N° d'ordre

Année 2011

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE NEUROSCIENCE ET COGNITION

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 18 Novembre 2011

par

M Olivier CLEMENT

L'hypothalamus latéral contiendrait le générateur principal du sommeil paradoxal

Arguments neuroanatomiques et pharmacologiques chez le rat

Thèse réalisée sous la direction de Pierre-Hervé LUPPI
Centre de recherche en neuroscience de Lyon, INSERM U1028, CNRS UMR 5292
Equipe Physiopathologie des réseaux neuronaux du cycle sommeil

Membres du Jury :	Pr. Luc ZIMMER	Président
	Dr. Véronique FABRE	Rapporteur
	Dr. Thierry GALLOPIN	Rapporteur
	Pr. Yves DAUVILLIERS	Examinateur
	Dr. Pierre-Hervé LUPPI	Directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	**M. A. Bonmartin**
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur G. Annat
Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. le Professeur D. Simon
Vice-président du Conseil Scientifique	M. le Professeur J-F. Mornex
Secrétaire Général	M. G. Gay

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur J. Etienne
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly
UFR d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : M. le Professeur F. Locher
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. le Professeur Y. Matillon
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : M. le Professeur P. Farge

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. le Professeur F. De Marchi
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. Fleury
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme le Professeur H. Parrot
Département GEP	Directeur : M. N. Siauve
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. Akkouche
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur A. Goldman
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. Ben Hadid
Département Physique	Directeur : Mme S. Fleck
Département Sciences de la Terre	Directeur : Mme le Professeur I. Daniel
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. C. Collignon
Observatoire de Lyon	Directeur : M. B. Guiderdoni
Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon 1	Directeur : M. P. Fournier
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. Pignault
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. Coulet
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. le Professeur J-C. Augros
Institut Universitaire de Formation des Maîtres	Directeur : M. R. Bernard

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier chaleureusement tous les membres du jury d'avoir bien voulu consacrer une partie de leur temps à l'évaluation de ma thèse en espérant que ce travail sera à la hauteur de leurs espérances.

Merci à Luc Zimmer d'avoir accepté de présider ce jury.

Merci à Yves Dauvilliers pour avoir maintenu sa présence dans ce jury en acceptant mes conditions sur la date de soutenance.

Encore merci aux deux rapporteurs Thierry Gallopin et Véronique Fabre qui ont accepté, sans le savoir, de corriger une thèse « en kit » ! Merci pour leur disponibilité et leurs remarques constructives et pertinentes sur le manuscrit.

Enfin, merci à Pierre-Hervé Luppi pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, pour son aide, son intérêt pour mon travail tout au long de ces années, mais également pour son enthousiasme, sa disponibilité et le prêt de son jardin pour les barbecues d'été du labo.

Un grand merci à toutes les personnes qui m'ont aidé et qui ont participé de près ou de loin à ce travail, avec dans le désordre :

- Anne, pour m'avoir accueilli, par intermittence certes, mais pendant de longs mois (années ?) pour essayer de faire marcher le double marquage immuno/in situ lorsque l'altitude et l'âge du capitaine venaient jouer les troubles fêtes.
- Patrice, pour toutes les discussions scientifiques autant que pausesques, et pour m'avoir fournit un code myTF1 pour regarder la finale du championnat d'Europe de hand.
- Paul et Gaël, pour leur disponibilité et leur encadrement tout au long du projet BDNF : même si je n'ai pas inclus cette partie dans mon manuscrit, je sais qu'ils savent à quel point ce projet me tenait à cœur. Merci aussi à Gaël pour le prêt de sa Wii aux repas de noël et à Paul pour la leçon de danse sur la dite console ! Et qu'il soit écrit quelque part que j'irai (un jour, après un long entrainement !!!) relever le défi de la piscine face à gayoul…
- Valérie, pour tout ce qu'elle fait au quotidien pour que le labo puisse tourner, et toujours avec le sourire avec ça ! Avec deux neurones quand même t'en fais des choses !
- A Tic et Tac (alias Paul-Antoine et Sébastien) pour leurs arrivées fracassantes au labo et leur aide précieuse donnée sans modération (mon compte épargne temps doit être négatif).
- A Céline pour ne pas avoir eu le choix de me laisser maniper sans blouse et pour la synthèse des sondes.
- A Lucienne et Dônise pour leur soutien à l'égard des jeunes, leur disponibilité et leur générosité. Profitez bien de la retraite ! Il faudrait les mêmes pour les futurs thésards !
- A tous les anciens thésards : Pakal, pour ses blagues et ses miaous, Billy, pour ses chansons, son calendrier de l'avant Playmobil et son impassibilité devant les Giles à la fête de la science, Bastien alias le gros bâtard, pour son bureau et sa capacité à raconter les fins de films, sans oublier Lucie et Yaz. Merci pour votre accueil, notre intégration, le temps que vous nous avez consacré, tout ce que vous nous avez appris, les soirées raclette et les fêtes de l'IFR, ou plutôt des IFR car dans le labo tant que y a boire…autant y aller !
- A tous les nouveaux thésards qui ont remplacé les anciens, Mahdy avec ses Comment ? Thèses de BIIIPP, Thésards de BIIIPP, Vie de BIIIPPP, Mickel pour tout ce que je ne sais pas parceque

je n'étais pas à la bonne soirée et pour son pays si différent de celui de Mahdy (Comment ? Vous êtes tous les deux Libanais ? Ah bon !), Sara, pour ses fonds d'écran et pour avoir compté la glycine, TOUTE la glycine (par contre, faut vraiment que tu mettes du fromage dans ta tortilla !), Léa, pour ses blagues à la Pakal qu'on ne comprend pas toujours, c'est dû à l'électrophy ça ? Bonne chance à tous ! Prenez exemple sur vos aînés !

- A Leslie, qui ne rentre ni dans la catégorie « anciens » ni dans celle « nouveaux » mais qui bois avec tout le monde… comme ça on n'est jamais seul. Puisqu'on parle alcool, t'as déjà acheté ta bouteille pour Patrice ?
- Aux étudiants que j'ai encadré : Pauline et Manu, deux étudiants, deux abandons de la recherche ! C'est ce qu'on appelle faire du 100 % ! Excellent comme score ! Bon, prof je peux comprendre, mais cuisto ? Allez ! Va dormir Manu, t'as dû respirer un peu trop de formamide, t'as plus les idées claires !
- Au nutella qui m'a accompagé dans tous mes goûters.

Ils n'ont pas participé à tout ça mais ils ont néanmoins joué un rôle primordial dans cette thèse : je veux bien entendu parle de tous mes amis :

Les Hanks : Flo, MG, Pab, Ma, pour les ppwwouuuh (ou pwwwwoohhhh ça dépend de l'humeur), les aaahhh, les mab, les monc, les bab, les kiwis (voir les salades de fruits), les fesses (j'en connais d'ailleurs qui n'ont toujours pas remonté la rue d'la ré), les vacances et les soirées, passées et à venir.

Les Bordelais : Corky, Etche, Gweg, Cam, Bichon, Alf, Pierrot, Momo, Coco, Jean Sé, Coach, pour les années et les années passées ensembles, les soirées sous les étiquettes, les tennis (perdus pour beaucoup), les quiquidortoù, les journées à la plage, les sessions d'anthologie (ou pas). En tout cas si y a bien une chose pour laquelle je ne vous remercie pas c'est pour vos moments repos sur la plage ! Allez ! On joue aux raquettees ?

Les volleyeurs : Bat, Baba, p'tit Oliv, Seb, Mickey, Paul, Chris, Niel pour les bougies, buffets et autres blocs qui font du bien le soir, après le labo et avant une bière/madeleine !

La plage, la mer et la nature

Un immense merci à toute ma famille, oncles, tantes, cousins, grands parents qui ont toujours été là et qui m'ont soutenu et changé les idées notamment durant cette dernière ligne droite (éviter le facteur tout de même), mais surtout, à mon papa, à ma maman, à mon frère et à ma sœur. C'est avant tout grâce à eux si j'ai pu en arriver ici aujourd'hui. Merci pour votre soutien, votre amour, vos conseils et tout ce que vous m'avez toujours apporté, la liste serait trop longue ici !

Enfin un immense merci à Marina ! Merci pour ton amour, ta confiance, ton soutien dans les moments difficiles. Je sais que l'on a dû faire certains sacrifices durant cette dernière année à cause de ma thèse et je m'en excuse. On se rattrapera ! Mille mercis pour tout ce que tu as partagé avec moi et pour tout ce dont je n'ai la place de parler ici.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES VI

ABBREVIATIONS XII

INTRODUCTION GENERALE 2

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES 6

CHAPITRE I - ETATS DE VIGILANCE, FONCTIONS ET PATHOLOGIES ASSOCIEES AU SOMMEIL PARADOXAL 8
I.1 – PHENOMENOLOGIE DES ETATS DE VIGILANCE 9
I.1.1 – L'éveil 9
I.1.2 – Le sommeil lent 9
I.1.3 – Le sommeil paradoxal 11
I.1.3.a – Les phénomènes toniques 11
I.1.3.b – Les phénomènes phasiques 11
I.1.4 – L'organisation du cycle veille-sommeil chez le rat 12
I.2 – LES FONCTIONS DU SOMMEIL PARADOXAL 12
I.2.1 – L'activité onirique du sommeil paradoxal : gardien de la conscience et de l'instinct 13
I.2.2 – Sommeil paradoxal et maturation cérébrale 14
I.2.3 – Sommeil paradoxal et neurogenèse 15
I.2.4 – Sommeil paradoxal et apprentissage 17
I.2.5 – Sommeil paradoxal et gestion des émotions 17
I.3 – LES PATHOLOGIES ASSOCIEES AU SOMMEIL PARADOXAL 19
I.3.1 – La narcolepsie 19
I.3.1.a - Symptomatologie 19
I.3.1.b - Origines neurologiques 19
I.3.2 – Les troubles comportementaux associés au SP ou RBD 20
CHAPITRE II – LES RESEAUX NEURONAUX SOUS TENDANT LE CYCLE VEILLE-SOMMEIL 22
II.1 – MECANISMES NEURONAUX RESPONSABLES DE L'EVEIL 22
II.1.1 – Le système noradrénergique du locus coeruleus 22
II.1.2 – Le système sérotoninergique du noyau du raphé dorsal 25
II.1.3 – Le système histaminergique de noyau tuberomammillaire 26
II.1.4 – Le système hypocrétinergiques de l'hypothalamus postérieur 28
II.1.5 – Les systèmes cholinergiques du tegmentum ponto-mésencéphalique et du télencéphale basal 31
II.1.5.a – Le tegmentum ponto-mésencéphalique 31
II.1.5.b – Le télencéphale basal 31
II.2 – MECANISMES NEURONAUX RESPONSABLES DU SOMMEIL LENT 34
II.2.1 – La région préoptique et la genèse du SL 34
II.2.2 – Modulation de l'activité du VLPO : changements Ev-SL et homéostasie du SL 36
II.2.2.a – L'inhibition du VLPO par les systèmes d'éveil 36
II.2.2.b – La régulation homéostasique du SL : MnPn et les facteurs hypnogènes 37
II.2.2.c – Le noyau suprachiasmatique et la régulation circadienne du SL 38
II.2.3 – Le thalamus et la genèse des ondes lentes 39
II.3 – MECANISMES NEURONAUX RESPONSABLES DU SOMMEIL PARADOXAL 41
II.3.1 – Vers la recherche d'un centre du SP : l'hypothèse cholinergique 41
II.3.2 – Les neurones SP-on du noyau sublatérodorsal et la genèse du SP 42

II.3.3 – Les noyaux gigantocellulaires bulbaires : relais du SLD dans le contrôle de l'atonie musculaire 44
II.3.4 – Les structures SP-off dites permissives et le contrôle GABAergique du SLD 47
II.3.5 – L'inactivation GABAergique des structures monoaminergiques 50
II.3.6 – Le rôle de l'hypothalamus postérieur dans la régulation du SP 52
II.3.7 – Modèles de la genèse et du maintien du SP 54
CHAPITRE III – OBJECTIFS ET APPROCHES EXPERIMENTALES 58
III.1 – DETERMINER LA NATURE NEUROCHIMIQUE DES NEURONES SP-ON DU SLD 58
III.2 – CARACTERISER LA PRESENCE ET LA LOCALISATION DES NEURONES GLYCINERGIQUES PONTOBULBAIRES IMPLIQUES DANS LA REGULATION DU SP 58
III.3 – CARACTERISER LES AFFERENCES MAJEURES AUX NEURONES SP-OFF DE LA VLPAG/DDPME ET LES CONFIRMER PAR UNE APPROCHE PHARMACOLOGIQUE 58
III.4 – CONFIRMER L'IMPLICATION DU DPGI DANS LA REGULATION DU SP VIA L'INHIBITION DES NEURONES MONOAMINERGIQUES 59

MATERIELS ET METHODES 60

I – LA POLYSOMNOGRAPHIE 62
I.1 – Rappels théoriques 62
I.2 – Protocole expérimental 62
I.2.1 – Chirurgie et récupération post-opératoire 62
I.2.2 – Enregistrements polysomnographiques et analyse du cycle veille-sommeil 63
II – LE TRAÇAGE DE VOIES NERVEUSES PAR L'UTILISATION D'UN TRACEUR RETROGRADE 64
II.1 – Principe et traceur utilisé 64
II.2 – Protocole expérimental 65
III – PRIVATION ET HYPERSOMNIE DE SP PAR LA METHODE DE LA PISCINE 65
III.1 – Principe 65
III.2 – Protocole détaillé 66
IV – PHARMACOLOGIE INTRATISSULAIRE SUR ANIMAL LIBRE DE SE MOUVOIR 67
IV.1 – Principe et drogues utilisées 67
IV.2 – Protocole détaillé 67
V – PERFUSION ET PREPARATION DES TISSUS 68
V.1 – Principe 68
V.2 – Protocole détaillé 69
VI – UTILISATION DU PROTO-ONCOGENE C-FOS COMME MARQUEUR D'ACTIVATION NEURONALE 69
VII – IMMUNOHISTOCHIMIE 71
VII.1 – Principe de l'immunohistochimie 71
VII.2 – Anticorps utilisés 71
VII.3 – Protocole utilisé pour le double marquage DAB 72
VII.4 – Protocole utilisé pour le triple marquage DAB/fluorescence 73
VIII – IMMUNO-DETECTION DE C-FOS COUPLE A L'HYBRIDATION *IN SITU* DE *VGLUT2* 73
VIII.1 – Principe de l'hybridation *in situ* 73
VIII.2 – Sondes utilisées 73
VIII.3 – Protocole utilisé pour l'hybridation *in-situ* 75
VIII.4 – Couplage de l'immunohistochimie du c-FOS avec l'hybridation *in situ* de *vglut2* ou *gad65* 75
IX – ANALYSE DES RESULTATS 76
IX.1 – Analyse du cycle veille-sommeil et analyse spectrale 76

IX.2 – Analyse des résultats histologiques 76
X – STATISTIQUES 77

RESULTATS 78

CHAPITRE I – DETERMINATION DE LA NATURE NEUROCHIMIQUE DES NEURONES DU SLD, NOYAU RESPONSABLE DE LA MISE EN PLACE DU SP 80
CHAPITRE II - LOCALISATION DES NEURONES GLYCINERGI-QUES ACTIVES LORS D'UNE HYPERSOMNIE DE SP ET POTENTIELLEMENT IMPLIQUES DANS LA REGULATION DE L'ATONIE MUSCULAIRE : UNE ETUDE PRELIMINAIRE 88
CHAPITRE III – IMPLICATION DE L'AIRE LATERALE DE L'HYPOTHALAMUS DANS LA REGULATION DU SP VIA SES PROJECTIONS SUR LES NEURONES GABAERGIQUES SP-OFF DE LA VLPAG/DDPME 94
CHAPITRE IV – IMPLICATION DU NOYAU PARAGIGANTOCEL-LULAIRE DORSAL DANS LA REGULATION DU SP VIA L'INHIBITION DES SYSTEMES NORADRENERGIQUES ET ADRENERGIQUES 128

DISCUSSION GENERALE 156

RESUME DES PRINCIPAUX RESULTATS OBTENUS 158
CONSIDERATIONS METHODOLOGIQUES 159
INTERPRETATION FONCTIONNELLE 161
SLD ET GIV : DEUX STRUCTURES EXECUTRICES DU SOMMEIL PARADOXAL 161
Les neurones glutamatergiques du SLD 161
Le GiV/GiA, seul relai du SLD pour la mise en place de l'atonie lors du SP 161
Les neurones SP-on du GiV/GiA sont glycinergiques et GABAergiques 163
Les neurones SP-on du SLD et l'activation corticale 163
LES MECANISMES DE REGULATION DU SP 165
Les mécanismes inducteurs de SP 165
Les mécanismes d'inhibition du SP 167
Hypothalamus latéral, neurones à MCH et homéostasie du SP 169
PERSPECTIVES 171
Mieux contrôler la spécificité des populations neuronales ciblées 171
Le contrôle de l'atonie musculaire par le SLD via le GiV 171
L'ordre séquentiel d'activation des différentes populations de type SP-on 171
L'implication de l'amygdale centrale (Ce) dans l'apparition des crises de cataplexie 172
L'implication des neurones à MCH dans la régulation de l'homéostasie du SP 172

CONCLUSION GENERALE 174

LISTE DES PUBLICATIONS 178

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 182

RESUME 210

ABBREVIATIONS

3V	3ième ventricule
4N	noyau trochléaire
4V	4ième ventricule
5-HT	5-hydroxytryptamine ou sérotonine
7N	noyau du nerf facial
12N	noyau de l'hypoglosse
A1	groupe noradrénergique A1
A1/C1	région avec des neurones adrénergiques et noradrénergiques
A2	groupe noradrénergique A2
A2/C2	région avec des neurones adrénergiques et noradrénergiques
A5	groupe noradrénergique A5
A6	groupe noradrénergique A6
A7	groupe noradrénergique A7
A9	groupe noradrénergique A9
A10	groupe noradrénergique A10
A11	groupe noradrénergique A11
AHC	aire hypothalamique antérieure, partie centrale
AHP	aire hypothalamique antérieure, partie postérieure
APT	noyau prétectal antérieur
Amb	noyau ambigu
AMPT	alpha-methyl-para-tyrosine
Aq	aqueduc
Arc	noyau arqué
ATg	noyau tegmental antérieur
BST	noyau de la strie terminale
BLA	noyau amygdalien basolatéral
C1	groupe adrénergique C1
C2	groupe adrénergique C2
C3	groupe adrénergique C3
Ce	noyau amygdalien central
CGPn	substance grise pontique
CnF	noyau cunéiforme
cp	pédoncule cérébral
CTb	sous-unité b de la toxine cholérique
DA	aire dorsale de l'hypothalamus
dDpMe	partie dorsale du noyau réticulé mésencéphalique profond
DLPAG	substance grise périaqueducale, partie dorsolatérale
DM	noyau hypothalamique dorsomedian
DMPAG	substance grise périaqueducale, partie dorsomédiane
DPGi	noyau réticulé paragigantocellulaire dorsal
dDpMe	noyau réticulé mésencéphalique profond, partie dorsale
DpMe	noyau réticulé mésencéphalique profond
DR	noyau du raphé dorsal
DTg	noyau tegmental dorsal
EEG	électroencéphalogramme
EMG	électromyogramme
EOG	électrooculogramme
Ev	éveil
f	fornix

g7	genoux du nerf facial
GAD	glutamate décarboxylase enzyme de synthèse du GABA
Gi	noyau gigantocellulaire
GiA	noyau gigantocellulaire alpha
GiV	noyau gigantocellulaire ventral
GLYT2	transporteur vésiculaire de la glycine n°2
HCRT	hypocrétine (orexine)
HCRT-R	récepteur à l'hypocrétine
HRP	horse radish peroxidase (péroxydase de raifort)
icp	pédoncule cérébelleux inférieur
ic	capsule interne
IC	colliculus inférieur
IP	noyau interpédonculaire
IO	olive inférieure
KF	noyau de Kîlliker-Fuse
LC	locus coeruleus
LDT	noyau tegmental latérodorsal
LDTg	noyau tegmental latérodorsal
lfp	faisceau longitudinal pontique
LG	corps genouillé latéral
LH	aire latérale de l'hypothalamus
LHb	noyau de l'habenula latérale
LM	corps mammillaire latéral
LPAG	substance grise périaqueducale, partie latérale
LPB	noyau parabrachial latéral
LPGi	noyau réticulé paragigantocellulaire latéral
LPO	aire préoptique latérale
LVe	noyau vestibulaire latéral
Mc	noyau réticulé magnocellulaire
MCH	hormone de mélanoconcentration
me5	faisceau mésencéphalique trigeminal
MEA	noyau amygdalien median
MHb	noyau de l'habenula médiane
ml	lemniscus médian
ML	corps mammillaire médiane, partie latérale
mlf	faisceau longitudinal médian
MM	corps mammillaire médian, partie médiane
MnPO	noyau préoptique median
MnR	noyau du raphé médian
Mo5	noyau moteur trigéminal
MPB	noyau parabrachial médian
MPO	aire préoptique médiane
mt	faisceau mammillothalamique
MTu	noyau tubéral médian
MVe	noyau vestibulaire médian
opt	tractus optique
Pa	noyau hypothalamique paraventriculaire
pc	commissure postérieure
PCRt	noyau réticulé parvocellulaire

PeF	aire périfornicale
péri-LCα	péri-locus coeruleus α
PGO	onde ponto-geniculo-occipitale
PH	noyau hypothalamique postérieur
PMD	noyau prémammillaire, partie dorsale
Pn	noyau pontique
PnC	noyau pontique, partie caudale
PnO	noyau pontique, partie rostrale
PPT	noyau tegmental pédonculopontin
Pr	noyau prépositus
Pr5	noyau trigéminal sensoriel principal
PV	noyau paraventriculaire du thalamus
py	pyramidal tract
R	noyau rouge
RBD	REM sleep behaviour disorder
REM sleep	rapid eye mouvement sleep
RMg	noyau du raphe magnus
RMPAG	substance grise périaqueducale, partie rostromédiane
ROb	raphe obscurus
RPa	raphé palidus
RRF	retrorubral field
SC	colliculus supérieur
SCH	noyau suprachiasmatique
scp	pédoncule cérébelleux supérieur
scpd	pédoncule cérébelleux supérieur, branche descendante
SL	sommeil lent
SLD	noyau sublatérodorsal
SNC	substance noir, zone compacte
SNR	substance noir, zone réticulée
Sol	noyau du faisceau solitaire
SOREM	Sleep Onset REM Sleep
SP	sommeil paradoxal
sp5	faisceau trigéminal spinal
SpVe	noyau vestibulaire spinal
STh	noyau subthalamique
SuM	noyau supramammillaire
SupO	olive supérieure
TB	télencéphale basal
TCSP	trouble du comportement associé au sommeil paradoxal
TH	tryptophane hydroxylase
TMN	noyau tuberomammillaire
VLPAG	substance grise périaqueducale partie ventrolatérale
VLPO	aire préoptique ventrolatérale
VGLUT2	transporteur vésiculaire du glutamate n°2
VMH	noyau hypothalamique ventromédian
VTA	aire tegmentale ventrale
WGA	wheat germ agglutinin
ZI	zona incerta

INTRODUCTION GENERALE

27 ans ! C'est en moyenne le temps que chacun d'entre nous aura passé au cours de sa vie à dormir. Nous consacrons donc un tiers de notre vie à cette « activité » qu'est le sommeil et ce, sans savoir exactement ni pourquoi, ni comment.

Dans L'Iliade, Homère décrit « le sommeil et la mort, [comme] deux jumeaux », reflétant ainsi la croyance populaire puisque dans la mythologie grecque, Hypnos, dieu du sommeil, et Thanatos, dieu de la mort, sont frères et constituent deux présentations de la même condition du soi. Dans l'Odyssée, le sommeil d'Ulysse est pour lui une expérience terrible, « semblable à la mort », où il y endure assauts des dieux, crises profondes et voyages dans le temps et dans l'espace. Le sommeil était donc perçu dans l'antiquité comme un état passif, certes peuplé de rêves, mais dont la seule fonction était la récupération physique et psychique des efforts fournis durant la journée écoulée.

Cette conception passive du sommeil, qui nous apparait aujourd'hui comme archaïque, n'en est pas moins restée la seule explication jusque dans les années 1950 et l'avènement de la polygraphie (technique permettant l'enregistrement simultané des activités cérébrale, musculaire, cardiaques, etc.). En effet, l'électroencéphalographie (ou EEG), permettant l'enregistrement de l'activité cérébrale, a été inventé dans les années 1920 par le physiologiste allemand Hans Berger et il aura fallu attendre les années 1950 pour que l'EEG se développe et se répande dans la pratique médicale courante. L'application au sommeil de ce nouvel outil allait alors faire voler en éclat les croyances populaires : le sommeil n'est un phénomène ni uniforme, ni passif.

En effet, en 1957 à Chicago, un trio composé de Nathaniel Kleitman, Eugen Aserinsky et William Dement ont mis en évidence chez l'homme l'existence d'un troisième état de vigilance distinct de l'éveil et du sommeil lent. Ce sommeil profond, qui survient de manière périodique au cours du sommeil, est caractérisé par une activité corticale intense, une profonde atonie musculaire et des saccades oculaires rapides. Cette dernière caractéristique lui vaudra l'appellation de REM sleep (pour Rapide Eye Mouvement Sleep) dans la communauté Américaine. En France, on lui préfère la terminologie de Sommeil Paradoxal (SP) suite à sa découverte chez le chat par Michel Jouvet en 1959. Cette appellation fait référence au paradoxe observé durant cet état : une activité cérébrale similaire à celle de l'éveil associée à une atonie musculaire quasi totale.

Depuis sa découverte il y a plus de 60 ans, le sommeil paradoxal a été la source d'innombrables travaux visant à élucider tant son origine que sa fonction. En effet, comment ne pas le considérer comme primordial si l'on en juge par sa phylogénie : apparu il y a 150 millions d'années il est présent chez quasiment tous les homéothermes. La sélection naturelle, moteur de l'évolution, ayant plutôt tendance à contre sélectionner les adaptations « inutiles », aurait sans doute conduit à la disparition de ce stade si celui-ci n'avait pas une certaine utilité. Si l'étude du rôle physiologique du sommeil paradoxal a connu un essor considérable au cours de la dernière décennie, l'étude des mécanismes responsable de sa mise en place a commencé dès sa découverte. De plus, la découverte plus récente de pathologies associées au sommeil, et plus particulièrement au sommeil paradoxal, comme la narcolepsie ou les troubles comportementaux en sommeil paradoxal (ou RBD pour REM sleep Behaviour Disorders), leur association parfois forte avec des maladies neurodégénératives, a sans aucun doute relancé la nécessité de comprendre les mécanismes sous tendant la mise en place du sommeil paradoxal.

Comme tout domaine de recherche, celui de la genèse du sommeil paradoxal ne fait pas exception et n'échappe pas aux divergences d'opinion et aux controverses. Malgré tout, un modèle global et accepté de tous a pu émerger : la survenue du sommeil paradoxal serait la résultante de l'activation de populations neuronales dites exécutives avec l'arrêt concomitant d'autres populations dites permissives. Ces dernières seraient en effet responsables de l'inhibition des systèmes exécuteurs durant l'éveil et le sommeil lent. Leur

arrêt faciliterait ainsi l'activation des structures exécutives permettant ainsi l'apparition du sommeil paradoxal. Malgré ce modèle général, notre connaissance de l'ensemble de ces réseaux reste parcellaire et insuffisant, que ce soit à visée scientifique ou thérapeutique.

C'est dans l'optique d'une meilleure compréhension des mécanismes neuronaux régulant cet état si particulier que s'inscrivent les travaux présentés dans ce manuscrit. Pour cela, nous avons couplé plusieurs techniques regroupées sous le terme générique de « neuroanatomie fonctionnelle » : traçage de voies nerveuses ; neuroimagerie fonctionnelle à l'aide du marqueur d'activation neuronal c-FOS ; modulation des quantités de sommeil paradoxal ; identification de la nature neurochimique des cellules (par hybridation *in situ* ou immunomarquage de marqueurs spécifiques d'un type cellulaire) ; pharmacologie intratissulaire à l'aide de canules et effet sur le cycle veille-sommeil.

L'ensemble de ces travaux avait deux grands objectifs : confirmer la nature neurochimique de certaines populations neuronales clefs dans la genèse du sommeil paradoxal ; et parfaire notre connaissance des interactions existantes entre les diverses populations impliquées dans la régulation du cycle veille-sommeil.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE I - Etats de vigilance, fonctions et pathologies associées au sommeil paradoxal

Tous les êtres vivants présents à la surface du globe sont soumis au cycle jour/nuit et alternent entre un état actif, durant lequel ils interagissent avec leur environnement, et une phase d'inactivité. Cette dernière est généralement associée à une baisse de la perception environnementale et au repos.
Ce stade d'inactivité a également été associé au sommeil chez une grande quantité d'espèces, notamment chez tous les vertébrés supérieurs. Depuis quelques années, la mise en évidence d'un stade de « sommeil » chez des espèces dites « inférieures » tend à démontrer que le sommeil n'est pas l'apanage des seuls animaux dits « évolués » mais serait bien une caractéristique commune à tous les être vivants. En particulier, la présence d'une phase de « sommeil » a pu être mise en évidence chez la Blatte (Leucophea maderae), la Drosophile (Drosophila melanogaster), le Poisson zèbre (Danio rerio) et le Ver (Caenorhabditis elegans) (Zimmerman *et al.*, 2008). En effet, le sommeil se caractérise par : une posture comportementale spécifique ; une augmentation de l'intensité des stimuli nécessaires à l'induction de l'éveil ; un passage rapide entre les états de « sommeil » et d'éveil ; la présence d'un phénomène d'homéostasie ; et enfin, une interaction avec le cycle circadien. Le **Tableau 1** récapitule, pour le Ver, Poisson zèbre et la Drosophile, la présence de ces signes distinctifs menant à la conclusion de l'existence d'un état « de type sommeil » chez ces espèces.

Si le sommeil apparait donc comme un bien commun à de très nombreuses espèces, la présence d'un second type de sommeil n'a été reportée que tardivement et ce, uniquement chez les homéothermes : il s'agit du sommeil paradoxal (SP). La découverte de ce troisième état (voir introduction générale), en plus de l'éveil (Ev) et du sommeil, a complexifié le cycle veille-sommeil que l'on pensait connaitre. En effet, la polygraphie, technique d'enregistrement synchronisé de l'électroencéphalogramme (EEG) et de l'électromyogramme (EMG), mais aussi de nombreux autres paramètres physiologiques tels que l'électrooculogramme (EOG), les rythmes cardiaque et respiratoire, la température corporelle, etc., permet de distinguer de manière claire Ev, sommeil lent (SL) et SP.

Dans ce premier chapitre, nous nous attacherons tout d'abord à préciser les caractéristiques de chacun de ces trois états. Si le chat a été le modèle animal historique pour l'étude du cycle veille-sommeil, il a depuis plusieurs année été progressivement remplacé par l'utilisation du rat et de la souris, et ce pour des raisons autant financières (coût moindre des modèles murins) que techniques (possibilités d'utilisations des techniques actuelles de biologie moléculaire, transgénèse, séquençage, etc.). Pour cette raison, et puisque cette étude est réalisée chez le rat, nous décrirons ici principalement le cycle veille-sommeil de cet animal. Toutefois, des références au chat pourront y être apportées en y faisant explicitement référence.
Les deuxième et troisième parties de ce chapitre seront ensuite consacrées aux fonctions aujourd'hui attribuées au SP ainsi qu'aux pathologies associées à cet état.

Model organism	Behavioral criterion for sleep				
	Species-specific posture	Increased arousal	Quick reversibility	Homeostasis	Interaction with circadian clock
Caenorhabditis elegans (worm)		×	×	×	×
Drosophila melanogaster (fruitfly)	×	×	×	×	×
Danio rerio (zebrafish)	×	×	×	×	×

Tableau I.1 : Existence d'un état de sommeil chez trois organismes modèles non mammifères
La croix (×) indique que la présence de ce caractère comportemental a été démontré chez l'espèce concernée. D'après Zimmerman et al., 2008.

I.1 – Phénoménologie des états de vigilance

Si de nombreux paramètres physiologiques varient en fonction du cycle veille-sommeil, il est possible de distinguer l'Ev, le SL et le SP par l'analyse simultanée des seuls EEG et EMG. Toutefois, il est important de remarquer que pour certaines pathologies pouvant affecter un ou plusieurs de ces paramètres (**voir partie I.3**), le recours à l'analyse de données supplémentaires est indispensable pour la détermination de l'état du sujet. C'est pourquoi nous ne limiterons pas notre caractérisation des états de vigilance aux seuls EEG et EMG.

I.1.1 – L'éveil

L'éveil est la phase du cycle veille-sommeil pendant lequel l'animal va interagir avec son environnement, que ce soit pour s'alimenter, explorer son environnement, se reproduire, se déplacer, etc. L'animal est donc actif, attentif aux stimuli environnementaux et a les yeux ouverts.

Au niveau de l'EMG, les enregistrements indiquent la présence d'un tonus musculaire important, variable en fonction de l'activité comportementale de l'animal. En effet, une augmentation de la locomotion de l'animal se traduira par une augmentation d'évènements phasiques de forte amplitude correspondants aux contractions des muscles enregistrés (**Figure I.1A**). Au niveau de l'EEG, on parle d'un d'état « activé » : l'activité corticale est rapide, désynchronisée et de faible amplitude. L'analyse du spectre de fréquence de l'EEG de l'éveil révèle la présence d'ondes rapides de type béta (20-30 Hz) et gamma (50-60 Hz). De plus, des ondes de type thêta (5-10 Hz) sont également présentes. Ces ondes ont une origine hippocampique, mais du fait de l'importance de l'hippocampe chez le rat, ce sont ces ondes thêta qui sont majoritairement retrouvées au niveau de l'EEG de surface (**Figure I.1B**). De plus la fréquence de ces ondes thêta peut légèrement varier en fonction du comportement de l'animal. En effet, lors d'un éveil calme, ce rythme thêta oscille autour de 5-6,5 Hz alors qu'il peut atteindre 7-8 Hz au cours d'un éveil actif (exploration ou apprentissage par exemple) (Vyazovskiy and Tobler, 2005).

Concernant l'EOG, l'activité des muscles oculaires est importante et traduit les saccades oculaires permanentes ayant lieu durant l'éveil. Les fréquences cardiaques et respiratoires sont élevées (rapportées à celle observées en SL) et augmentent en fonction de l'activité motrice et/ou émotionnelle de l'animal. La température corporelle est au contraire très stable et est régulée autours de 38°C.

I.1.2 – Le sommeil lent

Chez l'homme, on décompose classiquement le SL en 4 stades qui reflètent la profondeur du sommeil. On parle ainsi de manière commune de sommeil lent léger (stades I et II), et de sommeil lent profond (stades III et IV). Chez le chat, seuls 2 stades sont encore distingués alors que chez le rat, animal d'étude de cette thèse, un seul stade de SL est généralement décrit.

Chez le rat, la transition entre l'éveil et le SL est extrêmement courte et ne dure que quelques secondes. L'animal adopte une position en boule caractéristique, s'immobilise et ferme les yeux. Sa sensibilité à l'environnement qui l'entoure diminue au fur et à mesure qu'il sombre dans un sommeil de plus en plus profond. De même, ses températures corporelle et cérébrale ainsi que ses rythmes cardiaque et ventilatoire diminuent (ses derniers deviennent également plus réguliers). Sa position stéréotypée en boule, sur le ventre, la tête ramenée contre son thorax peut cependant varier en fonction de la température ambiante lui permettant ainsi de réguler sa température interne (Valatx *et al.*, 1973). Au niveau de l'EMG, cette position se traduit par une diminution de l'activité musculaire enregistrée et l'absence de phénomènes phasiques (**Figure I.1A**). Tout comme l'EMG, l'EOG ne montre aucune activité.

L'EEG est lui dit synchronisé, c'est-à-dire qu'il présente majoritairement des ondes lentes de grande amplitude. Ces ondes lentes prédominantes sont comprises entre 0,5 et 4 Hz et appartiennent à la gamme delta. Superposées à ce rythme delta, des ondes sigma plus rapides (10-14 Hz), aussi appelées fuseaux, sont également présentes (**Figure I.1**). La puissance des ondes delta, aussi appelé SWA (pour Slow Wave Activity), est un marqueur de l'homéostasie du sommeil puisque l'amplitude de ces ondes lentes dépend de l'intensité et la durée de l'éveil précédent la phase de sommeil (Tobler and Borbely, 1986; Vyazovskiy et al.,

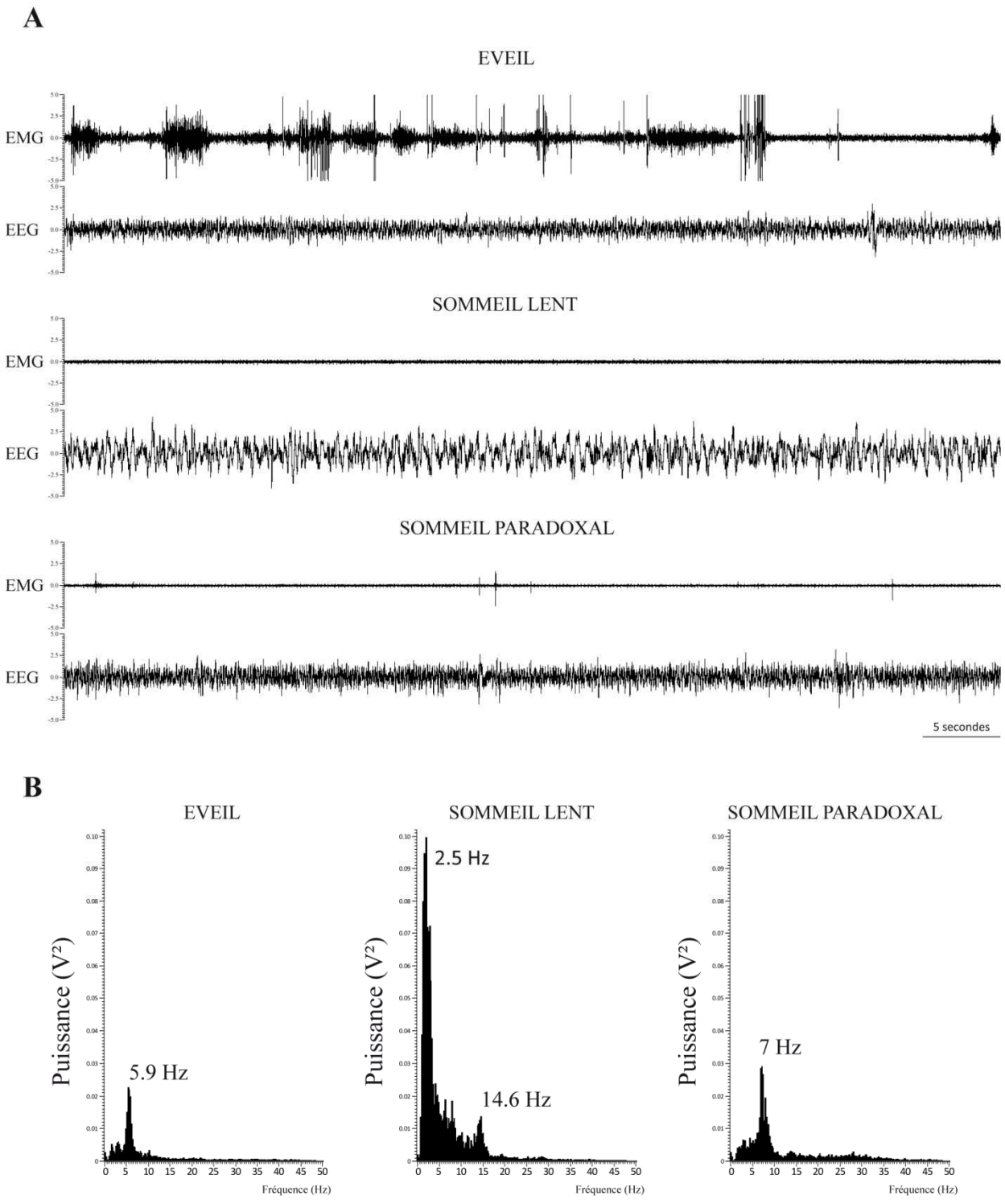


Figure I.1: Caractérisation polygraphique des états de vigilance chez le rat
(A) Tracés électromyographique (EMG) et électroencéphalographique (EEG) enregistrés chez le rat durant l'éveil, le sommeil lent et le sommeil paradoxal. L'EEG a été enregistré au niveau du cortex pariétal.
(B) Caractérisation de l'activité EEG de l'éveil, du sommeil lent et du sommeil paradoxal, au niveau du cortex pariétal à l'aide d'un spectre de puissance.

2007).

I.1.3 – Le sommeil paradoxal

Le sommeil paradoxal (SP), qui ne représente que 10 % de la phase claire et 5 % de la phase sombre, survient toujours après une phase de SL. Le passage direct de l'éveil au SP n'existe pas en conditions physiologiques normales mais peut survenir dans certaines conditions pathologiques (**voir partie I.3**). Contrairement au SL, le SP s'accompagne d'une augmentation du seuil d'éveil, de la température cérébrale ainsi que de la fréquence respiratoire qui devient irrégulière. La fréquence cardiaque devient également irrégulière : elle peut subir de fortes accélérations tout en étant, majoritairement, ralentie. Au niveau EEG et EMG, le SP se caractérise par la concomitance de phénomènes toniques, présents tout au long du stade, et de phénomènes phasiques, survenant de façon discontinue.

I.1.3.a – Les phénomènes toniques

Si l'on excepte les muscles ventilatoires, cardiaque, et oculaires, la quasi-totalité des muscles striés squelettiques présentent une complète absence d'activité, aussi appelé atonie musculaire, ce qui se caractérise par un EMG plat (**Figure I.1A**).

L'EEG ressemble lui à celui de l'éveil. Toutefois, il se distingue de ce dernier par la présence prédominante d'ondes theta (4-8 Hz) d'amplitude plus importante comme illustré par la **Figure I.1**. Des ondes rapides de type gamma (30-40 Hz) sont également présentes.

Cette association entre un relâchement musculaire complet, signe de repos, et une activité cérébrale intense proche de celle observée durant l'éveil a été à l'origine de la dénomination de « sommeil paradoxal » donnée par Michel Jouvet lors de la découverte de cet état chez le chat (Jouvet and Michel, 1959; Jouvet *et al.*, 1959).

I.1.3.b – Les phénomènes phasiques

Superposés à cette atonie musculaire « généralisée », deux types de mouvements sont observables au cours du SP. Tout d'abord, des mouvements brefs peuvent parcourir les extrémités des membres (doigts) et de la face (vibrisses, oreilles). On parle alors de twitch (tremblements). De plus, l'EOG présente une activité en bouffées, signe de la présence de mouvements oculaires rapides sous les paupières fermées. Chez le chat, ces mouvements rapides sont concomitant avec l'apparition de pointes PGO, phénomène électrique prenant naissance au niveau du pont et se propageant jusqu'au cortex occipital via les corps genouillés. Ces pointes PGO ont été supposées jouer un rôle dans l'activité onirique. Toutefois, elles n'ont été retrouvées ni chez l'homme ni chez le rat.

