des aires corticales motrices, prémotrices et limbique intervenant dans l'élaboration des réactions motrices et émotionnelles liées à la douleur.

Le cortex constitue l'aboutissement des messages nociceptifs ascendants. Les cortex somesthésiques primaire et secondaire sont principalement impliqués dans la composante sensori-discriminative de la douleur, alors que les cortex insulaire, cingulaire et fronto-orbitaire (intégrés au système limbique), sont plus particulièrement impliqués dans la composante émotionnelle (cf Le Bars et Willer, 2004).

2. Contrôles de la nociception

La douleur ne peut être considérée comme le seul résultat d'un message périphérique parvenant aux centres supérieurs. Elle est aussi le résultat de boucles de régulations internes modulant ces messages dans le sens d'une amplification ou d'une inhibition du signal de base. Cette modulation peut s'exercer à différents niveaux de l'intégration (périphériques, segmentaires ou suprasegmentaires) et à partir de différents niveaux de contrôle (structures supraspinales bulbaires, pontiques, hypothalamiques ou même corticales).

2.1 Mécanismes Périphériques

Lors de l'inflammation (après une lésion tissulaire) sont mis en jeu des mécanismes moléculaires et cellulaires convergeant vers une sensibilisation de la zone lésée et des tissus environnants. Cette sensibilisation est due à la libération dans l'espace extracellulaire d'agents proalgésiques qui peuvent être classés selon leur origine cellulaire : les cellules lésées, les cellules de la lignée inflammatoire et les nocicepteurs eux-mêmes. Respectivement, ces cellules libèrent majoritairement (i) ATP et ions H⁺, (ii) histamine, sérotonine, prostaglandines, cytokines, mitogènes et endotoxines, (iii) substance P, CGRP et neurokinine A. Certains agents vont activer directement les fibres afférentes primaires en dépolarisant les terminaisons libres comme les protons ou l'ATP. Cette sensibilisation peut s'exercer via une augmentation du potentiel générateur déclenché au niveau des récepteurs-canaux, mais aussi via l'abaissement du seuil d'ouverture des canaux sodiques dépendants du voltage, donc du seuil de

déclenchement des potentiels d'action. D'autres agents ont la capacité de provoquer depuis la périphérie des changements de synthèse protéique au niveau des noyaux des neurones sensoriels primaires situés dans les ganglions spinaux. Par exemple, le NGF, après avoir été transporté jusqu'au corps cellulaire par le complexe NGF-TrkA, agit sur la transcription génique. Ces mécanismes aboutissent à l'augmentation de la synthèse de canaux ioniques et de précurseurs de certains peptides, transportés ensuite vers la périphérie et/ou vers la terminaison centrale du neurone (cf Le Bars et Willer, 2004).

2.2 Mécanismes segmentaires

L'activité des fibres de gros diamètre peut atténuer les réponses des neurones spinaux aux stimuli nociceptifs véhiculés par les fibres de fin diamètre. Ces phénomènes sont déclenchés par l'activité des fibres A β mais aussi, par celle des fibres A δ . Cette interaction entre les activités des fibres de gros et de fin diamètre a été modélisée par Melzack et Wall, en 1965 (Melzack and Wall, 1965), sous le terme de théorie du portillon médullaire (« gate control of pain theory»). Elle repose sur les points suivants : les neurones nociceptifs (en général des WDR) reçoivent des entrées synaptiques excitatrices à la fois des nocicepteurs (fibres A δ et C) et des fibres non nociceptives (A β) ; les fibres de gros diamètre de type A β sont capables d'inhiber les neurones nociceptifs de façon indirecte, en activant des interneurons inhibiteurs situés dans la couche II ; les fibres nociceptives excitent les neurones nociceptifs et simultanément inhibent les interneurons inhibiteurs de la couche II. En d'autres termes, les afférences non nociceptives « ferment » la porte et les afférences nociceptives « ouvrent » la porte à la transmission centrale des informations nociceptives. Les mécanismes de l'analgésie liée au gate-control s'exercent de façon sélective en terme de topographie : la douleur n'est soulagée que dans la région du corps correspondant aux métamères mis en jeu, c'est-à-dire dont l'innervation nociceptive et non-nociceptive converge sur les mêmes segments de la moelle épinière (Le Bars et Willer 2004).

2.3 Mécanismes supra-segmentaire

L'existence de contrôles toniques sur la nociception a d'abord été mise en évidence par Sherrington au début du XXe siècle, par l'observation d'une facilitation des réflexes nociceptifs après section de la moelle, chez le chat.

Ces contrôles supraspinaux peuvent être également mis en jeu de manière phasique. Dans une étude de Reynolds en 1969 (Reynolds, 1969), la stimulation électrique de la PAG permet d'effectuer une laparotomie chez le rat vigile, sans que celui-ci n'exprime de signes de douleur. Ensuite, il a été montré que l'on pouvait induire une analgésie par la stimulation électrique de nombreux autres régions cérébrales (noyau réticulaire latéral, noyau du tractus solitaire, groupe catécholaminergique A5, région bulbaire rostroventrale [RVM], locus coeruleus, PB, aire prétectale, hypothalamus latéral, noyau rouge, substance noire). Néanmoins, les régions depuis lesquelles une stimulation électrique engendre une analgésie sans effet secondaire apparent sont plus restreintes. Ces régions sont la PAG et la RVM, comprenant le noyau raphé magnus (NRM), les noyaux paragigantocellulaire et gigantocellulaire (Guirimand and Le Bars, 1996). Cette analgésie résulte de l'activation de voies inhibitrices descendantes bulbo-spinales induisant – par la libération de neuromodulateurs tels que les monoamines – une réduction de l'activité des neurones nociceptifs spinaux (Figure 5b).

D'autre part, nous savons que l'activité nociceptive des neurones à convergence est fortement inhibée lorsque l'on applique une stimulation nociceptive sur une quelconque partie du corps, différente de leur champ récepteur excitateur : ces contrôles mis en jeu sont appelés Contrôles Inhibiteurs Diffus induits par stimulation Nociceptive (CIDN). De façon intéressante, les CIDN sont totalement absents chez un animal dont la moelle a été déconnectée du reste du SNC par section transversale (Morton et al., 1987), ce qui implique qu'ils dépendent de l'activation de structures supra-segmentaires, et sont donc différents des mécanismes de contrôle segmentaires évoqués plus haut. Les voies ascendante et descendante de ces mécanismes sont localisées dans les cordons antéro-latéral et dorso-latéral de la moelle épinière, respectivement (Villanueva et al., 1986a; Villanueva et al., 1986b). Le fait que les lésions du thalamus n'affectent pas les CIDN suggère que ceux-ci dépendent de l'activation de structures du tronc cérébral, à l'origine de voies inhibitrices descendantes. Par contre, la lésion du noyau SRD induit une réduction des CIDN (Bouhassira et al., 1992). Une étude ultérieure montrait que la section du bulbe au dessus du niveau du SRD n'affectait pas les CIDN (Gall et al., 1998). Ce résultat suggère que les CIDN impliquent exclusivement l'activation de structures bulbaires très caudales comme le SRD. De plus, l'implication du SRD dans le phénomène des CIDN (Bouhassira et al., 1992) suggèrent l'implication des neurones des couches profondes dans le déclenchement des CIDN, ces dernières étant la source spinale majeure de projections vers le SRD (Raboisson et al., 1996). Cependant, une étude récente (Lapirot et al., 2009) montre que les neurones exprimant les récepteurs NK1 dans la corne dorsale sont eux aussi impliqués dans le déclenchement des CIDN. Etant donné que ces neurones sont situés majoritairement dans les

couches I et III, nous pouvons donc ici suggérer que les neurones des couches superficielles sont aussi impliqués dans les CIDN. Ceci est en accord avec les résultats impliquant l'aire parabrachiale latérale (PBL) dans les CIDN sachant que cette région reçoit aussi des projections des couches I et III (Laprot et al., 2009). Ensemble, ces données laissent à penser que les CIDN sont sous-tendus par plusieurs voies anatomiques parallèles. Une voie mettrait en jeu les neurones des couches profondes de la corne dorsale et serait plutôt confinée dans la partie la plus caudale du tronc cérébral. En effet, la position rostro-caudale du SRD, et ses projections réciproques avec la moelle épinière, suggèrent qu'il fait partie d'une boucle très courte spino-réticulo-spinale. Une autre, impliquant les neurones des couches superficielles de la corne dorsale, mettrait en jeu des structures beaucoup plus rostrales dans le tronc cérébral (la PBL étant située à la jonction ponto-mésencéphalique). Cette hypothèse serait en accord avec une étude montrant l'implication du noyau accumbens (NAcc) dans l'antinociception évoquée par une stimulation nociceptive hétérotopique, chez le rat (Gear et al., 1999). Dans cette étude, le réflexe d'ouverture de la gueule est inhibé par l'application d'une stimulation nociceptive thermique (immersion dans un bain d'eau chaude) ou chimique (injection sous-cutanée de capsaïcine) dans la patte postérieure. Cet effet analgésique est totalement abolit après injection d'un antagoniste opioïdique, la naloxone, ou d'un antagoniste dopaminergique, le flupentixol, dans le NAcc. Concernant la voie descendante, support des CIDN, seules les projections du SRD vers la moelle pouvaient être envisagées avant cette étude. D'un point de vue neurochimique, l'implication de la sérotonine dans les CIDN (Chitour et al., 1982; Willer et al., 1999) laissait penser que les projections sérotoninergiques en provenance du NRM – largement impliqué dans le contrôle de la nociception – étaient aussi impliquées dans la voie descendante des CIDN. De plus, l'étude de Gear et coll. en 1999 (Gear et al., 1999), ainsi que celle de Brink et coll., en 2006 (Brink et al., 2006), montrent que l'inhibition du NRM, par microinjection de muscimol, réduit significativement l'effet antinociceptif d'une stimulation nociceptive hétérotopique. Enfin, il est connu depuis plusieurs décennies que la PAG exerce un contrôle inhibiteur sur la nociception (Reynolds, 1969), majoritairement par ces projections vers la RBRV. Étant donnée l'implication de la PBL dans les CIDN, et les projections neuronales en provenance de la PBL vers la PAG, on peut penser que la PBL puisse activer la voie descendante des CIDN par la voie PAG-RBRV. Cette hypothèse concorde bien avec l'idée que les CIDN sont un moyen expérimental d'accéder aux contrôles endogènes descendants de la douleur.

Chez l'Homme les données semblent coïncider avec celles des CIDN chez le rat. Ils semblent être eux aussi dépendants de structures supra-segmentaires puisque l'inhibition du

réflexe nociceptif RIII à la stimulation électrique du nerf sural par une stimulation nociceptive conditionnante (bras plongé dans un bain d'eau à 10°C) n'existe pas chez le patient tétraplégique (Roby-Brami et al., 1987). De plus, le réflexe RIII n'est pas réduit par l'application d'une stimulation conditionnante hétérotopique ipsilatérale à une lésion de la région bulbaire rétro-olivaire (De Broucker et al., 1990).

Parmi les structures supraspinales à l'origine des contrôles descendants, l'hypothalamus semble jouer un rôle significatif. Que ce soit chez l'animal ou chez l'homme et ce aussi bien au niveau spinal que trigéminale, lors des douleurs, l'activité de certaines aires de l'hypothalamus présentent une plasticité qui démontre le rôle de l'hypothalamus dans l'intégration nociceptive et suggère son implication dans les contrôles endogènes de la douleur.

3. Anatomie fonctionnelle de l'hypothalamus

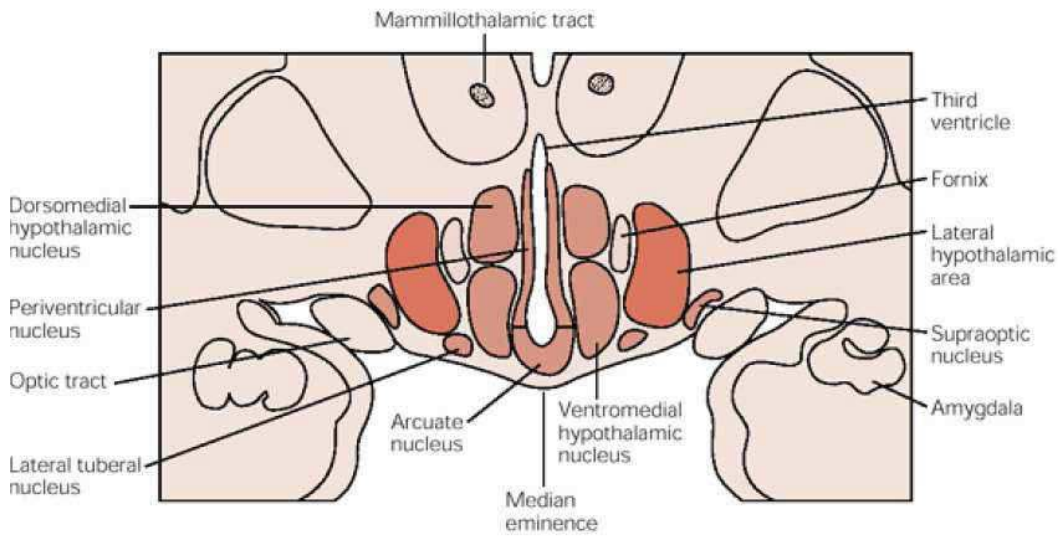
L'hypothalamus est une structure de petite taille qui possède un rôle fondamental dans le maintien de l'homéostasie. Afin d'assurer ce rôle, l'hypothalamus contrôle le système endocrinien (hormones hypophysaires en particulier), le système nerveux autonome (ortho et parasymphatique) et le système nerveux central régissant les comportements et les émotions (système limbique).

L'hypothalamus est une structure diencéphalique située sous le noyau thalamique, et de part et d'autre du troisième ventricule. Il s'étend de la partie rostrale des noyaux préoptiques dorsalement au chiasma optique jusqu'à la partie caudale des corps mammillaires (Figure 6). L'hypothalamus est souvent divisé selon un axe rostro-caudal en trois grandes parties : antérieure, moyenne et postérieure (Iversen et al., 2000).

La région antérieure ou aire préoptique est impliquée dans l'intégration des messages périphériques pour la régulation homéostatique. Cette région intervient dans la régulation de la pression artérielle, de la température corporelle, de certaines hormones et de la reproduction. Elle comprend en particulier le noyau suprachiasmatique responsable du contrôle de l'activité cyclique circadienne (régulation de l'horloge biologique).

La région moyenne ou aire tubérale comprend les noyaux paraventriculaire (PVN), supraoptique (SON), arqué, ventro et dorsomédian, Le PVN et le SON régulent le système endocrinien (via post-hypophyse) et aussi les systèmes sympathique et parasymphatique. Le noyau arqué influence le système endocrinien (via l'antéhypophyse) et indirectement les fonctions liées aux hormones sécrétées par cette partie de l'hypophyse.

A



B

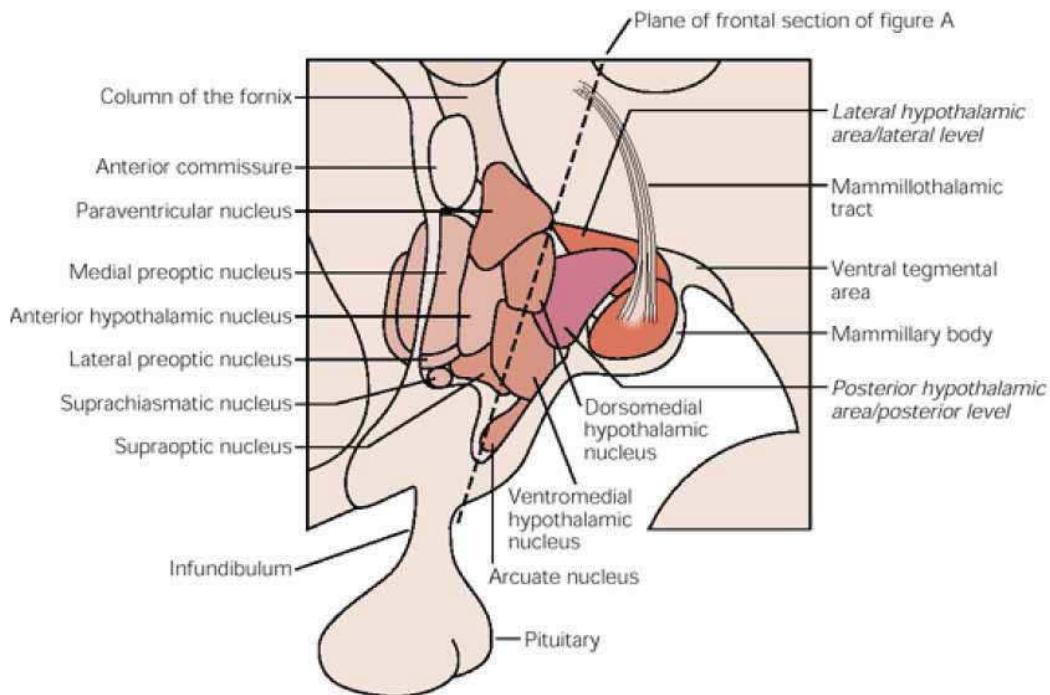


Figure 6. Structure anatomique de l'hypothalamus. (A) Illustration schématique d'une section coronale de l'hypothalamus composé de trois zones périventriculaire, médiane et latérale (B) Représentation schématique d'une coupe sagittale de l'hypothalamus divisé en trois parties préoptique, tubérale, et mammillaire (d'après Iversen et al 2000).

Les neurones des noyaux ventro et dorsomédian émettent des efférences locales hypothalamiques et vers la substance grise périaqueducale afin de réguler certaines fonctions comme la prise alimentaire, la reproduction et la croissance.

La région postérieure ou aire mammillaire : comprend les noyaux mammillaires et la partie postérieure de l'hypothalamus. Les fonctions physiologiques régies par cette aire restent relativement inconnues si ce n'est le rôle de certains groupes cellulaires mammillaires impliqués dans la régulation de l'état de vigilance et d'éveil.

Sur le plan médio-latéral, l'hypothalamus est divisé en deux parties : l'hypothalamus médian constitué des régions antérieure, moyenne et postérieure ; et l'hypothalamus latéral constituée d'une matrice neuronale pauvre en cellules (On y trouve les 2 noyaux latéraux qui forment deux petits renflements dans la partie latérale du plancher de l'hypothalamus).

3.1 Les principales efférences de l'Hypothalamus

Le faisceau médian du télencéphale est un important faisceau de fibres longitudinales qui passe au travers de l'hypothalamus latéral. Il connecte l'hypothalamus au tronc cérébral, à l'amygdale et au cortex cérébral.

Les fibres périventriculaires sont situées dans la paroi du 3ème ventricule. Elles sont constituées :

- de fibres longitudinales qui connectent l'hypothalamus au mésencéphale : cette voie permet l'activation de comportements simples et stéréotypés.
- des axones issus des cellules neuroendocrines parvocellulaires, notamment des noyaux PVN et arqués. Ces axones projettent sur l'éminence médiane, contrôlant ainsi l'hypophyse antérieure.
- d'axones issus des neurones magnocellulaires de l'hypothalamus qui projettent directement sur l'hypophyse postérieure.

3.2 Les principales afférences de l'hypothalamus

L'hypothalamus reçoit des afférences du faisceau solitaire qui transmet un grand nombre d'informations de la formation réticulée du tronc cérébral, du fornix qui amène de nombreuses informations en provenance de structures limbiques, de la rétine, des organes circumventriculaires permettant de détecter les substances pharmacologiques dans le sang, de différents systèmes sensoriels et de structures cérébrales comme l'amygdale et l'hippocampe. Ces afférences permettent à l'hypothalamus d'avoir les informations nécessaires pour maintenir

l'état d'homéostasie dans l'organisme. Il existe également une communication intrinsèque entre les différents noyaux hypothalamiques.

3.3 Relations hypothalamo-spinales

Les aires latérale, postérieure, dorsale et préoptique de l'hypothalamus ainsi que les noyaux dorsomédial, paraventriculaire et suprachiasmatique hypothalamiques reçoivent des afférences directes depuis la moelle (Cliffier et al., 1991). Une dense distribution de neurones marqués, suite à l'injection de Fluorogold (un traceur rétrograde) au niveau de la moelle épinière, a été rapportée dans l'hypothalamus latéral et médial. Environ 50% de ces neurones sont localisés dans les couches profondes, 10% dans les couches superficielles, 25% dans le noyau spinal latéral et 10% dans les alentours du canal central (Burstein et al., 1990).

Certains noyaux hypothalamiques envoient des efférences directes vers la moelle épinière. Une distribution de cellules marquées de façon rétrograde a été observée dans le noyau paraventriculaire, dans l'aire latérale, dans l'aire postérieure dorsale, et dans le noyau rétrochiasmatique suite à des injections de traceurs rétrogrades dans la moelle épinière (Swanson and Kuypers, 1980; Hosoya, 1980; Cechetto and Saper, 1988). Nous développerons ici ces noyaux hypothalamiques, avec leurs substrats neurochimiques, à l'origine des voies hypothalamo-spinales pouvant constituer un système de contrôles descendants de la nociception.

3.3.1 Noyau paraventriculaire

Le noyau paraventriculaire (PVN) est une structure hypothalamique de petite taille qui se trouve du part et d'autre du troisième ventricule, avec une organisation morphologique bien distincte (Figure 7). En effet, le PVN est divisé en deux sous divisions magnocellulaire et parvocellulaire où chaque sous division est formée de différentes parties. Les sous divisions magnocellulaires et parvocellulaires se différencient selon un certain nombre de paramètres morphologique, neurochimique et fonctionnel. (Swanson and Kuypers, 1980; Armstrong et al., 1980; Swanson et al., 1981; Sawchenko and Swanson, 1982; van den Pol, 1982).

La sous division magnocellulaire est formée de trois parties : antérieure, médiane et postérieure. La partie antérieure (am) s'étend sur le côté ventromédian du fornix. La partie médiane magnocellulaire (mm) se compose d'un groupe compact de grands neurones dans la partie périventriculaire (pv) et parvocellulaire antérieure (ap) du PVN (entre la partie antérieure et postérieure du PVN magnocellulaire). La partie postérieure magnocellulaire (pm) correspond

à la partie la plus large du PVN et se divise en partie rostromédiane et caudolatérale. Les neurones de la sous division magnocellulaire sont de grande taille (entre 20 et 35µm) avec une arborisation dendritique très peu développée. La partie magnocellulaire du PVN est impliquée dans la sécrétion des hormones neurohypophysaires comme la vasopressine et l'ocytocine (Figure 8).

La sous division parvocellulaire comporte cinq parties : antérieure, médiane, latérale, dorsale et périventriculaire. La partie antérieure (formée de cellules de petites et moyennes tailles) se situe entre le PVN (am) et (pv), et s'étend de la partie rostrale du PVN (am) jusqu'à la partie antérieure du PVN (pm). La partie parvocellulaire médiane (mp) du PVN est formée d'un groupe dense de neurones de petites tailles, qui se situe sur le côté médian du PVN (pm). La partie latérale parvocellulaire (lp) s'étend sur le côté latéral et caudal du PVN (pm), cette partie est formée de cellules de moyennes tailles orientées latéralement. La partie dorsale parvocellulaire (dp) est formée de groupe de cellules orientées horizontalement, et localisée sur le côté dorsal du PVN (pm) et (ap). La partie périventriculaire est caractérisée par ses cellules fusiformes, orientées verticalement. La sous division parvocellulaire projette en partie sur la moelle épinière et les noyaux autonomes du bulbe afin de contrôler le système nerveux sympathique.

Le PVN a été impliqué dans la modulation de la douleur par divers travaux. Une stimulation électrique ou chimique de ce noyau induit un effet anti-nociceptif (Yirmiya et al., 1990; Miranda-Cardenas et al., 2006; Yang et al., 2006b), tandis que sa lésion facilite la nociception (Yang et al., 2006b) et réduit l'analgésie induite par le stress (Truesdell and Bodnar, 1987). De plus, une stimulation nociceptive comme une injection intra-plantaire de formol ou d'adjuvant induisant l'arthrose ou par une distension du colon active les neurones du PVN (Kurose et al., 2001; Wang et al., 2009; Suzuki et al., 2009; Culman et al., 2010; Ueta et al., 2011).

La moelle épinière reçoit des projections de neurones marqués à l'ocytocine, à la vasopressine et au CRF issus majoritairement de la sous-division parvocellulaire du noyau paraventriculaire. D'autres types de neurones du PVN projettent également vers la moelle épinière comme ceux synthétisant la somatostatine, la méthionine/leucine-enképhaline et la dopamine, mais de façon moins dense (Swanson and Kuypers, 1980; Swanson et al., 1981; Sawchenko and Swanson, 1982; Cechetto and Saper, 1988). Nous développerons les trois phénotypes neurochimiques majeurs du PVN, à savoir l'ocytocine, la vasopressine et le CRF (Corticotropin-releasing factor), qui semblent plus particulièrement impliqués dans les contrôles descendants de la douleur.

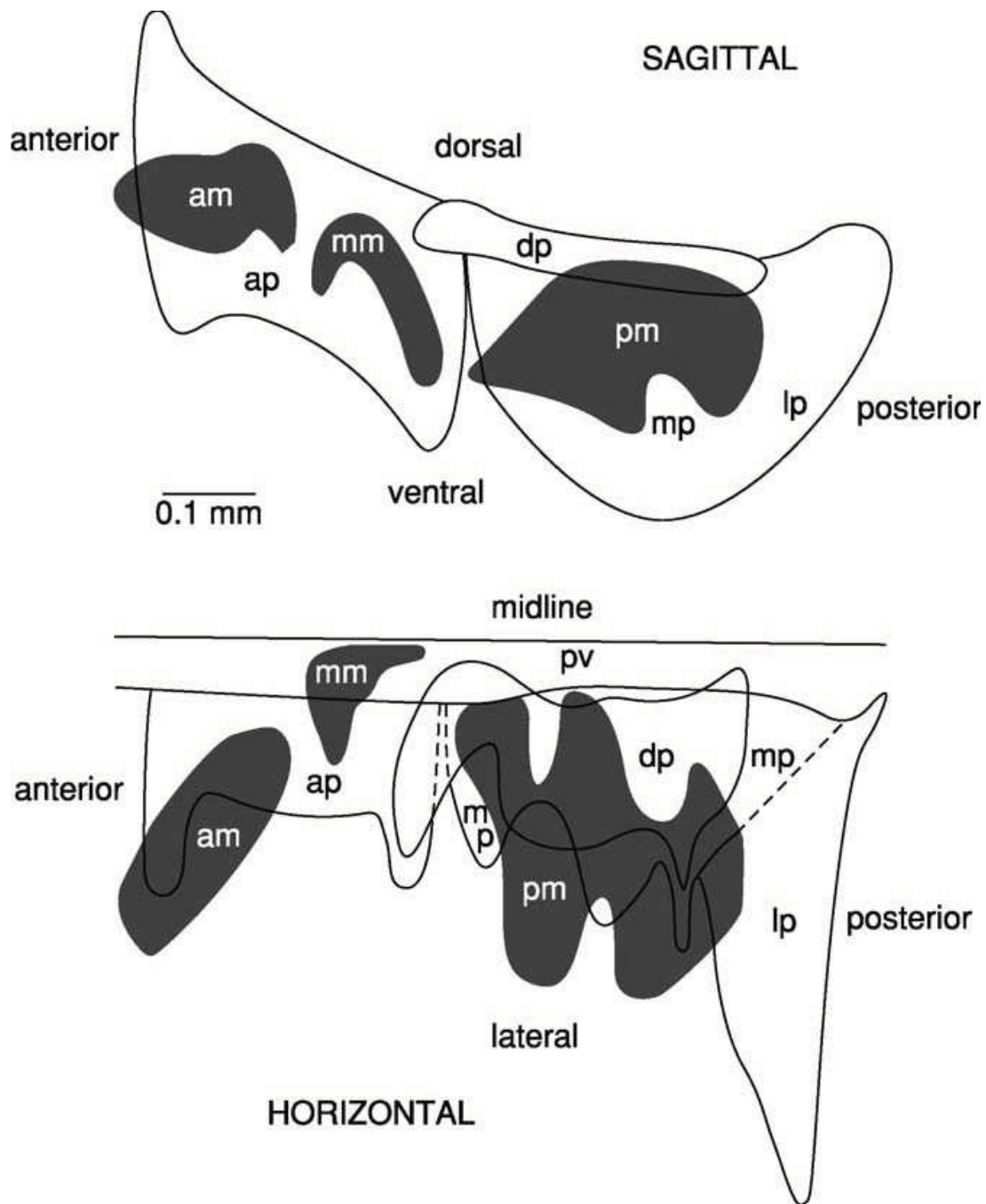


Figure 7. Représentation schématique de la distribution rostro-caudal des sous divisions magno-et parvocellulaire du noyau paraventriculaire. am : sous division mag nocellulaire antérieure, ap : sous division parvocellulaire antérieure, dp : sous di vision parvocellulaire dorsale, lp : sous division parvocellulaire latérale, mm : sous division magnocellulaire médiale, mp : sous division parvocellulaire médiale, pv : sous d ivision périventriculaire (d' après Swanson et al., 1981).

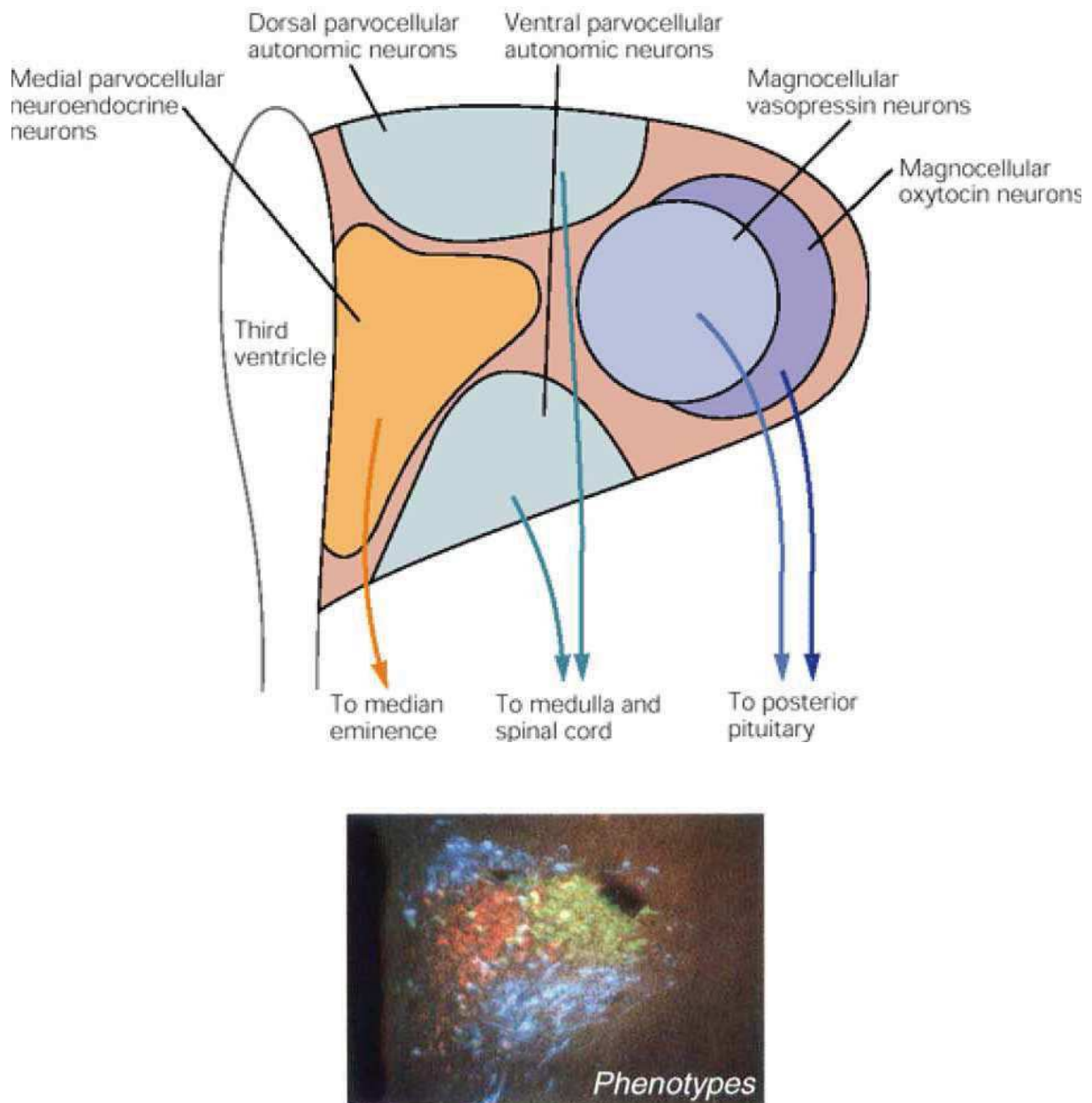


Figure 8. Organisation anatomo-fonctionnelle du noyau paraventriculaire (PVN). (A) Illustration schématique des voies de projection des sous divisions parvo- et magnocellulaire du PVN. (B) Un marquage immunohistochimique des neurones marqués au CRF (en rouge), à la vasopressine (en vert), et les cellules marqués de façon rétrograde suite à une injection d'un traceur rétrograde dans la moelle épinière (d'après Sawchenko et al., 2000 ; Iversen et al., 2000).

3.3.1.1 Ocytocine

L'ocytocine (OT) est un nonapeptide synthétisé au niveau du PVN et du SON. Sa structure primaire est caractérisée par un pont de disulfure entre les acides aminés 1 et 6 lui conférant une structure cyclique. Il joue un rôle majeur dans la régulation de certaines fonctions physiologiques endocrines comme la lactation, la parturition, la reproduction, le dimorphisme sexuel et le comportement social (Gimpl and Fahrenholz, 2001). Les neurones OTergiques sont localisés majoritairement dans la partie magnocellulaire, cependant 31% de ces neurones se trouvent également au niveau de la division parvocellulaire du PVN (Sawchenko and Swanson, 1982).

Les neurones OTergiques projettent sur différentes structures cérébrales comme la PAG, le noyau hypothalamique dorso-médian, le thalamus, l'hippocampe, le subiculum, le cortex entorhinal, le septum, l'amygdale, le bulbe olfactif, la substance noire, le locus coeruleus et les noyaux du raphé (Figure 9).

a) Récepteurs à l'ocytocine

L'OT agit sur des récepteurs appartenant à la famille de la rhodopsine GPCR classe 1 (récepteur couplé à la protéine G) formé de 7 domaines transmembranaires en hélice α . Ces récepteurs sont localisés dans différentes structures du cerveau comme le bulbe olfactif, l'amygdale, l'aire préoptique et dans les couches superficielles de la moelle épinière (Tribollet et al., 1997; Uhl- Bronner et al., 2005). Les projections OTergiques sur la moelle épinière proviennent majoritairement du PVN. En effet, une lésion de cette dernière abolit complètement la concentration d'OT dans la moelle (Lang et al., 1983; Hawthorn et al., 1985), tandis qu'une stimulation du PVN augmente la concentration d'OT dans le liquide cébrospinal (Pittman et al., 1984).

b) Implication de l'ocytocine dans la douleur

Des études récentes ont suggéré l'implication de l'OT dans la modulation de la nociception chez l'homme et l'animal. Une stimulation nociceptive chimique ou mécanique chez le rat module la concentration d'OT au niveau de la moelle lombaire et active les neurones OTergiques du PVN (Yang et al., 2007a; Wang et al., 2009). Chez des patients souffrant d'un mal de dos, la concentration d'OT dans le liquide cébro-spinal est également augmentée (Yang, 1994).

Chez l'homme comme chez l'animal, l'OT a un effet anti-nociceptif. Une administration d'OT, par voie intrathécale ou intraventriculaire, induit une analgésie chez des patients souffrants d'un mal de dos ou de douleurs cancéreuses intenses (Madrazo et al., 1987; Yang, 1994) et réduit la nociception évoquée par des stimuli chimique, thermique, mécanique

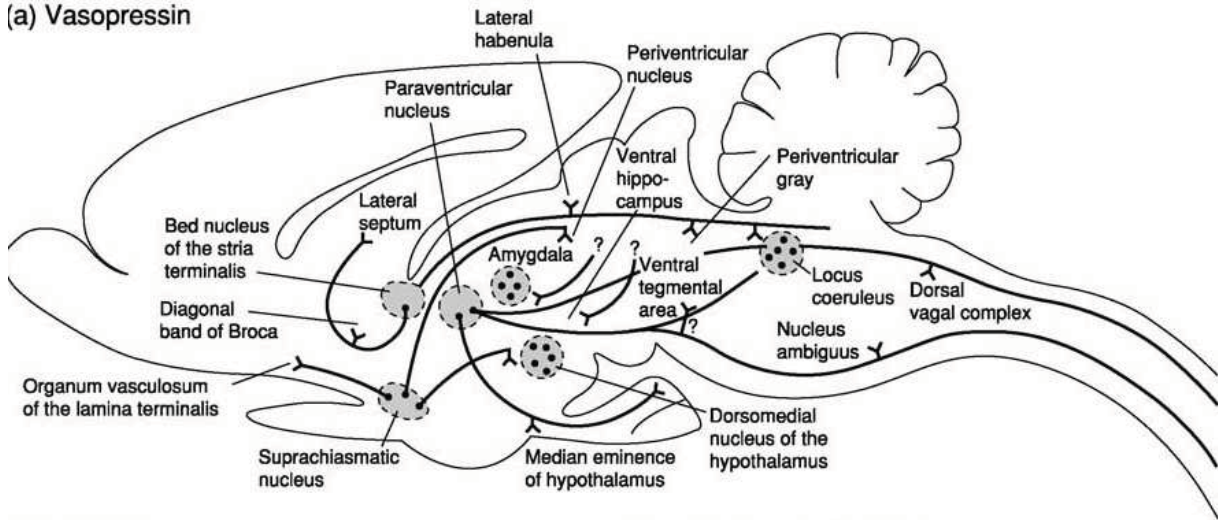
et inflammatoire chez le rat. Cet effet anti-nociceptif est réduit par des injections d'antagoniste OT ou de sérum anti-OT (Arletti et al., 1993; Yu et al., 2003; Yang et al., 2007a). De plus, l'administration intrathécale de l'atosiban (un antagoniste des récepteurs OT) induit une hyperalgie thermique et mécanique dans un modèle de douleur inflammatoire (Yu et al., 2003).

L'effet anti-nociceptif d'OT met en jeu le système opioïdérique ainsi que les voies de la PAG et du RVM. Une injection intra-PAG ou intra RVM d'OT augmente la latence du retrait de la patte chez le rat en réponse à des stimuli nociceptifs thermiques et mécaniques. Cet effet anti-nociceptif est atténué par des injections d'antagonistes des récepteurs mu et kappa au niveau de la PAG et des récepteurs mu dans la RVM (Ge et al., 2002; Wang et al., 2003).

Des données électrophysiologiques confirment les résultats obtenus en comportement. Une stimulation électrique du PVN ou une administration locale d'OT réduit les potentiels d'actions des fibres A δ et C des couches superficielles de la moelle lombaire. Cette réduction est contrecarrée par une injection d'antagoniste spécifique des récepteurs à l'OT (Condes-Lara et al., 2008; Rojas-Piloni et al., 2010). De plus, les neurones OTergiques du PVN qui projettent sur la moelle répondent sélectivement aux stimuli nociceptifs thermique et mécanique (Condes-Lara et al., 2009).

Breton et ses collaborateurs (2008) ont proposé un mécanisme expliquant l'anti-nociception induite par l'OT au niveau spinal. L'OT, relarguée par le PVN au niveau des couches I-II de la moelle épinière, activerait une sous-population d'interneurones glutamatergiques, entraînant le recrutement d'interneurones GABAergiques. Cette augmentation du pool inhibiteur au niveau des couches superficielles inhiberait le message nociceptif médié par les fibres A δ et C.

(a) Vasopressin



(b) Oxytocin

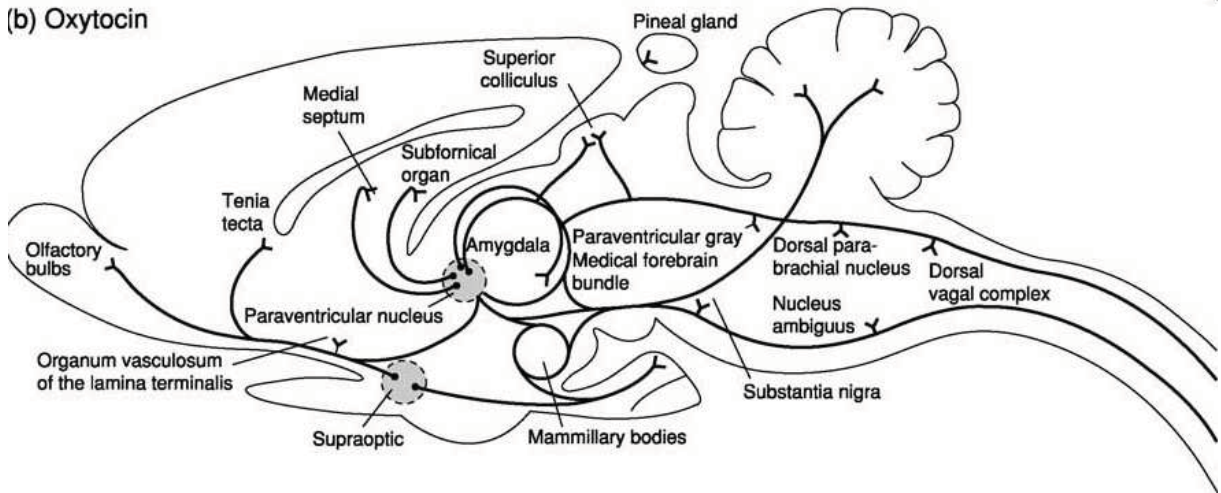


Figure 9. Les principales voies vasopressinergiques (a) et oxytocinergiques (b) ainsi que leurs sites d'origine dans le système nerveux central chez le rat (d'après McEwen, 2004)

3.3.1.2 Vasopressine

L'arginine vasopressine, un nonapeptide comportant 9 acides aminés dont deux groupements cystéines reliés par un pont disulfure Cys1 – Cys6, fut pour la première fois isolée et identifiée par Du Vigéaud, Lawer et Popenoe en 1953. Sa structure primaire est très proche de celle de l'ocytocine mais diffère par deux acides aminés en position 3 et 8.

Au niveau du système nerveux central (Figure 9), la vasopressine est distribuée fortement dans les noyaux PVN, SON et suprachiasmatique. Elle est également localisée mais de façon moins dense dans le thalamus, le bulbe rachidien, le cervelet, l'amygdale, la substance noire, l'hippocampe et la moelle (Hawthorn et al., 1980).

Les neurones marqués à la vasopressine dans le PVN sont localisés majoritairement dans la sous-division magnocellulaire postérieure et 20% sont dispersés dans la partie parvocellulaire (Sawchenko and Swanson, 1982; Nysten et al., 2001). La vasopressine synthétisée au niveau des noyaux magnocellulaires supraoptique et paraventriculaire, est véhiculée le long des axones du tractus hypothalamo-hypophysaire pour être relarguée au niveau de la neurohypophyse dans les capillaires sanguins (Vandesande and Dierickx, 1975). Cependant, les neurones à vasopressine issus de la sous-division parvocellulaire projettent leurs axones dans l'éminence médiane externe où la vasopressine est relarguée dans le système porte antéhypophysaire (Harbuz and Lightman, 1992).

Les neurones marqués à la vasopressine dans le PVN se projettent également sur la moelle épinière (Sawchenko and Swanson, 1982; Cechetto and Saper, 1988; Nysten et al., 2001). Ainsi une lésion du PVN réduit de 80% le taux de la vasopressine dans la moelle épinière (Lang et al., 1983). La majorité de ces projections sont issues de la partie parvocellulaire du PVN (Sawchenko and Swanson, 1982).

a) Récepteurs à la vasopressine

Les récepteurs à la vasopressine appartiennent à la famille des GPCR, ils sont formés de 7 domaines transmembranaires avec un domaine N-terminal extracellulaire et un domaine C-terminal cytoplasmique. Ils sont classifiés en 3 catégories : les récepteurs V1A, V1B et les V2. La vasopressine peut se lier aussi au récepteur de l'ocytocine. Les récepteurs de type V1a et V1b sont couplés positivement à l'activation d'une phospholipase C β via une protéine G hétérodimérique de type α q/ α 11, tandis que les récepteurs V2 sont eux couplés positivement à l'adénylyl-cyclase via une protéine G de type α s.

Chez le rat, les récepteurs à la vasopressine (V1a) sont localisés dans les myocytes des vaisseaux, au niveau hépatique et dans le système nerveux central (cortex cérébral, bulbe olfactif, ganglions de la base, latéral septum, hippocampe, thalamus, hypothalamus et raphé dorsal). Les récepteurs V1a sont également localisés de façon diffuse dans la moelle épinière surtout dans les segments lombaires et sacrés. (Tribollet et al., 1997; Tribollet et al., 1998; Liu et al., 2003). Les récepteurs V1b sont localisés au niveau du cortex cérébelleux, les ganglions de la base, le latéral septum, l'amygdale, le diencephale, le thalamus, l'hypothalamus, et le cervelet (Hernando et al., 2001). La vasopressine contrôle l'axe corticotrope via ces récepteurs présents dans l'adénohypophyse. Les récepteurs V2 sont impliqués dans la réabsorption de l'eau au niveau rénal et sont majoritairement localisés dans cet organe.

b) Implication de la vasopressine dans la douleur

La vasopressine est impliquée dans la régulation des fonctions cardio-vasculaires, de la température corporelle, de la composition cérébrale en eau et en électrolytes, du rythme circadien, des fonctions de reproduction et des comportements sociaux (De Wied et al., 1993).

Elle est également impliquée dans la douleur. Une stimulation nociceptive aiguë ou chronique active les neurones marqués à la vasopressine dans le PVN. En effet, une injection sous cutanée de formol ou d'un adjuvant induisant l'arthrose chez des rats transgéniques exprimant la vasopressine couplée à une molécule fluorescente augmente la concentration plasmatique en vasopressine et intensifie le marquage fluorescent dans le PVN (Kurose et al., 2001; Suzuki et al., 2009). La distension du colon induit aussi une expression de la protéine Fos (marqueur d'activation neuronale) dans les neurones vasopressines du PVN chez le rat (Wang et al., 2009).

Récemment, certaines études ont attribué un effet anti-nociceptif à la vasopressine chez l'homme et l'animal. Chez des patients cancéreux, par exemple, des injections intraventriculaire de vasopressine réduisent fortement la douleur pendant une durée de 75 minutes (Madrazo et al., 1987). Des effets comparables ont été observés chez le modèle animal. Une injection systémique de vasopressine chez la souris entraîne une réduction des contractions abdominales induites par l'acide acétique et réduit la latence du retrait de la queue évoquée par un stimulus thermique nociceptif (Berkowitz and Sherman, 1982). Un effet anti-nociceptif similaire a été rapporté chez le rat suite à des injections intraventriculaire ou systémique de vasopressine (Berntson and Berson, 1980). De plus, des études réalisées chez les rats Brattleboro (déficients en vasopressine) montrent que ces rats présentent un état hyperalgique par rapport à des rats non déficients. Cet effet est bien spécifique à la vasopressine étant donné

qu'une injection de lysine vasopressine dans le ventricule latéral ou en sous-cutanée réduit l'hyperalgésie chez ces rats (Bodnar et al., 1982). L'effet de la vasopressine sur la douleur a été également évalué par des injections intraventriculaires d'un sérum anti-vasopressine. Ces injections induisent un effet anti-nociceptif en augmentant la latence du retrait de la patte face à un stimulus thermique modéré (46°C) (Bodnar et al. 1986).

Les données concernant l'effet spinal de la vasopressine sont assez controversées. Thurston et ses collaborateurs rapportent un effet anti-nociceptif de longue durée chez le rat suite à une injection intrathécale de vasopressine en réponse à des stimuli nociceptifs thermiques et chimiques (Thurston et al., 1988). Gerardo et ses collaborateurs ont testé l'implication de la voie descendante vasopressinergique dans la douleur en enregistrant l'activité neuronale extracellulaire des neurones de la corne dorsale évoquée par une stimulation électrique des champs récepteurs cutanés. Aucun effet n'a été observé suite à une injection intrathécale de vasopressine sur la réponse des fibres C et A δ (Rojas-Piloni et al., 2010). Également, Yang et ses collaborateurs montrent qu'une injection intrathécale de vasopressine n'a aucun effet analgésique et que la stimulation nociceptive ne modifie pas le taux de libération de la vasopressine au niveau de la moelle (Yang et al., 2006c).

L'effet anti-nociceptif induit par la vasopressine libérée à partir du PVN met en jeu 3 structures principales la PAG, le noyau du raphe magnus et le noyau caudé. Yang et ses collaborateurs montrent qu'une stimulation nociceptive induit la libération de l'arginine vasopressine dans ces noyaux. Cette libération est fortement réduite par une inhibition du PVN. Des microinjections de vasopressine dans ces noyaux augmentent le seuil nociceptif évoqué par une stimulation chimique chez le rat tandis que l'antagoniste des récepteurs à la vasopressine réduit l'effet anti-nociceptif induit par la stimulation électrique du PVN (Yang et al., 2006a; Yang et al., 2007b; Yang et al., 2009; Yang et al., 2011).

La vasopressine est impliquée également dans les douleurs céphaliques. Une augmentation de la concentration plasmatique en vasopressine a été rapportée en réponse à une stimulation du nerf infraorbital chez le rat ou chez les patients souffrant d'algie vasculaire ou de migraine (Orlowska-Majdak et al., 1994; Franceschini et al., 1995; Hasselblatt et al., 1999). L'administration intracérébroventriculaire de vasopressine réduit la douleur induite par une stimulation électrique de la pulpe dentaire chez le rat (Zubrzycka and Janecka, 2005). Des effets similaires ont été observés suite à des microinjections de vasopressine au niveau de l'amygdale (Ahn et al., 2001). L'effet anti-nociceptif de la vasopressine met en jeu des systèmes opioïdique et sérotoninergique. En effet, des injections (en intraventriculaire)

d'antagonistes opioïde (naloxone) et sérotonine (methysergide) atténuent l'effet antinociceptif induit par la vasopressine (Ahn et al., 2001; Zubrzycka and Janecka, 2005).

3.3.1.3 Corticotropin-releasing factor (CRF)

Le CRF, un peptide formé de 41 acides aminés, fut découvert pour la première fois par Vale et ses collaborateurs en 1981 (Vale et al., 1981). Il est impliqué dans l'activation de l'axe hypothalamo-pituitaire-adrénargique. Dans une situation du stress, le CRF est libéré par la partie parvocellulaire du PVN et transporté jusqu'à la glande pituitaire antérieure où il va stimuler la libération de l'ACTH (Figure 10). L'ACTH à son tour activera la libération des corticostéroïdes (Chrousos and Gold, 1992).

Les neurones marqués au CRF sont localisés dans certaines structures cérébrales comme le PVN, le locus coeruleus et le noyau de Barrington. Les neurones CRF du PVN sont distribués majoritairement dans la sous division parvocellulaire (80%) (Olschowka et al., 1982; Swanson et al., 1983; Sawchenko and Swanson, 1985; Valentino et al., 1992). Chez le rat, 20% des projections du PVN sur la moelle épinière sont marqués au CRF (Puder and Papka, 2001). Les fibres CRF sont distribuées de façon diffuse dans la moelle épinière chez le rat et la souris surtout dans les couches I, V, VII et X (Merchenthaler et al., 1983; Korosi et al., 2007). Des études d'autoradiographie rapportent une forte capacité de liaison aux récepteurs CRF au niveau des couches superficielles I et II et modérée pour les couches ventrales de la moelle épinière (Skofitsch et al., 1985).

Certaines études attribuent un effet anti-nociceptif au CRF suite à des injections systémiques. En effet, des injections intraveineuses du CRF réduisent la latence de retrait de la queue ou de la patte chez le rat induite par des stimuli nociceptifs thermiques (Hargreaves et al., 1987; Ayesta and Nikolarakis, 1989; Hargreaves et al., 1990), diminuent la fréquence des contractions abdominales chez la souris induites par des injections de phénylquinone (Wei et al., 1986) et soulagent les douleurs dentaires postopératoires chez l'homme (Hargreaves et al., 1987).

Des résultats similaires ont été rapportés suite à des injections intracérébroventriculaire et intracisternale du CRF (Bianchi et al., 1991; Kita et al., 1993; Bianchi and Panerai, 1995). L'absence d'effet sur la douleur, observé dans un certain nombre d'études, serait dû à la dose administrée du CRF (Britton et al., 1985; Wei et al., 1986; Sherman and Kalin, 1986; Sherman and Kalin, 1987; Sherman and Kalin, 1988; Ayesta and Nikolarakis, 1989). Notons ainsi que la dose effective pour induire une analgésie serait de l'ordre de quelques nanogrammes et diffère selon le modèle animal.

Le CRF agit plus particulièrement sur des douleurs types toniques ; Song et collab. rapportent qu'une injection intrathécale du CRF réduit fortement la latence de contraction chez des souris injectés en acide acétique au niveau abdominal. Cependant, le CRF n'a aucun effet sur la douleur phasique (test du retrait de la queue) suite à des injections intrathécales de doses équivalentes (Song and Takemori, 1990; Song and Takemori, 1991).

Le CRF possède aussi un effet anti-nociceptif périphérique au niveau du site de l'inflammation. En effet, des injections sous cutanée ou intraplantaire du CRF réduisent l'hyperalgésie induite par deux agents inflammatoires ; la carragénine ou le CFA (complete Freund adjuvant) chez le rat (Hargreaves et al., 1989; Schafer et al., 1994; Cabot et al., 1997). Cependant le CRF administré en sous cutanée n'a aucun effet face à un stimulus thermique aigu (Sherman and Kalin, 1986; Zadina and Kastin, 1986). Schaefer et ses collaborateurs. ont décrit un mécanisme par lequel le CRF agit sur le site d'inflammation dans le tissu périphérique. Le CRF agit sur les récepteurs des cellules immunitaires au niveau du site d'inflammation en libérant des opioïdes. Des injections intraplantaires de bêta-endorphine, Met-enkephaline et cyclosporin A (agent immunosuppresseur) inhibent l'effet anti-nociceptif de CRF sur l'hyperalgésie induite par le CFA (Schafer et al., 1996; Cabot et al., 1997). Les récepteurs CRF présents sur les cellules immunitaires (monocytes, macrophages et lymphocytes) sont surexprimés dans un modèle de douleur inflammatoire périphérique (Mousa et al., 1996).

Le CRF est impliqué également dans l'analgésie induite par un stress. En effet, une injection intraplantaire d'antagoniste CRF empêche l'analgésie induite par un événement stressant comme la nage forcée dans un cadre d'une inflammation par le CFA (Schafer et al., 1996).

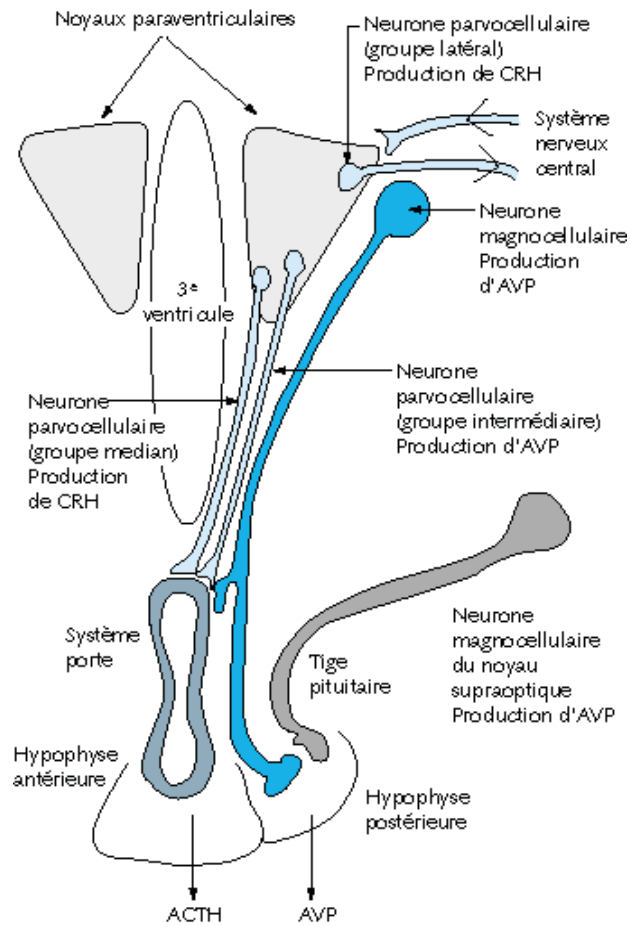


Figure 10. Illustration schématique des voies de sécrétion de la vasopressine et du CRH par le noyau paraventriculaire. Les neurones magnocellulaires du PVN et du noyau supraoptique délivrent la vasopressine dans la circulation générale via l'hypophyse postérieure. Tandis que les neurones parvocellulaires sécrètent le CRH et la vasopressine dans le système porte, ce qui va stimuler la libération antéhypophysaire de l'ACTH (Nicolet-Barousse et al., 2001).

3.3.2 Noyau rétrochiasmatique

Le noyau rétrochiasmatique (RCA) est situé dans la partie la plus ventrale de l'hypothalamus, sous le 3^{ème} ventricule et caudalement au noyau suprachiasmatique (Figure 11).

Chez le rat, le RCA reçoit des projections de la rétine (Johnson et al., 1988), du noyau parabrachial (Bester et al., 1997), suprachiasmatique (Watts et al., 1987), ventro-médian hypothalamique, de la substance noire, et du noyau paratrigéminal (Pasquier and Tramezzani, 1979; Watts et al., 1987; Johnson et al., 1988). Chez la chèvre, il reçoit des projections du latéral septum, des noyaux du lit de la strie terminale, du thalamus, du PVN, du SON, de l'amygdale, de l'hippocampe et du PB. Le RCA reçoit une dense distribution de fibres noradrénergiques issues des noyaux A1, A2, A6/7, ainsi qu'une faible densité de projections dopaminergiques et sérotoninergiques issues de l'aire périventriculaire de l'hypothalamus et du raphé dorsal respectivement (Tillet et al., 2000).

Le RCA envoie des projections denses vers le noyau paraventriculaire, l'hypothalamus latéral, le noyau ventromédian de l'hypothalamus, la substance grise périaqueducule, et le noyau de Barrington. Il projette aussi de façon moins dense vers le septum, le thalamus dorsal, le noyau solitaire, le noyau moteur dorsal du nerf vague, la moelle épinière, et plusieurs sites hypothalamiques, y compris l'aire préoptique, le noyau arqué, l'hypothalamus antérieur, et le noyau arqué (Ribeiro-Barbosa et al., 1999).

Le RCH est impliqué chez le rat dans l'élaboration de certains comportements comme l'agressivité, la défense, la prise alimentaire, la régulation osmotique, thermique et cardiaque (Pirnik and Kiss, 2005; Skibicka and Grill, 2009). Ce noyau est aussi impliqué dans la régulation de la reproduction annuelle sensible à la photopériode (jour long/court) en contrôlant la sécrétion saisonnière de la LH (luteinizing hormone) (Havern et al., 1991). Le RCH joue enfin un rôle majeur dans la régulation du rythme chronobiologique en contrôlant la production de la mélatonine par la glande pinéale (Cipolla-Neto et al., 1999).

La mélatonine, indolamine endogène, est produite principalement par la glande pinéale; elle est impliquée dans le contrôle du rythme chronobiologique; elle possède également des propriétés anxiolytiques, sédatives et antioxydantes. Des données expérimentales et cliniques ont attribué récemment un rôle analgésique à la mélatonine. Chez l'animal, des injections de mélatonine locale ou systémique induisent un effet anti-nociceptif dose-dépendant lors de stimulations nociceptives thermique, électrique, chimique et mécanique (Yu et al., 2000; Pang et al., 2001; Naugib et al., 2003; Nosedá et al., 2004; Li et al., 2005; Mantovani et al., 2006). Des études cliniques montrent également le potentiel analgésique de la mélatonine chez les patients souffrant de douleurs chroniques comme la fibromyalgie, le

syndrome du côlon irritable et la migraine. Ainsi, une perturbation des taux plasmatiques et urinaires de la mélatonine a été rapportée chez les patients fibromyalgiques. Le traitement à la mélatonine améliore la qualité de la vie chez ces patients en réduisant la douleur et les symptômes d'anxiété et de dépression et en améliorant la qualité du sommeil (Wikner et al., 1998; Hussain et al., 2011). Deux études cliniques réalisées chez les patients souffrant du symptôme du côlon irritable rapportent une réduction de la douleur rectale et abdominale suite à un traitement oral à la mélatonine (Lu et al., 2005; Song et al., 2005). Une perturbation de la sécrétion de la mélatonine a été rapportée également chez les migraineux chez qui la prise de mélatonine réduit la douleur pulsatile. Un traitement préventif à la mélatonine réduit la fréquence, l'intensité et la durée de la douleur (Brun et al., 1995; Claustrat et al., 1997; Peres et al., 2004; Masruha et al., 2008).

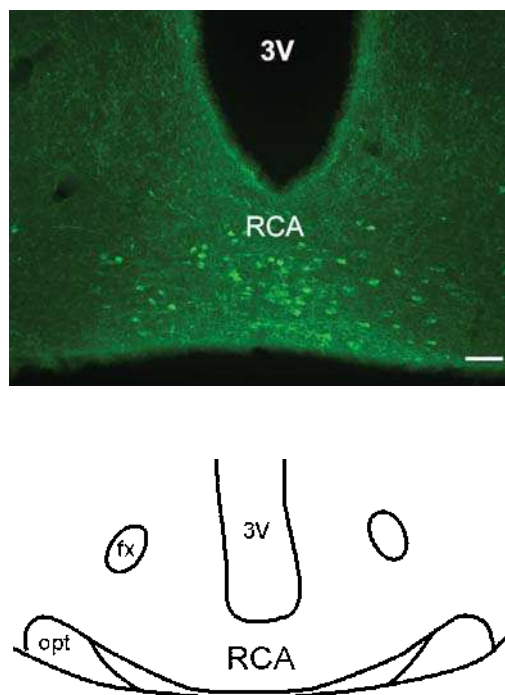


Figure 11. Marquage immunofluorescent de l' α -MSH dans une coupe coronale hypothalamique montrant l'aire rétrochiasmatic (RCA). 3V : troisième ventricule. opt : faisceau optique, fx : fornix. Barre échelle = 100 μ m.

Parmi les neurones du RCH, il existe différents phénotypes neurochimiques: des neurones POMC, α -MSH et TH immunopositifs (Koylu et al., 1997; Elias et al., 1998; Tillet et al., 2000). Il existe aussi des neurones synthétisant le peptide CART (cocaine and amphetamine regulated transcript).

3.3.2.1 Peptide CART

Le peptide CART est distribué de façon diffuse dans les régions hypothalamiques et extra-hypothalamiques du cerveau, dans la moelle épinière et la glande pituitaire (Koylu et al., 1997; Koylu et al., 1998). Ce peptide est impliqué dans la prise alimentaire, la récompense, le stress, la dépression ainsi que la régulation du système autonome et endocrinien (Kuhar et al., 2000). Il a été récemment détecté dans les afférences primaires peptidergiques de type C (Ohsawa et al., 2000; Kozsurek et al., 2007), suggérant ainsi une éventuelle implication dans la nociception. L'injection intrathécale du peptide CART induit un effet anti-nociceptif face à une stimulation thermique nociceptive (test de la plaque chaude), dans une douleur tonique aiguë (test au formol) ou inflammatoire (carragénine intra-plantaire); et réduit l'hyperalgésie thermique et l'allodynie mécanique chez des souris neuropathiques (Ohsawa et al., 2000; Damaj et al., 2003; Damaj et al., 2006).

3.3.2.2 Alpha-Melanocyte stimulating hormone (α -MSH)

Les mélanocortines sont une famille de peptides endogènes générés par un clivage enzymatique d'un précurseur commun le pro opiomélanocortine (POMC). Les principaux membres de la famille mélanocortine sont α , β , γ MSH (melanocyte stimulating hormone) et ACTH (adrenocorticotrop hormone). Les mélanocortines exercent leurs actions via cinq sous-types de récepteurs les MC1, 2, 3, 4, 5. Les récepteurs mélanocortines MC1, MC2 et MC5 sont principalement exprimés dans les tissus périphériques, alors que les récepteurs MC3 et MC4 sont principalement limités au système nerveux central. L'AgRP (Agouti related protein) est un antagoniste endogène qui se lie préférentiellement aux récepteurs MC1 (principalement exprimés au niveau de la peau), MC3 et MC4 (Dinulescu and Cone, 2000; Cone, 2006).

Le récepteur MC3 a une distribution limitée dans le cerveau, il se trouve principalement dans l'hypothalamus, le thalamus, le tronc cérébral et le cortex. Comparée à celle des récepteurs MC3, les récepteurs MC4 ont une distribution plus diffuse dans le cerveau (Mountjoy et al., 1994; Adan and Gispén, 1997; Wikberg, 1999). En outre, le MC4 est le seul sous-type à être exprimée dans la moelle épinière (Mountjoy et al., 1994). Des études de

marquage radioactif avec un analogue de l' α -MSH dans la moelle montrent que les récepteurs MC4 sont exprimés de façon abondante dans les couches superficielles I, II, et X (van der et al., 1999).

Les mélanocortines sont impliqués dans la régulation de plusieurs fonctions physiologiques, tant au niveau central que périphérique. Ils sont impliqués dans la pigmentation de la peau, la prise alimentaire, régulation de la consommation énergétique, de la température corporelle, de la pression sanguine et du comportement sexuel (Adan and Gispen, 2000). L'administration centrale de α -MSH induit un état d'anxiété et de dépression, augmente le bâillement, favorise l'apprentissage, et supprime la prise alimentaire (Bertolini and Gessa, 1981; Zhao et al., 1995; Fan et al., 1997).

a) Implication des mélanocortines dans la douleur

L'implication des mélanocortines dans la nociception a été suggéré au début des années 70, montrant que l'administration centrale d' α -MSH et d'ACTH provoque une hyperalgésie chez différents modèles animaux (Bertolini et al., 1979; Sandman and Kastin, 1981; Williams, Jr. et al., 1986) et inverse les effets analgésiques de la morphine et de la β -endorphine (Gispen et al., 1976; Wiegant et al., 1977; Smock and Fields, 1981). L'administration centrale de 0,1-10 mg d' α -MSH induit une hyperalgésie chez les rats sur le test du retrait de la queue (Sandman and Kastin, 1981). Des résultats similaires ont été obtenus avec une administration intracérébroventriculaire d'ACTH (Bertolini et al., 1979). Chez le hérisson, des doses élevées d'ACTH produisent également une hyperalgésie (Sollertinskaya, 1997). Des doses plus faibles d'ACTH (0,5 et 1,0 μ g) causent une hyperalgésie chez le lapin lors d'un test nociceptif thermique (Williams, Jr. et al., 1986). L'administration intrathécale d'un antagoniste des récepteurs MC3/MC4 provoque une augmentation des réponses nociceptives induites par une injection de formol intra-plantaire chez la souris (Bellasio et al., 2003).

Cependant, quelques études attribuent un effet anti-nociceptif aux mélanocortines. Ohkubo et ses collaborateurs (Ohkubo et al., 1985) ont montré que l'administration centrale d' α -MSH (0,1-10 μ g) chez la souris induit une analgésie sur le test thermique de la plaque chaude. Walker et ses collaborateurs rapportent le même effet suite à des microinjections d' α -MSH dans la PAG (Walker et al., 1981).

Plus récemment, une étude a montré que l'injection intrathécale de SHU9119 (antagoniste des récepteurs aux mélanocortines) réduisait l'allodynie aux stimuli thermiques et mécaniques chez le rat neuropathique (Vrinten et al., 2001). Cet effet spinal est médié par les

récepteurs MC4 ; étant donné que seul l'agoniste sélectif aux récepteurs MC4 peut moduler l'allodynie (Vrinten et al., 2001).

3.3.3 L'aire latérale et périfornicale de l'hypothalamus

L'aire latérale et périfornicale de l'hypothalamus jouent un rôle important dans la régulation de la prise alimentaire et du cycle sommeil/éveil, ainsi que dans l'addiction et la récompense. Ils ont été impliqués plus récemment dans la modulation de la nociception. Une stimulation électrique de l'hypothalamus latéral induit un effet anti-nociceptif en augmentant le seuil du retrait de la patte évoqué par un stimulus thermique et en réduisant les réponses nociceptives induites par l'injection intraplantaire de formol (Lopez et al., 1991; Franco and Prado, 1996). Une stimulation électrique nociceptive de la pulpe dentaire ou de la patte ou une inflammation par la carragénine active les neurones de l'aire latérale de l'hypothalamus (Morita et al., 1977; Hamba et al., 1990; Watanabe et al., 2005).

Différents phénotypes neurochimiques se trouvent dans l'aire latérale de l'hypothalamus comme l'orexine A et B, la galanine, la substance P, le MCH (melanin-concentrating hormone) et l' α -MSH (alpha-melanocyte stimulating hormone). Ces neuromédiateurs sont synthétisés par des neurones innervant directement la moelle épinière (Cechetto and Saper, 1988; van den Pol, 1999; Swanson et al., 2005). Nous développerons plus particulièrement l'orexine A et B, deux phénotypes neurochimiques de l'hypothalamus latéral, impliqués dans les contrôles descendants de la douleur.

3.3.3.1 Orexine A et Orexine B

L'orexine A et B sont deux neuropeptides exprimés exclusivement par les neurones de l'aire latérale et périfornicale de l'hypothalamus (De Lecea et al., 1998; Sakurai et al., 1998). Chez les mammifères, l'orexine A est formé de 33 acides aminés liés par deux ponts de disulfure tandis que l'orexine B est formé d'une chaîne linéaire de 28 acides aminés. Ils présentent une forte homologie surtout dans la partie C-terminale. Les orexines A et B dérivent d'un même précurseur la prépro-orexine après un clivage protéolytique. Cette dernière est formée de 130 acides aminés et codée par un gène unique situé sur le chromosome 17q21 chez l'homme.

a) Projections vers le système nerveux central

Les neurones orexinergiques se projettent sur différentes structures du cerveau comme le septum, le PVN, le thalamus, et l'aire parabrachiale (Figure 12). Les projections les plus denses ont été observées au niveau du raphé dorsal, du locus coeruleus, et du noyau tuberomammillaire (Peyron et al., 1998).

Les neurones orexinergiques projettent également sur la totalité de la moelle épinière, leurs fibres sont concentrées au niveau des couches I, X et aux alentours du canal central de la moelle (van den Pol, 1999; Date et al., 2000).

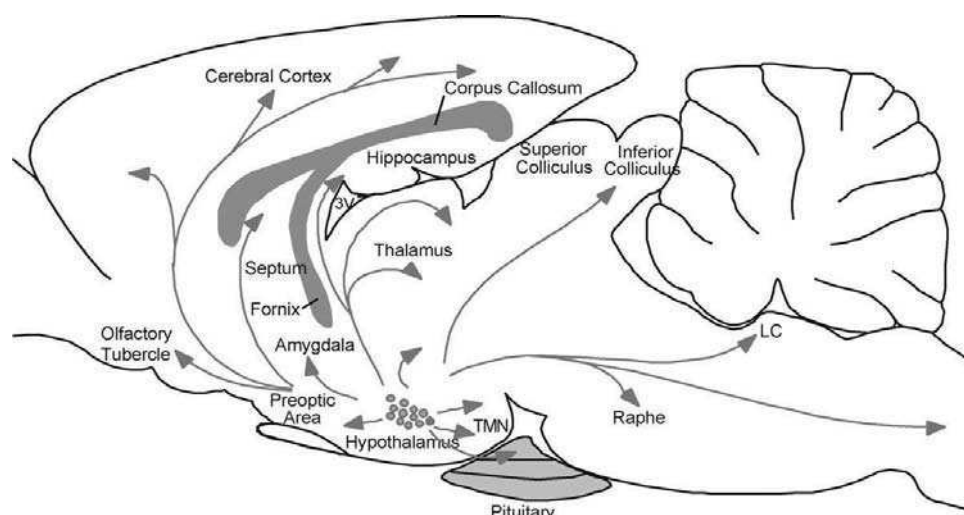


Figure 12. Représentation schématique des projections orexinergiques issues de l'hypothalamus latéral dans le système nerveux central. LC : locus coeruleus, TMN : noyau tuberomammillaire, 3V : troisième ventricule. (d'après Sakurai, 2005).

b) Les récepteurs aux orexines

Les orexines A et B se fixent respectivement sur les récepteurs de type orexine 1 (OX1) et les récepteurs de type 2 (OX2). Ces récepteurs présentent 64% d'homologie. Les récepteurs OX1 présentent deux fois plus d'affinité pour l'orexine A, tandis que les récepteurs OX2 ont la même affinité pour l'orexine A et B (Sakurai et al., 1998). Les récepteurs OX1 sont exclusivement couplés à la sous-classe Gq de la protéine G hétérotrimérique, les récepteurs OX2 sont couplés à la protéine Gi/o et q (Figure 13). Ces récepteurs sont distribués de façon

diffuse au niveau du cerveau et de la moelle épinière (Greco and Shiromani, 2001; Hervieu et al., 2001). Une dense expression de ces récepteurs a été observée au niveau du cortex cérébral, des ganglions de la base, de l'aire tegmentale ventrale, de l'hippocampe, de l'hypothalamus, du thalamus, du raphé dorsal et médian, du locus coeruleus, et de la PAG. Trivedi et ses collab. ont montré une distribution dis tincte entre les récepteurs OX1 et OX2 : les OX1 sont plus abondant au niveau du l ocus coeruleus et du raphé dorsal tandis que les récept eurs OX2 sont fortement exprimés au niveau du cortex et du PVN (Trivedi et al., 1998).

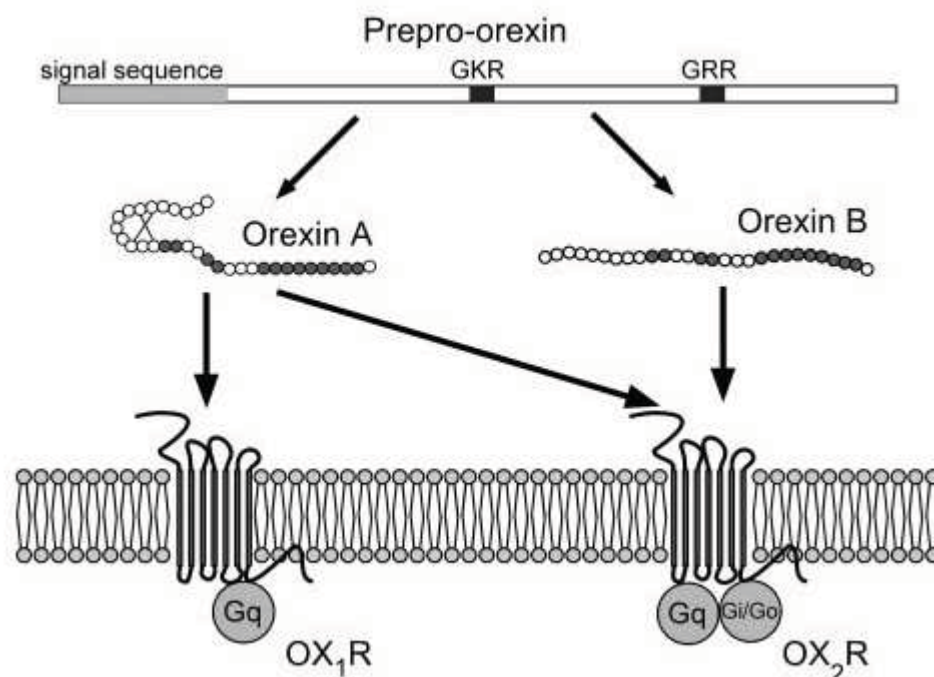


Figure 13. Spécificité d'action des oréxines sur les récepteurs OX1 et O X2. Clivage protéolytique de la prépro-orexine en orexine A et B ; Les récepteurs OX 1 et 2 sont couplés à une protéine G (Tsujino and Sakurai, 2009).

c) Rôle de l'orexine dans le système nerveux central

Les orexines jouent un rôle important dans la régulation du cycle sommeil/éveil. Chez le rat, une injection intraventriculaire d'orexine supprime le sommeil et active l'état d'éveil. Une augmentation de l'expression de Fos dans les neurones orexinergiques ainsi que le taux d'orexine dans le liquide céphalorachidien ont été rapportés pendant la période nocturne active chez le rat (Hagan et al., 1999; Estabrooke et al., 2001; Yoshida et al., 2001). Une

altération des taux d'orexine dans le liquide céphalorachidien a été également rapportée chez 90% des patients narcoleptiques (Mignot et al., 2002). Chez le modèle animal, une mutation du récepteur OX2 ou une altération de l'expression du précurseur prépro-orexine induit les mêmes symptômes que ceux observés chez les patients narcoleptiques (Chemelli et al., 1999; Willie et al., 2003). Des injections d'orexine A améliorent l'état d'éveil, inhibe les crises cataleptiques et suppriment le sommeil chez un modèle de souris narcoleptique (Mieda et al., 2004).

Les orexines contrôlent la prise alimentaire. Des injections intracérébroventriculaires d'orexine A ou B chez le rat augmentent fortement la consommation alimentaire (Sakurai et al., 1998). Egalement, une augmentation du taux d'ARNm de l'orexine a été montrée chez des rats privés de nourriture pendant 48 heures.

Les orexines sont impliquées dans les phénomènes de récompense et d'addiction. Les neurones orexinergiques projettent sur des noyaux connus pour leur implication dans la récompense comme la VTA et le noyau accumbens (Fadel and Deutch, 2002). Harris et Aston-Jones ont montré une augmentation de l'expression de Fos dans les neurones orexinergiques chez des rats conditionnés à recevoir une récompense à la nourriture, la cocaïne et la morphine (Harris et al., 2005). De plus, les patients narcoleptiques sous traitement d'amphétamine développent rarement une addiction à ce traitement (AKIMOTO et al., 1960; Guilleminault et al., 1974; Nishino and Mignot, 1997). De même, les souris déficientes en orexine développent rarement un état addictif à la morphine (Georgescu et al., 2003).

d) Orexine : dichotomie anatomo-fonctionnelle

Harris et Aston-jones attribuent une dichotomie anatomo-fonctionnelle aux orexines. Les neurones orexinergiques de l'hypothalamus latéral sont impliqués dans l'addiction et la récompense, tandis que ceux de l'aire périforniacle contrôlent le cycle sommeil/éveil et le stress. En effet, une augmentation de l'expression de Fos dans les neurones orexinergiques de l'aire périforniacle a été rapportée chez des rats ayant subi divers types de stress comme un choc électrique au niveau de la patte, un stress induit par le froid, la peur ou l'immobilisation (Sakamoto et al., 2004; Winsky-Sommerer et al., 2004; Harris and Aston-Jones, 2006; Furlong et al., 2009). Ces neurones sont activés également pendant le cycle d'éveil (Estabrooke et al., 2001). Cependant les neurones orexinergiques de l'hypothalamus latéral sont spécifiquement activés chez des rats conditionnés à associer un lieu à une récompense. Suite à des microinjections du polypeptide pancréatique (un stimulateur des neurones orexinergiques) dans l'hypothalamus latéral, les rats montrent une préférence vers des environnements associés à une récompense à la morphine (Harris et al., 2005).

e) Implication des orexines dans la douleur

L'effet anti-nociceptif de l'orexine A a été décrit pour la première fois par Bingham et ses collaborateurs en 2001. Des injections d'orexine A (par voies intracérébroventriculaire ou intraveineuse) chez la souris réduisent fortement la réponse nociceptive évoquée par un stimulus nociceptif thermique, viscéral ou inflammatoire (Bingham et al., 2001).

Des données contradictoires sur l'efficacité anti-nociceptive de l'orexine B ont été abordées dans la littérature. Cheng et ses collaborateurs montrent que les injections intrathécales d'orexine A ou B réduisent l'allodynie chez le rat dans un modèle de douleur postopératoire (Cheng et al., 2003). Tandis que, Yamamoto et ses collaborateurs rapportent un effet anti-nociceptif spécifique à l'orexine A. Une injection intrathécale d'orexine A réduit fortement l'hyperalgésie induite par le formol et l'allodynie dans un modèle de douleur neuropathique. Aucun effet n'a été observé suite à des injections intrathécales d'orexine B (Yamamoto et al., 2002). Pour Mobarakeh et ses collaborateurs, l'effet anti-nociceptif induit par l'orexine A est bien supérieure à celui de l'orexine B induit par des stimuli nociceptifs thermique, mécanique, et chimique chez la souris (Mobarakeh et al., 2005).

L'effet antinociceptif de l'orexine A met en jeu la voie de la PAG. Les fibres ainsi que les récepteurs orexinergiques sont distribués de façon dense au niveau de cette structure. De plus, les microinjections locales d'orexine A réduisent l'hyperalgésie induite par le formol (Azhdari et al., 2011).

f) Rôle de l'orexine dans l'analgésie induite par un stress aigu

Les neurones orexinergiques sont activés par un stress aigu. Une immobilisation ou un choc électrique chez la souris augmente l'expression de Fos dans les neurones orexinergiques (Winsky-Sommerer et al., 2004). Reyes et ses collaborateurs rapportent également une augmentation de l'ARNm de l'orexine suite à un stress aigu induit par une immobilisation (Reyes et al., 2003).

L'orexine joue un rôle dans l'analgésie induite par un stress. En effet, un stress induit par un choc électrique ou par immobilisation augmente la latence du retrait de la patte ou la queue évoquée par un stimulus thermique nociceptif. Cet effet analgésique est réduit chez la souris déficiente en orexines (souris KO prépro-orexine ou transgénique orexine/ataxine) (Watanabe et al., 2005; Xie et al., 2008). Ceci est réversible par des injections intracérébroventriculaire d'orexine A (Xie et al., 2008).

3.3.4 Hypothalamus postérieur dorsal : Noyau A11

La voie descendante issue de la partie postérieure dorsale vers la moelle provient essentiellement du noyau hypothalamique A11 (Skagerberg et al., 1982; Cechetto and Saper, 1988). Bien que comprenant d'autres phénotypes neurochimiques (ex CGRP), le noyau A11 est considéré comme un noyau à neurones dopaminergiques.

3.3.4.1 Dopamine

La dopamine appartient à la famille des catécholamines, elle est synthétisée à partir de la tyrosine grâce à une succession de réactions enzymatiques. La tyrosine est transformée en premier temps par la tyrosine hydroxylase en dihydroxyphénylalanine (DOPA), qui est à son tour décarboxylée en dopamine par la dopa décarboxylase (Vallone et al., 2000).

a) Distribution des noyaux dopaminergiques

Les corps cellulaires dopaminergiques sont principalement distribués dans 3 zones : la substance noire compacta (A9), l'aire retrorubrale (A8), et l'aire tegmentale ventrale (VTA). Les zones A8-A9 innervent le striatum dorsal (noyau caudé et putamen), formant ainsi la voie nigro-striée, alors que la VTA innerve le cortex frontal, formant la voie mésocorticale (Figure 14). La VTA innerve également le striatum ventral (noyau accumbens) formant la voie mésolimbique (Vallone et al., 2000).

D'autres groupes de cellules dopaminergiques sont situés dans l'hypothalamus. Les neurones dopaminergiques des noyaux périventriculaire (A14), et arqué (A12) forment la voie tubéro-infundibulaire qui innerve l'éminence médiane de l'hypothalamus ainsi que le système porte hypophysaire. Enfin, les neurones dopaminergiques du noyau A11 innervent la moelle épinière (Skagerberg et Lindvall 1985, Qu et al., 2006). Ils constituent la principale source de dopamine dans la moelle épinière. Les neurones dopaminergiques du noyau A11 envoient des projections principalement ipsilatérales vers la moelle épinière et un faible contingent de projections sur le côté controlatéral (Skagerberg and Lindvall, 1985; Qu et al., 2006; Barraud et al., 2010). Les fibres dopaminergiques sont localisées de façon diffuse au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière chez différentes espèces comme le rat, le singe et le chat (Skagerberg et al., 1982b; Holstege et al., 1996).

D'un point de vue morphologique, les corps cellulaires dopaminergiques du noyau A11 diffèrent de ceux des autres noyaux diencephaliques. Les corps cellulaires des neurones dopaminergiques du noyau A11 ont une forme multipolaire ou triangulaire de grande taille,

tandis que ceux des noyaux A12, 13 et 14 ont une forme ovale de petite taille et sont distribués de façon dense (Skagerberg and Lindvall, 1985; Qu et al., 2006).

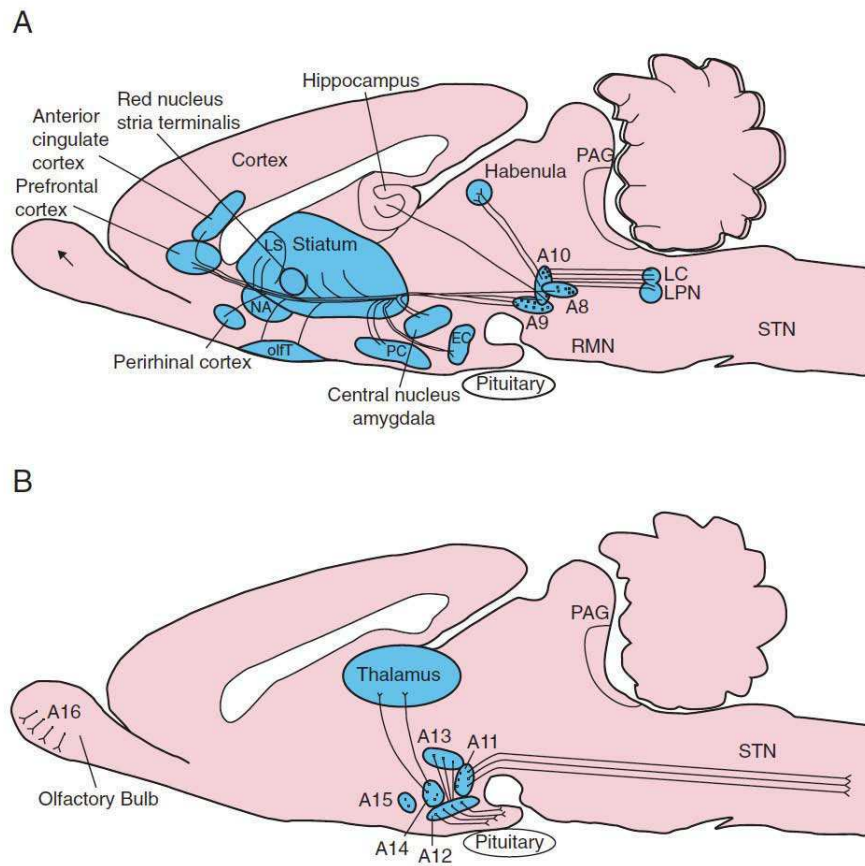


Figure 14. Distribution des noyaux dopaminergiques dans le système nerveux central. EC : Cortex entorhinal, LC : locus coeruleus, LPN : noyau parabrachial latéral, LS : latéral septum, NA : noyau accumbens, olfT : tubercule olfactif, PAG : substance grise périaqueducule, PC : cortex pyriforme, RMN : noyau raphé magnus, STN : noyau trigéminal. (d'après Akerman and Goadsby, 2007).

b) Récepteurs dopaminergiques

La dopamine exerce son action via des récepteurs transmembranaires couplés à la protéine G. Cinq récepteurs dopaminergiques ont été isolés, caractérisés et subdivisés en deux sous-familles, les D1-D2 like, sur la base de leurs propriétés biochimiques et pharmacologiques. La sous-famille D1-like comprend les récepteurs D1-D5, tandis que celle des D2-like comprend les récepteurs D2, D3 et D4 (Vallone et al., 2000).

Les récepteurs D1 sont majoritairement exprimés dans le noyau accumbens, l'amygdale, le cortex cérébral, le tubercule olfactif, le noyau sous thalamique et le striatum. Les récepteurs D5 sont exprimés de façon restreinte dans l'hippocampe, le thalamus et le noyau mamillaire latéral. Les récepteurs D2 sont distribués de façon diffuse dans le cerveau surtout dans le striatum, l'aire tegmentale ventrale, la substance noire, le noyau accumbens et le tubercule olfactif (Jackson and Westlind-Danielsson, 1994).

c) Rôle de la dopamine dans la douleur

Un grand nombre d'études cliniques et expérimentales rapporte l'implication du système dopaminergique dans la nociception. Nous savons par exemple qu'une injection intraplantaire de carragénine chez le rat augmente les taux de la dopamine ou de son métabolite l'acide homovanillique dans le striatum, la PAG et la corne dorsale de la moelle épinière (Gao et al., 2001b). Nous décrirons par la suite le rôle de la dopamine dans la nociception au niveau de structures comme les noyaux de la base, le cortex, la PAG et le noyau A11.

Au niveau des noyaux de la base, les études chez l'animal montrent que les neurones de la substance noire et du striatum répondent aux stimuli nociceptifs thermique, mécanique et électrique (Barasi, 1979; Pay and Barasi, 1982; Gao et al., 1990; Bernard et al., 1992; Chudler et al., 1993; Chudler, 1998). Des études d'imagerie ont montré l'activation du striatum par différents types de stimulations douloureuses (Casey et al., 1996; Svensson et al., 1997).

Les injections de l'agoniste non sélectif l'apomorphine ou sélectif le quinpirole des récepteurs D2 dans le striatum dorsolatéral induit un effet analgésique sur le test au formol. Cependant, les microinjections des agonistes ou antagonistes des récepteurs D1 dans le striatum n'ont aucun effet sur la douleur tonique (Magnusson and Fisher, 2000; Taylor et al., 2003). Une lésion des neurones dopaminergiques du striatum (par des microinjections de 6-hydroxydopamine) diminue la latence de retrait de la patte induite par des stimuli nociceptifs thermique ou mécanique (Saade et al., 1997).

Dans le cas du noyau accumbens, nous savons qu'il reçoit de la motoneurone épinière des projections directes et envoie des efferences vers des structures connues pour leur implication dans la modulation de la nociception comme l'amygdale et le pallidum ventral (Burstein and Giesler, Jr., 1989; Heimer et al., 1991; Zubieta et al., 2002). Des analyses d'imagerie médicale (fMRI) révèlent une modification de l'activité du noyau accumbens suite à une stimulation nociceptive thermique (Becerra et al., 2001). Chez le rat, une stimulation nociceptive comme une injection intra-plantaire de capsaïcine ou un pincement de la queue induit une libération de la dopamine dans le noyau accumbens (Rouge-Pont et al., 1993; Schmidt et al., 2002). Par ailleurs, des microinjections bilatérales de l'agoniste des récepteurs D2 le quinpirole dans le noyau accumbens réduit la réponse nociceptive induite par une injection de formol intra-plantaire chez le rat. Cet effet analgésique induit par le quinpirole est bloqué par un pré-traitement avec le raclopride (antagoniste des récepteurs D2) (Taylor et al., 2003).

Chez l'homme, Jones et ses collab. montrent qu'une stimulation thermique douloureuse (46°C) au niveau de la main augmente le flux sanguin dans le putamen et le globus pallidus (Jones et al., 1991). Une injection intradermique de capsaïcine induit également une augmentation du flux sanguin dans le putamen. Des études cliniques ont montré une corrélation entre le taux des récepteurs D2 dans le striatum et les seuils des douleurs thermiques chez des sujets sains. Par exemple, les sujets avec un faible taux de récepteurs D2 présentent des seuils de douleur élevés pour le froid (Hagelberg et al., 2002). Les récepteurs D2 du striatum sont également impliqués dans des douleurs orofaciales. Les patients qui souffrent de stomatodynie ou de douleur atypique faciale ont des taux élevés de récepteurs D2 striatal par rapport aux sujets sains (Hagelberg et al., 2003a; Hagelberg et al., 2003b).

Comme le montrent certains travaux chez le rat, des régions corticales, comme le cortex insulaire, le cortex cingulaire antérieur (CCA) et le cortex préfrontal, sont également soumises à des influences dopaminergiques qui peuvent moduler la nociception. Burkey et ses collaborateurs ont montré qu'une injection d'un inhibiteur de recapture dopaminergique le GBR-12935 dans la région agrulaire du cortex insulaire entraîne une analgésie vis-à-vis d'une stimulation nociceptive thermique ou inflammatoire. Des faibles doses de SCH-23390 (antagoniste des récepteurs D1) bloquent l'effet analgésique induit par le GBR-12935 (Burkey et al., 1999). L'équipe de Coffeen montre également que les microinjections de SCH-23390 ou de l'agoniste des récepteurs D2, le TNPA, dans le cortex insulaire agrulaire atténue la douleur dans un modèle de douleur neuropathique (Coffeen et al., 2008).

Enfin certains travaux montrent qu'une stimulation électrique de la VTA inhibe les neurones du CCA (lié à la composante affective et émotionnelle de la douleur) qui répondent à des stimuli nociceptifs et bloque le comportement nociceptif (Piro et al., 1996; Sotres-Bayon et al., 2001). De plus, des injections locales de dopamine dans le CCA est capable d'induire une analgésie dans un modèle de neuropathie chronique (Lopez-Avila et al., 2004).

L'activation de la PAG, par des stimulations électriques ou par des microinjections locales d'agonistes opioïdiques, induit un effet anti-nociceptif (Yaksh et al., 1976; Meyer et al., 2009). Deux groupes de neurones dopaminergiques ont été identifiés au niveau de la PAG : des neurones de grande taille localisés dans la partie latérale de la PAG et des neurones de petite taille localisés principalement dans la partie ventro-latérale de la PAG. Flores et ses collaborateurs ont montré que la lésion des neurones dopaminergiques de la partie latérale de la PAG réduit l'effet analgésique induit par les opioïdes lors du test de la plaque chaude. Des résultats semblables ont été obtenus après des microinjections intra-PAG d'antagoniste des récepteurs D1 alors qu'aucun effet n'a été observé suite à des microinjections d'antagoniste des récepteurs D2 (Flores et al., 2004).

L'administration de l' α -flupenthixol (antagoniste dopaminergique) combiné à la morphine dans la partie ventrale de la PAG réduit l'effet antinociceptif de la morphine mesuré par le test de la plaque chaude. Cependant, l'injection de l' α -flupenthixol sans la morphine n'a aucun effet vis-à-vis d'un stimulus thermique. Des microinjections de l'agoniste dopaminergique l'apomorphine dans la PAG ventrale augmente la latence de retrait de la patte dans le test de la plaque chaude. Cet effet antinociceptif est bloqué exclusivement par des microinjections de l'antagoniste des récepteurs D2 l'é ticlopride. Enfin, l'antagoniste des récepteurs D1 le SCH-23390 microinjecté dans la PAG ne bloque pas l'effet antinociceptif induit par la dopamine (Meyer et al., 2009).

d) Contrôles dopaminergiques de la nociception au niveau spinal

La voie dopaminergique descendante vers la moelle provient essentiellement du noyau hypothalamique A11. Elle constitue la principale source de dopamine dans la moelle épinière. Les neurones dopaminergiques du noyau A11 envoient des projections principalement ipsilatérales vers la moelle épinière et un faible contingent de projections sur le côté controlatéral (Skagerberg and Lindvall, 1985; Qu et al., 2006; Barraud et al., 2010). Les fibres dopaminergiques sont localisées de façon diffuse au niveau de la corne dorsale de la moelle

épinière chez différentes espèces comme le rat, le singe et le chat (Skagerberg et al., 1982; Holstege et al., 1996).

L'effet antinociceptif spinal de la dopamine a été mis en évidence par des injections intrathécales de dopamine. Ces injections augmentent les seuils nociceptifs mécaniques mesurés par les filaments de Von Frey et induisent un effet anti-nociceptif sur des réponses évoquées par des stimuli nociceptifs thermiques et chimiques via les récepteurs D2 (Tamae et al., 2005). Aucun effet n'a été observé suite à l'administration des agonistes/antagonistes des récepteurs D1 (Jensen and Yaksh, 1984; Barasi and Duggal, 1985; Liu et al., 1992). Cependant, Gao et ses collaborateurs ont montré un effet analgésique de l'antagoniste des récepteurs D1 dans un cadre de douleur inflammatoire. En effet, l'injection intrathécale de SCH23390 (antagoniste des récepteurs D1) réduit l'hyperalgésie induite par une injection de carragénine intra-plantaire (Gao et al., 2001a).

Des résultats similaires ont été observés dans des études d'électrophysiologie *in vivo*. L'application de la dopamine ou de RU24213 (agoniste des récepteurs D2) par iontophorèse dans la corne dorsale de la moelle épinière inhibe sélectivement la réponse neuronale aux stimuli nociceptifs cutanés chez le rat et le chat. Cet effet anti-nociceptif de la dopamine est reversé par le sulpiride (antagoniste des récepteurs D2). Aucun effet n'a été observé suite à des injections de SKF 38393 (agoniste des récepteurs D1) (Fleetwood-Walker et al., 1988). L'application de la dopamine au niveau spinal inhibe les neurones de la substance gélatineuse de la moelle en induisant un courant sortant ou une hyperpolarisation. Cette inhibition met en jeu des récepteurs D2 couplés à la protéine G en activant les canaux potassiques (Taniguchi et al., 2011).

En ce qui concerne l'origine hypothalamique des effets antinociceptifs dopaminergiques, certains travaux ont pu montrer l'implication du noyau A11. En effet, la stimulation électrique du noyau A11 mime les effets induits par l'application de la dopamine, effet qui est reversé par des injections spinales de sulpiride (Fleetwood-Walker et al., 1988). De plus, la stimulation électrique du noyau A11 entraîne l'hyperpolarisation des neurones de la substance gélatineuse de la moelle, effet reversé par l'administration de sulpiride (antagoniste des récepteurs D2) (Tamae et al., 2005; Taniguchi et al., 2011).

Enfin, Wei et ses collaborateurs ont testé l'effet de la modulation pharmacologique du noyau A11 sur l'allodynie chez des rats neuropathiques. Les microinjections de quinpirole (agoniste D2) dans le noyau A11 réduisent l'allodynie chez les rats neuropathiques. L'effet analgésique du quinpirole est reversé par un pré-traitement du noyau A11 avec le raclopride (antagoniste des récepteurs D2) et par la bicuculline (antagoniste des récepteurs GABA A). Le

muscimol, agoniste des récepteurs GABA A, injecté dans le noyau A11 réduit également l'allodynie chez des rats neuropathiques (Wei et al., 2009).

En résumé, le noyau A11 exerce un contrôle antinociceptif dopaminergique au niveau des neurones des couches superficielles de la moelle via la mise en jeu des récepteurs D2.

3.3.4.2 Dopamine et douleurs chez l'homme

Le dysfonctionnement du système dopaminergique a été également impliqué dans un certain nombre de pathologies douloureuses telles que la fibromyalgie, le syndrome des jambes sans repos, la maladie de Parkinson et la migraine.

a) La Fibromyalgie

La fibromyalgie est caractérisée par des douleurs chroniques diffuses à différentes parties du corps qui touchent 2% de population, principalement les femmes. Ce trouble est souvent associée à une variété d'autres symptômes notamment la fatigue chronique, la raideur musculaire et les troubles affectifs. Des analyses d'imagerie (TEP) montrent une diminution de l'activité de la dopa-décarboxylase chez ces patients dans plusieurs structures cérébrales connues pour leur implication dans la modulation de la douleur comme le thalamus, le mésencéphale, l'insula, le cortex cingulaire antérieur et l'hippocampe (Wood et al., 2007). Une stimulation douloureuse induite par une injection d'une solution hypotonique dans le muscle antérieur du tibia augmente la libération de la dopamine dans les ganglions de la base chez des sujets sains. Cette libération de dopamine est corrélée à l'intensité de la douleur perçue chez les sujets sains. À l'inverse, aucune corrélation significative n'a été démontrée chez des patients atteints de fibromyalgie, suggérant ainsi une perturbation des rôles dopaminergiques. Contrairement aux sujets sains, Les patients atteints de fibromyalgie présentent une réponse anormale de dopamine à la stimulation douloureuse (Wood et al., 2007).

b) Syndrome des jambes sans repos

Cette pathologie est caractérisée par une sensation désagréable et un besoin irrésistible de bouger les membres inférieurs surtout dans des périodes de repos ou de sommeil. Il est à noter que 30% des patients qui souffrent de fibromyalgie développent le syndrome des jambes sans repos (Yunus and Aldag, 1996). Un déficit du système dopaminergique serait responsable de la pathologie des jambes sans repos. Des analyses d'imagerie (T.E.P) ont montré une hypoactivité dopaminergique chez ces patients (Cervenka et al., 2006). Stiansky-kostler et ses collaborateurs rapportent une hyperalgésie mécanique statique chez les patients souffrant du

syndrome de jambes sans repos qui peut être réduit par un traitement à base d'agonistes dopaminergiques (Stiasny-Kolster et al., 2004).

Le noyau A11 pourrait être impliqué dans cette pathologie. Chez le rongeur par exemple, une lésion à la 6-hydroxydopamine du noyau A11 mime les symptômes des jambes sans repos. Les rats lésés souffrent d'une réduction du temps de sommeil, d'une latence élevée à s'endormir, et des séquences répétées de mouvements verticaux (se mettre debout) (Ondo et al., 2000; Zhao et al., 2007).

c) La maladie de Parkinson

Outre les troubles posturaux moteurs des patients parkinsoniens, 40% d'entre eux souffrent de différents types de douleur comme des douleurs musculo-squelettiques, dystoniques, radiculaires, orales et génitales (Goetz et al., 1986; Ford et al., 1996). Une diminution des seuils nociceptifs thermiques a été rapportée chez les patients parkinsoniens (Djaldetti et al., 2004). Ces seuils sont réduits pendant la période du sevrage au Lévodopa (agoniste dopaminergique, utilisé comme un traitement dans le cadre de la maladie de Parkinson), et augmentent après la prise de ce traitement (Slaoui et al., 2007). Le traitement au lévodopa augmente également les seuils nociceptifs du réflexe de flexion (RIII), réduits chez les patients parkinsoniens (Gerdelat-Mas et al., 2007).

Des symptômes de brûlure buccale se manifestent chez les patients parkinsoniens (Ford et al., 1996), il s'agit d'une douleur orofaciale chronique caractérisée par une sensation de brûlure et d'assèchement buccale ainsi qu'une perturbation du goût. Ces symptômes sont liés à une dérégulation du système dopaminergique, les études d'imagerie montrent une altération de la recapture de la DOPA et un bas ratio de récepteurs D1/D2 dans le putamen chez ces patients (Jaaskelainen et al., 2001; Hagelberg et al., 2003b).

4. Les objectifs

Notre travail a pour objectif d'étudier le rôle des rôles descendants hypothalamiques dans la nociception trigéminal. Dans la première partie, nous caractériserons l'origine et l'organisation des voies descendantes hypothalamiques sur le noyau spinal caudal du trijumeau (Sp5C). Dans la deuxième et dernière partie de ce manuscrit, nous analyserons, respectivement, l'influence des systèmes hypothalamiques descendants dopaminergique et orexinergique sur la nociception trigéminal.

4.1 Organisation des contrôles descendants hypothalamiques sur le complexe sensitif du trijumeau

Des données de la littérature rapportent l'implication de l'hypothalamus dans la douleur céphalique Chez l'homme et l'animal (Alstadhaug, 2009).

Nous savons que l'hypothalamus reçoit des projections directes du complexe sensitif du trijumeau (Iwata et al., 1992; Newman et al., 1996; Malick and Burstein, 1998; Malick et al., 2000). Chez l'animal, des études électrophysiologiques (Shigenaga et al., 1973; Morita et al., 1977; Hamba et al., 1990) ou d'expression de Fos (marqueur d'activité) (Malick et al., 2001; Ter Horst et al., 2001; Benjamin et al., 2004) montrent une activation de l'hypothalamus suite à une excitation du complexe sensitif du trijumeau. Une stimulation du sinus sagittal chez le chat par exemple augmente l'expression de Fos dans les noyaux supraoptiques et postérieure de l'hypothalamus (Benjamin et al., 2004). Cependant, la stimulation de la dure-mère chez le rat augmente l'expression de Fos dans le noyau ventromédian de l'hypothalamus (Malick et al., 2001). Une injection intracisternale de capsaïcine chez le rat active également certaines structures hypothalamiques (Ter Horst et al., 2001). Les analyses électrophysiologiques montrent une activation de l'hypothalamus latéral en réponse à une stimulation nociceptive de la pulpe dentaire chez le rat (Morita et al., 1977; Hamba et al., 1990).