La présence de saccades oculaires durant cet état a amené les anglo-saxons à préférer le terme de REM sleep, pour « rapid eye mouvement sleep », suite à cette dénomination par Aserinsky et Kleitman lors de sa découverte chez l'Homme (Aserinsky and Kleitman, 1953).

Enfin, des érections péniennes surviennent également durant ce stade. Ces érections se produisent de manière aléatoire, sans corrélation temporelle avec les autres phénomènes phasiques (Schmidt *et al.*, 1994).

Si chez le rat, comme chez tout autre mammifères, chaque état (Ev, SL et SP) peut être facilement distinguable des 2 autres par une combinaison de caractéristiques bien précises, la survenue de tel ou tel état n'apparait pas de manière stochastique. En effet, la répartition et l'apparition du sommeil au cours de la journée est un phénomène relativement bien conservé d'un individu à un autre : c'est le cycle veille-sommeil.

I.1.4 – L'organisation du cycle veille-sommeil chez le rat

Tout comme de nombreux processus comportementaux et physiologiques qui varient de manière circadienne, le cycle veille-sommeil n'échappe pas à cette règle. Cependant, la fréquence du rythme veille-sommeil chez le rongeur étant bien inférieure à 24H (puisqu'il effectue de très nombreux cycles au cours d'une seule journée), on parle alors de rythme ultradien.
Le rat étant un animal nocturne, l'éveil représente près de 65 % de la phase sombre et moins de 30 % de la phase claire. Au contraire, 60 % de la phase claire est dédiée au SL alors que ce stade ne représente que 30 % de la phase sombre. Le SP compte lui respectivement pour 10 % et 5 % des phases claires et sombres. Cette nette différence de comportement entre nuit et jour traduit bien l'existence d'un rythme circadien chapeautant le cycle veille-sommeil.

Au cours de ces cycles, l'alternance entre les trois états de vigilance se fait de manière ordonnée. Comme nous l'avons déjà mentionné, le SP n'apparait jamais directement après une phase d'éveil : il suit obligatoirement une phase de SL. De plus, une phase de SP est toujours suivie d'un éveil. Celui-ci peut être extrêmement cours, on parlera alors de micro-réveil.
Au cours de la journée, chez le rat, une phase de SP apparait toutes les 10 minutes environ et dure en moyenne 1,5 minute. La **Figure I.2** montre un hypnogramme de rat sur 24h. Un hypnogramme représente l'alternance des états de vigilance au cours du temps.

I.2 – Les fonctions du sommeil paradoxal

Si les fonctions de l'éveil sont relativement faciles à déterminer (alimentation, reproduction, déplacement, etc.), celles du sommeil restent encore à clarifier. En tout état de cause, celles-ci sont primordiales puisqu'une privation de sommeil entraine la mort d'un individu plus rapidement qu'une privation de nourriture, et que toute privation de celui-ci entraine, de manière automatique, l'existence d'une dette de sommeil qui sera récupérée en grande partie lors des épisodes de sommeil successifs.

S'il apparaît clairement que le sommeil a un impact bénéfique sur la sensation de repos du corps et du cerveau, ses fonctions supposées sont nombreuses, et la contribution respective du SL et du SP pour certaines de ces fonctions fait toujours débat au sein de la communauté scientifique. Parmi les nombreuses fonctions liées au sommeil se trouvent : la récupération physique, l'économie d'énergie(Berger and Phillips, 1995), la croissance (production de l'hormone de croissance durant le sommeil), la réparation cellulaire (corrélations entre taille de l'animal, activité métabolique et quantité de sommeil) (Adam and Oswald, 1977), la maturation du cerveau, l'apprentissage etc…

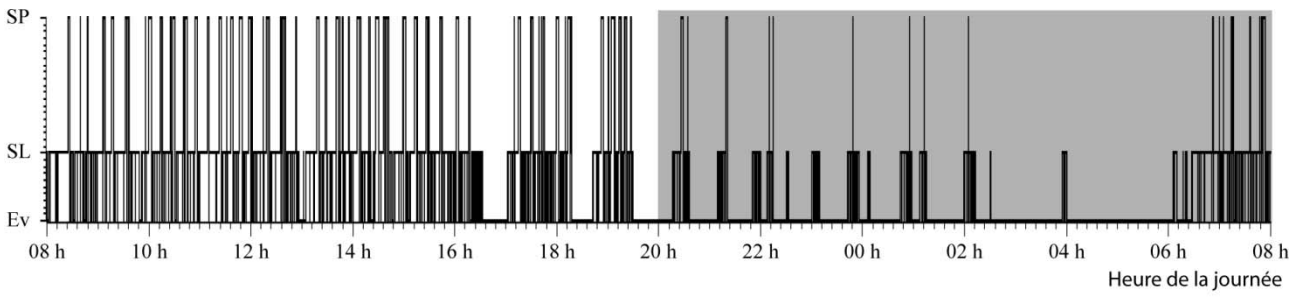


Figure I.2 : Hypnogramme de rat sur 24h
Un hypnogramme montre l'alternance entre les différents états de vigilance au cours du temps. Celui-ci est représenté sur 24 h en fonction de l'heure de la journée. Le fond grisé correspond à la phase sombre. SP, sommeil paradoxal; SL, sommeil lent; Ev, éveil.

Ne pouvant être exhaustifs, nous traiterons plus spécifiquement de certaines fonctions associées au SP puisque le SP est, en lui-même, tout aussi indispensable que le sommeil en général, une privation sélective de SP étant létale au bout de deux à trois semaines (Rechtschaffen *et al.*, 1989; Rechtschaffen and Bergmann, 2002).

I.2.1 – L'activité onirique du sommeil paradoxal : gardien de la conscience et de l'instinct

Même si les rêves ont de tous temps été associés au sommeil, ils sont, depuis la découverte du SP, plus fortement associés à cet état. En effet, dès sa découverte chez l'homme dans les années 1950, Aserinsky et Kleitman associent déjà SP et activité onirique. En réveillant leurs patients durant leur sommeil, ils rapportent qu'un réveil durant une phase de SP est presque toujours associé à un rappel de rêve (dans 80 % des cas), alors que si le réveil à lieu durant du SL, il n'est que très rarement associé à un rêve (dans 7 %des cas) (Aserinsky and Kleitman, 1953; Dement and Kleitman, 1957). Depuis, de nombreux autres arguments sont venus renforcer ce lien entre rêves et SP.
Chez l'Humain, l'analyse fine des souvenirs obtenus lors de réveils forcés durant le SL ou le SP a confirmé que l'activité onirique a principalement lieu durant le SP (Jouvet, 1979). De plus, chez les chats dont les centres nerveux contrôlant l'atonie du SP ont été lésés, les comportements oniriques ne sont observables que durant le SP (Sastre and Jouvet, 1979). Enfin, la découverte récente chez l'Homme des troubles comportementaux associés au SP (ou RBD pour REM sleep Behaviour Disorders) (**voir partie I.3**) a également renforcé le lien entre SP et rêves puisque les comportements oniriques ne surviennent qu'en SP et sont toujours accompagnés de rêves.

Bien que le lien entre SP et activité onirique ne soit plus à démontrer, la question du rôle des rêves, et donc du SP, n'est pas pour autant résolue et il est nécessaire de faire appel à la psychologie et ou à la psychanalyse pour tenter d'y trouver une réponse. Une des explications possible est que le rêve servirait à « *l'élimination de pensées étouffées dans l'œuf* » (d'après Robert), hypothèse reprise par Freud. Ce dernier définissait le rêve comme *« un gardien du sommeil qui empêche l'intrusion de désirs non déguisés et inacceptables dans le système conscient* ». Le rêve serait alors l'expression de certains désirs et passions refoulées par la conscience durant l'éveil et ressurgissant durant le SP sous forme imaginaire acceptable par notre conscience.

L'analyse des rêves chez l'Homme a permis l'émergence de cette théorie de l'inconscient, mais cette approche est impossible chez l'animal et ne peut donc venir en appui de cette théorie. Toutefois l'analyse de comportements oniriques chez l'animal a pu être réalisée chez le chat notamment et a permis l'expression d'une autre théorie quand à la fonction des rêves.
Cette seconde théorie a notamment été développée à Lyon suite à des expériences de lésions bilatérales du locus coeruleus alpha (LCα) chez le chat. Cette lésion bilatérale a pour effet une suppression de l'atonie musculaire normalement observée durant le SP et l'expression de comportements oniriques stéréotypés (Sastre and Jouvet, 1979). Durant le SP, ces animaux présentent des comportements d'exploration, d'attaque ou de fuite (**Figure I.3**). Pour Jouvet, le SP servirait donc à l'expression périodique de ces comportements instinctifs, permettant ainsi leur conservation durant la totalité de la vie de l'individu. Cette théorie est soutenue par l'observation qu'un écureuil adulte élevé en isolement total exprime le même comportement d'enfouissement que l'écureuil sauvage lorsqu'on lui donne des noisettes (Jouvet, 1979). De même, un rat naïf, élevé en cage toute sa vie, exprimera une réaction de peur lorsqu'il sera mis en présence d'odeur de renard, prédateur naturel des rongeurs (Dielenberg and McGregor, 2001).

Ces données soutiennent donc l'hypothèse, selon laquelle le SP permettrait, en rejouant des comportements stéréotypés, d'assurer la pérennité de l'instinct chez les individus d'une même espèce.

Toutefois, cette théorie se heurte à quelques points. Tout d'abord, les poïkilothermes (animaux à sang froid) présentent de nombreux comportements innés tout en étant dépourvus de SP. De même, certains comportements innés n'ont jamais été observés chez ces chats lésés. L'absence de comportements sexuels en est l'une des meilleures illustrations (Sastre and Jouvet, 1979).

Il est enfin important de noter que ces deux fonctions supposées du SP ne sont pas exclusives.

I.2.2 – Sommeil paradoxal et maturation cérébrale

L'idée que le SP pourrait jouer un rôle dans la maturation cérébrale est une idée datant des années

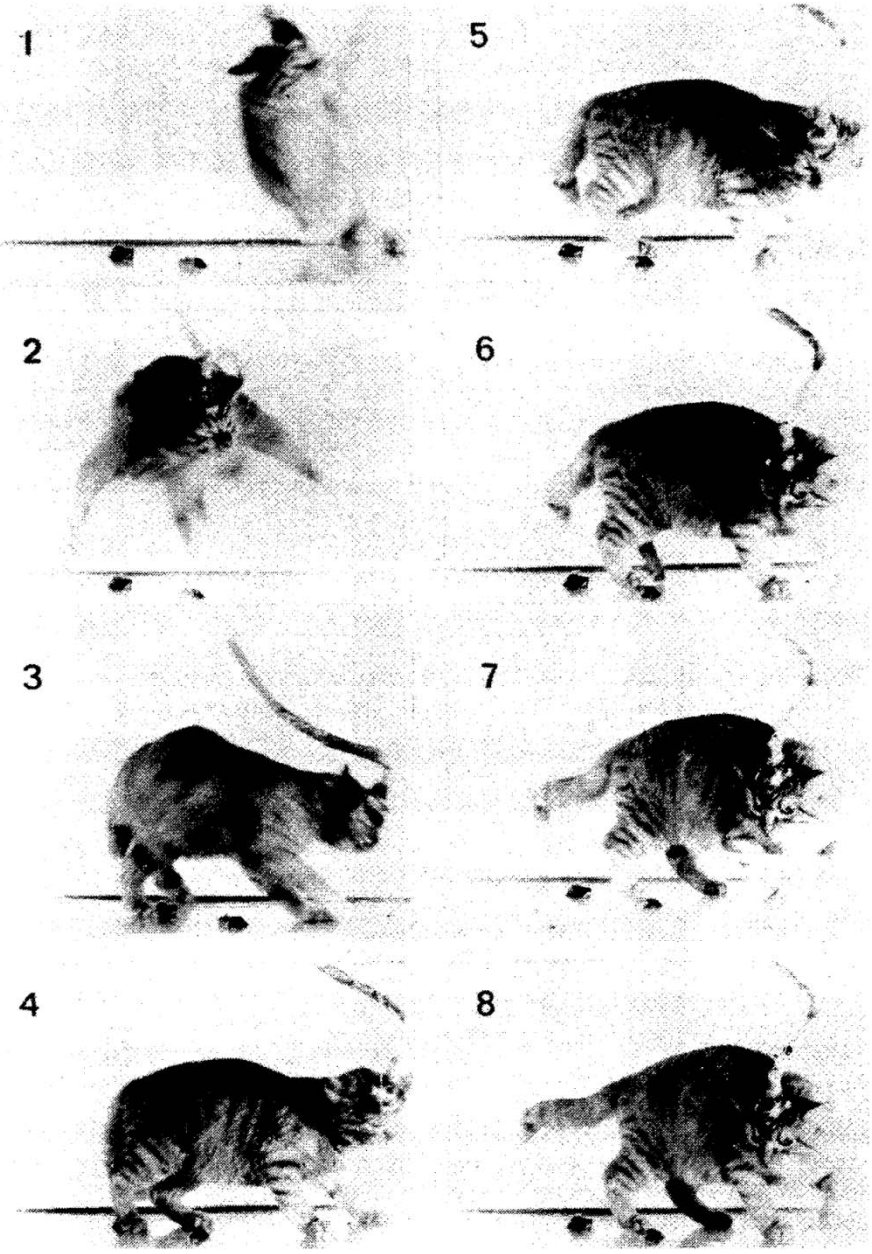


Figure I.3 : Chat sans atonie musculaire au cours du SP présentant des comportements oniriques.
Ces photographies ont été prises lors d'une phase de SP chez chat dont le périLC-alpha, région contrôlant l'atonie musculaire lors de cet état, a été lésé. L'animal présente un comportement d'attaque : il s'élance et donne des coups de pattes dans l'espace. D'après Sastre et Jouvet 1979.

1960. Cette hypothèse trouve naturellement son origine lorsque l'on considère l'évolution des quantités de SP au cours du développement en fonction des espèces.
Au cours du développement pré et post natal, le fœtus, et/ou le jeune, présente(nt) différents états d'activité. Chez les mammifères, sans rentrer dans les détails de leur dénomination, de leurs caractéristiques et des controverses, l'existence de trois états distincts pouvant être comparés à l'éveil, au SL et au SP est généralement admise (Frank and Heller, 2003; Valatx, 2004).
La **Figure I.4A** montre l'évolution des quantités d'éveil, de SL et de SP durant le premier mois post-natal ainsi que chez l'adulte chez trois espèces de mammifères (rat, chat et cobaye). Chez le rat, le jeune nait très immature et passe près de 70 % de son temps en SP durant ses 10 premiers jours de vie. Cette proportion diminuera ensuite pour atteindre les proportions adultes au bout d'un mois environ. A l'opposé, le cobaye nait quasiment mature (il ne dépend de sa mère que pour s'alimenter) et passe moins de 10 % de son temps en SP après sa naissance. De plus, le rythme veille-sommeil du jeune cobaye est comparable à celui de l'adulte. Le chat se situe lui entre ces deux espèces, tant du point de vue de la maturation du jeune à la naissance que des quantités de SP. Chez les mammifères, les jeunes immatures, comme les fœtus, présentent donc de grandes quantités de SP (Roffwarg *et al.*, 1966; Jouvet-Mounier and Astic, 1968; Jouvet, 1980). Cette association est particulièrement bien mise en évidence à plus grande échelle comme le montre la F**igure I.4B** qui corrèle degré de maturité à la naissance et quantité de SP chez l'adulte.

Le SP serait donc un état propice au développement cérébral et à l'établissement de connections neuronales fonctionnelles. En effet, le SP s'accompagne d'un accroissement de l'activité neuronale permettant ainsi le renforcement des connections synaptiques. Cette théorie est soutenue par le fait que l'altération du SP durant la phase critique du développement du système visuel entraine, chez l'adulte, une altération de la vision (Davenne *et al.*, 1989; Shaffery *et al.*, 1998; Frank *et al.*, 2001).

I.2.3 – Sommeil paradoxal et neurogenèse

Comme nous l'avons évoqué plus haut, l'apparition phylogénétique du SP est concomitante de celle de l'homéothermie. Or, le « passage » à l'homéothermie s'est également accompagné d'une diminution drastique de la neurogenèse postnatale. Alors que les amphibiens, reptiles et autres poissons présentent une neurogenèse continue assurant une croissance cérébrale post natale constante, celle des mammifères est extrêmement réduite et se limite au bulbe olfactif, au gyrus denté de l'hippocampe et à la zone sous-ventriculaire (Gross, 2000)). De plus, ces neurones néoformés ne représentent chez les mammifères qu'une infime partie de l'ensemble des neurones cérébraux. Cette coïncidence entre apparition du SP et diminution de la neurogenèse soutient donc l'hypothèse que le SP optimiserait la neurogenèse chez l'adulte en régulant la prolifération, la migration et la différenciation des « quelques » neurones néoformés. Cette théorie est soutenue par des travaux qui montrent qu'une privation de SP, comme de sommeil total, altère la neurogenèse dans l'hippocampe de rats adultes (Guzman-Marin *et al.*, 2005; Guzman-Marin *et al.*, 2008). De plus, une privation de SP altère l'apprentissage dans des tâches dépendantes de l'hippocampe, tâches connues pour faciliter la survie des neurones hippocampiques néoformés (Smith and Rose, 1996).
Le rôle du SP dans la neurogenèse est donc à rapprocher de son rôle dans la maturation cérébrale puisque le développement et la maturation du cerveau s'accompagnent d'une neurogenèse importante.

L'implication du SP dans la formation et la maturation de nouveaux neurones laisse donc présager un rôle important du SP dans les phénomènes de mémorisation. En effet, il est maintenant bien établi que l'altération de la neurogenèse chez le rongeur entraine une diminution des capacités mnésiques (Shors *et al.*, 2001; Saxe *et al.*, 2006).

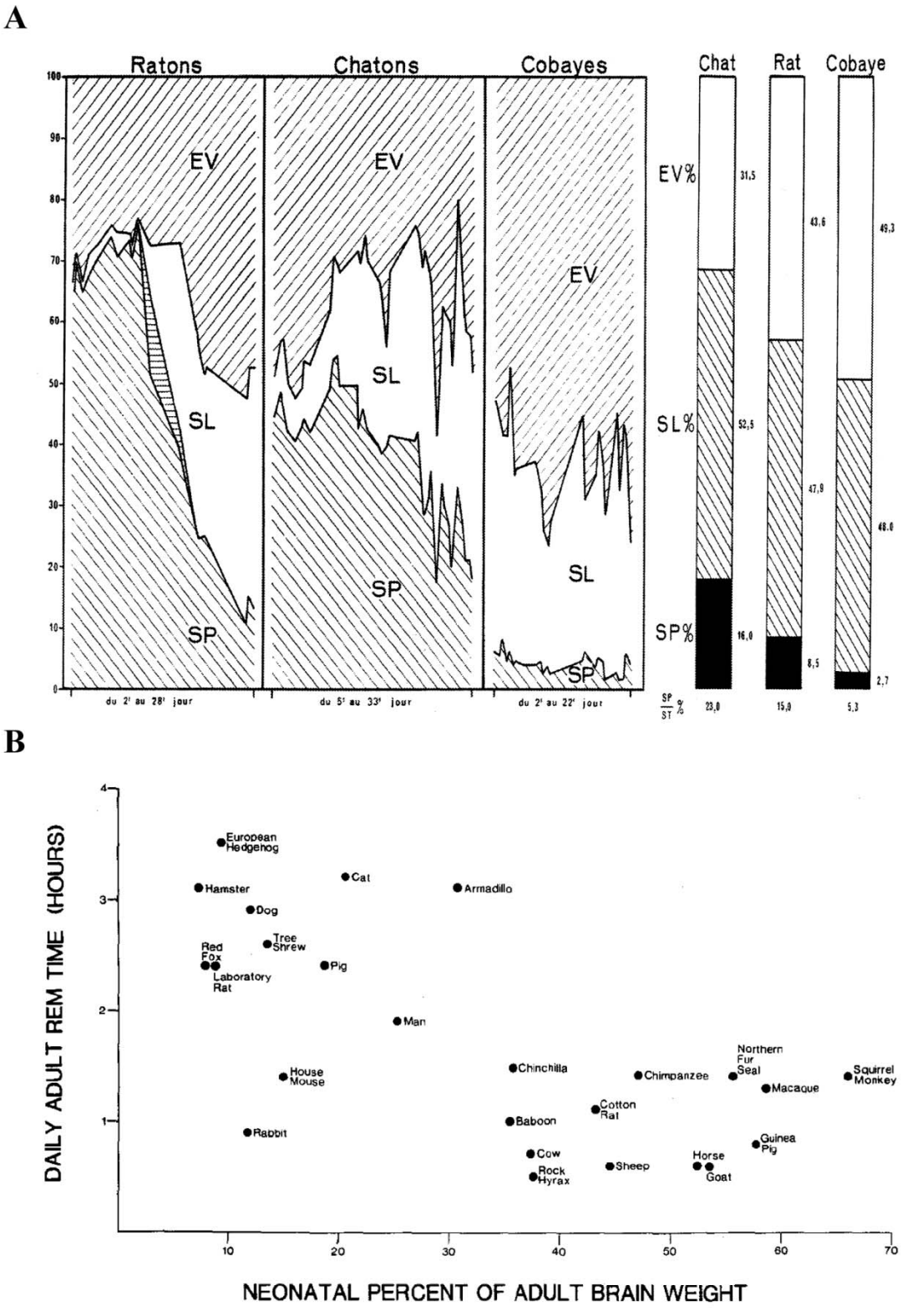


Figure I.4: Sommeil paradoxal et maturation cérébrale

(A) Evolution, en pourcentage, des états de vigilance chez le raton, le chaton et le jeune cobaye durant le premier mois post-apprentissage (à gauche) ainsi que chez les adultes respectifs (à droite). D'après Jouvet-Mounier et al.1970.

(B) Relation entre maturité cérébrale à la naissance et quantité journalière de SP chez l'adulte. Le degré de maturité à la naissance est estimé par le pourcentage du poids du cerveau du nouveau né par apport au poids du cerveau adulte. D'après Zepelin, 2000.

I.2.4 – Sommeil paradoxal et apprentissage

L'importance du sommeil dans la consolidation mnésique est un fait bien connu du grand public mais également de la communauté scientifique. En effet, de nombreuses études menées chez l'humain et chez le rongeur démontrent un rôle critique du sommeil dans les phénomènes d'apprentissage en permettant notamment la ré-expression, dans l'hippocampe et durant le sommeil, d'informations récemment acquises et permettant ainsi leur consolidation (Wilson and McNaughton, 1994; Louie and Wilson, 2001).
Chez le rat, une augmentation de SP est observée après exposition à un nouvel environnement enrichi (Gutwein and Fishbein, 1980), mais également après certaines tâches comportementales (Smith, 1985; Hennevin *et al.*, 1995). De plus, une privation du SP suivant cet apprentissage altère les performances lors des tests de rappels (Smith, 1985; Hennevin *et al.*, 1995; Smith and Rose, 1996; Graves *et al.*, 2003; McDermott *et al.*, 2003).
Si le SP post-apprentissage semble donc important pour les processus de mémorisation, le SP pré-apprentissage l'est tout autant puisque sa suppression entraine également des déficits de mémorisation (Gruart-Masso *et al.*, 1995).

Au niveau électrophysiologique, les patrons d'activation spatio-temporels de cellules de lieu de l'hippocampe observés durant un apprentissage spatial sont rejoués durant le SP qui suit l'apprentissage (Louie and Wilson, 2001). Chez l'homme, Maquet et al. ont également pu mettre en évidence grâce à des techniques d'imagerie cérébrale que les aires cérébrales activés lors d'un apprentissage procédural se réactivent lors du SP qui suit (Maquet *et al.*, 2000).

Enfin, de nombreux travaux démontrent un rôle majeur du SP dans les processus cellulaires et moléculaire de consolidation mnésique (Maquet, 2001; Gais and Born, 2004). En particulier, le SP facilite l'établissement de la potentialisation à long terme (ou LTP pour long term potentiation), modèle cellulaire de la mémoire internationalement reconnu (McDermott *et al.*, 2003; Ravassard *et al.*, 2009). Le SP est également un état favorable à l'expression de nombreux facteurs de plasticité (Ribeiro *et al.*, 2002; Clément *et al.*, 2010; Renouard *et al.*, 2010) qui permettent une modification des connections synaptiques et donc la mise en mémoire de nouvelles informations.

Les résultats présentés ci-dessus tendent donc à démontrer que le SP joue un rôle déterminant dans les phénomènes de mémorisation. Toutefois, les contributions respectives du SP et du SL dans ces phénomènes sont sources de nombreux débats dans la communauté scientifique. En effet, certains patients montrant une réduction drastique de leur quantités de SP suite à un traitement pharmacologique ou à des lésions cérébrales ne montrent aucun déficit d'apprentissage (Siegel, 2001). De plus, de nombreuses études réalisées chez l'humain soutiennent un rôle du SL dans les phénomènes d'apprentissage et ce au détriment du SP (Gais and Born, 2004). Cette absence de consensus quand à la dépendance de la mémoire vis-à-vis du SL ou du SP est sans aucun doute dû au fait qu'il n'existe pas « une mémoire » mais « des mémoires ».

I.2.5 – Sommeil paradoxal et gestion des émotions

La mémoire n'est pas un phénomène unitaire et comprend de nombreuses composantes qui peuvent expliquer les résultats apparemment contradictoires obtenus chez les rongeurs et l'humain notamment. L'une des différences majeures entre les tests mnésiques réalisés chez l'humain et chez les rongeurs est la composante émotionnelle accompagnant systématiquement les tests réalisés chez ces derniers, que celle-ci soit positive (renforcement positif à l'aide de nourriture par exemple) ou négative (renforcement négatif à l'aide d'un choc électrique par exemple). Or, comme évoqué ci-dessus, les tests réalisés chez les rongeurs impliquent majoritairement le SP ce qui laisse donc supposer un rôle du SP dans la mémoire émotionelle.

Un nombre croissant de données expérimentales vont en effet dans ce sens(Walker, 2010). En 2009 notamment, Nishida et al. ont démontré chez l'humain une corrélation positive entre performance de la mémoire émotionelle et durée de SP (**Figure I.5A**) (Nishida *et al.*, 2009). De plus, les aires cérébrales impliquées dans le traitement d'informations émotionnelles (amygdale, hippocampe, et cortex cingulé antérieur notamment) sont activées durant le SP aussi bien chez l'homme (Maquet *et al.*, 1996) que chez le rat (Renouard *et al.*, 2010). Enfin, chez le rongeur, une augmentation des quantités de SP a été reportée après un stress de contention (Marinesco *et al.*, 1999), après un entrainement dans la piscine de Morris (entrainement aversif par nature) (Smith and Rose, 1997) et plus récemment après exposition à un environnement stressant (Clément *et al.*, 2010).
Ces données expérimentales sont renforcées par des données épidémiologiques associant le trouble de dépression majeur à des disfonctionnements du SP. De plus, les patients dépressifs montrent des quantités de SP faibles et consolident préférentiellement les évènements négatifs de leur journée (Walker and van der

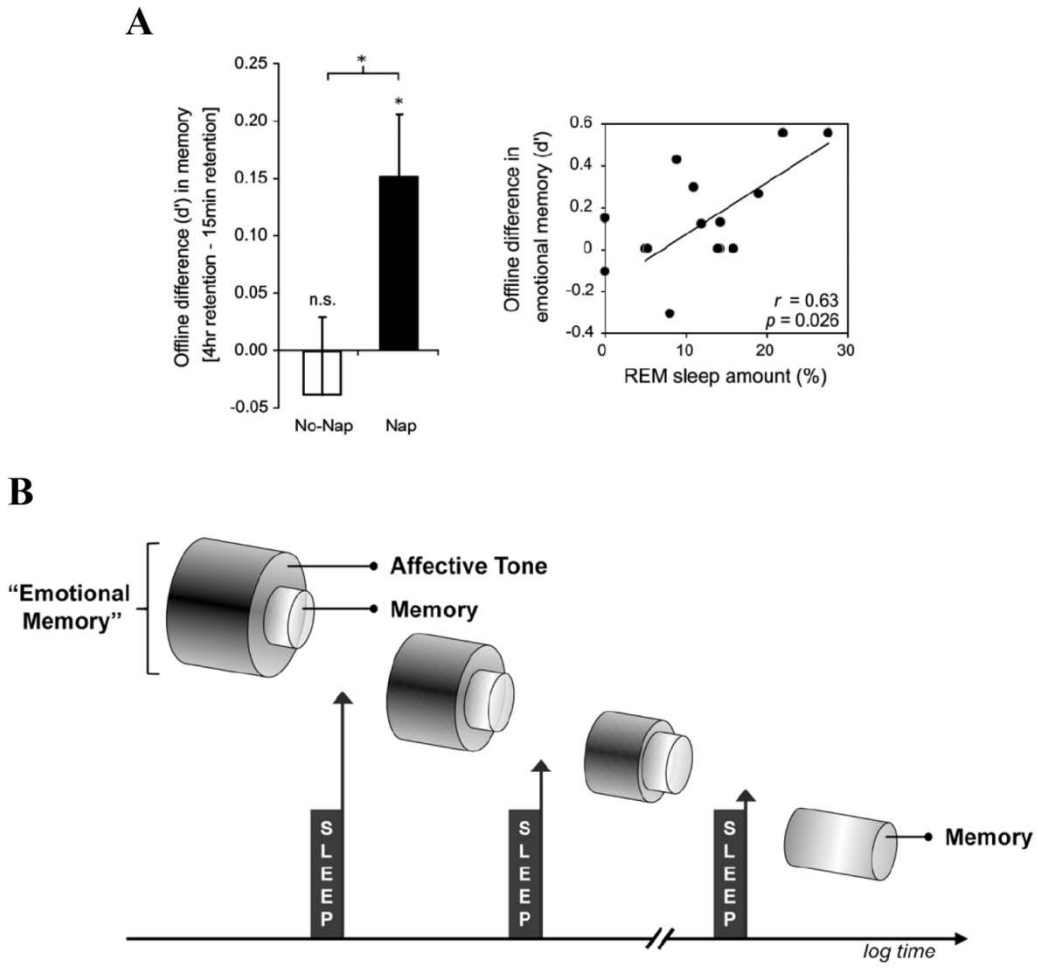


Figure I.5: Sommeil paradoxal et la gestion des émotions
(A) L'amélioration de la mémorisation d'images à connotation émotionnelle est corrélée aux quantités de SP. Dans ce test, les sujets ont mémorisé deux séries de photographies, l'une 4 h et l'autre 15 min avant une phase de re-test. Un seul groupe (Nap) a pu réaliser une sieste de 90 min entre ces deux séries. Le rappel des deux séries d'images est testé. Les sujets ayant fait une sieste se souviennent mieux des images de la série 4 h que celles de la série 15 min alors qu'aucune différence n'est observée pour le groupe No-Nap (partie gauche). De plus, l'amélioration observée chez le groupe Nap est corrélée aux quantités de SP ayant eu lieu durant la sieste (graphique de droite).
(B) Modèle de l'équipe de Walker quand au rôle du SP dans la mémoire émotionnelle. Au cours du temps, le SP permettrait de supprimer la composante émotionnelle d'une trace mnésique, stockée en même temps que l'apprentissage lui même, pour ne garder plus que la composante purement factuelle.
D'après Walker and van der Helm, 2009.

Helm, 2009; Walker, 2010).

Selon Walker, le SP interviendrait donc dans la gestion et la mise en mémoire des informations émotionnelles en permettant de supprimer progressivement la composante émotionnelle du souvenir pour ne plus garder que la composante purement factuelle (Walker and van der Helm, 2009) (**Figure I.5B**).

I.3 – Les pathologies associées au sommeil paradoxal

Le sommeil est un problème de santé publique majeur. En effet, plus de 90 % des personnes interrogées déclarent avoir déjà eu un problème de sommeil au cours de leur vie et environ un tiers de la population souffre de troubles du sommeil. Les pathologies associées au sommeil sont nombreuses (insomnie, bruxisme, somnambulisme, narcolepsie, syndrome des jambes sans repos, apnées du sommeil, trouble comportemental du SP, dépression etc.) et leurs causes ne sont pas toujours bien définies.

Dans ce paragraphe, nous nous focaliserons sur la narcolepsie et les troubles comportementaux associés au SP (TCSP ou RBD pour REM sleep behaviour disorder), deux pathologies spécifiquement associées au SP et dont l'étude se révèle extrêmement importante pour la compréhension des mécanismes régissant le cycle veille-sommeil. Toutefois, les mécanismes neuronaux sous-tendant ces maladies ne seront abordés en détail que dans le chapitre suivant. Cette partie se veut juste une introduction à ces pathologies et à leur symptomatologie permettant de mieux comprendre l'importance de leur étude.

I.3.1 – La narcolepsie

I.3.1.a - Symptomatologie

La narcolepsie, maladie rare affectant 1 personne sur 2000, est la seule pathologie dont l'attribut premier est une désorganisation importante du cycle veille-sommeil. En effet, comme illustré en **Figure I.6,** les patients souffrant de cette pathologie présentent une somnolence diurne excessive associée à une fragmentation du sommeil nocturne mais sans pour autant que cela altère les quantités de sommeil sur 24 h. De plus, chez une majorité de malades, le sommeil (aussi bien diurne que nocturne) est caractérisé par : une diminution de la latence d'endormissement ; et par la présence de SOREM (Sleep Onset REM Sleep) qui sont des passages directs de l'éveil au SP sans passer par une phase d'endormissement. Or comme nous l'avons vu précédemment (**voir partie I.1.4**) les SOREMs ne se retrouvent pas chez le sujet sain.
A cette altération du cycle veille sommeil s'ajoute, chez 70 % des patients, la présence de crises de cataplexie qui sont des pertes de tonus musculaire bilatérales affectant la quasi-totalité des muscles striés (exceptés les muscles cardiaques, respiratoires et oculomoteurs). Ces attaques cataplectiques, pendant lesquelles le patient reste conscient, sont généralement déclenchées par des émotions positives telles que le rire.

I.3.1.b - Origines neurologiques

En 1999, Lin et al. ont été les premiers à faire le lien entre narcolepsie et hypocrétines. En utilisant une colonie de chiens narcoleptiques-cataplectiques au sein de laquelle la transmission de la maladie se faisait de manière génétique, ils ont pu établir que la mutation du récepteur 2 à l'hypocrétine était à l'origine de la pathologie chez ces individus (Lin *et al.*, 1999). L'année suivante, deux groupes ont confirmé cette relation chez l'humain en montrant que des patients narcoleptiques présentaient une réduction drastique, voir une absence, du marquage pour les neurones à hypocrétine (Peyron *et al.*, 2000; Thannickal *et al.*, 2000). De plus, de nombreux mutants murins affectant le système hypocrétinergique ont depuis été générés et

présentent des symptômes proches de ceux de la narcolepsie (Chemelli *et al.*, 1999; Hara *et al.*, 2001; Willie *et al.*, 2003).
L'ensemble des données disponibles confirme donc les résultats princeps et il est aujourd'hui largement admis que la narcolepsie est dû à la disparition d'une population neuronale hypothalamique : les neurones à hypocrétine (ou orexine). Cependant, la cause primaire de la disparition des neurones à hypocrétine reste aujourd'hui largement inconnue bien que des hypothèses d'attaque auto-immune aient été formulées.

L'ensemble des symptômes principaux de la narcolepsie montre donc que cette pathologie se caractérise par la difficulté des patients à maintenir un état d'éveil consolidé. De plus, il apparaît que le SP, ou certaines de ses caractéristiques comme l'atonie, peuvent survenir de manière inappropriée. La narcolepsie nous fournit donc un modèle et une opportunité pour l'étude et la compréhension des mécanismes régissant le cycle veille-sommeil.

I.3.2 – Les troubles comportementaux associés au SP ou RBD

Cette pathologie touche principalement les hommes et se déclare généralement autour de 60 ans. Elle est caractérisée par une reprise anormale du tonus musculaire au cours des épisodes de SP ce qui conduit les patients à littéralement « vivre » leur rêves. Durant ces phases de SP, les patients montrent de nombreux comportements : ils peuvent parler, crier, s'asseoir, sauter du lit, donner des coups de points, de pieds, faire semblant de fumer, de scier, etc. De plus, si cette personne se réveille durant cette phase (de manière

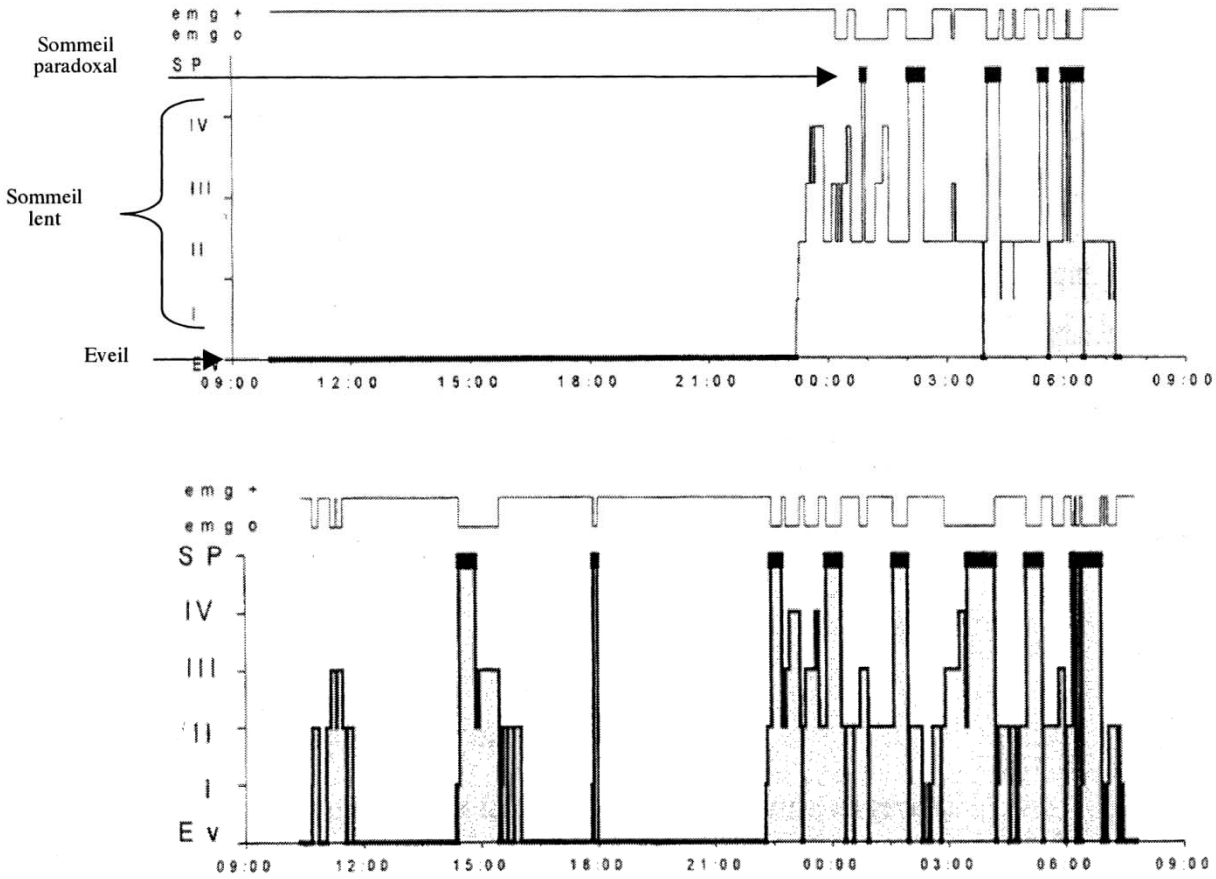


Figure I.6: Hypnogrammes de sujets sain (en haut) et narcoleptique en bas
Alors que le sommeil d'un sujet sain (en haut) est consolidé durant la nuit, celui d'un patient narcoleptique (en bas) est fragmenté. De plus, le sommeil d'un tel patient se caractérise par son apparition durant la journée signe d'une somnolence excessive, la présence de crises de cataplexies ainsi qu'un délai d'apparition de SP diminué. D'après H. Bastuji.

spontanée ou non), la restitution de son rêve correspondra au comportement observé (Schenck *et al.*, 1986). De plus, ce trouble est généralement retrouvé chez des patients présentant une pathologie neurodégénérative comme la maladie de Parkinson, la démence à corps de Lewy ou l'atrophie multisystématisée (MSA) (Iranzo *et al.*, 2009) suggérant une origine neurodégénérative des RBD.

Si l'origine de ces troubles reste encore inconnue près de 30 ans après leur caractérisation (Schenck *et al.*, 1986), leur étude nous fournit de précieuses informations sur les mécanismes neuronaux contrôlant notamment l'atonie caractéristique du SP. En effet, seul le contrôle de l'atonie est affecté puisque les patients ne présentent aucune variation des quantités de SP (Mahowald and Schenck, 2000). De plus, l'analogie avec les comportements oniriques observés chez le chat (Sastre and Jouvet, 1979) semble indiquer une origine commune, c'est-à-dire une lésion au niveau pontique et/ou bulbaire, régions cérébrales impliquées dans l'atonie du SP (**voir chapitre II**).

L'existence de telles pathologies rend donc plus utiles encore les travaux visant à élucider les mécanismes neuronaux sous tendant la mise en place et le maintien du SP. Elles nous fournissent également de nombreuses données permettant une meilleure compréhension de ces mécanismes. Au cours de cette thèse, nous nous sommes concentrés sur l'étude de ces mécanismes contrôlant le SP. Or, comme nous le verrons dans le chapitre suivant, c'est l'interaction permanente entre les différents systèmes d'éveil, de SL et de SP qui permet la mise en place de tel ou tel état de vigilance ainsi que leur alternance. Il est donc impossible de prétendre comprendre les mécanismes régulant le SP sans une vision globale des mécanismes régissant l'ensemble des états de vigilance. Par conséquent, nous présenterons dans le chapitre suivant l'ensemble des réseaux neuronaux responsables des trois états de vigilance : l'éveil, le SL et le SP.

CHAPITRE II – Les réseaux neuronaux sous tendant le cycle veille-sommeil

II.1 – Mécanismes neuronaux responsables de l'éveil

L'existence de véritables « centres nerveux » pour l'éveil ou le sommeil n'a pas toujours été admise. Au début du XXième siècle, le sommeil était encore perçu comme une perte de conscience dont l'origine était expliquée, par certains, par une rétractation des dendrites des cellules ganglionnaires du cerveau induisant une interruption de la conduction nerveuse et par là même une perte de conscience synonyme de sommeil. Il a fallu attendre les années 1930 et les travaux du neurologue autrichien Constantin von Economo sur l'épidémie d'encéphalite léthargique (ou grippe espagnole) qui a frappée l'Europe pour voir émerger les prémices de la théorie actuelle basée sur l'existence de régions cérébrales promouvant soit l'éveil soit le sommeil. En effet certains patients infectés présentaient une forte somnolence alors que d'autres présentaient de profondes insomnies. De manière intéressante, les lésions cérébrales observées chez ces patients suite à l'infection présentaient des localisations différentes suggérant ainsi à von Economo que l'hypothalamus postérieur pourrait être un centre éveillant alors que sa partie antérieure induirait le sommeil (von Economo, 1930). Toutefois, le rôle de l'hypothalamus dans la gestion de l'éveil allait être mis de côté pendant un certain temps notamment suite aux découvertes impliquant les régions mésencéphalique et pontique dans le phénomène d'éveil.