Les études cliniques ont montré également l'implication de l'hypothalamus dans la physiopathologie de certaines douleurs céphaliques comme la migraine et l'algie vasculaire faciale. En effet, des symptômes prédictifs ; qui laissent suggérer une dérégulation de l'hypothalamus ; sont observés 48h avant le déclenchement de la crise de migraine comme une perturbation du cycle sommeil/éveil et de la prise alimentaire, un changement d'humeur, une sensation de soif et des problèmes urinaires (Giffin et al., 2003). D'autres arguments, suggérant une implication de l'hypothalamus, sont la rythmicité circadienne des crises, la fluctuation hormonale chez les femmes corrélés avec la fréquence de crises, et une perturbation de sommeil comme étant un facteur favorisant le déclenchement de la crise. Une dérégulation du pattern hormonal contrôlé directement ou indirectement par l'hypothalamus a été rapportée par des analyses endocrinologiques chez les patients souffrant de migraine chronique ou d'algie vasculaire faciale (Leone and Bussone, 1993; Peres et al., 2001). De plus, des études de neuro-imageries (Tomographie par émission de positons) rapportent une activation de l'hypothalamus pendant les crises de migraine et d'algie vasculaire (May et al., 1998a; Denuelle et al., 2007). Enfin, la stimulation électrique de haute fréquence de l'hypothalamus postérieure réduit fortement l'intensité et la fréquence de la douleur chez les patients résistants au traitement de l'algie vasculaire (Leone et al., 2010).

Nous avons tout d'abord cherché à caractériser, par une approche anatomique chez le rat, l'origine et l'organisation anatomique des contrôles hypothalamiques descendants en injectant un traceur rétrograde (le fluorogold) dans le Sp5C.

4.2 Organisation du Contrôle descendant dopaminergique

Le système dopaminergique est impliqué dans certaines douleurs céphaliques comme la migraine (Charbit et al., 2010). En effet, les patients souffrant de migraine semblent être hypersensibles aux agonistes dopaminergiques qui exacerbent chez eux des symptômes habituellement rencontrés pendant les crises de migraine comme le bâillement, la nausée et le vomissement (Blin et al., 1991; Cerbo et al., 1997). De plus, un polymorphisme des récepteurs dopaminergiques a été rapporté chez ces patients (Peroutka et al., 1997). Chez le rat, une injection intracisternale de quinpirole (agoniste des récepteurs D₂) réduit la réponse nociceptive induite par une injection orofaciale de formol ou de capsaïcine. Tandis qu'une administration de sulpiride (antagoniste des récepteurs D₂) réduit l'effet anti-nociceptif du quinpirole, et facilite le comportement nociceptif quand il est administré tout seul (Lapirot et al., 2011). Des données électrophysiologiques confirment l'effet anti-nociceptif des agonistes D₂ observé dans les études comportementales (Bergerot et al., 2007; Charbit et al., 2009; Lapirot et al., 2009). L'administration des agonistes D₂ par voie intracisternale réduit sélectivement les réponses des neurones médiées par les fibres nociceptives de type C induites par une stimulation nociceptive électrique du champ cutané maxillaire facial chez le rat (Lapirot et al., 2011). Le noyau A11 est une structure clé dans le contrôle dopaminergique des douleurs trigéminales. En effet, l'activation du noyau A11 inhibe la réponse neuronale trigéminal induite par une stimulation nociceptive électrique de la dure-mère ou par un pincement nociceptif de la région ophtalmique chez le rat. L'effet anti-nociceptif observé suite à la stimulation du noyau A11 met en jeu les récepteurs D₂. Un prétraitement à l'éticlopride (antagoniste des récepteurs D₂) renverse l'inhibition de la réponse neuronale induite par la stimulation du noyau A11 (Charbit et al., 2009).

En se basant sur ces données, nous avons caractérisé le phénotype neurochimique du noyau A11 chez le rat ainsi que son implication dans la douleur trigéminal. Pour ce faire, nous avons tout d'abord identifié le phénotype neurochimique des projections du noyau A11 sur le complexe sensitif du trijumeau. Nous avons recherché quel phénotype neuronal du noyau A11

pouvait être activé par une stimulation tonique nociceptive céphalique. Pour cela, nous avons analysé l'expression de la protéine Fos (marqueur d'activation neuronale) au sein du A11 en réponse à une injection faciale sous cutanée de formol. Pour tester l'implication du noyau A11 dans les douleurs trigéminales, nous avons évalué l'effet de la lésion de ce noyau à l'aide de microinjections locales d'acide kainique ou de 6-hydroxydopamine sur la durée du grattage induite par une injection de formol dans la lèvre supérieure.

4.3 Contrôle descendant orexinergique

L'implication de l'orexine dans les douleurs céphaliques s'appuie principalement sur des arguments indirects suggérés le plus souvent par des études cliniques. En effet, La prévalence des crises de migraine est augmentée chez les patients narcoleptiques déficients en orexine et chez les sujets souffrant de surpoids ou d'obésité (Dahmen et al., 1999; Dahmen et al., 2003; Peterlin et al., 2010). Une corrélation entre le polymorphisme des récepteurs OX2 et le risque de développer la migraine ou l'algie vasculaire a été également rapportée chez l'homme (Rainero et al., 2004; Baumber et al., 2006; Rainero et al., 2007; Rainero et al., 2011).

Chez l'animal, l'orexine A a un effet anti-nociceptif. En effet, dans un modèle de douleur trigéminovasculaire, les injections systémiques d'orexine A réduisent la vasodilatation ainsi que la réponse des fibres A δ induites par une stimulation électrique des méninges (Holland et al., 2005; Holland et al., 2006). La réduction de la vasodilatation, par différents agents comme les antagonistes de CGRP et les triptans, est considéré comme étant un traitement efficace contre la migraine (Ferrari, 2002; Williamson et al., 1997). De plus, l'administration de l'orexine A dans l'hypothalamus postérieur diminue l'activité spontanée ainsi que les réponses A δ et C des neurones du Sp5C évoqué par des stimulations des méninges (Bartsch et al., 2004). Aucun effet sur la douleur a été rapporté suite aux injections systémiques d'orexine B (Holland et al., 2005; Holland et al., 2006). Cette absence d'effet est peut être due à la voie d'administration étant donné que l'orexine B est formé d'une chaîne linéaire et donc plus susceptible à être dégradé par des peptidases. De plus l'orexine B possède une demi-vie plus courte que celle de l'orexine A (Yoshida et al., 2003).

Dans cette dernière partie, nous avons caractérisé le contrôle descendant orexinergique sur le Sp5C ainsi que son implication dans la douleur trigéminale par des techniques d'immunohistochimie, d'anatomie et d'électrophysiologie.

Nous avons ainsi analysé l'expression, au niveau hypothalamique, de la protéine Fos en réponse à une stimulation nociceptive trigéminale (injection de formol dans la lèvre supérieure

chez le rat). Par une technique de double marquage Fluorogold/OrexineA, nous avons cherché à identifier un phénotype neurochimique possible des contrôles descendants de l'aire périfornicale et latérale de l'hypothalamus.

Enfin, nous avons cherché à attester de l'existence fonctionnelle d'un contrôle hypothalamique orexinergique descendant direct sur la nociception trigéminal. Pour cela, nous avons analysés les effets d'injections intracisternales de l'orexine A sur les réponses C et A δ des neurones nociceptifs du noyau spinal du trijumeau induites par une stimulation nociceptive électrique de leur champ récepteur.

**Chapitre 1 : Organisation des contrôles descendants
hypothalamiques sur le complexe sensitif du trijumeau**

**ORGANIZATION OF DESCENDING HYPOTHALAMIC PROJECTIONS TO THE
MEDULLARY DORSAL HORN**

Khaled Abdallah, Alain Artola, Lénaïc Monconduit, Radhouane Dallel, Philippe Luccarini

Inserm/UdA U1107, Neuro-Dol: Trigeminal Pain and Migraine, Université d'Auvergne,
Faculté de Chirurgie Dentaire, 11 Boulevard Charles de Gaulle, Clermont-Ferrand, 63000,
France.

Running head: Hypothalamo-trigeminal neurons

Associate editor: Gert Holstege, University of Groningen: Brainstem and Spinal Cord
Sensorimotor Systems

Corresponding authors: Radhouane DALLEL, Philippe LUCCARINI

Inserm/UdA U1107, Neuro-Dol: Trigeminal Pain and Migraine, Faculté de Chirurgie Dentaire,
11 Boulevard Charles de Gaulle, Clermont-Ferrand, 63000, France.

E-mail : radhouane.dallel@udamail.fr

Grant Information: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM),
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Université d'Auvergne-Clermont-
Ferrand and Région Auvergne.

ABSTRACT

Several lines of evidence suggest that the hypothalamus is involved in trigeminal pain processing. However, the organization of descending hypothalamic projections to the medullary dorsal horn (MDH) remains poorly understood. By using a neuroanatomical tracing approach, we examined the organization of hypothalamic projections to the MDH.

Microinjections of the retrograde tracer, Fluorogold, into MDH reveal that five hypothalamic nuclei project to the MDH: the paraventricular nucleus (PVN), lateral hypothalamic area (LH), perifornical hypothalamic area (PFX), A11 nucleus and retrochiasmatic area (RCA). The density of retrogradely FG-labeled neurons in the hypothalamus varies according to the dorso-ventral location of the MDH injection site. There are much more labeled neurons after injections into the ventrolateral part of the MDH (where ophthalmic afferents project) than after injections into its dorsomedial or intermediate parts (where mandibular and maxillary afferents, respectively, project). Moreover, descending hypothalamic projections are bilateral with, nevertheless, a clear ipsilateral predominance for PVN and LH nuclei.

These results delineate the organization of descending hypothalamic projections to the MDH and suggest that these projections are preferentially involved in the processing of meningeal and cutaneous inputs from the ophthalmic branch of the trigeminal nerve in rats. Therefore, understanding the role of hypothalamic projection to the MDH is likely to offer insights into the neurobiology of headache.

KEYWORDS: hypothalamus, trigeminal, nociception, orofacial pain, headache, rat

INTRODUCTION

Pain is a complex experience that involves sensory-discriminative, cognitive-evaluative, and affective-emotional components. Transmission of nociceptive messages is thus modulated by different central nervous system networks according to the nature of the painful stimulus and behavioral state of the individual (for review, see Millan, 2002). For instance, descending pathways from brainstem and hypothalamus are known to either inhibit or facilitate transmission of nociceptive information at the level of the spinal and medullary dorsal horn (MDH).

The hypothalamus integrates multiple functions including endocrine and autonomic control, thermoregulation, sleep, appetite, emotional behavior and arousal, and governs the rhythmicity and timing of many body functions (for review, see Saper, 2012). Evidence from neuroimaging studies in man suggest that hypothalamus is also a key player in nociceptive processing, particularly in trigeminal pain syndromes such as migraine (Denuelle et al., 2007) and trigeminal autonomic cephalalgias (for review, see Holle et al., 2011) including cluster headache (May et al., 1998). This prompted the use of deep-brain stimulation to modulate this region in patients with refractory chronic cluster headache (Leone et al., 2001; Schoenen et al., 2005; Fontaine et al., 2010). Animal studies, using electrophysiological recordings in rats (Shigenaga et al., 1973; Morita et al., 1977; Hamba et al., 1990) and cats (Rudomin et al., 1965) or Fos expression as a histochemical marker of neuronal activity (Malick et al., 2001; Ter Horst et al., 2001; Benjamin et al., 2004), suggest that the hypothalamus is activated following trigeminal stimulation.

It is widely accepted that trigeminal sensory information can reach the hypothalamus via multisynaptic pathways through the brainstem, thalamus, and cortex. Recently, however, anatomical (Iwata et al., 1992; Newman et al., 1996; Li et al., 1997; Malick and Burstein,

1998) and electrophysiological (Malick et al., 2000) studies showed that a substantial number of MDH neurons directly send their axons to hypothalamic regions.

The hypothalamus modulates the perception of trigeminal pain (for review, see Akerman et al., 2011). Stimulation or lesion of the A11 nucleus decrease or increase, respectively, dural stimulation-evoked responses of MDH neurons (Charbit et al., 2009). This raises the question as to whether hypothalamic areas directly project to the MDH. We have therefore carried out an anatomical study in the hypothalamus to address this issue. We microinjected the retrograde tracer, Fluorogold (FG), into MDH and looked for retrogradely FG-labeled neurons in hypothalamic nuclei.

MATERIALS AND METHODS

Adult male Sprague Dawley rats were obtained from Charles River laboratories (France) and maintained in a light- and temperature controlled environment (lights on 19.00–7.00 h, 22°C) with food and water *ad libitum*. All efforts were made to minimize the number of animals used. The experiments followed the ethical guidelines of the International Association for the Study of Pain and ethical guidelines of the directive 2010/63/UE of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes.

Fluorogold injection

Animals (250–300 g) were anesthetized with chloral hydrate (400 mg/kg body weight, intraperitoneally (i.p.)) and placed in a stereotaxic frame. After surgical removing of the atlanto-occipital membrane, glass micropipettes (30–40 µm diameter tips) filled with a 2% solution of Fluorogold (hydroxystilbamidine, Molecular Probes, Reference H22845), diluted in 0.1 M cacodylic acid were inserted into the right MDH (AP –5.3 mm from the interaural line, ML 2.7

mm, P 1.5 mm) according to Paxinos and Watson (2007) with an angle of 80° to the horizontal plane. Once the micropipette was in place, direct positive current (5 μ A) was applied for 30 s every 30 s for 15–20 min. The microelectrode was left in situ for a further 5 min before withdrawal from the brain. A single injection into the MDH was performed in each animal.

Following a postoperative survival period of one week, animals were deeply anaesthetized with urethane (1.5 g/kg, i.p) and perfused transcardially over a 15-min period with warm (37 °C) heparinized saline (25 IU heparin/mL) followed by cold (10 °C) phosphate-buffered solution (0.1 M, pH 7.6) containing 4% paraformaldehyde and 0.03% picric acid. The brain and first cervical segment (C1) were removed and then cryoprotected in a buffered 30% sucrose solution containing paraformaldehyde-picric acid solution and left overnight. Coronal sections were cut on a freezing microtome (40 μ m thick) and collected in a 0.05 M Tris-buffered saline (TBS). A set of MDH sections was mounted on gelatin-coated slides and viewed using a fluorescent microscope (Zeiss AxioPlan 2 Imaging microscope; FG: excitation 365/10 nm, dichroic mirror 400 nm and barrier filter 520 \pm 560 nm) in order to localize the injection sites. Only diencephalic sections of animals in which injection site was exclusively located within the MDH were processed further.

Primary Antibody

A rabbit polyclonal anti-body against Fluorogold (Millipore; Reference AB153; Lot LV1644476; Biag et al., 2012) was used in order to detect the retrogradely labeled cells in hypothalamus and the tracer injection site in MDH.

Fluorogold injection site immunocytochemistry

Free-floating brainstem sections were placed in 1% normal horse serum for 30 minutes before incubation in a rabbit polyclonal antibody directed against Fluorogold (1:20000, Millipore, Reference AB153) overnight at room temperature. Sections were then washed in TBS and placed in biotinylated horse anti-rabbit followed by avidin–biotin–peroxidase complex (Immpress, Abcys Vector, 30 min at room temperature). Immunoreactivity for Fluorogold was visualized in sections using 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (kit Vector Peroxydase substrate DAB).

Hypothalamic section immunocytochemistry

Free-floating diencephalic sections were placed in 1% normal goat serum for 60 minutes before incubation in a rabbit polyclonal antibody directed against Fluorogold (1:20000, Millipore, Reference AB 153) overnight at room temperature. Immunoreactivity was revealed using Cy3 conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (1: 200, Jackson Immunoresearch, Reference 111-165-003) for 2 hours at room temperature. All immunolabels were diluted in TBS containing 0.25% bovine serum albumin and 0.3% Triton X-100. Specificity controls consisted of the omission of the primary antibody and incubation of sections in inappropriate secondary antibodies. In all these control experiments, no specific staining was evident. All sections were rinsed in TBS and transferred to gelatinized slides before being coverslipped using DPX.

Cresyl violet staining

In order to define the cytoarchitecture of PVN subdivisions (Swanson and Kuypers, 1980b; Cechetto and Saper, 1988; Nysten et al., 2001), a few selected sections were mounted separately and stained with a 0.5 % cresyl violet solution for 10-min. Sections were then rinsed with

distilled water and dehydrated in graded dilutions of ethanol before being cleared with xylene and coverslipped using DPX.

Data analysis

Computer-assisted bright-field images of injection sites were obtained using a CCD colour video camera (Sony DXC-950P) connected to a Nikon Optiphot-2 microscope at 4× magnification. Each injection site was analyzed using coronal sections processed with DAB. The delineation of the MDH was based on our own myeloarchitecture atlas adapted from Strassman and Vos (1993) and Molander et al. (1989). Brainstem sections were categorized according to their approximate rostrocaudal location in the MDH (from +0.4 μm to -3.2 μm , 10 levels) relative to the most caudal tip of the subnucleus interpolaris/MDH transition region, as described by Yoshida et al. (1991). Representation of injection sites were grouped on standard drawings of MDH.

Immunofluorescence was analyzed with a motorized Zeiss Axioplan 2 Imaging microscope coupled with a Hamamatsu C4742-95 digital camera, by using Texas Red filter set. Images of each side of hypothalamic nuclei were captured separately with a x10 objective, resulting in an image size of 1280x1024 pixels. Retrogradely labeled cell bodies were counted manually with the aid of imagej cell counter plugin; according to their location within the different rostrocaudal planes of the hypothalamus (from -0.9 to -4.8 mm posterior to bregma). The delineation of the hypothalamus was based upon the Paxinos and Watson atlas (2007), Swanson and Kuypers (1980b), Skagerberg and Lindvall (1985), Cechetto and Saper (1988), Swanson et al. (2005). Representative examples of retrogradely labeled cell bodies distribution were grouped on standard drawings illustrating the rostro-caudal levels of hypothalamus. Images were exported to Adobe PhotoShop (v 5.5) to adjust brightness and contrast before

adjusting the image scale by using ImageJ 1.45 software. The images were imported into Coral Draw 12 to insert additional indications and/or anatomical landmarks.

Data are expressed as mean \pm SEM. Statistical analyses were performed using Sigma Plot software. Either the Student *t*-test, Mann-Whitney rank sum test, when data were not normally distributed, and one Way ANOVA followed by *post hoc* Tukey's multiple comparison tests were used as specified in the text. Significance level was set at $p < 0.05$.

RESULTS

Localization and extent of injection sites

The present data were collected from 21 rats, in which the injection of Fluorogold (FG), manifest as a dense core of intense fluorescence, was restricted to MDH. The MDH localization of FG injections was confirmed by using DAB: each injection appeared as a center of dense FG immunoreactivity surrounded by, first, a halo of staining with strongly FG immunoreactive neurons and then, more peripherally, less stained neurons (Fig. 1). Coronal levels at which tracer deposition was maximal were at about -1.2 mm ($n = 2$), -1.6 mm ($n = 10$), -2.0 mm ($n = 6$) and -2.4 mm ($n = 3$) relative to the most caudal tip of the subnucleus interpolaris/MDH transition region (Fig. 1B). Mean rostrocaudal, mediolateral and dorsoventral extents of injection sites (area of strongly immunostained neurons) were $965 \pm 62 \mu\text{m}$, $562 \pm 48 \mu\text{m}$ and $503 \pm 39 \mu\text{m}$, respectively.

In most animals ($n = 15$), FG injections were confined to either the dorsomedial ($n = 3$) or intermediate ($n = 8$) or ventrolateral ($n=4$) area of MDH (Fig. 1B). These areas are innervated by the mandibular (V3), maxillary (V2) and ophthalmic (V1) branch of the trigeminal nerve (V), respectively. Therefore, it has been possible to study the organization of hypothalamic projections to each specific MDH areas which will be referred to as V3, V2 and V1 areas,

respectively, in the remainder of the paper. Representative examples on FG injections into the V3, V2 and V1 areas are illustrated in Figure 1A.

Distribution of FG neurons in the hypothalamus

FG neurons were predominantly found in the paraventricular nucleus (PVN), lateral hypothalamic area (LH), perifornical hypothalamic area (PFX), A11 nucleus and retrochiasmatic area (RCA) (Fig. 2-5). The concentration of FG neurons was high in the PVN, intermediate in the LH, A11 and PFX, and low in the RCA. Some neurons were scattered throughout the remainder of hypothalamic nuclei.

FG neurons in the paraventricular nucleus (PVN)

The highest density of descending hypothalamo-trigeminal neurons was in the PVN. FG neurons were found in both the ipsilateral and contralateral PVN with nevertheless a clear ipsilateral predominance: the number of FG neurons was much higher in the ipsilateral than in the contralateral PVN (75 and 25%, respectively of the total number of FG neurons in PVN; Mann-Whitney rank sum test, $n = 21$, $p < 0.001$ (Fig. 2B, 3A, 4B).

FG neurons were not uniformly distributed throughout the PVN but mainly restricted to its caudal part, between -1.8 and -2.1 mm posterior to bregma. They were thus preferentially located in some of PVN subdivisions in a pattern that was similar in all investigated animals. The PVN is known to include two clusters of large (magnocellular) and small to medium-sized (parvocellular) neurons (Swanson and Sawchenko, 1983). The parvocellular part is subdivided into five subnuclei, the periventricular, anterior, medial, lateral and dorsal subdivisions, and the magnocellular part, into three subnuclei, the anterior, medial and posterior groups. FG neurons were concentrated within the lateral and medial parvocellular subdivisions and, less, in the

dorsal parvocellular subdivision. Numerous FG neurons were also observed in the posterior magnocellular subdivision (Fig. 5, Table 1).

FG neurons in the lateral hypothalamic area (LH) and perifornical hypothalamic area (PFX)

There were many FG neurons in bilateral LH and PFX (Fig. 2C, 2D, 3A, 4C). Whereas, in LH, the number of FG neurons was higher in the ipsilateral than in the contralateral side (64 and 36%, respectively, of the total number of FG neurons in LH; Mann-Whitney rank sum test, $n = 21$, $p < 0.001$), in PFX, there was no significant difference between the ipsilateral and contralateral sides. FG neurons were observed throughout the ipsilateral LH, between -2.1 and -4.3 mm posterior to bregma and in ipsilateral PFX, between -2.8 and -3.6 mm posterior to bregma (Fig. 2C, D).

FG neurons in hypothalamic A11 nucleus (A11)

Many FG neurons were also observed in hypothalamic A11 nucleus (Fig. 2E, 3A, 4D). There were slightly more FG neurons in the contralateral, this time, than in ipsilateral A11 nucleus (58 and 42% respectively, of the total number of FG neurons in A11; Mann-Whitney rank sum test, $n = 21$, $p = 0.037$). FG neurons were evenly distributed throughout the rostrocaudal extent of the A11 area that is in the dorsal and posterior hypothalamus, extending caudally and dorsally along the periventricular grey of the caudal thalamus, between plans 3.3 to -4.8 mm posterior to bregma (Skagerberg and Lindwall, 1985).

FG neurons in the retrochiasmatic area (RCA)

The lowest density of descending hypothalamo-trigeminal neurons was in the RCA (Fig. 2A, 3A, 4A). There was no lateral predominance. FG neurons were observed between plans -1.6 to -1.8 mm posterior to bregma (Fig. 2A).

Distribution of FG neurons in the hypothalamus as a function of the injection site

The number of retrogradely FG-labeled neurons in the hypothalamus varied with the location of the injection site within MDH: V1, V2 or V3. There were many more FG neurons in hypothalamic nuclei following injections into the V1 area of MDH than after injections into V2 and V3 areas (One-way ANOVA and *post hoc* Tukey's multiple comparison tests, V1 vs. V2: $p = 0.004$, V1 vs. V3: $p = 0.036$, $n = 15$; Fig. 6). Moreover, FG neurons could only be observed in RCA following injections in the V1 area: there were no or very few neurons when injections were located in other MDH areas (Fig. 6).

DISCUSSION

Here, we used the retrograde tracer Fluorogold to delineate the organization of hypothalamic projections to the MDH. We present the first evidence in rats that mainly five hypothalamic nuclei, the PVN, LH, PFX, A11 and RCA, project to the MDH. Hypothalamic projections to MDH are bilateral, with, nevertheless, an ipsilateral predominance for most of them. Interestingly, hypothalamic projections vary between MDH areas. The V1 area appears to receive massive hypothalamic projections and it is the only MDH area to get inputs from the RCA.

Anatomical considerations

The Paraventricular nucleus (PVN)

The projections of magnocellular and parvocellular PVN in rats are different. Magnocellular neurons project directly to the posterior lobe of the pituitary and parvocellular ones to lower brainstem and spinal cord (Saper et al., 1976; Hosoya, 1980; Swanson and Kuypers, 1980a;

Sawchenko and Swanson, 1982; Cechetto and Saper, 1988). PVN projections to the spinal cord are mostly ipsilateral.

The present results indicate that PVN also projects directly to the MDH. PVN projections to MDH are bilateral with, nevertheless, a clear ipsilateral predominance, and, as those to the spinal cord (Sawchenko and Swanson, 1982; Cechetto and Saper, 1988), originate mainly from the lateral, medial and dorsal subdivisions of parvocellular PVN. Interestingly, a significant number of magnocellular neurons were also retrogradely labeled. Whether magnocellular neurons project to the spinal cord is still a matter of discussion as no (Hosoya and Matsushita, 1979; Shafon et al., 1998) as well as few (Swanson and Kuypers, 1980b; Wagner et al., 1993) and significant (Nilaver et al., 1980; Portillo et al., 1998; Nylén et al., 2001) magnocellular projections to the spinal cord have been reported. Anyhow, both parvocellular and magnocellular PVN appear to project to the MDH. Further studies involving for instance electrophysiological recordings will be needed to determine the actual functional role of such heterogeneous PVN projections to the MDH.

The lateral hypothalamus (LH) and perifornical hypothalamic areas (PFX)

LH and PFX project to other hypothalamic areas as well as to the cortex and spinal cord (Saper, 2012). Actually, LH and PFX projections to the spinal cord are larger than PVN ones (Hosoya, 1980). We show that LH and PFX strongly project to the MDH, too. It is interesting to note that, whereas LH and PFX projections to the spinal cord are ipsilateral (Saper et al., 1976; Hosoya and Matsushita, 1979; Hosoya, 1980), those to MDH are bilateral with, nevertheless, an ipsilateral predominance for LH ones. Using anterograde autoradiographic tracing, (Hosoya and Matsushita, 1981) similarly found sparse labeled fibers in bilateral MDH following [³H] amino acid injection into LH and PFX.

The hypothalamus A11 nucleus

The A11 cell group consists of large neurons that are clustered in the dorsocaudal region of diencephalon (Ondo et al., 2000). A11 neurons project primarily to the dorsal horn, with minor projections to the intermediolateral cell column and ventral horn, along the entire spinal cord (Skagerberg et al., 1982; Holstege et al., 1996). Our study demonstrates that the A11 nucleus also densely projects to MDH. A11 projections to MDH are bilateral. This organization is thus different from that of A11 projections to the spinal cord which are predominantly ipsilateral in rats (Skagerberg and Lindvall, 1985), mice (Qu et al., 2006; Pappas et al., 2010) and monkeys (Barraud et al., 2010).

The retrochiasmatic hypothalamic area (RCA)

The RCA is constituted of small and medium-sized neurons located just behind the suprachiasmatic nucleus and in front of the arcuate median eminence complex (Pasquier and Tramezzani, 1979). In addition to thalamic intergeniculate leaflet afferents, the RCA receives projections from the retina, through the retinohypothalamic tract and from the suprachiasmatic nucleus (Berk and Finkelstein, 1981; Stephan et al., 1981; Watts and Swanson, 1987; Johnson et al., 1988; Levine et al., 1991). The RCA projects to numerous areas in the central nervous system, including the hypothalamus (Morin et al., 1994), intergeniculate leaflet (Card and Moore, 1989), and spinal cord (Hosoya, 1980; Swanson and Kuypers, 1980a; Elias et al., 1998). Our results indicate that RCA also bilaterally projects to MDH, but, interestingly, exclusively to the V1 area.

Altogether, our results indicate that the hypothalamic nuclei which send axons to the spinal cord, do also project to the MDH. However, the organization of hypothalamic projections to the spinal cord and MDH are different: while the former are ipsilateral, the latter are mostly bilateral. Our results show in addition that hypothalamic nuclei do not evenly project to the

MDH but preferentially to the V1 area, where meningeal and cutaneous inputs from the ophthalmic branch of the trigeminal nerve terminate.

Functional considerations

MDH receives direct inputs from trigeminal primary afferent fibers and contains neurons that respond to mechanical or thermal stimulation of the cornea (Meng et al., 1997), temporomandibular joint (Broton et al., 1988), facial skin (Hu, 1990; R aboisson et al., 1995), and intracranial dura (Burstein et al., 1998). MDH neurons are known to directly project to the hypothalamus (Iwata et al., 1992; Newman et al., 1996; Li et al., 1997; Malick and Burstein, 1998; Malick et al., 2000). Together with our evidence for direct hypothalamic projections to the MDH, this suggests that connections between the hypothalamus and MDH are reciprocal. Hypothalamus might thus be a key element in feedback loops that regulate trigeminal somatosensory inflow. However, whether nociceptive stimuli activate the very hypothalamic neurons that project to MDH is still unknown.

The Paraventricular nucleus (PVN)

In addition to regulating the autonomic nervous system (Saper, 2012), PVN also modulates spinal nociception. Both electrical and chemical stimulation of PVN produces spinal antinociception (Truesdell and Bodnar, 1987; Wang et al., 1990; Yirmiya et al., 1990; Miranda-Cardenas et al., 2006; Yang et al., 2006; Pinto-Ribeiro et al., 2008), whereas its lesions conversely facilitates nociception (Yang et al., 2006) and attenuates stress-induced analgesia (Truesdell and Bodnar, 1987).

Whether PVN also modulates trigeminal nociception is still a matter of discussion. On the one hand, studies using Fos expression have provided inconsistent results. Stimulation of the

dura mater has been found to either increase (Ter Horst et al., 2001) or not change (Malick et al., 2001; Benjamin et al., 2004) Fos expression. And noxious electrical stimulation of tooth pulp fails to enhance Fos expression (Matsumoto et al., 1993). But, on the other hand, PVN neurons synthesize and secrete neuropeptides including oxytocin and arginine vasopressin (Saper, 2012). These peptides are involved in spinal pain processing (Berkowitz and Sherman, 1982; Breton et al., 2008; Mogil et al., 2011) and also interfere with trigeminal pain. When centrally applied, oxytocin reduces the trigeminal reflex triggered by noxious tooth pulp stimulation (Zubrzycka and Janecka, 2005; Zubrzycka and Janecka, 2008) and, when systemically applied, it attenuates electrical whisker pad stimulation-induced pain-vocalization in newborn rats (Mazurka et al., 2011). Similarly, vasopressin, either centrally applied (Zubrzycka and Janecka, 2005; Zubrzycka and Janecka, 2008) or microinjected into the spinal trigeminal nucleus (Gura, 2000), reduces the amplitude of trigeminal reflex induced by noxious tooth pulp stimulation.

The lateral hypothalamus area (LH) and perifornical hypothalamic area (PFX)

LH and PFX interfere with spinal cord nociception. For instance, electrical stimulation or microinjection of morphine in LH increases the latency of the tail-flick test (Franco and Prado, 1996; Dafny et al., 1996). And a noxious tooth pulp stimulation activates LH neurons (Morita et al., 1977; Hamba et al., 1990). However, it has to be noted that noxious stimulation of the dura mater fails to enhance Fos expression in LH (Malick et al., 2001; Ter Horst et al., 2001; Benjamin et al., 2004).

LH and PFX neurons projecting to the spinal cord contain orexin (Peyron et al., 1998; van den Pol, 1999). Orexin neurons are primarily known to control sleep and wakefulness, energy metabolism, reward, and addiction (for review see Sakurai and Mieda, 2011). They are also involved in nociception and stress-induced analgesia (for review, see Chiou et al., 2010). The

descending orexin system might also modulate trigeminal pain. There is a high density orexin-immunoreactive fibers in superficial MDH (Peyron et al., 1998; van den Pol, 1999). Interestingly, orexin peptides have been shown to selectively modulate responses to noxious dural but not facial cutaneous stimulation (Holland et al., 2006). Together with recent evidence for an association between the orexin receptor 1 gene and migraine (Rainero et al., 2011), this suggests that the orexin system has a specific role in the physiopathology of migraine.

The hypothalamus A11 nucleus

The A11 nucleus is involved in the processing of both spinal (Fleetwood-Walker et al., 1988; Wei et al., 2009; Taniguchi et al., 2011) and trigeminal (Charbit et al., 2009) nociceptive information. Direct stimulation and lesion of the A11 nucleus decreases and increases, respectively, the response of MDH neurons to dural stimulation (Charbit et al., 2009). Pain modulation by A11 descending dopaminergic projections is specifically mediated by D2-like receptors (Fleetwood-Walker et al., 1988; Charbit et al., 2009; Lapirot et al., 2011). Directly activating these D2-like receptors inhibits, whereas blocking them enhances, both formalin- and capsaicin-evoked pain behavior as well as C-fiber-evoked action potential firing of trigeminal WDR neurons (Lapirot et al., 2011). MDH and spinal dorsal horn both exhibit a strong dopamine labeling, consisting of many varicose fibers, especially in rats and monkeys (Holstege et al., 1996). Altogether, these results suggest that A11 neurons are the major source of dopamine input to both MDH and spinal cord neurons (Skagerberg and Lindvall, 1985).

The retrochiasmatic hypothalamic area (RCA)

Our results show, for the first time, that RCA projects exclusively to the V1 area. This MDH region receives sensory inputs from cranial blood vessels (Ackerman et al., 2011) and contains neurons with both dural and peri-ocular receptive fields (Burstein et al., 1998). RCA projections to MDH might thus be specifically involved in the control of migraine pain.

The function of RCA is poorly known. RCA neurons which innervate the spinal cord are alpha melanocyte-stimulating hormone-immunoreactive (α -MSH; Cechetto and Saper, 1988). Alpha-MSH has been shown to interfere with pain (Bellasio et al., 2003). Moreover, α -MSH neurons in RCA are activated by leptin (Elias et al., 1998), an adipocyte-derived hormone which decreases body weight. Interestingly, epidemiologic studies suggest that migraine and chronic daily headache are associated with obesity (for review, see Peterlin et al., 2009).

Conclusion

Our results demonstrate that, though hypothalamic projections to the spinal cord and the MDH originate from the very same hypothalamic nuclei, the former are ipsilateral whereas the latter are bilateral. Furthermore, these hypothalamic nuclei preferentially, if not exclusively, project to the V1 area. This suggests not only that the hypothalamus differentially modulates trigeminal and spinal somatosensory information but also that it primarily modulates meningeal ones. Therefore, understanding the role of hypothalamic projection to the MDH is likely to offer insights into the neurobiology of migraine, and perhaps other primary headache disorders.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

None of the authors has any conflict of interest to declare.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank A.M. Gaydier for secretarial assistance and A. Descheemaeker for technical support.

ROLE OF AUTHORS

All authors had full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. Study concept and design: KA, RD, PL. Acquisition of data: KA. Analysis and interpretation of data: KA, AA, RD, PL. Drafting of the manuscript: KA, AA, RD. Obtained funding : RD. Technical support: LM. Study supervision: RD, PL.

LITTERATURE CITED

- Akerman S, Holland P R, Goadsby PJ. 2011. Diencephalic and brainstem mechanisms in migraine. *Nat Rev Neurosci* 12(10):570-84.
- Barraud Q, Obeid I, Aubert I, Barriere G, Contamin H, McGuire S, Ravenscroft P, Porras G, Tison F, Bezard E, Ghorayeb I. 2010. Neuroanatomical study of the A11 diencephalospinal pathway in the non-human primate. *PLoS One* 5(10):e13306.
- Bellasio S, Nicolussi E, Bertorelli R, Reggiani A. 2003. Melanocortin receptor agonists and antagonists modulate nociceptive sensitivity in the mouse formalin test. *Eur J Pharmacol* 482(1-3):127-32.
- Benjamin L, Levy MJ, Lasalandra MP, Knight YE, Akerman S, Classey JD, Goadsby PJ. 2004. Hypothalamic activation after stimulation of the superior sagittal sinus in the cat: a Fos study. *Neurobiol Dis* 16(3):500-5.
- Berk ML, Finkelstein JA. 1981. An autoradiographic determination of the efferent projections of the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus. *Brain Res* 226(1-2):1-13.
- Berkowitz BA, Sherman S. 1982. Characterization of vasopressin analgesia. *J Pharmacol Exp Ther* 220(2):329-34.
- Biag J, Huang Y, Gou L, Hintiryan H, Askarinam A, Hahn JD, Toga AW, Dong HW. 2012. Cyto- and chemoarchitecture of the hypothalamic paraventricular nucleus in the C57BL/6J male mouse: a study of immunostaining and multiple fluorescent tract tracing. *J Comp Neurol* 520(1):6-33.
- Breton JD, Veinante P, Uhl-Bronner S, Vergnano AM, Freund-Mercier MJ, Schlichter R, Poisbeau P. 2008. Oxytocin-induced antinociception in the spinal cord is mediated by a subpopulation of glutamatergic neurons in lamina I-II which amplify GABAergic inhibition. *Mol Pain* 4:19.

- Broton JG, Hu JW, Sessle BJ. 1988. Effects of temporomandibular joint stimulation on nociceptive and nonnociceptive neurons of the cat's trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn). *J Neurophysiol* 59(5):1575-89.
- Burstein R, Yamamura H, Malick A, Strassman AM. 1998. Chemical stimulation of the intracranial dura induces enhanced responses to facial stimulation in brain stem trigeminal neurons. *J Neurophysiol* 79(2):964-82.
- Card JP, Moore RY. 1989. Organization of lateral geniculate-hypothalamic connections in the rat. *J Comp Neurol* 284(1):135-47.
- Cechetto DF, Saper CB. 1988. Neurochemical organization of the hypothalamic projection to the spinal cord in the rat. *J Comp Neurol* 272(4):579-604.
- Charbit AR, Akerman S, Holland PR, Goadsby PJ. 2009. Neurons of the dopaminergic/calcitonin gene-related peptide A11 cell group modulate neuronal firing in the trigeminocervical complex: an electrophysiological and immunohistochemical study. *J Neurosci* 29(40):12532-41.
- Chiou LC, Lee HJ, Ho YC, Chen SP, Liao YY, Ma CH, Fan PC, Fuh JL, Wang SJ. 2010. Orexins/hypocretins: pain regulation and cellular actions. *Curr Pharm Des* 16(28):3089-100.
- Dafny N, Dong WQ, Prieto-Gomez C, Reyes-Vazquez C, Stanford J, Qiao JT. 1996. Lateral hypothalamus: site involved in pain modulation. *Neuroscience* 70(2):449-60.
- Denuelle M, Fabre N, Payoux P, Chollet F, Geraud G. 2007. Hypothalamic activation in spontaneous migraine attacks. *Headache* 47(10):1418-26.
- Elias CF, Saper CB, Maratos-Flier E, Tritos NA, Lee C, Kelly J, Tatro JB, Hoffman GE, Ollmann MM, Barsh GS, Sakurai T, Yanagisawa M, Elmquist JK. 1998. Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *J Comp Neurol* 402(4):442-59.

- Fleetwood-Walker SM, Hope PJ, Mitchell R. 1988. Antinociceptive actions of descending dopaminergic tracts on cat and rat dorsal horn somatosensory neurones. *J Physiol* 399:335-48.
- Fontaine D, Lanteri-Minet M, Ouchchane L, Lazorthes Y, Mertens P, Blond S, Gerard G, Fabre N, Navez M, Lucas C, Dubois F, Sol JC, Paquis P, Lemaire JJ. 2010. Anatomical location of effective deep brain stimulation electrodes in chronic cluster headache. *Brain* 133(Pt 4):1214-23.
- Franco AC, Prado WA. 1996. Antinociceptive effects of stimulation of discrete sites in the rat hypothalamus: evidence for the participation of the lateral hypothalamus area in descending pain suppression mechanisms. *Braz J Med Biol Res* 29(11):1531-41.
- Gura EV. 2000. Vasopressin-Mediated Modulation of Trigeminal Reflexes in Rats. *Neurophysiology* 32(6):371-5.
- Hamba M, Hisamitsu H, Muro M. 1990. Nociceptive projection from tooth pulp to the lateral hypothalamus in rats. *Brain Res Bull* 25(3):355-64.
- Holland PR, Akerman S, Goadsby PJ. 2006. Modulation of nociceptive dural input to the trigeminal nucleus caudalis via activation of the orexin 1 receptor in the rat. *Eur J Neurosci* 24(10):2825-33.
- Holle D, Katsarava Z, Obermann M. 2011. The hypothalamus: specific or nonspecific role in the pathophysiology of trigeminal autonomic cephalalgias? *Curr Pain Headache Rep* 15(2):101-7.
- Holstege JC, Van Dijken H, Buijs RM, Goecknecht H, Gosens T, Bongers CM. 1996. Distribution of dopamine immunoreactivity in the rat, cat and monkey spinal cord. *J Comp Neurol* 376(4):631-52.
- Hosoya Y. 1980. The distribution of spinal projection neurons in the hypothalamus of the rat, studied with the HRP method. *Exp Brain Res* 40(1):79-87.

- Hosoya Y, Matsushita M. 1979. Identification and distribution of the spinal and hypophyseal projection neurons in the paraventricular nucleus of the rat. A light and electron microscopic study with the horseradish peroxidase method. *Exp Brain Res* 35(2):315-31.
- Hosoya Y, Matsushita M. 1981. Brainstem projections from the lateral hypothalamic area in the rat, as studied with autoradiography. *Neurosci Lett* 24(2):111-6.
- Hu JW. 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(3):331-45.
- Iwata K, Kenshalo DR, Jr., Dubner R, Nahin RL. 1992. Diencephalic projections from the superficial and deep laminae of the medullary dorsal horn in the rat. *J Comp Neurol* 321(3):404-20.
- Johnson RF, Morin LP, Moore RY. 1988. Retinohypothalamic projections in the hamster and rat demonstrated using cholera toxin. *Brain Res* 462(2):301-12.
- Lapirot O, Melin C, Modolo A, Nicolas C, Messaoudi Y, Monconduit L, Artola A, Luccarini P, Dallel R. 2011. Tonic and phasic descending dopaminergic controls of nociceptive transmission in the medullary dorsal horn. *Pain* 152(8):1821-31.
- Leone M, Franzini A, Bussone G. 2001. Stereotactic stimulation of posterior hypothalamic gray matter in a patient with intractable cluster headache. *N Engl J Med* 345(19):1428-9.
- Levine JD, Weiss ML, Rosenwasser AM, Miselis RR. 1991. Retinohypothalamic tract in the female albino rat: a study using horseradish peroxidase conjugated to cholera toxin. *J Comp Neurol* 306(2):344-60.
- Li JL, Kaneko T, Shigemoto R, Mizuno N. 1997. Distribution of trigeminohypothalamic and spinohypothalamic tract neurons displaying substance P receptor-like immunoreactivity in the rat. *J Comp Neurol* 378(4):508-21.

- Malick A, Burstein R. 1998. Cells of origin of the trigeminohypothalamic tract in the rat. *J Comp Neurol* 400(1):125-44.
- Malick A, Jakubowski M, Elmquist JK, Saper CB, Burstein R. 2001. A neurohistochemical blueprint for pain-induced loss of appetite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(17):9930-5.
- Malick A, Strassman RM, Burstein R. 2000. Trigeminothalamic and reticulohypothalamic tract neurons in the upper cervical spinal cord and caudal medulla of the rat. *J Neurophysiol* 84(4):2078-112.
- Matsumoto N, Kawarada K, Kamata K, Suzuki TA. 1993. Electrical stimulation of tooth pulp increases the expression of c-fos in the cat supraoptic nucleus but not in the paraventricular nucleus. *Life Sci* 53(15):1235-41.
- May A, Bahra A, Buchel C, Frackowiak RS, Goadsby PJ. 1998. Hypothalamic activation in cluster headache attacks. *Lancet* 352(9124):275-8.
- Mazucca M, Minlebaev M, Shakirzyanova A, Tyzio R, Taccola G, Janackova S, Gataullina S, Ben Ari Y, Giniatullin R, Khaizipov R. 2011. Newborn Analgesia Mediated by Oxytocin during Delivery. *Front Cell Neurosci* 5:3.
- Meng ID, Hu JW, Benetti AP, Bereiter DA. 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. *J Neurophysiol* 77(1):43-56.
- Millan MJ. 2002. Descending control of pain. *Prog Neurobiol* 66(6):355-474.
- Miranda-Cardenas Y, Rojas-Piloni G, Martinez-Lorenzana G, Rodriguez-Jimenez J, Lopez-Hidalgo M, Freund-Mercier MJ, Condes-Lara M. 2006. Oxytocin and electrical stimulation of the paraventricular hypothalamic nucleus produce antinociceptive effects that are reversed by an oxytocin antagonist. *Pain* 122(1-2):182-9.

- Mogil JS, Sorge RE, LaCroix-Fralish ML, Smith SB, Fortin A, Sotocinal SG, Ritchie J, Austin JS, Schorscher-Petcu A, Melmed K, Czereminski J, Bittong RA, Mokris JB, Neubert JK, Campbell CM, Edwards RR, Campbell JN, Crawley JN, Lariviere WR, Wallace MR, Sternberg WF, Balaban CD, Belfer I, Fillingim RB. 2011. Pain sensitivity and vasopressin analgesia are mediated by a gene-sex-environment interaction. *Nat Neurosci* 14(12):1569-73.
- Molander C, Xu Q, Rivero-Melian C, Grant G. 1989. Cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the rat: II. The cervical and upper thoracic cord. *J Comp Neurol* 289(3):375-85.
- Morin LP, Goodless-Sanchez N, Smale L, Moore RY. 1994. Projections of the suprachiasmatic nuclei, subparaventricular zone and retrochiasmatic area in the golden hamster. *Neuroscience* 61(2):391-410.
- Morita N, Tamai Y, Tsujimoto T. 1977. Unit responses activated by tooth pulp stimulation in lateral hypothalamic area of rat. *Brain Res* 134(1):158-60.
- Newman HM, Stevens RT, Apkarian AV. 1996. Direct spinal projections to limbic and striatal areas: anterograde transport studies from the upper cervical spinal cord and the cervical enlargement in squirrel monkey and rat. *J Comp Neurol* 365(4):640-58.
- Nilaver G, Zimmerman EA, Wilkins J, Michaels J, Hoffman D, Silverman AJ. 1980. Magnocellular hypothalamic projections to the lower brain stem and spinal cord of the rat. Immunocytochemical evidence for predominance of the oxytocin-neurophysin system compared to the vasopressin-neurophysin system. *Neuroendocrinology* 30(3):150-8.
- Nylen A, Skagerberg G, Alm P, Larsson B, Holmqvist B, Andersson KE. 2001. Nitric oxide synthase in the hypothalamic paraventricular nucleus of the female rat; organization of spinal projections and coexistence with oxytocin or vasopressin. *Brain Res* 908(1):10-24.

- Ondo WG, He Y, Rajas ekaran S, Le WD. 2000. Clinical correlates of 6-hydroxydopamine injections into A11 dopaminergic neurons in rats: a possible model for restless legs syndrome. *Mov Disord* 15(1):154-8.
- Pappas SS, Tiernan CT, Behrouz B, Jordan CL, Breedlove SM, Goudreau JL, Lookingland KJ. 2010. Neonatal androgen-dependent sex differences in lumbar spinal cord dopamine concentrations and the number of A11 diencephalospinal dopamine neurons. *J Comp Neurol* 518(13):2423-36.
- Pasquier DA, Tramezzani JH. 1979. Afferent connections of the hypothalamic retrochiasmatic area in the rat. *Brain Res Bull* 4(6):765-71.
- Paxinos G, Watson CW. 2007. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 6th Edition. San Diego: Academic Press.
- Peterlin BL, Rapoport AM, Kurth T. 2010. Migraine and obesity: epidemiology, mechanisms, and implications. *Headache* 50(4):631-48.
- Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, De Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, Kilduff TS. 1998. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci* 18(23):9996-10015.
- Pinto-Ribeiro F, Ansah OB, Almeida A, Pertovaara A. 2008. Influence of arthritis on descending modulation of nociception from the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Brain Res* 1197:63-75.
- Portillo F, Carrasco M, Vallo JJ. 1998. Separate populations of neurons within the paraventricular hypothalamic nucleus of the rat project to vagal and thoracic autonomic preganglionic levels and express c-Fos protein induced by lithium chloride. *J Chem Neuroanat* 14(2):95-102.
- Qu S, Ondo WG, Zhang X, Xie WJ, Pan TH, Le WD. 2006. Projections of diencephalic dopamine neurons into the spinal cord in mice. *Exp Brain Res* 168(1-2):152-6.

- Raboisson P, Dallel R, Clavelou P, Sessle BJ, Woda A. 1995. Effects of subcutaneous formalin on the activity of trigeminal brain stem nociceptive neurones in the rat. *J Neurophysiol* 73(2):496-505.
- Rainero I, Rubino E, Gallone S, Fenoglio P, Picci LR, Giobbe L, Ostacoli L, Pinessi L. 2011. Evidence for an association between migraine and the hypocretin receptor 1 gene. *J Headache Pain* 12(2):193-9.
- Rudomin P, Malliani A, Borlone M, Zanchetti A. 1965. Distribution of electrical responses to somatic stimuli in the diencephalon of the cat with special reference to the hypothalamus. *Arch Ital Biol* 103:60-89.
- Sakurai T, Mieda M. 2011. Connectomics of orexin-producing neurons: interface of systems of emotion, energy homeostasis and arousal. *Trends Pharmacol Sci* 32(8):451-62.
- Saper CB. 2012. Hypothalamus. *The Human Nervous System*. Elsevier; p 549-72.
- Saper CB, Loewy AD, Swanson LW, Cowan WM. 1976. Direct hypothalamo-autonomic connections. *Brain Res* 117(2):305-12.
- Sawchenko PE, Swanson LW. 1982. Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat. *J Comp Neurol* 205(3):260-72.
- Schoenen J, Di Clemente L, Vandenhede M, Fumal A, De P, V, Mouchamps M, Remacle JM, de Noordhout AM. 2005. Hypothalamic stimulation in chronic cluster headache: a pilot study of efficacy and mode of action. *Brain* 128(Pt 4):940-7.
- Shafton AD, Ryan A, Badoer E. 1998. Neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus send collaterals to the spinal cord and to the rostral ventrolateral medulla in the rat. *Brain Res* 801(1-2):239-43.
- Shigenaga Y, Matano S, Okada K, Sakai A. 1973. The effects of tooth pulp stimulation in the thalamus and hypothalamus of the rat. *Brain Res* 63:402-7.

- Skagerberg G, Bjorklund A, Lindvall O, Schmidt RH. 1982. Origin and termination of the diencephalo-spinal dopamine system in the rat. *Brain Res Bull* 9(1-6):237-44.
- Skagerberg G, Lindvall O. 1985. Organization of diencephalic dopamine neurones projecting to the spinal cord in the rat. *Brain Res* 342(2):340-51.
- Stephan FK, Berkley KJ, Moss RL. 1981. Efferent connections of the rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* 6(12):2625-41.
- Strassman AM, Vos BP. 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. *J Comp Neurol* 331(4):495-516.
- Swanson LW, Kuypers HG. 1980a. A direct projection from the ventro medial nucleus and retrochiasmatic area of the hypothalamus to the medulla and spinal cord of the rat. *Neurosci Lett* 17(3):307-12.
- Swanson LW, Kuypers HG. 1980b. The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. *J Comp Neurol* 194(3):555-70.
- Swanson LW, Sanchez-Watts G, Watts AG. 2005. Comparison of melanin-concentrating hormone and hypocretin/orexin mRNA expression patterns in a new parceling scheme of the lateral hypothalamic zone. *Neurosci Lett* 387(2):80-4.
- Swanson LW, Sawchenko PE. 1983. Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annu Rev Neurosci* 6:269-324.
- Taniguchi W, Nakatsuka T, Miyazaki N, Yamada H, Takada D, Fujita T, Kumamoto E, Yoshida M. 2011. In vivo patch-clamp analysis of dopaminergic antinociceptive actions on substantia gelatinosa neurons in the spinal cord. *Pain* 152(1):95-105.