En effet, à la fin des années 1940, Moruzzi et Magoun ont démontré que la lésion par coagulation de la formation réticulée mésencéphalique entraine un coma de longue durée, alors que sa stimulation électrique provoque une désynchronisation corticale et permet de réveiller un animal endormi (Moruzzi and Magoun, 1949). Ces données ont été à l'origine de la théorie réticulaire ascendante de l'éveil, théorie toujours à la base des modèles actuels. Toutefois, la lésion par coagulation, entraine une lésion des corps cellulaires de la zone visée, mais également des fibres de passages. Or, le développement de techniques permettant une lésion spécifique des corps cellulaires tout en évitant la destruction des fibres de passages (comme l'injection d'acide iboténique ou kaïnique) a par la suite révélé que la formation réticulée mésencéphalique n'est pas, en elle-même, responsable de l'éveil mais que celui-ci est dû aux fibres de passage. En effet, la lésion de cette zone par injection d'acide kaïnique n'entraine aucune altération de l'éveil ni de l'activation corticale (Denoyer *et al.*, 1989).

Si les chercheurs ont tout d'abord pensé que les neurones responsables de l'éveil étaient répartis de manière dispersée au sein de la formation réticulée pontique, de nombreux travaux neurochimiques et électrophysiologiques ont démontré que l'éveil est en fait le résultat de l'activation de populations neuronales distinctes regroupées au sein de noyaux bien définis (Saper *et al.*, 2010) . Il s'agit des systèmes noradrénergique du locus coeruleus, sérotoninergique du raphé dorsal et cholinergique du tegmentum ponto-mésencéphalique. Cependant, comme nous le verrons, ces structures sont nécessaires mais non suffisantes à l'établissement d'un état stable d'éveil. D'autres populations rentrent alors en jeu, comme les neurones histaminergiques du noyau tubéromammillaire et hypocrétinergiques du l'aire latérale de l'hypothalamus.

II.1.1 – Le système noradrénergique du locus coeruleus

Le locus coeruleus (ou LC) doit son nom à sa couleur bleutée caractéristique chez les primates. C'est un noyau bilatéral très compact, localisé en bordure du 4ième ventricule et comportant chez le rat environ 1500 neurones noradrénergiques dans chaque hémisphère. Il correspond également au groupe A6 décrit par

Dahlstrom (Dahlstrom and Fuxe, 1964; Card *et al.*, 2006) et représente environ la moitié des neurones noradrénergiques du cerveau chez le rat. De manière surprenante, les neurones du LC étendent leurs dendrites de manière médiane et ventro-médiane, rostroventrale mais pas latéralement (Shipley *et al.*, 1996).
Le LC projette de manière diffuse sur l'ensemble du système nerveux central, via des projections ascendantes vers le cortex, l'hippocampe, le cervelet, le thalamus, le télencéphale basal (Olson and Fuxe, 1971; Jones and Moore, 1977; Foote *et al.*, 1983), ou descendantes vers les noyaux associatifs et sensoriels et la moëlle épinière (Nygren and Olson, 1977). Au niveau de ses afférences, l'utilisation de traceurs rétrogrades comme la péroxydase de raifort (HRP), l'agglutinine de germes de blé (Wheat Germ Agglutinin) couplée à le HRP (WGA-HRP) ou la sous-unité b de la toxine cholérique (CTb) a permis de décrire de nombreuses afférences au LC. Si les noyaux réticulés paragigantocellulaire dorsal (DPGi) et latéral (LPGi) représentent deux afférences majeures au LC (Aston-Jones *et al.*, 1986), celui-ci reçoit également de nombreuses projections en provenance de la région préoptique, de l'hypothalamus postérieur, de la substance grise périaqueducale ainsi que du Kölliker-Fuse (Cedarbaum and Aghajanian, 1978; Luppi *et al.*, 1995). Ces afférences multiples permettent au LC d'intégrer des informations d'origine très diverse et, comme nous le verrons par la suite, une majorité de ces projections est impliquée dans la régulation du cycle veille-sommeil. Ces quelques caractéristiques font du LC un candidat sérieux pour la régulation des états de vigilance puisque ses projections diffuses lui permettent de moduler l'activité de l'ensemble de l'encéphale.

Au niveau physiologique, de nombreuses données viennent confirmer l'implication du LC dans l'induction de l'éveil.
Tout d'abord, l'enregistrement unitaire de neurones du LC montre que ceux-ci déchargent de manière variable en fonction des états de vigilance. Plus précisément, leur taux de décharge est maximal durant l'éveil (2 - 4 Hz), diminue durant le SL (0,5 - 1 Hz) et devient nul durant les épisodes de SP (Hobson *et al.*, 1975; McCarley and Hobson, 1975; Aston-Jones and Bloom, 1981a; Takahashi *et al.*, 2010) (**Figure II.1A**).
Il a également été démontré que les neurones du LC déchargent de manière synchronisée (Aston-Jones and Bloom, 1981b; a) permettant ainsi une libération massive de noradrénaline au niveau de l'ensemble de ses aires de projections. En effet, le taux de noradrénaline extracellulaire est corrélé à la fréquence de décharge des neurones du LC et présente de fortes variations même lors de faibles modifications du taux de décharge (Berridge and Abercrombie, 1999).
Plus récemment, Léger et al. ont rapporté qu'environ 30 % des neurones noradrénergiques du LC expriment le marqueur d'activité c-FOS après 3 h d'exposition à un nouvel environnement, soutenant ainsi l'association entre éveil et activité du LC (Leger *et al.*, 2009). De plus, l'inactivation pharmacologique du LC entraine une augmentation de la puissance des ondes lentes chez le rat anesthésié (Berridge *et al.*, 1993) et la déplétion en noradrénaline (par injection d'AMPT, inhibiteur de la Tyrosine Hydroxylase, enzyme de synthèse des catécholamines) diminue les quantités d'éveil et augmente celles de SP (Leppavuori, 1980). A l'inverse, la stimulation pharmacologique du LC chez le rat anesthésié induit une activation corticale et hippocampique temporellement corrélée à l'activité induite du LC (Berridge and Foote, 1991). Enfin, chez l'animal libre de se mouvoir, l'activation par optogénétique des neurones noradrénergiques du LC a montré un lien de causalité, fréquence dépendant, entre activité du LC, activation corticale, transition sommeil/éveil et activité motrice (**Figure II.1B**) (Carter *et al.*, 2010).

Si le rôle éveillant du LC n'est donc plus à démontrer, les mécanismes sous tendant son action et sa régulation ne sont pas encore totalement compris. Il pourrait exercer son action éveillante via une action excitatrice sur les neurones thalamique (pour l'activation corticale) (McCormick, 1989) et via l'inhibition des systèmes inducteurs de SL (**Figure II.9**) (Gallopin *et al.*, 2000) lors du maintien de l'éveil mais également lors des transitions SL-éveil. A ce propos, lors des transitions Ev/SL et SL/Ev, il a été montré que les variations d'activité des neurones du LC anticipent le changement du rythme EEG jusqu'à 1 sec, soit plus que l'anticipation observée pour les neurones responsables du SL (Takahashi *et al.*, 2009). Toutefois, comme illustré en **Figure II.1A** (tracés du bas), il est intéressant de noter que lors des transitions SP/Ev, l'activation

de ces neurones anticipe bien le retour du tonus musculaire mais pas le changement d'activité EEG (Aston-Jones and Bloom, 1981a; Takahashi *et al.*, 2010). De plus, si l'activation par optogénétique du LC durant le SP induit le réveil de l'animal, son inhibition tonique diminue bien les quantités d'Ev et augmente celles du SL, mais n'affecte ni la quantité globale de SP ni la durée des épisodes de SP (Carter *et al.*, 2010). En outre, très peu de neurones noradrénergiques du LC expriment le marqueur c-FOS après une privation spécifique de SP par la méthode de la piscine (Leger *et al.*, 2009). Ces données laissent donc sous-entendre que le LC

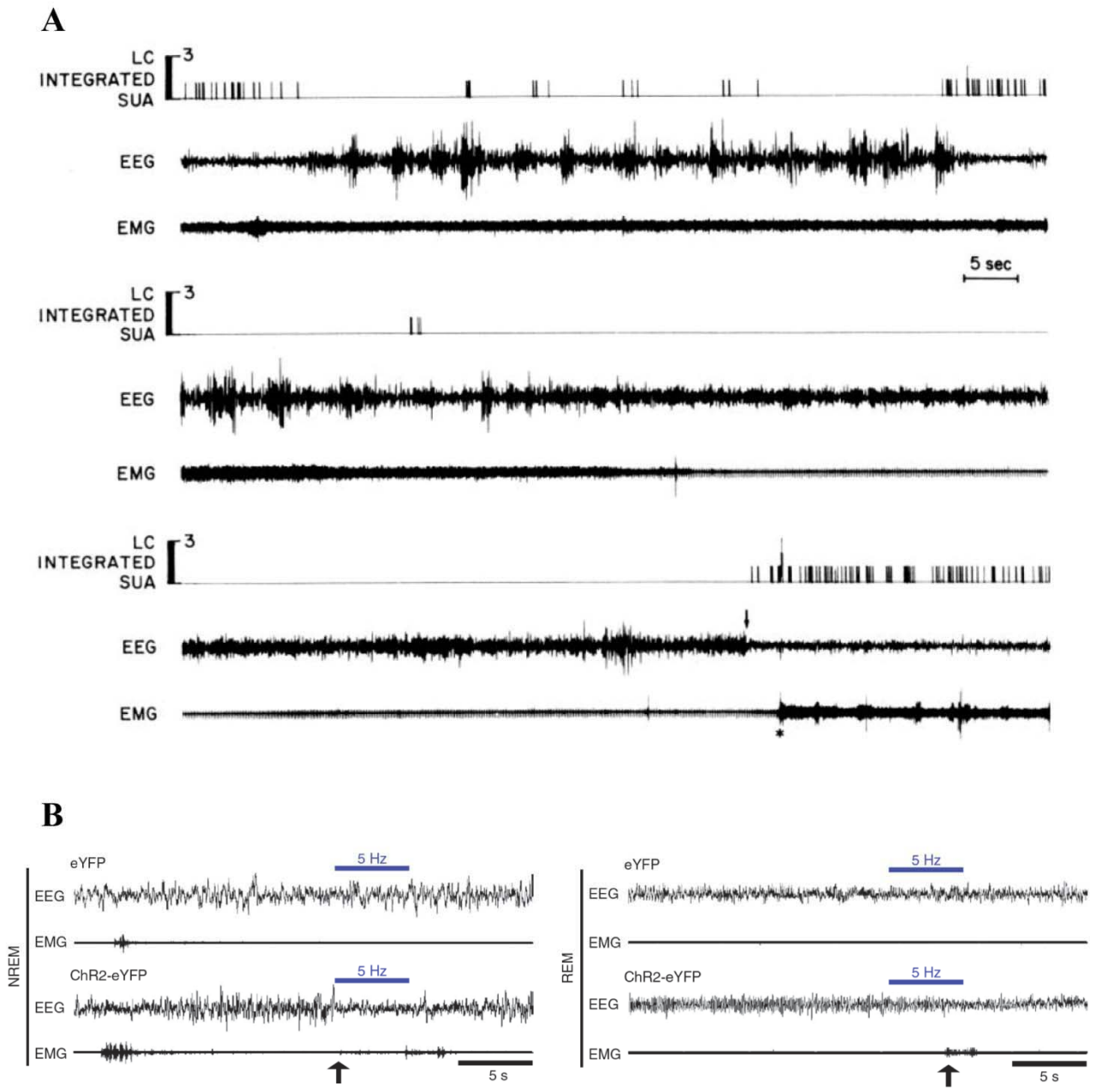


Figure II.1: Implication des neurones noradrénergiques du Locus Coeruleus dans l'induction de l'éveil
(A) Activité unitaire spontanée d'un neurone du LC au cours des différents états de vigilance (déterminés par les critères EEG/EMG). Son activité est maxinale durant l'éveil. Elle est diminuée durant le SL, bien qu'une activation phasique perdure, et nulle durant le SP. Enfin, la reprise d'activité de ce neurone (flèche) coïncide avec le retour d'un EEG désynchronisé caractéristique de l'éveil, et anticipe le retour du tonus musculaire. D'après Aston-Jones et Bloom 1981.
(B) Chez les souris modifiées génétiquement (ChR2-eYFP, traces du bas), la stimulation opotogénétique (trait bleu) des neurones noradrénergiques du LC induit un retour à l'éveil (flèche) que cette stimulation ait lieu durant le SL (NREM, à gauche) ou le SP (REM, à droite). Chez les animaux contrôles (eYFP, traces du haut), cette stimulation n'a aucun effet. D'après Carter et al., 2010.

interviendrait bien dans les transitions Ev/SL mais qu'il ne serait pas responsable de la sortie du SP.
Par contre, son inhibition est indispensable à l'apparition du SL ou du SP. A ce sujet, il a été montré que le LC reçoit en permanence un tonus inhibiteur glycinergique et GABAergique (Nitz and Siegel, 1997b; Gervasoni *et al.*, 1998) mais que seul ce dernier évolue au cours du cycle veille-sommeil : minimum au cours de l'éveil, il augmente durant le SL pour être maximal durant le SP (Gervasoni *et al.*, 1998). L'inhibition du LC proviendrait des neurones GABAergiques du VLPO durant le SL (**voir partie II.2**) et de structures mésencéphaliques et pontiques durant le SP (**voir partie II.3.5**).

Le LC joue donc un rôle clef dans la mise en place et le maintien de l'éveil, mais aussi dans l'activation corticale qui l'accompagne. De plus, il peut être considéré comme un système permissif vis-à-vis du SL, et plus encore vis-à-vis du SP, puisque son inhibition est nécessaire à la survenu de ces états.

II.1.2 – Le système sérotoninergique du noyau du raphé dorsal

Le noyau du raphé dorsal (DR) est une structure médiane située dans la partie rostrale du pont juste ventralement à l'aqueduc de Sylvius. Chez le rat, il comporte environ 11500 neurones sérotoninergiques (5-HT) représentant environ un tiers des neurones totaux de ce noyau. De plus, la taille des neurones 5-HT est supérieure à celle des neurones non 5-HT de ce même noyau (Descarries *et al.*, 1982). Comme les neurones noradrénergiques du LC, les neurones 5-HT du DR projettent sur l'ensemble du système nerveux central : cortex, hippocampe, hypothalamus, thalamus, région préoptique, PAG, formation réticulée pontique et bulbaire, noyau parabrachial, etc. (Vertes, 1991; Vertes and Kocsis, 1994). De même, les afférences de ces deux noyaux sont en partie identiques puisque le DR reçoit des projections en provenance notamment de l'hypothalamus, de l'aire préoptique, de la formation réticulée mésencéphalique, de la PAG, du LPGi, du DPGi ainsi que du noyau du faisceau solitaire (Sol) (Peyron *et al.*, 1996).

Les premières études reliant la sérotonine à la régulation des états de vigilance ont conduit à la théorie sérotoninergique du sommeil (Jouvet, 1972), théorie selon laquelle la sérotonine jouait un rôle majeur dans l'endormissement. En effet, chez le chat, la destruction du DR par coagulation tout comme l'inhibition de la TPOH (tryptophane hydroxylase, enzyme de synthèse de la 5-HT), induit une profonde insomnie. De plus, l'insomnie induite par l'inhibition de la TPOH peut être réversée par l'application intraventriculaire d'un précurseur de la 5-HT (Jouvet, 1968; 1969). Cependant l'effet inducteur de sommeil de cette application n'apparaît qu'après un certain délai, laissant supposer un effet facilitateur de la 5-HT vis-à-vis du sommeil plutôt qu'un effet inducteur (Petitjean *et al.*, 1985). De plus, de nombreuses données sont depuis venues infirmer cette théorie.

Tout d'abord, des études plus récentes montrent que l'injection systémique d'agonistes des récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B} diminue les quantités de SP et qu'elle engendre, à haute dose, une augmentation de l'éveil. A l'inverse, l'application d'antagonistes de ces récepteurs augmente les quantités de SP. En accord avec ces données, des mutants murins pour les récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B} présentent des quantités de SP supérieures à leurs contrôles, et sans atteinte des quantités d'éveil ou de SL (Boutrel *et al.*, 1999; Boutrel *et al.*, 2002). De plus, l'enregistrement électrophysiologique unitaire au cours du cycle veille-sommeil des neurones 5-HT du DR a démontré qu'ils sont de type SP-off : c'est-à-dire spécifiquement inactifs durant les phases de SP (McGinty and Harper, 1976; Gervasoni *et al.*, 2000). **La Figure II.2** illustre bien cette caractéristique : leur activité est maximale durant l'éveil (1 à 3 Hz), diminue durant le SL (0,5 Hz) et s'arrête durant les phases SP. En ce qui concerne les transitions entre états de vigilance, les neurones 5-HT du DR s'activent de manière synchronisée avec le retour de l'activation corticale, mais lors de l'endormissement, la diminution de leur taux de décharge anticipe la synchronisation de l'EEG (Sakai, 2011).Concordant avec leur patron d'activité, l'enregistrement par voltamètrie de la libération de 5-HT au

cours du temps révèle qu'elle augmente durant l'éveil et diminue au cours du sommeil. Ces résultats ont été obtenus dans le cortex et l'hypothalamus notamment, deux aires de projection des neurones du DR (Cespuglio *et al.*, 1990).

L'ensemble de ces données suggère donc que les neurones 5-HT du DR sont impliqués dans la régulation l'éveil, mais également du SP. Ils participeraient à l'activation corticale via leurs projections sur les noyaux réticulé et intralaminaire du thalamus (Saper *et al.*, 2010). Ils seraient également responsables de l'inactivation des structures génératrices du SL. En effet il a été mis en évidence que 50 % des neurones GABAergiques du VLPO responsables du SL sont inhibés par la 5-HT (**Figure II.9**) (Gallopin *et al.*, 2000) et la concentration en 5-HT augmente en fin d'éveil dans cette région (Python *et al.*, 2001).

Tout comme les neurones du LC, les neurones du DR ont donc un rôle clef dans les mécanismes responsables de l'éveil. Ils ne seraient cependant pas responsables de la genèse de cet état et joueraient par contre un rôle permissif vis-à-vis du sommeil puisque leur inhibition est indispensable à l'apparition de ce dernier (voir partie II.2 et II.3.5 et II.3.6).

II.1.3 – Le système histaminergique de noyau tuberomammillaire

Le noyau tuberomammillaire (TMN), localisé à la limite ventrale de l'hypothalamus postérieur est la (presque) seule région du cerveau où l'on trouve des neurones synthétisant l'histamine (Panula *et al.*, 1984; Watanabe *et al.*, 1984). Bien qu'il y ait un nombre très réduit de neurones à histamine, des projections histaminergiques sont retrouvées dans l'ensemble du système nerveux central. En particulier, ces neurones projettent sur de nombreuses régions impliquées dans la régulation des états de vigilance : thalamus, région préoptique, PAG, LC, TLD/PPT etc. (Panula *et al.*, 1989).
De nombreuses régions elles aussi impliquées dans la régulation du cycle veille-sommeil projettent également sur le TMN. C'est le cas de la région préoptique, des neurones hypocrétinergiques de l'hypothalamus postérieur, mais également des aires sérotoninergiques, noradrénergiques et adrénergiques du tronc cérébral (Ericson *et al.*, 1991; Peyron *et al.*, 1998).

Tout comme les autres neurones monoaminergiques, les neurones histaminergiques sont de type SP-off. Plus précisément, ils sont même de nature Ev-on puisque leur activité est maximale durant l'éveil attentif, diminue durant l'éveil calme et devient nulle durant les phases de SL et de SP (**Figure II.3A,B**) (Steininger *et al.*, 1999; Vanni-Mercier *et al.*, 2003; Takahashi *et al.*, 2006). En accord avec ce mode de décharge, Mochizuki et al. ont rapporté une augmentation du taux d'histamine intracérébral chez le rat au

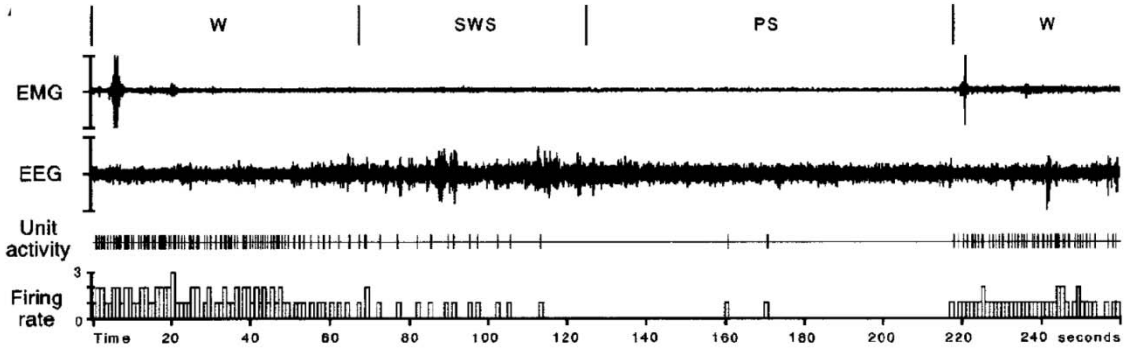


Figure II.2: Les neurones sérotoninergiques du noyau du raphé dorsal (DR) sont de nature SP-off
Activité unitaire spontanée d'un neurone sérotoninergique du DR au cours du cycle veille-sommeil. Sa fréquence de décharge (firing rate) est maximale durant l'éveil (W), diminue au cours du SL (SWS) pour devenir nulle durant le SP (PS). D'après Gervasoni et al., 2000.

cours de la phase sombre (Mochizuki *et al.*, 1992). Ces données suggèrent donc un lien entre histamine et éveil.

En effet, de nombreuses études montrent que les substances pharmacologiques potentialisant la transmission histaminergiques induisent de l'éveil (Lin *et al.*, 1996), alors que celles la diminuant favorisent le sommeil (Lin *et al.*, 1990). De plus, l'inhibition de la synthèse d'histamine au niveau du TMN induit une

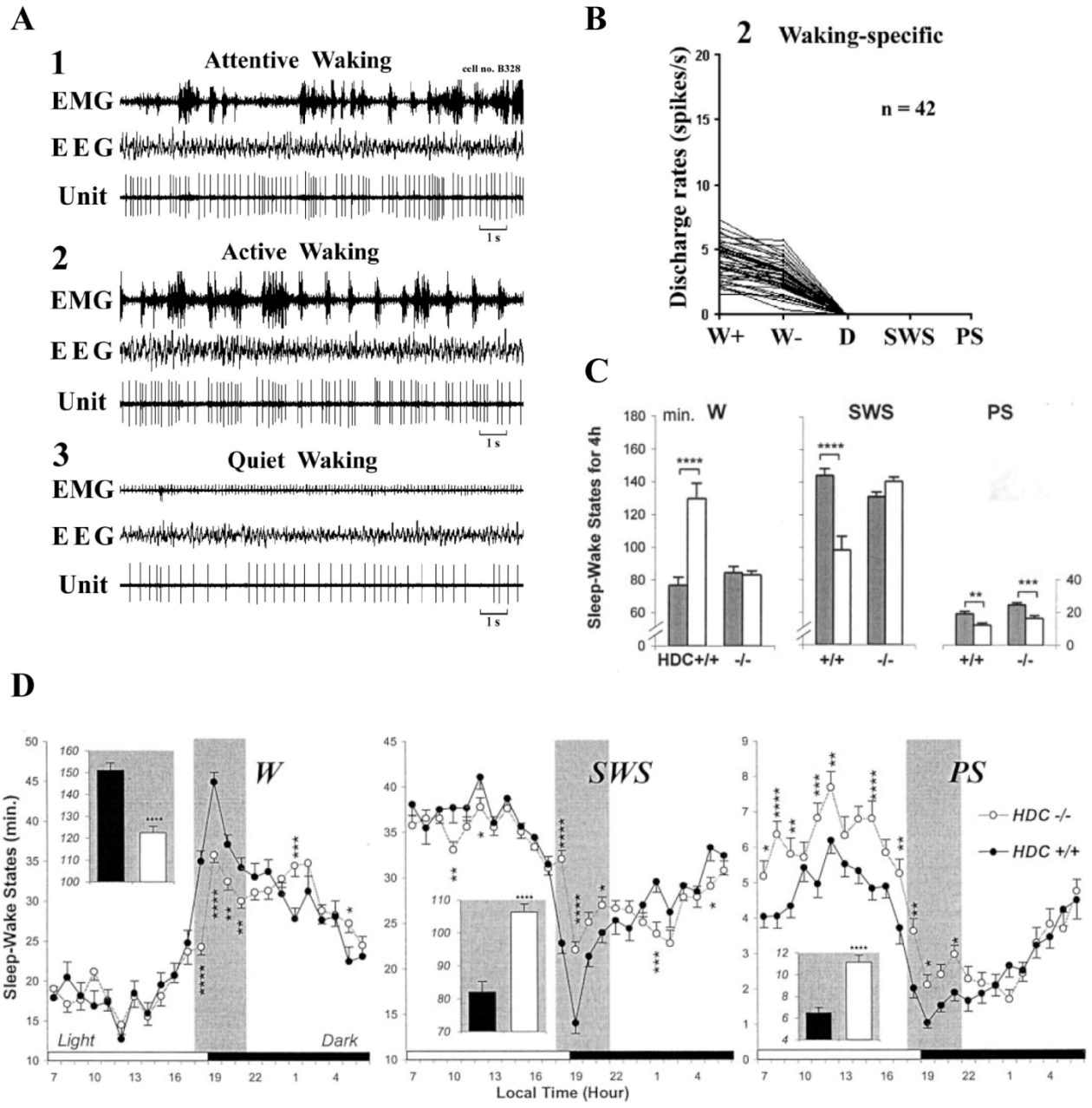


Figure II.3: Les neurones histaminergiques du noyau tuberomammillaire (TMN) sont de nature éveil-on et sont impliqués dans le maintien d'éveil

(A) Activité unitaire spontanée (unit) d'un neurone histaminergique du TMN de type éveil-on au cours de l'éveil attentif (attentive waking), de l'éveil actif (active waking) et de l'éveil calme (quiet waking).

(B) Graphique montrant l'activité d'un tel neurone durant tous les états de vigilance. D'après Takahashi et al., 2006.

(C) Quantité d'éveil (W), de SL (SWS) et de SP (PS) au cours des 4 h suivant un changement d'environnement pour des souris sauvages (HDC+/+) et des souris invalidées pour le gène de l'histidine décarboxylase, enzyme de synthèse de l'histamine (HDC-/-). Les barres grisées représentent les quantités enregistrées en baseline.

(D) Quantités d'éveil (W), de SL (SWS) et de SP (PS) au cours de la journée chez des souris HDC+/+ et des souris HDC-/- . D'après Parmentier et al., 2002.

augmentation des quantités de SL alors que l'inhibition de sa dégradation induit de l'éveil (Lin *et al.*, 1988). Plus récemment, il a été rapporté que des souris $HDC^{-/-}$ (souris KO pour l'histidine décarboxylase, enzyme de synthèse de l'histamine) présentent des quantités de SP supérieures à des souris sauvages, mais également une baisse des quantités d'éveil lors du passage en phase sombre ainsi qu'une puissance diminuée du rythme thêta durant l'éveil (**Figure II.3D**). De plus, ces souris sont incapables de rester éveillées lorsqu'elles sont soumises à un défi comportemental comme l'exposition à un nouvel environnement (**Figure II.3C**) (Parmentier *et al.*, 2002).

Si la physiologie de ces neurones apparait au premier abord comme semblable à celle autres populations monoaminergiques, certaines différences existent. Contrairement aux neurones noradrénergiques du LC, l'activation des neurones histaminergiques du TMN ne précède pas l'apparition de l'éveil et a même tendance à apparaitre avec un certain délai. De la même manière, ces neurones ne répondent pas ou peu à un stimulus sonore appliqué lors du SL. Par contre tout comme les neurones du LC, ceux du TMN voient leur taux de décharge diminuer avant l'apparition des premières ondes lentes synonymes de SL (Takahashi *et al.*, 2006). Cela suggère donc un rôle légèrement différent du TMN par rapport au LC vis-à-vis de l'éveil.

L'ensemble de ces données suggère que les neurones à histamine du TMN jouent un rôle clef dans la régulation de la vigilance. Ils ne seraient pas responsables de la mise en place de l'éveil mais leur activation secondaire permettrait son maintien. Ils seraient notamment impliqués dans les mécanismes d'activation corticale et interviendraient à ce titre plus spécifiquement dans le maintien de l'éveil attentif.

II.1.4 – Le système hypocrétinergiques de l'hypothalamus postérieur

Jusqu'à la fin des années 1990, le système histaminergique du TMN était le seul système éveillant localisé au sein de l'hypothalamus. En 1998, la découverte simultanée par deux équipes d'une nouvelle famille de neuropeptides allait changer la donne. Celle-ci se compose de deux neuropeptides, les hypocrétines 1 et 2 (HCRT-1 et HCRT-2), aussi appelées orexines A et B (Ox-A et Ox-B) et synthétisées exclusivement par des neurones (environ 6700 chez le rat) localisés dans la région périfornicale de l'hypothalamus postérieur (Modirrousta *et al.*, 2005). Les HCRT-1 et HCRT-2 dérivent d'un même gène codant pour la prépro-hypocrétine et ont été impliquées en premier lieu dans la régulation de la prise alimentaire (de Lecea *et al.*, 1998; Sakurai *et al.*, 1998b). De plus, de nombreux neurones à hypocrétines contiennent également le glutamate (Torrealba *et al.*, 2003) laissant supposer une action excitatrice de ces neurones. En effet, les deux seuls récepteurs aux hypocrétines aujourd'hui connus sont couplés à des protéines G et ont un effet excitateur (Sakurai *et al.*, 1998a).

Bien que la localisation des neurones à HCRT soit extrêmement limitée, la présence de fibres à HCRT, tout comme celle des récepteurs HCRT-R1 et HCRT-R2, a été rapportée dans l'ensemble du système nerveux central (**Figure II.4**) (Peyron *et al.*, 1998; Marcus *et al.*, 2001). En particulier, les neurones à hypocrétines projettent sur l'ensemble du cortex et sur la totalité des structures impliquées dans l'éveil comme les neurones à histamine du TMN, les neurones sérotoninergiques du DR, les neurones cholinergiques du LDT/PPT et du télencéphale basal, et les neurones noradrénergiques du LC. Il est intéressant de noter que cette dernière projection représente la projection extra-hypothalamique la plus dense. Si les efférences des neurones à HCRT ne font aucun doute, leurs afférences sont d'avantage soumises à controverse. En effet, l'hétérogénéité de l'hypothalamus a pendant longtemps rendu impossible l'étude des ces afférences pas les méthodes classiques de traçage de voies nerveuses. Toutefois, la publication récente de deux études indépendantes montrent que les neurones à HCRT semble recevoir des projections en provenance de nombreuses structures comme l'amygdale, le noyau accumbens, le septum latéral, la région

préoptique (latérale, médiane et ventrolatérale), l'hypothalamus, le DR, le LC, la PAG et certains cortex (Sakurai *et al.*, 2005; Yoshida *et al.*, 2006).

Au niveau physiologique, les neurones à HCRT semble jouer un rôle dans de nombreuses fonctions clefs telles que la régulation de la balance énergétique, l'activité endocrinienne, cardiovasculaire, nociceptive, et enfin, ce qui nous intéresse ici, dans la régulation des états de vigilance (Smart and Jerman, 2002). En effet, une déficience du système hypocrétinergique (perte neuronale ou mutation des récepteurs) entraine, chez de nombreuses espèces, l'apparition de la narcolepsie (**voir partie I.3.1**) (Chemelli *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 1999; Peyron *et al.*, 2000; Thannickal *et al.*, 2000; Hara *et al.*, 2001; Willie *et al.*, 2003). L'impossibilité pour les sujets narcoleptiques de maintenir un état stable d'éveil, associé à l'existence de projections denses des neurones à HCRT sur l'ensemble des systèmes d'éveil tendent à soutenir l'implication des neurones à HCRT dans la régulation de l'éveil. En effet, de nombreuses données confirment ce rôle.

Tout d'abord, l'injection intracérébro-ventriculaire ou au sein de la région préoptique d'HCRT-1 induit une forte augmentation des quantités d'éveil et de l'activité locomotrice (Hagan *et al.*, 1999; Espana *et al.*, 2001). Il a également été montré que l'application d'HCRT-1 directement au sein du LC accroit de manière concomitante les quantités d'éveil et la fréquence de décharge des neurones du LC (Bourgin *et al.*, 2000). Cet effet éveillant est bloqué par l'administration d'antagoniste des récepteurs H1 de l'histamine (Yamanaka *et al.*, 2002) ou chez des souris invalidées pour ce récepteur (Huang *et al.*, 2001).

De plus, les neurones à HCRT montrent une activité maximale lors des stades d'éveil, plus particulièrement lorsque les animaux sont soumis à un éveil attentif (prise de nourriture, exploration etc.) (**Figure II.5A**) (Lee *et al.*, 2005c; Mileykovskiy *et al.*, 2005), et il a été démontré que l'HCRT agit comme un neurotransmetteur excitateur sur les neurones histaminergiques du TMN (Bayer *et al.*, 2001), noradrénergique du LC (Horvath *et al.*, 1999), 5-HT du DR (Liu *et al.*, 2002) et cholinergiques du LDT (Burlet *et al.*, 2002). De manière symétrique, noradrénaline et acétylcholine (mais pas la sérotonine)

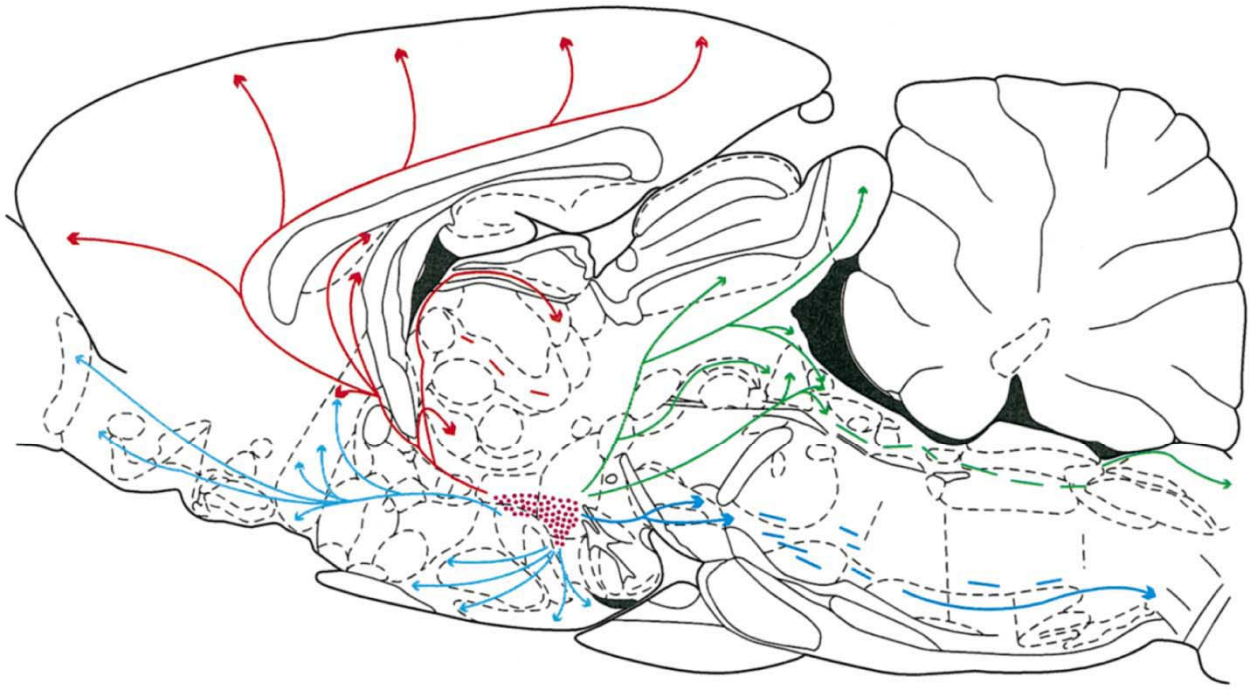


Figure II.4: Les neurones hypocrétinergiques de l'aire latérale de l'hypothalamus projettent sur l'ensemble du système nerveux central

Représentation schématique des différentes voies anatomiques de projection des neurones à HCRT. Les voies ascendantes dorsales sont en rouges, les ascendantes ventrales en turquoise, les descendantes ventrales en bleu et les descendantes dorsales en vert. D'après Peyron et al., 1998.

stimulent les neurones à HCRT (Muraki *et al.*, 2004; Bayer *et al.*, 2005).

Enfin, comme illustré en **Figure II.5B,** la stimulation par optogénétique pendant le sommeil des neurones à HCRT induit le réveil de l'animal dans un délai relativement court (40 sec) (Adamantidis *et al.*, 2007). A l'inverse, l'inhibition tonique de ces neurones par optogénétique induit l'apparition de SL (Tsunematsu *et al.*, 2011). Il est également intéressant de noter que l'effet éveillant de l'activation par optogénétique de ces neurones disparaît lorsque les neurones du LC sont inhibés par optogénétique de manière synchronisée (Carter and de Lecea, 2010).

L'ensemble de ces données suggère donc que les neurones à HCRT jouent un rôle clef dans le maintien de l'éveil via leur profil de décharge particulier et leurs projections sur l'ensemble des systèmes d'éveil. Tout en étant eux aussi régulés par les autres systèmes d'éveil, ils pourraient servir à la synchronisation de tous ces systèmes et ainsi permettre la mise en place d'un état de vigilance stable, mais également modulable en fonction des processus cognitifs réalisés à un instant donné.

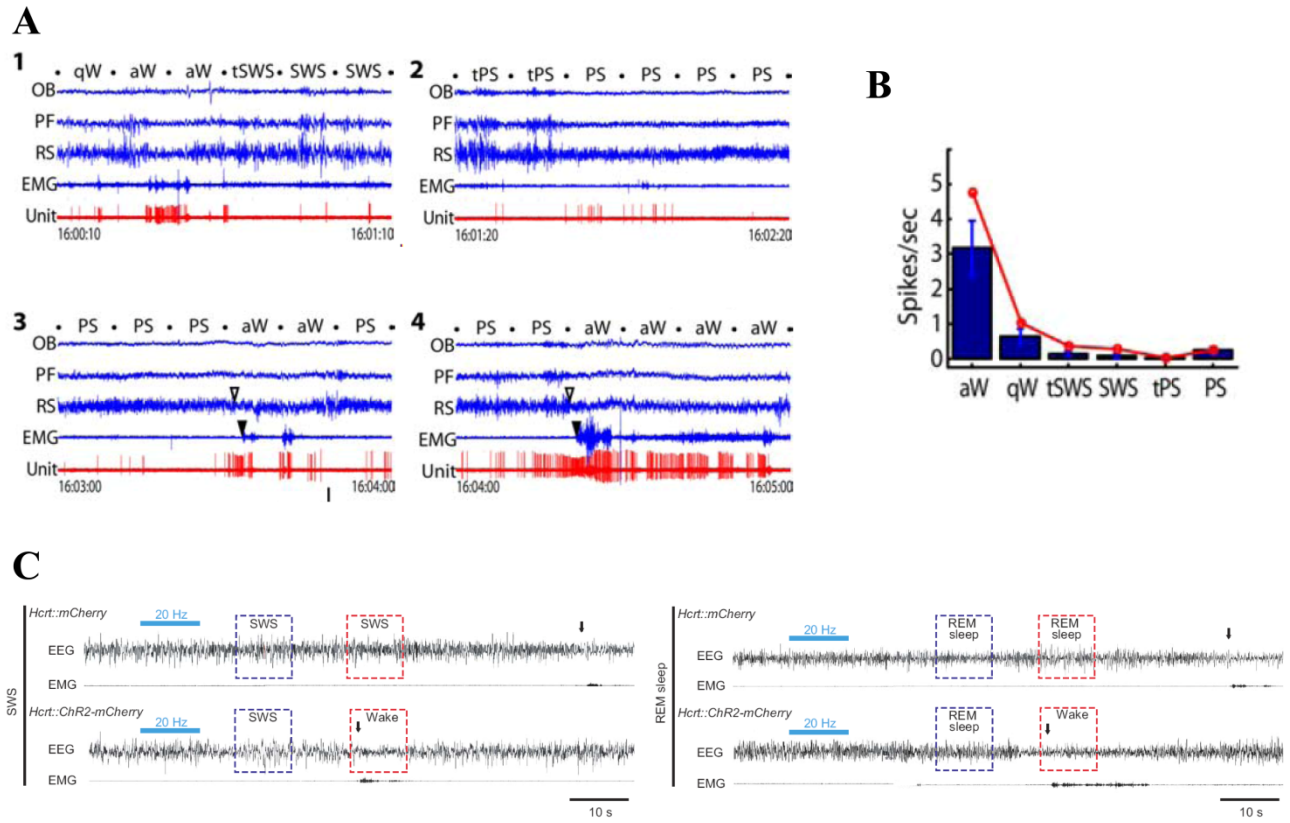


Figure II.5: Implication des neurones hypocrétinergiques dans l'induction de l'éveil
(A) Activité unitaire spontanée (en rouge) d'un neurone à hypocrétine (HCRT) de l'aire latérale de l'hypothalamus (LH) au cours des différentes transitions entre les états de vigilance (qW, éveil calme; aW, éveil actifs; tPS, transition SP).
(B) Histogramme montrant la moyenne de décharge des neurones à HCRT durant les différents états de vigilance. D'après Lee et al. 2000.
(C) Chez des souris modifiées génétiquement (Hcrt::ChR2-mCherry, souris exprimant la channel rhodopsin-2 sous le contrôle du promoteur HCRT, traces du bas), la stimulation opotogénétique (trait bleu) des neurones hypocrétinergiques de la LH induit l'apparition de l'éveil (flèche) que cette stimulation ait lieu durant le SL (SWS, à gauche) ou le SP (REM sleep, à droite). Chez les animaux contrôles (Hcrt::mCherry, traces du haut), cette stimulation n'a aucun effet. D'après Adamantidis et al., 2010.

II.1.5 – Les systèmes cholinergiques du tegmentum ponto-mésencéphalique et du télencéphale basal

II.1.5.a – Le tegmentum ponto-mésencéphalique

Ce système cholinergique est composé de deux noyaux distincts : le noyau tegmental latérodorsal (LDT) et le noyau tegmental pédonculopontin (PPT). Ces neurones ne sont pas exclusivement cholinergiques et peuvent également contenir d'autres neuropeptides comme le CRF ou la substance P (Vincent *et al.*, 1986). Les neurones cholinergiques du LDT et du PPT projettent sur l'hypothalamus postérieur, le télencéphale basal, le cortex préfrontal et le thalamus, en particulier sur les noyaux réticulé et intralaminaire du thalamus (Satoh and Fibiger, 1986; Hallanger *et al.*, 1987). Ils reçoivent en contrepartie des projections venant du télencéphale basal, de l'aire latérale de l'hypothalamus, de la zona incerta (ZI), de la PAG et de la formation réticulée mésencéphalique (Semba and Fibiger, 1992).

D'un point de vu physiologique, ces neurones cholinergiques du LDT et PPT représentent l'afférence majeure des noyaux thalamiques en provenance du mésencéphale (Hallanger *et al.*, 1987), structure connue pour son implication dans l'activation corticale. Le LDT/PPT est également l'afférence cholinergique majeure au thalamus (Mesulam *et al.*, 1983). De plus, l'enregistrement de l'activité de ces neurones a révélé qu'ils déchargent plus rapidement durant l'éveil et le SP que durant le SL (el Mansari *et al.*, 1989; Kayama *et al.*, 1992). Ces données suggèrent donc un rôle de ces neurones dans l'activation corticale (Steriade *et al.*, 1993). Il a en effet été montré chez le rat anesthésié que les neurones cholinergiques du LDT déchargent de manière intense durant l'activation corticale et que cette augmentation d'activité précède en général les transitions de l'EEG vers des gammes de fréquences plus rapides (Boucetta and Jones, 2009).

LDT et PPT semblent donc plus jouer un rôle au niveau de l'activation corticale qu'au niveau de l'induction de l'éveil à proprement parler. En effet, une lésion des ces neurones ne semble pas affecter les quantités d'éveil (Webster and Jones, 1988).

II.1.5.b – Le télencéphale basal

La terminologie de télencéphale basal (TB) regroupe plusieurs noyaux : le septum médian, la substance innominée et les bandes diagonale, verticale et horizontale de Broca (Heimer and Alheid, 1991) Si le TB comporte une importante population cholinergique, on y retrouve de nombreux neurones GABAergiques et glutamatergiques.

Les neurones cholinergiques du TB innervent de manière diffuse le cortex, l'hippocampe et le thalamus. Ils sont la source principale d'acétylcholine pour le cortex et l'hippocampe, mais pas pour le thalamus pour qui l'innervation cholinergique provient majoritairement du LDT/PPT (voir ci-dessus) (Mesulam *et al.*, 1983). En plus de cette innervation cholinergique, le TB fournit de manière plus importante encore une innervation glutamatergique et GABAergique au cortex. Dans ces neurones du TB, le glutamate peut être colocalisé dans les neurones cholinergiques ou GABAergiques (Manns *et al.*, 2001; Hur and Zaborszky, 2005). Par contre, on ne retrouve aucun neurone coexprimant le GABA et l'acétylcholine (Gritti *et al.*, 1993).

En ce qui concerne ses afférences, le TB reçoit des projections histaminergiques, noradrénergiques et sérotoninergiques en provenance respectivement de l'hypothalamus postérieur, du LC et du DR (Jones and Cuello, 1989).
Concernant leur rôle physiologique, il est généralement admis que ces neurones participent à l'activation corticale en constituant le relai extra-thalamique entre le système réticulé activateur ascendant pontomésencéphalique et le cortex (Jones, 2004). En effet, l'activité des neurones cholinergiques du TB est

maximale durant le SP (16 Hz) et l'éveil (7 Hz) et minimale durant le SL (1 Hz). De plus, ces neurones déchargent en bouffées de manière synchronisée avec les oscillations thêta (**Figure II.6**) (Lee *et al.*, 2005b)). Ces données concordent avec les observations selon lesquelles une lésion d'une partie du TB par application d'acide iboténique induit un léger ralentissement de l'EEG sans modification des états des quantités d'éveil et de sommeil (Kaur *et al.*, 2008). Toutefois, dans cette même étude, les auteurs rapportent qu'une lésion spécifique des neurones cholinergiques du TB provoque une réduction transitoire de l'éveil au profit du SL mais sans affecter les spectres de fréquence EEG. De même l'inactivation transitoire du TB par application de procaïne induit du SL alors que son activation à l'aide d'agoniste glutamatergique provoque de l'éveil (Cape and Jones, 2000).

L'ensemble de ces données illustre donc l'existence d'un consensus sur l'implication du TB dans l'activation corticale durant l'éveil et le SP. Par contre, son implication dans la genèse et le maintien de l'éveil, tout comme la contribution respective des différentes populations neuronales en son sein restent à confirmer.

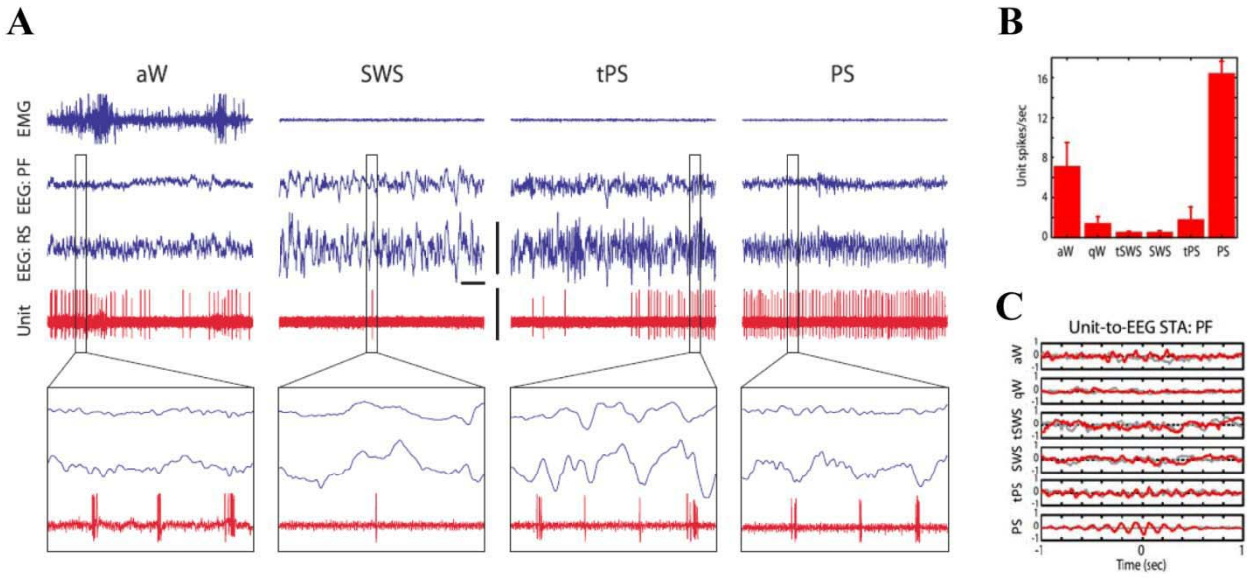


Figure II.6: Les neurones cholinergiques du télencéphale basal (TB) et l'activation corticale
(A) Activité unitaire (en rouge) d'un neurone cholinertique du TB durant l'éveil actif (aW), le SL (SWS), la transition SL/SP (tPS) et le SP (PS). L'activité est importante durant l'éveil, nulle durant le SL et augmente progressivement durant la transition SL/SP pour devenir maximale durant le SP. Les agrandissements montrent que la décharge de ces neurones est synchronisée avec le rythme théta de l'EEG.
(B) Histogramme récapitulant le taux moyen de décharge de ces neurones durant les différents états de vigilance.
(C) Graphique de corrélation entre le patron de décharge de ces neurones et l'activité EEG au cours des différents états de vigilance. Ces neurones déchargent de manière synchronisée avec le rythme thêta.
D'après Lee et al., 2005a.

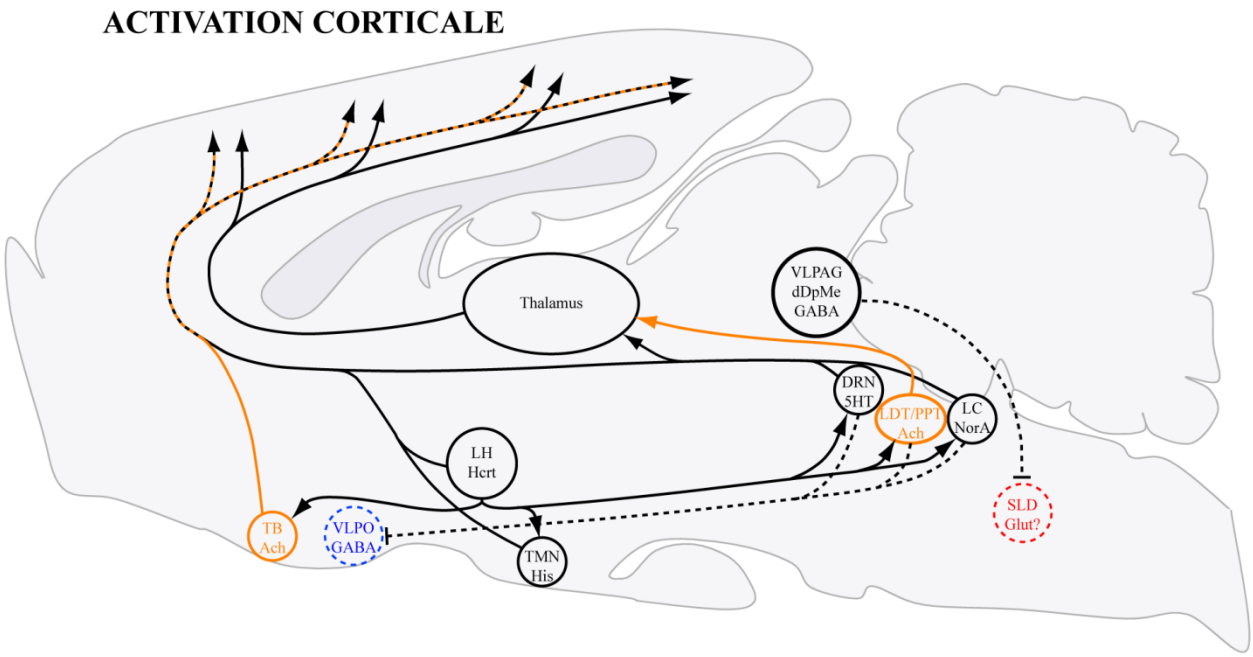


Figure II.7: Schéma récapitulatif des différentes populations neuronales, et de leurs inter-relations, impliquées dans la régulation de l'éveil

Les populations représentées en noir, bleu, et rouge correspondent respectivement aux populations spécifiquement actives durant l'éveil, le SL et le SP. Celles en orange sont actives durant l'éveil et le SP. La nature neurochimique est indiquée pour chaque population. Les populations actives sont entourées d'un trait plein alors que celles inactives le sont d'un trait discontinu. Les flèches en trait plein et en pointillé représentent respectivement des projections excitatrices et inhibitrices.

Nous introduisons ici le fait que le SLD, région générant le SP est inhibé durant l'éveil par des neurones GABAergiques localisés au sein de la VLPAG (voir partie II.3). Bien que nous n'ayons pas encore présenté ces résultats, il est néanmoins important de les signaler dans le contexte d'un schéma bilan.

Comme le résume la Figure II.7, l'éveil résulte de l'activité simultanée de nombreux systèmes répartis dans l'ensemble de l'encéphale. La plupart de ces systèmes se concentrent dans le mésencéphale et forment le système réticulé activateur ascendant. Plus rostralement, on trouve les neurones à HCRT de l'hypothalamus et ceux cholinergiques du TB. A première vu, une certaine redondance semble exister au sein de ces systèmes. Celle-ci autorise une réorganisation de ces derniers permettant ainsi le maintien d'un état d'éveil même dans le cas où certaines de ces populations sont endommagées. En effet, la lésion du TB, du TMN, du LC ou du LDT/PPT n'affecte que peu les quantités d'éveil (Webster and Jones, 1988; Shouse and Siegel, 1992; Gerashchenko *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2006a; Kaur *et al.*, 2008). Malgré cette apparente redondance, chaque système semble jouer une fonction particulière dans les processus de l'éveil. Comme nous l'avons évoqué, certaines populations, comme le LC, anticipent les changements d'états de vigilance et pourraient donc jouer un rôle dans l'induction de ce stade. A l'inverse, d'autres comme le TB, ne semble pas intervenir dans l'induction à proprement parler de l'éveil mais plutôt dans l'activation corticale qui le caractérise. Notons également que ces populations pourraient intervenir dans différentes situation physiologiques. Le LC pourrait notamment servir à coder la nouveauté (activation à un son nouveau et phénomène d'habituation lorsque ce son se répète) alors que le TMN interviendrait spécifiquement lors de l'éveil attentif. Les neurones à HCRT seraient une sorte de synchronisateur général permettant de maintenir un état d'éveil stable tout en le modulant en fonction des défis auxquels est confronté l'individu.

II.2 – Mécanismes neuronaux responsables du sommeil lent

L'existence d'un centre nerveux inducteur de sommeil a été supposée par certains auteurs dès la fin du 19ième siècle (sans que cela ne reflète la pensée communément admise). Puis, durant les années 1920, l'étude systématique de patients atteint de la grippe espagnole a permis au neurologue von Economo d'établir une corrélation entre l'existence de profondes insomnies chez ses patients et la présence de lésions inflammatoires au niveau de l'aire préoptique (POA) (von Economo, 1930). Cette association l'a amené à émettre l'hypothèse selon laquelle la POA serait une structure clef pour l'établissement du sommeil physiologique. Toutefois, ce n'est que bien plus tard que cette théorie allait trouver un écho expérimental lorsqu'il a été rapporté que la lésion de la POA chez le singe (Ranson, 1939) et chez le rat (Nauta, 1946) induit également de profondes insomnies. A l'inverse, la stimulation électrique chez le chat de la POA provoque l'apparition d'ondes lentes et de sommeil lent (Sterman and Clemente, 1962a; b).
Ces données préliminaires ont été à la base de la théorie actuelle acceptée par tous selon laquelle le sommeil lent est généré par un petit groupe de neurones localisé au sein de l'aire préoptique et projetant sur l'ensemble des systèmes d'éveil, permettant ainsi leur inhibition synchrone.

II.2.1 – La région préoptique et la genèse du SL

La découverte et la caractérisation tardive des neurones de la POA responsables de la survenue du SL s'expliquent par la nature même de cette région. En effet, la POA est une région vaste sans véritable subdivision claire qui rassemble de nombreux types cellulaires impliqués dans de nombreuses fonctions vitales.

En 1989, Sallanon et al. répliquent les expériences de lésion de la POA chez le chat et confirment l'induction d'une profonde insomnie. Toutefois, ils révèlent également que chez animaux, l'application de muscimol dans l'hypothalamus postérieur provoque une profonde hypersomnie suggérant ainsi l'existence d'une inhibition réciproque intra-hypothalamique pour la régulation de l'éveil et du SL (Sallanon *et al.*, 1989).

En 1996, l'utilisation de l'imagerie neuronale chez le rat a permis une avancée décisive dans la compréhension des mécanismes responsables de la genèse du SL. En effet, Sherin et al**.** ont cartographié, chez le rat, la localisation des neurones de la POA exprimant le c-FOS (marqueur d'activation neuronale) après une profonde hypersomnie de SL. Ils ont ainsi pu démontrer que même si de nombreux neurones c-FOS+, et donc actifs durant le SL, sont retrouvés de manière diffuse dans l'ensemble de la POA, il existe un petit cluster de ces neurones qui est localisé dans la partie ventrale de la POA, nommé par la suite VLPO (noyau préoptique ventrolatéral) (Sherin *et al.*, 1996). Outre le VLPO, on retrouve également de nombreux neurones c-FOS+ après hypersomnie de SL au sein du noyau préoptique médian (MnPn)(Gong *et al.*, 2004). De plus, il apparaît que dans ces deux noyaux le nombre de neurones c-FOS+ après hypersomnie de SL est proportionnel aux quantités de SL effectuée par l'animal juste avant son sacrifice.

Plus tard, des études électrophysiologiques sont venues confirmer l'hypothèse d'une implication du VLPO et du MnPn dans la genèse du SL. En effet, l'enregistrement unitaire de neurones de la POA chez le rat vigile a révélé que le VLPO et le MnPn sont les seules régions de la POA qui contiennent des neurones actifs spécifiquement durant le SL (SL-on) (**Figure II. 8**) et dont la fréquence de décharge est corrélée à l'intensité et à la durée des épisodes de SL (Szymusiak *et al.*, 1998; Suntsova *et al.*, 2002). De plus, l'augmentation du taux de décharge de ces neurones précède la synchronisation corticale caractéristique du SL, et lors des transitions SL/Ev, leur activité décroit avant le retour d'un EEG synchronisé (Takahashi *et al.*, 2009). Ces neurones SL-on ont donc un patron de décharge symétrique à celui observé pour les neurones des systèmes d'éveil (**voir partie I**).

De nombreux résultats physiologiques vont également dans le même sens. Tout d'abord, la lésion bilatérale du VLPO par application d'acide iboténique induit chez le rat une profonde insomnie avec une diminution de plus de 50 % des quantités de SL (Lu *et al.*, 2000). De même l'application de carbachol (un agoniste cholinergique) au sein du VLPO supprime le SL chez le rat vigile en contention (Schmidt *et al.*, 2002; 2003).

De plus, il apparaît que les neurones du VLPO et du MnPn, de nature GABAergique et galaninergique (Sherin *et al.*, 1998), projettent sur l'ensemble des systèmes d'éveil et reçoivent également des projections en provenance de chacun de ces systèmes (Luppi *et al.*, 1995; Sherin *et al.*, 1998; Gervasoni *et al.*, 2000; Steininger *et al.*, 2001; Uschakov *et al.*, 2006). L'hypothèse que les systèmes d'éveil soient inhibés durant le SL par la POA est renforcée par le fait que la concentration extracellulaire en GABA au sein de ces systèmes augmente durant le SL par rapport à l'éveil (Nitz and Siegel, 1996; Nitz and Siegel, 1997a; Nitz and Siegel, 1997b) et que les projections du VLPO et du MnPn sur ces systèmes sont de nature inhibitrice (Suntsova *et al.*, 2007). En effet, il a notamment été montré que la stimulation électrique du VLPO entraine l'inhibition des neurones du TMN par un mécanisme GABAergique (Yang and Hatton, 1997). De même l'inhibition du VLPO chez le rat anesthésié entraine l'expression de c-FOS au sein des neurons HCRT de l'hypothalamus et sérotoninergiques du DR (Kumar *et al.*, 2008).

L'ensemble de ces données suggère donc avec force que les neurones SL-on localisés au sein du MnPn et plus encore ceux du VLPO sont responsables de la mise en place du sommeil lent via l'inhibition coordonnée de l'ensemble des systèmes d'éveil. Toutefois, il faut garder à l'esprit qu'une

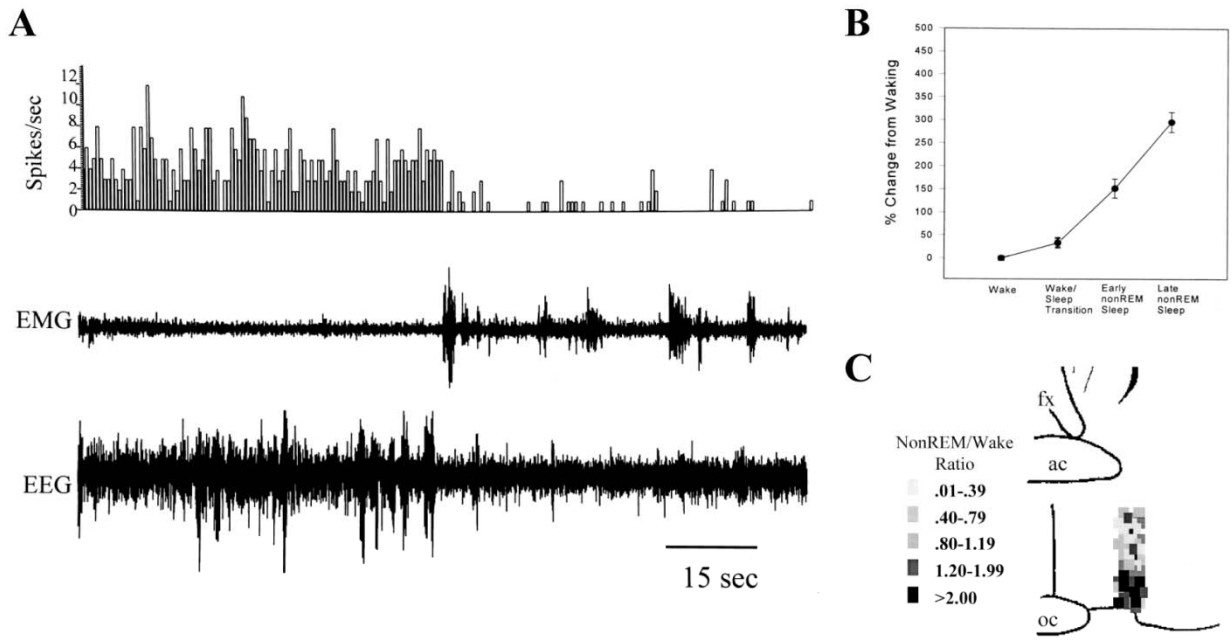


Figure II.8: Activité et localisation des neurones SL-on du VLPO

(A) Exemple d'activité unitaire spontanée d'un neurone de l'aire préoptique ventrolatérale (VLPO) au cours du SL et de l'éveil montrant clairement le caractère SL-on de ce neurone.

(B) Activité relative des neurones de type SL-on durant l'éveil (wake), les transitions éveil-SL (wake/sleep transition) et les phases précoces (early nonREM sleep) et tardives (late nonREM sleep) du SL. Cette activité, normalisée par rapport à celle de l'éveil indique que l'activation des neurones SL-on précède la mise en place du SL.

(C) Ce graphique montre la localisation des neurones enregistrés ainsi que leur caractéristique physiologique représentée par le rapport entre l'activité durant le SL et celle durant l'éveil. Les neurones de type SL-on (en noir et gris foncé) sont majoritairement localisé dans la partie ventrolatérale de l'aire préoptique.

D'après Szymusiak et al., 1998.

lésion bilatérale du VLPO entraine une diminution de « seulement » 50 % des quantités de SL suggérant l'existence d'autres neurones inducteurs de SL localisés, soit de manière diffuse dans la POA, soit situés dans d'autres régions cérébrales et pouvant prendre le relai de ceux du VLPO. Mais quelles sont les causes de l'activation de ces neurones SL-on ?

II.2.2 – Modulation de l'activité du VLPO : changements Ev-SL et homéostasie du SL

II.2.2.a – L'inhibition du VLPO par les systèmes d'éveil

Au début des années 2000, l'étude *in-vitro* de neurones du VLPO supposés SL-on a permis de déterminer leurs caractéristiques morphologiques et fonctionnelles. Depuis, il est généralement admis que les neurones SL-on du VLPO sont GABAergiques et galaninergiques, de forme triangulaire et avec la particularité électrophysiologique de présenter un potentiel calcique de bas seuil (low threshold calcium spike). De plus, tous ces neurones sont inhibés par la noradrénaline et par l'acétylcholine alors que la sérotonine n'inhibe que 50 % de ces neurones, les 50 % restant étant excité (**Figure II.9**). Par contre il semble que ni l'histamine ni l'hypocrétine n'induisent une inhibition des neurones du VLPO (Gallopin *et al.*, 2000). Toutefois, ce dernier résultat ne signifie pas pour autant que les neurones à histamine ne peuvent inhiber les neurones SL-on du VLPO. En effet, les neurones à histamine contiennent également du GABA (Airaksinen *et al.*, 1992) et le neuropeptide opioïde mu, peptide induisant une inhibition des neurones du VLPO (Greco *et al.*, 2008). Il a également été rapporté que le modafinil, agent pharmacologique induisant l'éveil, inhibe les neurones du VLPO via l'inhibition de la recapture de la noradrénaline (Gallopin *et al.*, 2004). Des études complémentaires ont permis de montrer que l'inhibition de la noradrénaline passe par des adrénorécepteurs $\alpha 2$ post-synaptiques (Matsuo *et al.*, 2003) ; celle de l'Ach par des récepteurs muscariniques post-synaptiques ainsi que des récepteurs nicotiniques pré-synaptiques sur les terminaisons noradrénergiques (Saint-Mleux *et al.*, 2004) ; et celle de la 5-HT par des récepteurs 5HT-1A post-synaptiques (Gallopin *et al.*, 2005).

Ces données décrivent donc un système assez simple permettant la genèse du SL. Les neurones SL-on du VLPO sont inhibés durant l'éveil par l'ensemble des systèmes d'éveil. Au début du SL, les neurones SL-on s'activent, inhibent les systèmes d'éveil permettant ainsi de renforcer leur propre

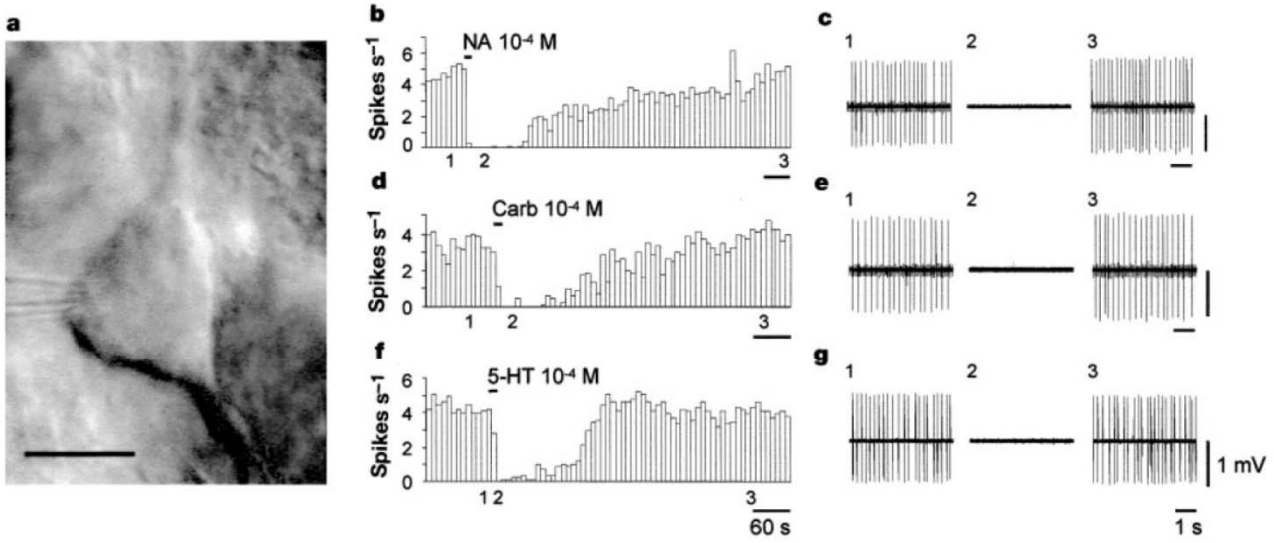


Figure II.9: Caractérisation fonctionnelle et morphologique des neurones SL-on du VLPO
Les neurones SL-on du VLPO sont de forme triangulaire (comme illustré par la photographie) et sont inhibés *in vitro* par l'application de noradrénaline (NA), de carbachol (Carb, agoniste cholinergique) et de sérotonine (5-HT). D'après Gallopin et al., 2000.

activité. Cette inhibition réciproque entre les systèmes d'éveil et de SL permet donc la stabilisation de l'état de vigilance dans l'une ou l'autre des configurations (Saper *et al.*, 2001; Fort *et al.*, 2004). Cependant, l'activation des neurones du VLPO reste encore incomprise. Deux possibilités existent : soit l'activité des neurones Ev-on diminue permettant ainsi l'activation des neurones du VLPO, soit l'activation de ces derniers résulte d'une excitation extérieure.

II.2.2.b – La régulation homéostasique du SL : MnPn et les facteurs hypnogènes

Le fait que le SL soit régulé de manière homéostatique est connu de tous. Par contre, les mécanismes permettant notamment de récupérer d'une privation de sommeil sont encore flous, même si certaines pistes ont été plus ou moins explorées.

La première d'entre elle concerne le noyau préoptique médian (MnPn) dont nous avons parlé ci-dessus. En effet, comme nous l'avons déjà évoqué, le MnPn présente, comme le VLPO, de nombreux neurones c-FOS+ après une hypersomnie de SL (Gong *et al.*, 2004) et possède également de nombreux neurones SL-on (Suntsova *et al.*, 2002). Par contre, contrairement au VLPO, le MnPn présente également de nombreux neurones c-FOS+ après une privation de sommeil de 2 h suggérant un rôle de ce noyau dans l'accumulation de la pression de sommeil (Gvilia *et al.*, 2006). De plus l'activation des neurones SL-on du MnPn précèdent la survenue du cet état (Szymusiak and McGinty, 2008). Le MnPn pourrait alors moduler l'activité des neurones SL-on du VLPO via l'existence de projections sur ce dernier (Chou *et al.*, 2002; Uschakov *et al.*, 2007).

La deuxième piste permettant d'expliquer une régulation homéostatique du SL est à rechercher du côté des substances dites hypnogènes. Bien que de nombreuses substances de ce type aient été décrites nous ne traiterons que de l'adénosine puisque c'est elle qui a reçu le plus d'attention de la part de la communauté scientifique. En effet, il a été démontré depuis bientôt 15 ans que l'adénosine est une molécule capable de favoriser l'apparition de SL (Porkka-Heiskanen *et al.*, 1997) et qu'elle serait responsable de l'hypersomnie observée après une privation de sommeil (Porkka-Heiskanen and Kalinchuk, 2011). En effet, comme illustré en **Figure II.10**, la concentration extracellulaire en adénosine augmente au cours d'une privation de sommeil

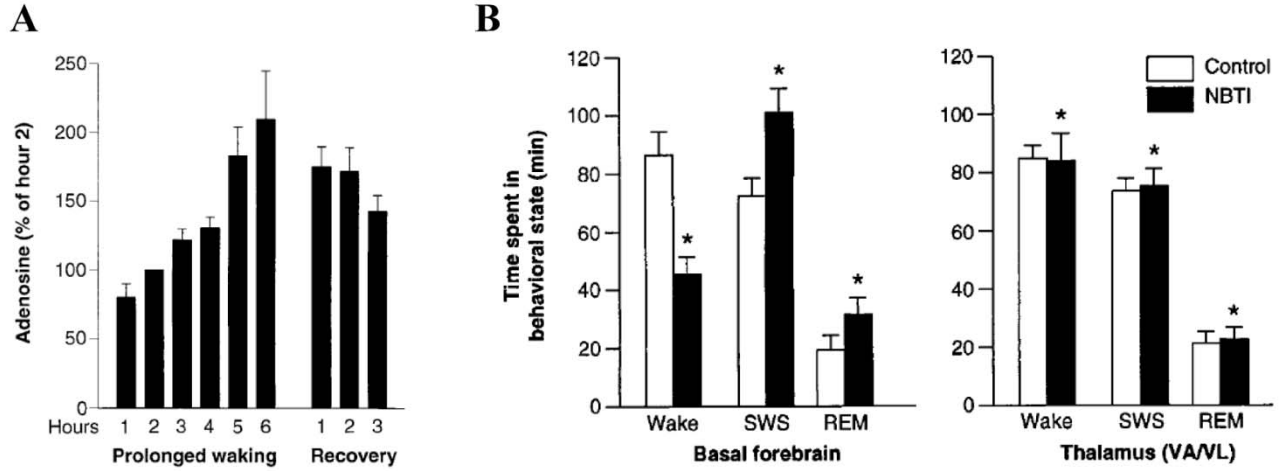


Figure II.10: Adénosine et induction du sommeil
(A) Concentration extracellulaire en adénosine dans le télencéphale basal (TB) durant un éveil prolongé de 6h (prolonged waking) et durant les 3 h de récupération qui suivent (recovery) pendant lesquelles l'animal effectue majoritairement du SL.
(B) Dans le TB (basal forebrain, à gauche), l'augmentation des concentrations extracellulaires en adénosine par un traitement au NBTI (inhibiteur du transporteur de l'adénosine) provoque une augmentation des quantités de sommeil et une baisse de celles d'éveil. Le même traitement au niveau du thalamus (à droite) ne provoque aucune modification des états de vigilance.
D'après Porkka-Heisknen et al., 1997.

pour diminuer durant l'hypersomnie qui suit (Porkka-Heiskanen and Kalinchuk, 2011), et l'augmentation de la concentration extracellulaire en adénosine dans le TB induit une augmentation des quantités de SL. De plus, l'adénosine inhibe les neurones cholinergiques du LDT/PPT (Rainnie *et al.*, 1994) mais également les neurones histaminergiques du TMN (Oishi *et al.*, 2008) et les neurones hypocrétinergiques de l'hypothalamus (Liu and Gao, 2007). De manière concordante, des souris invalidées pour le récepteur A_{2A} à l'adénosine ne montrent aucune régulation homéostatique du SL. En effet, l'application intraventriculaire d'un agoniste A_{2A} ne provoque pas chez ces souris l'augmentation des quantités de SL observée chez des souris sauvages (Urade *et al.*, 2003). Par contre, des souris invalidée pour le récepteur A_1 présentent une homéostasie du SL normale, tant au point de vue des quantités de SL que de la puissance spectrale des ondes delta (Stenberg *et al.*, 2003). Cela laisse donc supposer une implication du récepteur A_{2A} et non d'A1 dans la régulation du SL. Enfin, certaines données laissent supposer que l'adénosine pourrait stimuler directement les neurones du VLPO. En effet l'application d'un agoniste A_{2A}R proche du VLPO induit du SL et l'expression de c-FOS par les neurones du VLPO (Scammell *et al.*, 2001). De plus, des études réalisées *in vitro* sur des neurones du VLPO confirment ces résultats puisque l'application d'agoniste A_{2A}R provoque une dépolarisation des neurones du VLPO (Gallopin *et al.*, 2005). Enfin, des souris génétiquement modifiée chez lesquelles le relargage d'adénosine par les astrocytes est invalidé ne montrent aucune hypersomnie suivant une privation de sommeil (Halassa *et al.*, 2009).

Evoquons enfin la possibilité évoquée par certains groupes d'une relation entre la thermorégulation et l'homéostasie du SL (McGinty *et al.*, 2001).

L'accumulation de substance hypnogènes, comme l'adénosine, au cours de l'éveil pourraient avoir comme conséquence la stimulation des neurones SL-on du VLPO permettant ainsi la survenue du SL. En cas de privation de sommeil, cette accumulation plus importante serait à l'origine de l'hypersomnie observée, tant d'un point de vue quantitatif (quantités de SL) que qualitatif (puissance des ondes delta) (Porkka-Heiskanen and Kalinchuk, 2011).

II.2.2.c – Le noyau suprachiasmatique et la régulation circadienne du SL

En plus d'une régulation homéostasique, chacun d'entre nous se rend bien compte que le SL est régulé de manière circadienne et qu'il en est de même pour l'ensemble des espèces.

Cette régulation circadienne du SL pourrait se faire via des interconnections entre le VLPO et le noyau suprachiasmatique. En effet, il a été démontré que le noyau suprachiasmatique projette densément sur le VLPO (Novak and Nunez, 2000; Sun *et al.*, 2001; Chou *et al.*, 2002), et qu'il est capable de moduler la libération de noradrénaline au sein du VLPO, et donc son activité (Saint-Mleux *et al.*, 2007). En accord avec ce couplage structural entre noyau suprachiasmatique et VLPO, Novak et Nunez ont démontré un couplage physiologique de ces deux régions en utilisant l'expression du marqueur d'activation c-FOS (Novak and Nunez, 1998).

En plus de cette interrelation noyau suprachiasmatique/VLPO, ce dernier reçoit également des informations en provenance directe des cellules ganglionnaires de la rétine (Lu *et al.*, 1999). Par conséquent, il se pourrait que la lumière puisse moduler directement l'activité du VLPO et donc influencer la survenue du SL.

L'activité du VLPO, influencée notamment par l'activité du noyau suprachiasmatique, est donc régulée en fonction de l'heure de la journée permettant ainsi au SL de ne survenir que durant la période propice à cet état. Toutefois, les mécanismes sous-tendant ce contrôle restent pour l'instant largement inconnus.

II.2.3 – Le thalamus et la genèse des ondes lentes

Le thalamus ne joue pas un rôle dans la régulation à proprement parlée du SL mais participe à la synchronisation corticale qui caractérise cet état de vigilance (**voir partie II.2.3**).

Comme illustré en **Figure II.11**, les oscillations lentes observées au niveau de l'EEG seraient dues à l'hyperpolarisation rythmique des neurones corticaux. En effet l'enregistrement électrophysiologique de l'activité de neurones corticaux révèle une alterne entre deux états : un état dépolarisé durant lequel ils déchargent et qui correspond à la composante négative de l'EEG, et un état hyperpolarisé durant lequel les neurones sont silencieux et qui correspond à la composante positive de l'EEG (Steriade, 2000; Timofeev *et al.*, 2001). Ce mécanisme oscillatoire est une caractéristique intrinsèque au cortex puisque ces oscillations persistent dans le cortex suite à une lésion du thalamus (Villablanca, 1974) mais sont absentes lorsque les connections intra-corticales sont détruites (Amzica and Steriade, 1995).

Les noyaux du thalamus interviendraient alors notamment dans la genèse des fuseaux qui accompagnent ces ondes lentes. En effet, la décharge des neurones cortico-thalamique induit une synchronisation des neurones thalamiques (Contreras and Steriade, 1997a; b). Or les neurones du noyau réticulé du thalamus, de nature GABAergique projettent sur des neurones thalamiques glutamatergiques qui projettent directement au cortex (Pare *et al.*, 1987). Le noyau réticulé du thalamus serait alors responsable de l'inhibition rythmique des neurones corticaux via ces projections thalamocorticales. En effet il a notamment

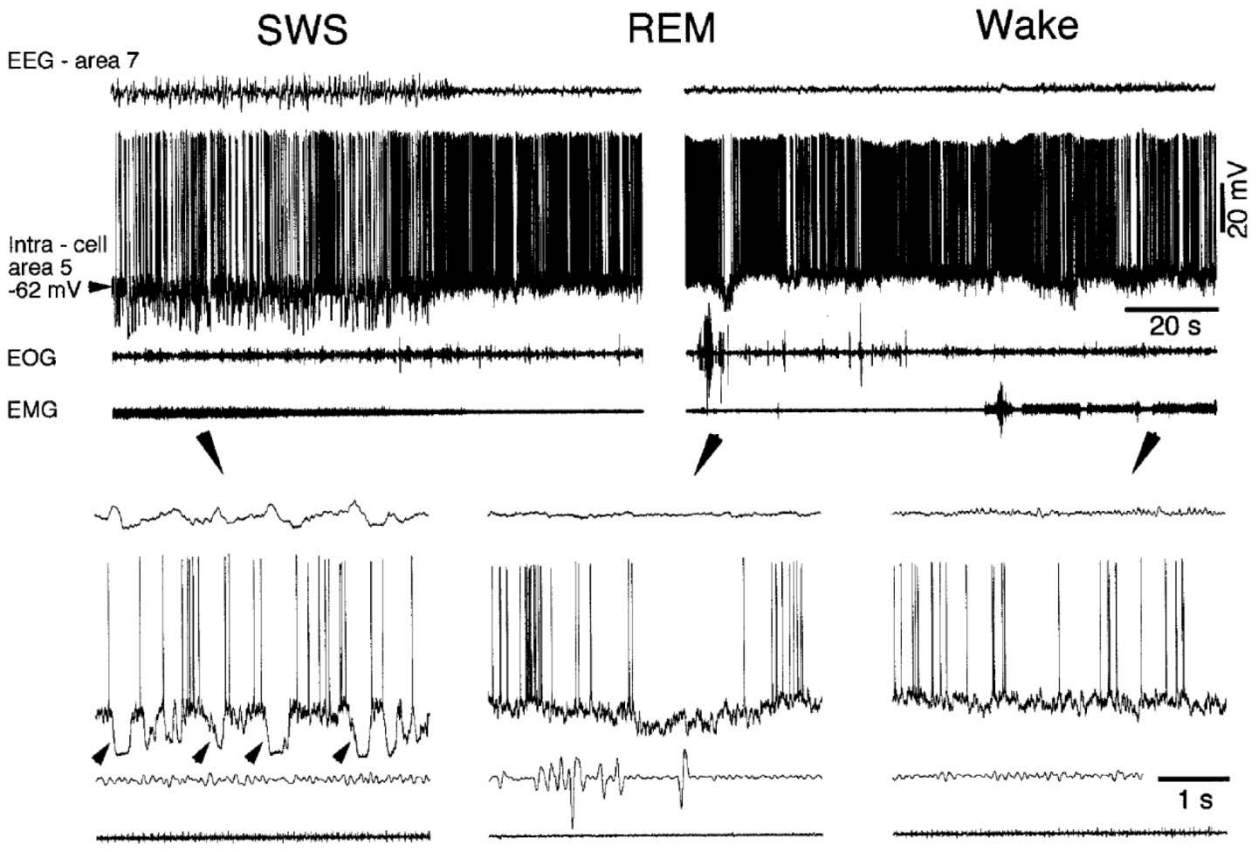


Figure II.11: L'inhibition périodique des neurones corticaux durant le SL est à l'origine des ondes lentes enregistrées au niveau de l'EEG
Enregistrements EEG, EMG, EOG et de l'activité unitaire intracellulaire d'un neurone cortical au cours des différents états de vigilance. Les tracés du bas sont des agrandissements des tracés du haut signalés par des flèches. Une hyperpolarisation cyclique des neurones corticaux (signalée par des flèches) est observée uniquement durant le SL et correspond aux valeurs positives de l'EEG. D'après Timofeev et al., 2001.

été observé une disparition des fuseaux corticaux lorsque le noyau réticulé du thalamus est déconnecté du reste du thalamus (Steriade *et al.*, 1985), et la stimulation du noyau réticulé du thalamus provoque l'apparition de fuseaux corticaux (Marini *et al.*, 1992).

L'interrelation entre cortex et noyaux thalamiques serait à l'origine du patron d'activité caractéristique observé durant le SL.