- Ter Horst GJ, Meijler WJ, Korf J, Kemper RH. 2001. Trigeminal nociception-induced cerebral Fos expression in the conscious rat. *Cephalalgia* 21(10):963-75.
- Truesdell LS, Bodnar RJ. 1987. Reduction in cold-water swim analgesia following hypothalamic paraventricular nucleus lesions. *Physiol Behav* 39(6):727-31.
- van den Pol AN. 1999. Hypothalamic hypocretin (orexin): robust innervation of the spinal cord. *J Neurosci* 19(8):3171-82.
- Wagner CK, Sisk CL, Clemens LG. 1993. Neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the sexually dimorphic lower lumbar spinal cord concentrate 3H-estradiol in the male rat. *J Neuroendocrinol* 5(5):545-51.
- Wang QA, Mao LM, Han JS. 1990. Analgesia from electrical stimulation of the hypothalamic arcuate nucleus in pentobarbital-anesthetized rats. *Brain Res* 526(2):221-7.
- Watts AG, Swanson LW. 1987. Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: II. Studies using retrograde transport of fluorescent dyes and simultaneous peptide immunohistochemistry in the rat. *J Comp Neurol* 258(2):230-52.
- Wei H, Viisanen H, Pertovaara A. 2009. Descending modulation of neuropathic hypersensitivity by dopamine D2 receptors in or adjacent to the hypothalamic A11 cell group. *Pharmacol Res* 59(5):355-63.
- Yang J, Chen JM, Song CY, Liu WY, Wang G, Wang CH, Lin BC. 2006. Through the central V2, not V1 receptors influencing the endogenous opiate peptide system, arginine vasopressin, not oxytocin in the hypothalamic paraventricular nucleus involves in the antinociception in the rat. *Brain Res* 1069(1):127-38.
- Yirmiya R, Ben Eliahu S, Shavit Y, Marek P, Liebeskind JC. 1990. Stimulation of the hypothalamic paraventricular nucleus produces analgesia not mediated by vasopressin or endogenous opioids. *Brain Res* 537(1-2):169-74.

Yoshida A, Dostrovsky JO, Sessle BJ, Chiang CY. 1991. Trigeminal projections to the nucleus submedius of the thalamus in the rat. *J Comp Neurol* 307(4):609-25.

Zubrzycka M, Janecka A. 2005. Effects of centrally administered vasopressin on orofacial pain perception in rats. *Brain Res* 1051(1-2):112-6.

Zubrzycka M, Janecka A. 2008. Interactions of galanin with endomorphin-2, vasopressin and oxytocin in nociceptive modulation of the trigemino-hypoglossal reflex in rats. *Physiol Res* 57(5):769-76.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Localization of Fluorogold (FG) injection sites within MDH. A: Digitized photomicrographs of bulbo-cervical coronal sections showing examples of FG injection sites into the mandibular (V3), maxillary (V2) and ophthalmic (V1) areas of MDH; Scale Bar = 300 μ m. B: Schematic representation illustrating the rostro-caudal distribution of all FG injection sites (n = 21), from -1.2 to -2.4 mm relative to the most caudal tip of the subnucleus interpolaris/MDH transition region and their ventro-dorsal extent within the medullary dorsal horn (MDH).

Figure 2. Rostrocaudal distribution of retrogradely FG-labeled cells in the hypothalamus following FG injections in MDH. A-E: Bar histograms of the number of FG neurons (mean \pm SEM; n = 21) at the ipsilateral (filled bars) and contralateral (empty bars) side on coronal sections plotted as a function of the posterior distance (mm posterior to bregma) within the five hypothalamic nuclei: RCA: retrochiasmatic area (A), PVN: paraventricular nucleus (B), LH: lateral hypothalamus area (C), PFX: perifornical area (D) and A11 (E). Abscissa in black are for the maximum rostrocaudal extent (mm posterior to bregma) of each hypothalamic nucleus: RCA (-1.6 to -1.8 mm), PVN (-0.9 to -2.1 mm), LH (-1.6 to 4.8 mm), PFX (-2.8 to -3.6 mm) and A11 (-3.3 to -4.8 mm). A-E right: Pie charts of the bilateral distribution of FG neurons in each hypothalamic nuclei.

Figure 3. Rostrocaudal distribution of retrogradely FG-labeled neurons in the hypothalamus after a large FG injection into the MDH. A: Semi-schematic drawings of coronal sections at different levels, from -1.8 to -4.5 mm posterior to bregma. Retrogradely FG-labeled neurons in the hypothalamus and adjacent areas are indicated by red dots. B: A representative injection

site of FG in MDH. PVN: paraventricular nucleus, RCA: re trochiasmatic area, LH: lateral hypothalamus area, PFX: perifornical area. Scale bar 300 μ m.

Figure 4. Examples of retrogradely FG-labeled neurons in the PVN, RCA, LH, PFX and A11 hypothalamic nuclei following a large FG injection into the MDH. A-D: Representative photomicrographs of coronal sections showing retrogradely FG-labeled neurons in the RCA (A), PVN (B), LH and PFX (C) and A11 (D) following a large FG microinjection into the MDH (the same as Figure 3). These photomicrographs show clearly that FG-labeled neurons are present on both ipsilateral (on the right in A, B C, and D) and contralateral sides (on the left in A, B C', and D). 3V: third Ventricle, mt: mammillothalamic tract, fx: fornix, Fr: Fasciculus retroflexus. Scale bar 50 μ m.

Figure 5. Example of retrogradely FG-labeled neurons in the ipsilateral PVN following a large FG microinjection into the MDH. A-D: Representative photomicrographs of coronal sections showing the retrogradely labeled neurons (left) and the corresponding cresyl violet stainings (right) through the parvo- and magnocellular PVN at -1.6 (A), -1.8 (B), -1.9 (C) and -2.1 mm (D) posterior to bregma following large FG microinjection into the MDH (the same as F igure 3). pv: periventricular part; am: anterior magnocellular part; ap: anterior parvocellular part; lp: lateral parvocellular part; pm: posterior magnocellular part, mp: medial parvocellular part; dp: dorsal parvocellular part of PVN. Scale bar: 50 μ m

Figure 6. Distribution of FG neurons in the hypothalamus as a function of the injection site in MDH. Bar histo gram of the number of FG neurons (mean number of neurons per section \pm SEM; n = 15) in the five hypothalamic nuclei (PVN, LH, PFX, A11 and RCA) as a function of

the localization of the MDH injection site: mandibular (V3), maxillary (V2) and ophthalmic (V1) areas.

ABBREVIATIONS

3V: third Ventricle

am: anterior magnocellular part

ap: anterior parvocellular part

dp: dorsal parvocellular part

FG: Fluorogold

Fr: Fasciculus retroflexus

fx: fornix

LH: lateral hypothalamus area

lp: lateral parvocellular part of PVN

MDH: medullary dorsal horn

mp: medial parvocellular part of PVN

mt: mammillothalamic tract

PFX: perifornical area

pm: posterior magnocellular part of PVN

pv: periventricular part

PVN: paraventricular nucleus

RCA: retrochiasmatic area

V1: ophthalmic branch

V2: maxillary branch

V3: mandibular branch

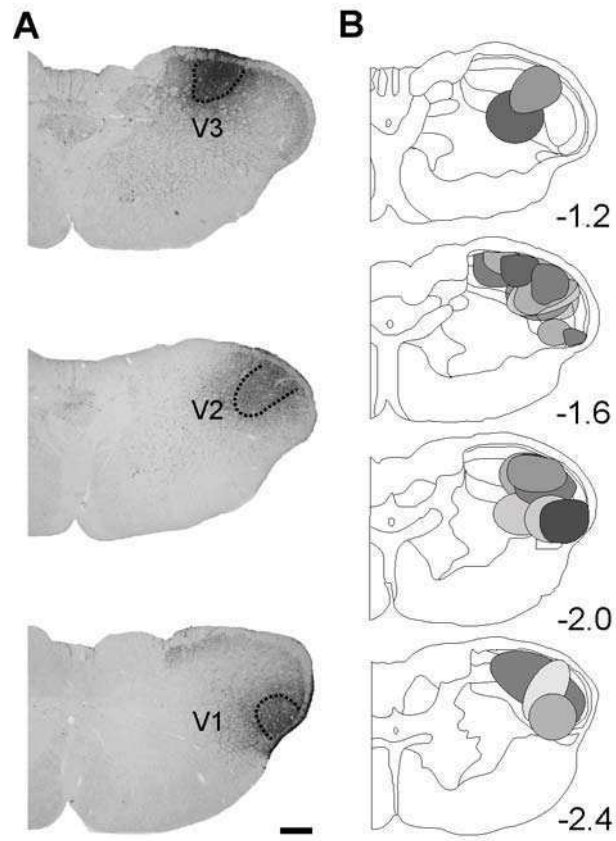


Figure 1

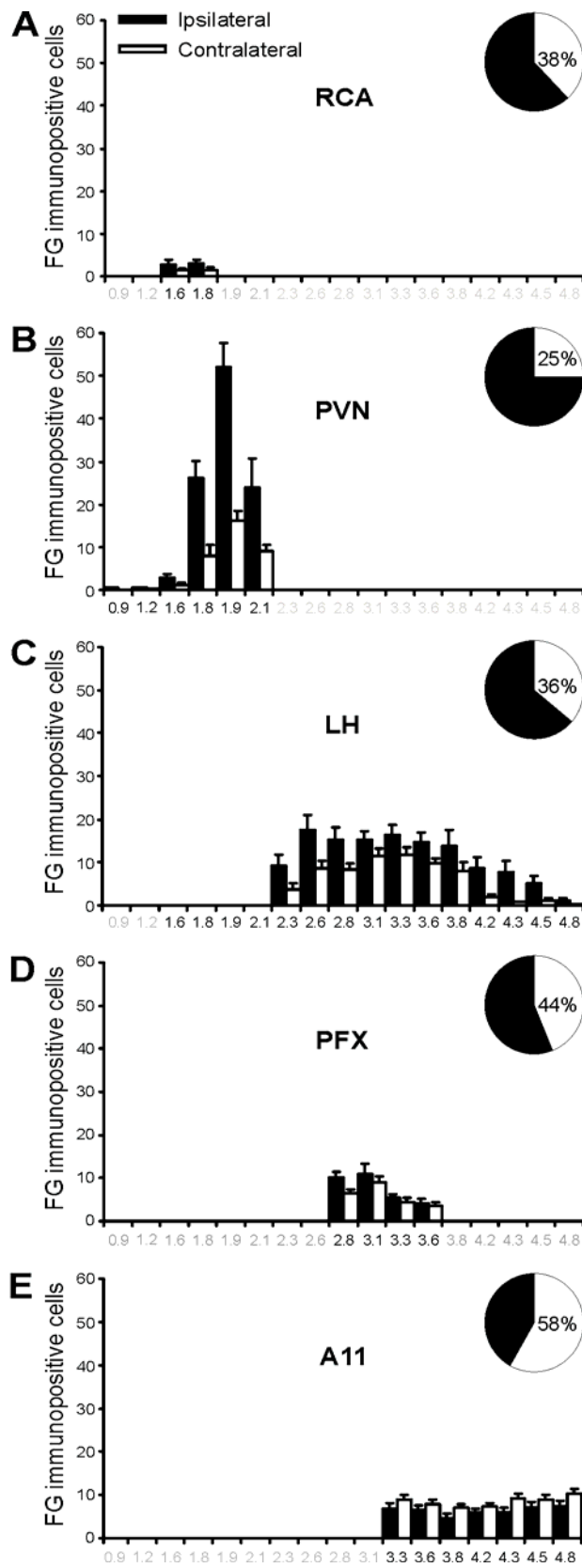


Figure 2

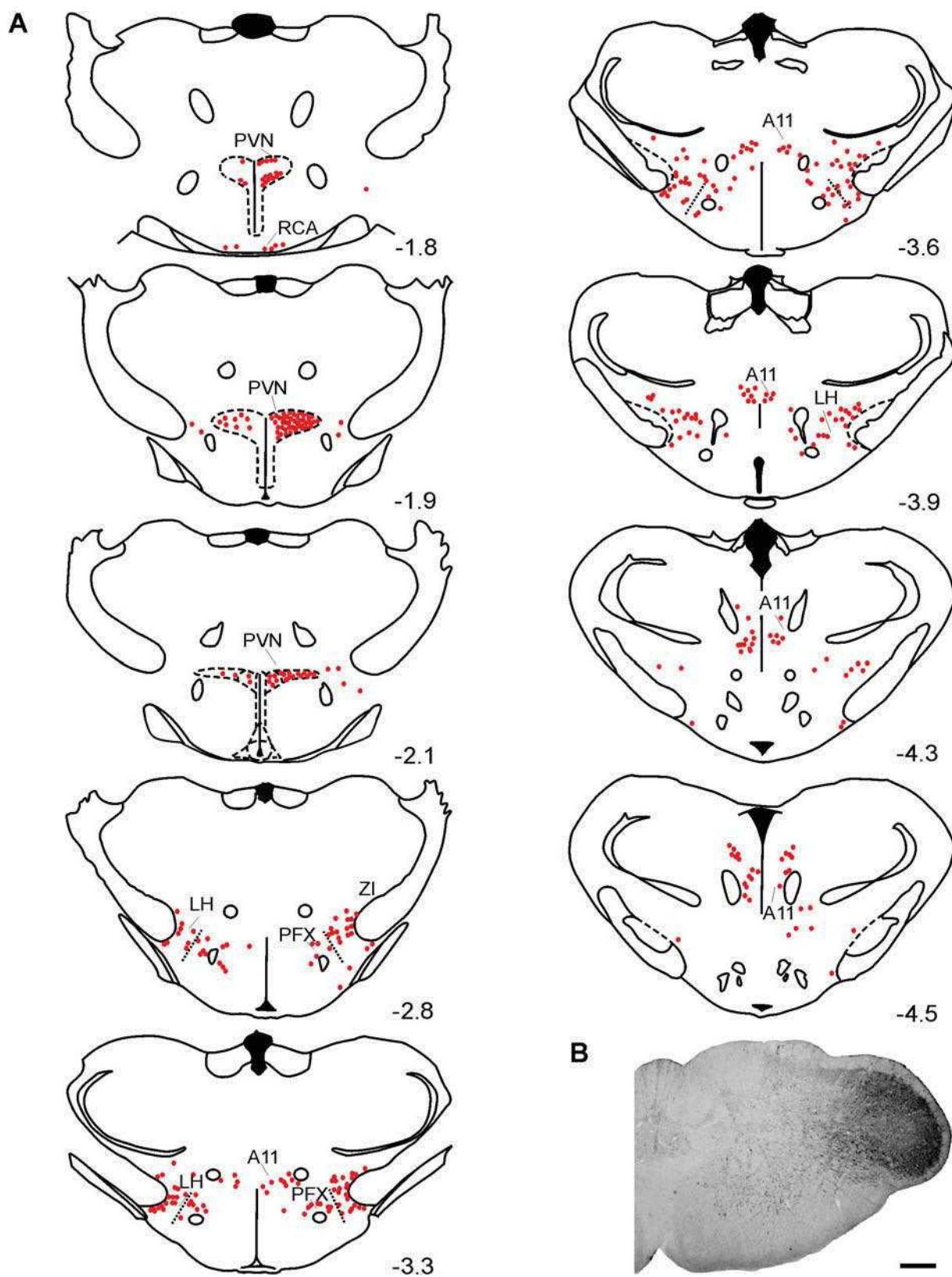


Figure 3

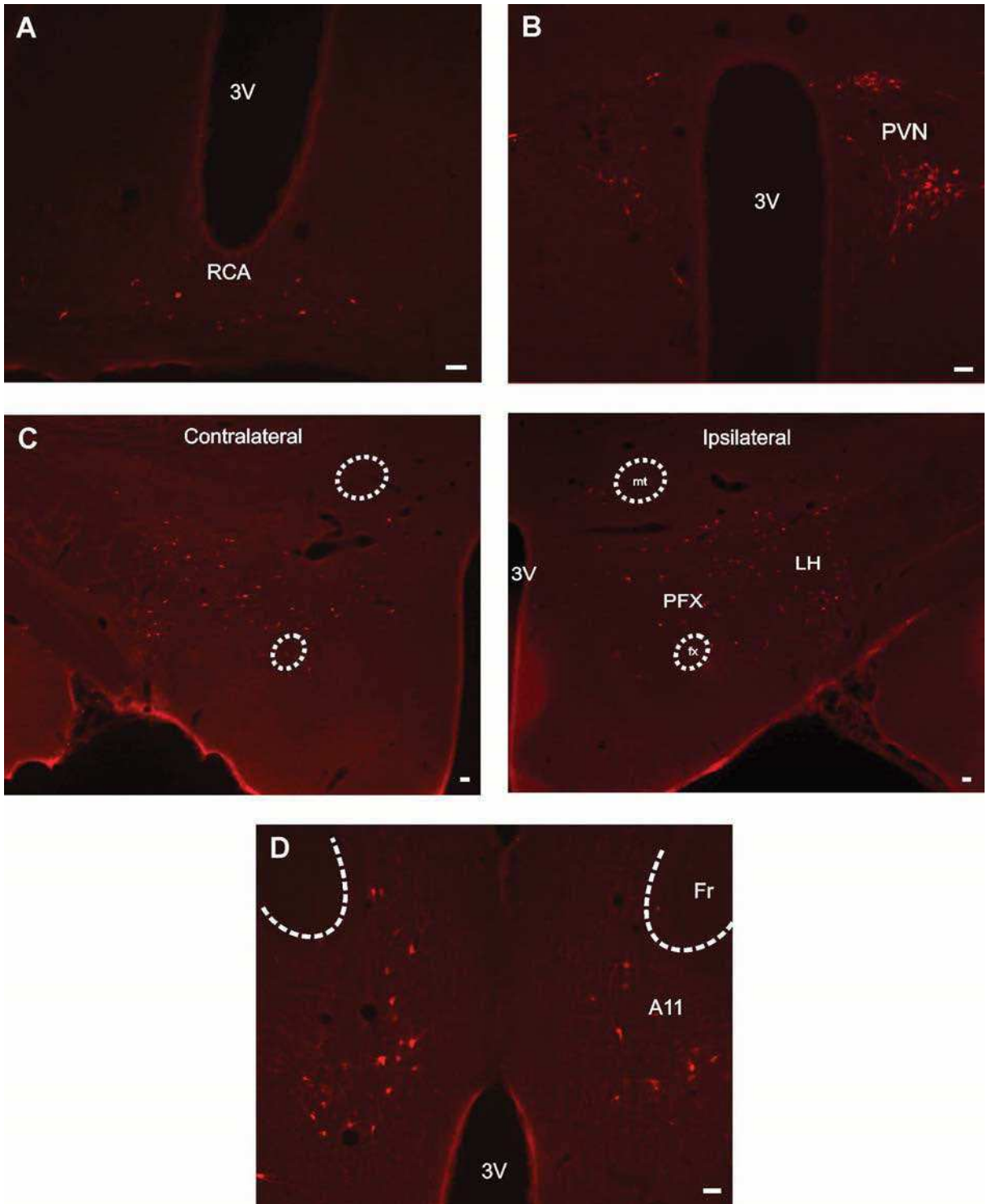


Figure 4

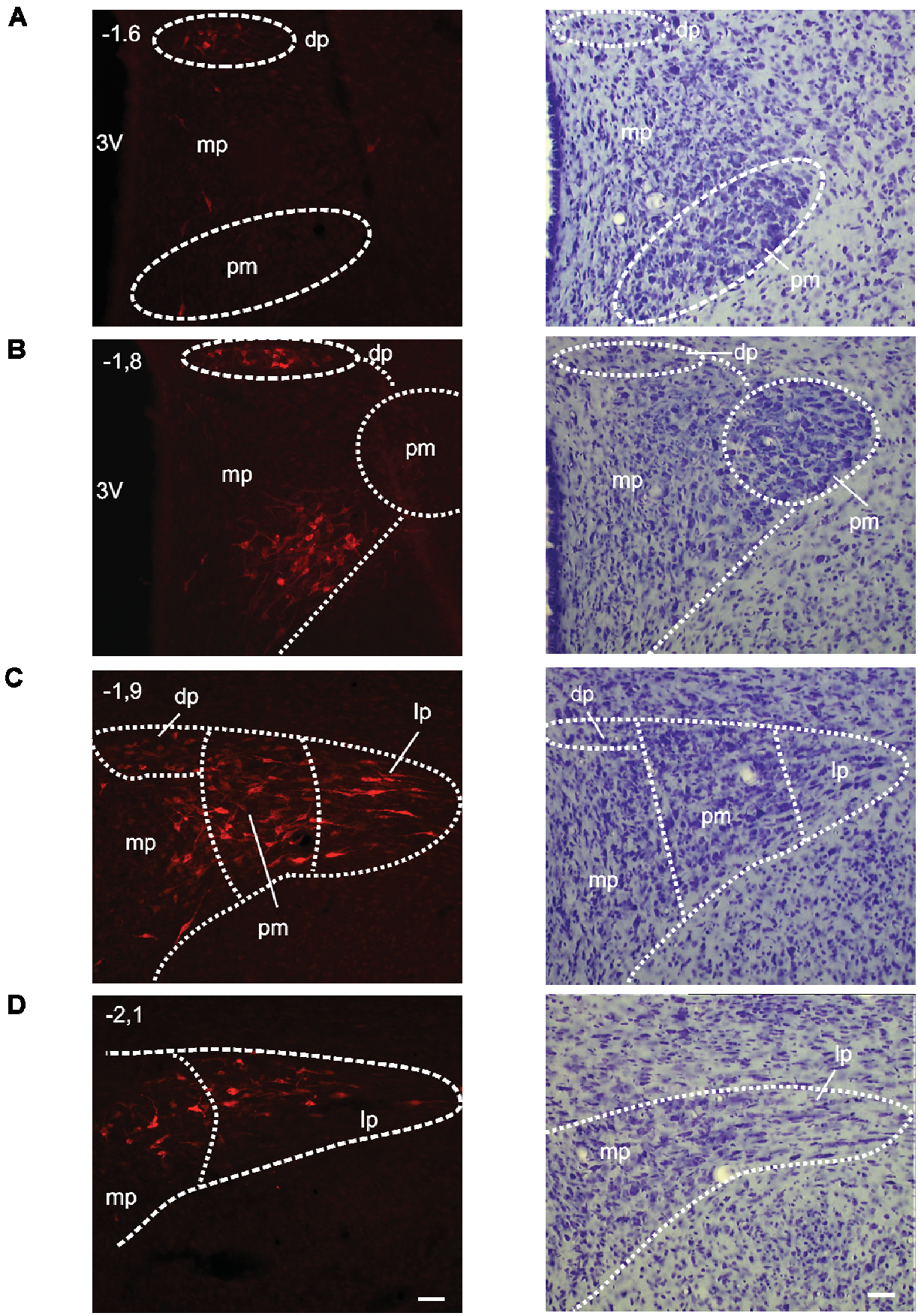


Figure 5

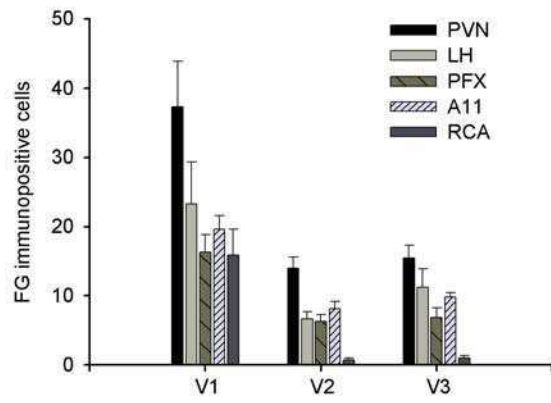


Figure 6

Table 1. Distribution of retrogradely fluorogold labelled neurons within the different subnuclei of parvo- and magnocellular PVN following fluorogold injections into the MDH. (mean: average number of fluorogold labelled neurons per section), ns: non significant.

PVN subdivisions	Ipsilateral (mean \pm SEM, n = 21)	Contralateral (mean \pm SEM, n = 21)	P values
Anterior parvocellular part	0.5 \pm 0.2	0.1 \pm 0.1	ns
Medial parvocellular part	13.8 \pm 1.9	4.5 \pm 0.9	P<0.001
Dorsal parvocellular part	4.8 \pm 1.0	1.5 \pm 0.5	P<0.01
Lateral parvocellular part	11.7 \pm 2.0	3.4 \pm 0.6	P<0.001
Periventricular part	0.1 \pm 0.1	0.2 \pm 0.2	ns
Anterior magnocellular part	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	ns
Medial magnocellular part	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	ns
Posterior magnocellular part	10.7 \pm 1.6	3.7 \pm 0.6	P<0.001

Chapitre 2 : Organisation du contrôle descendant dopaminergique

**DESCENDING DOPAMINE TRIGEMINAL PAIN CONTROLS FROM THE A11
HYPOTHALAMIC NUCLEUS**

Khaled Abdallah, Lénaïc Monconduit, Alain Artola, Philippe Luccarini*, Radhouane Dallel

Inserm/UdA U1107, Neuro-Dol: Trigeminal Pain and Mi graine, Université d’Auvergne,
Faculté de Chiru rgie Dentaire, 11 Boulevard Charles d e Gaulle, Clermont-Ferrand, 63000,
France. * IUT Génie Biologique, Ensemble Universitaire des Cézeaux, Aubière, 63172, France

Corresponding authors: Radhouane DALLEL, Philippe LUCCARINI

Inserm/UdA U1107, Neuro-Dol: Trigeminal Pain and Migraine, Faculté de Chirurgie Dentaire,
11 Boulevard Charles de Gaulle, Clermont-Ferrand, 63000, France.

E-mail : radhouane.dallel@udamail.fr

Grant Information: Institut National de la Santé et de la Re cherche Médicale (INSERM),
Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche, Université d’Auvergne-Clermont-
Ferrand and Région Auvergne.

ABSTRACT

Descending pain-modulatory systems, either inhibitory or facilitatory, play a critical role in both acute and chronic pain. Compared with serotonin and norepinephrine, little is known about the function of dopamine (DA). In this study, we characterized the neuroanatomical organization of descending DA pathways from hypothalamic A11 nuclei to the medullary dorsal horn (MDH) and investigated their role in trigeminal pain. Tyrosine hydroxylase (TH) and alpha-calcitonin gene related peptide (CGRP) double-immunolabelling reveals that, though there are TH- and CGRP- double-immunoreactive neurons, TH- and CGRP-immunolabellings are mostly contained in different neurons. There is two times more TH- than CGRP-immunoreactive cells and these two types of neurons exhibit different distribution patterns, indicating that the A11 nucleus is somehow heterogenous. Using the retrograde tracer Fluorogold (FG), we show that descending A11 inputs to the MDH originate mainly from TH-immunoreactive neurons and are bilateral. Nociceptive facial stimulation by unilateral subcutaneous (s.c.) injection of formalin elevates Fos-immunoreactivity in both ipsi- and contralateral A11 nuclei. Surprisingly, though, Fos-immunoreactive neurons are neither TH-immunoreactive nor projecting neurons. Finally, selectively lesioning A11 neurons, by locally injecting kainic acid or 6-OHDA, inhibits trigeminal pain behavior. These results confirm that the A11 nucleus is involved in pain processing. However, they suggest that activation of A11 nuclei should produce a state of hyperalgesia. But the effects of local administration of DA or acute manipulations of A11 nuclei lead to the very opposite conclusion. It is proposed that long-lasting dysfunction of descending A11 DA projections enables plasticity changes in the DH neuronal network.

INTRODUCTION

The transfer of nociceptive information at the level of dorsal horn (DH) is subject to extensive processing by both local segmental and supraspinal mechanisms (for review see Millan, 2002). In this regard, a network of descending pathways projecting from cerebral structures to DH act to modulate the passage of nociceptive messages to the brain. While descending noradrenergic and serotonergic controls have been the object of intense investigation, the actions of descending dopaminergic (DA) controls on spinal and medullary dorsal horns (spinal DH and MDH, respectively) are less well defined (see Millan, 2002). These descending DA controls of sensory afferents appear to be particularly important since DA dysfunction has been objectively demonstrated in painful clinical conditions including chronic cephalic pain, fibromyalgia and restless legs syndrome (for review see Wood, 2008).

Locally applied DA consistently depresses the responses of deep DH neurons to afferent stimulation (Fleetwood-Walker et al., 1988; Garraway and Hochman, 2001; Bergerot et al., 2007). Interestingly, only responses to noxious stimuli are inhibited, those to innocuous stimulation being unaffected (Fleetwood-Walker et al., 1988). DA acts through five distinct G protein-coupled receptors (D1-D5) belonging to two families, D1-like (D1 and D5) and D2-like (D2, D3 and D4) receptors. Although, all DA receptors are present in the spinal cord (Zhao et al., 2007; Bergerot et al., 2007; Zhu et al., 2007; Charbit et al., 2009), the D2 receptor is the most prominent DA receptor subtype in the spinal DH and MDH (Zhu et al., 2007; Chen et al., 1991), and mediates the antinociceptive action of DA (Fleetwood-Walker et al., 1988).

In the mammalian spinal cord, descending DA projections arise predominantly from the ipsilateral A11 cell group in the dorsoposterior hypothalamus (Hökfelt et al., 1979; Skagerberg and Lindvall, 1985). However, stimulation, on the one hand, and acute lesion, on the other

hand, in the A11 area do not provide exactly opposite effects. Whereas local electrical or pharmacological stimulation in the region of the A11 nucleus selectively inhibits the responses of DH neurons to noxious stimulations, via activation of D2 receptors at the level of DH (Fleetwood-Walker et al., 1988; Charbit et al., 2009), electrical lesion of the A11 nucleus facilitates the responses of neurons in the trigeminocervical complex to both noxious and innocuous mechanical stimuli (Charbit et al., 2009). It is worth noting that, then, many non DA neurons and/or projections are removed in addition to DA ones. Therefore, the actual role of descending DA projections from the A11 nucleus on pain transmission remains ill-defined.

Therefore, using behavioral and anatomical techniques, we have addressed the two questions: (1) What is the functional organization of descending DA projections from the hypothalamic A11 nucleus to MDH? (2) How do descending DA projections modulate trigeminal pain?

MATERIALS AND METHODS

Adult male Sprague Dawley rats were obtained from Charles River laboratories (France) and maintained in a light- and temperature controlled environment (lights on 19.00–7.00 h, 22°C) with food and water *ad libitum*. All efforts were made to minimize the number of animals used. The experiments followed the ethical guidelines of the International Association for the Study of Pain and ethical guidelines of the directive 2010/63/UE of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes. Protocols applied in this study have been authorized by the local Ethics Committee in Animal Experiment, CEMEA Auvergne (n° CE 28-12 and CE 30-12).

Fluorogold (FG) injection

Animals (250-300 g) were anesthetized with intraperitoneal (i.p.) chloral hydrate (400 mg/kg body weight) and placed in a stereotaxic frame. After surgical removing of the atlanto-occipital membrane, glass micropipettes (30–40 μm diameter tips) filled with a 2% solution of FG (hydroxystilbamidine, Molecular Probes, Reference H22845), diluted in 0.1 M cacodylic acid were inserted into the right MDH (AP –5.3 mm from the interaural line, ML 2.7 mm, P 1.5 mm) according to Paxinos and Watson (2007) with an angle of 80° to the horizontal plane. Once the micropipette was in place, 30-s pulses of positive current (5 μA) were applied at 1 Hz for 15–20 min. The microelectrode was left *in situ* for a further 5 min before withdrawal from the brain. A single injection into the MDH was performed in each animal.

Following one-week postoperative survival period, animals were deeply anaesthetized with urethane (1.5 g/kg, i.p) and perfused transcardially over a 15-min period with warm (37 °C) heparinized saline (25 IU heparin/mL) followed by cold (10 °C) phosphate-buffered solution (0.1 M, pH 7.6) containing 4% paraformaldehyde and 0.03% picric acid. The brain and first cervical segment (C1) were removed and then cryoprotected in a buffered 30% sucrose solution containing paraformaldehyde-picric acid solution and left overnight. Coronal sections were cut on a freezing microtome (40 μm thick) and collected in a 0.05 M Tris-buffered saline (TBS). A set of MDH sections was mounted on gelatin-coated slides and viewed using a fluorescent microscope (Zeiss Axioplan 2 Imaging microscope; FG: excitation 365/10 nm, dichroic mirror 400 nm and barrier filter 520 \pm 560 nm) in order to localize the injection sites. Only diencephalic sections of animals in which injection site was exclusively located within the MDH were processed further.

Immunohistochemistry

FG injection site immunohistochemistry

Free-floating brainstem sections were placed in 1% normal horse serum for 30 min before incubation in a rabbit polyclonal antibody directed against FG (1:20000, Millipore, Reference AB153) overnight at room temperature. Sections were then washed in TBS and placed in biotinylated horse anti-rabbit followed by avidin–biotin–peroxidase complex (Immpress, Abcys Vector, 30 min at room temperature). FG immunoreactivity was visualized in sections using 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (kit Vector Peroxydase substrate DAB).

Alpha-calcitonin gene related peptide (α -CGRP), tyrosine hydroxylase (TH) and FG immunofluorescence

Once A11 coronal sections had free-floated in 1% normal goat serum for 1 h, immunofluorescence staining reaction was carried out with a polyclonal rabbit antibody against FG (1:20000, Millipore, Reference AB153) and a monoclonal mouse antibody against TH (1:6000, Millipore, Reference AB152) or α -CGRP (1:1000, Abcam, Reference ab10987); overnight at room temperature. Immunoreactivity was revealed using Cy3 conjugated goat anti-rabbit (1:200, Jackson ImmunoResearch) and Cy2 (1:200, Jackson ImmunoResearch) conjugated goat anti-mouse secondary antibodies for 2 h at room temperature.

Immunofluorescence staining reaction was carried out with a polyclonal rabbit antibody against α -CGRP (1:1000, Abcam, Reference ab47027) and a monoclonal mouse antibody against TH (1:6000, Millipore, Reference AB152). Immunoreactivity was revealed using Cy3 conjugated goat anti-rabbit (1:200, Jackson ImmunoResearch) and Cy2 (1:200, Jackson ImmunoResearch) conjugated goat anti-mouse secondary antibodies for 2 h at room temperature. After incubation, sections were mounted onto gelatin-coated slides and left to dry in dark environment. Sections were then dehydrated in alcohol, cleared in xylene and coverslipped with DPX.

Fos, TH and FG immunohistochemistry

Rats were s.c. injected with formalin (50 μ l, 1.5%) or saline into the upper lip. Two hours later, rats were deeply anaesthetized, perfused transcardially and brains removed (see above). After A11 coronal sections had free-floated in 1% normal horse serum for 30 min, immunohistochemistry reaction was carried out with a polyclonal rabbit antibody against c-fos (1:3000, Santa Cruz, Reference SC-52; overnight at room temperature) using biotinylated horse anti-rabbit followed by avidin–biotin–peroxidase complex (Immpress, Abcys, Vector; 30 min at room temperature). Fos immunoreactivity was visualized in sections using 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) coupled to nickel (Kit Vector peroxidase substrate DAB). Sections were washed with TBS and incubated with a mouse monoclonal antibody against TH (1:6000, Millipore, Reference AB153) overnight at room temperature. Sections were then treated with biotinylated horse anti-mouse followed by Avidin-biotin-peroxydase complex. TH immunoreactivity was revealed using DAB.

After Fos expression was revealed using DAB coupled to nickel (see protocol above), sections were incubated with a rabbit polyclonal antibody (1:20000, Millipore, Reference AB153) overnight at room temperature. Sections were then washed and treated with a rabbit secondary antibody conjugated to peroxidase (Immpress, Abcys, Vector) FG immunoreactivity was revealed using DAB. All sections were rinsed in TBS and transferred to gelatinized slides before being coverslipped using DPX. Neither omission of the primary antibody nor incubation of sections in inappropriate secondary antibodies provided specific staining.

Data analysis

Computer-assisted bright-field images of FG injection sites and of TH or FG-immunoreactive neurons expressing Fos were obtained using a CCD colour video camera (Sony DXC-950P) connected to a Nikon Optiphot-2 microscope. FG, TH and α -CGRP immunofluorescence was

analyzed with a motorized Zeiss AxioPlan 2 Imaging microscope coupled with a Hamamatsu C4742-95 digital camera, by switching between fluorescein and Texas Red filter sets. MDH and A11 nucleus were delineated according to the atlas of Paxinos and Watson (2007) and our own myeloarchitectural atlas adapted from Strassman and Vos (1993), Molander et al. (1989) and Skagerberg and Lindvall (1985). In each rat, labeled cells were counted on coronal sections at seven different rostrocaudal levels – from -3.3 to -4.8 mm posterior to bregma – throughout the A11 nucleus. Images were exported to ImageJ 1.45 software to adjust brightness, contrast and image scale. Images were then imported into Coral Draw 12 to insert additional indications and/or anatomical landmarks.

Behavior

Lesion surgery

Animals were anesthetized with i.p. chloral hydrate (400 mg/kg body weight). They were then secured in a stereotaxic apparatus. A needle (30-gauge) was implanted such that its tip was 0.5 mm above the region of the right A11 nucleus. The stereotaxic coordinates (Paxinos and Watson, 2007) of the injection site relative to the bregma were as follows: anteroposterior (AP), – 3.9 mm; lateral (L), + 0.5 mm and dorsoventral (DV), – 7 mm, with the incisor bar at 3.3 mm below the interaural plane.

In a first series of experiments, rats (n= 11) randomly were injected (flow rate: 0.5 μ l/min) with 1 μ l of either physiological saline (Vehicle Control) or Kainic acid solution (1mg/ml, Sigma Aldrich) into the right A11 nucleus. Animals were allowed a 7-day recovery period prior to behavioral testing. Brain sections were subjected to a Cresyl violet staining and TH immunohistochemistry in order to determine the localization and extent of the lesion.

In a second series of experiments, rats (n = 15) were first treated with desipramine–HCl (25 mg/kg, i.p., Sigma-Aldrich) to protect noradrenergic neurons before being anesthetized.

They were injected (flow rate: 0.5 μ l/min) with 2 μ g of 6-OHDA-HCl (6-hydroxydopamine hydrochloride, Sigma-Aldrich) dissolved in 1 μ l of sterile 0.9% NaCl and 0.1% ascorbic acid, into the right A11 nucleus. Behavioral experiments were performed 3 weeks later. The loss of TH cells was assessed by immunohistochemistry for TH. Animals showing misplaced needle or a reduction in TH immunostaining < 20 % were used as a control group.

Testing of motor function

The recovery of each animal was monitored by observing its spontaneous behavior and general health state. Changes in motor performance were assessed using the accelerating rotarod (8500; Ugo Basile; Comerio, Italy), in which rats were required to walk against the motion of a rotating drum, with the speed increasing from 4 to 40 rpm over 5 min. The time the animal falls off the rotarod is the latency (sec). Two days before the facial formalin test, rats were trained to stay on the accelerating rotarod for 60 s. The next day, rotarod latencies were measured.

Facial formalin test

The facial formalin test was performed as previously described (Raboisson and Dallel., 2004). Formalin (50 μ l, 1.5% solution) was s.c. injected into the right upper lip. Formalin-induced pain behavior was expressed as the time animals spent rubbing the injected area with the forepaw within 3-min time bins for 45 min after injection. Video-recorded behavior was analyzed by an investigator who was blind to animal treatment. Formalin test was performed one week after kainic acid microinjection and three weeks after 6-OHDA microinjection.

Statistical analysis

Results are presented as mean \pm SEM. Statistical analyses were performed using Sigma Plot software. Data were analyzed using either Student's *t*-test or one-way analysis of variance

(ANOVA) or one-way Repeated Measures (RM) ANOVA followed by a post hoc Student-Newman-Keuls test as indicated. The level of significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS

Dopamine and CGRP neurons in the A11 nucleus

TH immunoreactive cells were found scattered throughout the A11 area, that is, in dorsal and posterior hypothalamic areas extending dorsally along the periventricular grey of the caudal thalamus. Figure 1A shows representative examples of TH immunolabelled cells in two frontal planes: -3.3 and -4.1 mm from bregma. As previously noted (Skagerberg & Lindvall, 1985), in some brains occasional TH immunolabelled cells were observed lateral and ventrolateral to the mammillothalamic tract. The average number of A11 TH cells was found to be 95 ± 2 (mean \pm S.E.M., $n = 8$) on each side. The majority of these TH immunolabelled cells are located rostrally, with the number gradually tapering off in the caudal half of the A11 nucleus (Fig. 1A, C).

Compared with TH immunolabelled cells, CGRP immunolabelled ones are less numerous in the A11 nucleus (Fig. 1B). It is worth to note that the number of CGRP immunoreactive neurons actually varied with the antibody used. A11 CGRP immunolabelled cells were on each side 31 ± 4 ($n = 8$) and 61 ± 2 ($n=4$) with mouse and rabbit antibody, respectively. Interestingly, whatever the used antibody is, the majority of these cells is located between -4.16 and -4.3 mm posterior to bregma (Fig. 1B, C).

TH and CGRP (rabbit antibody) double immunolabelling reveals that there are TH and CGRP double immunoreactive cells throughout the entire rostro-caudal extension of the A11 area (Fig. 1C). However, there are much less TH and CGRP double immunoreactive cells than

TH only and CGRP only immunoreactive ones (Fig. 1D): they actually constitute 17% of TH and 26% of CGRP immunoreactive cells in each A11 nucleus.

Descending projection of the hypothalamic A11 nucleus

Localization and extent of injection sites

The present data were collected from 8 rats, in which the injection of Fluorogold (FG), manifest as a dense core of intense fluorescence, was restricted to MDH. The MDH localization of FG injections was confirmed by using DAB: each injection appeared as a center of dense FG immunoreactivity surrounded by, first, a halo of staining with strongly FG immunoreactive neurons and then, more peripherally, less stained neurons. Coronal levels at which tracer deposition was maximal were at about -1.2 mm (n = 3), -1.6 mm (n = 2), and -2.0 mm (n = 3) relative to the most caudal tip of the subnucleus interpeduncularis/MDH transition region, as described by Yoshida et al. (1991) (Fig. 2C).

Descending hypothalamic A11 neurons

Following a single FG injection into the right MDH, many FG immunoreactive neurons are found in both ipsi- and contralateral hypothalamic A11 nuclei (Fig. 2). FG immunoreactive neurons are evenly distributed throughout the rostrocaudal extent of the A11 area, between the -3.3 and -4.8 mm frontal plans, posterior to bregma.

TH and FG double immunolabelling shows that TH and FG immunoreactive neurons are present within both ipsi- and contralateral A11 nuclei. They do not morphologically differ from TH only immunoreactive neurons. TH and FG double immunoreactive neurons are found throughout the A11 nucleus. They constitute 26% of TH only and 59% of FG only immunoreactive neurons in each A11 nucleus (ipsi/contralateral). No other DA system in the

brain exhibits TH and FG double immunoreactive cell bodies, suggesting that the A11 system is the sole suprasegmental source of DA innervation to the MDH.

CGRP and FG double-immunolabelling shows that CGRP and FG immunoreactive neurons are found within throughout both ipsi- and contralateral A11 nuclei. They appear to constitute 12% of CGRP only and 9% of FG only neurons in each A11 nucleus (ipsi/contralateral).

It is worth noting that while FG immunoreactive, TH and FG immunoreactive and CGRP and FG immunoreactive neurons are evenly distributed throughout the whole rostro-caudal extent of A11 areas (Fig. 2D, E), TH immunoreactive and CGRP immunoreactive cells are not (Fig. 1C). There are thus relatively more TH immunoreactive neurons in the rostral than in the caudal part of A11 nuclei and CGRP immunoreactive neurons in the medial than in both rostral and caudal parts of A11 nuclei which do not project to MDH.

A11 nuclei are involved in pain processing

We then examined whether A11 neurons are involved in trigeminal pain processing using the anatomical marker of activation, Fos protein. Subcutaneous (s.c.) injection of formalin (50 μ l, 1.5%) into the right vibrissa pad produced a significantly larger increase in the number of Fos-immunoreactive neurons in both ipsi- and contralateral A11 nuclei compared with s.c. saline (Fig. 3C left). Moreover, formalin-induced increase in Fos-immunoreactive cells occurred more within the rostral part of A11 nuclei (rostral part: 315 ± 56 and 158 ± 25 in formalin and saline groups, respectively, $p = 0.020$; caudal part: 144 ± 27 and 80 ± 7 , in formalin and saline groups, respectively, $p = 0.045$; $n = 12$ in both groups) (Fig. 3C right).

To determine whether TH neurons are activated by noxious facial stimulation, we assessed Fos expression in TH-immunoreactive neurons, using double Fos and TH

immunolabelling (Fig. 3A). Surprisingly, there was an extremely low number (<2%) of Fos- and TH- immunoreactive neurons in A11 nuclei following i.c. formalin.

We also examined whether noxious facial stimulation activates descending hypothalamic A11 neurons by combining retrograde transport of FG injected into the MDH, with Fos immunolabelling (Fig. 3B). There was no FG- and Fos-immunoreactive cells in A11 nuclei following i.c. formalin. This suggests that noxious stimulation does not activate descending A11 neurons.

Dopaminergic A11 neurons inhibit trigeminal pain

These results led us to examine the effect of inactivating A11 nuclei on trigeminal pain behavior. We tested the effects of injecting kainic acid and 6-hydroxyDA into the right A11 nucleus, producing a non selective and selective, respectively, lesion of TH-containing neurons, on the ipsilateral facial formalin test.

TH-neurons loss

In both experiments, the extent of the lesion was assessed on a series of TH immunolabelled coronal sections. In the control group, there were 104 ± 6 and 107 ± 5 TH-immunoreactive neurons in the right and left A11 nucleus, respectively.

Anatomical examination of brains in the series of experiments (non selective lesion) revealed that microinjection were inside the A11 nucleus in 8 experiments (3 after saline and 5 after kainic acid microinjection), whereas it was outside in 3 others. Loss of TH-immunoreactive neurons in the A11 nucleus was observed only when kainic acid was actually microinjected into the A11 nucleus. As shown in Fig. 4A, B, the number of TH-labeled neurons was reduced in the ipsilateral (to the injection) A11 nucleus. In these 5 animals, there were only 45 ± 10 and 87 ± 4 TH-immunoreactive neurons in the ipsi- and contralateral A11

nuclei, respectively. Compared with normal animals (see above), there was a significant reduction in the number of TH-immunoreactive neurons in the ipsi- (mean reduction: $57 \pm 9\%$, $P < 0.001$) but not the contralateral (mean reduction: $17 \pm 4\%$, $p = 0.052$) A11 nucleus. Rats with microinjection sites outside the A11 nucleus and saline-treated rats were pooled together in one control group for facial formalin test, because there were no differences among them.

Unilateral microinjection of 6-OHDA ($2 \mu\text{g}/1\mu\text{l}$) into the right A11 nucleus did not induce any loss in TH-immunoreactive neurons in 7 animals. In the remaining 8 animals, it significantly reduced the number of TH-immunoreactive neurons in both ipsi- and contralateral (to injection site) A11 nuclei (Fig. 5A, C). In these animals, TH-immunoreactive neurons were 65 ± 6 and 81 ± 7 in ipsi- and contralateral A11 nuclei, respectively. Compared with non-lesioned animals, the number of TH-immunoreactive neurons was significantly reduced in both ipsi- (mean reduction: $39 \pm 5\%$, $p < 0.001$; Fig. 5C) and contralateral (mean reduction: $22 \pm 7\%$, $p = 0.034$) A11 nuclei.

Body weight and testing of psychomotor function

Neither locomotor ability nor the number of rears during the first 5 min of the formalin test were significantly altered in lesioned rats. All rats groomed normally and maintained a healthy fur coat.

The rotarod test was performed 3 weeks after lesion, before the formalin test. Six-OHDA lesion had no effect on motor performance. The time spent on the rotarod at a speed of 15 rpm was 126 ± 7 and 116 ± 8 and 147 ± 12 sec in 6-OHDA lesioned and 6-OHDA non-lesioned and saline rats, respectively.

Lesioned animals have a slightly but not significantly ($p = 0.11$) lower body weight than not lesioned animals.

Antinociceptive effect

In the control group ($n=6$), subcutaneous (s.c.) injection of formalin into the vibrissa pad induced a typical biphasic nociceptive response: a first, short-lasting response followed by a second, prolonged one (see examples in Fig. 4C, 5D). These two phases were separated by a period of relative inactivity. The first phase (measured during the first 3-min block) started 20–30 s after the formalin injection and the duration of rubbing activity was 43 ± 9 sec. The second phase of intense rubbing activity occurred between blocks 5 and 12, i.e. 15–36 min after formalin injection, and its total duration was 201 ± 13 sec. In kainic acid lesioned animals, the rubbing response to formalin injection was reduced. Durations of the first and second phases were only 21 ± 7 sec and 103 ± 26 sec ($n = 5$), respectively (Fig. 4C). The duration of the rubbing response during the second phase was thus reduced by $49 \pm 13\%$ ($p = 0.007$).

To test whether A11 TH-immunoreactive neurons are specifically involved in descending modulation of trigeminal pain, we examined the effect on the facial formalin test of selectively lesioning TH-immunoreactive neurons by microinjecting 6-OHDA into the right A11 nucleus. Behavioral testing – s.c. injection of formalin in the right vibrissa pad – was performed three weeks after 6-OHDA microinjection. We compared non-lesioned animal ($n = 7$) with lesioned animals ($n = 8$) (Fig. 5D, E). In non-lesioned animals, the duration of rubbing activity was 29 ± 8 and 220 ± 19 sec during the first and second phase, respectively. In lesioned animals, the rubbing response to formalin injection was dramatically reduced. Durations of the first and second phases were only 9 ± 4 and 127 ± 19 sec, respectively. The duration of the rubbing response during the first and second phase were thus reduced by $69 \pm 14\%$ ($p < 0.035$), and $42 \pm 9\%$ ($p = 0.004$), respectively. Interestingly, the number of TH-immunoreactive neurons in the A11 nucleus and the duration of the rubbing response were significantly correlated (Spearman's rank correlation, $r = 0.58$, $p = 0.024$; Fig. 5B).

DISCUSSION

In this study, we characterized the neuroanatomical organization of descending pathways from hypothalamic A11 nuclei to MDH and investigated their role in trigeminal pain. TH and CGRP double-immunolabelling reveals that, though there are TH-immunoreactive neurons that are also CGRP-immunoreactive, TH- and CGRP-immunolabellings are mostly contained in different neurons. There is two times more TH- than CGRP-immunoreactive cells and the distribution patterns of these two types of neurons within A11 nuclei are different. Using the retrograde tracer FG and TH or CGRP immunohistochemistry, we show that descending A11 inputs to the MDH originate mainly from TH-immunoreactive neurons and are bilateral. Nociceptive facial stimulation by unilateral subcutaneous (s.c.) injection of formalin produces a significantly larger elevation of the number of Fos-immunoreactive neurons in both ipsilateral and contralateral A11 nuclei than after s.c. saline. Fos-immunoreactive neurons are neither TH-immunoreactive nor projecting neurons. Finally, selectively lesioning A11 neurons inhibits trigeminal pain behavior.

TH-immunoreactivity does not differentiate between DA- and nor adrenaline (NA)-producing cells. Since, however, there are probably no NA-producing cells in the areas studied, the cells exhibiting TH-immunoreactivity will be referred to as dopaminergic. TH-immunoreactivity has already been used to identify DA neurons within the A11 in rats, mice and monkeys (Qu et al., 2006; Pappas et al., 2010; Barraud et al., 2010).

Our results indicate that the density and distribution of DA- and CGRP-containing neurons are different. As previously shown in rats (Skagerberg and Lindvall, 1985) and mice (Pappas et al., 2010; Qu et al., 2006), most DA neurons are located rostrally, with their number gradually tapering off in the caudal half of the A11 nucleus. On the other hand, CGRP-containing cells, twice less than DA neurons, are mainly located within the medial part of A11

nucleus, between -4.16 and -4.3 mm posterior to bregma. We also found TH and CGRP double-immunoreactive neurons. As previously shown (Charbit et al., 2009; Orazzo et al., 1993), they are distributed throughout the entire rostro-caudal extent of A11 nucleus. TH and CGRP double-immunoreactive neurons are 26% and 17% of the total number of CGRP- and TH-immunoreactive A11 neurons, respectively. This agrees with an early observation by Orazzo et al., (1993), but significantly differs from another one by Charbit et al., (2009) who reported that CGRP colocalizes with all DA cells within the A11 nucleus. Such difference might be due to antibodies. We used a rabbit antibody against α -CGRP, while Charbit et al., (2009) used a goat one. Consistent with this hypothesis, we observed that there are more CGRP-immunoreactive cells with a rabbit than with a mouse antibody. Altogether, that the distribution patterns of DA-, CGRP- and DA-CGRP-containing neurons within the A11 nucleus are different suggests that the A11 nucleus might not be homogenous but include several parts with different functions.