La Figure II.12 récapitule l'ensemble des processus mis en œuvre dans la genèse et la régulation du SL. Contrairement au système d'éveil qui est extrêmement complexe et semble présenter une certaine redondance, celui du SL parait beaucoup plus simple. En effet, la région préoptique, et en particulier le VLPO, contiennent les seuls neurones inducteurs de SL connus à ce jour. Ces neurones seraient responsables de l'inhibition de la totalité des systèmes d'éveil via des projections GABAergiques sur chacune de ces structures. En retour, l'ensemble des systèmes d'éveil est également capable d'inhiber ce centre du sommeil permettant alors la transition SL-éveil. Enfin, ces neurones

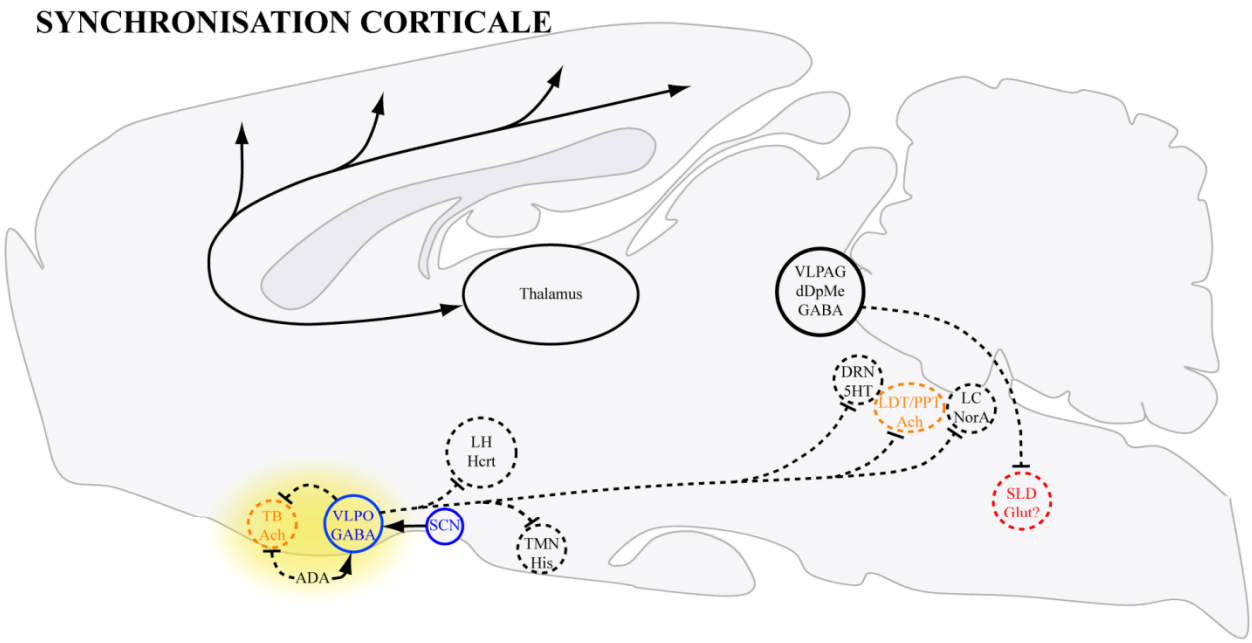


Figure II.12: Schéma récapitulatif des différentes populations neuronales, et de leurs inter-relations, impliquées dans la régulation du sommeil lent
Les populations représentées en noir, bleu, et rouge correspondent respectivement aux populations spécifiquement actives durant l'éveil, le SL et le SP. Celles en orange sont actives durant l'éveil et le SP. La nature neurochimique est indiquée pour chaque population. Les populations actives sont entourées d'un trait plein alors que celles inactives le sont d'un trait discontinu. Les flèches en trait plein et en pointillé représentent respectivement des projections excitatrices et inhibitrices.
De manière similaire au schéma bilan de l'éveil, le SLD est inhibé durant le SL par des neurones GABAergiques localisés au sein de la VLAPG.
Abbréviations : ADA, adénosine

SL-on subissent une régulation circadienne et homéostasique en provenance vraisemblablement du noyau suprachiasmatique et du MnPn pour la première et de l'adénosine notamment pour la seconde.

II.3 – Mécanismes neuronaux responsables du sommeil paradoxal

II.3.1 – Vers la recherche d'un centre du SP : l'hypothèse cholinergique

Dès la découverte du SP, de nombreux chercheurs se sont penchés sur les mécanismes permettant sa genèse. Connaissant déjà l'existence d'un « centre » de l'éveil, l'existence d'une région inductrice de SP a été recherchée quasiment immédiatement via des expériences de transsection. Dès le début des années 1960, il était clair que le tronc cérébral contenait l'ensemble des structures nécessaires à l'établissement du SP. En effet, l'ablation de la totalité des structures cérébrales en avant de la jonction ponto-mésencéphalique (préparation du « chat pontique »), tout comme une section au niveau de la jonction intercolliculaire (préparation dite de « cerveau isolé »), abolit le SP dans la partie rostrale de l'encéphale mais pas dans la partie caudale restante (**Figure II.13**) où il continue de survenir de manière rythmique (Jouvet, 1962; Villablanca, 1966). Par contre, une section plus caudale localisée à la jonction entre le pont et la moëlle épinière n'affecte pas le SP sauf en ce qui concerne l'atonie des muscles innervés par les motoneurones spinaux (Jouvet, 1962). Ces données indiquent donc que la région ponto-bulbaire contient toutes les structures nécessaires au déclenchement et au maintien du SP.

L'utilisation de techniques plus sélectives et moins invasives a permis de réduire la zone d'intérêt. En effet, la lésion électrolytique de la majeure partie du noyau pontis oralis (PnO) supprime le SP de manière permanente chez le chat (Carli and Zanchetti, 1965). Cet effet a par la suite été observé dans le cas de lésions plus petites et restreintes à la partie dorsale du PnO et du PnC (noyau pontis caudalis) (Jouvet, 1965; Sastre *et al.*, 1981; Webster and Jones, 1988). De même l'application de carbachol, un agoniste cholinergique, au sein du PnO augmente les quantités de SP (George *et al.*, 1964). De plus, si ces injections sont restreintes à la partie dorsale du PnO la latence de cet effet est diminuée (Sakai *et al.*, 1979; Vanni-Mercier *et al.*, 1989; Lai and Siegel, 1990). De manière similaire, l'application de kaïnate dans cette région provoque l'appartion de SP (Onoe and Sakai, 1995). Cette zone, nommée péri-LCα chez le chat (pour péri-locus coeruleus α) semble

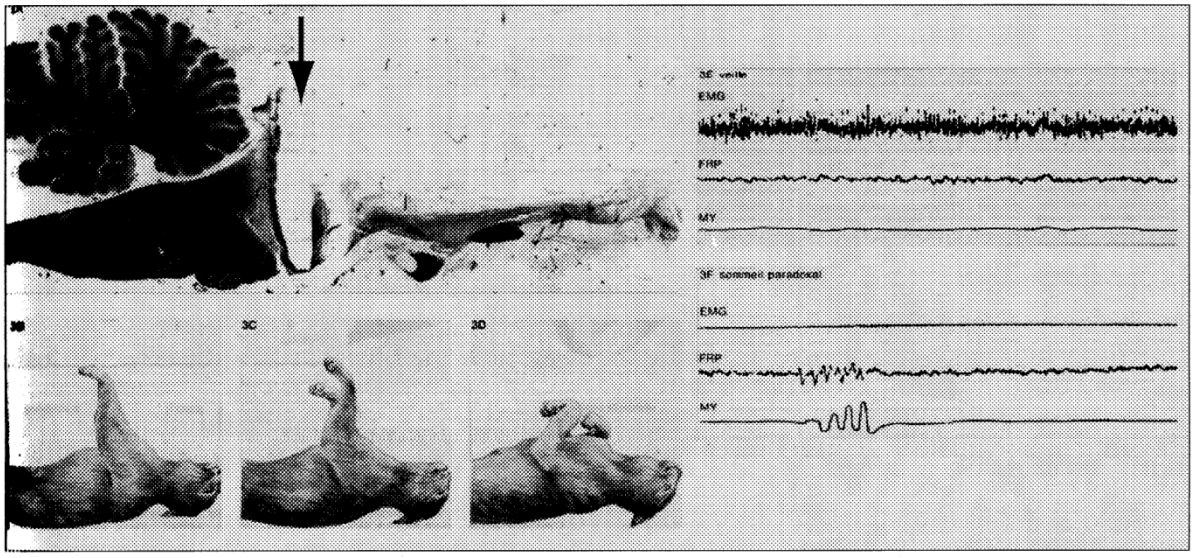


Figure II.13: Le modèle du chat pontique et la localisation ponto-bulbaire des structures génératrices du SP
Une section est réalisée au niveau intercolliculaire (flèche) et toutes les régions rostrales à celle-ci sont aspirées. L'animal présente alors un état d' « éveil », caractérisé par une importante activité musculaire (EMG, en haut) et la désynchronisation des ondes enregistrées dans la formation réticulée pontique (FRP, en haut), en alternance avec un état de « sommeil paradoxal » caractérisé par l'absence de tonus musculaire (EMG, en bas), et l'apparition simultanée d'ondes pontiques phasiques (FRP, en bas) corrélées aux mouvements des yeux (MY, en bas). D'après Jouvet, 1962.

donc jouer un rôle clef dans la genèse du SP. Chez le rat, on parle de noyau sublatérodorsal (SLD) pour cette même structure. Dans un souci de clarté, nous garderons par la suite la terminologie de SLD.

Une étape cruciale dans la compréhension des mécanismes du SP a été franchie lors de la découverte au sein du SLD de neurones de type SP-on, c'est-à-dire spécifiquement actifs durant le SP (Sakai *et al.*, 1979; Sakai and Koyama, 1996; Sakai *et al.*, 2001; Boissard *et al.*, 2002). Chez le chat, ces neurones SP-on du SLD ont pu être séparés en deux sous-populations. La première, localisée dans la partie rostro-dorsale du SLD, projette vers des structures rostrales comme le noyau intralaminaire du thalamus, le télencéphale basal, l'hypothalamus postérieur et est inhibé par l'application de carbachol. L'hypothèse que ces neurones étaient de nature cholinergique (de tels neurones exprimant des autorécepteurs inhibiteurs (el Mansari *et al.*, 1990)) et qu'ils seraient responsables de l'activation corticale a été émise. La deuxième sous-population consiste en des neurones excités par l'application de carbachol (donc supposés non cholinergiques) et projetant caudalement vers la formation réticulée ventromédiane, alors connue pour être responsable de l'atonie musculaire durant le SP.

Cette théorie de la genèse du SP, dite théorie cholinergique, était également appuyée par des résultats plus anciens montrant que l'injection périphérique d'un antagoniste cholinergique diminue les quantités de SP alors que l'injection d'un agoniste cholinergique les augmente (Jouvet and Michel, 1960). Des résultats de neuroanatomie fonctionnelle sont également venus en appui de cette théorie. En effet, chez le rat, une partie des neurones cholinergiques du LDT/PPT sont c-FOS+ après une hypersomnie de SP suivant une privation spécifique de cet état par la méthode de la piscine. De plus ce nombre est corrélé positivement aux quantités de SP faites durant l'hypersomnie (Maloney *et al.*, 1999). De même, l'induction de SP par injection de carbachol au sein du tegmentum pontique rostral induit une expression de c-FOS au sein des neurones cholinergiques du LDT/PPT (Yamuy *et al.*, 1993; Shiromani *et al.*, 1996).

La théorie cholinergique faisait donc jouer un rôle majeur aux neurones cholinergiques du LDT/PPT dans la genèse du SP. Cependant, depuis une dizaine d'année, cette théorie s'estompe progressivement au profit d'une théorie faisant la part belle au glutamate et au GABA.

II.3.2 – Les neurones SP-on du noyau sublatérodorsal et la genèse du SP

Contrairement à ce qui est observé chez le chat, l'application chez le rat de carbachol au sein du SLD induit, soit une augmentation modérée (Shiromani and Fishbein, 1986; Velazquez-Moctezuma *et al.*, 1989; Bourgin *et al.*, 1995), soit aucune modification des quantités de SP (Deurveilher *et al.*, 1997), voir même une augmentation des quantités d'éveil (Boissard *et al.*, 2002). De plus, contrairement à ce qu'avaient trouvé Maloney et al. (1999), Verret et al. ont montré que suite à une hypersomnie de SP suivant une privation sélective de cet état, seul quelques neurones cholinergiques expriment le marqueur c-FOS (Verret *et al.*, 2005). Ces données tendent donc à limiter le rôle de l'acétylcholine dans la genèse du SP. En accord avec cette supposition, les lésions du PPT et/ou du LDT chez le chat et chez le rat n'ont que peu ou pas d'effet sur le SP (Webster and Jones, 1988; Shouse and Siegel, 1992; Lu *et al.*, 2006b). En outre, les neurones SP-on localisés au sein du SLD ne montrent aucune variation de leur taux de décharge suite à l'application iontophorétique de carbachol (**Figure II.14**) (Boissard *et al.*, 2002). Toutefois, l'apparente non implication des neurones cholinergiques dans la genèse du SP est à prendre avec précaution. En effet, comme nous le verrons par la suite, les neurones SP-on du SLD sont soumis à une forte inhibition GABAergique durant l'éveil et le SL. Par conséquent il se pourrait que l'activation cholinergique ne soit alors pas suffisante pour permettre une activation de ces neurones. En soutien à cette remarque, il a été rapporté que chez le rat anesthésié ou décérébré et présentant probablement un tonus inhibiteur GABAergique moindre sur le SLD, l'application de carbachol permet d'induire un état de type SP-like (Taguchi *et al.*, 1992; Fenik *et al.*, 1999).

Par conséquent l'utilisation de l'optogénétique permettrait de fournir de précieuses informations quand au rôle des neurones cholinergiques du LDT/PPT dans la genèse et la régulation du SP.

Comme nous l'avons déjà évoqué ci-dessus, l'activation du SLD chez le chat par application d'agoniste glutamatergique provoque l'apparition du SP. De même, chez le rat, l'application de kaïnate au sein du SLD augmente le taux de décharge des neurones SP-on et induit de manière concomitante l'apparition d'un état de type SP-like (Boissard *et al.*, 2002). De manière concordante, l'inhibition du SLD provoque une baisse des quantités de SP ainsi qu'une augmentation de la latence d'apparition du SP (Xi *et al.*, 2001a).

Comme nous l'avons également mentionné, les neurones SP-on du SLD sont supposés être responsables de l'activation corticale et de l'atonie musculaire. En effet, il a été montré chez le chat que les neurones SP-on du SLD localisés dans sa partie rostrale sont activés antidromiquement par la stimulation des noyaux intralaminaires du thalamus ou de l'hypothalamus postérieur (el Mansari *et al.*, 1989). De plus, l'injection de traceurs antérograde au sein du SLD du rat a montré que celui-ci projette bien sur ces noyaux connus pour jouer un rôle dans l'activation corticale (Boissard *et al.*, 2002). Toutefois, des données récemment obtenues au sein du laboratoire fragilisent cette hypothèse. En effet, suite à l'injection de CTb dans le noyau intralaminaire du thalamus, de nombreux neurones sont rétrogradement marqués dans le SLD, confirmant ainsi l'existence de projections, mais ces neurones n'expriment pas le marqueur c-FOS après une hypersomnie de SP (Valencia-Garcia, communication personnelle). Une étude plus poussée de la nature neurochimique et du comportement électrophysiologique de ces neurones est donc nécessaire.

En ce qui concerne les neurones SP-on localisés dans la partie caudale du SLD, ceux-ci sont activés antidromiquement par la stimulation de la formation réticulée bulbaire qui contient, comme nous le verrons par la suite (**voir partie II.3.3**), les prémotoneurones responsables de l'atonie au cours du SP (Sakai *et al.*, 1981). Ces données, confirmées chez le rat par l'utilisation de traceurs antérogrades (Boissard *et al.*, 2002), sont en faveur d'un rôle du SLD dans la mise en place de l'atonie caractéristique du SP. De nombreuses données confirment cette hypothèse. Tout d'abord, la lésion chez le chat de la partie caudale du SLD supprime l'atonie musculaire lors du SP (Sastre and Jouvet, 1979; Sastre *et al.*, 1979). De plus, l'activation continue du SLD chez le rat par application d'antagoniste GABAergique provoque une atonie musculaire prolongée ainsi que l'apparition de nombreux neurones c-FOS+ au sein du SLD (Boissard *et al.*, 2002) suggérant ainsi un rôle de ce noyau dans la suppression du tonus musculaire.

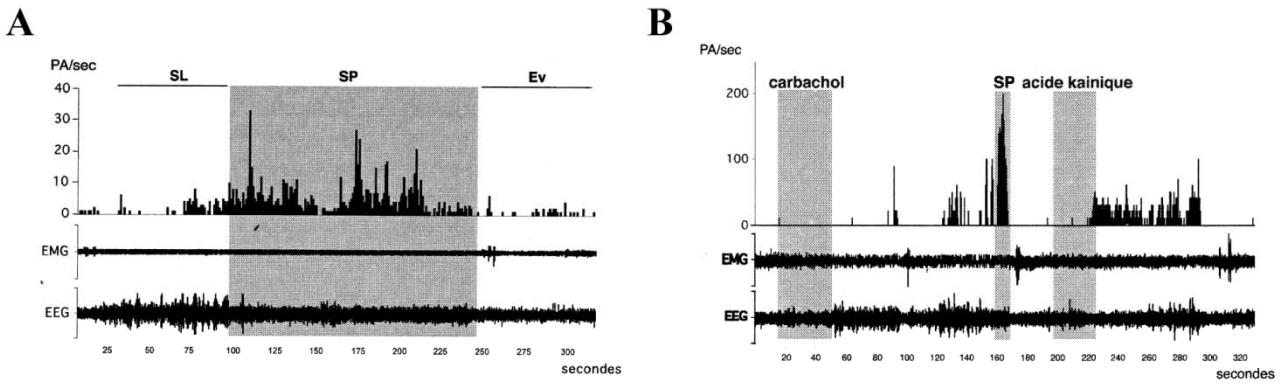


Figure II.14: Les neurones SP-on du noyau sublatérodorsal (SLD) chez le rat
(A) Activité unitaire au cours des états de vigilance d'un neurone de type SP-on enregistré au sein du SLD chez le rat en contention stéréotaxique.
(B) Caractérisation pharmacologique de ces neurones SP-on. L'application de carbachol n'induit aucune modification de la fréquence de décharge de ces neurones alors qu'elle est augmentée durant les épisodes de SP ou par l'application d'acide kaïnique. D'après Boissard, 2002.

Si l'implication du SLD dans la genèse du SP fait consensus, la nature neurochimique de ces neurones est encore incertaine. En effet, il a été montré que les neurones du SLD projetant à la formation réticulée bulbaire ventrale ne sont ni cholinergiques, ni aminergiques (Luppi *et al.*, 1988). Des résultats récents montrent également un nombre très réduit de neurones GABAergiques activés dans le SLD après hypersomnie de SP. De plus, ce nombre ne varie pas en fonction des différentes conditions expérimentales (contrôle, privation sélective de SP, hypersomnie de SP) suggérant ainsi que les neurones SP-on du SLD ne sont pas de nature GABAergique (Sapin *et al.*, 2009). L'hypothèse avancée depuis longtemps est qu'ils seraient de nature glutamatergique (Luppi *et al.*, 1988; Luppi *et al.*, 2006; Fort *et al.*, 2009; Saper *et al.*, 2010; Luppi *et al.*, 2011).En effet, de nombreuses données vont dans ce sens. Tout d'abord le SLD contient des neurones exprimant le transporteur vésiculaire du glutamate n°2 (vGLUT2) (Lu *et al.*, 2006b), marqueur spécifique de neurones glutamatergiques (Herzog *et al.*, 2001). Kodama et al. ont également montré que la concentration extracellulaire en glutamate au sein du noyau réticulé magnocellulaire (Mc) responsable de l'atonie musculaire et recevant des projections du SLD (**voir partie II.3.3**) augmente durant le SP (Kodama *et al.*, 1998). De plus, l'application locale d'agonistes glutamatergiques au sein du Mc provoque une atonie musculaire de manière dose-dépendante. Enfin, le blocage de la transmission glutamatergique au sein du Mc par l'application d'antagonistes NMDA ou kaïnique inhibe la mise en place de l'atonie musculaire normalement induite par l'injection de carbachol au niveau du péri-LCα (Lai and Siegel, 1988).

L'ensemble de ces données suggère donc que la genèse du SP serait due à l'activation d'un petit groupe de neurones supposés glutamatergiques et localisés au sein du péri-LCα chez le chat, encore nommé SLD chez le rat. Ces neurones seraient responsables : (i) de l'activation corticale via des projections ascendantes sur le thalamus, (ii) de l'atonie musculaire via des projections descendantes sur la formation réticulée bulbaire ventrale. Chez le chat, il existerait deux sous-populations réparties de manière rostrocaudale. Chez le rat, une telle organisation spatiale n'a pas encore été clairement établie. Notons toutefois que récemment, le groupe de Saper a émis l'hypothèse d'une ségrégation de ces deux populations chez le rat : l'activation corticale serait alors due à des neurones glutamatergiques localisés au sein du noyau précoeruleus et du noyau parabrachial (Lu *et al.*, 2006b; Saper *et al.*, 2010). Ces dernières données doivent cependant être prises avec précautions étant donné qu'elles n'ont pas encore été reproduites.

II.3.3 – Les noyaux gigantocellulaires bulbaires : relais du SLD dans le contrôle de l'atonie musculaire

De manière certaine, l'atonie musculaire caractéristique du SP est le résultat d'un phénomène actif. En effet, l'enregistrement intracellulaire de motoneurone spinaux a démontré que ceux-ci sont hyperpolarisés durant le SP (Chase and Morales, 1990). De plus, comme illustré en **Figure II.15A-B**, cette hyperpolarisation est médiée par la glycine que ce soit au niveau de la moelle épinière, de l'hypoglosse ou du noyau trigeminal (Chase *et al.*, 1989; Soja *et al.*, 1991; Kohlmeier *et al.*, 1996; Yamuy *et al.*, 1999). En accord avec cette inhibition, l'analyse par microdialyse des concentrations extracellulaires en GABA et glycine a montré qu'elles augmentent dans la moelle épinière et dans le noyau de l'hypoglosse durant l'atonie induite par l'application d'acétylcholine dans le SLD du chat (Kodama *et al.*, 2003) mais également durant le SP physiologique (Taepavarapruk *et al.*, 2008). De manière contradictoire, une étude récente à montré que l'application simultanée par microdialyse de bicuculline et de strychnine (antagonistes respectifs des récepteurs GABAa et glycinergique) au sein du noyau trigeminal n'a aucune influence sur l'atonie musculaire (Brooks and Peever, 2008). Cependant ces mêmes auteurs ont depuis rapporté que l'ajout supplémentaire d'un antagoniste GABAb provoquait le retour du tonus musculaire au cours des épisodes de SP (Brooks and Peever, 2009). Enfin, il a été rapporté tout récemment qu'une souris transgénique dont les transmissions GABAergiques et glycinergiques sont altérées présentent tous les symptômes des RBD, notamment la présence de mouvements durant le SP (Brooks and Peever, 2011). L'ensemble de ces données

suggère donc que l'inhibition des motoneurones durant le SP serait médiée majoritairement par la glycine mais également par le GABA. Mais quelles sont les structures responsables de cette inhibition

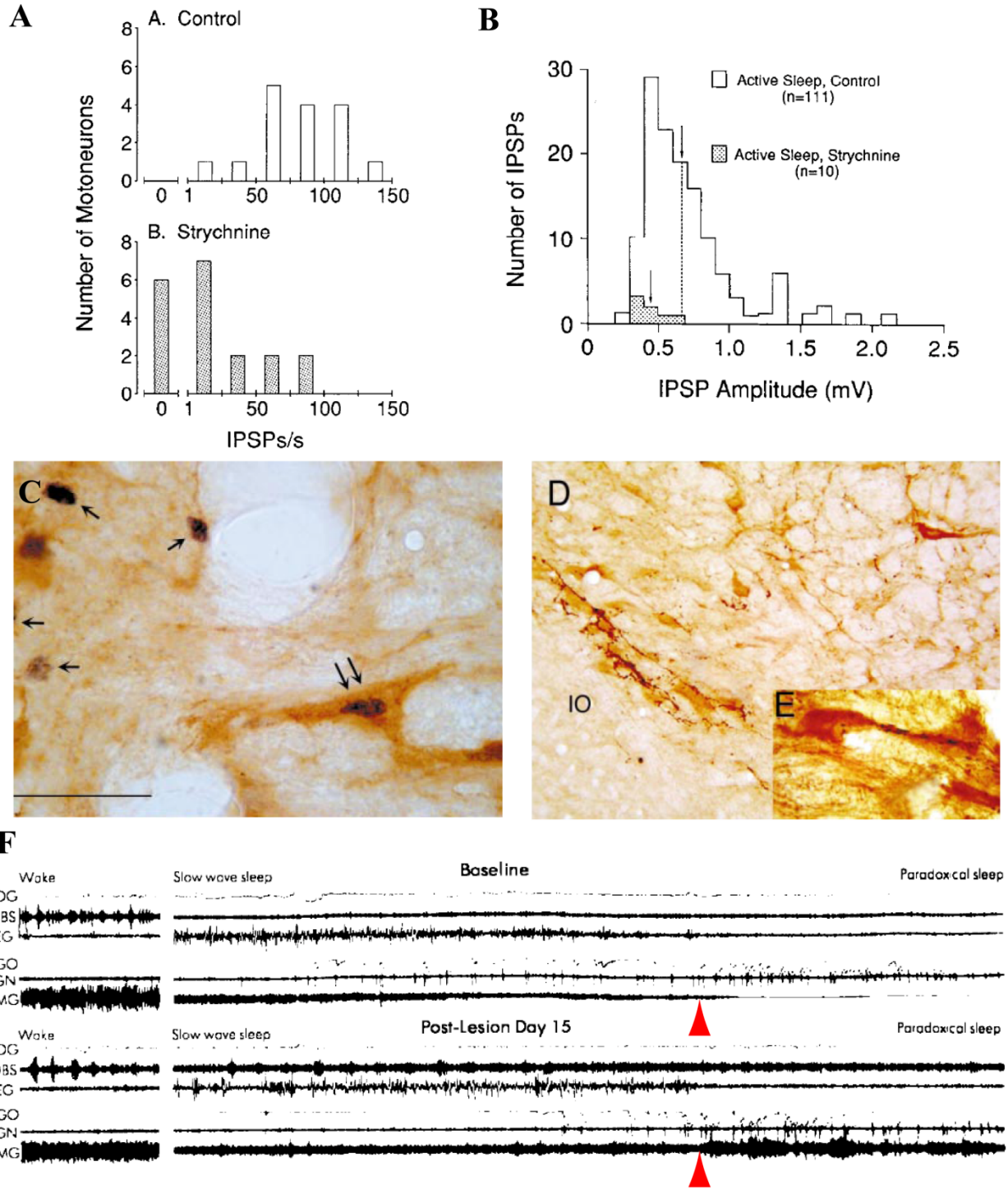


Figure II.15: Les neurones glycinergiques du GiV génèrent l'atonie musculaire du SP

(A) Répartition des motoneurones en fonction de la fréquence des PPSI (IPSPs/s) enregistrée durant le SP en condition normale ou en présence de strychnine, antagoniste glycinergique.

(B) Amplitude des PPSI enregistrés dans ces deux mêmes conditions pour un même neurone. Les flèches indiquent la valeur médiane pour chaque condition et révèlent qu'en condition normale, 50 % des PPSI ont une amplitude plus forte que l'amplitude maximale observée sous strychnine. D'après Chase et al., 1989.

(C-E) Le GiV contient de nombreux neurones glycinergiques (marron) activés après hypersomnie de SP (c-FOS en noir) (**C**). De plus des fibres marquées à la PHAL (traceur antérograde, en noir) en provenance du SLD projettent sur ces neurones glycinergiques du GiV (en marron) (**D, E**). D'après Boissard et al., 2002.

(F) La lésion du GiV entraine la disparition de l'atonie musculaire normalement observée durant le SP (flèches rouges). D'après Holmes and Jones, 1994.

GABA/glycinergique?

Si le SLD contient de nombreux neurones SP-on, ce n'est pas la seule région ponto-bulbaire où ce type de neurone est retrouvé. En effet, la présence de tels neurones au sein du noyau réticulé magnocellulaire (Mc) a pu être mise en évidence (Sakai *et al.*, 1979; Siegel *et al.*, 1979). Sakai et al. ont également pu déterminer que ces neurones SP-on sont activés antidromiquement lors de la stimulation de la voie réticulo-spinale, démontrant ainsi qu'ils projettent directement sur la moelle épinière (Sakai *et al.*, 1979; Kanamori *et al.*, 1980). Le Mc contient également de nombreux neurones glycinergiques projetant sur les motoneurones de la moelle épinière et du noyau trigeminal (Fort *et al.*, 1989; Fort *et al.*, 1993; Rampon *et al.*, 1996) et une étude en microscopie électronique a consolidé ces résultats en montrant que les neurones glycinergiques du Mc projettent de manière monosynaptique sur les motoneurones spinaux (Holstege and Bongers, 1991). Il a également été rapporté que les neurones du Mc projetant sur noyau moteur trigeminal sont c-FOS+ lors de l'atonie musculaire provoquée par la stimulation cholinergique du SLD (Morales *et al.*, 1999). De manière analogue, chez le rat dont nous utiliserons désormais la terminologie dans un souci de clarté, les noyaux gigantocellulaires ventraux (GiV) et alpha (GiA), qui correspondent au Mc du chat, contiennent de nombreux neurones glycinergiques c-FOS+ après induction du SP par application de bicuculline dans le SLD (**Figure II.15C**) (Boissard *et al.*, 2002). Il est fort probable que ces neurones du GiV/GiA contiennent également le GABA comme neurotransmetteur puisque Sapin et al. ont montré que dans ces structures, la grande majorité des neurones c-FOS+ après hypersomnie de SP expriment l'ARNm de la gad67 et sont donc de nature GABAergique (Sapin *et al.*, 2009).

L'ensemble de ces données suggèrent donc que ce sont ces neurones glycinergiques du GiV/GiA qui sont responsables de l'inhibition des motoneurones durant le SP. En effet, de nombreuses données anatomiques et physiologiques laissent penser que le GiV/GIA est bien le relais du SLD dans la genèse de l'atonie musculaire.

Tout d'abord, comme illustré en **Figure II.15D-E,** le SLD projette sur ces neurones glycinergiques (Luppi *et al.*, 1988; Boissard *et al.*, 2002). De plus, les neurones du SLD projetant sur le GiV/GiA sont de nature SP-on (Sakai *et al.*, 1981) et sont donc supposés glutamatergiques (**voir partie II.3.2**). En effet, la libération de glutamate augmente dans le GiV/GiA durant le SP (Kodama *et al.*, 1998) où l'application d'un agoniste glutamatergique provoque une inhibition du tonus musculaire (Lai and Siegel, 1991). A l'inverse, la lésion de cette zone induit le retour du tonus musculaire durant le SP (**Figure II.15F**) (Holmes and Jones, 1994).

Si cette implication des neurones glycinergiques du GiV/GiA dans l'atonie du SP fait relativement consensus, des travaux récents du groupe de Saper supposeraient une modification de la théorie existante. En effet, son groupe a montré que certains neurones du SLD projettent directement sur la moelle épinière sans passer par le GiV/GiA dont la lésion n'a aucune incidence sur la survenue de l'atonie durant le SP (Lu *et al.*, 2006b; Vetrivelan *et al.*, 2009). Or, la lésion du GiV/GiA semblait être localisée trop rostrale (Luppi *et al.*, 2011), épargnant de fait les neurones SP-on du GiV/GiA et aucun résultat n'indique que les neurones projetant directement à la moelle épinière soient de type SP-on. Plus encore, il a été montré chez le chat par des stimulations antidromiques que les neurones du SLD projetant directement à la moelle épinière ont un type de décharge non corrélé au SP (Sakai *et al.*, 1981).

L'ensemble des données disponibles de la littérature ont donc conduit à l'élaboration de la théorie globalement consensuelle selon laquelle les neurones glycinergiques et GABAergiques du GiV/GiA, sous le contrôle du SLD, seraient responsables de l'inhibition des motoneurones durant le SP. Il est intéressant de noter qu'ils pourraient également intervenir dans l'inhibition des entrées sensorielles, qui sont réduites durant le SP (Soja *et al.*, 2001), via des projections sur la corne dorsale de la moelle épinière (Kato *et al.*, 2006).

Comme nous venons de la voir, les évènements en aval du SLD sont relativement bien connus et peu soumis à controverse. A l'inverse, ceux en amont du SLD permettant sont activation et donc l'apparition du SP sont, comme nous allons le voir, moins bien décrits et par conséquent d'avantage soumis à discussion.

II.3.4 – Les structures SP-off dites permissives et le contrôle GABAergique du SLD

Les premières hypothèses permettant d'expliquer l'activation du SLD se basaient sur deux grands arguments. Le premier, d'ordre électrophysiologique, se rapportait aux modes de décharges des différentes populations impliquées dans la régulation des états de vigilance. Les neurones SP-on du SLD s'opposent en effet aux neurones noradrénergiques, sérotoninergiques, histaminergiques et hypocrétinergiques qui montrent une activité de type SP-off (**voir partie II.1**). Le second, d'ordre pharmacologique, montrait que l'application de substances potentialisant la transmission noradrénergique ou sérotoninergique supprime le SP (Jones, 1991; Gervasoni *et al.*, 2002). En outre l'application de noradrénaline au sein du SLD inhibe le SP et l'activité des neurones SP-on non cholinergiques (Tononi *et al.*, 1991; Sakai and Koyama, 1996). L'ensemble de ces données ont conduit à l'hypothèse de l'inhibition réciproque entre les neurones SP-on du SLD et ceux SP-off des structures d'éveil (McCarley and Hobson, 1975). Mais cette théorie s'est tout d'abord heurtée au fait que les neurones des structures d'éveil sont d'avantage de type éveil-on que de type SP-off. Leur fréquence de décharge durant le SL est en effet relativement faible (**voir partie II.1**) laissant planer un doute sur leur capacité à inhiber le SLD durant le SL. De plus une étude récente du laboratoire montre que les neurones noradrénergiques, et en particulier ceux du LC, ont peu de chance d'être responsables de l'inhibition du SLD. En effet, après une privation spécifique de SP par la méthode de la piscine, les neurones noradrénergiques du LC ne sont pas c-FOS+ (Leger *et al.*, 2009). En outre, il ne semble pas que le LC soit une afférence majeure du le SLD (Boissard *et al.*, 2003). Signalons tout de même que dans

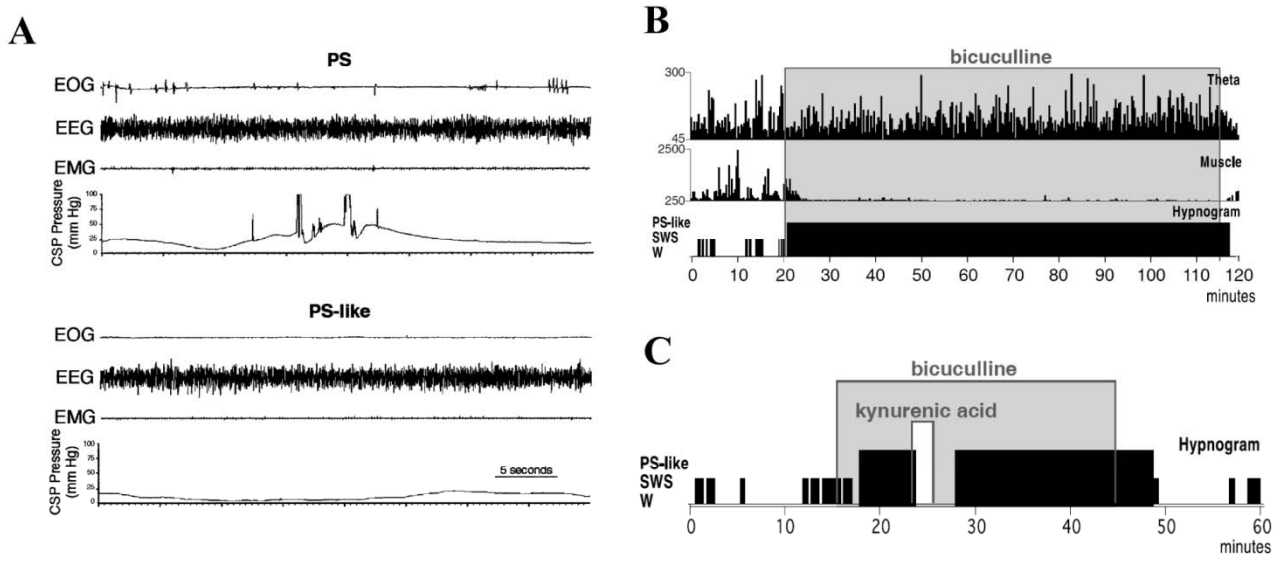


Figure II.16: La mise en place du SP nécessite la levée de l'inhibition GABAergique du SLD
(A) Caractérisation de l'état de type SP (PS-like) induit par l'application de bicuculine (antagoniste GABA) au sein du SLD chez le rat en contention stéréotaxique. La pression sanguine dans les corps spongieux est représentée (CSP Pressure) en plus de l'EEG, de l'EMG et de l'EOG.
(B) L'application de bicuculline au sein du SLD provoque l'apparition d'un état de type SP qui perdure tant que l'application de bicuculline est maintenue. L'activité thêta de l'EEG, l'activité musculaire ainsi que l'hypnogramme correspondant sont représentés.
(C) Cet état particulier peut être réversé par l'application concomitante d'acide kynurenique, (antagoniste glutamatergique).
D'après Boissard et al., 2002.

cette étude, un nombre non négligeable de neurones TH des aires A1/C1 et A2/C2 sont actifs durant la privation de SP. Ces neurones noradrénergiques pourraient alors participer à l'inhibition du SP observée durant ce protocole. Toutefois, si l'inhibition monoaminergique n'est donc pas à exclure totalement, depuis maintenant une décennie, de nombreux arguments se sont accumulés quand à l'importance de mécanismes GABAergiques dans l'inhibition du SLD. Ce sont ces arguments que nous allons maintenant développer.

Au début des années 2000, Xi et al. ont réalisé des injections par pression de GABA et de bicuculline (antagoniste GABAergique) au sien du SLD chez le chat. Ils ont alors observé l'apparition quasi-immédiate d'une longue phase de SP, alors que l'application de GABA durant le SP ou le SL induisait l'apparition d'éveil (Xi *et al.*, 1999; 2001b). De plus, cette même étude montre que l'application de strychnine, antagoniste glycinergique, dans le SLD n'a aucun effet sur les états de vigilance. Chez le rat, il a été confirmé que l'application par iontophorèse de bicuculline ou de gabazine (un autre antagoniste $GABA_A$) dans le SLD de rats en contention stéréotaxique provoque l'apparition rapide d'un état de type SP caractérisé par une augmentation de la puissance des ondes thêta et l'absence de tonus musculaire (**Figure II.16A**). De plus comme illustré en **Figure II.16B**, cet état perdure tant que l'application de bicuculline se poursuit et est suivi de l'expression de c-FOS dans de nombreux neurones du SLD (Boissard *et al.*, 2002). Ces résultats, reproduits par la suite chez le rat libre de se mouvoir (Pollock and Mistlberger, 2003; Sanford *et al.*, 2003) suggèrent que le SLD est toniquement inhibé par un mécanisme GABAergique durant l'éveil et le SL permettant ainsi une inhibition du SP.
A cet effet, il a également été montré que les neurones SP-on du SLD sont excités lors de l'application iontophorétique de bicuculline (Boissard *et al.*, 2000). En outre, l'état de type SP induit par l'application de bicuculline au sein du SLD est réversé par l'application simultanée d'un antagoniste glutamatergique (**Figure II.16C**) suggérant ainsi que le SLD est également soumis en permanence à un tonus excitateur (Boissard *et al.*, 2002). L'ensemble de ces données suggère donc que l'activation du SLD nécessaire à la survenue du SP nécessite la levée de l'inhibition GABAergique qui le contrôle.

La localisation des neurones GABAergiques responsables de l'inhibition du SLD a été l'étape suivante dans la compréhension des mécanismes régulant le SP.

Dans cette optique, Boissard et al. ont analysé les afférences GABAergiques au SLD, identifiées par une injection de CTb au sein du SLD et la présence de la GAD, enzyme de synthèse du GABA. Ils ont ainsi pu en déduire que les afférences GABAergiques majeures au SLD pouvant être responsables de son inhibition étaient la substance réticulée pontique (incluant le SLD) ainsi que la région à la limite entre la substance grise périaqueducale ventro-latérale (VLPAG) et le noyau réticulé mésencéphalique profond (DpMe) (**Figure II.17A**) (Boissard *et al.*, 2003). La partie dorsale du DpMe contenant ces neurones a par la suite été nommée dDpMe. Ces données ont ensuite été confirmée par Lu et al. (Lu *et al.*, 2006b). Le fait que des neurones GABAergiques locaux puissent participer à l'inhibition du SLD a été mis en avant dès 1999 par l'injection dans le SLD d'oligonucléotides permettant l'arrêt de l'expression du gène de la GAD et induisant une augmentation des quantités de SP (Xi *et al.*, 1999). Toutefois, l'implication de tels neurones est aujourd'hui soumise à discussion. En effet, Sapin et al. ont bien montré la présence dans le SLD de neurones GABAergiques c-FOS+ après une privation de SP, mais cette présence est assez limitée et ne varie pas en fonction des groupes comportementaux (contrôle, privation et hypersomnie de SP) (Sapin *et al.*, 2009). Au contraire, comme illustré en **Figure II.17B**, leur étude montre que la seule structure pontomésencéphalique contenant un nombre important de neurones GABAergiques activés lors d'une privation de SP est en fait la VLPAG/dDpMe. De plus, l'inhibition de cette structure par injection de muscimol induit chez le rat comme chez le chat une hypersomnie de SP (**Figure II.17C**) (Sastre *et al.*, 1996; Boissard *et al.*, 2000; Crochet *et al.*, 2006; Sapin *et al.*, 2009). De même sa lésion entraine une augmentation de près de 90 % des quantités de SP (Lu *et al.*, 2006b).

L'ensemble des données exposées ci-dessus montrent que pendant l'éveil et le SL, le SLD est maintenu inactif par une inhibition tonique GABAergique vraisemblablement en provenance de la VLPAG et du dDpMe. La mise en place du SP résulterait alors de l'arrêt de ces structures GABAergiques permettant ainsi une levée de l'inhibition du SLD et donc son activation. La VLPAG/d représente donc une structure dite permissive puisque sont arrêt est indispensable à la mise en place du SP.