Using the retrograde tracer FG, we show that descending A11 inputs to the MDH are bilateral, with even a slight contralateral predominance (see Abdallah et al., submitted). FG-immunoreactive neurons are evenly distributed throughout the rostrocaudal extent of A11 areas. Such organization is thus strongly different from that of A11 projections to the spinal DH which are predominantly, if not exclusively, ipsilateral in rats (Skagerberg and Lindvall, 1985), mice (Qu et al., 2006; Pappas et al., 2010) and monkeys (Barraud et al., 2010). FG and TH double-immunoreactive neurons constitute 59% of the total number of FG-immunoreactive neurons in each A11 nucleus, suggesting that most FG retrogradely-labeled neurons are DA ones. Consistently, approximately 50-60% (Papas et al., 2010; Qu et al., 2006), 30-55% (Skagerberg and Lindvall, 1985; Cechetto and Saper, 1988), and 70% (Barraud et al., 2010) of the total of diencephalic A11 DA neurons have been shown to be retrogradely-labeled following the injection of a retrograde tracer in mice, rat and monkey spinal DH, respectively.

No other DA system in the brain appears to exhibit FG and TH double-immunoreactive cell bodies, suggesting that, as spinal DH (Skagerberg and Lindvall, 1985; Qu et al., 2006; Pappas et al., 2010; Barraud et al., 2010), A11 nuclei are the sole supraspinal source of DA innervation to MDH. There are also some CGRP and FG double-immunoreactive neurons within A11 nuclei, located throughout the entire rostro-caudal extent of A11 area. But, they are very few compared with TH and FG double-immunoreactive neurons. CGRP and FG double-immunoreactive neurons constitute 12% of the total CGRP-immunoreactive neurons and 9% of the total FG retrogradely-labeled neurons in each A11 nucleus. These results suggest that A11 DA neurons are the main descending DA pathway to the MDH.

We then examined whether A11 neurons are involved in trigeminal pain processing using the anatomical marker of activation, Fos protein. Unilateral s.c. injection of formalin into the vibrissa pad produces a significantly larger elevation of the number of Fos-immunoreactive neurons in both ipsi- and contralateral A11 nuclei compared with s.c. saline. Thus, A11 nuclei appear to be involved in trigeminal pain processing. Surprisingly, though, neither FG retro-labeled nor DA neurons express Fos, suggesting that these neurons are not activated by noxious stimulation. This is rather unexpected since descending DA pathways projecting to the MDH have been shown to contribute to diffuse noxious inhibitory controls (DNIC) (Laprot et al., 2011). Therefore, how are A11 nuclei involved in trigeminal pain processing?

To address this question, we examined the effect of inactivating A11 nuclei on trigeminal pain. Both selective (6-OHDA microinjection) and non selective (kainic acid microinjection) lesion of A11 DA neurons reduce the number of TH-immunoreactive neurons, with kainic acid killing more TH-immunoreactive neurons (~60%) than 6-OHDA (~40%). Similarly, Ondo et al (2000) have reported a 54% reduction in A11 TH-immunolabelled cell in rats treated with 6-OHDA compared with controls. Both selective and non selective unilateral lesion of A11 DA neurons inhibit the two phases of pain behavior in the formalin test, suggesting that inactivating

A11 nuclei has an antinociceptive effect. This was unexpected since previous studies have indicated that descending A11 DA projections rather inhibit nociceptive transmission. Indeed, local electrical and chemical stimulation of the A11 area inhibit the responses of spinal (Fleetwood-Walker et al., 1988; Taniguchi et al., 2011) and medullary (Charbit et al., 2009) DH neurons to selectively noxious stimulation, via segmental D2 receptors. Conversely, electrical lesion of the A11 nucleus facilitates the responses of neurons within the trigeminocervical complex to both noxious and innocuous mechanical stimuli (Charbit et al., 2009, 2011). However, it is worth noting that such previous studies have assessed the effect activating or inactivating the A11 neuronal network only in acute preparations and on electrophysiological responses of DH neurons to peripheral stimuli, that is, on sensory thresholds. In the present experiments, we examined, the effect of, on the one hand, a 2-3-weeks long-lasting dysfunction of descending A11 DA projections on, on the other hand, spontaneous pain behavior in a rat model of inflammatory pain. Thus, inactivating A11 nuclei, by microinjecting a DA D2 receptor or GABA_A receptor agonist, has recently been shown to attenuate pain hypersensitivity in an animal model of neuropathic pain (Wei et al., 2009). Moreover, descending dopaminergic pathways are known to exert both a tonic and phasic inhibitory control on spinal and trigeminal specifically pain transmission (Lapierre et al., 2011; Wood, 2008; Charbit et al., 2009). Thus, an ongoing facilitation of synaptic transmission between noxious primary afferents and second order neurons in DH might lead to use-dependent long-term depression of these synapses (see for instance Randic et al., 1993). This would account for the observation that the two phases of formalin-induced pain behavior are decreased. Finally, not all DA neurons project down to the medullary and spinal DHs (present results; Skagerberg and Lindvall, 1985; Cechetto and Saper, 1988; Qu et al., 2006; Papas et al., 2010; Barraud et al., 2010). This raises the possibility that chronic dysfunction of other A11 DA projection neurons leads to an inhibition of nociceptive transmission.

Altogether, these results show that, as spinal DH, MDH receives dopaminergic afferents exclusively from hypothalamic A11 nuclei. However, whereas descending dopaminergic pathways to spinal DH are essentially ipsilateral, those to MDH are bilateral. Several-weeks long-lasting dysfunction of descending A11 DA projections leads to hypoalgesia in the facial formalin model, suggesting that descending DA projections to DH are pronociceptive. Since the effects of local administration of DA or acute manipulations of A11 nuclei lead to the very opposite conclusion, it is not clear how hypothalamic A11 nuclei actually modulate pain. Moreover, that neither DA nor projecting neurons to the MDH do express Fos protein following pain raises the question as to which neurons within A11 nuclei are actually activated by pain.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

None of the authors has any conflict of interest to declare.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank A.M. Gaydier for secretarial assistance and A. Descheemaeker for technical support.

REFERENCES

- Barraud Q, Obeid I, Aubert I, Barriere G, Contamin H, McGuire S, Ravenscroft P, Porras G, Tison F, Bezard E, Ghoraieb I. 2010. Neuroanatomical study of the A11 diencephalospinal pathway in the non-human primate. *PLoS One* 5(10):e13306.
- Bergerot A, Storer RJ, Goadsby PJ. 2007. Dopamine inhibits trigeminovascular transmission in the rat. *Ann Neurol* 61(3):251-62.
- Cechetto DF, Saper CB. 1988. Neurochemical organization of the hypothalamic projection to the spinal cord in the rat. *J Comp Neurol* 272(4):579-604.
- Charbit AR, Akerman S, Goadsby PJ. 2011. Trigemino-cervical complex responses after lesioning dopaminergic A11 nucleus are modified by dopamine and serotonin mechanisms. *Pain* 152(10):2365-76.
- Charbit AR, Akerman S, Holland PR, Goadsby PJ. 2009. Neurons of the dopaminergic/calcitonin gene-related peptide A11 cell group modulate neuronal firing in the trigemino-cervical complex: an electrophysiological and immunohistochemical study. *J Neurosci* 29(40):12532-41.
- Chen JF, Qin ZH, Szele F, Bai G, Weiss B. 1991. Neuronal localization and modulation of the D2 dopamine receptor mRNA in brain of normal mice and mice lesioned with 6-hydroxydopamine. *Neuropharmacology* 30(9):927-41.
- Fleetwood-Walker SM, Hope PJ, Mitchell R. 1988. Antinociceptive actions of descending dopaminergic tracts on cat and rat dorsal horn somatosensory neurones. *J Physiol* 399:335-48.

Garraway SM, Hochman S. 2001. Modulatory actions of serotonin, norepinephrine, dopamine, and acetylcholine in spinal cord deep dorsal horn neurons. *J Neurophysiol* 86(5):2183-94.

Hokfelt T, Phillipson O, Goldstein M. 1979. Evidence for a dopaminergic pathway in the rat descending from the A11 cell group to the spinal cord. *Acta Physiol Scand* 107(4):393-5.

Lapirot O, Melin C, Modolo A, Nicolas C, Messaoudi Y, Monconduit L, Artola A, Luccarini P, Dallel R. 2011. Tonic and phasic descending dopaminergic controls of nociceptive transmission in the medullary dorsal horn. *Pain* 152(8):1821-31.

Millan MJ. 2002. Descending control of pain. *Prog Neurobiol* 66(6):355-474.

Molander C, Xu Q, Rivero-Melian C, Grant G. 1989. Cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the rat: II. The cervical and upper thoracic cord. *J Comp Neurol* 289(3):375-85.

Ondo WG, He Y, Rajasekaran S, Le WD. 2000. Clinical correlates of 6-hydroxydopamine injections into A11 dopaminergic neurons in rats: a possible model for restless legs syndrome. *Mov Disord* 15(1):154-8.

Orazzo C, Pieribone VA, Cecatelli S, Terenius L, Hokfelt T. 1993. CGRP-like immunoreactivity in A11 dopamine neurons projecting to the spinal cord and a note on CGRP-CCK cross-reactivity. *Brain Res* 600(1):39-48.

Pappas SS, Tiernan CT, Behrouz B, Jordan CL, Breedlove SM, Goudreau JL, Lookingland KJ. 2010. Neonatal androgen-dependent sex differences in lumbar spinal cord dopamine concentrations and the number of A11 diencephalospinal dopamine neurons. *J Comp Neurol* 518(13):2423-36.

- Paxinos G, Watson CW. 2007. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th Edition. San Diego: Academic Press
- Qu S, Ondo W G, Zhang X, Xie W J, Pan TH, Le WD. 2006. Projections of diencephalic dopamine neurons into the spinal cord in mice. *Exp Brain Res* 168(1-2):152-6.
- Raboisson P, Dallel R. 2004. The orofacial formalin test. *Neurosci Biobehav Rev* 28(2):219-26.
- Randic M, Jiang MC, Cerne R. 1993. Long-term potentiation and long-term depression of primary afferent neurotransmission in the rat spinal cord. *J Neurosci* 13(12):5228-41.
- Skagerberg G, Lindvall O. 1985. Organization of diencephalic dopamine neurones projecting to the spinal cord in the rat. *Brain Res* 342(2):340-51.
- Strassman AM, 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. *J Comp Neurol* 331(4):495-516.
- Taniguchi W, Nakatsuka T, Miyazaki N, Yamada H, Takeda D, Fujita T, Kumamoto E, Yoshida M. 2011. In vivo patch-clamp analysis of dopaminergic antinociceptive actions on substantia gelatinosa neurons in the spinal cord. *Pain* 152(1):95-105.
- Wei H, Viisanen H, Pertovaara A. 2009. Descending modulation of neuropathic hypersensitivity by dopamine D2 receptors in or adjacent to the hypothalamic A11 cell group. *Pharmacol Res* 59(5):355-63.
- Wood PB. 2008. Role of central dopamine in pain and analgesia. *Expert Rev Neurother* 8(5):781-97.
- Yoshida A, Dostrovsky JO, Sessle BJ, Chiang CY. 1991. Trigeminal projections to the nucleus submedius of the thalamus in the rat. *J Comp Neurol* 307(4):609-25.

Zhao H, Zhu W, Pan T, Xie W, Zhang A, Ondo WG, Le W. 2007. Spinal cord dopamine receptor expression and function in mice with 6-OHDA lesion of the A11 nucleus and dietary iron deprivation. *J Neurosci Res* 85(5):1065-76.

Zhu H, Clemens S, Sawchuk M, Hochman S. 2007. Expression and distribution of all dopamine receptor subtypes (D(1)-D(5)) in the mouse lumbar spinal cord: a real-time polymerase chain reaction and non-autoradiographic in situ hybridization study. *Neuroscience* 149(4):885-97.

LEGENDS TO THE FIGURES.

Figure 1: TH- and CGRP-immunoreactive neurons in the A11 nucleus. **A**, Representative photomicrographs showing TH-immunostaining in two coronal sections: -3.3 mm, left, and -4.3 mm, right, from bregma. Note that there many more TH-immunoreactive cells in the most rostral section. **B**, Fluorescence images of CGRP- (red; left) and TH-immunoreactive (green; middle) and CGRP and TH double-immunoreactive neurons (white arrow; right). Note that there is only one CGRP and TH double-immunoreactive neuron. Scale bars: 50 μ m. **C**, Distribution of TH- (black circles) and CGRP-immunoreactive (red circles) and TH- and CGRP double-immunoreactive (green triangles) neurons (mean + SEM) in coronal sections through each A11 nucleus (from -3.3 to 4.8 mm from bregma). **D**, Bar histograms of the total number (mean + SEM) of TH- (black bar) and CGRP-immunoreactive (red bar) and TH- and CGRP double-immunoreactive (green bar) neurons per A11 nucleus.

Figure 2: The retrograde tracer FG reveals A11 descending DA projections to the MDH.

A, Fluorescence images of TH- (green; top) and FG-immunoreactive (red; middle) and TH and FG double-immunoreactive neurons (white arrows; bottom). **B**, Fluorescence images of CGRP- (green; top) and FG-immunoreactive (red; middle) and CGRP and FG double-immunoreactive neurons (white arrow; bottom). Scale bars: 50 μ m. **C**, Schematic representation illustrating the rostro-caudal distribution of all FG injection sites ($n = 8$), from -1.2 to -2.0 mm relative to the most caudal tip of the subnucleus interpolaris/MDH transition region and their ventro-dorsal extent within MDH. **D**, Bar histogram of the distribution of TH- (black bars) and FG-immunoreactive (red bars) and TH- and FG-double immunoreactive (green bars) neurons (mean + SEM) in coronal sections through each A11 nucleus (from -3.3 to 4.8 mm from bregma) following FG injection in the right MDH. **E**, Bar histogram of the distribution of

CGRP- (black bars) and FG-immunoreactive (red bars) and CGRP- and FG-double immunoreactive (green bars) neurons (mean + SEM) in coronal sections through the each A11 nucleus (from -3.3 to 4.8 mm from bregma) following FG injection in the right MDH. Note that there are much less CGRP- and FG-double immunoreactive neurons than TH- and FG-double immunoreactive neurons (different ordinate scales between D and E) and that retrogradely labeled DA neurons are evenly distributed throughout the A11 area.

Figure 3: Fos-expression reveals that A11 neurons are activated during pain. **A,** Representative photomicrographs of coronal sections (-3.9 mm from bregma) showing TH- (light brown) and Fos-immunostaining (black dots) in the right A11 nucleus following subcutaneous injection of saline (left) and formalin (right) into right vibrissa pad. There is no DA neuron expressing Fos. **B,** Representative photomicrograph of a coronal section (-3.9 mm from bregma) showing FG- (light brown) and Fos-immunostaining (black dots) in the right A11 nucleus following subcutaneous injection of formalin into right vibrissa pad. There is no retrogradely labeled neuron expressing Fos. Scale bars: 50 μ m. **C,** Bar histograms of the number (mean + SEM) of Fos-immunoreactive cells in ipsi- and contralateral A11 nuclei (left) and of the rostro-caudal distribution (from -3.3 to -4.8 mm from bregma) of Fos-immunoreactive cells in the ipsilateral nucleus (right) following subcutaneous injection of saline (black; n = 12) and formalin (grey; n = 12) into right vibrissa pad. * P < 0.05

Figure 4: Microinjection of kainic acid into the right A11 nucleus produces hypoalgesia in the facial formalin test. **A, B,** Representative photomicrographs of coronal sections (-3.9 mm from bregma) showing TH-immunostaining (A) and the corresponding Cresyl violet staining in ipsi- (right) and contralateral (left) A11 nuclei. Cresyl violet helps delineate the limits of the kainic acid lesion. Note that there is no TH-immunoreactive neuron on the lesioned side. Scale

bars: 50 μm . **C**, Average time course of the face rubbing response to subcutaneous injection of formalin into the right vibrissa pad in lesioned (empty circles; $n = 5$) and non-lesioned rats (filled circles; $n = 6$). **C, inset**, Bar histograms of the duration of the 1st and 2nd phases of the face rubbing behavior in lesioned (filled bars) and non-lesioned rats (empty bars). The duration of the two phases of the face-rubbing response are reduced in lesioned compared with non-lesioned rats. ** $P < 0.01$.

Figure 5: Microinjection of 6-OHDA into the right A11 nucleus produces hypoalgesia in the facial formalin test. **A**, Representative photomicrograph of a coronal section (-3.9 mm from bregma) showing TH-immunostaining in ipsi- (right) and contralateral (left) A11 nuclei. Note that only 2 to 3 neurons are still TH-immunoreactive on the lesioned side. Scale bars: 50 μm . **B**, The decrease in the duration of the rubbing behavior correlates with the reduction in the number of A11 TH-immunoreactive. **C**, Distribution of TH-immunoreactive neurons (mean + SEM) in coronal sections through the ipsilateral A11 nucleus (from -3.3 to 4.8 mm from bregma) in lesioned (filled triangles; $n = 8$), non-lesioned (empty circles; $n = 7$) and control rats (filled circles; $n = 6$). **D**, Average time course (mean + SEM) of the face rubbing response to subcutaneous injection of formalin into the right vibrissa pad in lesioned (empty circles; $n = 8$) and non-lesioned rats (filled circles; $n = 7$). **E**, Bar histograms (mean + SEM) of the duration of the 1st and 2nd phases of the face rubbing behavior in lesioned (filled bars) and non-lesioned rats (empty bars) (same results as **D**). The duration of the two phases of the face-rubbing response are reduced in lesioned compared with non-lesioned rats. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

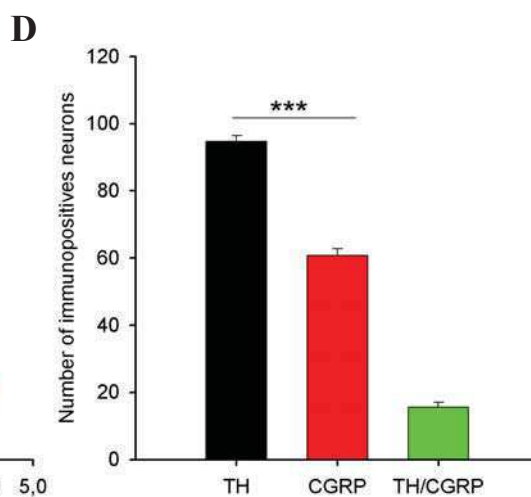
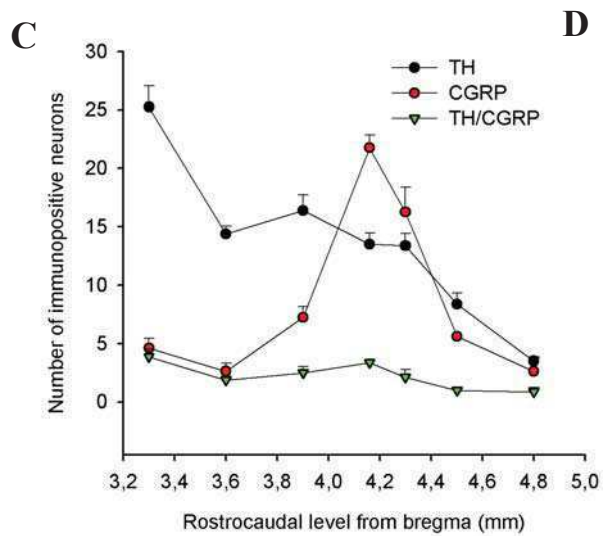
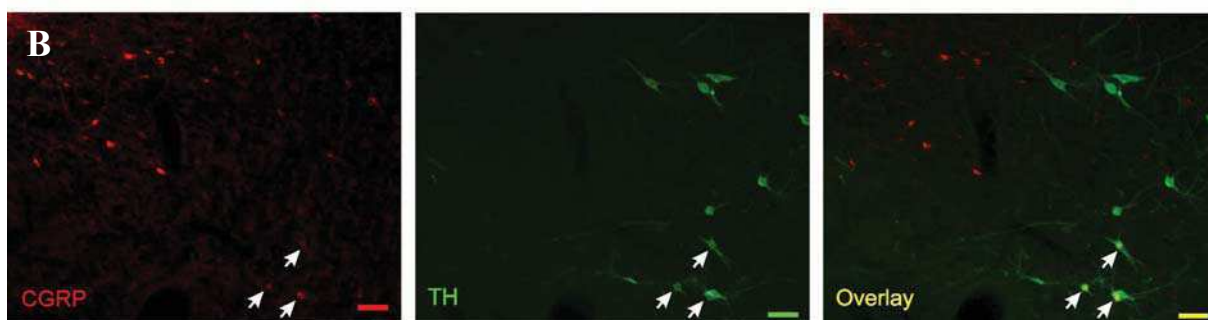
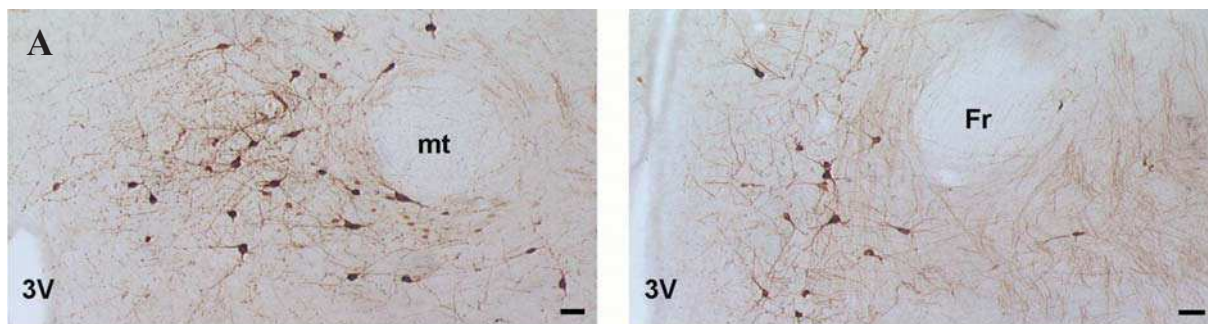
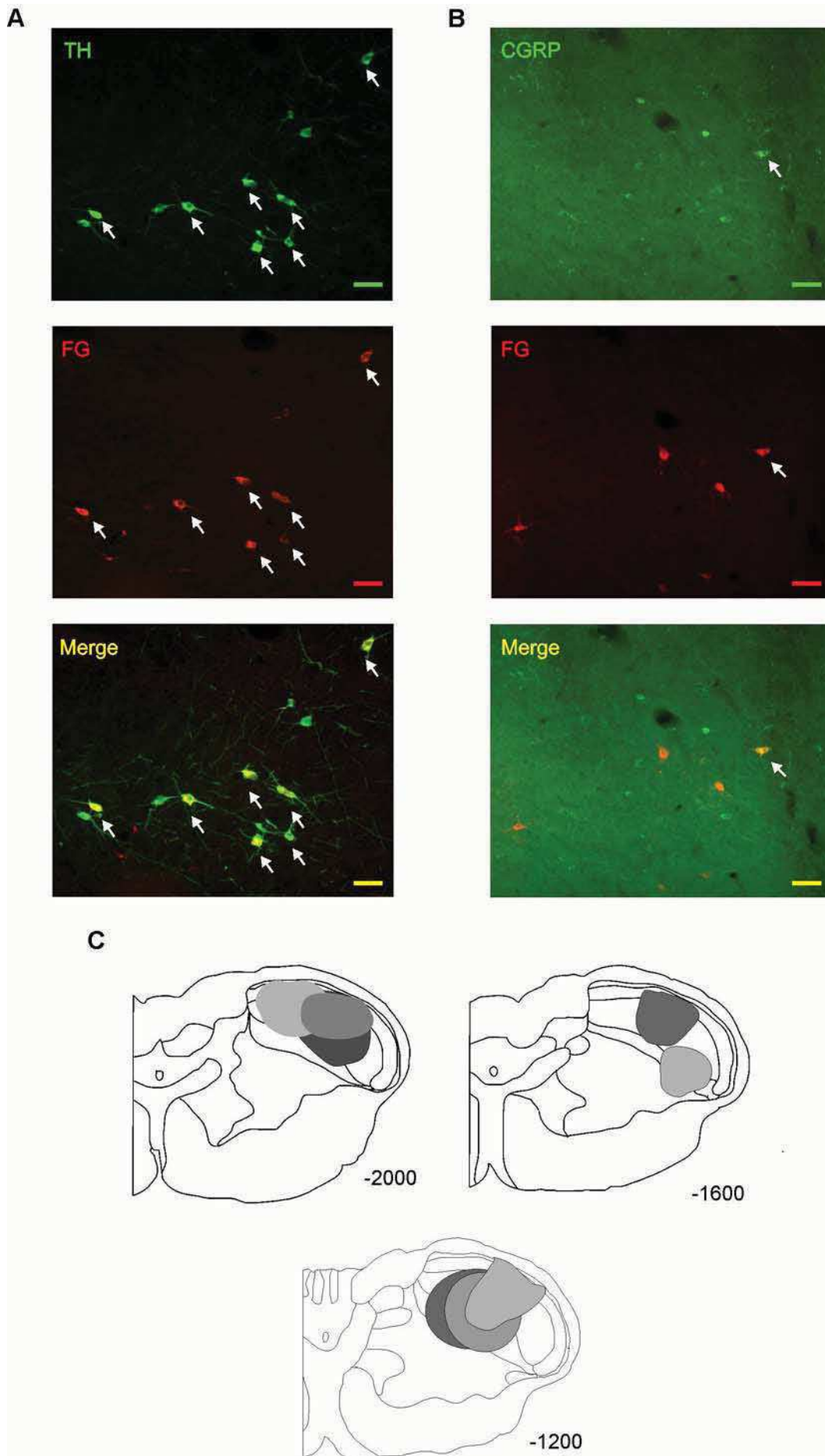


Figure 1



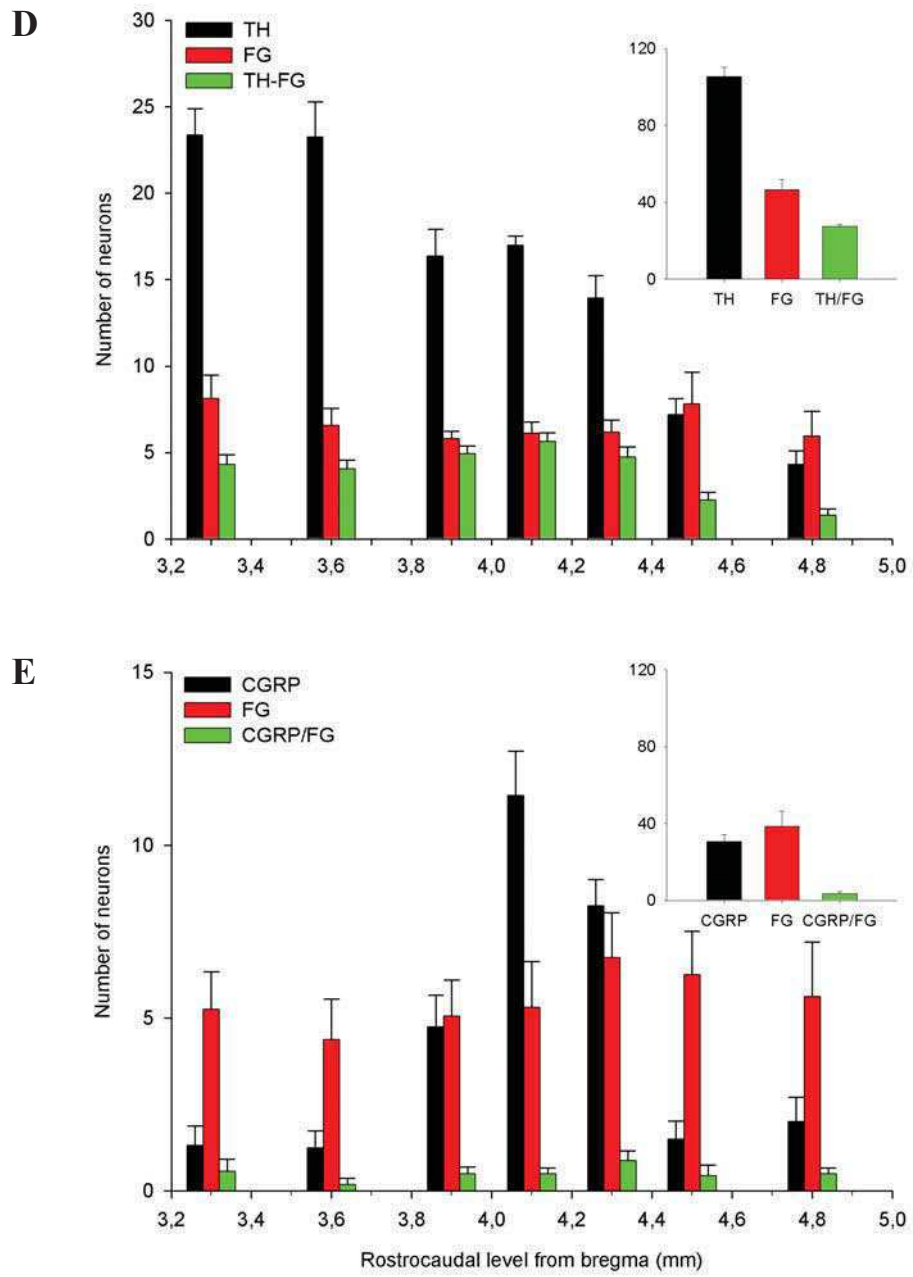


Figure 2

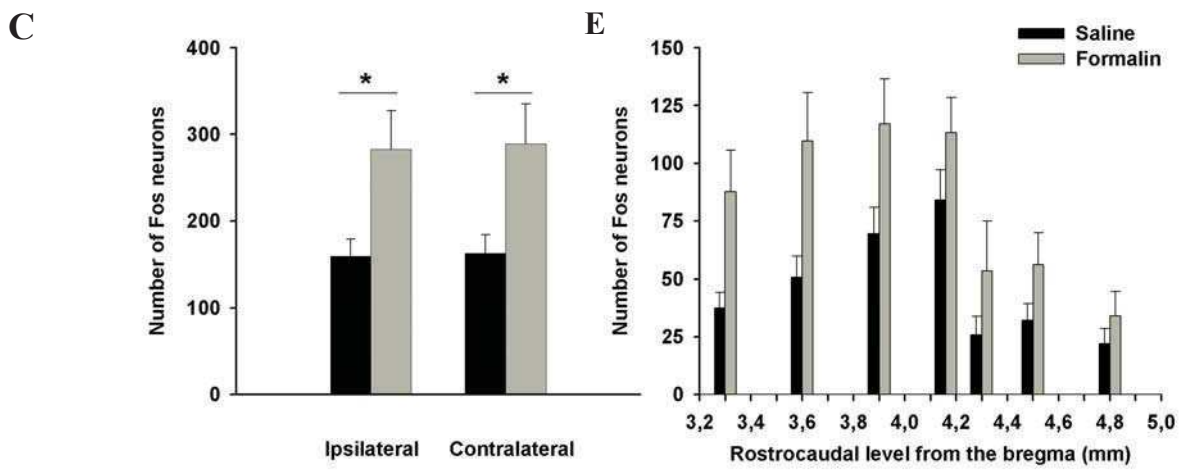
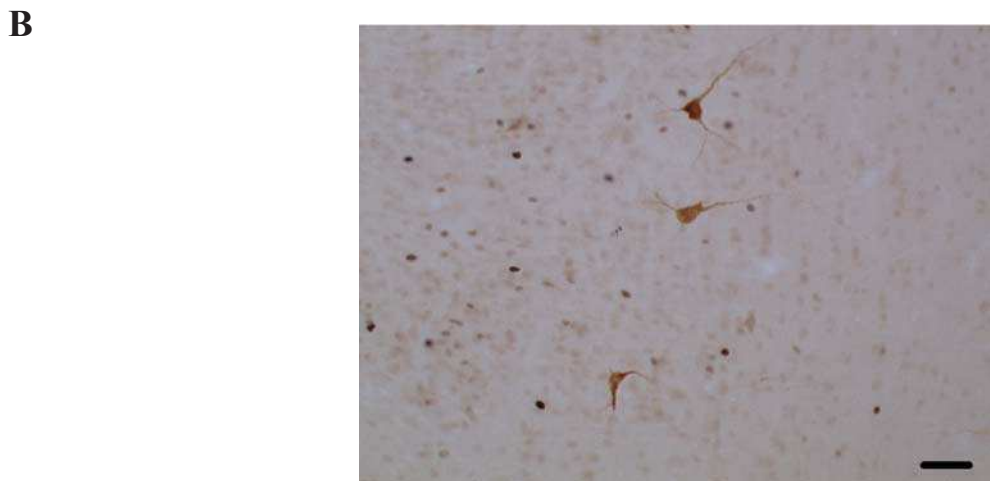
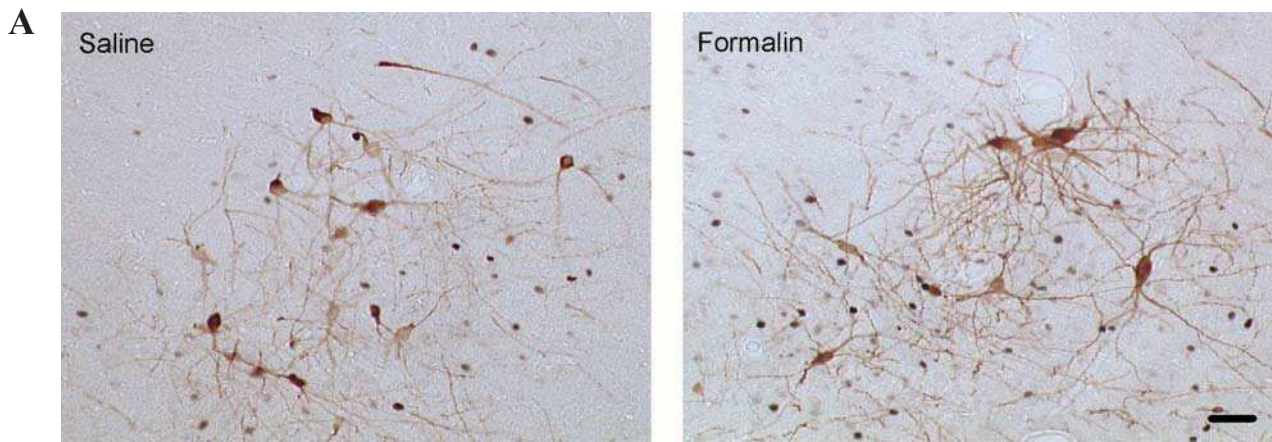


Figure 3

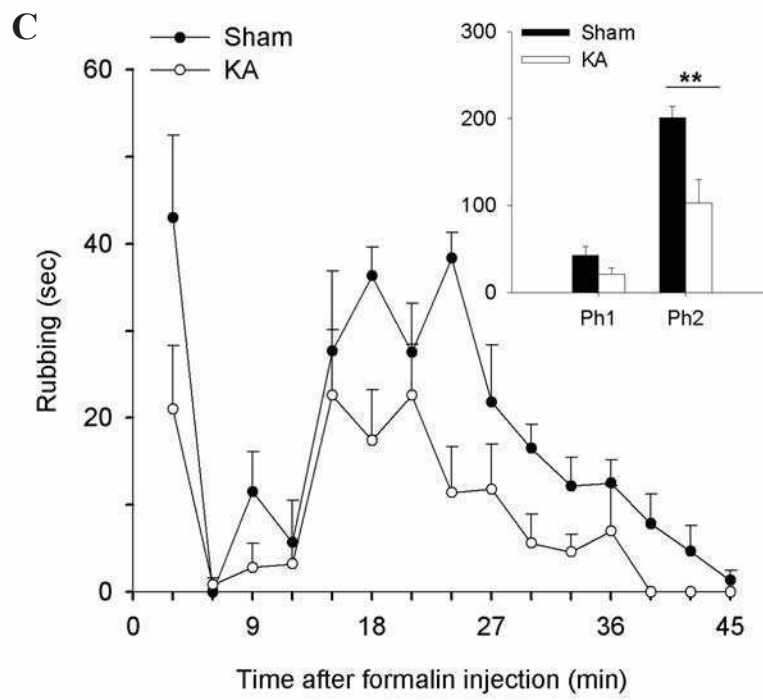
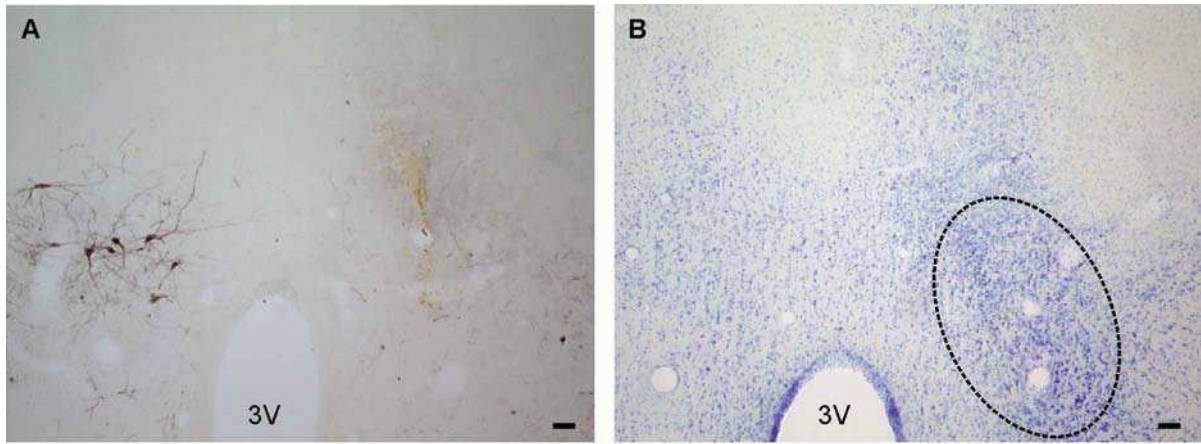


Figure 4

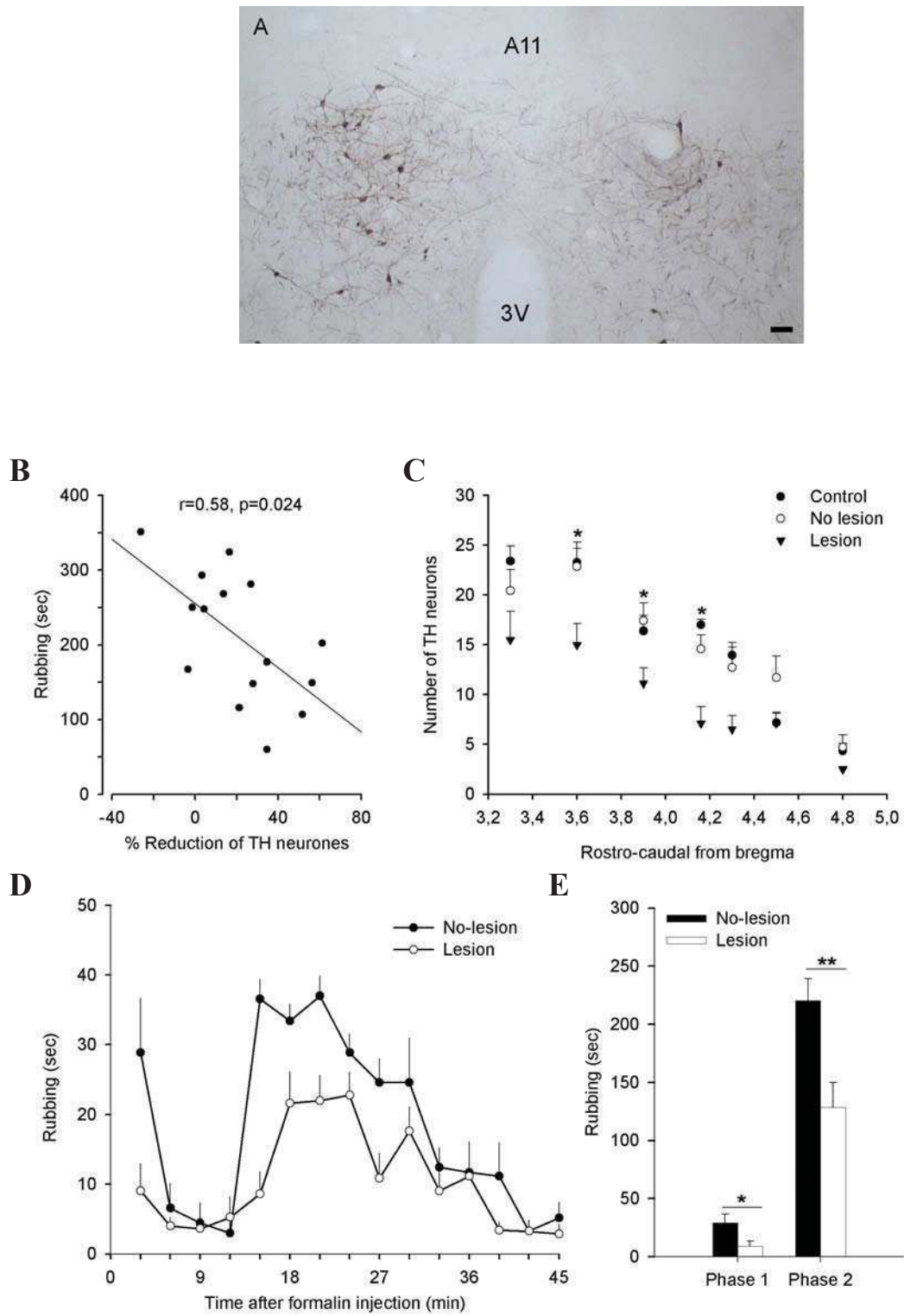


Figure 5

**Chapitre 3: Organisation du contrôle descendant
orexinergique**

**INHIBITION OF TRIGEMINAL NOCICEPTIVE MESSAGES BY HYPOTHALAMIC
OREXIN DESCENDING PATHWAY IN THE RAT**

Khaled Abdallah, Radhouane Dallel, Philippe Luccarini*

Inserm/UdA U1107, Neuro-Dol: Trigeminal Pain and Mi graine, Université d’Auvergne,
Faculté de Chiru rgie Dentaire, 11 Boulevard Charles d e Gaulle, Clermont-Ferrand, 63000,
France. *IUT Génie Biologique, Ensemble Universitaire des Cézeaux, Aubière, 63172, France

Corresponding authors: Radhouane DALLEL, Philippe LUCCARINI

Inserm/UdA U1107, Neuro-Dol: Trigeminal Pain and Migraine, Faculté de Chirurgie Dentaire,
11 Boulevard Charles de Gaulle, Clermont-Ferrand, 63000, France.

E-mail : radhouane.dallel@udamail.fr

Grant Information: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM),
Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche, Université d’Auvergne-Clermont-
Ferrand and Région Auvergne.

ABSTRACT

The transfer of nociceptive information at the level of dorsal horn is subject to extensive processing by both local segmental and supraspinal mechanisms, including descending orexinergic controls, originating from the hypothalamic LH and PFX nuclei. The inhibitory role of orexin on evoked pain, via activation of orexin-A receptors at the level of the dorsal horn, is rather well established. Here, using anatomical techniques, we have addressed the two questions. (1) What is the organization of descending trigeminal orexinergic pathway? (2) Do descending orexinergic pathway controls modulate trigeminal pain? We show that the descending orexinergic pathway to MDH originates from bilateral LH and PFX nuclei. But neurons in PFX nuclei are preferentially excited by noxious stimulation. Activating the orexin-A receptors inhibits specifically C-fiber-evoked action potential firing of trigeminal wide dynamic range (WDR) neurons. We conclude that descending orexinergic controls from preferentially the PFX nuclei inhibit specifically C-fiber nociceptive transmission via orexin-A receptors at the level of superficial MDH.

INTRODUCTION

Painful experience involves sensory-discriminative, cognitive-evaluative, and affective-emotional components. Transmission of nociceptive messages is thus modulated by different central nervous system networks according to the nature of the painful stimulus and behavioral state of the individual (for review, see Millan, 2002). Moreover, nociception cannot be reduced to a simple integration of ascending messages from periphery to cortical areas. It results also from a modulation of ascending nociceptive messages by descending influences from supraspinal centers. Indeed; descending pathways from brainstem and hypothalamus are known to either inhibit or facilitate transmission of nociceptive information at the level of the spinal and medullary dorsal horn (MDH).

Evidence from neuroimaging studies in man suggest that hypothalamus is also a key player in nociceptive processing, particularly in trigeminal pain syndromes such as migraine (Denuelle et al., 2007) and trigeminal autonomic cephalalgias (for review, see Holle et al., 2011) including cluster headache (May et al., 1998). Animal studies, using electrophysiological recordings in rats (Shigenaga et al., 1973; Morita et al., 1977; Hamba et al., 1990) and cats (Rudomin et al., 1965) or Fos expression as a immunohistochemical marker of neuronal activity (Malick et al., 2001; Ter Horst et al., 2001; Benjamin et al., 2004), suggest that the hypothalamus is activated following trigeminal stimulation.

Hypothalamus modulate nociceptive message at the level of the spinal and medullary dorsal horn. For example, Focal electrical stimulation of A11 nucleus suppresses the nociceptive responses of WDR neurons in the spinal dorsal horn (Fleetwood-Walker et al., 1988) and decreases the dural stimulation-evoked responses of MDH neurons (Charbit et al., 2009). Furthermore, a recent study (Lapirot et al., 2011) had shown a tonic inhibition of the trigeminal nociceptive input by descending dopaminergic controls via activation of D2-like receptors at the level of superficial MDH.

Other hypothalamic areas such as lateral hypothalamus are also involved in nociception modulation. Electrical stimulation or microinjection of morphine in lateral hypothalamus increases the latency of the tail-flick test and decreases inflammatory pain induced by formalin injection (Lopez et al., 1991; Franco and Prado, 1996; Dafny et al., 1996).

Lateral (LH) and perifornical (PFX) hypothalamic areas contain orexin labeled neurons that project to the spinal cord (Peyron et al., 1998; van den Pol, 1999). Interestingly, Orexin immunoreactive neurons have been shown to be located exclusively in the LH and PFX areas (De Lecea et al., 1998). In addition to their role in the control of sleep and wakefulness, energy metabolism, reward, and addiction (for review see Sakurai and Miyauchi, 2011), orexinergic neurons are known to be involved in nociception and stress-induced analgesia (for review, see Chiou et al., 2010). Intrathecal administration of orexin A induces anti-nociception in thermal, mechanical and chemical nociceptive tests (Yamamoto et al., 2002; Mobarakeh et al., 2005). Furthermore, Orexin A reduces mechanical allodynia induced by carrageenan inflammation or nerve ligation in the rat (Yamamoto et al., 2003a; Yamamoto et al., 2003b).

Descending orexin system might also modulate trigeminal pain. High density of orexin-immunoreactive fibers was found in superficial MDH (Peyron et al., 1998; van den Pol, 1999). Moreover, Orexin peptides have been shown to modulate responses to noxious dural stimulation (Holland et al., 2006). Further evidence for a possible role of the orexinergic system is provided by genetic association studies. The polymorphism in orexin receptors gene has been reported to associate significantly with an increased risk of cluster headache and migraine (Holland and Goadsby, 2009; Rainoro et al., 2011).

In our recent work (Abdallah et al. in submission), microinjections of Fluorogold, a retrograde tracer, into MDH revealed that LH and PFX hypothalamic areas project to the MDH. In order to assess the involvement of these two areas in trigeminal nociception, Fos expression was first analyzed after facial formalin stimulation. Secondly, we have characterized the

organization of descending orexinergic fibers from LH and PFX to the MDH, by combining immunolabelling of orexin A and fluorogold positive hypothalamic neurons. And finally, we tested the effect of intracisternal application of orexin A on nociceptive responses of WDR neurons in Sp50 evoked by electrical stimulation of their receptive fields.

MATERIAL AND METHODS

Adult male Sprague Dawley rats were obtained from Charles River laboratories (France) and maintained in a light- and temperature controlled environment (lights on 19.00–7.00 h, 22°C) with food and water *ad libitum*. All efforts were made to minimize the number of animals used. The experiments followed the ethical guidelines of the International Association for the Study of Pain and ethical guidelines of the directive 2010/63/UE of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes. Protocols applied in this study have been authorized by the local Ethics Committee in Animal Experiment, CEMEA Auvergne (n° CE 26-12 and CE 28-12)

Immunocytochemical experiments

Fluorogold microinjection

Animals (250-300g) were anesthetized with chloral hydrate (400 mg/kg body weight, intraperitoneally (i.p.) and placed in a stereotaxic frame. After surgical removing of the atlanto-occipital membrane, glass micropipettes (30–40 µm diameter tips) filled with a 2% solution of Fluorogold (hydroxystilbamidine, Molecular Probes, Reference H22845), diluted in 0.1 M cacodylic acid were inserted into the right MDH (AP –5.3 mm from the interaural line, ML 2.7 mm, P 1.5 mm) according to Paxinos and Watson (1998) with an angle of 80° to the horizontal plane. Once the micropipette was in place, direct positive current (5 µA) was applied for 30 s

every 30 s for 15–20 min. The microelectrode was left in situ for a further 5 min before withdrawal from the brain. A single injection into the MDH was performed in each animal.

Following a postoperative survival period of one week, animals were deeply anaesthetized with urethane (1.5 g/kg, i.p) and perfused transcardially over a 15-min period with warm (37 °C) heparinized saline (25 IU heparin/mL) followed by cold (10 °C) phosphate-buffered solution (0.1 M, pH 7.6) containing 4% paraformaldehyde and 0.03% picric acid. The brain and first cervical segment (C1) were removed and then cryoprotected in a buffered 30% sucrose solution containing paraformaldehyde-picric acid solution and left overnight. Coronal sections were cut on a freezing microtome (40 µm thick) and collected in a 0.05 M Tris-buffered saline (TBS). A set of MDH sections was mounted on gelatin-coated slides and viewed using a fluorescent microscope (Zeiss Axioplan 2 Imaging microscope; FG: excitation 365/10 nm, dichroic mirror 400 nm and barrier filter 520 ± 560 nm) in order to localize the injection sites. Only diencephalic sections of animals in which injection site was exclusively located within the MDH were processed further.

Fluorogold and Orexin A immunofluorescence

Free-floating diencephalic sections were placed in 1% normal goat serum for 1 h before incubation in a combination of a polyclonal rabbit anti-FG antibody (1:20000, Millipore, Reference AB153) and a monoclonal mouse anti-orexin antibody (1:1000, Santa Cruz, Reference Sc-80263), overnight at room temperature. Sections were rinsed 3 times in TBS, and then placed in Cy2 goat anti-mouse (1:200, Jackson ImmunoResearch, USA) and Cy3 goat anti-rabbit (1:200, Jackson ImmunoResearch, USA) for 120 min at room temperature. After incubation, sections were rinsed in TBS, mounted into gelatin-coated slides and left to dry in a dark environment. Sections were then dehydrated in alcohol cleared in xylene, and

coverslipped with DPX. All immunolabels were diluted in 0.25% bovine serum albumin, 0.3% Triton X-100 in TBS.

Fos immunofluorescence

In a second group, rats received subcutaneous injection of formalin into the vibrissa pad (50 μ l, 1.5%). Two hours later, rats were deeply anaesthetized with urethane (1.5g/kg) and perfused transcardially. The brain was then removed and transferred in the paraformaldehyde-picric acid solution containing 30% sucrose at 4°C and left overnight. Coronal sections were cut on a freezing microtome and collected in a 0.05 M Tris-buffered saline (TBS). Free-floating hypothalamic sections were placed in 1 % normal goat serum for 1 h before overnight incubation at room temperature in a rabbit antibody directed against Fos (1:1000, Santa Cruz). Sections were then washed in TBS and placed in Cy3 goat anti-rabbit (1:200, Jackson Immunoresearch) for 120 min at room temperature.

OrexinA-containing fibers immunohistochemistry

After brain stem sections had free-floated in 1% normal horse serum for 1 h, immunohistochemistry reaction was carried out with a monoclonal mouse antibody against orexin A (1:1000, Santa Cruz ; overnight at room temperature) using biotinylated horse anti-rabbit followed by avidin–biotin–peroxidase complex (Immpress,Abcys, Vector; 30 min at room temperature). Orexin A immunoreactivity was visualized in sections using 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) and ammonium nickel sulphate (kit Vector Peroxidase substrate DAB). All sections were rinsed in TBS and transferred to gelatinized slides before being coverslipped with DPX.