Il est intéressant de noter que le SP induit suite à l'application de muscimol dans la VLPAG/dDpMe

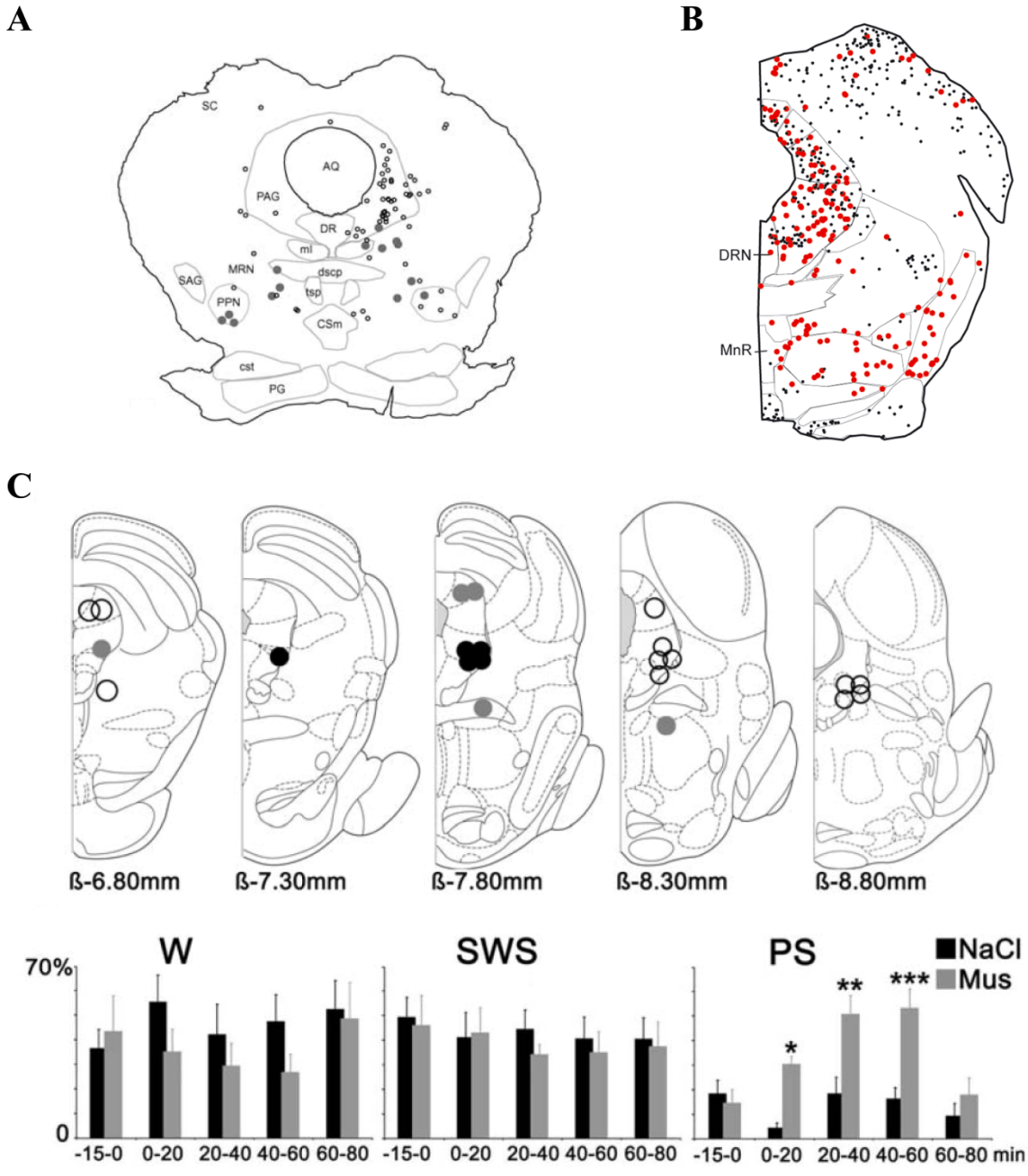


Figure II.17: L'inhibition GABAergique du SLD provient de la vlPAG/DpMe

(A) Localisation des neurones CTb+ (après injection de CTb dans le SLD, petits cercles noirs) et des neurones doublement marqués CTb/GAD+ (enzyme de synthèse du GABA, gros points gris). D'après Boissard et al., 2003.

(B) Localisation des neurones c-FOS+ (points noirs) et des neurones doublement marqués c-FOS/*gad67*+ (points rouges) après hypersomnie de SP. D'après Sapin et al., 2009.

(C) L'application de muscimol au niveau de la VLPAG/DpMe (points noirs au niveau des cartographies) induit une augmentation des quantités de SP (bandeau du bas). D'après Sapin et al., 2009.

possède toutes les caractéristiques du SP (atonie, rythme thêta, mouvements oculaires) (Boissard, 2002) alors que celui induit par l'application de bicuculline au sein du SLD ne produit qu'un état de type SP avec notamment une absence de mouvements oculaires (Boissard *et al.*, 2002). Cette observation suppose donc que la VLPAG/dDpMe inhiberait la totalité des structures impliquées dans la genèse du SP qui ne se limiteraient donc pas au seul SLD. Le contrôle de ces neurones GABAergiques représente donc un mécanisme clef dans la régulation du SP.

II.3.5 – L'inactivation GABAergique des structures monoaminergiques

Comme nous l'avons déjà évoqué, l'ensemble des neurones monoaminergiques présentent un patron de décharge de type SP-off (**voir partie II.1**) et l'application de monoamines ou de leurs agonistes dans le SLD ou de manière systémique (**voir partie II.3.4**) supprime le SP. La mise en place du SP nécessite donc l'inhibition de ces neurones.

Selon la théorie monoaminergique/cholinergique, l'inhibition des neurones monoaminergiques étaient due à l'activation des neurones SP-on cholinergiques du SLD (McCarley and Hobson, 1975). Or, le SLD ne projette quasiment pas notamment pas sur le LC (Luppi *et al.*, 1995; Verret *et al.*, 2006), et l'acétylcholine excite les neurones noradrénergiques du LC et n'inhibe que faiblement les neurones sérotoninergiques du DR (Guyenet and Aghajanian, 1979; Koyama and Kayama, 1993). De plus, l'application par iontophorèse durant l'éveil, le SL ou le SP de bicuculline ou de strychnine (antagonistes GABAergique et glycinergique) sur des neurones sérotoninergiques du DR ou noradrénergiques du LC provoque une augmentation de leur taux de décharge (**Figure II.18A**) (Darracq *et al.*, 1996; Gervasoni *et al.*, 1998; Gervasoni *et al.*, 2000).

Ces résultats suggèrent que les neurones du DR et du LC reçoivent un tonus GABAergique et/ou glycinergique important durant tous les trois états de vigilance. Cette hypothèse est étayée par des études de microdialyse qui ont révélé que les concentrations extracellulaires en GABA, mais pas en glycine, augmentent dans le LC et le DR durant le SP par rapport au SL et de manière plus importante encore par rapport à l'éveil (Nitz and Siegel, 1997a; Nitz and Siegel, 1997b). L'inhibition GABAergique des neurones monoaminergiques est donc minimale durant l'éveil, augmente durant le SL, provoquant ainsi une baisse de leur activité, et augmente encore durant les épisodes de SP conduisant à l'arrêt total de ces neurones. Si leur inhibition durant le SL provient vraisemblablement du VLPO (**voir partie II.2**), leur origine durant le SP semble différente.

En effet, il a été avancé que les neurones GABAergiques de l'extended-VLPO (région s'étendant dorsalement au VLPO) pourraient être responsables de cette inhibition durant le SP (Lu *et al.*, 2002). Mais une étude du laboratoire contredit cette hypothèse. En effet, Verret et al. ont montré que l'extended-VLPO contient bien des neurones projetant sur le LC (car immunoréactifs à la CTb après son injection dans le LC) mais que ces derniers ne sont pas c-FOS+ lors d'une hypersomnie de SP (Verret *et al.*, 2006). De plus, l'étude des neurones sérotoninergiques chez le chat pontique ou décérébré montre que l'inhibition de ces neurones perdure durant le SP suggérant ainsi que les structures responsables de cette inhibition sont localisées au niveau pontobulbaire (Jouvet, 1972; Woch *et al.*, 1996).

En accord avec ces observations et comme illustré en **Figure II.18B**, Verret et al. ont observé que contrairement à l'extended-VLPO, les noyaux paragigantocellulaires dorsaux (DPGi) et latéraux (LPGi), ainsi que la VLPAG, contiennent l'essentiel des neurones projetant au LC et actifs lors d'une hypersomnie de SP (Verret *et al.*, 2006).De plus, l'étude des afférence au LC ainsi qu'au DR a mise en évidence que DPGi et VLPAG sont deux afférences GABAergiques pontobulbaires communes à ces deux systèmes (Luppi *et al.*, 1998; Gervasoni *et al.*, 2000). Enfin, plus récemment, Sapin et al. ont montré que 86 %, 70 % et 52 % des

neurones activés lors d'une hypersomnie de SP et localisés respectivement dans le DPGi, le LPGi et la VLPAG sont de nature GABAergique (Sapin *et al.*, 2009). L'ensemble de ces données semble donc montrer que l'inhibition des neurones monoaminergiques au cours du SP proviendrait de neurones GABAergiques localisés au sein du DPGi, du LPGi et de la VLPAG.

Cette hypothèse est confirmée par le fait que la stimulation électrique du DPGi augmente les quantités de SP chez le rat via ses projections sur le LC (Kaur *et al.*, 2001), et que l'application locale de bicuculline dans le LC empêche son inhibition normalement induite par la stimulation du DPGi (Ennis and Aston-Jones, 1989). En outre, le fait que le DPGi contienne des neurones de type SP-on dont l'augmentation de l'activité anticipe

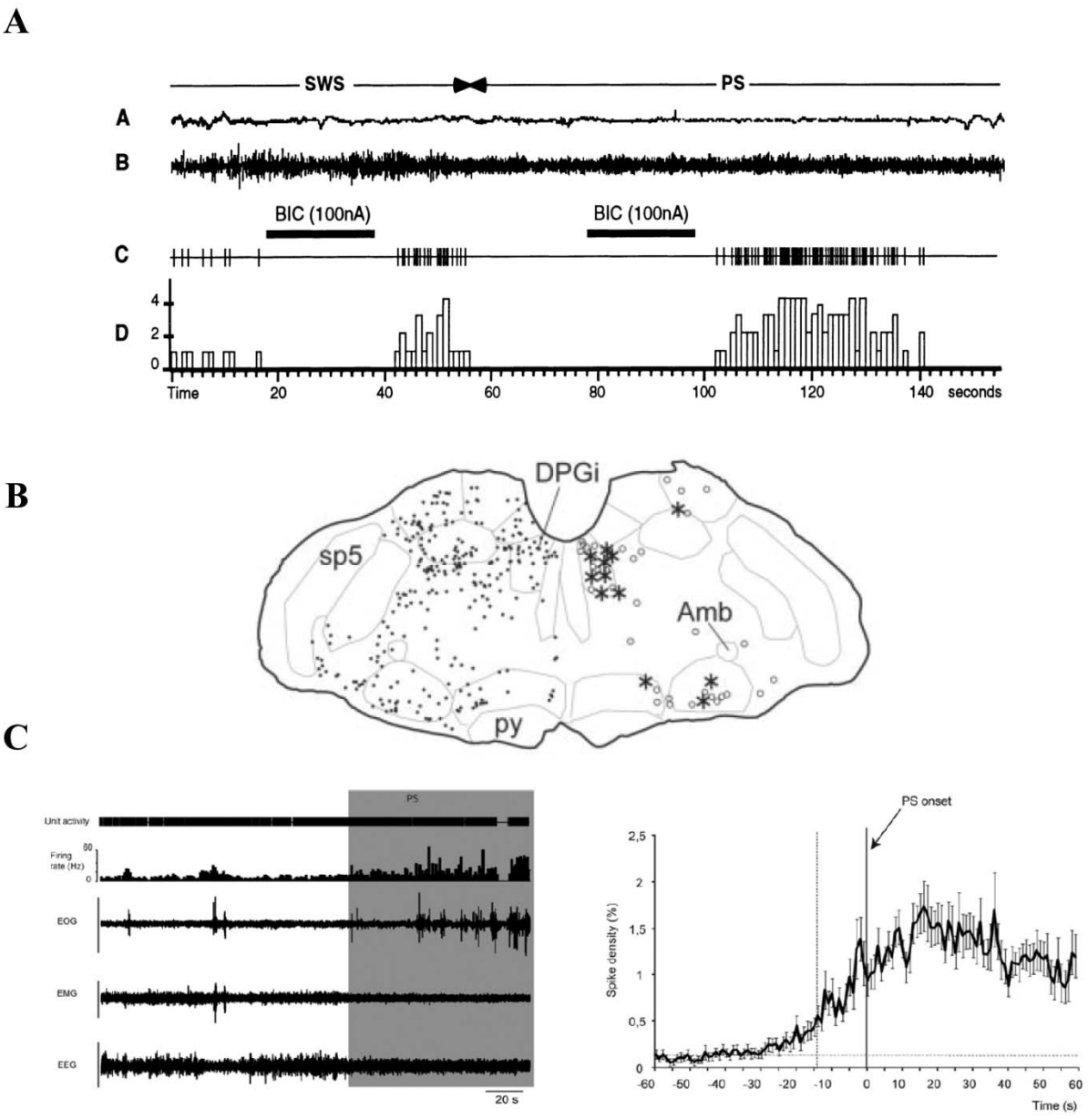


Figure II.18: Durant le SP, les neurones monoaminergiques sont inhibés par des neurones SP-on GABAergiques du DPGi

(A) L'application de bicuculine (BIC) au sein du locus coeruleus durant le SL (SWS) ou le SP (PS) induit une augmentation du taux de décharge des neurones noradrénergiques. D'après Gervasoni et al., 1998.

(B) Le DPGi est la structure contenant le plus de neurones projetant sur le LC et activés durant une hypersomnie de SP. Les points noirs correspondent aux neurones c-FOS+, les cercles noirs au neurones CTb+ et les étoiles aux neurones c-FOS/CTb+. L'injection de CTb a été réalisée au sein du LC. D'après Verret et al., 2006

(C) Le DPGi contient de nombreux neurones de type SP-on (à gauche). De plus, l'augmentation du taux de décharge de ces neurones précède d'environ 15 sec l'apparition du SP (à droite). D'après Goutagny et al., 2008

largement la survenue et la disparition du SP (respectivement de 15 et 10 secondes) conforte de manière importante cette hypothèse (**Figure II.18C**) (Goutagny *et al.*, 2008). L'implication de la VLPAG est également soutenue par les résultats de Liu et al. montrant que la stimulation sur des tranches d'encéphale de la VLPAG induit l'inhibition des neurones sérotoninergiques du DR via un mécanisme GABAergique (Liu *et al.*, 2000).

Il apparaît donc que les neurones monoaminergiques, promoteurs d'éveil et de type SP-off, sont toniquement inhibés durant le SP par des mécanismes GABAergiques. Les données existantes laissent supposer que, particulièrement en ce qui concerne le LC, cette inhibition serait due à des neurones GABAergiques localisés au sein du DPGi, du LPGi et de la VLPAG. Le rôle de ces structures dans l'inhibition des autres aires monoaminergiques a été évoquée (Luppi *et al.*, 2004; Luppi *et al.*, 2006; Fort *et al.*, 2009) mais reste encore à être démontré formellement.

II.3.6 – Le rôle de l'hypothalamus postérieur dans la régulation du SP

L'implication de l'hypothalamus dans la régulation du SP n'a été suggérée que tardivement, et ce probablement parce qu'il avait été montré que le SP perdure chez le chat pontique, démontrant ainsi que les structures nécessaires à sa genèse sont localisées au niveau pontobulbaire (**voir partie II.3.1**). A la fin des années 1980, les premières études montrant un lien entre hypothalamus et SP sont venues du laboratoire de Jouvet. En réalisant des privations de SP chez le chat pontique, il a ainsi été démontré que les mécanismes homéostatiques du SP sont absents chez le chat pontique puisque celui-ci ne présente aucune hypersomnie de SP consécutive à une telle privation. De plus, si un isolat d'hypothalamus est laissé intact chez un chat pontique, celui-ci peut survivre plusieurs semaines et montre des quantités journalières normales de SP (Jouvet, 1988). Ces données suggèrent donc un rôle de l'hypothalamus dans la régulation homéostatique du SP.

En soutien à cette hypothèse, l'hypothalamus postérieur, et en particulier l'aire latérale de l'hypothalamus (LH), la zona incerta (ZI) et l'aire périfornicale (PeF), présentent de nombreux neurones c-FOS+ suite à une hypersomnie de SP (Verret *et al.*, 2006). Ces résultats suggèrent que ces structures comportent des neurones spécifiquement actifs durant le SP et donc potentiellement impliqués dans sa régulation. En effet, plusieurs groupes ont ainsi montré que l'hypothalamus postérieur contient de nombreux neurones de type SP-on (Steininger *et al.*, 1999; Alam *et al.*, 2002) (Koyama *et al.*, 2003; Goutagny *et al.*, 2005; Hassani *et al.*, 2009). De plus, l'application de muscimol (agoniste GABAergique) au sein de la LH chez le chat induit une disparition de SP (Lin *et al.*, 1989). Toutefois, cet effet disparaît chez un chat auquel une section de l'encéphale a été réalisée immédiatement rostralement au LDT, montrant ainsi que la LH régule le SP via des projections sur les structures pontobulbaires génératrices du SP (Sakai *et al.*, 1990).

S'il apparaissait que la LH intervient dans la régulation et l'homéostasie du SP, la nature précise des neurones impliqués restait encore à déterminer étant donné que l'hypothalamus est une structure extrêmement hétérogène comportant de nombreux types cellulaires. Une partie de la réponse est venue d'une étude du laboratoire montrant que les neurones à MCH (hormone de mélanoconcentration), petite population (environ 12000 neurones chez le rat) localisée au sein de l'hypothalamus postérieur, sont spécifiquement activés lors d'une hypersomnie de SP (Modirrousta *et al.*, 2005). En effet, dans cette condition expérimentale et comme illustré en **Figure II.19A**, près de 50 % des neurones c-FOS+ dans l'hypothalamus postérieur sont de nature MCHergique, et près de 60 % des neurones MCH sont c-FOS+. De plus, l'application intracérébroventriculaire de MCH augmente de manière drastique les quantités de SP (Verret *et al.*, 2003). La nature SP-on de ces neurones a par la suite été définitivement confirmée par l'enregistrement unicellulaire de ces neurones couplé à un marquage juxtacellulaire (**Figure II.19B-C)** (Hassani *et al.*, 2009).

De nombreuses études ont depuis confirmé l'implication des neurones à MCH dans la régulation du SP. En effet, si l'injection icv de MCH augmente les quantités de SP (**Figure II.19D**), l'injection sous-cutanée d'un antagoniste MCHergique diminue les quantités de SL et de SP (Ahnaou *et al.*, 2008) et des souris dont la voie de signalisation de la MCH a été invalidée présentent une altération de leur cycle veille-sommeil et de son homéostasie (Adamantidis *et al.*, 2008; Willie *et al.*, 2008). En outre, des souris génétiquement modifiées MCH-ataxine (qui expriment l'ataxine dans les neurones à MCH ce qui induit leur dégénérescence) présentent une diminution de l'hypersomnie de SP suivant une privation spécifique de cet état (Fort, communication personnelle). Si les neurones à MCH semblent donc être impliqués dans la régulation du SP, il est important de noter que ces neurones ne sont pas les seuls neurones de l'hypothalamus activés durant le SP. En effet, de nombreux neurones GABAergiques de l'hypothalamus postérieur sont, à l'instar des neurones MCH, c-FOS+ durant une hypersomnie de SP (Sapin *et al.*, 2010) et de type SP-on (Hassani *et al.*, 2010). Si près de 90 % des neurones MCH sont également GABAergiques (Sapin *et al.*, 2010), il semble exister une différence entre les neurones MCH et les neurones GABAergiques non MCH de l'hypothalamus.
En effet, les premiers voient leur activité unitaire augmenter à l'apparition du SP alors que l'augmentation d'activité des seconds précède l'apparition du SP (Hassani *et al.*, 2009; Hassani *et al.*, 2010). Ces derniers pourraient donc, au contraire des neurones MCH, être impliqués dans le déclenchement du SP.

D'un point de vu mécanistique, il a été émis l'hypothèse que les neurones à MCH pourraient favoriser le SP via l'inhibition des neurones SP-off dits permissifs, comme les neurones monoaminergiques,

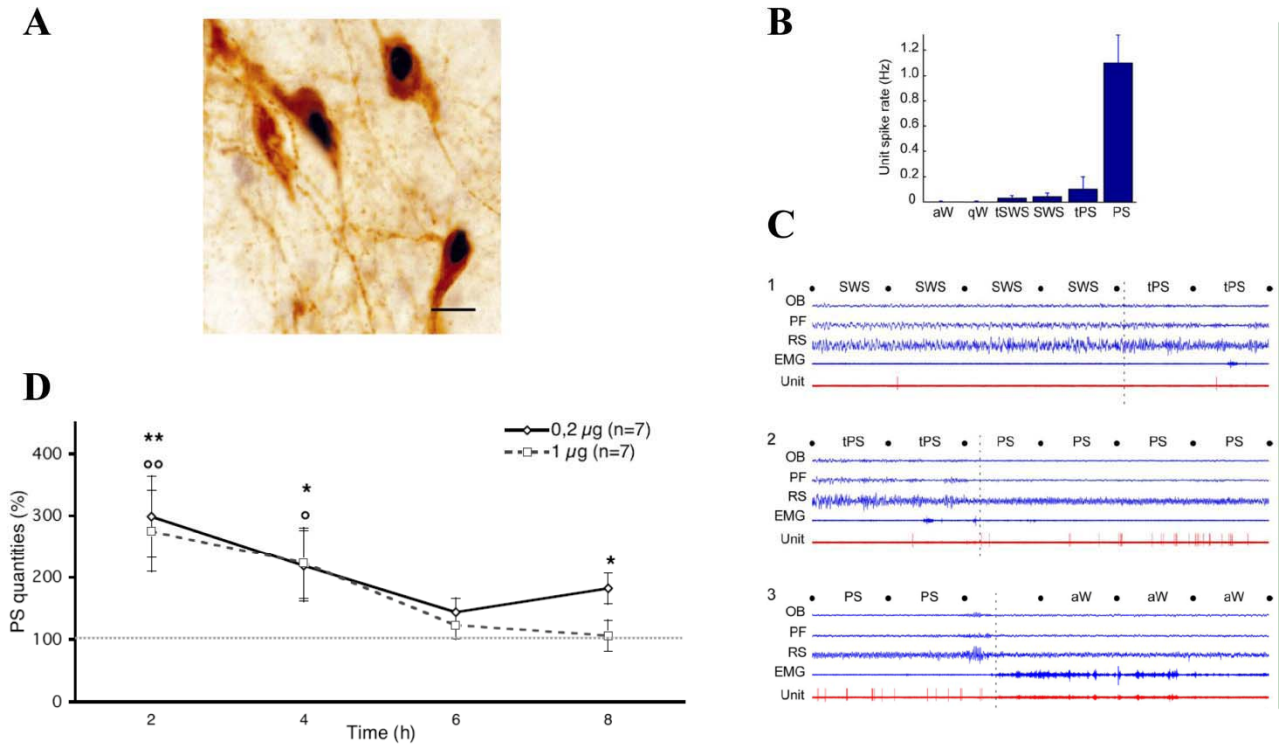


Figure II.19: Implication des neurones à MCH dans la régulation du SP
(A) Près de 50 % des neurones à MCH (en marron) expriment c-FOS (en noir) après une profonde hypersomnie de SP. D'après Verret et al., 2003.
(B-C) Activité unitaire (en rouge) des neurones à MCH au cours des différents états de vigilance montrant leur caractère SP-on. aW, éveil actif; qW, éveil calme; tSWS, transition éveil/SL; SWS, SL; tPS, transition SL/SP; PS, SP. Les différents états de vigilance sont déterminés en fonction de l'activité EMG et des EEG des cortex olfactif (OB), préfrontal et rétrosplénial (RS). D'après Hassani et al., 2009.
(C) L'injection intracérébroventriculaire de MCH induit une augmentation des quantités de SP. D'après Verret et al., 2003.

hypocrétinergiques ou les neurones GABAergiques de la VLPAG/dDpMe (Fort *et al.*, 2009; Saper *et al.*, 2010; Luppi *et al.*, 2011). En accord avec cette hypothèse, de grandes quantités de fibres à MCH ainsi que de MCHR1 (Récepteur à la MCH) sont retrouvées au niveau du TMN, du DR, du LC et de la VLPAG/dDpMe (Bittencourt *et al.*, 1992; Hervieu *et al.*, 2000; Kilduff and de Lecea, 2001). En outre, en plus de contenir le GABA comme neurotransmetteur, la MCH est un neuropeptide inhibiteur (Gao and van den Pol, 2001) et celle-ci inhibe notamment les neurones sérotoninergiques du DR (Lagos *et al.*, 2009). Les neurones à MCH pourraient également participer à l'inhibition des neurones à hypocrétine. En effet, ces deux populations sont interconnectées (Bayer *et al.*, 2002; Guan *et al.*, 2002) et il a récemment été mis en évidence que la MCH pourrait diminuer la transmission hypocrétinergique (Rao *et al.*, 2008).

L'hypothalamus postérieur, et en particulier les neurones à MCH, semble donc impliqué dans la régulation du SP et plus particulièrement dans son homéostasie. Il exercerait son rôle facilitateur envers le SP en permettant une inhibition des structures SP-off permissives. De part les interconnections existantes entre les neurones à MCH et ceux à HCRT, deux populations aux caractéristique électrophysiologiques et physiologiques opposées, l'hypothalamus apparaît donc comme une structure clef pour la régulation des états de vigilance, et du SP en particulier.

II.3.7 – Modèles de la genèse et du maintien du SP

La **Figure II.20A** illustre le modèle de la genèse et du maintien du SP tel qu'on le conçoit actuellement au sein du laboratoire. Dans ce modèle, le SLD est la structure centrale responsable de la mise en place du SP. Supposé de nature glutamatergique, il supprimerait le tonus musculaire par l'excitation des prémotoneurones GABAergiqes/glycinergiques du GiV/GiA et permettrait également l'activation corticale via des projections ascendantes sur le noyau réticulé du thalamus. L'existence de deux sous populations, l'une rostrale et l'autre caudale a bien été montrée chez le chat mais reste une hypothèse chez le rat. D'une manière générale, une telle organisation permettrait d'expliquer les symptômes observés chez les patients atteints de RBD. En effet ceux-ci montrent des quantités et une homéostasie normale du SP mais seule la régulation de l'atonie est défectueuse (**voir partie I.3.2**). L'existence de deux populations distinctes permettrait alors d'expliquer cette spécificité symptomatologique.
Durant l'éveil et le SL, les neurones SP-on du SLD seraient maintenus inactifs par des neurones GABAergiques SP-off localisés au sein de la VLPAG et du dDpMe. Durant l'éveil, ces neurones seraient notamment sous l'excitation des neurones à HCRT éveil-on de l'hypothalamus. La dégénérescence des neurones à HCRT chez les sujets narcoleptiques diminuerait ainsi le tonus excitateur sur ces neurones durant l'éveil, permettant ainsi leur inhibition dans certaines conditions et la survenue des crises de cataplexie par l'activation du SLD. Chez le sujet sain, l'inhibition de ces neurones GABAergiques de la VLPAG/dDpMe, permettant ainsi la survenue du SP, serait la conséquence de l'activation des neurones SP-on du DPGi, de la VLPAG elle-même et de l'hypothalamus postérieur (MCH notamment). Ces neurones participeraient également à l'arrêt des neurones monoaminergiques observé durant le SP.

La **Figure II.20B** correspond au modèle du SP prôné par le groupe de Saper. Deux différences majeures sont à signaler. La première se trouve au niveau de la mise en place de l'atonie musculaire. Selon leur modèle, le SLD induirait l'inhibition des motoneurones via le GiV/GiA mais également via des projections directes sur des inter-neurones inhibiteurs de la moelle épinière. Le second désaccord porte sur l'inhibition des neurones GABAergiques SP-off de la VLPAG/dDpMe sui viendrait selon eux de neurones GABAergiques SP-on localisés au sein du SLD lui-même créant ainsi un mécanisme de « flip-flop » entre ces deux structures expliquant l'alternance de ces états de vigilance.

Quelque soit le modèle considéré, il est intéressant de noter plusieurs points communs. Tout d'abord, les deux modèles présentent, à un moment ou un autre, une ou plusieurs populations qui s'inhibent mutuellement et dont les caractéristiques sont opposées (SP-on vs SP-off). On peut citer par exemple les neurones à HCRT et à MCH dans le premier cas et les neurones du SLD et de la VLPAG dans le second. Cette inhibition réciproque, permet, comme dans le cas d'un circuit électrique, le maintien d'un état stable parmi les différentes configurations possibles, et non pas d'un mix de plusieurs états (Saper *et al.*, 2010).
Le deuxième point intéressant est la différence entre l'entrée et la sortie du SP. En effet, la transition entre SL et SP se fait « en douceur » avec un EEG qui, durant ce stade intermédiaire, présente des fuseaux caractéristiques du SL sur fond de rythme thêta caractéristique du SP. Au contraire, la sortie du SP est abrupte puisque comme illustré en **Figure II.2**, chaque épisode de SP se termine par un micro éveil, sans présence d'un stade intermédiaire. Les mécanismes permettant l'entrée et la sortie du SP sont donc deux mécanismes différents. L'entrée progressive en SP pourrait refléter le temps nécessaire à l'ensemble des neurones SP-on, SP-off et SL-on pour changer de mode de décharge. Par conséquent, pendant ce court lapse de temps, des neurones du SL continueraient de générer des fuseaux et des ondes lentes pendant que certains neurones du SP, déjà activés induiraient déjà une certaine activation corticale. Au contraire, la sortie brutale du SP suggère qu'une population de neurones éveil-on est capable de s'activer de manière synchrone permettant ainsi le réveil de l'animal en une fraction de seconde, caractéristique indispensable pour la survie de nombreux animaux. Cette population, en plus de s'activer de manière synchrone doit être capable de moduler l'activité de l'ensemble des structures impliquées dans le cycle veille-sommeil et de moduler son activité de manière très rapide. L'ensemble de ces caractéristiques fait penser que les neurones du LC pourraient être responsables de cette sortie du SP. En effet, ces neurones déchargent de manière synchronisée, projettent sur l'ensemble de l'encéphale (**voir partie II.1.1**) et changent leur activité en moins d'une seconde (Takahashi *et al.*, 2010). De plus, leur activation optogénétique induit l'apparition d'un éveil « complet » dans un lapse de temps très court (Carter *et al.*, 2010). Toutefois, le fait que les neurones du LC n'anticipent pas la fin du SP mais ne s'activent qu'au retour d'un EEG de type éveil, et qu'ils ne sont pas c-FOS+ lors d'une privation de SP n'est pas en faveur de cette hypothèse. Les mécanismes contrôlant la sortie du SP sont donc pour l'instant largement inconnus.

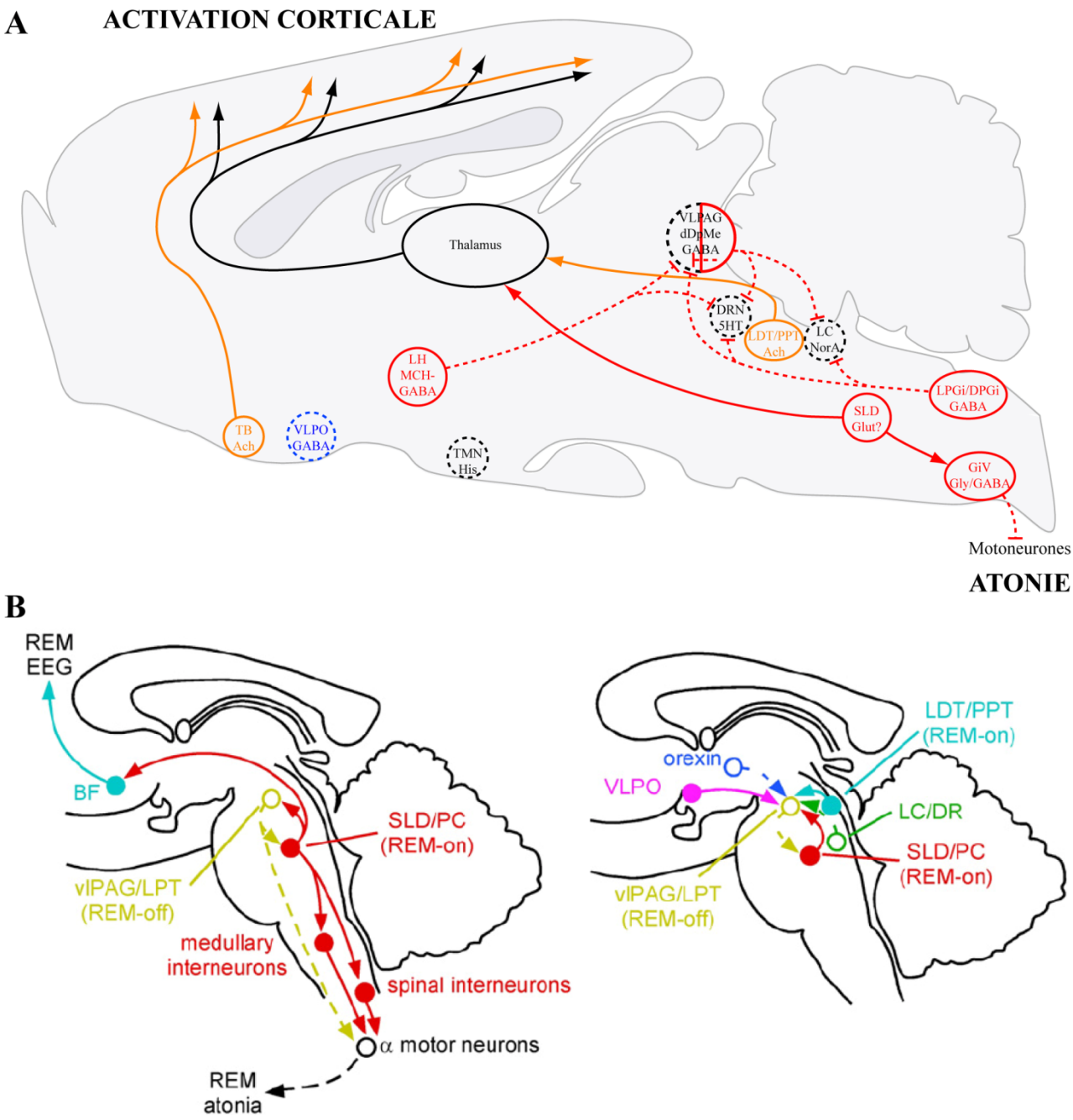


Figure II.20: Schémas récapitulatifs des différentes populations neuronales, et de leurs inter-relations, impliquées dans la régulation du sommeil paradoxal

(A) Schéma proposé par le laboratoire. Les populations représentées en noir, bleu, et rouge correspondent respectivement aux populations spécifiquement actives durant l'éveil, le SL et le SP. Celles en orange sont actives durant l'éveil et le SP. La nature neurochimique est indiquée pour chaque population. Les populations actives sont entourées d'un trait plein alors que celles inactives le sont d'un trait discontinu. Les flèches en trait plein et en pointillé représentent respectivement des projections excitatrices et inhibitrices.

(B) Schéma proposé par le groupe de Saper. Dans celui-ci, le SLD est inhibé durant l'Ev et le SL par les neurones GABAergiques de la vlPAG/LPT (équivalent de notre VLPAG/dDpMe). Durant le SP, ces derniers sont à leur tour inhibés par des neurones GABAergiques du SLD. Des neurones glutamatergiques de celui induisent l'atonie musculaire via des projections sur les interneurones médullaires (l'équivalent de notre GiV) et des projections directes sur des prémotoneurones glycinergiques de la moelle épinière. Par ailleurs, des neurones glutamatergiques du précoeruleus (PC) projettent sur le télencéphale basal (BF) responsable de l'activation corticale (partie gauche). De nombreux systèmes comme les neurones à orexin, les neurones cholinergiques du LDT/PPT, GABAergiques du VLPO et monoaminergiques du DR et du LC régulent l'activité des neurones de la vlPAG/LPT (partie de droite). D'après Saper et al. 2010.

CHAPITRE III – Objectifs et approches expérimentales

Les différents objectifs de cette thèse, que nous allons présenter ci-dessous, s'inscrivent tous dans une démarche globale visant à mieux comprendre les mécanismes neuronaux responsables de la mise en place et du maintien du SP chez le rat.

III.1 – Déterminer la nature neurochimique des neurones SP-on du SLD

Comme nous l'avons rappelé à plusieurs reprises, la mise en place du SP est due à l'activation de neurones de type SP-on localisés au sein du SLD. Toutefois, bien que l'importance de ces neurones ait été mise en évidence dès les années 1980 via des injections pharmacologiques (**voir partie II.3.1**), leur nature neurochimique n'est toujours pas connue avec certitude. De nombreuses études réalisées au sein du laboratoire ont tout de même permis de montrer que ces neurones ne sont ni cholinergiques ni GABAergiques (Verret *et al.*, 2005; Sapin *et al.*, 2009). A l'inverse, de nombreuses études ont suggéré que ces neurones pouvaient être de nature glutamatergique (Fort *et al.*, 2009; Saper *et al.*, 2010; Luppi *et al.*, 2011).

Le premier objectif de cette thèse était donc de confirmer la nature glutamatergique des neurones de SLD responsables de la genèse du SP. L'utilisation d'un double marquage associant le marqueur d'activation neuronale c-FOS à un marqueur des neurones glutamatergiques (en l'occurrence VGLUT2), et ce chez des rats ayant réalisé une hypersomnie de SP devait nous permettre de répondre à cette question.

III.2 – Caractériser la présence et la localisation des neurones glycinergiques pontobulbaires impliqués dans la régulation du SP

Comme le suggèrent les modèles expliquant la régulation du SP (**Figure II.20**), l'inhibition des motoneurones durant le SP fait intervenir des prémotoneurones (bulbaires et/ou spinaux) de nature glycinergiques et/ou GABAergiques. Or la localisation intégrale des neurones glycinergiques pontobulbaires et spinaux activés durant le SP reste pour l'instant inconnue.

Afin de répondre à cette question, ce qui permettrait ainsi de privilégier une voie bulbaire et/ou spinale pour l'atonie musculaire durant le SP, nous avons entrepris de cartographier les neurones glycinergiques pontobulbaire et spinaux activés lors du SP. Cette partie se basait également sur un marquage couplant l'immunohistochimie du c-FOS avec l'hybridation *in situ* du transporteur vésiculaire de la glycine (GLYT2), marqueur spécifique des neurones glycinergiques.

III.3 – Caractériser les afférences majeures aux neurones SP-off de la VLPAG/dDpMe et les confirmer par une approche pharmacologique

Comme nous l'avons montré ci-dessus, le contrôle des neurones GABAergiques de la VLPAG/dDpMe est une étape clef dans l'apparition du SP. Or, ce contrôle est précisément un des deux points de discorde majeurs existant entre les deux modèles de genèse du SP. Le modèle du groupe de Saper

propose que ce sont des neurones GABAergiques du SLD lui-même qui permettent l'inhibition de ces neurones. Or Sapin et al. ont démontré que le SLD ne contient quasiment pas de neurones GABAergiques activés lors du SP (Sapin *et al.*, 2009), et Xi et al. ont montré que l'inactivation des neurones GABAergiques du SLD augmente les quantités de SP (Xi *et al.*, 1999). Ces donnés vont donc à l'encontre de ce modèle. Au contraire, il est fait l'hypothèse au sein du laboratoire que l'inhibition de la VLPAG/dDpMe pourrait être due aux neurones SP-on de l'hypothalamus postérieur (en particulier les neurones MCH) ou du DPGi.

Afin de résoudre ce dilemme, nous avons entrepris l'étude exhaustive de toutes les régions projetant sur la VLPAG/dDpMe et activées lors d'une hypersomnie de SP. Les afférences ont été visualisées à l'aide du traceur rétrograde CTb injecté au sein de la VLPAG/dDpMe, et les neurones activés lors d'une hypersomnie de SP ont été visualisés à l'aide de l'expression du marquer c-FOS.
Dans un deuxième temps, nous avons vérifié le rôle fonctionnel de certaines de ces projections par l'application locale à l'aide de canules de divers agents pharmacologiques, et par l'analyse de leurs effets sur le cycle veille-sommeil et sur l'activation des structures clefs impliquées dans le cycle veille-sommeil.

III.4 – Confirmer l'implication du DPGi dans la régulation du SP via l'inhibition des neurones monoaminergiques

Le dernier objectif de cette thèse était d'étudier l'implication du DPGi dans la régulation du cycle veille-sommeil via notamment ses projections sur les neurones monoaminergiques. En effet, il a été montré que le DPGi contient des neurones SP-on (Goutagny *et al.*, 2008) de type GABAergique (Sapin *et al.*, 2009) et projetant sur le LC (Verret *et al.*, 2006). De plus, l'augmentation de l'activité de ces neurones précède l'apparition du SP. Il était donc tentant d'émettre l'hypothèse que ces neurones du DPGi sont indispensables à la survenue du SP par l'inhibition totale des neurones monoaminergiques (Fort *et al.*, 2009; Luppi *et al.*, 2011). Si leur action sur le LC est maintenant acquise, qu'en est-il des autres neurones monoaminergiques qui présentent des patrons de décharges et des rôles physiologiques similaires à ceux du LC ? Sont-ils également inhibés par le DPGi ? Quelle est l'importance du DPGi dans la régulation du cycle veille-sommeil ?

Pour tenter de répondre à toutes ces questions, nous avons également adopté une stratégie pharmacologique couplée à de l'immunohistochimie. Nous avons implanté des canules au niveau du DPGi permettant l'application en son sein de substances pharmacologiques, et nous avons étudié par neuroanatomie fonctionnelle l'effet de ces applications sur le cycle veille-sommeil ainsi que sur l'activité de structures importantes pour la régulation des états de vigilance, en premier lieu desquelles les structures monoaminergiques.

MATERIELS ET METHODES

I – La polysomnographie

I.1 – Rappels théoriques

Comme nous l'avons déjà évoqué à plusieurs reprises dans l'introduction, la détermination des états de vigilance est réalisée grâce à l'enregistrement polygraphique de nombreux paramètres physiologiques tels que les activités cérébrales (EEG), musculaire (EMG), cardiaque, respiratoire, mais aussi les températures corporelle et cérébrale ainsi que les mouvements oculaires (EOG). Toutefois, EEG et EMG permettent à eux seuls de caractériser l'état de vigilance.

L'EEG est réalisé à l'aide d'électrodes localisées à la surface du crâne qui enregistrent les fluctuations électriques liées à l'activité sous-jacente d'une large population de neurone. Les potentiels enregistrés au niveau des électrodes EEG reflètent majoritairement les potentiels post-synaptiques inhibiteurs et excitateurs par rapport aux potentiels d'action (Martin, 1991). L'EEG enregistré peut être soit bipolaire, il correspond alors à la différence de potentiel enregistrée entre deux électrodes EEG, soit unipolaire. Dans ce cas, on enregistre la différence de potentiel existant entre l'électrode EEG et une électrode de référence placée à distance. En fonction de la localisation spatiale des électrodes, le signal EEG enregistré peut être légèrement différent. En effet, les ondes lentes (dans la gamme Delta) prédominent au niveau du cortex frontal alors que les ondes thêta sont majoritaires au niveau du cortex pariétal (dû à la proximité de l'hippocampe chez es rongeurs).Par conséquent, l'utilisation de plusieurs électrodes EEG permet de déterminer avec certitude l'état d'activité de l'encéphale.

L'EMG, bipolaire, permet une mesure de l'activité musculaire tonique et des événements phasiques (secousses). Les électrodes musculaires peuvent être localisées au niveau de nombreux muscles mais sont classiquement placées au niveau des muscles posturaux de la nuque.

I.2 – Protocole expérimental

Durant cette thèse, les enregistrements EEG/EMG des animaux sont réalisés à l'aide de 4 électrodes EEG placées à la surface du cerveau (EEG unipolaire, 1 électrode de référence et 3 électrodes d'enregistrement) et de deux électrodes musculaires insérées au niveau de la nuque. Ces 6 électrodes sont reliées à un micro-connecteur solidaire de la tête de l'animal. Les électrodes EEG sont constituées de petites vis (Anthogyr, France), raccourcies en longueur afin de ne provoquer aucune lésion du cortex et les électrodes EMG consistent en de petites boules d'étain aurifiées situées à l'extrémité d'un fil d'acier.

I.2.1 – Chirurgie et récupération post-opératoire

Toutes les expériences décrites ci-dessous sont réalisées sur des rats Sprague Dawley (Charles River Laboratories, France) pesant entre 240 et 260g à leur arrivée au laboratoire. A leur arrivée, les rats sont placés par 2 minimum dans des cages standards en conservant les groupes formés par le fournisseur afin de limiter le stress des animaux. Dans cette même optique, les animaux sont habitués aux conditions d'hébergement et à l'expérimentateur durant un minimum de 4 jours jusqu'à ce qu'ils atteignent environ 300g.

Lors de la chirurgie, l'animal est anesthésié par une injection intrapéritonéale (i.p.) d'un mélange de kétamine (Virbac Santé Animale, France) et de xylazine (Bayer, Allemagne) (100 $mg.kg^{-1}$ et 10 $mg.kg^{-1}$ respectivement). L'animal reçoit également une injection sous cutanée de Rimadyl (200 $\mu l.kg^{-1}$, Pfizer, France) pour son effet analgésique de 24 h, ainsi qu'une injection sous-citanée d'atropine (0,04 $mg.kg^{-1}$, Sigma-Aldrich, MO) afin d'éviter les arrêts cardiorespiratoires et l'accumulation de mucus au niveau des

bronches. Tout au long de la chirurgie, la profondeur de l'anesthésie est surveillée en vérifiant l'abolition des réflexes pupillaire et du retrait au pincement de la patte ainsi que les rythmes cardiaque et ventilatoire (surveillance visuelle). Si une réinjection d'anesthésique est nécessaire, le protocole suivant est utilisé : seules la kétamine et la xylazine sont réinjectées avec des doses réduites de moitié par rapport à la primo-injection (50 $mg.kg^{-1}$ et 5 $mg.kg^{-1}$ respectivement). De plus, la xylazine étant un myorelaxant et pouvant donc provoquer un arrêt cardiaque, la xylazine n'est réinjectée qu'une fois toutes les 2 injections. Enfin, la température corporelle est maintenue à 37°C à l'aide d'une couverture chauffante et d'une sonde thermique rectale.

Une fois anesthésié, l'animal est rasé sur la partie supérieure du crâne avant d'être maintenu dans un appareil de contention stéréotaxique (David Kopf Instruments, CA) à l'aide de barres d'oreilles et d'une pièce de maintien des incisives. De la pommade ophtalmique est appliquée au niveau des yeux pour prévenir leur dessèchement, la peau du crâne est nettoyée à l'aide d'H_20_2 et d'une solution iodée, puis une infiltration de lidocaïne (Xylovet, Ceva Santé Animale, France) est réalisée au niveau de la zone d'incision (son effet analgésique dure environ 2h). La peau du crâne est incisée sur toute la longueur du crâne à l'aide d'un scalpel, réclinée et maintenue sur les bords latéraux par des pinces hémostatiques. L'os du crâne est décapé à l'aide d'une rugine et nettoyé à l' H_20_2. La tête de l'animal est mise à l'horizontale en se servant des coordonnées du Bregma et du Lambdoïde, puis des trépanations sont réalisées pour permettre la mise en place des vis faisait office d'électrodes EEG. Dans un souci de reproductibilité, les EEG sont positionnées à l'aide de coordonnées stéréotaxiques : EEG frontale : antéropostérieur (AP) Bregma (β) + 3 mm, médiolatéralité (ML) β + 1 mm ; EEG pariétale : AP β - 4 mm, ML β + 3 mm ; EEG occipitale AP β - 8 mm, ML β + 3 mm ; EEG de référence, AP β - 12 mm, ML β + 2 mm.
Les électrodes EEG sont ensuite vissées dans leurs emplacement définitifs et solidarisées au crâne de l'animal par de la résine dentaire (Super-Bond c&B, Sun Medical co. Ltd, Japon). Les deux électrodes EMG sont ensuite glissées entre deux plans musculaires de part et d'autre de la nuque et les 6 électrodes (EMG et EEG) sont connectées au micro-connecteur (Plastics One Inc, CT). L'ensemble est fixé au crâne du rat par du ciment dentaire (Paladur, Heraeus Kulzer, Allemagne).
Après une infiltration sous-cutanée de xylocaïne (analgésie), la plaie est suturée à l'avant et à l'arrière de la prothèse et une solution iodée est appliquée sur le pourtour de la prothèse afin de désinfecter la plaie.

Immédiatement après l'implantation, les animaux sont placés dans un baril en plexiglas translucide individuel (diamètre : 30 cm, hauteur : 40 cm) où ils ont accès *ad libitum* à l'eau et à la nourriture. En règle générale les animaux se réveillent 1 h après la chirurgie et présentent au bout de quelques heures des comportements normaux d'exploration, de toilettage et de prise alimentaire. Bien que la récupération post-opératoire soit en générale rapide (moins de 48 h), une période de repos de 5 jours minimum est laissée aux animaux. En cas d'infection de la plaie, du Baytril (0.02 $ml.kg^{-1}$, Bayer), un antibiotique, est injecté quotidiennement en sous-cutané. Dans ce cas, la période de récupération est allongée jusqu'à ce que la cicatrisation soit correcte.

I.2.2 – Enregistrements polysomnographiques et analyse du cycle veille-sommeil

Au terme de la récupération post-opératoire (5 jours), les animaux sont placés pendant 4 jours dans les conditions d'enregistrement afin de s'y habituer. Le micro-connecteur placé sur la tête du rat est relié au dispositif d'enregistrement via un câble (Plastics One Inc.) et la présence d'un connecteur tournant (Plastics One Inc.) permet au rat de se déplacer dans sa cage sans perturber les signaux électriques. Les caissons d'enregistrement sont ventilés, isolés phoniquement et électriquement. Tout comme la pièce de stabulation, ils sont éclairés selon un cycle de 12 heures (de 8h à 20h) et la température y est régulée (21°C ± 1°C). A l'issue de cette habituation, des enregistrements contrôles d'une durée de 48 h sont réalisés.

L'acquisition des données polysomnographiques est entièrement informatisée. Les signaux EEG et EMG sont amplifiés (MCP Plus, Alpha-Omega Engineering, Israel), numérisés par un convertisseur CED 1401 (Cambridge Electronic Design, UK) et enregistrés avec le logiciel Spike 2 (Cambridge Electronic Design) à l'aide de scripts développés au sein du laboratoire. La fréquence d'échantillonnage pour les EEG et EMG est de 520.8 Hz.

II – Le traçage de voies nerveuses par l'utilisation d'un traceur rétrograde

II.1 – Principe et traceur utilisé

La compréhension des mécanismes régissant le fonctionnement du système nerveux nécessite la connaissance des connections existantes en son sein. La technique dite de « traçage de voies » permet de les mettre en évidence. On distingue les traceurs antérogrades, qui permettent de révéler les efférences de la structure où a été injectée le traceur, et les traceurs rétrogrades qui marquent eux les afférences à cette structure. Le traçage rétrograde repose sur la capacité des neurones à capter par leurs terminaisons certaines molécules, puis à les transporter de manière rétrograde jusqu'à leur corps cellulaire où elles s'accumulent. Après un temps de survie nécessaire à ce transport, la présence du traceur est révélée par immunohistochimie.

De nombreux traceurs existent ou sont en cours de développement et il convient de sélectionner celui qui présente les meilleurs caractéristiques permettant de répondre à la question biologique soulevée. En effet, pour chaque traceur, il faut tenir compte de :
- sa sensibilité. Plus le traceur sera sensible, plus le marquage rétrograde sera complet et reflètera l'ensemble des afférences à la région d'intérêt.
- sa spécificité. Le traceur ne doit pas être capté par des fibres de passage mais uniquement par les neurones possédant des terminaisons synaptiques dans la région d'intérêt.
- sa nature monosynaptique ou polysynaptique, c'est-à-dire sa capacité à franchir ou non les synapses et donc à révéler ou non les seules afférences primaires.
- son mode d'injection *in situ*. Le traceur doit pouvoir être injecté avec des sites d'injection de taille restreinte.
- son caractère cytotoxique ou non.

La prise en compte de toutes ces données nous a amené à choisir la sous-unité b de la toxine cholérique (CTb) comme traceur rétrograde. La CTb est une protéine de 11,5 kDa qui se fixe de manière spécifique sur les monogangliosides GM1 présents en très grande quantité au niveau de la membrane des terminaisons nerveuses du système nerveux central. Cette forte densité explique en partie la taille restreinte du site d'injection (comparé à d'autres traceurs) du fait de la faible diffusion du traceur. Une fois fixée la CTb est internalisée dans des vésicules et transportée jusqu'au corps cellulaire du neurone afférent (Stoeckel *et al.*, 1977; Trojanowski, 1983). Notons au passage que si temps de survie de l'animal est suffisant, la CTb permet également de révéler de manière très sensible les efférences à la structure injectée. La CTb est de plus un marqueur très sensible, monosynaptique, n'est pas capté par les fibres de passage non lésées et n'est pas cytotoxique. De plus, la possibilité de l'injecter par micro-iontophorèse permet la réalisation reproductible de sites d'injection de petite taille comparée à une injection par pression. Enfin, ce traceur a été utilisé à de très nombreuses reprises pour l'étude des réseaux neuronaux du cycle-veille-sommeil (Yamuy *et al.*, 1993; Rampon *et al.*, 1996; Sherin *et al.*, 1996; Maloney *et al.*, 1999; Morales *et al.*, 1999; Maloney *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2002; Maloney *et al.*, 2002; Boissard *et al.*, 2003; Verret *et al.*, 2003; Verret *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2006b; Verret *et al.*, 2006; Goutagny *et al.*, 2008; Leger *et al.*, 2009; Sapin *et al.*, 2009; Sapin *et al.*, 2010)

puisqu'il permet notamment de coupler le traçage des voies nerveuses à l'identification de la nature neurochimique des neurones.

II.2 – Protocole expérimental

La CTb lyophilisée (500µg, List Biological Laboratories, CA) est reconstituée dans 100µL de tampon phosphate (PB) 0,1M pH 6 dans lequel la CTb est chargée positivement, permettant ainsi son injection par iontophorèse.

L'injection de CTb a lieu juste avant la mise en place des électrodes EEG/EMG. Pour ce faire, une trépanation d'environ 2mm de diamètre est réalisée au niveau des coordonnées théoriques de la structure cible provenant de l'Atlas The Rat Brain (Paxinos et Watson, 1998). Pour les injections au sein de la VLPAG/dDpMe, les coordonnées suivantes sont utilisées : AP β - 7 mm, ML β + 0.8 mm, dorsoventral DV - 5.2 mm par rapport à la surface du cerveau. En ce qui concerne les injections dans le SLD les coordonnées théoriques utilisées sont les suivantes AP β - 9.6 mm, ML β + 1.2 mm, DV - 5.8 mm par rapport à la surface du cerveau. Toutefois, par souci pratique dû à la présence du sinus veineux transverse à cet endroit, la pipette d'injection est inclinée de 15° vers l'arrière modifiant ainsi les coordonnées utilisées pour l'injection qui deviennent AP β - 10.87 mm, ML β + 1.2 mm, DV - 6 mm par rapport à la surface du cerveau. Une fois la trépanation effectuée, la dure mère est enlevée après application locale de lidocaïne, puis la pipette contenant la CTb (pipette en verre borrosilicaté étirée et de diamètre extérieur compris entre 3 et 5 µm à son extrémité) est introduite dans l'encéphale et positionnée à la bonne profondeur en utilisant un micro-descendeur. La pipette est laissée en place 5 min avant que l'injection ait lieu. L'injection est réalisée à l'aide d'un générateur de courant (CS4, Transkinetics, MA) réglé comme suit : + 2 µA, 7 sec ON/7 sec OFF, pendant 15 min. Une fois l'injection terminée, la pipette est laissée en place pendant 15 min supplémentaires puis retirée doucement afin de limiter au maximum la création d'une trainée de CTb lors de la remontée de la pipette. Une période de 15 jours est ensuite suffisante pour de marquer l'ensemble des afférences à la structure cible.

III – Privation et hypersomnie de SP par la méthode de la piscine

III.1 – Principe

Comme nous le verrons par la suite (voir **partie VI** du Matériels et méthodes), nous avons décidé d'utiliser le marqueur d'activation c-FOS afin de caractériser les populations neuronales activées lors du SP. Or les quantités physiologiques normales de SP sont faibles et très fractionnées et ne permettent donc pas d'induire une expression suffisante du marqueur permettant une distinction claire des régions impliquées dans le SP, à moins d'utiliser des techniques de corrélations qui sont très gourmandes en temps et en animaux. Toutefois, le SP étant régulé de manière homéostatique, toute privation de SP sera suivie d'une hypersomnie de SP permettant de « récupérer » les quantités perdues. L'induction d'une profonde hypersomnie permet donc de contourner le problème exposé ci-dessus.

Pour ce faire, nous avons utilisé la méthode de la piscine, aussi appelée méthode « du pot de fleur inversé » (inverted flower pot technique). L'animal est placé dans un baril dont le fond est rempli d'eau de laquelle n'émerge d'une petite plateforme. Celle-ci est assez grande pour permettre à l'animal de réaliser du SL, mais est trop petite pour qu'il puisse réaliser du SP. En effet, comme nous l'avons évoqué à plusieurs reprises, le SP se caractérise par une profonde atonie musculaire. Par conséquent, toute tentative d'entrée en SP de la part de l'animal s'accompagnerait d'une chute de l'animal et donc de son réveil. Des mécanismes physiologiques sont alors mis en place pour éviter la mise en place du SP et donc de telles chutes. Une telle

privation peut être prolongée pendant plusieurs jours et lors d'un retour de l'animal dans des conditions d'hébergement standard, celui-ci récupèrera le SP perdu en réalisant une profonde hypersomnie de SP. De plus, cette technique a été largement utilisée au sein et en dehors du laboratoire pour l'étude des mécanismes neuronaux impliqués dans la régulation du SP (Yamuy *et al.*, 1993; Rampon *et al.*, 1996; Sherin *et al.*, 1996; Maloney *et al.*, 1999; Morales *et al.*, 1999; Maloney *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2002; Maloney *et al.*, 2002; Boissard *et al.*, 2003; Verret *et al.*, 2003; Verret *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2006b; Verret *et al.*, 2006; Goutagny *et al.*, 2008; Leger *et al.*, 2009; Sapin *et al.*, 2009; Sapin *et al.*, 2010).

III.2 – Protocole détaillé

Ce protocole débute après la période de 2 jours correspondant aux enregistrements contrôles. Durant toute la durée du protocole les animaux ont un accès *ad libitum* à l'eau et à la nourriture. Le protocole est synthétisé en **Figure 1**.

Les rats du groupe contrôle (PSC) restent dans des conditions d'hébergement standard (baril en plexiglas avec de la litière) durant l'intégralité du protocole. Le premier jour de ce protocole à 11 h, les rats des groupes « privation de SP » (PSD) et « hypersomnie de SP » (PSR) sont placés dans des barils en plexiglas dans lesquels seule une plateforme de 6,5 cm de diamètre émerge de l'eau (2 cm de profondeur). Chaque jour vers 11H, ces rats sont replacés durant 45/60 min dans un environnement standard afin de leur permettre de se nettoyer et de se dégourdir les pattes pendant que le baril de privation est nettoyé. Après 72 h de privation, alors que les rats du groupe PSD restent dans les mêmes conditions, les rats du groupe PSR sont replacés à 11 h dans un environnement standard. Après une phase d'exploration, de toilettage et de prise de nourriture d'environ 45/60 min, ces animaux présentent une succession de phases de SP entrecoupées de micro-éveils et de courts épisodes de SL : c'est l'hypersomnie de SP. Ces animaux sont sacrifiés 150 min exactement après la survenue du premier épisode de SP. Ce délai correspond au « meilleur » compromis entre pic d'expression du marqueur c-FOS, profondeur de l'hypersomnie du SP et éloignement par rapport à la période de privation. Les animaux des groupes PSC et PSD sont sacrifiés soit juste avant soit juste après les animaux PSR.

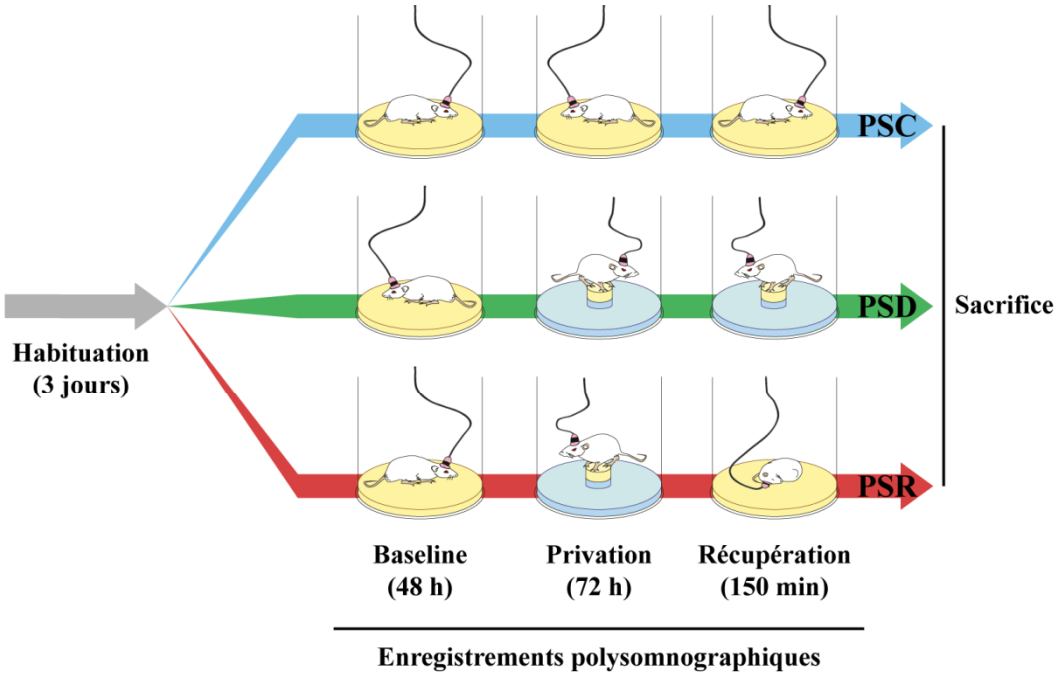


Figure 1: Protocole de privation/récupération sélectif du SP
PSC, groupe contrôle; PSD, groupe privé sélectivement de SP; PSR, groupe en hypersomnie de SP

IV – Pharmacologie intratissulaire sur animal libre de se mouvoir

IV.1 – Principe et drogues utilisées

La démonstration de l'implication d'un groupe de neurones dans la régulation de telle ou telle fonction physiologique passe nécessairement par des expériences consistant à regarder l'effet de son activation, ou de son inhibition, sur ladite fonction. Au cours des dernières années, de nouvelles techniques permettant de modifier l'activité neuronale et basées sur l'utilisation d'animaux génétiquement modifiés sont apparues. Ne disposant pas de ces techniques, nous avons donc choisi d'utiliser une méthode, certes plus ancienne, mais qui a largement contribué à la compréhension des mécanismes cérébraux : la pharmacologie intra-tissulaire par canules.

Cette méthode permet d'injecter au sein du tissu cérébral une quantité et un volume donné de l'agent pharmacologique souhaitée. De plus, cette méthode a l'avantage d'être réversible, de permettre de tester l'effet de diverses substances sur un même animal et de permettre aussi bien l'activation que l'inhibition de la région visée chez un animal vigile et libre de ses mouvements.
Pour ce faire, un guide canule (Plastics One Inc.) est implanté de manière chronique au niveau de la structure cérébrale visée. Le jour de l'expérience, à l'heure souhaitée, l'agent pharmacologique est injecté à l'aide d'une canule et d'un pousse seringue (qui permet l'injection d'un volume précis en un temps donné). Le rat est ensuite replacé dans sa cage pour suivre l'évolution des états de vigilance.

Durant cette thèse, nous avons utilisé les drogues suivantes :

- Muscimol (Sigma-Aldrich) : agoniste des récepteurs GABAa, dilution à 1 $\mu g.\mu l^{-1}$ (8.24 mM), injection de 0,3 µl
- Clonidine hydrochloride (Tocris Bioscience, UK) : agoniste des récepteurs adrénergiques $\alpha 2$, dilution à 0.53 $\mu g.\mu l^{-1}$ (2 mM), injection de 0,3 µl
- NaCl 0,9 % : solution pour injection contrôle, injection de 0,3 µl

Toutes les drogues sont diluées dans du NaCl 0,9 %, échantillonnées par petits volume et stockées à -20°C. Pour chaque nouvelle injection, un nouvel échantillon est décongelé immédiatement avant utilisation.

IV.2 – Protocole détaillé

Pour les animaux concernés, l'implantation des guides canules est réalisée après l'injection de CTb et avant la pose des électrodes EEG.
Les coordonnées utilisées sont les suivantes :

- DPGi : AP β - 12 mm, ML β + 0 mm, DV - 5.2 mm par rapport à la surface du cerveau
- LH : AP β - 3.3 mm, ML β ± 1.8 mm, DV - 5.9 mm par rapport à la surface du cerveau. La LH étant une structure bilatérale, un guide canule est inséré dans chaque hémisphère. Or l'encombrement stéréotaxique des guides canules ne permet pas d'implanter les canules de manière verticale. Un angle latéral de 10° a donc été utilisé pour la LH. Les coordonnées utilisées pour l'implantation des guides canules sont donc les suivantes : AP β - 3.3 mm, ML β ± 3.3 mm, DV - 8.64 mm par rapport à la surface du cerveau. Il est important de noter que le guide canule est positionné au dessus de la structure visée étant donné que la canule dépasse de 2.6 mm de l'extrémité du guide canule.

Pour l'implantation des guides canules, une trépanation est réalisée aux coordonnées stéréotaxiques souhaitées et la dure-mère y est retirée. Chaque guide canule est implanté avec son mandrin (afin d'éviter son obstruction par du tissu ou un caillot sanguin lors de la descente) à l'aide de l'appareil stéréotaxique. Une fois mis en place, le guide canule est solidarisé au crâne de l'animal à l'aide de résine dentaire (Superbond

C&B). L'ensemble des canules est par la suite solidarisé avec les électrodes EEG/EMG à l'aide de ciment dentaire.

Après une période de 5 jours de récupération post-opératoire (**voir partie I.2.1** du Matériels et Méthodes), les animaux sont habitués aux conditions d'enregistrement et d'injection. Ils sont placés dans les caissons d'enregistrement et sont quotidiennement entrainés à la procédure d'injection : les animaux sont déconnectés du cable d'enregistrement, retirés du caisson et soumis à la procédure normale d'injection sauf qu'aucune canule n'est insérée dans le guide canule. Cette phase d'habituation est indispensable afin de limiter au maximum le stress des animaux. La durée minimale de cette période est de 7 jours mais peut être prolongée pour les individus les plus craintifs.

Une fois l'habituation terminée, les animaux sont soumis aux injections pharmacologiques. Le protocole d'injection commence à 9 h (soit 1 h après le début de la phase claire) pour les injections dans le DPGi et à 9 h 20 pour celles dans la LH. Cette différence s'explique par le fait que les différentes structures ont été traitées en parallèle et ne pouvaient donc pas être réalisées en même temps. Nous avons choisi de réaliser ces injections le matin car nous pensions que le traitement par injection de muscimol et de clonidine de structures impliquées dans la mise en place et le maintien du SP allait probablement diminuer les quantités de SP. Or c'est le matin que ces quantités sont les plus importantes et permettent donc d'observer facilement une diminution. A l'heure de l'injection, les animaux sont sortis de leur caisson et pesés. Le mandrin est retiré du guide canule et placé dans un bain d'éthanol. Une canule, connectée par l'intermédiaire d'une tubulure en polyéthylène (Plastics One Inc.) à une seringue Hamilton (Hamilton, Suisse) fixée à un pousse-seringue (New Era Pump System, NY) est alors descendue dans le guide canule. La présence d'une bague de serrage au niveau de la tubulure permet de solidariser le guide canule et la canule et permet ainsi de laisser l'animal libre de ses mouvement sans craindre de voir la canule bouger. La canule est maintenue en place durant 5 min, puis l'injection est réalisée à l'aide du pousse seringue : 0,3 µl sont injecté à un débit de 0,1 $\mu l.min^{-1}$. Une fois l'injection terminée, la canule est encore maintenue en place durant 5 autres minutes avant d'être retirée. Le guide canule est alors ré-obturé à l'aide du mandrin séché et l'animal est immédiatement reconnecté à son câble et replacé dans son baril. Dans le cas de la LH, cette opération doit être réitérée pour le second hémisphère.

La séquence d'injection des différentes substances est aléatoire et 3 jours au minimum séparent deux injections consécutives. 24 h après l'injection, les animaux sont de nouveau pesés afin de contrôler leur poids.

Les signaux EEG et EMG sont enregistrés à partir des deux derniers jours précédant la première injection et ce jusqu'au sacrifice de l'animal. Pour certaines injections, le comportement de l'animal a également été enregistré (de manière synchronisée avec l'EEG et l'EMG) pendant quelques heures suivant l'injection.

V – Perfusion et préparation des tissus

V.1 – Principe

Ces étapes ont pour but la conservation à long terme des tissus à étudier dans un état aussi proche que possible de l'état vivant, tout en la rendant compatible avec leur analyse. Pour ce faire, les tissus sont tout d'abord fixés à l'aide de paraformaldéhyde, un fixateur réticulant, qui entraîne la formation de ponts méthylène (CH2) entre les protéines, et permet ainsi de préserver la structure du tissu et des ARN. La perfusion du fixateur se fait par le réseau vasculaire permettant ainsi une bonne diffusion du fixateur dans

l'ensemble du tissu d'intérêt. De plus, une telle perfusion permet une fixation rapide évitant ainsi toute dégradation du tissu. En général, la perfusion du fixateur est précédée d'un lavage du système vasculaire par une solution physiologique permettant une meilleure diffusion du fixateur mais permettant également la suppression des peroxydases endogènes contenues dans les globules rouges et qui pourraient interférer lors de l'immunohistochimie. Une étape de sur-fixation pendant laquelle le cerveau baigne dans du paraformaldéhyde est également réalisée afin d'en homogénéiser la fixation.

La deuxième étape consiste à traiter les tissus prélevés pour leur analyse future au microscope. La réalisation de coupes minces et transparentes observables au microscope nécessite la congélation des tissus sans les endommager. Le tissu est donc saturé à l'aide d'une solution de saccharose cryoprotectrice qui prévient l'éclatement des cellules lors de la congélation.

V.2 – Protocole détaillé

Les animaux sont profondément anesthésiés au pentobarbital monosodique (dose létale de 150 $mg.kg^{-1}$, i.p., Ceva santé animale). Le sang est éliminé par la perfusion intracardiaque de 400 ml de Ringer-lactate hépariné (à 0,1 %) stérile. La présence d'héparine est indispensable afin d'éviter toute coagulation qui pourrait boucher certains capillaires et altérer la qualité de la fixation. Ce rinçage est suivi par la perfusion de 400ml de solution de fixation froide (paraformaldéhyde à 4% dans du tampon phosphate (PB) 0,1 M pH 7,4). Le cerveau est ensuite prélevé et surfixé dans la même solution de fixation pendant 1 nuit à 4°C.
Puis, le cerveau est placé durant 3 jours dans une solution de PB 0,1 M pH 7,4 autoclavée contenant 30 % de saccharose. Cette solution est changée 24 h après que le cerveau y ait été plongé pour la première fois. Dès que le cerveau est « équilibré », il est congelé dans un bain de méthylbutane refroidi à -50°C par de la carboglace. Il est ensuite sectionné au cryostat (Microm, France) à -20°C, en coupes frontales sériées de 30 µm d'épaisseur, du télencéphale basal jusqu'au bulbe rachidien caudal. Les coupes flottantes sont recueillies dans des puits de boîtes de culture remplis d'une solution cryoprotectrice dépourvue de RNase (DEPC 0,05%, Glycérol 20%, Ethylène Glycol 30% dans du tampon potassium phosphate 50 mM pH 7,4). Les coupes sont alors conservées à -20°C.

VI – Utilisation du proto-oncogène c-FOS comme marqueur d'activation neuronale

Dans le cadre de notre étude, l'utilisation de la CTb nous permet de déterminer les afférences à notre structure d'intérêt. Cependant, il est indispensable de savoir parmi toutes ces afférences lesquelles sont spécifiquement actives durant le SP.

Un moyen de répondre à cette question est l'utilisation d'un marqueur dit d'activité neuronale, et repose sur le fait qu'en plus d'une réponse de type électrique, la stimulation d'un neurone peut engendrer une réponse de type moléculaire. En effet, l'activation de nombreux récepteurs membranaire entraine une cascade de seconds messagers intracellulaires (kinases, phosphatases, Ca^{2+}, etc.) se terminant par l'expression de facteurs de transcription aussi appelés gènes d'activation précoce (IEG pour immediate early genes). Une fois traduits, ces IEG sont responsables de la transcription de nombreux autres gènes codant pour diverses protéines (récepteurs, canaux ioniques, protéines du cytosquelette, enzymes de synthèse des neurotransmetteurs, etc.) qui permettent la mise en place des réponses physiologiques adaptées. Par conséquent, l'étude des IEG est un moyen détourné permettant l'étude de l'activation d'une ou plusieurs populations neuronales (Kovacs, 2008). Dans le système nerveux central, de nombreux IEG ont été identifiés

(ZIF268, c-FOS, JUN, etc.) et le proto-oncogène c-FOS est l'un des plus utilisés pour la visualisation *in situ* des structures cérébrales activées lors d'une stimulation aigue.

Le gène *c-fos* code pour une protéine de 55kDa et son niveau d'expression est modulé par l'activité neuronale. En effet la stimulation d'un neurone entraine la surexpression de l'ARNm de *c-fos* dont le pic est observé environ 30 min après le stimulus alors que le pic d'expression de la protéine est observé entre 90 et 120 min après le stimulus (Kovacs, 2008). Bien que l'expression de c-FOS ne soit pas strictement corrélée au taux de décharge du neurone, ce marqueur a été utilisé à de très nombreuses reprises dans le cadre de l'étude du cycle veille-sommeil. En particulier, la corrélation entre l'expression de c-FOS et les quantités d'éveil, de SL ou de SP dans différents paradigme expérimentaux a permis de discriminer les neurones actifs durant l'éveil (Scammell *et al.*, 2000; Estabrooke *et al.*, 2001) de ceux actifs durant le SL (Sherin *et al.*, 1996) et de ceux actifs durant le SP (Yamuy *et al.*, 1993; Maloney *et al.*, 1999; Morales *et al.*, 1999; Maloney *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2002; Maloney *et al.*, 2002; Boissard *et al.*, 2003; Verret *et al.*, 2003; Verret *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2006b; Verret *et al.*, 2006; Leger *et al.*, 2009; Sapin *et al.*, 2009; Sapin *et al.*, 2010).
Le proto-oncogène c-FOS apparait donc comme un bon outil pour l'étude des populations neuronales impliquées dans la régulation des états de vigilance et en particulier du SP. En effet, sa détection est aisée (immunohistochimie), permet l'analyse exhaustive et comparative de l'ensemble de l'encéphale et peut être couplée à de nombreux marqueurs permettant ainsi de caractériser les neurones activés (zones de projections,

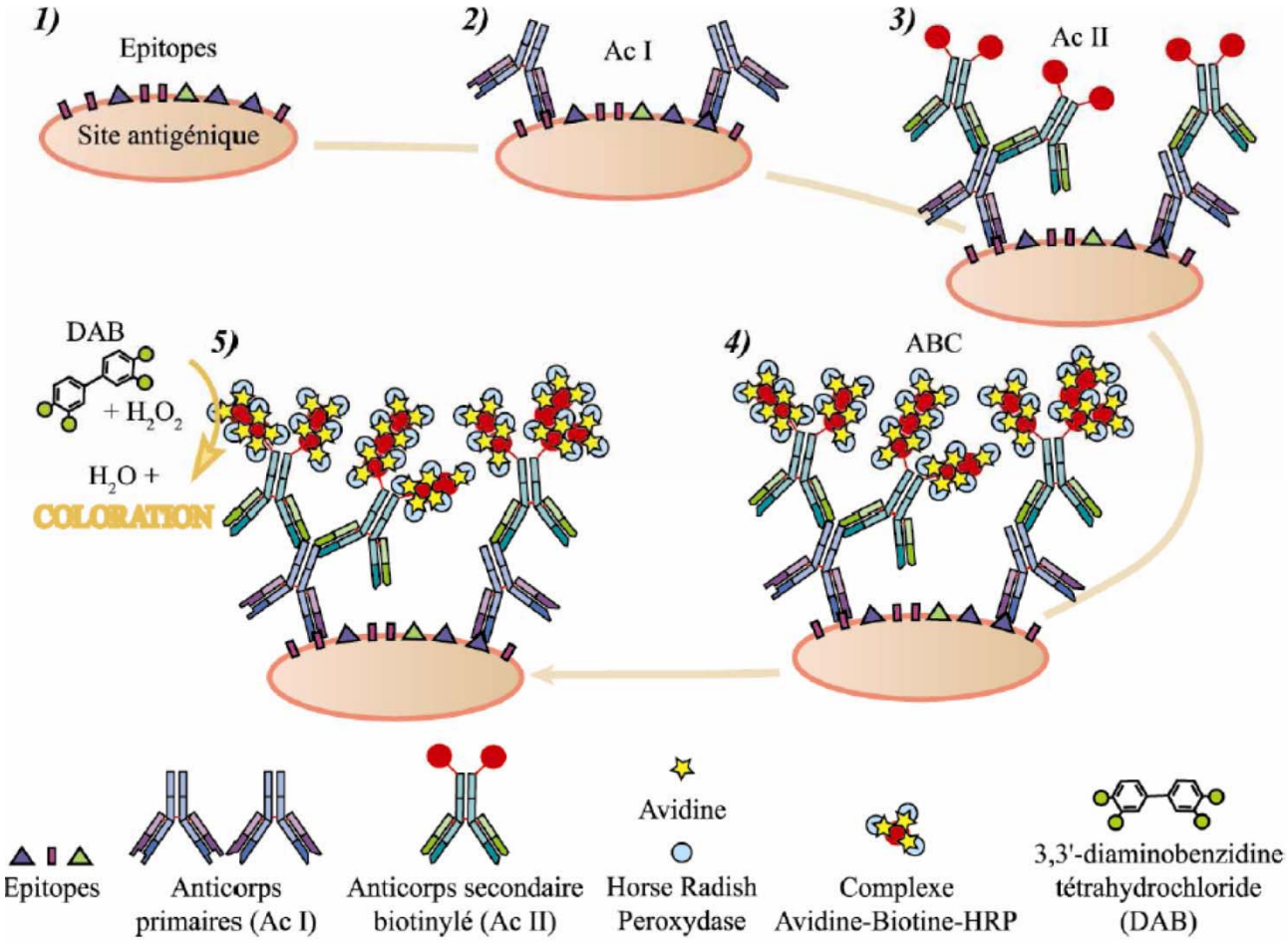


Figure 2 : Schéma explicatif du principe de l'immunohistochimie telle qu'utilisée au cours de cette thès
Certains épitopes présents à la surface de l'antigène cible **(1)** sont reconnus spécifiquement par l'anticorps primaire polyclonal **(2)**. L'anticorps secondaire, biotinylé et dirigé contre l'espèce chez laquelle l'anticorps primaire a été produit, se fixe sur ce dernier **(3)**. Le couplage entre biotine, avidine et HRP forme un complexe macromoléculaire enzymatique ABC **(4)**. La présence de ce complexe est révélée par la dégradation du peroxyde d'hydrogène par la HRP permettant l'oxydation de la DAB et la formation d'un précipité coloré **(5)**. D'après Ravassard, 2009.

nature neurochimique,etc.).

VII – Immunohistochimie

VII.1 – Principe de l'immunohistochimie

Basée sur la spécificité de liaison des anticorps (Ac), l'immunohistochimie permet de révéler la présence *post-mortem* d'un antigène cible au sein d'un tissu. C'est antigène peut être endogène (enzyme de synthèse, neurotransmetteur, récepteur, etc.) comme exogène (particule virale, traceur, protéine rapporteuse, etc.).

La première étape correspond à la fixation un Ac dit primaire sur l'antigène, cet Ac pouvant être monoclonal (fixation sur un seul épitope) ou polyclonal (fixation sur plusieurs épitopes). Si cet Ac est directement couplé à une molécule rapporteuse (enzyme, élément radioactif, fluorochrome) qui permet de révéler la présence de l'antigène, on parle d'immunohistochimie directe. Cependant, l'intensité d'une telle révélation est souvent trop faible et une étape d'amplification du signal est donc généralement requise. On parle alors d'immunohistochimie indirecte. Pour cela, un second Ac (Ac secondaire, Ac) dirigé contre l'Ac primaire est utilisé. C'est en général un Ac polyclonal dirigé contre l'espèce chez laquelle l'Ac primaire a été produit. Plusieurs Ac secondaires pouvant se fixer sur un seul Ac primaire, l'intensité du marquage obtenue est donc augmentée.

En microscopie optique, la technique de révélation la plus courante utilise la péroxydase du Raifort (Horse Radish Peroxydase, HRP) qui transforme son substrat, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau (H2O), libérant ainsi un proton H^+. Ce dernier permet alors l'oxydation de la molécule rapporteuse choisie, molécule dont la forme oxydée présente une coloration permettant ainsi son observation. Dans cette thèse, nous avons utilisé la 3,3' diaminobenzidine tétrahydrochloride (DAB) dont la forme oxydée forme un précipité insoluble marron sauf si il est mis en présence de nickel lors de sa formation : dans ce cas il devient noir. Cette particularité permet de la révélation successive sur un même tissu de deux marqueurs permettant ainsi la mise en évidence de colocalisations.

Dans le but d'accroître la qualité et la sensibilité du signal observé, l'utilisation du complexe avidine-biotine permet d'augmenter la fixation de la HRP sur l'Ac secondaire. En effet, comme son nom l'indique, l'avidine a une forte affinité pour la biotine et possède 4 sites de liaison pour celle-ci. L'utilisation d'Ac secondaires et de HRP biotinylés permet donc la création d'un complexe macromoléculaire de biotine, d'avidine et de HRP couplé à l'Ac secondaire. Le principe de l'immunohistochimie tel qu'il a été utilisé au cours de cette thèse est illustré en **Figure 2**.

VII.2 – Anticorps utilisés

Lors de la réalisation d'un double marquage, l'utilisation d'Ac primaires produits chez différentes espèces est généralement recommandé afin d'éviter tout risque de réaction croisée, ce que nous n'avons malheureusement pas toujours pu faire durant cette thèse. Toutefois, l'utilisation de deux marqueurs, l'un cytoplasmique révélé en marron et l'autre nucléaire révélé en noir nous a permis de nous affranchir de ce problème. De plus, les marquages obtenus ne semblaient pas montrer de réaction croisée, ce qui pourrait être dû au délai séparant les 2 marquages.

		Caractéristiques	Espèce d'origine	Dilutions utilisées	Référence
Ac primaires	**c-FOS**	sérum immun (polyclonal)	lapin	DAB : 1/10000	Merck PC38 (Ab-5)
	CTb	sérum immun (polyclonal)	chèvre	DAB : 1/40000 Fluo : 1/10000	Merck 227040
	MCH	sérum immun (polyclonal)	lapin	DAB : 1/20000 Fluo : 1/5000	Phoenix Pharmaceuticals Inc. H-070-47
	HCRT	Ac polyclonal purifié	chèvre	DAB : 1/5000	Santa Cruz Biotechnology Inc. sc-8070
	TH	sérum immun (polyclonal)	lapin	DAB : 1/5000	Jacques Boy,
	5-HT	Ac monoclonal	souris	DAB : 1/300000	Y. Charnay (Leger *et al.*, 1998)
Ac secondaires	**Anti-lapin**	IgG biotinylé (polyclonal)	chèvre	DAB : 1/1000	Vector Laboratories BA-1000
	Anti-chèvre	IgG biotinylé (polyclonal)	cheval	DAB : 1/1000	Vector Laboratories BA-9500
	Anti-lapin fluo	conjugué α488 (polyclonal)	âne	1/500	Invitrogen A-21206
	Anti-chèvre fluo	conjugué α546 (polyclonal)	âne	1/500	Invitrogen A-11056

VII.3 – Protocole utilisé pour le double marquage DAB

Immédiatement avant le début du protocole, les coupes flottantes sont sorties du milieu de cryoprotection et rincées 3 fois 10 minutes dans du PBST (PB 10 mM pH 7,4, NaCl 0,9 %, Triton X100 0,3%). Elles sont ensuite incubées 3 jours à 4 °C dans du PBST-Az (PBST, Azide 0.1 %) contenant l'Ac primaire dilué (voir tableau ci-dessus pour les dilutions). Après 3 rinçages de 10 minutes dans du PBST, elles sont incubées 90 min à température ambiante dans l'anticorps secondaire adéquat dilué dans du PBST. Puis elles sont à nouveau rincées 3 fois 10 minutes dans du PBST avant d'êtres incubées 90 minutes à température ambiante dans une solution contenant le complexe Avidine-Biotine-Horse Radish Peroxydase (1:1000; Elite kit, Vector Laboratories, CA) dilué dans du PBST. Elles sont ensuite rincées 3 fois 10 min dans du PBST et la révélées dans une solution de Tris-HCl 0,05 M à pH 7,6 contenant 0,025% de 3,3'-diaminobenzidine tétrahydrochloride (DAB, Sigma-Aldrich), 5 $mg.ml^{-1}$ d'ammonium nickel et 0,003% de H_2O_2 ajouté extemporanément. La réaction est contrôlée en permanence sous le microscope pour être arrêtée lorsque le rapport signal sur bruit de fond est maximal. L'arrêt de la réaction se fait par 3 rinçages successifs dans du PBST-Az.

Dans le cas d'un double marquage, les coupes sont laissées dans du PBST-Az durant 3 jours avant que le second marquage ne soit réalisé. Le même protocole est utilisé à l'exception de la révélation qui doit être faite en absence d'ammonium nickel.

Une fois la réaction terminée, les coupes sont montées sur des lames histologiques de verre gélatinées, déshydratées et montées sous lamelles avec de la colle Depex (**VWR, France**).

VII.4 – Protocole utilisé pour le triple marquage DAB/fluorescence

Pour le triple marquage c-FOS/CTb/MCH, les coupes sont tout d'abord soumises au protocole ci-dessus pour la révélation du c-FOS à l'aide de la DAB avant d'être laissées 3 jours à 4 °C dans du PBST-Az. Les coupes sont ensuite incubées 3 jours à 4 °C en présence des Ac anti-MCH et anti-CTb dans du PBST-Az. Après 3 rinçages de 10 min dans du PBST, elles sont incubées 2 h, à température ambiante et à l'abri de la lumière, dans du PBST contenant les Ac secondaires anti-lapin et anti-chèvre couplés à leurs fluorochromes. Enfin, toujours en les protégeant de la lumière, les coupes sont rapidement montées sur des lames de verre, séchées (20 min maximum) et montées sous lamelles à l'aide de Mowiol 4-88 **(**Merck, Allemagne). L'analyse au microscope se fait le plus rapidement possible et les lames sont stockées à l'abri de la lumière à 4 °C afin d'empêcher la détérioration des fluorochromes.