Data analysis

Computer-assisted bright-field images of OrexinA-containing fibers were obtained using a CCD colour video camera (Sony DXC-950P) connected to a Nikon Optiphot-2 microscope at 10× magnification. The delineation of the MDH was based upon the Paxinos and Watson atlas (1997) and our own myeloarchitecture atlas adapted from Strassman and Vos, 1993 and Molander et al. 1989.

Fluorogold, Orexin A or c-fos immunofluorescence was analysed with a motorized Zeiss Axioplan 2 Imaging microscope coupled with a Hamamatsu C4742-95 digital camera, by switching between fluorescein and Texas Red filter sets. For illustrations, numerical images of immunofluorescence were obtained using Metamorph 5.4 software. In each rat, Fos immunoreactive nuclei, FluoroGold (FG) neurons, Orexin A-immunoreactive neurons and double labeled (FG + Orexin A) neurons in the lateral and perifornical hypothalamic areas were counted according to their location along different rostrocaudal planes within the hypothalamus (from -2.1 to -4.8 posterior to bregma). The delineation of the two hypothalamic areas was based upon the Paxinos and Watson atlas (1997), Swanson et al. (2005).

Images were exported to ImageJ 1.45 software to adjust brightness and contrast before adjusting the image scale bar. They were then imported into Coral Draw 12 to insert additional indications and/or anatomical landmarks.

Electrophysiological experiments

Animal preparation

For surgery, the animals were anaesthetized with 2% halothane in a nitrous oxide/oxygen mixture (2/3–1/3). After intramuscular injection of 100 µg atropine sulfate, a tracheal cannula was inserted, the jugular vein was cannulated to paralyze rats by an intravenous perfusion of vecuronium bromide (2.4 mg/h). So, animals were artificially ventilated with a volume-controlled pump (54–55 strokes/min). The levels of halothane, O₂, N₂O and the end-tidal CO₂ (3.5–4.5%) were monitored by an anesthetic gas monitor (Artema MM 200, Sundbyberg, Sweden) during the entire experimental period. These parameters were measured by infra-red absorption, digitally displayed and under the control of alarms. A sufficient depth of anesthesia was judged from the absence of gross fluctuations of heart rate. The vascularization of the cutaneous tissues was periodically checked by observing the color of the paw extremities and the rapidity by which they regained normal color after the application of pressure to the paw. The core temperature was maintained at $38 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ with a homeothermic blanket system.

The animals were then placed in a stereotaxic frame with the head fixed in a ventroflexed position (incisor bar dropped 5 mm under the standard position) by means of an adapted metallic bar. A craniotomy was performed on the right side at the level of the occipitoparietalis suture and the dura mater was removed. For intracisternal application, a skin medial incision was performed from occipital end of skull to C2-C3 level, muscles are laterally reclined to access to atlanto-occipitalis membrane. A window was opened in the membrane to allow the intracisternal applications at the level of trigeminal subnucleus caudalis. After surgery, the level of halothane was reduced to 0.6-0.7% and maintained at this level during the recording period.

Recordings

Unitary extracellular recordings were made from right Sp50 neurons with glass micropipettes (8-10 M) filled with a mixture of 5% NaCl and pontamine sky blue. The brainstem was explored 2.4-3.0 mm lateral to the midline and between the frontal planes P. 1.1 and P. 2.6 (Paxinos and Watson, 1997). Single unit activities were amplified and displayed on oscilloscopes and were also led into a window discriminator connected to a CED 1401plus interface (Cambridge Electronic Design) and a PC computer (Spike 2.05 software), to allow sampling and analysis of the spontaneous and evoked neuronal activity.

Wide dynamic range (WDR) trigeminal neurons were recognized based on their responses to mechanical and percutaneous electrical stimulations of their receptive field (Dallel et al., 1999). Specifically, neurons that responded in a graded manner with increasing firing rates to the stimulus range from non-noxious to noxious intensity were classified as WDR cells. Innocuous mechanical stimuli to the skin and mucosa included air puff, brushing with a soft brush, gentle stroking and light pressure with a blunt probe. Noxious mechanical stimuli consisted of heavy pressure, pinprick and pinching with fine forceps (tip area 1 mm²) which evoked a painful sensation when applied to the experimenters' skin. Once a neuron had been identified, its receptive field was mapped and classified according to its location: perioral or more peripheral regions of the face (Dallel et al., 1999). Electrical square-wave stimuli (2 ms duration) were applied through a pair of stainless steel stimulating electrodes subcutaneously placed into the center of the previously delineated receptive field and thresholds for eliciting A-fiber-evoked and C-fiber-evoked responses determined. In post-stimulus time histograms (PSH), A- and C-fiber-evoked responses were distinguished according to their latencies. It was previously shown that burst discharges at latencies >30 ms are elicited by C-fibers (Dallel et al., 1999). Therefore, all spikes between 30 and 200 ms post-stimulus were considered as C-fiber-

evoked. During repetitive stimulation, C-fiber-evoked responses of trigeminal WDR neurons progressively increased (wind-up), thereafter, reached a maximum or peak and then plateaued or slightly decreased (Dallel et al., 1999). Fits of the wind-up plots were obtained using a least square fitting algorithm. The dynamic properties of the successive responses were best fitted using a second-order polynomial regression ($R^2 = 0.99$), indicating that in all cases there was a strong correlation between the amplitude of the response and the number of repetitive stimuli. Since the initial slope of the polynomial fit curves (coefficient of the first degree of x) corresponded to the ability of the neuron to amplify its response, it was used to quantify wind-up (Coste et al., 2008).

Experimental design

The activity of the neuron was considered stable when PSH obtained after two successive trains of 30 electrical shocks, applied to the excitatory receptive field at 3 times the threshold for C-fibers activation, did not differ to 10%. Then, was applied the procedure that involved sequences of 30 stimuli every 10 min during 110 min. A 10-min interval was selected to allow full recovery to baseline response between sequences.

In each sequences, the PSHs built from 1st-30th responses were used for studying the nociceptive response: the total number of spikes in the range of the A-delta and C-evoked responses. During repetitive stimulation, C fiber-evoked responses of trigeminal WDR neurons progressively increased from the first to the 15th stimulation (windup), thereafter, reached a maximum or peak and then plateaued or slightly decreased. Windup value was calculated as the difference between the total number of spikes at C-fibers latencies produced by the train of 15 stimuli and the input. The input was calculated as the number of spikes produced by the first stimulation multiplied by the total number of stimuli.

Orexin A (0.2 – 0.6 nmol in 5 μ l) was injected after two stable (variation in unconditioned C-fiber response <10%) control sequences had been recorded. There was only one orexin A injection in each rat. Injection was manually performed via a micropipette by slowly (during 5sec.) dropping the solution into the open window of the cisterna.

Statistics

For immunohistochemical analysis data were expressed as mean number of cells per section. Results of electrophysiological analysis were expressed as mean \pm SEM. Statistical analysis was performed using Student's t-test or one-way Repeated Measures (RM) ANOVA followed by a post hoc Bonferroni test as indicated. The level of significance was set at $P < 0.05$.

RESULTS

Activation of lateral and perifornical hypothalamic areas by formalin nociceptive stimulation

In our previous study, we have shown that MDH received bilateral projections from lateral and perifornical areas of the hypothalamus. To determine whether these areas are actually involved in trigeminal pain processing, we investigated the effect of subcutaneous injection of formalin into the vibrissa pad (50 μ l, 1.5%) on Fos protein expression. Animals (n = 5) which received a subcutaneous injection of formalin into the vibrissa pad exhibited a dense distribution of Fos immunoreactive (Fos-ir) cells in the ipsilateral and contralateral LH and PFX areas (Figure 1). There was no difference between ipsilateral and contralateral areas; so we have summed the two sides of each area. Labeling in both areas was significantly ($p < 0.05$) greater in animals receiving formalin than those in control animals (receiving subcutaneous injection of saline n = 6). The formalin group exhibited a larger number of Fos-ir cells compared with the control group for LH (51 ± 14 and 10 ± 3 , respectively; $p = 0.0135$) and PFX (74 ± 21 and 19 ± 11 , respectively; $p = 0.039$). Moreover, increase in c-Fos-ir cells following formalin injection occurred primarily within the PFX area ($p = 0.03$).

Organization of descending hypothalamic orexin pathway to MDH

Data were collected from 5 rats, in which fluorogold microinjection were restricted to MDH (Figure 2). A relative dense population of FG labeled neurons were found in both sides of LH and PFX areas following FG injection into MDH (mean number per section = 26 ± 7 , 27 ± 4 ; respectively) (Figure 3). Immunolabelling data (Figure 3) showed also a dense population of orexin A immunoreactive neurons in these areas (mean number per section = 44 ± 5 and 130 ± 15 , respectively). Orexin A labeled neurons were distributed along the rostro-caudal axis from -

2.1 to -3.9 in LH and between -2.8 and -3.6 posterior to bregma in PFX area. Double labeling immunofluorescence (FG/Orexin A) revealed that, among the descending projecting neurons from LH and PFX area (Figure 3), a proportion of them were orexinergic ($15.5 \pm 1\%$ and $32.8 \pm 5\%$, respectively). Interestingly, Orexin A descending neurons to MDH were preferentially located in the PFX area. Double labeled-ir neurons were present along the rostro-caudal axis of the two areas : between -2.1 mm to - 3.9 mm posterior to bregma in LH and from -2.8 to -3.6 mm in PFX (Figure. 3 C,E).

Orexin-containing fibers terminals in MDH

The terminals of descending orexin A containing fibers were analyzed at the level of MDH. The distribution of orexin terminals was identical along the rostro-caudal axis of MDH. These fiber-terminals were equally present as in the mandibular (dorsomedial), maxillary (dorsolateral), as in the ophthalmic (ventrolateral) area of MDH.

Regarding the MDH laminar distribution of the orexin fiber-terminals, it appeared that, even if sparse terminals were present in deep lamina (IV-V), most of terminals were located in more superficial laminae, particularly in I and II laminae (Figure 4).

Electrophysiological data

Characteristics of trigeminal WDR neurons

A total of 10 WDR neurons were recorded within the Sp5O. None of them exhibited spontaneous activity. All had an ipsilateral receptive field that included the intraoral or perioral region. They were sensitive to both innocuous and noxious mechanical stimuli and responded by increasing their firing rate as stimulus intensity increased into the noxious range. When 2-ms-long percutaneous electrical stimuli were applied to the center of the receptive field of the

neurons, responses attributable to peripheral activation of A- and C-fibers could be observed. The longest latency responses (97 ± 4 ms) were C-fiber-evoked. Indeed, the computed conduction velocity (~ 0.5 m/s) was in the range of those previously reported for C-fibers (Dallel et al., 1999; Coste et al., 2008). In addition, long latency responses could only be evoked by high intensity stimulations (mean threshold: 8 ± 1 mA) and they exhibited windup (Dallel et al., 1999; Coste et al., 2008). Indeed, we observed a progressive increase of C-fiber-evoked responses to repetitive (0.66 Hz) constant percutaneous suprathreshold electrical stimuli applied to the receptive field: the first stimulation elicited few spikes (~ 5 spikes) but repetition of the stimulus induced a marked increase of the responses, with a maximum (~ 30 spikes) seen as early as the 10-11th presentation. Beyond, the response plateaued. Moreover, A δ -fiber evoked responses have a short latency (12 ± 0 ms) and are evoked by small intensity stimulations (mean threshold 2 ± 0 mA).

Effect of orexin A application on nociceptive responses of WDR trigeminal neurons.

Whereas intracisternal application of 0.3 ($n = 6$) and 0.6 ($n = 4$) nmmol orexin A did not affect the A delta response (Figure 5D), it consistently depressed the C-fiber-evoked responses of Sp50 WDR neurons at a dose dependent manner of 0.6 nmol orexin A (figure 5A,B). The depression of C-fiber-evoked responses appeared as soon as 10 min after microinjection and last for at least 80 min after injection (figure 5A,B). The effect was significant from forty minutes after orexin A microinjection to the end of recording. We note at 40 and 60 minutes after injection a decrease in the C-fiber-evoked response that was respectively $31 \pm 6\%$ and $52 \pm 11\%$ of baseline (R-M ANOVA followed by Bonferroni post-hoc, $p = 0.021$ and 0.001 respectively) (Figure 5A,B). Moreover, wind up of Sp50 WDR neurons was not affected after 0.6 nmol of orexin A application (Figure 5C).

DISCUSSION

Our study shows that MDH receive descending orexinergic pathway influences from lateral (LH) and perifornical hypothalamic (PFX) areas. Fos expression in these two areas was increased by a tonic noxious stimulation. Interestingly, descending Orexin A neurons to MDH and Fos expression were primarily distributed within the PFX area. Furthermore, C-fiber-evoked action potential firing of trigeminal WDR neurons was inhibited after intracisternal application of orexin A.

LH and PFX hypothalamic areas are activated by tonic trigeminal noxious stimulation.

Our results are consistent with those previously reported an activation of central areas after spinal noxious stimulations. Indeed, Fos protein expression has been used as a marker for neuronal activation after noxious stimuli (Zhu et al., 2002). Hypothalamic orexin neurons can be activated either by a noxious electrical foot shock or by carrageenan induced inflammation (Zhu et al., 2002; Watanabe et al., 2005).

Pain has been considered as stressful and aversive stimuli. Our results indicate that tonic trigeminal noxious stimulation activated preferentially the perifornical area neurons. However, current evidence indicated a dichotomy in orexin function, such that orexin neurons in the lateral hypothalamus regulate reward processing for food and abused drugs, whereas those in the perifornical hypothalamus regulate arousal and response to stress (Harris and Aston-jones, 2006).

LH and PFX hypothalamic projecting neurons to MDH contains orexin

Earlier immunolabelling studies in the rat and the mouse have shown that substantial orexin A fibers originated from LH and/or PFX occurred throughout the spinal cord, with no

obvious regional localization except in lamina I and II where they are denser, and in the MDH (van den Pol, 1999; Cutler et al., 1999). As in our study, orexin-immunoreactive fibers are also present in the oral part of spinal trigeminal nucleus, and with a high density in the superficial laminae (gelatinous layer) of the caudal part (Peyron et al., 1998).

Immunoelectron microscopic examination of orexin A-like immunoreactive fibers in the rat spinal dorsal horn have shown axons terminals making synapses on dendrites of superficial lamina neurons (Guan et al., 2003) which are known to receive the nociceptive inputs from periphery, suggesting that the LH orexin A descending neurons may be involved in pain modulation mechanisms.

Orexin decreases the C-fiber-evoked responses of trigeminal WDR neurons to facial noxious stimulation.

We reported here that intracisternal orexin A (at the dose of 0.6 nmol) decrease the C-fiber-evoked responses of Sp5O WDR neurons to electrical stimulation of their cutaneous receptive field whereas the A delta fiber evoked responses were not affected.

The orexin A was applied at the bulbar surface where MDH neuronal networks, receiving C-fiber afferent terminals, can modulate the nociceptive C-fiber activity that reach WDR neurons in the Sp5O located approximately 3 mm more rostrally (Dallel et al., 1998; Voisin et al., 2002; Coste et al., 2008; Lapirot et al., 2011). In these later studies, A-delta evoked responses were not affected by microinjections into the superficial layers of MDH. So, we can postulated that intracisternal injections performed in our study could act in the same way as engaging the modulator neuronal network of C-fiber ascending message of MDH to Sp5O. Moreover, our results show that orexin A do not affect the Sp5O WDR neurons windup; which suggest that inhibition of nociceptive transmission could be mediated by presynaptic mechanism on C-fiber terminals in superficial laminae of MDH. This hypothesis is supported

also by the existence of orexin 1 receptor in the dorsal root ganglia small-diameter cells that express peripherin, a marker of C fibre (Hervieu et al., 2001).

The inhibition of trigeminal nociceptive input by orexin A has already been shown in the rat by other previous works. To study the central hypothalamic modulation of trigeminal nociception, Bartsch et al. in 2004 showed that injection of orexin A in posterior hypothalamus decreased the A- and C-fiber responses of trigeminal neurons to dural (meningeal input) electrical stimulation as well as responses to noxious thermal stimulation of the facial skin.

In contrast, intravenously injected orexin A selectively inhibited the A-fiber but not C-fiber evoked responses of trigeminal neurones to electrical dural stimulations (Holland et al., 2006). Moreover trigeminal activities responding to thermal or mechanical facial cutaneous stimulations applied in V1 (ophthalmic territory of trigeminal nerve) were not affected by orexin A (Holland et al., 2006). The difference of effects, between the two studies, on C-fiber response (inhibited or not) could be due to the net effect of orexin A on C-fiber inputs. Intravenous orexin A might result in inhibitory effects in areas as well as excitatory effects in other ones (Holland et al., 2006). Orexin A could act on different structures including hypothalamic descending inhibitory pathways that relay in the periaqueductal grey matter (PAG), locus coeruleus or nucleus raphe magnus to terminate in the MDH (Peyron et al., 1998; van den Pol, 1999). In the case of intravenous injection, orexin A could act also at the peripheral terminals of primary afferents (Bingham et al., 2001). Orexin A is able to inhibit neurogenic dural vasodilatation via inhibition of release of CGRP from trigeminal neurons (Holland et al., 2005).

The involvement of an orexin A descending inhibitory system of segmental nociceptive messages is supported also by behavioral studies using intrathecal applications. Indeed, intrathecal injection of 0.3 nmol of orexin-A reduced mechanical allodynia induced by carrageenan inflammation or nerve ligation in the rat (Yamamoto et al., 2003a; Yamamoto et

al., 2003b). In the mouse, intrathecally applied orexin A showed antinociceptive effects in thermal (hot-plate, tail-flick, paw-withdrawal), mechanical (tail-pressure), and chemical (formalin, capsaicin and abdominal stretch) nociceptive tests (Mobarakeh et al., 2005). In the rat, intrathecal orexin A increased also the hot plate latency and reduced nociceptive responses as the expression of Fos-like immunoreactivity in lamina I-II of spinal dorsal horn induced by subcutaneous paw formalin injection (Yamamoto et al., 2002)

In conclusion, our study shows that, superficial MDH is under control of descending orexinergic neuronal pathways originating from lateral and perifornical hypothalamic areas that can be activated by tonic inflammatory facial noxious input. This control results in a selective orexin-A-related segmental inhibition of C-fiber evoked responses of WDR trigeminal neurons.

REFERENCES

Bartsch T, Levy MJ, Knight YE, Goadsby PJ. 2004. Differential modulation of nociceptive dural input to [hypocretin] orexin A and B receptor activation in the posterior hypothalamic area. *Pain* 109(3):367-78.

Benjamin L, Levy MJ, Lasalandra MP, Knight YE, Akerman S, Classey JD, Goadsby PJ. 2004. Hypothalamic activation after stimulation of the superior sagittal sinus in the cat: a Fos study. *Neurobiol Dis* 16(3):500-5.

Bingham S, Davey PT, Babbs AJ, Irving EA, Sammons MJ, Wyles M, Jeffrey P, Cutler L, Riba I, Johns A, Porter RA, Upton N, Hunter AJ, Parsons AA. 2001. Orexin-A, an hypothalamic peptide with analgesic properties. *Pain* 92(1-2):81-90.

Charbit AR, Akerman S, Holland PR, Goadsby PJ. 2009. Neurons of the dopaminergic/calcitonin gene-related peptide A11 cell group modulate neuronal firing in the trigeminocervical complex: an electrophysiological and immunohistochemical study. *J Neurosci* 29(40):12532-41.

Chiou LC, Lee HJ, Ho YC, Chen SP, Liao YY, Ma CH, Fan PC, Fuh JL, Wang SJ. 2010. Orexins/hypocretins: pain regulation and cellular actions. *Curr Pharm Des* 16(28):3089-100.

Coste J, Voisin DL, Luccarini P, Dallel R. 2008. A role for wind-up in trigeminal sensory processing: intensity coding of nociceptive stimuli in the rat. *Cephalalgia* 28(6):631-9.

- Cutler DJ, Morris R, Shridhar V, Wattam TA, Holmes S, Patel S, Arch JR, Wilson S, Buckingham RE, Evans ML, Leslie RA, Williams G. 1999. Differential distribution of orexin-A and orexin-B immunoreactivity in the rat brain and spinal cord. *Peptides* 20(12):1455-70.
- Dafny N, Dong WQ, Prieto-Gomez C, Reyes-Vazquez C, Stanford J, Qiao JT. 1996. Lateral hypothalamus: site involved in pain modulation. *Neuroscience* 70(2):449-60.
- Dallel R, Duale C, Luccarini P, Molat JL. 1999. Stimulus-function, wind-up and modulation by diffuse noxious inhibitory controls of responses of convergent neurons of the spinal trigeminal nucleus oralis. *Eur J Neurosci* 11(1):31-40.
- Dallel R, Duale C, Molat JL. 1998. Morphine administered in the substantia gelatinosa of the spinal trigeminal nucleus caudalis inhibits nociceptive activities in the spinal trigeminal nucleus oralis. *J Neurosci* 18(10):3529-36.
- De Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG. 1998. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(1):322-7.
- Denuelle M, Fabre N, Payoux P, Chollet F, Geraud G. 2007. Hypothalamic activation in spontaneous migraine attacks. *Headache* 47(10):1418-26.
- Fleetwood-Walker SM, Hope PJ, Mitchell R. 1988. Antinociceptive actions of descending dopaminergic tracts on cat and rat dorsal horn somatosensory neurones. *J Physiol* 399:335-48.
- Franco AC, Prado WA. 1996. Antinociceptive effects of stimulation of discrete sites in the rat hypothalamus: evidence for the participation of the lateral hypothalamus area in descending pain suppression mechanisms. *Braz J Med Biol Res* 29(11):1531-41.

Guan JL, Wang QP, Shioda S. 2003. Immunoelectron microscopic examination of orexin-like immunoreactive fibers in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Brain Res* 987(1):86-92.

Hamba M, Hisamitsu H, Muro M. 1990. Nociceptive projection from tooth pulp to the lateral hypothalamus in rats. *Brain Res Bull* 25(3):355-64.

Hervieu GJ, Cluderay JE, Harrison DC, Roberts JC, Leslie RA. 2001. Gene expression and protein distribution of the orexin-1 receptor in the rat brain and spinal cord. *Neuroscience* 103(3):777-97.

Holland PR, Akerman S, Goadsby PJ. 2005. Orexin 1 receptor activation attenuates neurogenic dural vasodilation in an animal model of trigeminovascular nociception. *J Pharmacol Exp Ther* 315(3):1380-5.

Holland PR, Akerman S, Goadsby PJ. 2006. Modulation of nociceptive dural input to the trigeminal nucleus caudalis via activation of the orexin 1 receptor in the rat. *Eur J Neurosci* 24(10):2825-33.

Holland PR, Goadsby PJ. 2009. Cluster headache, hypothalamus, and orexin. *Curr Pain Headache Rep* 13(2):147-54.

Holle D, Katsarava Z, Obermann M. 2011. The hypothalamus: specific or nonspecific role in the pathophysiology of trigeminal autonomic cephalalgias? *Curr Pain Headache Rep* 15(2):101-7.

Lapirot O, Melin C, Modolo A, Nicolas C, Messaoudi Y, Monconduit L, Artola A, Luccarini P, Dallel R. 2011. Tonic and phasic descending dopaminergic controls of nociceptive transmission in the medullary dorsal horn. *Pain* 152(8):1821-31.

- Lopez R, Young SL, Cox VC. 1991. Analgesia for formalin-induced pain by lateral hypothalamic stimulation. *Brain Res* 563(1-2):1-6.
- Malick A, Jakubowski M, Elmquist JK, Saper CB, Burstein R. 2001. A neurohistochemical blueprint for pain-induced loss of appetite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(17):9930-5.
- May A, Kaube H, Buchel C, Eichten C, Rijntjes M, Juptner M, Weiller C, Diener HC. 1998. Experimental cranial pain elicited by capsaicin: a PET study. *Pain* 74(1):61-6.
- Millan MJ. 2002. Descending control of pain. *Prog Neurobiol* 66(6):355-474.
- Mobarakeh JI, Takahashi K, Sakurada S, Nishino S, Watanabe H, Kato M, Yanai K. 2005. Enhanced antinociception by intracerebroventricularly and intrathecally-administered orexin A and B (hypocretin-1 and -2) in mice. *Peptides* 26(5):767-77.
- Molander C, Xu Q, Rivero-Melian C, Grant G. 1989. Cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the rat: II. The cervical and upper thoracic cord. *J Comp Neurol* 289(3):375-85.
- Morita N, Tamai Y, Tsujimoto T. 1977. Unit responses activated by tooth pulp stimulation in lateral hypothalamic area of rat. *Brain Res* 134(1):158-60.
- Paxinos G, Watson CW. 2007. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 6th Edition. San Diego: Academic Press.
- Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, De Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, Kilduff TS. 1998. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci* 18(23):9996-10015.

- Rainero I, Rubino E, Gallone S, Fenoglio P, Picci LR, Giobbe L, Ostacoli L, Pinessi L. 2011. Evidence for an association between migraine and the hypocretin receptor 1 gene. *J Headache Pain* 12(2):193-9.
- Rudomin P, Malliani A, Borlone M, Zanchetti A. 1965. Distribution of electrical responses to somatic stimuli in the diencephalon of the cat with special reference to the hypothalamus. *Arch Ital Biol* 103:60-89.
- Sakurai T, Mieda M. 2011. Connectomics of orexin-producing neurons: interface of systems of emotion, energy homeostasis and arousal. *Trends Pharmacol Sci* 32(8):451-62.
- Shigenaga Y, Matano S, Okada K, Sakai A. 1973. The effects of tooth pulp stimulation in the thalamus and hypothalamus of the rat. *Brain Res* 63:402-7.
- Strassman AM, Vos BP. 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. *J Comp Neurol* 331(4):495-516.
- Swanson LW, Sanchez-Watts G, Watts AG. 2005. Comparison of melanin-concentrating hormone and hypocretin/orexin mRNA expression patterns in a new parcelling scheme of the lateral hypothalamic zone. *Neurosci Lett* 387(2):80-4.
- Ter Horst GJ, Meijler WJ, Korf J, Kemper RH. 2001. Trigeminal nociception-induced cerebral Fos expression in the conscious rat. *Cephalalgia* 21(10):963-75.
- van den Pol AN. 1999. Hypothalamic hypocretin (orexin): robust innervation of the spinal cord. *J Neurosci* 19(8):3171-82.

- Voisin DL, 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(1):183-93.
- Watanabe S, Kuwaki T, Yanagisawa M, Fukuda Y, Shimoyama M. 2005. Persistent pain and stress activate pain-inhibitory orexin pathways. *Neuroreport* 16(1):5-8.
- Yamamoto T, Nozaki-Taguchi N, Chiba T. 2002. Analgesic effect of intrathecally administered orexin-A in the rat formalin test and in the rat hot plate test. *Br J Pharmacol* 137(2):170-6.
- Yamamoto T, Saito O, Shono K, Aoe T, Chiba T. 2003a. Anti-mechanical allodynic effect of intrathecal and intracerebroventricular injection of orexin-A in the rat neuropathic pain model. *Neurosci Lett* 347(3):183-6.
- Yamamoto T, Saito O, Shono K, Hirasawa S. 2003b. Activation of spinal orexin-1 receptor produces anti-allodynic effect in the rat carrageenan test. *Eur J Pharmacol* 481(2-3):175-80.
- Yamamoto T, Saito O, Shono K, Hirasawa S. 2003c. Activation of spinal orexin-1 receptor produces anti-allodynic effect in the rat carrageenan test. *Eur J Pharmacol* 481(2-3):175-80.
- Yamamoto T, Saito O, Shono K, Hirasawa S. 2003d. Activation of spinal orexin-1 receptor produces anti-allodynic effect in the rat carrageenan test. *Eur J Pharmacol* 481(2-3):175-80.
- Yan JA, Ge L, Huang W, Song B, Chen XW, Yu ZP. 2008. Orexin affects dorsal root ganglion neurons: a mechanism for regulating the spinal nociceptive processing. *Physiol Res* 57(5):797-800.
- Zhu L, Onaka T, Sakurai T, Yada T. 2002. Activation of orexin neurones after noxious but not conditioned fear stimuli in rats. *Neuroreport* 13(10):1351-3.

FIGURE TO LEGENDS

Figure 1: Fos-ir in the LH and PFX areas following subcutaneous injection of saline (n = 6) or formalin (1.5%, 50 μ l, n = 5) into the right vibrissa pad. Photomicrograph of coronal sections showing Fos-immunoreactive cells (red) after facial saline (A) or formalin (B) injection. Note that formalin induces a strong increase in Fos expression. The increase is observed on the ipsi and contralateral hypothalamic areas with no significant difference between the two sides. C) Histograms illustrating the average number of Fos positive neurons observed in LH and PFX after facial saline injection (white column) and formalin injection (black column). Each histogram corresponds to the average number per section of Fos positive cells of both side of each area. Scale Bar: 100 μ m.

Figure 2: (A) Schematic representation of fluorogold (FG) microinjection sites into MDH (n = 5). (B) Photomicrograph illustrating a representative FG site into MDH. FG injection site appeared as a dense center of FG staining surrounded by a halo of FG immunoreactive neurons. Scale bar = 300 μ m.

Figure 3: Descending orexinergic projections to the MDH originate from the LH and PFX hypothalamic areas. (A) Photomicrograph of coronal sections showing OrexinA-immunoreactive neurons (green), fluorogold (FG, red) neurons, and double-labeled neurons (yellow). (B and D) Histogram illustrating the average number of FG/OrexinA neurons in the LH (B) and PFX (D) areas: OrexinA neurons (gray column), FG neurons (white column) and co-labeled neurons (black column). (C and E) Rostrocaudal distribution of FG/OrexinA neurons in the LH and PFX area, respectively. Open and black filled circle represent respectively the mean number of FG and co-labeled cells at various levels of the LH and PFX areas following microinjection of the fluorogold into the MDH (n = 5). Scale Bar: 50 μ m.

Figure 4: OrexinA fibers -like immunoreactivity in a representative coronal section of the medullary dorsal horn (MDH). Note that the fibers are mainly confined to the superficial laminae (I-II) of the MDH. Scale bar: 100 μ m.

Figure 5: Nociceptive evoked responses of Sp50 WDR neurons modulation by MDH orexin 1 receptor-activation. (A) Example illustrating the time course effect of intracisternal 0.6 nmol orexin A on the c-fiber evoked responses of a Sp50 WDR neuron. (B,D) Time course effect of intracisternal 0.3 and 0.6 nmol of orexin A on A-delta (D, n= 6) and C-fiber (B, n= 4) evoked responses of Sp50 WDR neurons to train of 30 electrical stimulation of their receptive field. Note that C-fiber responses are only significantly affected at the dose of 0.6 nmol of orexin A. (C) Cumulative results illustrating the dynamic properties of the successive responses to 15 stimulations before (control) and after intracisternal orexin A application (t = 40 min). Superimposed on the plots are the polynomial fits of the data (before, $y = -0,0834x^2 + 2,5241x + 1,1659$; after $y = -0,109x^2 + 2,7934x - 2,7396$). *, P<0.05; **, P<0.01

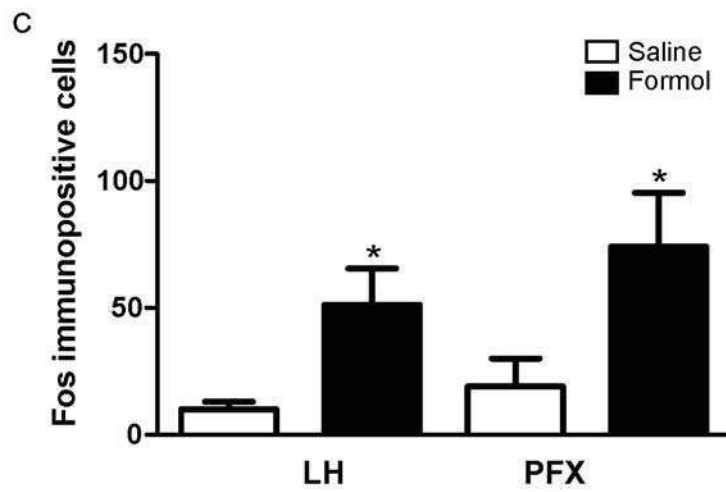
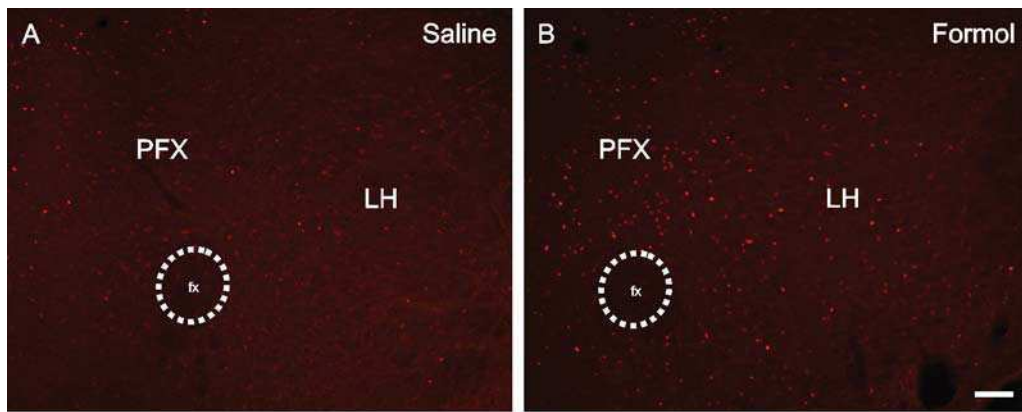


Figure 1

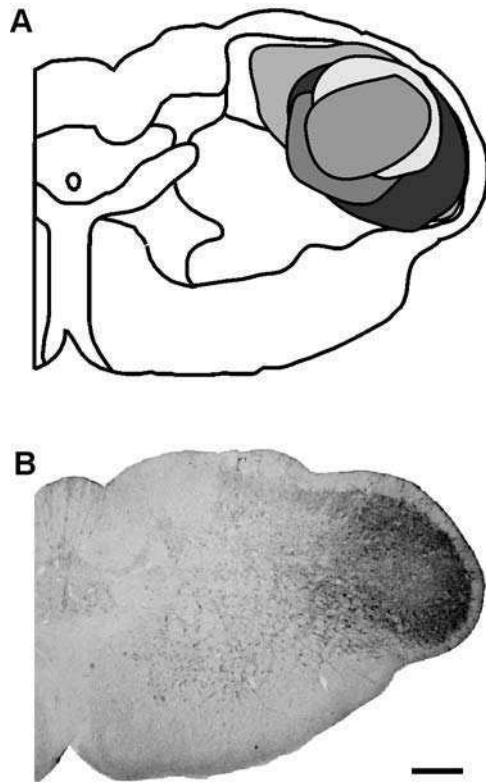
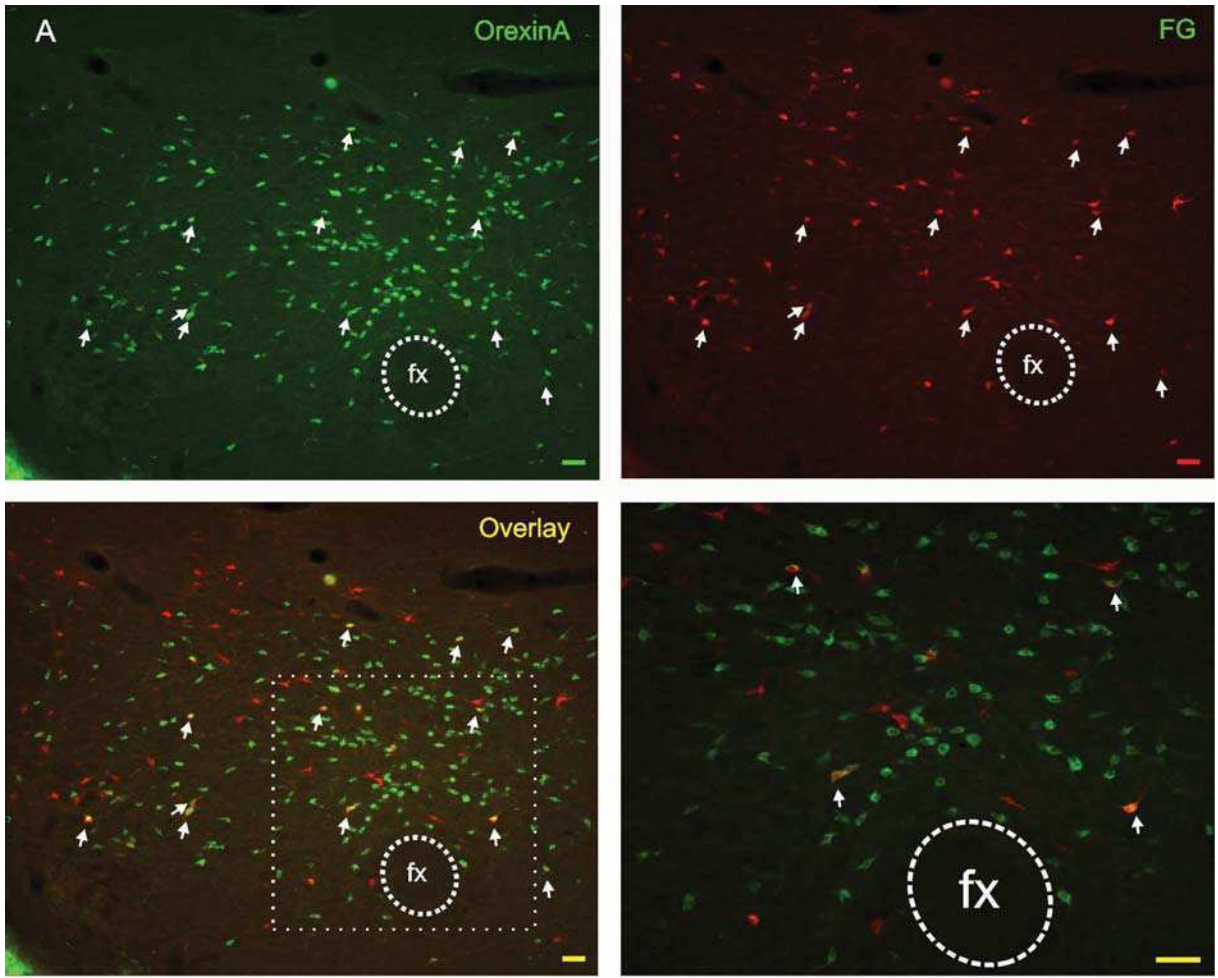


Figure 2



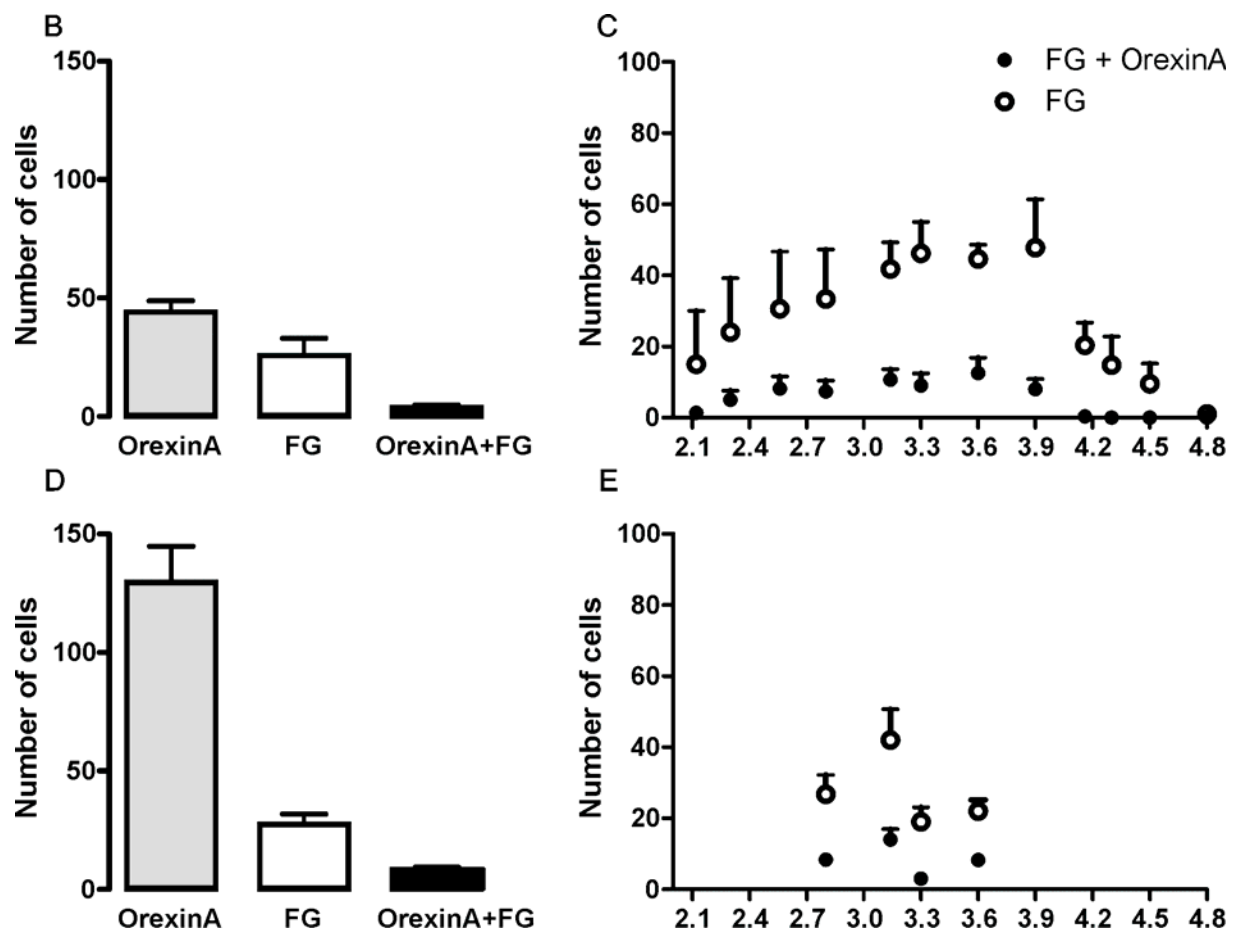


Figure 3

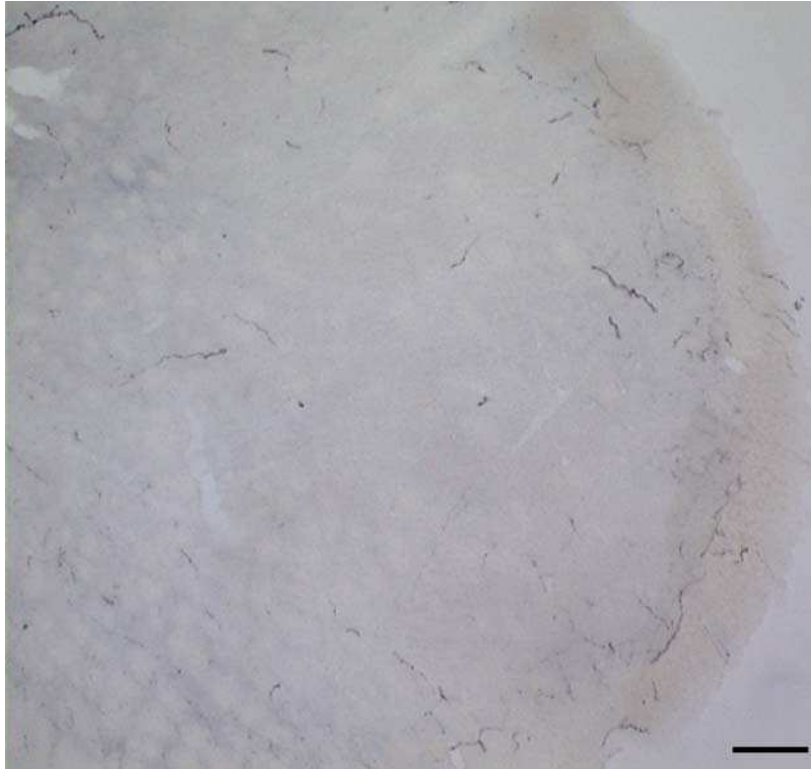


Figure 4

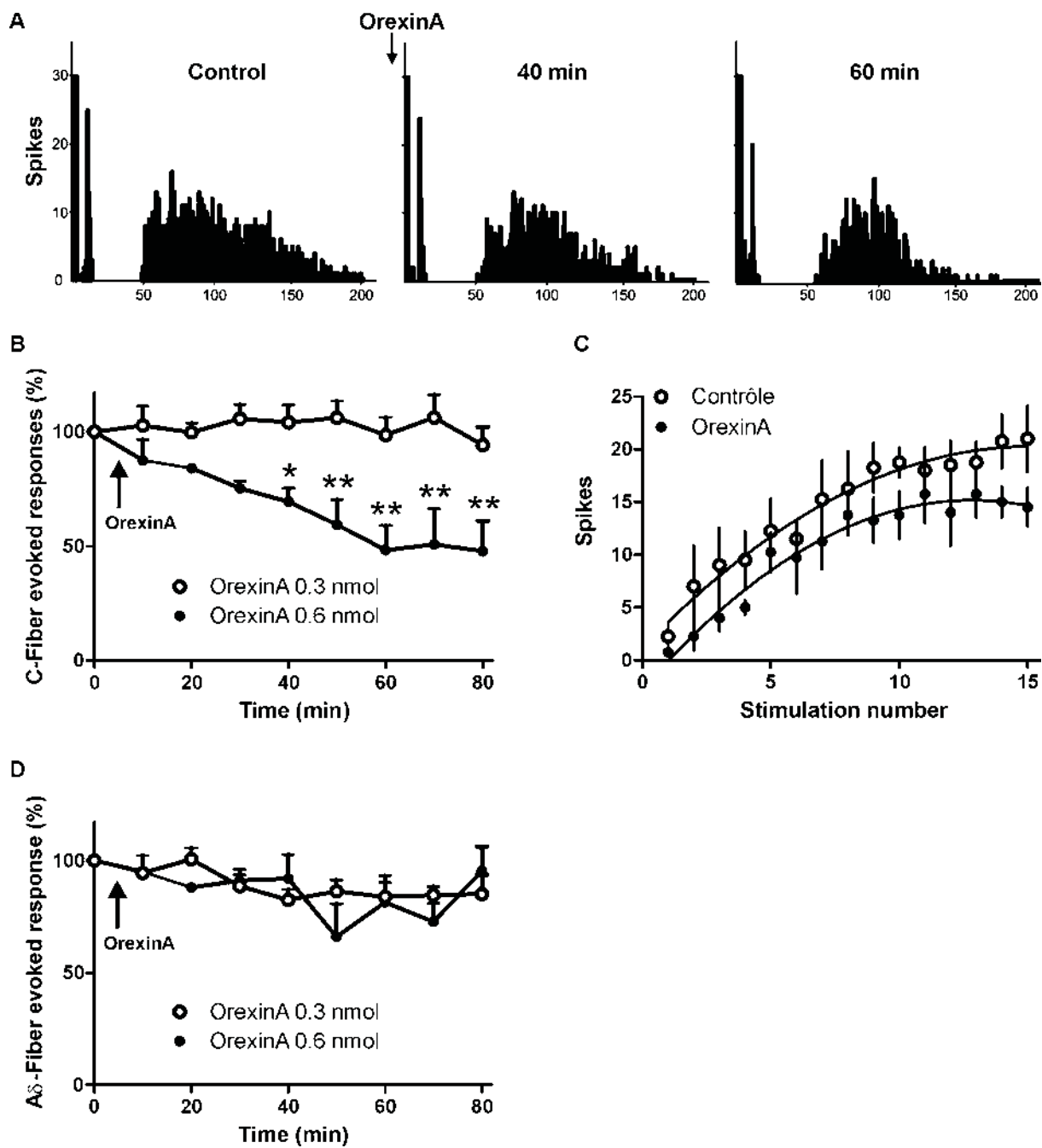


Figure 5

Synthèse et discussion générale

5.1 Organisation des projections hypothalamo-trigéminales: particularités et implications dans la nociception trigéminal

Notre étude anatomique utilisant un traceur rétrograde a permis de montrer que, comme la corne dorsale de la moelle (Cechetto and Saper, 1988), le sous-noyau caudal du trijumeau (Sp5C) reçoit les terminaisons provenant principalement de cinq noyaux de l'hypothalamus : paraventriculaire (PVN), latéral (LH), périfornical (PFX), A11 et rétrochiasmatique (RCA). A la différence des projections unilatérales (ipsilatérales) au niveau spinal (Cechetto and Saper, 1988), le Sp5C reçoit les projections de façon bilatérale avec une légère prédominance ipsilatérale pour la plupart des noyaux hypothalamiques. Ces données suggèrent que les contrôles descendants au niveau trigéminal seraient plus puissants de ceux exercés au niveau spinal. Par exemple, ils pourraient expliquer les différences des seuils des réponses dues à la mise en jeu des fibres C évoquées par la stimulation électrique des champs récepteurs cutanés des neurones tri-géminaux. En effet, ces seuils sont supérieurs à ceux observés pour les neurones spinaux (Dallel et al., 1999). De façon intéressante, nos résultats montrent que c'est la zone ophtalmique (V1) du Sp5C reçoit les projections hypothalamiques les plus denses en comparaison avec les zones maxillaire (V2) et mandibulaire (V3). La zone V1 du Sp5C est innervée principalement par des afférences primaires méningées. Ce résultat suggère une implication de la voie hypothalamo-trigéminal dans le contrôle des douleurs céphaliques. Les résultats de certains travaux cliniques ont d'ailleurs fait état de l'implication de l'hypothalamus dans certaines céphalées comme la migraine ou l'algie vasculaire de la face. En effet, une dérégulation hormonale hypothalamo-dépendante a été rapportée chez les patients souffrant de migraine chronique ou d'algie vasculaire de la face (Leone and Bussone, 1993; Peres et al., 2001). La tomographie par émission de positons a permis de montrer une activation de l'hypothalamus lors des crises de migraine (May et al., 1998; Denuelle et al., 2007). Enfin, La stimulation électrique de l'hypothalamus postérieur réduit fortement l'intensité et la fréquence de la douleur chez les patients souffrant d'algie vasculaire de la face (Leone et al., 2010).

Plus particulièrement, nous avons montré que la zone ophtalmique (V1) du Sp5C est la seule à recevoir des terminaisons axonales depuis les neurones du RCA. Le rôle du RCA dans la nociception est peu documenté. Nous savons cependant qu'une population des neurones de ce noyau synthétise l'hormone stimulatrice des α -mélanocytes ou mélanocortine (alphaMSH) et que cette hormone intervient dans la douleur. En effet, des travaux chez la souris ont montré

que l'activation des récepteurs MC4 par une injection d'agoniste au niveau spinal (intrathécal) entraînait un effet pro-nociceptif (hyperalgésie) lors du test au formol (Bellasio et al., 2003). Cependant le RCA peut aussi être impliqué dans un contrôle inhibiteur de la nociception. En effet, l'injection intrathécale du peptide CART, synthétisé par des neurones du RCA, induit un effet anti-nociceptif face à une stimulation thermique nociceptive (test de la plaque chaude), dans une douleur tonique aiguë (test au formol) ou inflammatoire (carragénine intra-plantaire), et réduit l'hyperalgésie thermique et l'allodynie mécanique chez des souris neuropathiques (Ohsawa et al., 2000; Damaj et al., 2003; Damaj et al., 2006).

D'autres travaux ont rapporté que les neurones du RCA sont activés par la leptine (Elias et al., 1998), une hormone connue comme favorisant la baisse de la prise alimentaire et la perte de poids. De façon intéressante, des études épidémiologiques récentes (Peterlin et al., 2010; Evans et al., 2012) suggèrent que la migraine et certaines céphalées pourraient être associées à l'obésité avec comme vecteur possible, entre autres, la leptine qui serait impliquée dans les deux phénomènes. Le RCA est aussi connu pour intervenir dans la régulation du cycle circadien via la modulation de la sécrétion de la mélatonine pinéale. En effet, il est impliqué dans le mécanisme d'inhibition de la sécrétion de mélatonine induit par une photo-stimulation nocturne de la rétine (Cipolla-Neto et al., 1999). L'intégration à son niveau des messages rétiniens, son implication possible dans un contrôle descendant facilitateur de la nociception ainsi que nos résultats montrant une sélectivité des projections descendantes vers la zone ophtalmique V1 du Sp5C suggèrent que le RCA pourrait jouer un rôle dans la photophobie associée à la douleur migraineuse.

En résumé, cette étude a permis d'établir la localisation des neurones hypothalamo-trigéminaux et de préciser la densité ainsi que l'organisation rostro-caudale des projections hypothalamo-trigéminales. Ces résultats suggèrent un rôle majeur des projections hypothalamo-trigéminales dans la physiologie et probablement la physiopathologie de douleurs trigéminales céphaliques telles que la migraine.

Dans une seconde étude, nous avons caractérisé le phénotype neurochimique des neurones hypothalamo-trigéminaux. Par rapport à la moelle (Cechetto and Saper, 1988), où on observe une population conséquente de neurones ocytocine et vasopressine, il apparaît que le Sp5C reçoit une très faible innervation des neurones ocytocine (4% ; n = 5) et vasopressine (1% ; n = 3) de l'hypothalamus (Figure 1-2). Ces résultats suggèrent que, contrairement à la moelle, la vasopressine et l'ocytocine ne seraient pas impliquées dans la modulation des messages nociceptifs trigéminaux. En revanche, nous avons observé que des projections hypothalamo-trigéminales denses provenant des neurones dopaminergiques du noyau A11 ainsi que des

neurones oréxinerigiques des noyaux LH et PFX. Le rôle de la dopamine et de l'oréxine dans la modulation des messages nociceptifs trigéminaux a été exploré de façon plus précise dans la suite des études.

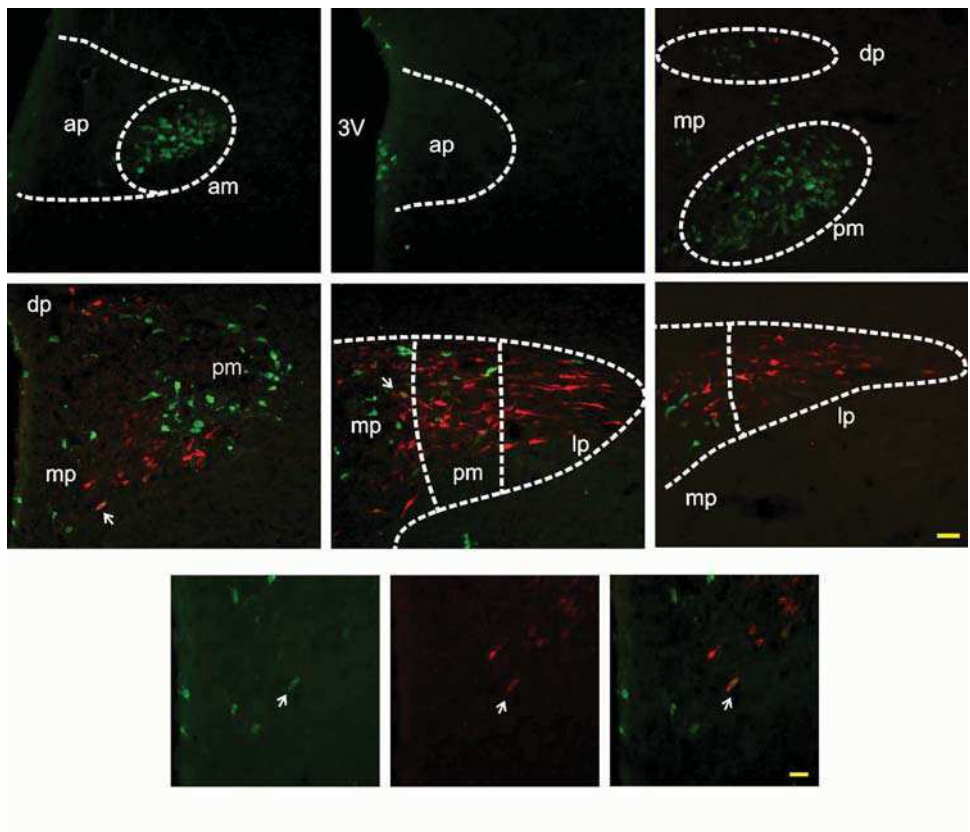


Figure 1. Distribution rostro-caudale des cellules ocytocinergiques (vert) et FG (rouge) immunopositives au niveau du PVN ipsilatéral. 3V: 3^{ème} ventricule, ap : partie parvocellulaire antérieure ; am : partie magnocellulaire antérieure; dp: parvocellulaire dorsal; mp: parvocellulaire médian; pm: partie magnocellulaire postérieure ; lp: postérieur latéral. Barre échelle = 50µm

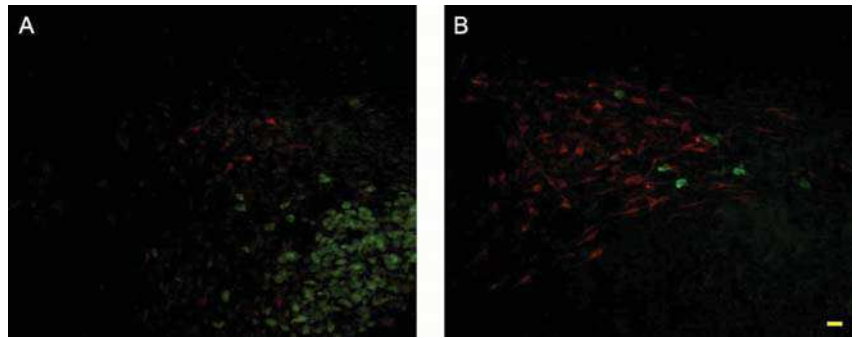


Figure 2. Cellules Vasopressine (vert) et FG (rouge) immunopositives dans le PVN ipsilatéral à -1.7 (A) et -1.9 (B) mm postérieurs au Bregma. Barre échelle =50µm

5.2 Rôle des neurones dopaminergiques du noyau A11 dans la modulation de la nociception trigéminal

Afférences du Noyau A11

Nos données anatomiques montrent aussi que le noyau hypothalamique A11 reçoit des projections denses de 3 structures qui sont impliquées dans le traitement des aspects émotionnels de la douleur : le noyau latéral du septum, le cortex préfrontal, et l'habenula latérale (Figure 3).

Des études chez l'homme et l'animal ont rapporté l'implication du noyau latéral du septum dans la nociception. En effet, ce noyau est activé par des stimuli nociceptifs viscéraux, inflammatoires et par des stimulations électriques de la pulpe dentaire (Palestini et al., 1987; Traub et al., 1996; Aloisi et al., 1997). De plus, la stimulation électrique du noyau latéral du septum réduit la douleur spontanée ainsi que l'allodynie chez des patients souffrant de douleurs neuropathiques chroniques (Schvarcz, 1993).

Le noyau A11 reçoit aussi des projections du cortex préfrontal médian, connu pour son implication dans le traitement cognitif et émotionnel de la douleur (Apkarian et al., 2005; Vertes, 2006; Moisset and Bouhassira, 2007). Il peut aussi être plus directement impliqué dans la perception et le traitement de la douleur. Des études d'imagerie par résonance magnétique, électrophysiologique et immunohistochimique (expression de Fos) montrent l'activation du cortex préfrontal par une stimulation nociceptive viscérale (Traub et al., 1996; Lazovic et al., 2005; Gao et al., 2006; Gibney et al., 2010). Récemment, le cortex préfrontal a été impliqué dans la nociception trigéminal. L'allodynie mécanique chez des rats rendus neuropathiques par ligature du nerf infra orbitaire est associée à l'activation du cortex préfrontal (Devoize et al., 2011)

Le noyau A11 reçoit également des projections de l'habenula latérale (cf figure 3), une structure localisée dans la partie postérieure-médiale du thalamus dorsal et qui est connue pour son implication dans les phénomènes d'aversion, de récompense, d'addiction, d'anxiété et plus récemment dans la modulation de la douleur (Shelton et al., 2012). Les données précliniques attribuent à l'habenula latérale un rôle putatif et affectif dans la modulation de la douleur (Shelton et al., 2012). L'habenula latérale reçoit des projections directes de la couche I de la moelle épinière et du complexe sensitif du trijumeau (Craig, 2003). Les neurones de l'habenula latérale répondent sélectivement aux stimuli nociceptifs (Gao et al., 1996). L'activation de ce noyau, par stimulation électrique, réduit l'hyperalgésie induite par le test au formol (Cohen and Melzack, 1986).

Ces données anatomiques suggèrent que le noyau A11 serait sous l'influence de structures impliquées dans les aspects émotionnels de la douleur.

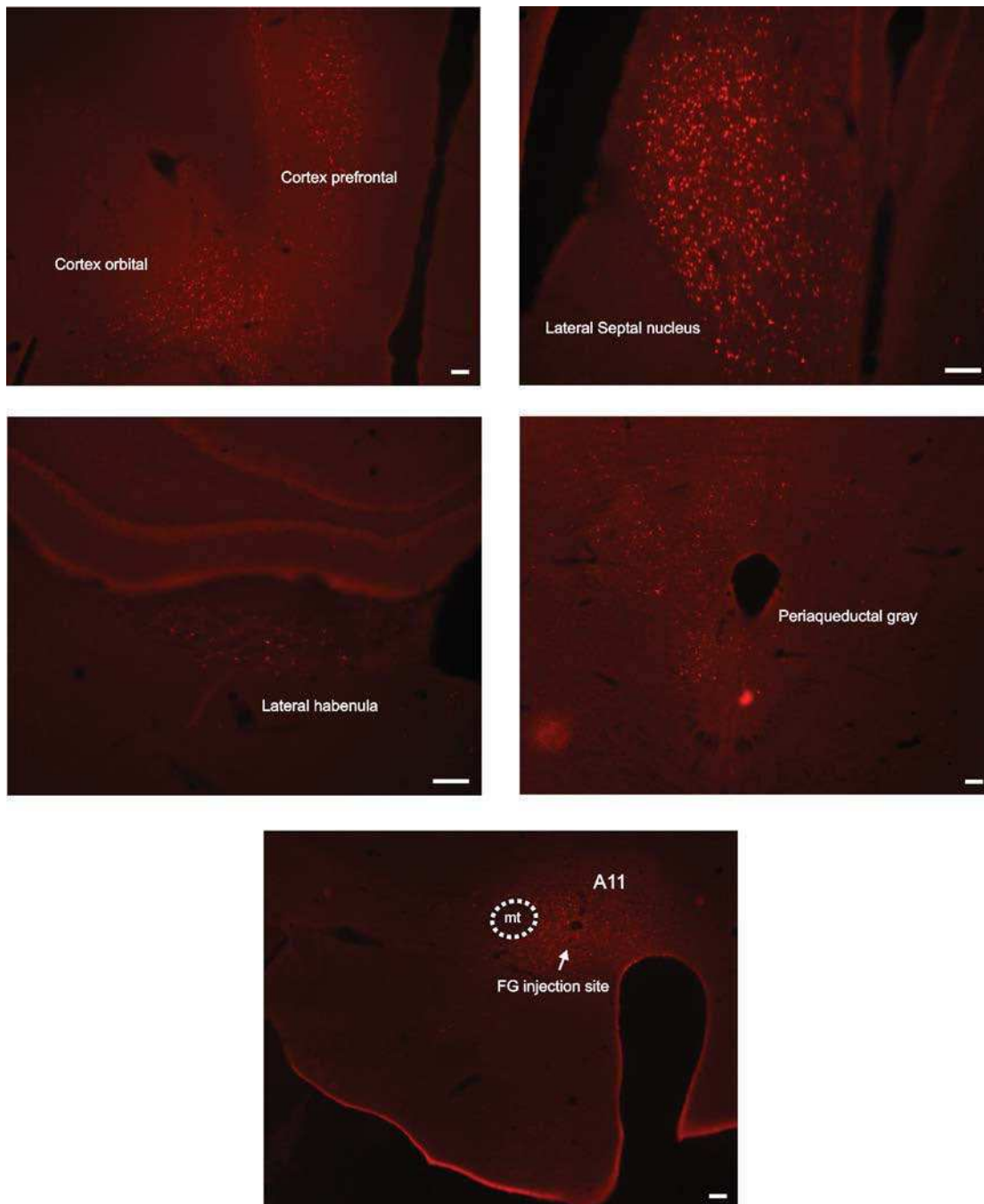


Figure 3 : Les principales afférences du noyau A11. Distribution des cellules marquées de façon rétrograde suite à une injection de Fluorogold dans le noyau A11 (n = 5). Barre échelle = 100µm.

Activation du noyau A11 par une stimulation tonique nociceptive

Chez l'animal, l'hypothalamus est activé par un certain nombre de stimuli nociceptifs comme la stimulation électrique des méninges (Malick et al., 2001) ou par injection intra-plantaire de substances inflammatoires (Watanabe et al., 2005; Suzuki et al., 2009; Culman et al., 2010). Notre étude montre pour la première fois une activation du noyau hypothalamique A11 par une stimulation nociceptive inflammatoire tonique (une injection sous-cutanée de formol dans la face). Il est possible que cette activation se fasse via une voie directe trigémino-hypothalamique mais il est plus probable que cette activation soit le résultat de la mise en jeu de plusieurs relais. En effet, le noyau A11 reçoit des projections de l'aire parabrachiale (Bester et al., 1997) mais aussi de la substance grise périaqueducule (PAG) (cf figure 3). Ceci suggère que ce noyau serait activé via la voie trigémino-mésencéphalique suite à une stimulation nociceptive inflammatoire.

Rôle des neurones dopaminergiques dans la modulation de la nociceptin trigéminale

Nos travaux montrent que les neurones descendant issues du noyau A11 sont majoritairement dopaminergiques (60% FG-TH, 10% FG-CGRP). Par rapport à la moelle qui reçoit principalement des projections ipsilatérales (Skagerberg and Lindvall, 1985; Orazzo et al., 1993; Qu et al., 2006; Barraud et al., 2010), les projections trigéminales du noyau A11 sont bilatérales. Cette organisation pourrait expliquer le caractère diffus et parfois bilatéral de certaines douleurs céphaliques comme dans le cas de la migraine chronique.

Le système dopaminergique a été impliqué dans la modulation de la nociception chez l'homme et l'animal. Des études cliniques montrent une réelle corrélation entre l'activation du système dopaminergique et la perception de la douleur chez des sujets en réponse à des stimuli thermique et chimique. En effet, une réduction de la dopamine a été associée à une hyperalgésie (Hagelberg et al., 2002; Pertovaara et al., 2004; Scott et al., 2006; Scott et al., 2007). De plus, une étude a rapporté une réduction de l'activité dopaminergique chez des patients souffrant de brûlure buccale (Hagelberg et al., 2003b). Chez l'animal, des microinjections d'agonistes dopaminergiques dans le striatum ou dans le noyau accumbens réduisent la réponse nociceptive induite par une injection de formol intra-plantaire chez le rat (Taylor et al., 2003). De plus l'administration d'agoniste dopaminergique réduit les réponses dues à la mise en jeu des fibres C évoquée par une stimulation électrique des champs cutanée et méningée des neurones nociceptifs trigéminaux. Cet effet anti-nociceptif met en jeu les

récepteurs D2 de la moëlle et du complexe sensitif du trijumeau (Fleetwood-Walker et al., 1988; Bergerot et al., 2007; Lapirot et al., 2011).

Pour déterminer le rôle du noyau A11 dans la modulation des messages nociceptifs trigéminaux, nous avons étudié l'effet de la lésion sélective (microinjection de 6-hydroxydopamine et non sélective (microinjection d'acide kainique) des neurones dopaminergiques du noyau A11 sur une douleur tonique évoquée par injection sous-cutané de formol dans la face. De manière inattendue, nos résultats montrent que la lésion du noyau A11 a effet antinociceptif. En effet nous avons observé une réduction significative des 2 phases du test au formol. En accord avec nos résultats (Wei et al., 2009) ; ont rapporté que le blocage du noyau A11 réduit l'allodynie mécanique chez les rats neuropathiques (Wei et al., 2009). Cependant, la majorité des études électrophysiologiques ont observé que la stimulation électrique ou chimique du noyau A11 réduit l'amplitude des réponses des neurones spinaux (Fleetwood-Walker et al., 1988) et trigéminaux (Charbit et al., 2009), évoquée par des stimulations nociceptives cutanées ou méningées. De plus, la lésion électrolytique du noyau A11 augmente l'amplitude des réponses des neurones trigéminaux (Charbit et al., 2009, 2011) évoquée par des stimulations nociceptives cutanées ou méningées. Les mécanismes physiopathologiques sous-tendant l'effet anti-nociceptif de la lésion du noyau A11 sont inconnus. Il serait indirect et pourrait mettre en jeu d'autres noyaux comme le locus coeruleus et/ou la RVM. En effet, les injections intrathécales, d'antagonistes sérotonine ou noradrénaline atténuent l'effet anti-nociceptif induit par l'inhibition du noyau A11 (Wei et al., 2009). Des injections intrathécales de 6-OHDA ou de 5-7 dihydroxytryptamine, dont le but est de lésionner les systèmes noradrénergique et sérotoninergique respectivement, réduisent l'hyperalgésie induite par le test au formol (Tjolsen et al., 1991). De plus, certains récepteurs à la sérotonine se localisent sur des neurones du trijumeau exprimant des récepteurs dopaminergiques (Charbit et al., 2011).

Notons aussi que les études cliniques rapportent une corrélation entre la baisse d'activité de la catéchol-O-méthyltransférase (COMT, enzyme qui métabolise les catécholamines dont la dopamine) et la prévalence d'apparition de la douleur chez des patients souffrant de fibromyalgie, du syndrome du colon irritable et de la pathologie temporomandibulaire (Marbach and Levitt, 1976; Gursoy et al., 2003; Diatchenko et al., 2005; Karling et al., 2011; Martinez-Jauand et al., 2012). Cette baisse d'activité réduit également l'efficacité des traitements morphiniques sur la douleur de type cancer (Rakvag et al., 2005). Chez le rat, des injections systémiques de l'OR486 (un inhibiteur du COMT) augmentent la sensibilité à la douleur induite par la carragénine intra-plantaire (Nackley et al., 2007).

Perspectives

Afin de préciser et renforcer nos résultats, nous devons :

1. Analyser l'expression des récepteurs dopaminergiques (D1 et D2) dans le Sp5C suite à la lésion du noyau A11 par microinjection de 6-OHDA.
2. Caractériser les projections descendantes du noyau A11 à l'aide des techniques de traçage antérograde (Phaseolus vulgaris) afin d'identifier les noyaux relais sur lesquelles il pourrait agir.
3. Vérifier si l'effet anti-nociceptif des lésions du noyau A11 peut être renversé par des injections intracisternales d'agonistes dopaminergiques

Rôle des neurones oréxines de s noyaux latéral et périfornical dans la modulation de la nociception trigéminale

Nos travaux montrent que le noyau latéral de l'hypothalamus (LH) et plus particulièrement le noyau périfornical (PFX) projettent densément sur le Sp5C. A l'aide d'une technique de double marquage, nous avons montré que 15 % des neurones descendants LH et 30 % des neurones descendants PFX sont oréxinerigiques se terminent dans le Sp5C. Les terminaisons oréxinerigiques sont essentiellement localisées dans les couches superficielles (I-II) du Sp5C.

Par approche immunohistochimique (expression de Fos), nous montrons que les neurones du LH et du PFX sont activés par une stimulation tonique nociceptive de la face (injection sous-cutanée de formol). Un résultat similaire a été rapporté chez la souris où une augmentation de l'expression de Fos a été observée dans le LH à la suite d'une inflammation (Watanabe et al., 2005). Nous n'avons pas établi si les neurones exprimant Fos sont oréxinerigiques. D'autres études utilisant par exemple des techniques de double (Fos/oréxine) ou de triple marquage (Fos/Fluorogold/oréxine) sont nécessaires afin de déterminer si des neurones oréxines descendants vers le Sp5C sont activés directement par une stimulation nociceptive.

Nous montrons aussi qu'une stimulation tonique inflammatoire active préférentiellement les neurones du PFX à partir de laquelle sont issues les projections oréxinerigiques les plus denses. De façon intéressante, il a été décrite une dichotomie anatomofonctionnelle entre les neurones oréxine du PFX et ceux du LH. En effet, les neurones orexinerigiques du LH sont impliqués dans les phénomènes d'addiction et de récompense tandis que ceux du PFX sont activés par le stress et pendant le cycle d'éveil (Harris and Aston-Jones, 2006). Ceci nous amène à poser la question suivante : existe-t-il une différence fonctionnelle entre la voie oréxinerigique hypothalamo-trigéminale issue du PFX et celle issue du LH.

Enfin, par approche électrophysiologique nous montrons que l'injection intracisternale d'oréxine A inhibe sélectivement les réponses dues à la mise en jeu des fibres C des neurones à convergence (WDR) trigéminaux. Le rôle de l'oréxine dans la modulation des messages nociceptifs trigéminaux a été exploré par une seule équipe qui a obtenu des résultats paradoxaux. D'une part, ils ont observé que la microinjection d'oréxine A dans l'hypothalamus postérieur (Bartsch et al., 2004) inhibe les réponses dues à la mise des fibres A et C méningées alors que l'administration systémique d'oréxine A affecte sélectivement les réponses dues à la

mise des fibres A méningées (Holland et al., 2006). En revanche, la microinjection d'oréxine A dans l'hypothalamus postérieur inhibe les réponses des neurones nociceptifs trigéminaux évoquées par une stimulation nociceptive thermique (chaud) cutanée alors que l'administration systémique d'oréxine A n'affecte pas les réponses dues à la mise et C des tissus cutanés. Ces différences pourraient s'expliquer par des différences dans le protocole expérimental (anesthésie, mode d'administration, dose utilisée, localisation des neurones enregistrés, ...). Une évaluation par une approche comportementale permettrait de clarifier le rôle de l'oréxine dans la modulation des messages nociceptifs trigéminaux.

Notre étude électrophysiologique montre également que l'administration intracisternale d'oréxine n'affecte pas le wind-up (augmentation progressive de la décharge des neurones nociceptifs lors de la stimulation répétitive des fibres C) des neurones WDR trigéminaux. Ceci suggère que l'oréxine A aurait une action plutôt pré-synaptique. Cette hypothèse est compatible avec les données anatomiques montrant que les récepteurs oréxines sont majoritairement localisées sur les terminaisons des fibres C (Guan et al., 2003).

Perspectives

Dans le but de consolider et compléter les données de l'étude électrophysiologique, il est nécessaire :

1. de renverser l'effet anti-nociceptif de l'oréxine A par le SB 334867, un antagoniste oréxinergique,
2. de vérifier le rôle joué par l'oréxine A sur un modèle comportemental de douleur inflammatoire méningée et cutanée.
3. Et d'évaluer son rôle dans les contrôles inhibiteurs descendants de la douleur (contrôles inhibiteurs diffus induit par stimulations nociceptives).

Les neurones de l'hypothalamus latéral sécrètent également de l'oréxine B. Son rôle dans la nociception est relativement peu documenté et des résultats contradictoires ont été obtenus dans des travaux antérieurs. Alors que Yamamoto et al (2002) ont observé que de l'oréxine B n'a aucun effet antinociceptif, une étude chez la souris montrait que l'oréxine B entraînait un effet antinociceptif lors de tests thermique, mécanique ou chimique (Mobarakeh et al., 2005) mais que cet effet était moindre par rapport à celui de l'oréxine A. De plus, l'injection de l'oréxine B dans l'hypothalamus postérieur entraîne un effet pro-nociceptif sur les réponses du Sp5C à la stimulation de la dure mère chez le rat (Bartsch et al., 2004). Des travaux

complémentaires sont nécessaires afin de déterminer le rôle de l'orexine B dans la modulation de la nociception trigéminal.

En conclusion, mes travaux ont permis :

1. d'établir l'organisation des projections descendantes du noyau hypothalamus sur le sous-noyau caudal du complexe sensitif du trijumeau,
2. d'identifier le phénotype neurochimique des neurones descendants hypothalamo-trigéminaux
3. et préciser le rôle et les mécanismes d'action des neurones dopaminergiques et orexinergiques dans la modulation des messages nociceptifs trigéminaux.

Références

- Adan RA, Gispén WH. 1997. Brain melanocortin receptors: from cloning to function. *Peptides* 18(8):1279-87.
- Adan RA, Gispén WH. 2000. Melanocortins and the brain: from effects via receptors to drug targets. *Eur J Pharmacol* 405(1-3):13-24.
- Ahn DK, Kim KH, Ju JS, Kwon S, Park JS. 2001. Microinjection of arginine vasopressin into the central nucleus of amygdala suppressed nociceptive jaw opening reflex in freely moving rats. *Brain Res Bull* 55(1):117-21.
- Akerman S, Go adsby PJ. 2007. Dopamine and migraine: biology and clinical implications. *Cephalalgia* 27(11):1308-14.
- AKIMOTO H, HONDA Y, TAKAHASHI Y. 1960. Pharmacotherapy in narcolepsy. *Dis Nerv Syst* 21:704-6.
- Aloisi AM, Zimmermann M, Herdgen T. 1997. Sex-dependent effects of formalin and restraint on c-Fos expression in the septum and hippocampus of the rat. *Neuroscience* 81(4):951-8.
- Alstadhaug KB. 2009. Migraine and the hypothalamus. *Cephalalgia* 29(8):809-17.
- Apkarian AV, Bushnell MC, Treede RD, Zubieta JK. 2005. Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *Eur J Pain* 9(4):463-84.
- Arletti R, Benelli A, Bertolini A. 1993. Influence of oxytocin on nociception and morphine antinociception. *Neuropeptides* 24(3):125-9.
- Armstrong WE, Warach S, Hatton GI, McNeill TH. 1980. Subnuclei in the rat hypothalamic paraventricular nucleus: a cytoarchitectural, horseradish peroxidase and immunocytochemical analysis. *Neuroscience* 5(11):1931-58.
- Ayesta FJ, Nikolarakis KE. 1989. Peripheral but not intracerebroventricular corticotropin-releasing hormone (CRH) produces antinociception which is not opioid mediated. *Brain Res* 503(2):219-24.
- Azhdari ZH, Semnani S, Fathollahi Y, Erami E, Khakpay R, Azizi H, Rohampour K. 2011. Intra-periaqueductal gray matter microinjection of orexin-A decreases formalin-induced nociceptive behaviors in adult male rats. *J Pain* 12(2):280-7.
- Barasi S. 1979. Responses of substantia nigra neurons to noxious stimulation. *Brain Res* 171(1):121-30.
- Barasi S, Duggal KN. 1985. The effect of local and systemic application of dopaminergic agents on tail flick latency in the rat. *Eur J Pharmacol* 117(3):287-94.
- Barraud Q, Obeid I, Aubert I, Barriere G, Contamin H, McGuire S, Ravenscroft P, Porras G, Tison F, Bezard E, Ghoraieb I. 2010. Neuroanatomical study of the A11 diencephalospinal pathway in the non-human primate. *PLoS One* 5(10):e13306.

- Bartsch T, Levy MJ, Knight YE, Goadsby PJ. 2004. Differential modulation of nociceptive dural input to [hypocretin] orexin A and B receptor activation in the posterior hypothalamic area. *Pain* 109(3):367-78.
- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. 2009. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 139(2):267-84.
- Baumber L, Sjostrand C, Leone M, Harty H, Bussone G, Hillert J, Trembath RC, Russell MB. 2006. A genome-wide scan and HCRTR2 candidate gene analysis in a European cluster headache cohort. *Neurology* 66(12):1888-93.
- Becerra L, Breiter HC, Wise R, Gonzalez RG, Borsook D. 2001. Reward circuitry activation by noxious thermal stimuli. *Neuron* 32(5):927-46.
- Bellasio S, Nicolussi E, Bertorelli R, Reggiani A. 2003. Melanocortin receptor agonists and antagonists modulate nociceptive sensitivity in the mouse formalin test. *Eur J Pharmacol* 482(1-3):127-32.
- Benjamin L, Levy MJ, Lasalandra MP, Knight YE, Akerman S, Classey JD, Goadsby PJ. 2004. Hypothalamic activation after stimulation of the superior sagittal sinus in the cat: a Fos study. *Neurobiol Dis* 16(3):500-5.
- Bergerot A, Storer RJ, Goadsby PJ. 2007. Dopamine inhibits trigeminovascular transmission in the rat. *Ann Neurol* 61(3):251-62.
- Berkowitz BA, Sherman S. 1982. Characterization of vasopressin analgesia. *J Pharmacol Exp Ther* 220(2):329-34.
- Bernard JF, Huang GF, Besson JM. 1992. Nucleus centralis of the amygdala and the globus pallidus ventralis: electrophysiological evidence for an involvement in pain processes. *J Neurophysiol* 68(2):551-69.
- Berntson GG, Berson BS. 1980. Antinociceptive effects of intraventricular or systemic administration of vasopressin in the rat. *Life Sci* 26(6):455-9.
- Bertolini A, Gessa GL. 1981. Behavioral effects of ACTH and MSH peptides. *J Endocrinol Invest* 4(2):241-51.
- Bertolini A, Poggioli R, Ferrari W. 1979. ACTH-induced hyperalgesia in rats. *Experientia* 35(9):1216-7.
- Bester H, Besson JM, Bernard JF. 1997. Organization of efferent projections from the parabrachial area to the hypothalamus: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study in the rat. *J Comp Neurol* 383(3):245-81.
- Bianchi M, Panerai AE. 1995. CRH and the noradrenergic system mediate the antinociceptive effect of central interleukin-1 alpha in the rat. *Brain Res Bull* 36(1):113-7.
- Bianchi M, Sacerdote P, Locatelli L, Mantegazza P, Panerai AE. 1991. Corticotropin releasing hormone, interleukin-1 alpha, and tumor necrosis factor-alpha share characteristics of stress mediators. *Brain Res* 546(1):139-42.

- Bingham S, Davey PT, Babbs AJ, Irving EA, Sammons MJ, Wyles M, Jeffrey P, Cutler L, Riba I, Johns A, Porter RA, Upton N, Hunter AJ, Parsons AA. 2001. Orexin-A, an hypothalamic peptide with analgesic properties. *Pain* 92(1-2):81-90.
- Blin O, Azulay JP, Masson G, Aubrespy G, Serratrice G. 1991. Apomorphine-induced yawning in migraine patients: enhanced responsiveness. *Clin Neuropharmacol* 14(1):91-5.
- Bodnar RJ, Wallace MM, Kordower JH, Nilaver G, Cort J, Zimmerman EA. 1982. Modulation of nociceptive thresholds by vasopressin in the Brattleboro and normal rat. *Ann N Y Acad Sci* 394:735-9.
- Bodnar RJ, Truesdell LS, Haldar J, Aral IA, Kordower JH, Nilaver G. 1986. Elimination of vasopressin analgesia following lesions placed in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Peptides* 7(1):111-7.
- Bouhassira D, Villanueva L, Bing Z, Le Bars D. 1992. Involvement of the subnucleus reticularis dorsalis in diffuse noxious inhibitory controls in the rat. *Brain Res* 595(2):353-7.
- Breton JD, Veinante P, Uhl-Bronner S, Vergnano AM, Freund-Mercier MJ, Schlichter R, Poisbeau P. 2008. Oxytocin-induced antinociception in the spinal cord is mediated by a subpopulation of glutamatergic neurons in lamina I-II which amplify GABAergic inhibition. *Mol Pain* 4:19.
- Brink TS, Hellman KM, Lambert AM, Mason P. 2006. Raphe magnus neurons help protect reactions to visceral pain from interruption by cutaneous pain. *J Neurophysiol* 96(6):3423-32.
- Britton KT, Morgan J, Rivier J, Vale W, Koob GF. 1985. Chlordiazepoxide attenuates response suppression induced by corticotropin-releasing factor in the conflict test. *Psychopharmacology (Berl)* 86(1-2):170-4.
- Brun J, Claustrat B, Sadiet P, Chazot G. 1995. Nocturnal melatonin excretion is decreased in patients with migraine without aura attacks associated with menses. *Cephalalgia* 15(2):136-9.
- Burkey AR, Carstens E, Jasmin L. 1999. Dopamine reuptake inhibition in the rostral agranular insular cortex produces antinociception. *J Neurosci* 19(10):4169-79.
- Burstein R, Cliffer KD, Giesler GJ, Jr. 1990. Cells of origin of the spinothalamic tract in the rat. *J Comp Neurol* 291(3):329-44.
- Burstein R, Giesler GJ, Jr. 1989. Retrograde labeling of neurons in spinal cord that project directly to nucleus accumbens or the septal nuclei in the rat. *Brain Res* 497(1):149-54.
- Cabot PJ, Carter L, Gaiddon C, Zhang Q, Schafer M, Loeffler JP, Stein C. 1997. Immune cell-derived beta-endorphin. Production, release, and control of inflammatory pain in rats. *J Clin Invest* 100(1):142-8.
- Casey KL, Minoshima S, Morrow TJ, Koeppe RA. 1996. Comparison of human cerebral activation pattern during cutaneous warmth, heat pain, and deep cold pain. *J Neurophysiol* 76(1):571-81.
- Cechetto DF, Saper CB. 1988. Neurochemical organization of the hypothalamic projection to the spinal cord in the rat. *J Comp Neurol* 272(4):579-604.

- Cerbo R, Barbanti P, Buzzi MG, Fabbrini G, Brusa L, Roberti C, Zanette E, Lenzi GL. 1997. Dopamine hypersensitivity in migraine: role of the apomorphine test. *Clin Neuropharmacol* 20(1):36-41.
- Cervenka S, Palhagen SE, Comley RA, Panagiotidis G, Cselenyi Z, Matthews JC, Lai RY, Halldin C, Farde L. 2006. Support for dopaminergic hypoactivity in restless legs syndrome: a PET study on D2-receptor binding. *Brain* 129(Pt 8):2017-28.
- Charbit AR, Akerman S, Goadsby PJ. 2010. Dopamine: what's new in migraine? *Curr Opin Neurol* 23(3):275-81.
- Charbit AR, Akerman S, Goadsby PJ. 2011. Trigemino-cervical complex responses after lesioning dopaminergic A11 nucleus are modified by dopamine and serotonin mechanisms. *Pain* 152(10):2365-76.
- Charbit AR, Akerman S, Holland PR, Goadsby PJ. 2009. Neurons of the dopaminergic/calcitonin gene-related peptide A11 cell group modulate neuronal firing in the trigemino-cervical complex: an electrophysiological and immunohistochemical study. *J Neurosci* 29(40):12532-41.
- Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, Elmquist JK, Scammell T, Lee C, Richardson JA, Williams SC, Xiong Y, Kisanuki Y, Fitch TE, Nakazato M, Hammer RE, Saper CB, Yanagisawa M. 1999. Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell* 98(4):437-51.
- Cheng JK, Chou RC, Hwang LL, Chiou LC. 2003. Antiallodynic effects of intrathecal orexins in a rat model of postoperative pain. *J Pharmacol Exp Ther* 307(3):1065-71.
- Chitour D, Dickenson AH, Le Bars D. 1982. Pharmacological evidence for the involvement of serotonergic mechanisms in diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). *Brain Res* 236(2):329-37.
- Chrousos GP, Gold PW. 1992. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA* 267(9):1244-52.
- Chudler EH. 1998. Response properties of neurons in the caudate-putamen and globus pallidus to noxious and non-noxious thermal stimulation in anesthetized rats. *Brain Res* 812(1-2):283-8.
- Chudler EH, Sugiyama K, Dong WK. 1993. Nociceptive responses in the neostriatum and globus pallidus of the anesthetized rat. *J Neurophysiol* 69(6):1890-903.
- Cipolla-Neto J, Skorupa AL, Ribeiro-Barbosa ER, Bartol I, Mota SR, Afeche SC, Delagrèze P, Guardiola-Lemaitre B, Canteras NS. 1999. The role of the retrochiasmatic area in the control of pineal metabolism. *Neuroendocrinology* 69(2):97-104.
- Claustrat B, Brun J, Geoffriau M, Zaidan R, Mallo C, Chazot G. 1997. Nocturnal plasma melatonin profile and melatonin kinetics during infusion in status migrainosus. *Cephalalgia* 17(4):511-7.
- Cliffer KD, Burstein R, Giesler GJ, Jr. 1991. Distributions of spinothalamic, spinohypothalamic, and spinotelenchephalic fibers revealed by anterograde transport of PHA-L in rats. *J Neurosci* 11(3):852-68.

- Coffeen U, Lopez-Avila A, Ortega-Legaspi JM, del Angel R, Lopez-Munoz FJ, Pellicer F. 2008. Dopamine receptors in the anterior insular cortex modulate long-term nociception in the rat. *Eur J Pain* 12(5):535-43.
- Coghill RC, Mayer DJ, Price DD. 1993. Wide dynamic range but not nociceptive-specific neurons encode multidimensional features of prolonged repetitive heat pain. *J Neurophysiol* 69(3):703-16.
- Cohen SR, Melzack R. 1986. Habenular stimulation produces an algesia in the formalin test. *Neurosci Lett* 70(1):165-9.
- Condes-Lara M, Martinez-Lorenzana G, Rodriguez-Jimenez J, Rojas-Piloni G. 2008. Paraventricular hypothalamic nucleus stimulation modulates nociceptive responses in dorsal horn wide dynamic range neurons. *Neurosci Lett* 444(2):199-202.
- Condes-Lara M, Rojas -Piloni G, Martinez -Lorenzana G, Rodriguez-Jimenez J. 2009. Paraventricular hypothalamic oxytocinergic cells responding to noxious stimulation and projecting to the spinal dorsal horn represent a homeostatic analgesic mechanism. *Eur J Neurosci* 30(6):1056-63.
- Cone RD. 2006. Studies on the physiological functions of the melano cortin system. *Endocr Rev* 27(7):736-49.
- Coste J, Voisin DL, Luccarini P, Dallel R. 2008. A role for wind-up in trigeminal sensory processing: intensity coding of nociceptive stimuli in the rat. *Cephalalgia* 28(6):631-9.
- Craig AD. 2003. Distribution of trigeminothalamic and spinothalamic lamina I terminations in the cat. *Somatosens Mot Res* 20(3-4):209-22.
- Craig AD, Kniffki KD. 1985. Spinothalamic lumbosacral lamina I cells responsive to skin and muscle stimulation in the cat. *J Physiol* 365:197-221.
- Culman J, Das G, Ohlen dorf C, Haass M, Maser-Gluth C, Zuhayra M, Zhao Y, Itoi K. 2010. Blockade of tachykinin NK1/NK2 receptors in the brain attenuates the activation of corticotrophin-releasing hormone neurones in the hypothalamic paraventricular nucleus and the sympathoadrenal and pituitary-adrenal responses to formalin-induced pain in the rat. *J Neuroendocrinol* 22(5):467-76.
- D'Mello R, Dickenson AH. 2008. Spinal cord mechanisms of pain. *Br J Anaesth* 101(1):8-16.
- Dahmen N, Kasten M, Wieczorek S, Gencik M, Epplen J T, Ullrich B. 2003. Increased frequency of migraine in narcoleptic patients: a confirmatory study. *Cephalalgia* 23(1):14-9.
- Dahmen N, Que rings K, Grun B, Bierbrauer J. 1999. Increased frequency of migraine in narcoleptic patients. *Neurology* 52(6):1291-3.
- Dallel R, Duale C, Luccarini P, Molat JL. 1999. Stimulus-function, wind-up and modulation by diffuse noxious inhibitory controls of responses of convergent neurons of the spinal trigeminal nucleus oralis. *Eur J Neurosci* 11(1):31-40.

- Dallel R, Duale C, Mola t JL. 1998. Morphine administered in the substantia gelatinosa of the spinal trigeminal nucleus caudalis inhibits nociceptive activities in the spinal trigeminal nucleus oralis. *J Neurosci* 18(10):3529-36.
- 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 Res* 521(1-2):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(2):181-91.
- Dallel R, Villanueva L, Woda A, Voisin D. 2003. [Neurobiology of trigeminal pain]. *Med Sci (Paris)* 19(5):567-74.
- Damaj MI, Martin BR, Kuhar MJ. 2003. Antinociceptive effects of supraspinal rat cart (55-102) peptide in mice. *Brain Res* 983(1-2):233-6.
- Damaj MI, Zheng J, Martin BR, Kuhar MJ. 2006. Intrathecal CART (55-102) attenuates hyperalgesia and allodynia in a mouse model of neuropathic but not inflammatory pain. *Peptides* 27(8):2019-23.
- Date Y, Mondal MS, Matsukura S, Nakazato M. 2000. Distribution of orexin-A and orexin-B (hypocretins) in the rat spinal cord. *Neurosci Lett* 288(2):87-90.
- De Broucker T, Cesaro P, Willer JC, Le Bars D. 1990. Diffuse noxious inhibitory controls in man. Involvement of the spinothalamic tract. *Brain* 113 (Pt 4):1223-34.
- De Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG. 1998. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(1):322-7.
- De Wied D, Diamant M, Fodor M. 1993. Central nervous system effects of the neurohypophyseal hormones and related peptides. *Front Neuroendocrinol* 14(4):251-302.
- De C, 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(4):921-8.
- Denuelle M, Fabre N, Payoux P, Chollet F, Geraud G. 2007. Hypothalamic activation in spontaneous migraine attacks. *Headache* 47(10):1418-26.
- Devoize L, Alvarez P, Monconduit L, Dallel R. 2011. Representation of dynamic mechanical allodynia in the ventral medial prefrontal cortex of trigeminal neuropathic rats. *Eur J Pain* 15(7):676-82.
- Diatchenko L, Slade GD, Nackley AG, Bhalang K, Sigurdsson A, Belfer I, Goldman D, Xu K, Shabalina SA, Shagin D, Max MB, Makarov SS, Maixner W. 2005. Genetic basis for individual variations in pain perception and the development of a chronic pain condition. *Hum Mol Genet* 14(1):135-43.
- Dinulescu DM, Cone RD. 2000. Agouti and agouti-related protein: analogies and contrasts. *J Biol Chem* 275(10):6695-8.

- Djaldetti R, Shifrin A, Rogowski Z, Sprecher E, Melamed E, Yarnitsky D. 2004. Quantitative measurement of pain sensation in patients with Parkinson disease. *Neurology* 62(12):2171-5.
- Du Vigneaud V, Lawler HC, Popenoe EA. Enzymatic cleavage of glycylamide from vasopressin and a proposed structure for this pressor-antidiuretic hormone of posterior pituitary. 1953a *J. AM.Chm. Soc.*, 75: 4881-5880.
- Elias CF, Lee C, Kelly J, Aschkenasi C, Ahima RS, Couceyro PR, Kuhar MJ, Saper CB, Elmquist JK. 1998. Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron* 21(6):1375-85.
- Estabrooke IV, McCarthy MT, Ko E, Chou TC, Chemelli RM, Yanagisawa M, Saper CB, Scammell TE. 2001. Fos expression in orexin neurons varies with behavioral state. *J Neurosci* 21(5):1656-62.
- Evans RW, Williams MA, Rapoport AM, Peterlin BL. 2012. The association of obesity with episodic and chronic migraine. *Headache* 52(4):663-71.
- Fadel J, Deutch AY. 2002. Anatomical substrates of orexin-dopamine interactions: lateral hypothalamic projections to the ventral tegmental area. *Neuroscience* 111(2):379-87.
- Fan W, Boston BA, Kesterson RA, Hruby VJ, Cone RD. 1997. Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature* 385(6612):165-8.
- Ferrari MD. 2002. Triptan: a comprehensive patient-based approach to compare triptans. *Headache* 42 Suppl 1:18-25.
- Fleetwood-Walker SM, Hope PJ, Mitchell R. 1988. Antinociceptive actions of descending dopaminergic tracts on cat and rat dorsal horn somatosensory neurons. *J Physiol* 399:335-48.
- Flores JA, ElBanoua F, Galan-Rodriguez B, Fernandez-Espejo E. 2004. Opiate antinociception is attenuated following lesion of large dopamine neurons of the periaqueductal grey: critical role for D1 (not D2) dopamine receptors. *Pain* 110(1-2):205-14.
- Ford B, Louis ED, Greene P, Fahn S. 1996. Oral and genital pain syndromes in Parkinson's disease. *Mov Disord* 11(4):421-6.
- Franceschini R, Leandri M, Cataldi A, Bruno E, Corsini G, Rolandi E, Barreca T. 1995. Raised plasma arginine vasopressin concentrations during cluster headache attacks. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 59(4):381-3.
- Franco AC, Prado WA. 1996. Antinociceptive effects of stimulation of discrete sites in the rat hypothalamus: evidence for the participation of the lateral hypothalamus area in descending pain suppression mechanisms. *Braz J Med Biol Res* 29(11):1531-41.
- Furlong TM, Vianna DM, Liu L, Carrive P. 2009. Hypocretin/orexin contributes to the expression of some but not all forms of stress and arousal. *Eur J Neurosci* 30(8):1603-14.
- Gall O, Bouhassira D, Chitour D, Le Bars D. 1998. Involvement of the caudal medulla in negative feedback mechanisms triggered by spatial summation of nociceptive inputs. *J Neurophysiol* 79(1):304-11.

- Gao DM, Hoffman D, Benabid AL. 1996. Simultaneous recording of spontaneous activities and nociceptive responses from neurons in the pars compacta of substantia nigra and in the lateral habenula. *Eur J Neurosci* 8(7):1474-8.
- Gao DM, Jeaugey L, Pollak P, Benabid AL. 1990. Intensity-dependent nociceptive responses from presumed dopaminergic neurons of the substantia nigra, pars compacta in the rat and their modification by lateral habenula inputs. *Brain Res* 529(1-2):315-9.
- Gao J, Wu X, Ouyang C, Li Y. 2006. Enhanced responses of the anterior cingulate cortex neurones to colonic distension in viscerally hypersensitive rats. *J Physiol* 570(Pt 1):169-83.
- Gao X, Zhang Y, Wu G. 2001a. Effects of dopaminergic agents on carrageenan hyperalgesia after intrathecal administration to rats. *Eur J Pharmacol* 418(1-2):73-7.
- Gao X, Zhang YQ, Zhang LM, Wu GC. 2001b. Effects of intraplantar injection of carrageenan on central dopamine release. *Brain Res Bull* 54(4):391-4.
- Ge Y, Lundberg T, Yu LC. 2002. Blockade effect of mu and kappa opioid antagonists on the anti-nociception induced by intra-periaqueductal grey injection of oxytocin in rats. *Brain Res* 927(2):204-7.
- Gear RW, Aley KO, Levine JD. 1999. Pain-induced analgesia mediated by mesolimbic reward circuits. *J Neurosci* 19(16):7175-81.
- Georgescu D, Zachariou V, Barrot M, Mieda M, Willie JT, Eisch AJ, Yanagisawa M, Nestler EJ, DiLeone RJ. 2003. Involvement of the lateral hypothalamic peptide orexin in morphine dependence and withdrawal. *J Neurosci* 23(8):3106-11.
- Gerdelat-Mas A, Simonetta-Moreau M, Thalamas C, Ory-Magne F, Slaoui T, Rascol O, Brefel-Courbon C. 2007. Levodopa raises objective pain threshold in Parkinson's disease: a RIII reflex study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 78(10):1140-2.
- Gibney SM, Gosselin RD, Dinan TG, Cryan JF. 2010. Colorectal distension-induced prefrontal cortex activation in the Wistar-Kyoto rat: implications for irritable bowel syndrome. *Neuroscience* 165(3):675-83.
- Giffin NJ, Ruggiero L, Lipton RB, Silberstein SD, Tvedskov JF, Olesen J, Altman J, Goadsby PJ, Macrae A. 2003. Premonitory symptoms in migraine: an electronic diary study. *Neurology* 60(6):935-40.
- Gimpl G, Fahrenholz F. 2001. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev* 81(2):629-83.
- Gispen WH, Buitelaar J, Wiegant VM, Terenius L, De Wied D. 1976. Interaction between ACTH fragments, brain opiate receptors and morphine-induced analgesia. *Eur J Pharmacol* 39(2):393-7.
- Goetz CG, Tanner CM, Levy M, Wilson RS, Garron DC. 1986. Pain in Parkinson's disease. *Mov Disord* 1(1):45-9.
- Greco MA, Shiromani PJ. 2001. Hypocretin receptor protein and mRNA expression in the dorsolateral pons of rats. *Brain Res Mol Brain Res* 88(1-2):176-82.

- Guan JL, Wang QP, Shioda S. 2003. Immunoelectron microscopic examination of orexin-like immunoreactive fibers in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Brain Res* 987(1):86-92.
- Guilleminault C, Carskadon M, Dement WC. 1974. On the treatment of rapid eye movement narcolepsy. *Arch Neurol* 30(1):90-3.
- Guirimand F, Le Bars D. 1996. [Physiology of nociception]. *Ann Fr Anesth Reanim* 15(7):1048-79.
- Gursoy S, Erdal E, Herken H, Madenci E, Alasehirli B, Erdal N. 2003. Significance of catechol-O-methyltransferase gene polymorphism in fibromyalgia syndrome. *Rheumatol Int* 23(3):104-7.
- Guy N, Chalus M, Dalle R, Voisin DL. 2005. Both oral and caudal parts of the spinal trigeminal nucleus project to the somatosensory thalamus in the rat. *Eur J Neurosci* 21(3):741-54.
- Hagan JJ, Leslie RA, Patel S, Evans ML, Wattam TA, Holmes S, Benham CD, Taylor SG, Routledge C, Hemmati P, Muntun RP, Ashmeade TE, Shah AS, Hatcher JP, Hatcher PD, Jones DN, Smith MI, Piper DC, Hunter AJ, Porter RA, Upton N. 1999. Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(19):10911-6.
- Hagelberg N, Forssell H, Aalto S, Rinne JO, Scheinin H, Taiminen T, Nagren K, Eskola O, Jaaskelainen SK. 2003a. Altered dopamine D2 receptor binding in atypical facial pain. *Pain* 106(1-2):43-8.
- Hagelberg N, Forssell H, Rinne JO, Scheinin H, Taiminen T, Aalto S, Luutonen S, Nagren K, Jaaskelainen S. 2003b. Striatal dopamine D1 and D2 receptors in burning mouth syndrome. *Pain* 101(1-2):149-54.
- Hagelberg N, Martikainen IK, Mansikka H, Hinkka S, Nagren K, Hietala J, Scheinin H, Pertovaara A. 2002. Dopamine D2 receptor binding in the human brain is associated with the response to painful stimulation and pain modulatory capacity. *Pain* 99(1-2):273-9.
- Hamba M, Hisamitsu H, Muro M. 1990. Nociceptive projection from tooth pulp to the lateral hypothalamus in rats. *Brain Res Bull* 25(3):355-64.
- Harbuz MS, Lightman SL. 1992. Stress and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis: acute, chronic and immunological activation. *J Endocrinol* 134(3):327-39.
- Hargreaves KM, Dubner R, Costello AH. 1989. Corticotropin releasing factor (CRF) has a peripheral site of action for antinociception. *Eur J Pharmacol* 170(3):275-9.
- Hargreaves KM, Flores CM, Dionne RA, Mueller GP. 1990. The role of pituitary beta-endorphin in mediating corticotropin-releasing factor-induced antinociception. *Am J Physiol* 258(2 Pt 1):E235-E242.
- Hargreaves KM, Mueller GP, Dubner R, Goldstein D, Dionne RA. 1987. Corticotropin-releasing factor (CRF) produces analgesia in humans and rats. *Brain Res* 422(1):154-7.
- Harris GC, Aston-Jones G. 2006. Arousal and reward: a dichotomy in orexin function. *Trends Neurosci* 29(10):571-7.

- Harris GC, Wimmer M, Aston-Jones G. 2005. A role for lateral hypothalamic orexin neurons in reward seeking. *Nature* 437(7058):556-9.
- Hasselblatt M, Kohler J, Volles E, Ehrenreich H. 1999. Simultaneous monitoring of endothelin-1 and vasopressin plasma levels in migraine. *Neuroreport* 10(2):423-5.
- Havern RL, Whisnant CS, Goodman RL. 1991. Hypothalamic sites of catecholamine inhibition of luteinizing hormone in the anestrous ewe. *Biol Reprod* 44(3):476-82.
- Hawthorn J, Ang VT, Jenkins JS. 1980. Localization of vasopressin in the rat brain. *Brain Res* 197(1):75-81.
- Hawthorn J, Ang VT, Jenkins JS. 1985. Effects of lesions in the hypothalamic paraventricular, supraoptic and suprachiasmatic nuclei on vasopressin and oxytocin in rat brain and spinal cord. *Brain Res* 346(1):51-7.
- Heimer L, Zahm DS, Churchill L, Kalivas PW, Wohltmann C. 1991. Specificity in the projection patterns of accumbal core and shell in the rat. *Neuroscience* 41(1):89-125.
- Hernando F, Schoots O, Lolait SJ, Burbach JP. 2001. Immunohistochemical localization of the vasopressin V1b receptor in the rat brain and pituitary gland: anatomical support for its involvement in the central effects of vasopressin. *Endocrinology* 142(4):1659-68.
- Hervieu GJ, Cluderay JE, Harrison DC, Roberts JC, Leslie RA. 2001. Gene expression and protein distribution of the orexin-1 receptor in the rat brain and spinal cord. *Neuroscience* 103(3):777-97.
- Holland PR, Akerman S, Goadsby PJ. 2005. Orexin 1 receptor activation attenuates neurogenic dural vasodilation in an animal model of trigeminovascular nociception. *J Pharmacol Exp Ther* 315(3):1380-5.
- Holland PR, Akerman S, Goadsby PJ. 2006. Modulation of nociceptive dural input to the trigeminal nucleus caudalis via activation of the orexin 1 receptor in the rat. *Eur J Neurosci* 24(10):2825-33.
- Holstege JC, Van Dijken H, Buijs RM, Goedknegt H, Gosens T, Bongers CM. 1996. Distribution of dopamine immunoreactivity in the rat, cat and monkey spinal cord. *J Comp Neurol* 376(4):631-52.
- Hosoya Y. 1980. The distribution of spinal projection neurons in the hypothalamus of the rat, studied with the HRP method. *Exp Brain Res* 40(1):79-87.
- Hughes DI, Scott DT, Todd AJ, Riddell JS. 2003. Lack of evidence for sprouting of Aβ afferents into the superficial laminae of the spinal cord dorsal horn after nerve section. *J Neurosci* 23(29):9491-9.
- Hunt SP, Mantyh PW. 2001. The molecular dynamics of pain control. *Nat Rev Neurosci* 2(2):83-91.
- Hunt SP, Rossi J. 1985. Peptide- and non-peptide-containing unmyelinated primary afferents: the parallel processing of nociceptive information. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 308(1136):283-9.

- Hussain SA, Al Khalifa II, Jasim NA, Gorial FI. 2011. Adjuvant use of melatonin for treatment of fibromyalgia. *J Pineal Res* 50(3):267-71.
- Iversen S, Iversen L, Sapper CB. 2000. Principles of Neural science. Chapter 49 960:981.
- Iwata K, Kenshalo DR, Jr., Dubner R, N ahin RL. 1992. Diencephalic projections from the superficial and deep laminae of the medullary dorsal horn in the rat. *J Comp Neurol* 321(3):404-20.
- Jaaskelainen SK, Rinne JO, Forssell H, Tenovuo O, Kaasinen V, Sonninen P, Bergman J. 2001. Role of the dopaminergic system in chronic pain -- a fluorodopa-PET study. *Pain* 90(3):257-60.
- Jackson DM, Westlind-Danielsson A. 1994. Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspects. *Pharmacol Ther* 64(2):291-370.
- Jensen TS, Yaksh T L. 1984. Effects of an intrathecal dopamine agonist, apomorphine, on thermal and chemical evoked noxious responses in rats. *Brain Res* 296(2):285-93.
- Johnson RF, Morin LP, Moore RY. 1988. Retinohypothalamic projections in the hamster and rat demonstrated using cholera toxin. *Brain Res* 462(2):301-12.
- Jones AK, Brown W D, Friston KJ, Qi LY, Frackowiak RS. 1991. Cortical and subcortical localization of response to pain in man using positron emission tomography. *Proc Biol Sci* 244(1309):39-44.
- Julius D, Basbaum AI. 2001. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413(6852):203-10.
- Kandel ER, Schwartz JH (1985): Principles of Neural Science, Elsevier Publishing, New York.
- Karling P, Danielsson A, Wikgren M, Soderstrom I, Del Favero J, Adolfsson R, Norrback KF. 2011. The relationship between the val158met catechol-O-methyltransferase (COMT) polymorphism and irritable bowel syndrome. *PLoS One* 6(3):e18035.
- Kita A, Imano K, Nakamura H. 1993. Involvement of corticotropin-releasing factor in the antinociception produced by interleukin-1 in mice. *Eur J Pharmacol* 237(2-3):317-22.
- Korosi A, Kozicz T, Richter J, Veening JG, Olivier B, Roubos E W. 2007. Corticotropin-releasing factor, urocortin 1, and their receptors in the mouse spinal cord. *J Comp Neurol* 502(6):973-89.
- Koylu EO, Couceyro PR, Lambert PD, Kuhar MJ. 1998. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide immunohistochemical localization in the rat brain. *J Comp Neurol* 391(1):115-32.
- Koylu EO, Couceyro PR, Lambert PD, Ling NC, DeSouza EB, Kuhar MJ. 1997. Immunohistochemical localization of novel CART peptides in rat hypothalamus, pituitary and adrenal gland. *J Neuroendocrinol* 9(11):823-33.
- Kozsurek M, Lukacs E, Fekete C, Wittmann G, Rethelyi M, Puskar Z. 2007. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide (CART) is present in peptidergic C primary afferents and axons of excitatory interneurons with a possible role in nociception in the superficial laminae of the rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 26(6):1624-31.

- Kuhar MJ, Adams LD, Hunter RG, Vechia SD, Smith Y. 2000. CART peptides. *Regul Pept* 89(1-3):1-6.
- Kurose T, Ueta Y, Nomura M, Yamaguchi K, Nagata S. 2001. Nociceptive stimulation increases NO synthase mRNA and vasopressin heteronuclearRNA in the rat paraventricular nucleus. *Auton Neurosci* 88(1-2):52-60.
- Lang RE, Heil J, Ganten D, Hermann K, Rascher W, Unger T. 1983. Effects of lesions in the paraventricular nucleus of the hypothalamus on vasopressin and oxytocin contents in brainstem and spinal cord of rat. *Brain Res* 260(2):326-9.
- Lapirot O, Chebbi R, Monconduit L, Artola A, Dallel R, Luccarini P. 2009. NK1 receptor-expressing spinoparabrachial neurons trigger diffuse noxious inhibitory controls through lateral parabrachial activation in the male rat. *Pain* 142(3):245-54.
- Lapirot O, Melin C, Modolo A, Nicolas C, Messaoudi Y, Monconduit L, Artola A, Luccarini P, Dallel R. 2011. Tonic and phasic descending dopaminergic controls of nociceptive transmission in the medullary dorsal horn. *Pain* 152(8):1821-31.
- Lazovic J, Wrzos HF, Yang QX, Collins CM, Smith MB, Norgren R, Matyas K, Ouyang A. 2005. Regional activation in the rat brain during visceral stimulation detected by c-fos expression and fMRI. *Neurogastroenterol Motil* 17(4):548-56.
- Le Bars D. et Willer J.-C. (2004) *Physiologie de la douleur*. EMC - Anesthésie-Réanimation, 227-266.
- Leone M, Bussone G. 1993. A review of hormonal findings in cluster headache. Evidence for hypothalamic involvement. *Cephalalgia* 13(5):309-17.
- Leone M, Franzini A, Cecchini AP, Broggi G, Bussone G. 2010. Hypothalamic deep brain stimulation in the treatment of chronic cluster headache. *Ther Adv Neurol Disord* 3(3):187-95.
- Li SR, Wang T, Wang R, Dai X, Chen Q, Li RD. 2005. Melatonin enhances antinociceptive effects of delta-, but not mu-opioid agonist in mice. *Brain Res* 1043(1-2):132-8.
- Liu QS, Qiao JT, Dafny N. 1992. D2 dopamine receptor involvement in spinal dopamine-produced antinociception. *Life Sci* 51(19):1485-92.
- Liu X, Tribollet E, Ougier R, Barberis C, Raggenbass M. 2003. Presence of functional vasopressin receptors in spinal ventral horn neurons of young rats: a morphological and electrophysiological study. *Eur J Neurosci* 17(9):1833-46.
- Lopez R, Young SL, Cox VC. 1991. Analgesia for formalin-induced pain by lateral hypothalamic stimulation. *Brain Res* 563(1-2):1-6.
- Lopez-Avila A, Coffeen U, Ortega-Legaspi JM, del Angel R, Pellicer F. 2004. Dopamine and NMDA systems modulate long-term nociception in the rat anterior cingulate cortex. *Pain* 111(1-2):136-43.
- Lu WZ, Gwee KA, Moolhalla S, Ho KY. 2005. Melatonin improves bowel symptoms in female patients with irritable bowel syndrome: a double-blind placebo-controlled study. *Aliment Pharmacol Ther* 22(10):927-34.

- Lu Y, Perl ER. 2005. Modular organization of excitatory circuits between neurons of the spinal superficial dorsal horn (laminae I and II). *J Neurosci* 25(15):3900-7.
- Madrazo I, Franco-Bourland RE, Leon-Meza VM, Mena I. 1987. Intraventricular somatostatin-14, arginine vasopressin, and oxytocin: analgesic effect in a patient with intractable cancer pain. *Appl Neurophysiol* 50(1-6):427-31.
- Magnusson JE, Fisher K. 2000. The involvement of dopamine in nociception: the role of D(1) and D(2) receptors in the dorsolateral striatum. *Brain Res* 855(2):260-6.
- Malick A, Burstein R. 1998. Cells of origin of the trigeminohypothalamic tract in the rat. *J Comp Neurol* 400(1):125-44.
- Malick A, Jakubowski M, Elmquist JK, Saper CB, Burstein R. 2001. A neurohistochemical blueprint for pain-induced loss of appetite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(17):9930-5.
- Malick A, Strassman RM, Burstein R. 2000. Trigeminothalamic and reticulohypothalamic tract neurons in the upper cervical spinal cord and caudal medulla of the rat. *J Neurophysiol* 84(4):2078-112.
- Mantovani M, Kaster MP, Pertile R, Calixto JB, Rodrigues AL, Santos AR. 2006. Mechanisms involved in the antinociception caused by melatonin in mice. *J Pineal Res* 41(4):382-9.
- Marbach JJ, Levitt M. 1976. Erythrocyte catechol-O-methyltransferase activity in facial pain patients. *J Dent Res* 55(4):711.
- Martinez-Jauand M, Sitges C, Rodriguez V, Picornell A, Ramon M, Buskila D, Montoya P. 2012. Pain sensitivity in fibromyalgia is associated with catechol-O-methyltransferase (COMT) gene. *Eur J Pain*.
- Masruha MR, Souza Vieira DS, Minetti TS, Cipolla-Neto J, Zukerman E, Vilanova LC, Peres MF. 2008. Low urinary 6-sulphatoxymelatonin concentrations in acute migraine. *J Headache Pain* 9(4):221-4.
- May A, Bahra A, Buchel C, Frackowiak RS, Goadsby PJ. 1998a. Hypothalamic activation in cluster headache attacks. *Lancet* 352(9124):275-8.
- McEwen BB. 2004. General introduction to vasopressin and oxytocin: structure/metabolism, evolutionary aspects, neural pathway/receptor distribution, and functional aspects relevant to memory processing. *Adv Pharmacol* 50:1-708.
- Melzack R, Wall PD. 1965. Pain mechanisms: a new theory. *Science* 150(3699):971-9.
- Merchenthaler I, Hynes MA, Vigh S, Shalily AV, Petrusz P. 1983. Immunocytochemical localization of corticotropin releasing factor (CRF) in the rat spinal cord. *Brain Res* 275(2):373-7.
- Meyer PJ, Morgan MM, Kozell LB, Ingram SL. 2009. Contribution of dopamine receptors to periaqueductal gray-mediated antinociception. *Psychopharmacology (Berl)* 204(3):531-40.

- Mieda M, Willie JT, Hara J, Sinton CM, Sakurai T, Yanagisawa M. 2004. Orexin peptides prevent cataplexy and improve wakefulness in an orexin neuron-ablated model of narcolepsy in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(13):4649-54.
- Mignot E, Lammers GJ, Ripley B, Okun M, Nevsimalova S, Overeem S, Vankova J, Black J, Harsh J, Bassetti C, Schrader H, Nishino S. 2002. The role of cerebrospinal fluid hypocretin measurement in the diagnosis of narcolepsy and other hypersomnias. *Arch Neurol* 59(10):1553-62.
- Miranda-Cardenas Y, Rojas-Piloni G, Martinez-Lorenzana G, Rodriguez-Jimenez J, Lopez-Hidalgo M, Freund-Mercier MJ, Condes-Lara M. 2006. Oxytocin and electrical stimulation of the paraventricular hypothalamic nucleus produce antinociceptive effects that are reversed by an oxytocin antagonist. *Pain* 122(1-2):182-9.
- Mobarakeh JI, Takahashi K, Sakurada S, Nishino S, Watanabe H, Kato M, Yanai K. 2005. Enhanced antinociception by intracerebroventricularly and intrathecally-administered orexin A and B (hypocretin-1 and -2) in mice. *Peptides* 26(5):767-77.
- Moisset X, Bouhassira D. 2007. Brain imaging of neuropathic pain. *Neuroimage* 37 Suppl 1:S80-S88.
- Molander C, Xu Q, Rivero-Melian C, Grant G. 1989. Cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the rat: II. The cervical and upper thoracic cord. *J Comp Neurol* 289(3):375-85.
- Morita N, Tamai Y, Tsujimoto T. 1977. Unit responses activated by tooth pulp stimulation in lateral hypothalamic area of rat. *Brain Res* 134(1):158-60.
- Morton CR, Maisch B, Zimmermann M. 1987. Diffuse noxious inhibitory controls of lumbar spinal neurons involve a supraspinal loop in the cat. *Brain Res* 410(2):347-52.
- Mountjoy KG, Mortrud MT, Low MJ, Simerly RB, Cone RD. 1994. Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol Endocrinol* 8(10):1298-308.
- Mousa SA, Schafer M, Mitchell WM, Hassan AH, Stein C. 1996. Local upregulation of corticotropin-releasing hormone and interleukin-1 receptors in rats with painful hindlimb inflammation. *Eur J Pharmacol* 311(2-3):221-31.
- Nackley AG, Tan KS, Fecho K, Flood P, Diatchenko L, Maixner W. 2007. Catechol-O-methyltransferase inhibition increases pain sensitivity through activation of both beta2- and beta3-adrenergic receptors. *Pain* 128(3):199-208.
- Naguib M, Hammond DL, Schmid PG, III, Baker MT, Cutkomp J, Queral L, Smith T. 2003. Pharmacological effects of intravenous melatonin: comparative studies with thiopental and propofol. *Br J Anaesth* 90(4):504-7.
- Nagy JI, Hunt SP. 1982. Fluoride-resistant acid phosphatase-containing neurones in dorsal root ganglia are separate from those containing substance P or somatostatin. *Neuroscience* 7(1):89-97.

- Newman HM, Stevens RT, Apkarian AV. 1996. Direct spinal projections to limbic and striatal areas: anterograde transport studies from the upper cervical spinal cord and the cervical enlargement in squirrel monkey and rat. *J Comp Neurol* 365(4):640-58.
- Nicolet-Barousse L., Sharshar T., Paillard M., Blanchard A. 2001. La vasopressine : une hormone aux multiples fonctions. *Médecine thérapeutique*. Volume 7, Numéro 10, 757-64.
- Nishino S, Mignot E. 1997. Pharmacological aspects of human and canine narcolepsy. *Prog Neurobiol* 52(1):27-78.
- Nosedá R, Hernández A, Valladares L, Mondaca M, Laurido C, Soto-Moyano R. 2004. Melatonin-induced inhibition of spinal cord synaptic potentiation in rats is MT2 receptor-dependent. *Neurosci Lett* 360(1-2):41-4.
- Nylen A, Skagerberg G, Alm P, Larsson B, Holmqvist B, Andersson KE. 2001. Nitric oxide synthase in the hypothalamic paraventricular nucleus of the female rat; organization of spinal projections and coexistence with oxytocin or vasopressin. *Brain Res* 908(1):10-24.
- Ohkubo T, Shibata M, Takahashi H, Naruse S. 1985. Naloxone prevents the analgesic action of alpha-MSH in mice. *Experientia* 41(5):627-8.
- Ohsawa M, Dun SL, Tseng LF, Chang J, Dun NJ. 2000. Decrease of hindpaw withdrawal latency by cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide to the mouse spinal cord. *Eur J Pharmacol* 399(2-3):165-9.
- Olschowka JA, O'Donohue TL, Mueller GP, Jacobowitz DM. 1982. The distribution of corticotropin releasing factor-like immunoreactive neurons in rat brain. *Peptides* 3(6):995-1015.
- Ondo WG, He Y, Rajasekaran S, Le WD. 2000. Clinical correlates of 6-hydroxydopamine injections into A11 dopaminergic neurons in rats: a possible model for restless legs syndrome. *Mov Disord* 15(1):154-8.
- Orazzo C, Pieribone VA, Ceccatelli S, Terenius L, Hokfelt T. 1993. CGRP-like immunoreactivity in A11 dopamine neurons projecting to the spinal cord and a note on CGRP-CCK cross-reactivity. *Brain Res* 600(1):39-48.
- Orłowska-Majdak M, Goraca A, Glabinski A, Traczyk WZ. 1994. Vasopressin release into the 3rd cerebral ventricle and into the blood after sciatic and trigeminal nerve stimulation. *J Physiol Pharmacol* 45(2):309-17.
- Palestini M, Mariotti M, Velasco JM, Formenti A, Mancina M. 1987. Medialis dorsalis thalamic unitary response to tooth pulp stimulation and its conditioning by brainstem and limbic activation. *Neurosci Lett* 78(2):161-5.
- Pang CS, Tsang SF, Yang JC. 2001. Effects of melatonin, morphine and diazepam on formalin-induced nociception in mice. *Life Sci* 68(8):943-51.
- Pasquier DA, Tramezzani JH. 1979. Afferent connections of the hypothalamic retrochiasmatic area in the rat. *Brain Res Bull* 4(6):765-71.
- Pay S, Barasi S. 1982. A study of the connections of nociceptive substantia nigra neurones. *Pain* 12(1):75-89.

- Peres MF, Sanchez dR, Seabra ML, Tufik S, Abucham J, Cipolla-Neto J, Silberstein SD, Zukerman E. 2001. Hypothalamic involvement in chronic migraine. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 71(6):747-51.
- Peres MF, Zukerman E, da Cunha TF, Moreira FR, Cipolla-Neto J. 2004. Melatonin, 3 mg, is effective for migraine prevention. *Neurology* 63(4):757.
- Peroutka SJ, Wilhoit T, Jones K. 1997. Clinical susceptibility to migraine with aura is modified by dopamine D2 receptor (DRD2) NcoI alleles. *Neurology* 49(1):201-6.
- Pertovaara A, Martikainen IK, Hagelberg N, Mansikka H, Nagren K, Hietala J, Scheinin H. 2004. Striatal dopamine D2/D3 receptor availability correlates with individual response characteristics to pain. *Eur J Neurosci* 20(6):1587-92.
- Peterlin BL, Rapoport AM, Kurth T. 2010. Migraine and obesity: epidemiology, mechanisms, and implications. *Headache* 50(4):631-48.
- Petko M, Antal M. 2000. Propriospinal afferent and efferent connections of the lateral and medial areas of the dorsal horn (laminae I-IV) in the rat lumbar spinal cord. *J Comp Neurol* 422(2):312-25.
- Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, De Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, Kilduff TS. 1998. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci* 18(23):9996-10015.
- Pirnik Z, Kiss A. 2005. Fos expression variances in mouse hypothalamus upon physical and osmotic stimuli: co-staining with vasopressin, oxytocin, and tyrosine hydroxylase. *Brain Res Bull* 65(5):423-31.
- Pirot S, Glowinski J, Thierry AM. 1996. Mediodorsal thalamic evoked responses in the rat prefrontal cortex: influence of the mesocortical DA system. *Neuroreport* 7(8):1437-41.
- Pittman QJ, Riphagen CL, Lederis K. 1984. Release of immunosayable neurohypophyseal peptides from rat spinal cord, in vivo. *Brain Res* 300(2):321-6.
- Popova LB, Ragnarson B, Orlovsky GN, Grant G. 1995. Responses of neurons in the central cervical nucleus of the rat to proprioceptive and vestibular inputs. *Arch Ital Biol* 133(1):31-45.
- Price DD, Greenspan JD, Dubner R. 2003. Neurons involved in the exteroceptive function of pain. *Pain* 106(3):215-9.
- Price DD, Hayes RL, Ruda M, Dubner R. 1978. Spatial and temporal transformations of input to spinothalamic tract neurons and their relation to somatic sensations. *J Neurophysiol* 41(4):933-47.
- Puder BA, Papka RE. 2001. Distribution and origin of corticotropin-releasing factor-immunoreactive axons in the female rat lumbosacral spinal cord. *J Neurosci Res* 66(6):1217-25.
- Qu S, Ondo W G, Zhang X, Xie W J, Pan TH, Le WD. 2006. Projections of diencephalic dopamine neurons into the spinal cord in mice. *Exp Brain Res* 168(1-2):152-6.

- Raboisson P, Dallel R, Bernard JF, Le Bars D, Villanueva L. 1996. Organization of efferent projections from the spinal cervical enlargement to the medullary subnucleus reticularis dorsalis and the adjacent cuneate nucleus: a PHA-L study in the rat. *J Comp Neurol* 367(4):503-17.
- Rainero I, Gallone S, Valfre W, Ferrero M, Angilella G, Rivoiro C, Rubino E, De Martino P, Savi L, Ferrone M, Pinessi L. 2004. A polymorphism of the hypocretin receptor 2 gene is associated with cluster headache. *Neurology* 63(7):1286-8.
- Rainero I, Rubino E, Gallone S, Fenoglio P, Picci LR, Giobbe L, Ostacoli L, Pinessi L. 2011. Evidence for an association between migraine and the hypocretin receptor 1 gene. *J Headache Pain* 12(2):193-9.
- Rainero I, Rubino E, Valfre W, Gallone S, De Martino P, Zampella E, Pinessi L. 2007. Association between the G1246A polymorphism of the hypocretin receptor 2 gene and cluster headache: a meta-analysis. *J Headache Pain* 8(3):152-6.
- Rakvag TT, Klepstad P, Baar C, Kvam TM, Dale O, Kaasa S, Krokan HE, Skorpen F. 2005. The Val158Met polymorphism of the human catechol-O-methyltransferase (COMT) gene may influence morphine requirements in cancer pain patients. *Pain* 116(1-2):73-8.
- REXED B. 1952. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J Comp Neurol* 96(3):414-95.
- Reyes TM, Walker JR, DeCino C, Hogenesch JB, Sawchenko PE. 2003. Categorically distinct acute stressors elicit dissimilar transcriptional profiles in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J Neurosci* 23(13):5607-16.
- Reynolds DV. 1969. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. *Science* 164(3878):444-5.
- Ribeiro-Barbosa ER, Skorupa AL, Cipolla-Neto J, Canteras NS. 1999. Projections of the basal retrochiasmatic area: a neural site involved in the photic control of pineal metabolism. *Brain Res* 839(1):35-40.
- Roby-Brami A, Bussel B, Willer JC, Le Bars D. 1987. An electrophysiological investigation into the pain-relieving effects of heterotopic nociceptive stimuli. Probable involvement of a supraspinal loop. *Brain* 110 (Pt 6):1497-508.
- Rojas-Piloni G, Mejia-Rodriguez R, Martinez-Lorenzana G, Condes-Lara M. 2010. Oxytocin, but not vasopressin, modulates nociceptive responses in dorsal horn neurons. *Neurosci Lett* 476(1):32-5.
- Rouge-Pont F, Piazza PV, Kharouby M, Le Moal M, Simon H. 1993. Higher and longer stress-induced increase in dopamine concentrations in the nucleus accumbens of animals predisposed to amphetamine self-administration. A microdialysis study. *Brain Res* 602(1):169-74.
- Saade NE, Atweh SF, Bahuth NB, Jabbur SJ. 1997. Augmentation of nociceptive reflexes and chronic deafferentation pain by chemical lesions of either dopaminergic terminals or midbrain dopaminergic neurons. *Brain Res* 751(1):1-12.

- Sakamoto F, Yamada S, Ueta Y. 2004. Centrally administered orexin-A activates corticotropin-releasing factor-containing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and central amygdaloid nucleus of rats: possible involvement of central orexins on stress-activated central CRF neurons. *Regul Pept* 118(3):183-91.
- Sakurai T. 2005. Roles of orexin/hypocretin in regulation of sleep/wakefulness and energy homeostasis. *Sleep Med Rev* 9(4):231-41.
- Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M. 1998. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92(5):1.
- Sandman CA, Kastin AJ. 1981. Intraventricular administration of MSH induces hyperalgesia in rats. *Peptides* 2(2):231-3.
- Sawchenko PE, Li HY, Ericsson A. 2000. Circuits and mechanisms governing hypothalamic responses to stress: a tale of two paradigms. *Prog Brain Res* 122:61-78.
- Sawchenko PE, Swanson LW. 1982. Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat. *J Comp Neurol* 205(3):260-72.
- Sawchenko PE, Swanson LW. 1985. Localization, colocalization, and plasticity of corticotropin-releasing factor immunoreactivity in rat brain. *Fed Proc* 44(1 Pt 2):221-7.
- Schafer M, Carter L, Stein C. 1994. Interleukin 1 beta and corticotropin-releasing factor inhibit pain by releasing opioids from immune cells in inflamed tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(10):4219-23.
- Schafer M, Mousa SA, Zhang Q, Carter L, Stein C. 1996. Expression of corticotropin-releasing factor in inflamed tissue is required for intrinsic peripheral opioid analgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(12):6096-100.
- Schmidt BL, Tambeli CH, Barletta J, Luo L, Green P, Levine JD, Gear RW. 2002. Altered nucleus accumbens circuitry mediates pain-induced antinociception in morphine-tolerant rats. *J Neurosci* 22(15):6773-80.
- Schvarcz JR. 1993. Long-term results of stimulation of the septal area for relief of neurogenic pain. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 58:154-5.
- Scott DJ, Heitzeg MM, Koeppe RA, Stohler CS, Zubieta JK. 2006. Variations in the human pain stress experience mediated by ventral and dorsal basal ganglia dopamine activity. *J Neurosci* 26(42):10789-95.
- Scott DJ, Stohler CS, Koeppe RA, Zubieta JK. 2007. Time-course of change in [¹¹C]carfentanil and [¹¹C]raclopride binding potential after a nonpharmacological challenge. *Synapse* 61(9):707-14.
- Shelton L, Becerra L, Borsook D. 2012. Unmasking the mysteries of the habenula in pain and analgesia. *Prog Neurobiol* 96(2):208-19.

- Sherman JE, Kalin NH. 1986. ICV-CRH potently affects behavior without altering antinociceptive responding. *Life Sci* 39(5):433-41.
- Sherman JE, Kalin N H. 1987. The effects of ICV-CRH on novelty-induced behavior. *Pharmacol Biochem Behav* 26(4):699-703.
- Sherman JE, Kalin N H. 1988. ICV-CRH alters stress-induced freezing behavior without affecting pain sensitivity. *Pharmacol Biochem Behav* 30(4):801-7.
- Shigenaga Y, Matano S, Okada K, Sakai A. 1973. The effects of tooth pulp stimulation in the thalamus and hypothalamus of the rat. *Brain Res* 63:402-7.
- Skagerberg G, Bjorklund A, Lindvall O, Schmidt RH. 1982. Origin and termination of the diencephalo-spinal dopamine system in the rat. *Brain Res Bull* 9(1-6):237-44.
- Skagerberg G, Lindvall O. 1985. Organization of diencephalic dopamine neurones projecting to the spinal cord in the rat. *Brain Res* 342(2):340-51.
- Skibicka KP, Grill HJ. 2009. Hypothalamic and hindbrain melanocortin receptors contribute to the feeding, thermogenic, and cardiovascular action of melanocortins. *Endocrinology* 150(12):5351-61.
- Skofitsch G, Insel TR, Jacobowitz DM. 1985. Binding sites for corticotropin releasing factor in sensory areas of the rat hindbrain and spinal cord. *Brain Res Bull* 15(5):519-22.
- Slaoui T, Mas-Gerdelat A, Ory-Magne F, Rascol O, Brefel-Courbon C. 2007. [Levodopa modifies pain thresholds in Parkinson's disease patients]. *Rev Neurol (Paris)* 163(1):66-71.
- Smock T, Fields HL. 1981. ACTH1-24 blocks opiate-induced analgesia in the rat. *Brain Res* 212(1):202-6.
- Sollertinskaya TN. 1997. Comparative study of the roles of ACTH and beta-endorphin in regulating conditioned reflex activity in the hedgehog. *Neurosci Behav Physiol* 27(6):663-71.
- Song GH, Leng PH, Gwee KA, Moolchala SM, Ho KY. 2005. Melatonin improves abdominal pain in irritable bowel syndrome patients who have sleep disturbances: a randomised, double blind, placebo controlled study. *Gut* 54(10):1402-7.
- Song ZH, Takemori AE. 1990. Involvement of spinal kappa opioid receptors in the antinociception produced by intrathecally administered corticotropin-releasing factor in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 254(2):363-8.
- Song ZH, Takemori A E. 1991. Antagonism of morphine antinociception by intrathecally administered corticotropin-releasing factor in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 256(3):909-12.
- Sotres-Bayon F, Torres-Lopez E, Lopez-Avila A, del Angel R, Pellicer F. 2001. Lesion and electrical stimulation of the ventral tegmental area modify persistent nociceptive behavior in the rat. *Brain Res* 898(2):342-9.
- Spike RC, Puskar Z, Andrew D, Todd AJ. 2003. A quantitative and morphological study of projection neurons in lamina I of the rat lumbar spinal cord. *Eur J Neurosci* 18(9):2433-48.

- Stiasny-Kolster K, Maerl W, Oertel WH, Moller JC, Treede RD. 2004. Static mechanical hyperalgesia without dynamic tactile allodynia in patients with restless legs syndrome. *Brain* 127(Pt 4):773-82.
- Sugiura Y, Terui N, Hosoya Y. 1989. Difference in distribution of central terminals between visceral and somatic unmyelinated (C) primary afferent fibers. *J Neurophysiol* 62(4):834-40.
- Suzuki H, Kawasaki M, Ohnishi H, Otsubo H, Ohbuchi T, Katoh A, Hashimoto H, Yokoyama T, Fujihara H, Dayanithi G, Murphy D, Nakamura T, Ueta Y. 2009. Exaggerated response of a vasopressin-enhanced green fluorescent protein transgene to nociceptive stimulation in the rat. *J Neurosci* 29(42):13182-9.
- Svensson P, Minoshima S, Beydoun A, Morrow TJ, Casey KL. 1997. Cerebral processing of acute skin and muscle pain in humans. *J Neurophysiol* 78(1):450-60.
- Swanson LW, Kuypers HG. 1980. The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. *J Comp Neurol* 194(3):555-70.
- Swanson LW, Sanchez-Watts G, Watts AG. 2005. Comparison of melanin-concentrating hormone and hypocretin/orexin mRNA expression patterns in a new parcelling scheme of the lateral hypothalamic zone. *Neurosci Lett* 387(2):80-4.
- Swanson LW, Sawchenko PE, Berod A, Hartman BK, Helle KB, Vanorden DE. 1981. An immunohistochemical study of the organization of catecholaminergic cells and terminal fields in the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus. *J Comp Neurol* 196(2):271-85.
- Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, Vale WW. 1983. Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinology* 36(3):165-86.
- SZENTAGOTHAI J. 1964. NEURONAL AND SYNAPTIC ARRANGEMENT IN THE SUBSTANTIA GELATINOSA ROLANDI. *J Comp Neurol* 122:219-39.
- Tamae A, Nakatsuka T, Koga K, Kato G, Furue H, Katafuchi T, Yoshimura M. 2005. Direct inhibition of substantia gelatinosa neurons in the rat spinal cord by activation of dopamine D2-like receptors. *J Physiol* 568(Pt 1):243-53.
- Taniguchi W, Nakatsuka T, Miyazaki N, Yamada H, Takeda D, Fujita T, Kumamoto E, Yoshida M. 2011. In vivo patch-clamp analysis of dopaminergic antinociceptive actions on substantia gelatinosa neurons in the spinal cord. *Pain* 152(1):95-105.
- Taylor BK, Joshi C, Uppal H. 2003. Stimulation of dopamine D2 receptors in the nucleus accumbens inhibits inflammatory pain. *Brain Res* 987(2):135-43.
- Ter Horst GJ, Meijler WJ, Korf J, Kemper RH. 2001. Trigeminal nociception-induced cerebral Fos expression in the conscious rat. *Cephalalgia* 21(10):963-75.
- Thurston CL, Culhane ES, Suberg SN, Carstens E, Watkins LR. 1988. Antinociception vs motor effects of intrathecal vasopressin as measured by four pain tests. *Brain Res* 463(1):1-11.

- Tillet Y, Ba tailler M, Thiery JC, Thibault J. 2000. Neronal projections to the lateral retrochiasmatic area of sheep with special reference to catecholaminergic afferents: immunohistochemical and retrograde tract-tracing studies. *J Chem Neuroanat* 19(1):47-67.
- Tjolsen A, Berge OG, Hole K. 1991. Lesions of bulbo-spinal serotonergic or noradrenergic pathways reduce nociception as measured by the formalin test. *Acta Physiol Scand* 142(2):229-36.
- Traub RJ, Silva E, Gebhart GF, Solodkin A. 1996. Noxious colorectal distention induced-c-Fos protein in limbic brain structures in the rat. *Neurosci Lett* 215(3):165-8.
- Tribollet E, Arsenijevic Y, Barberis C. 1998. Vasopressin binding sites in the central nervous system: distribution and regulation. *Prog Brain Res* 119:45-55.
- Tribollet E, Barberis C, Arsenijevic Y. 1997. Distribution of vasopressin and oxytocin receptors in the rat spinal cord: sex-related differences and effect of castration in pudendal motor nuclei. *Neuroscience* 78(2):499-509.
- Trivedi P, Yu H, MacNeil DJ, Van der Ploeg LH, Guan XM. 1998. Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain. *FEBS Lett* 438(1-2):71-5.
- Truesdell LS, Bodnar RJ. 1987. Reduction in cold-water swim analgesia following hypothalamic paraventricular nucleus lesions. *Physiol Behav* 39(6):727-31.
- Tsujino N, Sakurai T. 2009. Orexin/hypocretin: a neuropeptide at the interface of sleep, energy homeostasis, and reward system. *Pharmacol Rev* 61(2):162-76.
- Ueta Y, Dahanithi G, Fujihara H. 2011. Hypothalamic vasopressin response to stress and various physiological stimuli: visualization in transgenic animal models. *Horm Behav* 59(2):221-6.
- Uhl-Bronner S, Waltisperger E, Martinez-Lorenzana G, Condes LM, Freund-Mercier MJ. 2005. Sexually dimorphic expression of oxytocin binding sites in forebrain and spinal cord of the rat. *Neuroscience* 135(1):147-54.
- Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J. 1981. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* 213(4514):1394-7.
- Valentino RJ, Page M, Van Bockstaele E, Aston-Jones G. 1992. Corticotropin-releasing factor innervation of the locus coeruleus region: distribution of fibers and sources of input. *Neuroscience* 48(3):689-705.
- Vallone D, Picetti R, Borrelli E. 2000. Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Biobehav Rev* 24(1):125-32.
- van den Pol AN. 1982. The magnocellular and parvocellular paraventricular nucleus of rat: intrinsic organization. *J Comp Neurol* 206(4):317-45.
- van den Pol AN. 1999. Hypothalamic hypocretin (orexin): robust innervation of the spinal cord. *J Neurosci* 19(8):3171-82.

- van der KM, Tatro JB, Entwistle ML, Brakkee JH, Burbach JP, Adan RA, Gispen WH. 1999. Expression of melanocortin receptors and pro-opiomelanocortin in the rat spinal cord in relation to neurotrophic effects of melanocortins. *Brain Res Mol Brain Res* 63(2):276-86.
- Vandesande F, Dierickx K. 1975. Identification of the vasopressin producing and of the oxytocin producing neurons in the hypothalamic magnocellular neurosecretory system of the rat. *Cell Tissue Res* 164(2):153-62.
- Vertes RP. 2006. Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. *Neuroscience* 142(1):1-20.
- Villanueva L, Bouhassira D, Le Bars D. 1996. The medullary subnucleus reticularis dorsalis (SRD) as a key link in both the transmission and modulation of pain signals. *Pain* 67(2-3):231-40.
- Villanueva L, Chitour D, Le Bars D. 1986a. Involvement of the dorsolateral funiculus in the descending spinal projections responsible for diffuse noxious inhibitory controls in the rat. *J Neurophysiol* 56(4):1185-95.
- Villanueva L, Peschanski M, Calvino B, Le Bars D. 1986b. Ascending pathways in the spinal cord involved in triggering of diffuse noxious inhibitory controls in the rat. *J Neurophysiol* 55(1):34-55.
- Voisin DL, 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(1):183-93.
- Voisin DL, Guy N, Chalus M, Dallel R. 2005. Nociceptive stimulation activates locus coeruleus neurones projecting to the somatosensory thalamus in the rat. *J Physiol* 566(Pt 3):929-37.
- Vrinten DH, Adan RA, Groen GJ, Gispen WH. 2001. Chronic blockade of melanocortin receptors alleviates allodynia in rats with neuropathic pain. *Anesth Analg* 93(6):1572-7, table.
- Waite PME and Tracey DJ (1995), Trigeminal sensory system, in Paxinos G (ed.), *The rat nervous system*, Academic Press (Sydney), 705-724.
- Walker JM, Berntson GG, Sandman CA, Kastin AJ, Akil H. 1981. Induction of analgesia by central administration of ORG 2766, an analog of ACTH4--9. *Eur J Pharmacol* 69(1):71-9.
- Wang JW, Lundeberg T, Yu LC. 2003. Antinociceptive role of oxytocin in the nucleus raphe magnus of rats, an involvement of mu-opioid receptor. *Regul Pept* 115(3):153-9.
- Wang L, Martinez V, Larauche M, Tache Y. 2009. Proximal colon distension induces Fos expression in oxytocin-, vasopressin-, CRF- and catecholamines-containing neurons in rat brain. *Brain Res* 1247:79-91.
- Watanabe S, Kuwaki T, Yanagisawa M, Fukuda Y, Shimoyama M. 2005. Persistent pain and stress activate pain-inhibitory orexin pathways. *Neuroreport* 16(1):5-8.

- Watts AG, Swanson LW, Sanchez-Watts G. 1987a. Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: I. Studies using anterograde transport of Phaseolus vulgaris leucoagglutinin in the rat. *J Comp Neurol* 258(2):204-29.
- Wei ET, Kiang JG, Buchan P, Smith TW. 1986. Corticotropin-releasing factor inhibits neurogenic plasma extravasation in the rat paw. *J Pharmacol Exp Ther* 238(3):783-7.
- Wei H, Viisanen H, Pertovaara A. 2009 a. Descending modulation of neuropathic hypersensitivity by dopamine D2 receptors in or adjacent to the hypothalamic A11 cell group. *Pharmacol Res* 59(5):355-63.
- Wiegant VM, Gispen WH, Terenius L, De Wied D. 1977. ACTH-like peptides and morphine: interaction at the level of the CNS. *Psychoneuroendocrinology* 2(1):63-70.
- Wikberg JE. 1999. Melanocortin receptors: perspectives for novel drugs. *Eur J Pharmacol* 375(1-3):295-310.
- Wikner J, Hirsch U, Wetterberg L, Rojdmarm S. 1998. Fibromyalgia--a syndrome associated with decreased nocturnal melatonin secretion. *Clin Endocrinol (Oxf)* 49(2):179-83.
- Willer JC, Bouhassira D, Le Bars D. 1999. [Neurophysiological bases of the counterirritation phenomenon: diffuse control inhibitors induced by nociceptive stimulation]. *Neurophysiol Clin* 29(5):379-400.
- Williams DW, Jr., Lipton JM, Giesecke AH, Jr. 1986. Influence of centrally administered peptides on ear withdrawal from heat in the rabbit. *Peptides* 7(6):1095-100.
- Williamson DJ, Shepherd SL, Hill RG, Hargreaves RJ. 1997. The novel anti-migraine agent rizatriptan inhibits neurogenic dural vasodilation and extravasation. *Eur J Pharmacol* 328(1):61-4.
- Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Tokita S, Williams SC, Kisanuki YY, Marcus JN, Lee C, Elmquist JK, Kohlmeier KA, Leonard CS, Richardson JA, Hammer RE, Yanagisawa M. 2003. Distinct narcolepsy syndromes in Orexin receptor-2 and Orexin null mice: molecular genetic dissection of Non-REM and REM sleep regulatory processes. *Neuron* 38(5):715-30.
- Winsky-Sommerer R, Yamanaka A, Diano S, Borok E, Roberts AJ, Sakurai T, Kilduff TS, Horvath TL, De Lecea L. 2004. Interaction between the corticotropin-releasing factor system and hypocretins (orexins): a novel circuit mediating stress response. *J Neurosci* 24(50):11439-48.
- Woda A, Blanc O, Voisin DL, Coste J, Molat JL, Luccarini P. 2004. Bidirectional modulation of windup by NMDA receptors in the rat spinal trigeminal nucleus. *Eur J Neurosci* 19(8):2009-16.
- Wood PB, Schweinhardt P, Jaeger E, Dagher A, Hakyemez H, Rabiner EA, Bushnell MC, Chizh BA. 2007. Fibromyalgia patients show an abnormal dopamine response to pain. *Eur J Neurosci* 25(12):3576-82.
- Woolf CJ. 1987. Central terminations of cutaneous mechanoreceptive afferents in the rat lumbar spinal cord. *J Comp Neurol* 261(1):105-19.

- Xie X, Wisor JP, Hara J, Crowder TL, LeWinter R, Khroyan TV, Yamana A, Diano S, Horvath TL, Sakurai T, Toll L, Kilduff TS. 2008. Hypocretin/orexin and nociceptin/orphanin FQ coordinately regulate analgesia in a mouse model of stress-induced analgesia. *J Clin Invest* 118(7):2471-81.
- Yaksh TL, Yeung JC, Rudy TA. 1976. Systematic examination in the rat of brain sites sensitive to the direct application of morphine: observation of differential effects within the periaqueductal gray. *Brain Res* 114(1):83-103.
- Yamamoto T, Nozaki-Taguchi N, Chiba T. 2002. Analgesic effect of intrathecally administered orexin-A in the rat formalin test and in the rat hot plate test. *Br J Pharmacol* 137(2):170-6.
- Yang J. 1994. Intrathecal administration of oxytocin induces analgesia in low back pain involving the endogenous opiate peptide system. *Spine (Phila Pa 1976)* 19(8):867-71.
- Yang J, Chen JM, Liu WY, Song CY, Lin BC. 2006a. Through V2, not V1 receptor relating to endogenous opiate peptides, arginine vasopressin in periaqueductal gray regulates antinociception in the rat. *Regul Pept* 137(3):156-61.
- Yang J, Chen JM, Song CY, Liu WY, Wang G, Wang CH, Lin BC. 2006b. Through the central V2, not V1 receptors influencing the endogenous opiate peptide system, arginine vasopressin, not oxytocin in the hypothalamic paraventricular nucleus involves in the antinociception in the rat. *Brain Res* 1069(1):127-38.
- Yang J, Li P, Zhang XY, Zhang J, Hao F, Pan YJ, Lu GZ, Lu L, Wang DX, Wang G, Yan FL. 2011. Arginine vasopressin in hypothalamic paraventricular nucleus is transferred to the caudate nucleus to participate in pain modulation. *Peptides* 32(1):71-4.
- Yang J, Song CY, Liu WY, Lin BC. 2006c. Only through the brain nuclei, arginine vasopressin regulates antinociception in the rat. *Peptides* 27(12):3341-6.
- Yang J, Yang Y, Chen JM, Liu WY, Wang CH, Lin BC. 2007a. Central oxytocin enhances antinociception in the rat. *Peptides* 28(5):1113-9.
- Yang J, Yang Y, Chen JM, Xu HT, Liu WY, Wang CH, Lin BC. 2007b. Arginine vasopressin is an important regulator in antinociceptive modulation of hypothalamic paraventricular nucleus in the rat. *Neuropeptides* 41(3):165-76.
- Yang J, Yuan H, Liu W, Song C, Xu H, Wang G, Song C, Ni N, Yang D, Lin B. 2009. Arginine vasopressin in hypothalamic paraventricular nucleus is transferred to the nucleus raphe magnus to participate in pain modulation. *Peptides* 30(9):1679-82.
- Yirmiya R, Ben Eliahu S, Shavit Y, Marek P, Liebeskind JC. 1990. Stimulation of the hypothalamic paraventricular nucleus produces analgesia not mediated by vasopressin or endogenous opioids. *Brain Res* 537(1-2):169-74.
- Yoshida Y, Fujiki N, Maki RA, Schwarz D, Nishino S. 2003. Differential kinetics of hypocretins in the cerebrospinal fluid after intracerebroventricular administration in rats. *Neurosci Lett* 346(3):182-6.

- Yoshida Y, Fujiki N, Nakajima T, Ripley B, Matsumura H, Yoneda H, Mignot E, Nishino S. 2001. Fluctuation of extracellular hypocretin-1 (orexin A) levels in the rat in relation to the light-dark cycle and sleep-wake activities. *Eur J Neurosci* 14(7):1075-81.
- Yu CX, Zhu B, Xu SF, Cao XD, Wu GC. 2000. The analgesic effects of peripheral and central administration of melatonin in rats. *Eur J Pharmacol* 403(1-2):49-53.
- Yu SQ, Lundeberg T, Yu LC. 2003. Involvement of oxytocin in spinal antinociception in rats with inflammation. *Brain Res* 983(1-2):13-22.
- Yunus MB, Aldag JC. 1996. Restless legs syndrome and leg cramps in fibromyalgia syndrome: a controlled study. *BMJ* 312(7042):1339.
- Zadina JE, Kastin AJ. 1986. Neonatal peptides affect developing rats: beta-endorphin alters nociception and opiate receptors, corticotropin-releasing factor alters corticosterone. *Brain Res* 394(1):21-9.
- Zhao H, Zhu W, Pan T, Xie W, Zhang A, Ondo WG, Le W. 2007. Spinal cord dopamine receptor expression and function in mice with 6-OHDA lesion of the A11 nucleus and dietary iron deprivation. *J Neurosci Res* 85(5):1065-76.
- Zhao W, Sedman G, Gibbs M, Ng KT. 1995. Phosphorylation changes following weakly reinforced learning and ACTH-induced memory consolidation for a weak learning experience. *Brain Res Bull* 36(2):161-8.
- Zubieta JK, Smith YR, Bueller JA, Xu Y, Kilbourn MR, Jewett DM, Meyer CR, Koeppe RA, Stohler CS. 2002. μ -opioid receptor-mediated antinociceptive responses differ in men and women. *J Neurosci* 22(12):5100-7.
- Zubrzycka M, Janecka A. 2005. Effects of centrally administered vasopressin on orofacial pain perception in rats. *Brain Res* 1051(1-2):112-6.

Khaled Abdallah - Organisation des contrôles descendants hypothalamiques de la nociception trigéminal chez le rat.

Thèse : Spécialité Neurosciences ; Université d'Auvergne Clermont Ferrand

Résumé : La partie céphalique de notre corps est le siège de douleurs qui, comme la migraine, peuvent être très invalidantes. Le sous noyau caudal du trijumeau (Sp5C) assure le transfert des messages nociceptifs provenant de la face et des méninges vers les centres supérieurs. Ce transfert est modulé par des projections descendantes provenant de centres supraspinaux dont l'hypothalamus. Comment sont organisés les contrôles descendants hypothalamiques sur le Sp5C ?

En utilisant le traceur retrograde, Fluorogold (FG), nous avons analysé les projections hypothalamiques sur le Sp5C. Elles proviennent du noyau paraventriculaire (PVN), de l'aire hypothalamique latérale (LH), de l'aire hypothalamique perifornicale (PFX), du noyau A11 et de l'aire retrochiasmatisque (RCA). La zone ophtalmique V1 du Sp5C reçoit la plus forte densité de projections. Ces projections sont systématiquement bilatérales. Par double marquage immunohistochimique traceur/phénotype, nous avons précisé les phénotypes neurochimiques des neurones projetant du A11, LH et PFX vers le Sp5C. Dans le noyau A11, 60% environ de ces neurones sont dopaminergiques (DA) et 10% environ contiennent l'alpha-calcitonin gene related peptide (CGRP). De plus, 15% de ces neurones dans LH et 30% de ceux-ci dans PFX sont orexinergiques.

L'expression de Fos est augmentée dans le noyau A11 après stimulation nociceptive tonique inflammatoire (formol facial sous-cutané), indiquant que ce noyau contribue au traitement de l'information douloureuse. Cependant, ni les neurones DA ni les neurones FG expriment Fos. Par une approche comportementale et électrophysiologique, nous avons précisé le rôle des contrôles hypothalamiques dans la modulation de la nociception trigéminal. La lésion par acide kaïnique ou 6-OHDA d'un noyau A11 abaisse les réponses nociceptives comportementales (test au formol) chez le rat vigile. Pour tester l'hypothèse d'un contrôle hypothalamique orexinergique, nous avons enregistré les réponses électrophysiologiques de neurones trigéminaux à la stimulation électrique de leur champ récepteur. L'injection intracisternale (0.6 nmol dans 5µl) d'orexine A réduit (environ 50%) les réponses à l'activation sélectivement des fibres afférentes de type C sans modifier leur windup.

Au total, plusieurs de nos résultats méritent d'être soulignés. (1) Les voies hypothalamiques descendantes semblent contrôler préférentiellement les inputs méningés. (2) Un dysfonctionnement prolongé du noyau A11 provoque un état d'hypoalgésie, suggérant que l'activation des afférences DA provoque un état d'hyperalgésie. Or, les résultats d'injections locales de DA ou de manipulations aiguës du noyau A11 suggèrent un contrôle DA inhibiteur sur l'information nociceptive. Le dysfonctionnement DA pourrait favoriser une plasticité dans le Sp5C. (3) Enfin, l'inhibition sélective des réponses C par l'orexine A, suggère l'existence d'un contrôle présynaptique inhibiteur du message nociceptif trigéminal.

Abstract: Pain syndroms located in the head, such as migraine, can be particularly invalidating. Sensory inflow generated by nociceptors in the face and meninges activate neurons in the medullary dorsal horn (MDH), within the trigeminal system. There, a network of descending projections from cerebral structures enhance or inhibit the transfer of nociceptive information to higher centers. However, the functional anatomy of such descending controls of nociceptive information are still ill-defined. Here, we investigated the descending hypothalamic projections to the MDH.

Using the retrograde tracer, Fluorogold (FG), we analyzed the organization of hypothalamic projections to MDH. They originate from the paraventricular nucleus (PVN), lateral hypothalamic area (LH), perifornical hypothalamic area (PFX), A11 nucleus and reticulohypothalamic area (RCA). Within MDH, the V1 area, where primary afferent fibers of the ophthalmic branch of the trigeminal nerve terminate, receives the strongest hypothalamic projections. Hypothalamic projections to MDH are bilateral. Using double-immunolabelling, we determined the molecular phenotype of A11 nucleus, LH and PFX projecting neurons to MDH. In A11 nucleus, about 60% of projecting neurons to MDH are dopaminergic (DA) and about 10% contain the alpha-calcalcitonin gene related peptide (CGRP). Fifteen percent of LH projecting neurons to MDH and 30% of PFX ones contain orexin.

Pain (facial formalin test) elevates Fos expression in A11 nucleus, suggesting that it contributes to pain processing. However, it is worth noting that Fos-immunoreactive neurons are neither DA nor projecting neurons. We combined behavioral and electrophysiological techniques to get further insights into the role of hypothalamic projections on trigeminal pain. Lesion of A11 nuclei, by locally injecting kainic acid or 6-OHDA, reduces spontaneous pain behavior (facial formalin test). To examine whether orexin descending hypothalamic projections control trigeminal pain, we examined the effect of intracisternally applied orexin A on electrophysiological responses of trigeminal neurons to electrical stimulation of their receptive field. Orexin A (0.6 nmol in 5µl) selectively reduces (about 50%) C-fiber-evoked responses but not the windup phenomenon.

Several of these results are worth to note. (1) Descending hypothalamic projections predominantly control VI area of MDH, where primary afferent fibers innervating the meninges terminate. (2) The effect of long-lasting dysfunction of A11 nucleus suggests that activation of descending DA projections produce a state of hyperalgesia. This is at odds with the conclusion of previous reports on the effects of local administration of DA or acute manipulations of A11 nuclei, suggesting that descending DA projections rather inhibit nociceptive transmission. Long-lasting dysfunction of descending A11 DA projections might enable plasticity changes in DH neuronal network. (3) That orexin A selectively inhibits C-fiber-evoked responses suggests that orexin A selectively controls the transfer of nociceptive information via a presynaptic mechanism.

Mots clés: Hypothalamus, nociception, complexe sensitive du trijumeau, dopamine, orexine, rat.