VIII – Immuno-détection de c-FOS couplé à l'hybridation *in situ* de *vglut2*

VIII.1 – Principe de l'hybridation *in situ*

L'hybridation *in situ* (HIS) a pour but de révéler la présence, ou l'absence, d'une séquence d'ARN (ou d'ADN) au sein d'une cellule. Son principe repose sur l'hybridation de deux séquences d'acides nucléiques complémentaires : l'une exogène et marquée (sonde) et l'autre endogène (celle que l'on souhaiter visualiser). Les sondes utilisées peuvent être de l'ADN, de l'ARN (ribosonde) ou des oligonucléotides synthétiques (de 20 à 50 nucléotides) mais doivent dans tous les cas êtres marquées afin de permettre leur localisation. Ce marquage peut être réalisé à l'aide d'isotopes radioactifs (« sondes chaudes », Tritium ^{3}H, Phosphore ^{32}P ou ^{33}P, soufre ^{35}S) ou de molécules non radioactives (« sondes froides ») fluorescentes ou non (biotine, digoxigénine, phosphatase alcaline, etc.). Si la révélation des sondes chaudes par autoradiographie permet une étude quantitative, cette méthode est, du fait de la radioactivité, beaucoup plus contraignante à mettre en œuvre et présente une moins bonne résolution spatiale. A contrario l'HIS à l'aide de sondes froides (révélation colorimétrique) est plus facile à mettre en œuvre et présente une meilleure résolution spatiale mais est moins sensible et non quantitative.

Dans notre cas, il s'agit de vérifier la nature neurochimique d'un neurone et donc de déterminer si celui-ci exprime ou non un marqueur spécifique. Par conséquent, nous avons réalisé l'HIS d'un ARNm. Pour un tel marquage, l'utilisation de ribosondes a l'avantage d'être plus spécifique et plus stable que des oligonucléotides, mais possède l'inconvénient d'une pénétration plus faible. Au vues des avantages et inconvénients expliqués ci-dessus, nous avons utilisé une sonde froide marquée à la digoxigénine dont la révélation est permise grâce à l'utilisation d'un Ac anti-digoxigénine couplé à la phosphatase alcaline (**Figure 3A**). Comme montré en **Figure 3B,** cette enzyme permet une réaction d'oxydoréduction entre le nitroblue tetrazolium (NBT) et le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP) dont le produit final forme un précipité coloré bleu foncé.

VIII.2 – Sondes utilisées

Pour l'ensemble de ces travaux, des sondes dirigées contre 3 gènes d'intérêts ont été utilisées : v*glut2* (transporteur vésiculaire du glutamate, marqueur spécifique des neurones glutamatergiques), *gad65*, *gad67* (isoformes de 65 et 67 kDa de la glutamate décarboxylase, enzyme de synthèse du GABA, marqueur des neurones GABAergiques) et *glyt2* (transporteur de la glycine, marqueur des neurones glycinergiques). Pour chaque gène cible, les sondes anti-sens (dont la séquence complémentaire de celle de l'ARNm permet

l'hybridation et donc la révélation des neurones exprimant l'ARNm) et sens (dont la séquence identique à celle de l'ARNm ne permet pas l'hybridation et sert donc de contrôle) ont été synthétisées.

Les sondes dirigées contre *vglut2* et *gad67* ont été synthétisées à partir de plasmides linéarités que nous possédions déjà au sein du laboratoire. Les séquences de *vglut2* et *gad67* sont insérées respectivement dans les plasmides pCRII-TOPO (Invitrogen, UK) et pRY20 (Roche, Suisse). Chaque insert de respectivement 539 et environ 1800 pdb est encadré des promoteurs SP6 et T7. Pour la synthèse des sondes anti-sens et sens de *vglut2*, le plasmide est linéarisé respectivement par Not I et Hind III, puis transcrit par les polymérases SP6 et T7 respectivement. En ce qui concerne *gad67*, la linéarisation du plasmide est réalisée par EcoR V, la sonde anti-sens est alors transcrite à l'aide de SP6 et la sens à l'aide de T7. La synthèse des sondes marquées à la digoxigénine est faite à l'aide du kit DIG RNA labelling Kit (Roche) suivant les recommandations du fabricant.
Comme nous ne possédions pas de plasmide avec la séquence de *gad65* ou de *glyt2*, nous avons importé au sein du laboratoire une nouvelle technique qui permet une synthèse rapide de ribosondes et qui ne nécessite ni clonage ni de bactériologie (Gandrillon *et al.*, 1996). Brièvement, à partir d'une banque d'ADNc corticale de rat, un fragment d'ADN du gène de *gad65* est amplifié par PCR. Les amorces, en plus de contenir une portion de la séquence génique contiennent, pour l'une la séquence du promoteur de T7, et pour la seconde

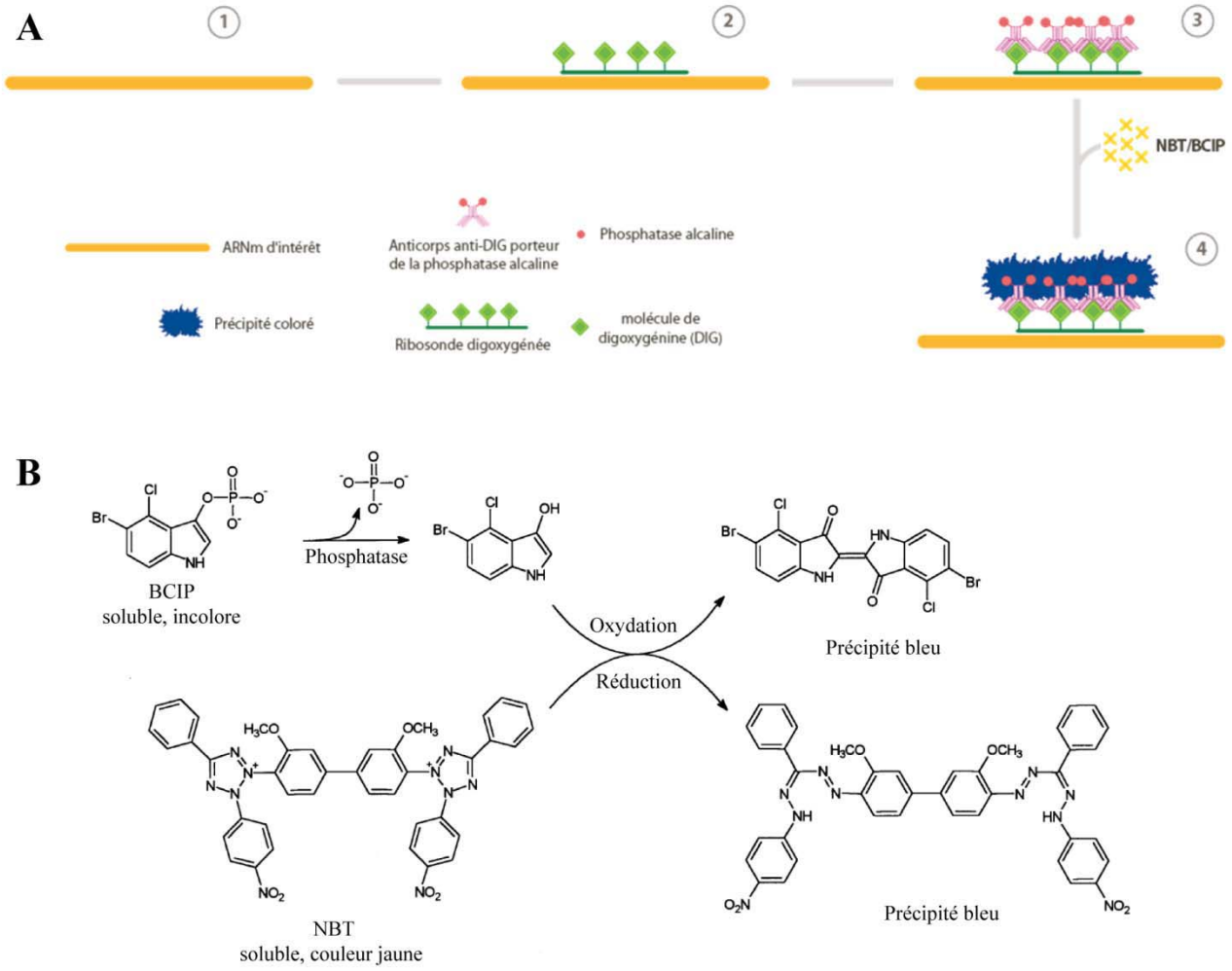


Figure 3 : Principe de l'hybridation *in situ* telle qu'utilisée au cours de cette thèse
(A) L'ARNm d'intérêt **(1)** est reconnu par la ribosonde marquée à la digoxigénine qui s'y hybride **(2)**. Ce complexe est ensuite reconnu par l'anticorps secondaire anti-digoxigénine couplé à la phosphatase alcaline **(3)**. L'ajout final de NBT/BCIP permet alors la formation d'un précipité bleu foncé **(4)**. D'après Sapin, 2009.
(B) Réaction chimique entre le NBT et le BCIP initiée par la phosphatase alcaline et amenant la formation d'un précipité insoluble bleu.

celle de SP6 (taatacgactcactatagggtatgcgctctgctctacgga et tatttaggtgacactatagcaggggcgatctcatcggta pour *gad65* ; taatacgactcactatagggcaagtgtgtccgattctggtct et tatttaggtgacactatagactcactcgtgtcagaaccttg pour *glyt2* ; les parties soulignées correspondent aux promoteurs respectifs de T7 et SP6). Le fragment ainsi obtenu permet alors la synthèse des ribosondes à l'aide du kit évoqué ci-dessus.
Une fois synthétisées, les sondes sont dosées et stockées à -20°C à une concentration de 0,03 $\mu g.\mu l^{-1}$ dans du milieu d'hybridation (voir ci-dessous pour sa composition).

VIII.3 – Protocole utilisé pour l'hybridation *in-situ*

Toutes les solutions utilisées durant ce protocole doivent être exemptes de RNAse afin de limiter la dégradation des sondes ainsi que des ARNm que l'on souhaite révéler.

Les coupes sont rincées 3 fois 10 min dans une solution de citrate de sodium (SSC 2X) avant d'être incubées la nuit dans une chambre humide à 65 °C dans le tampon d'hybridation (NaCl 150 mM, Tris-HCl 8 mM, Tris-Base 1 mM, NaH_2PO_4 6 mM, Na_2HPO_4 5 mM, EDTA 5 mM, formamide déionisé 50 %, dextran sulphate 10 %, yeast tRNA 1 $mg.ml^{-1}$ (Sigma type III, Sigma-Aldrich), ficoll 0,02 %, polyvinylpyrrolidone 0,02 %) contenant la ribosonde anti-sens marquée à la digoxigénine (0,7 $\mu g.ml^{-1}$). Les coupes sont ensuite rincées 2 fois 20 min à 55°C dans une solution de SSC 1X, formamide 50 %, Tween-20 0,1 %. Puis, elles sont incubées 15 minutes à 37°C en présence de RNAse A (10 $\mu g.ml^{-1}$, USB, OH) dans une solution de Tris 10 mM (pH 8.0) contenant 1 mM d'EDTA et 500 mM de NaCl. Les coupes sont ensuite rincées 3 fois 10 min dans du tampon PBST et incubées la nuit à température ambiante avec l'anticorps anti-digoxigénine couplé à la phosphatase alcaline et dilué au 1/2000 dans du PBST contenant 0,2 % d'agent bloquant (Blocking Reagent, Roche). Les coupes sont par la suite rincées 2 fois 10 min dans du PBST, 1 fois 10 min dans du PBS et 10 min supplémentaires dans du tampon de révélation (Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 150 mM, $MgCl_2$ 1 mM et Tween-20 0,1 %). Enfin, les coupes sont incubées à l'abri de la lumière dans le même tampon de révélation contenant le NBT/BCIP dilué au 1/50 (NBT/BCIP Stock Solution, Roche). L'avancée de la réaction est contrôlée régulièrement sous microscope et est arrêtée lorsque le rapport signal sur bruit de fond est maximal. La réaction est arrêtée par 3 lavages successifs dans du PBST-Az. Les coupes sont finalement disposées sur des lames histologiques en verre et montées sous lamelles à l'aide de Vectamount (Vector Laboratories).

Des marquages contrôles sont réalisés à l'aide des sondes sens afin de contrôler la spécificité du marquage obtenu.

VIII.4 – Couplage de l'immunohistochimie du c-FOS avec l'hybridation *in situ* de *vglut2* ou *gad65*

Afin de conserver l'intégrité de la structure protéique qui pourrait être altérée par les traitements nécessaires à la réalisation de l'hybridation *in situ*, le marquage immunohistochimique est effectué en premier. Tous les tampons d'immunohistochimie doivent donc être dépourvus de RNAse. Ils sont donc autoclavés et 0,2 % d'inhibiteur de RNase (ProtectRNA RNase inhibitor, Sigma-Aldrich) sont rajoutés extemporanément. Seul le tampon de révélation contenant la DAB ne contient pas d'inhibiteur de RNAse. Une fois la révélation dans ce tampon terminée, les coupes sont rincées 2 fois 10 min dans du PBST dépourvu d'inhibiteur de RNase et contenant 10 mM de dithio-threitol (DTT, Sigma-Aldrich). Le protocole d'hybridation *in situ* décrit ci-dessus est alors suivi. Toutefois, seuls 2 rinçages dans le tampon SSC 2X sont réalisés et ce dernier contient également 0.2 % d'inhibiteur de RNAse. En fin de protocole, les coupes sont montées à l'aide de Vectamount (Vector Laboratories).

IX – Analyse des résultats

IX.1 – Analyse du cycle veille-sommeil et analyse spectrale

L'analyse des états de vigilance est réalisée *a postériori* sous le logiciel Spike 2 et avec des scripts développés au sein du laboratoire. Cette analyse est visuelle, semi-automatique et séquentielle (par plages d'analyse de 5 sec). Bien que visuelle, la présence d'un spectre de fréquence pour chaque période de 5 sec fournit une aide à la décision pour les épisodes ambigus. Les états de vigilance sont déterminés selon les critères classiques rappelés ci-dessous :

- Eveil: l'EEG est de faible amplitude et activé ou "désynchronisé". Des activités de hautes fréquences ("40 Hz") sont observées ainsi que des ondes thêta (5-9 Hz). L'EMG varie suivant l'activité motrice de l'animal. On observe une activité musculaire tonique ample avec de nombreux événements phasiques au cours de l'éveil actif et un tonus musculaire plus faible avec de rares secousses pendant l'éveil calme.
- Sommeil lent : l'EEG est dit « synchronisé » : son amplitude est importante et il présente des oscillations très lentes, les ondes delta (0.5-4 Hz), des fuseaux (10-14 Hz) mais pratiquement plus de fréquences rapides. L'activité musculaire est faible et sans aucune bouffée phasique.
- Sommeil paradoxal : l'EEG, similaire à celui de l'éveil, est désynchronisé, rapide et de faible amplitude. Il présente une périodicité marquée autour de 5-9 Hz correspondant au rythme thêta. L'activité musculaire est très faible (atonie) avec parfois de brèves bouffées phasiques ("twitches").

En plus de l'analyse quantitative des états de vigilance, nous avons souhaité au cours de cette thèse caractériser qualitativement certains états de vigilance et nous avons pour cela eu recours à l'analyse spectrale. Cette analyse nécessite le scorage préalable des différents états de vigilance. Pour l'état de vigilance souhaité, nous avons sélectionné la période durant laquelle nous souhaitions réaliser cette analyse. Sur cette période, nous avons retiré de l'analyse 10 sec de part et d'autre de chaque transition entre deux états de vigilance afin de n'analyser que des états « purs ». Puis, pour chaque phase de 5 sec de cet état, un spectre de fréquence a été généré à l'aide d'une transformée rapide de Fourier (analyse des fréquences comprises entre 0,6 et 120 Hz, avec une résolution de 0,24 Hz). Un spectre de fréquence global a ensuite été généré sur l'ensemble de la période souhaitée par la sommation de tous les spectres unitaires. Enfin, un spectre de fréquence relatif est créé en normalisant la puissance de chaque intervalle de fréquence (bin de 24 Hz) par rapport à la puissance totale du spectre. Ces spectres relatifs peuvent ensuite être moyennés pour tous les animaux d'un même groupe ce qui permet la comparaison entre différents groupes comportementaux.

Pour chaque gamme de fréquence (delta, 0.5 - 4.6 Hz ; thêta, 5.1 - 8.9 Hz ; sigma, 9.9 - 14 Hz ; beta, 15 - 30 Hz ; gamma1, 39.9 – 48.1 Hz ; gamma2, 51.9 – 120 Hz), la puissance relative de celle-ci est également calculée en sommant la somme des puissances de tous les bins compris dans cette gamme de fréquence et en la normalisant par rapport à la puissance totale du spectre. L'analyse spectrale permet également la détermination des fréquences majoritaires pour chaque gamme de fréquence.

IX.2 – Analyse des résultats histologiques

Une cartographie de la distribution des neurones marqués est tout d'abord réalisée. Pour cela, des coupes sont sélectionnées de manière à obtenir un échantillon représentatif de l'ensemble de l'encéphale, ou de la région d'intérêt. Dans le cas de l'étude des afférences à la VLPAG/DpMe, les deux hémisphères ont été analysés afin de déterminer les projections contra et ipsilatérales. Dans tous les autres cas, un seul hémisphère a été analysé puisque les 2 hémisphères sont théoriquement symétriques. Les sections

sélectionnées sont analysées à l'aide du système d'analyse Mercator (Explora Nova, France) connecté à un microscope Zeiss dont la platine est motorisée en X et en Y. Les contours des coupes et des structures sont dessinés à faible grossissement alors que les neurones marqués sont pointés à plus fort grossissement. Pour chaque région cérébrale, le nombre de neurones pointés est calculé. Dans le cas où une structure est présente sur plusieurs sections, le nombre total de neurones marqués correspond à la somme des neurones comptés sur chaque section.

En ce qui concerne le triple marquage c-FOS/CTb/MCH, l'utilisation de la fluorescence ne permet pas une analyse longue sur un logiciel tel Mercator. Pour pallier cette difficulté, des images composées ont été prises de l'ensemble de l'hypothalamus postérieur situé ipsilatéralement à l'injection de CTb. Ces images ont été réalisées à l'aide du logiciel Mosaïc (Explora Nova). Pour chaque coupe analysée, 3 photographies successives sont prises (pour c-FOS, MCH et CTb) sans modification de la région photographiée ou de la mise au point. Ces images sont ensuite exportées et superposées sous Adobe Illustrator (**Adobe, CA**) ce qui permet le comptage des neurones immunoréactifs. De la même manière, le nombre total de neurones est compté pour une structure donnée à travers les différentes coupes.

X – Statistiques

L'analyse statistique de l'ensemble des données de cette thèse a été réalisée à l'aide du logiciel StatView. Etant donné la faible taille d'échantillon dont nous disposons (8 individus au maximum par groupe), l'utilisation de statistiques paramétriques est impossible puisque la normalité de la variable ne peut être testée. Par conséquent, toutes les comparaisons ont été réalisées à l'aide de tests non-paramétriques.

Dans le cas de la comparaison d'une variable entre les trois groupes PSC, PSD et PSR, un test de Kruskal-Wallis a tout d'abord été réalisé, puis les comparaisons post-hoc deux à deux ont été faites à l'aide d'un test de Mann-Whitney.

Pour analyser les effets des injections pharmacologiques, tant sur les quantités des différents états de vigilance que sur les caractéristiques de l'EEG, un test de Wilcoxon a été utilisé puisque les différents échantillons sont appariés.

Enfin, les effets de l'application locale de muscimol sur les différents marqueurs histologiques étudiés ont été comparés à la condition contrôle (NaCl) grâce à un test de Mann-Whitney.
Pour toutes ces analyses, nous avons considéré un risque α de 5 % comme acceptable pour conclure à une différence significative entre différentes populations.

RESULTATS

CHAPITRE I – Détermination de la nature neurochimique des neurones du SLD, noyau responsable de la mise en place du SP

Comme nous l'avons rappelé précédemment, le noyau sublatérodrosal (ou SLD) est un acteur majeur de la mise en place du SP chez le rat. Il serait responsable de l'inhibition des motoneurones via ses projections sur le GiV, et de l'activation corticale via ses projections sur le noyau intralaminaire du thalamus. Toutefois, la nature neurochimique de ces neurones n'est pas encore connue avec certitude. Durant de longues années ils ont été supposés cholinergiques (Shiromani and Fishbein, 1986; Sakai and Koyama, 1996; Shiromani *et al.*, 1996; Maloney *et al.*, 1999), mais des résultats plus récent sont venus contredire cette hypothèse. En effet, peu de neurones cholinergiques expriment le marqueur c-FOS après une profonde hypersomnie de SP (Verret *et al.*, 2005) et contrairement au chat, l'application d'un agoniste cholinergique au sein du SLD du rat n'induit pas d'augmentation de SP (Boissard *et al.*, 2002). Plus récemment, l'hypothèse que ces neurones seraient de nature GABAergique a été formulée (Lu *et al.*, 2006b). Mais celle-ci a également été mise en défaut puisque les neurones du SLD exprimant le c-FOS après une hypersomnie de SP ne sont pas de nature GABAergique (Sapin *et al.*, 2009). De plus, ces deux possibilités ne tenaient pas compte d'un certain nombre d'observations expérimentales.

En particulier, les concentrations extracellulaires en glutamate augmentent durant le SP dans le GiV, région recevant de nombreuses projections du SLD (Kodama *et al.*, 1998; Boissard *et al.*, 2002), et l'application d'antagoniste glutamatergique dans le GiV empêche l'atonie musculaire normalement induite par la stimulation pharmacologique du SLD (Lai and Siegel, 1988). Ces résultats laissent donc penser que les neurones du SLD impliqués dans la mise en place du SP pourraient être de nature glutamatergique.
Dans le but de tester cette hypothèse, nous avons couplé l'hybridation *in situ* de *vglut2*, marqueur des neurones glutamatergiques, avec l'immunohistochimie du c-FOS chez des rats contrôles, privés de SP pendant 72h par la méthode de la piscine, et des rats réalisant une hypersomnie de SP consécutive à cette même privation.

Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans la revue Sleep.

Evidence that Neurons of the Sublaterodorsal Tegmental Nucleus Triggering Paradoxical (REM) Sleep Are Glutamatergic

Olivier Clement, MSc[1,2]; Emilie Sapin, PhD[1,2,3]; Anne Bérod, PhD[2,4]; Patrice Fort, PhD[1,2]; Pierre-Hervé Luppi, PhD[1,2]

[1]CNRS, UMR 5167, Physiopathologie des réseaux neuronaux du cycle veille-sommeil, Lyon, France; [2]Institut fédératif des neurosciences de Lyon (IFNL, IFR19), Université Lyon 1, Université de Lyon, Lyon, France; [3]INSERM, ERI 17, Laboratoire HP2, Université de Grenoble, Université Joseph Fourier, Grenoble, France; [4]CNRS, EAC5006, Pharmacologie et Imagerie de la neurotransmission sérotoninergique, Lyon, France

Study Objectives: To determine whether sublaterodorsal tegmental nucleus (SLD) neurons triggering paradoxical (REM) sleep (PS) are glutamatergic.
Design: Three groups of rats were used: controls, rats deprived of PS for 72 h, and rats allowed to recover for 3 h after deprivation. Brain sections were processed for double labeling combining Fos immunohistochemistry and vesicular glutamate transporter 2 (vGLUT2) *in situ* hybridization.
Measurements and Results: The number of single Fos+ and Fos/vGLUT2+ double-labeled neurons was counted for each experimental condition. A very large number of Fos+ neurons expressing vGLUT2 mRNA specifically after PS hypersomnia was counted in the SLD. These double-labeled cells accounted for 84% of the total number of Fos+ cells.
Conclusions: This finding adds further evidence to the concept that PS-on neurons of the SLD generating PS are of small size and glutamatergic in nature. By means of their descending projections to medullary and/or spinal glycinergic/GABAergic premotoneurons, they may be especially important for the induction of muscle atonia during PS, a disturbed phenomenon in narcolepsy and REM sleep behavior disorder.
Keywords: REM sleep behavior disorder, Parkinson, brainstem reticular formation, cataplexy, hypocretin
Citation: Clement O; Sapin E; Bérod A; Fort P; Luppi PH. Evidence that neurons of the sublaterodorsal tegmental nucleus triggering paradoxical (REM) sleep are glutamatergic. *SLEEP* 2011;34(4):XXX-XXX.

INTRODUCTION

Based on lesion, local pharmacological unit recordings, and Fos staining studies, it is now well accepted that paradoxical sleep (PS, also known as REM sleep) induction and maintenance are due to the activation of neurons located in a small pontine nucleus named sublaterodorsal tegmental nucleus (SLD) in rats.[1,2] However, the neurochemical nature of these PS-generating neurons is still a matter of debate. It was long thought that they were cholinergic,[3] and it was more recently proposed that some of them might be GABAergic.[4] However, we found that SLD neurons activated after PS hypersomnia express neither choline acetyltransferase, the enzyme of synthesis of acetylcholine,[5] nor glutamate decarboxylase, that of GABA.[6] A few studies suggested that SLD PS-on neurons might in fact be glutamatergic. Indeed, neurons expressing the vesicular glutamate transporter 2 (vGLUT2), a specific marker of glutamatergic neurons, were observed in the SLD.[4] It was also shown that glutamate release is specifically increased during PS in the nucleus reticularis magnocellularis (Mc),[7] known to receive projections from the SLD and to contain glycinergic premotoneurons responsible for muscle atonia during PS.[1] Moreover, Lai and Siegel showed in cats that local application of glutamate into the Mc induces muscle atonia in a dose-dependent manner. Finally, blockade of glutamatergic transmission by application of kainate or NMDA antagonists into the Mc impaired muscle atonia induced by carbachol infusion into the SLD region.[8] To definitely resolve the issue of the chemical nature of PS-generating neurons, we compared the number of glutamatergic neurons activated in the SLD in control rats, rats deprived of PS for 72 h, and rats allowed to recover during 3 h from that deprivation. To this aim, we developed a new method combining immunodetection of Fos, a marker a neuronal activation, with *in situ* hybridization of the mRNA coding for vGLUT2.

Submitted for publication August, 2010
Submitted in final revised form October, 2010
Accepted for publication October, 2010
Address correspondence to: Pierre-Hervé LUPPI, CNRS UMR 5167, Physiopathologie des réseaux neuronaux du cycle veille-sommeil, Faculté de Médecine Laennec, 7 Rue Guillaume Paradin, 69372 Lyon cedex 08, FRANCE; Tel: +33 (0) 478771040; Fax: +33 (0) 478771022; E-mail: luppi@sommeil.univ-1.fr

METHODS

All experiments were conducted in accordance to the French and European Community guidelines for the use of research animals and approved by the institutional animal care and use committee of the University of Lyon 1 (protocols BH 2006-09 and BH 2006-10). Sprague-Dawley male rats were housed individually in recording barrels under a constant 12h light-dark cycle (light on at 07:00). Room temperature was maintained at 21 ± 1°C, and standard rodent food and water were available *ad libitum* throughout the experiment.

Surgery and Polygraphic Recordings

As previously described,[6] 12 rats (240-260g, Charles River, France) were implanted for electroencephalographic (EEG) and electromyographic (EMG) recordings. After 5 days recovery from surgery and 4 days habituation to the recording conditions, rats were connected to a cable attached to a rotating connector (Plastics One Inc., CT) to allow free movements of the animal within its home cage.

Paradoxical Sleep Deprivation and Recovery

PS deprivation was performed using the inverted flowerpot technique. Rats were divided in 3 groups: controls (PSC), deprived of PS (PSD), and PS hypersomniac (PSR) (n = 4 in each group). PSC animals remained in their standard cage throughout the experiment. After a 48-h baseline recording, PSD and PSR rats were placed (10:00) on a platform surrounded by 2 cm of water for 72 h preventing rats from entering PS. The last

day, PSR animals were removed from the platform (10:00) and were replaced on a dry bed of woodchips to allow PS recovery. All animals were anesthetized for perfusion at approximately 13:00. PSR rats were anesthetized 150 min after the appearance of the first PS episode, occurring approximately 30 min after the animals were put back in their home cage.

Perfusion, Fixation, and Section

Rats were perfused with a Ringer's lactate solution containing 0.1% heparin, followed by 500 ml of a fixative solution composed of 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4). Brains were removed and stored at 4°C for 1 night in the fixative solution and then for 3 days at 4°C in 30% sucrose in 0.1 M PB. Brains were rapidly frozen in methylbutane cooled with dry ice, and 30-µm-thick coronal sections were cut on a cryostat (Microm, France). Free-floating sections were collected and stored at −20°C in an RNase free cryoprotectant solution.

Fos Immunohistochemistry Combined with vGLUT2 mRNA *In Situ* Hybridization

The antisense and sense digoxigenin-labeled probe against vGLUT2 mRNA were synthesized from a recombinant linearized plasmid containing the vGLUT2 cDNA using a nonradioactive RNA labeling kit (Roche Diagnostic, Switzerland). As described before,[6,9] brain sections were successively incubated with a rabbit antiserum to Fos (1:3000; Merck, Germany), a biotinylated goat anti-rabbit IgG solution (1:1000; Vector Laboratories, Burlingame, CA) and an ABC-HRP solution (1:1000; Elite kit, Vector Laboratories). Then sections were immersed for around 15 min in 3,3-diaminobenzidine-4 HCl (DAB, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and 0.003% H_2O_2. They were then rinsed in PBST containing 10 mM dithio-threitol (DTT, Sigma-Aldrich) and in standard saline citrate solution (SSC 2X). Sections were then placed overnight at 65°C in the hybridization buffer containing 0.5 µg/mL of the digoxigenin-labeled probe. Sections were washed in SSC 1X, 50% formamide, 0.1% Tween-20 and treated with RNase A (USB Corporation, Cleveland, OH). Sections were then incubated with an anti-digoxigenin antibody conjugated to alkaline phosphatase (1:2000, Roche Diagnostic). Staining was revealed using nitroblue tetrazolium (NBT) and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP) (Roche Diagnostic). Controls in the absence of primary antibodies (anti-Fos and anti-digoxigenin) or with the sense probe were run to ensure the specificity of the labeling.

Analysis of Sleep-Wake State Data

Vigilance states were discriminated using EEG and EMG data as previously described.[6] For each rat, the last 150 min of EEG/EMG recordings before perfusion were analyzed by 5 sec epochs in order to determine quantities of W, SWS, and PS.

Analysis of Double Labeling

Drawings of double-labeled sections were made with an Axioscope microscope (Carl Zeiss AG, Germany) connected to a computerized image analysis system (Mercator; ExploraNova, France). Single- and double-labeled neurons were plotted on sections taken at 300 µm intervals (between AP -8,7 and -9,3 from bregma). The number of Fos+ and Fos/vGLUT2+ plotted neurons per brainstem structure was automatically counted and exported using Mercator software (ExploraNova). For structures present on several sections, neurons counted on all sections were summed.

Statistical Analysis

Nonparametric analyses of variance (Kruskal-Wallis test) were performed on the vigilance states and on the number of labeled neurons for each structure across experimental conditions (PSC, PSD, and PSR). Post hoc PLSD Mann-Whitney tests were used to identify significant pairwise differences (PSR or PSD *vs* PSC; PSR *vs* PSD). All statistics were performed using StatView software.

RESULTS

Quantification of Sleep

During the last 150 min before sacrifice, rats deprived of PS for 72 h by the inverted flower pot method (PSD animals) showed almost no PS (2.3% ± 2.3%), whereas controls (PSC animals) and animals allowed to recover from the deprivation (PSR animals) spent respectively 7.1% ± 1.8% and 37.4% ± 3.2% of their time in PS. PSR animals spent significantly more time in PS than PSC ($P = 0.0209$) and PSD ($P = 0.0209$) animals, and PSD rats spent significantly less time in PS than PSC rats ($P = 0.0433$). PSR animals displayed less waking (16.1% ± 5.7%) than PSC (49.4% ± 8.5%; $P = 0.0433$) and PSD (66.8% ± 4.6%; $P = 0.0209$) animals. No difference in SWS quantities was observed between the 3 groups of animals (PSC: 43.6% ± 7.0%; PSD: 31.7% ± 3.1%; PSR 46.5% ± 4.5%) (Figure S1).

Localization of the Single-Labeled Fos+ and Fos/vGLUT2+ Double-Labeled Neurons

We focused our analysis on the brainstem level containing the SLD. In agreement with our previous results,[5,6] the lateral parabrachial nucleus (LPB) was the only structure containing significantly more Fos+ neurons in PSD (106.6 ± 22.5) and PSR animals (82.4 ± 9.4) compared to PSC ones (33.0 ± 11.2) (Table S1). In addition, 3 structures, namely the laterodorsal tegmental nucleus (LDTg), the caudal part of the pontine reticular nucleus (PnC), and the SLD contained significantly more Fos+ neurons in PSR than in PSD and PSC animals (Figure 1F and Table S1).

The number of Fos/vGLUT2+ double-labeled cells was significantly increased in the LPB after PS deprivation (72.0 ± 15.4) and PS recovery (55.9 ± 4.8) compared to control (17.0 ± 6.4). These double-labeled cells constituted for both conditions 68% of the total number of Fos+ cells.

In the LDTg and SLD, the number of Fos/vGLUT2+ neurons increased specifically in the PSR condition compared to the PSC and PSD conditions (Table S1). Within the SLD, the number of Fos/vGLUT2+ neurons increased from 2.3 ± 0.8 in PSC and 2.6 ± 0.4 in PSD to 35.6 ± 3.8 in PSR (Figure 1A-C, G and Table S1). Double-labeled cells constituted 84% and 46% of the total number of Fos+ neurons in the SLD and LDTg, respectively. Interestingly, as illustrated in Figure 1E, vGLUT2+ neurons of the SLD that expressed Fos after PS recovery were of small size, whereas large vGLUT2+ neurons almost never expressed Fos.

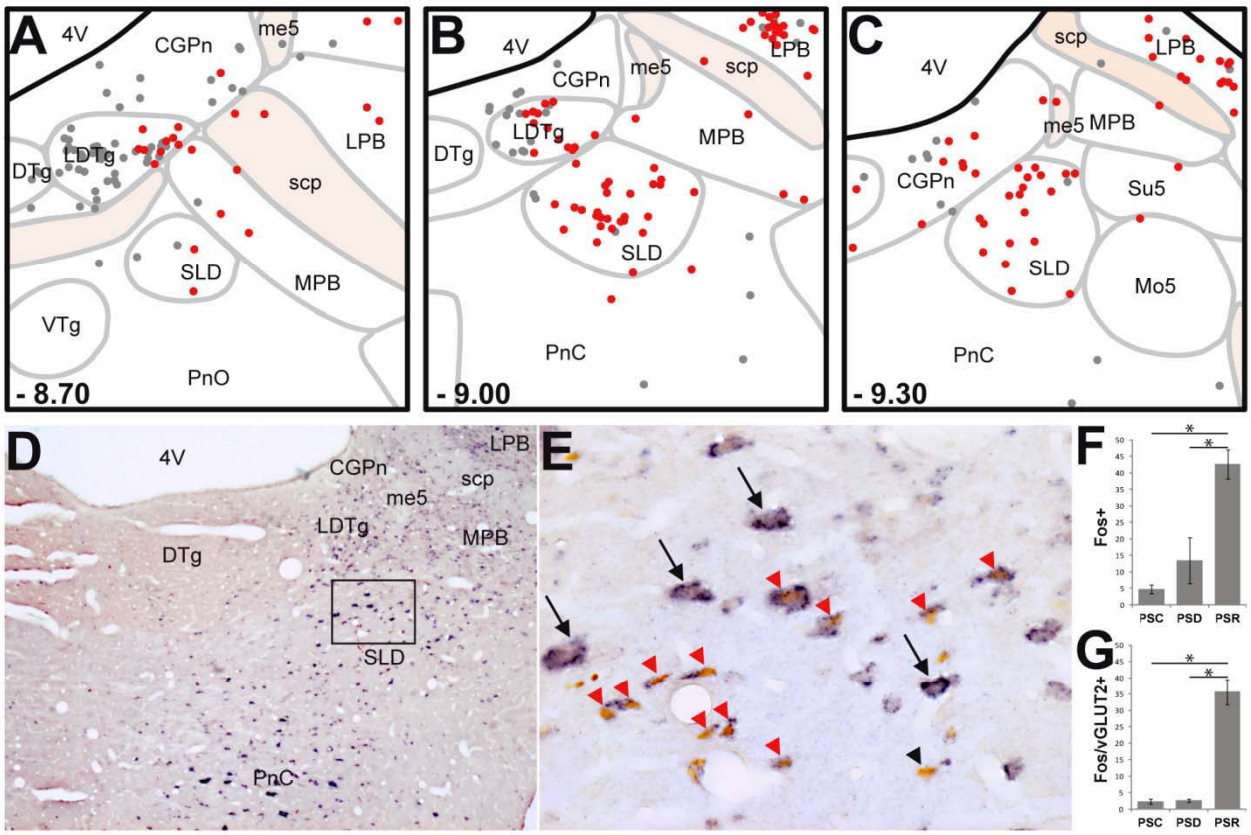


Figure 1—SLD neurons expressing Fos after PS-recovery are mostly glutamatergic. **(A-C)** Schematic distribution of Fos+ (gray dots) and Fos-vGLUT2+ (red dots) neurons on coronal sections taken at 300 µm intervals through the full rostro-caudal extent of the SLD in a representative PSR animal. Rostro-caudal localization of each section is indicated from Bregma at the bottom left corner of each drawing. **(D-E)** Photomicrographs showing Fos (brown nuclear staining) and vGLUT2 (blue diffuse cytoplasmic staining) double staining at SLD level. **(E)** is a higher magnification of the rectangular box in D. Note the dense cluster of double-labeled neurons into the SLD of a PSR rat. Interestingly, most of the large glutamatergic SLD neurons do not express Fos after PS hypersomnia (black arrows). Conversely, double-labeled neurons after PS hypersomnia are rather of small size (red arrowheads). Only one neuron labeled for Fos after PS-hypersomnia does not express vGLUT2 mRNA (black arrowhead). **(F-G)** Number of Fos+ and Fos/vGLUT2+ neurons in the SLD in control (PSC), PS deprived (PSP) and PS recovery (PSR) conditions. Values are mean ± SEM. * indicates $P < 0.05$.
4V, 4th ventricle; CGPn, central gray of the pons; DTg, dorsal tegmental nucleus; LDTg, laterodorsal tegmental nucleus; LPB, lateral parabrachial nucleus; me5, mesencephalic trigeminal tract; Mo5, motor trigeminal nucleus; MPB, medial parabrachial nucleus; PnC, pontine reticular nucleus, caudal part; PnO, pontine reticular nucleus, oral part; scp, superior cerebellar peduncle; SLD, sublaterodorsal tegmental nucleus; su5, supratrigeminal nucleus; VTg, ventral tegmental nucleus.

DISCUSSION

Here, we show for the first time that nearly all Fos+ neurons (84%) localized in the SLD after PS hypersomnia express vGLUT2 mRNA. These results strongly suggest that SLD neurons responsible for the generation of PS are glutamatergic in nature.

Methodological Considerations

Even if one could argue that Fos expression is not strictly correlated to neuronal discharge, we believe that our results convincingly show that SLD PS-on neurons are glutamatergic. Indeed, when unit recordings have been performed in areas reported to contain Fos+ labeled cells after PS hypersomnia,[1,5,6,9] PS-on neurons have always been recorded.[10-13] In particular, the presence of PS-on neurons has been reported in the SLD both in cats[14] and in rats.[15] However, a direct demonstration using for example juxtacellular labeling would be required. It is also well accepted that vGLUT2 is a specific marker of the glutamatergic neurons located in the brainstem.[16] We performed *in situ* hybridization rather than immunohistochemistry of vGLUT2 because it specifically and strongly labels cells bodies' cytoplasm, whereas immunohistochemistry only labels terminals.

SLD PS-On Neurons Are Glutamatergic

The results reported here that SLD PS-on neurons are glutamatergic are in line with our previous results showing that they are neither cholinergic nor GABAergic in nature. Indeed, we previously showed that Fos+ neurons located in the SLD after PS hypersomnia are not immunoreactive to choline acetyltransferase, the enzyme of synthesis of acetylcholine.[5] In addition, we previously reported that 15% of Fos+ neurons located in the SLD were GABAergic after PS hypersomnia, but also after PS deprivation and in control animals, indicating that SLD GABAergic neurons are not specifically active during PS.[6] Further

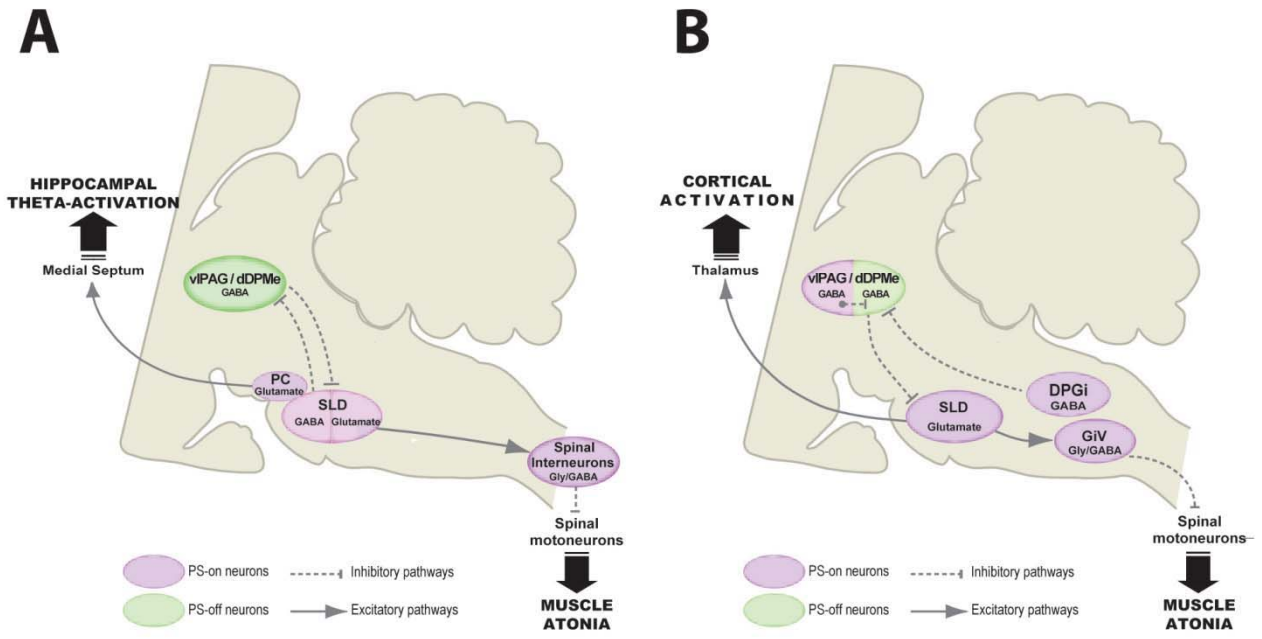


Figure 2—Models of the pontine network responsible for paradoxical (REM) sleep generation. This figure aims to compare our model **(B)** and that of Lu et al.[4] **(A)**. In both models, the SLD contains PS-on glutamatergic neurons generating PS. Their activation at the onset of PS is gated by the removal of a tonic GABAergic input activated during waking and SWS and arising from vlPAG/dDpMe neurons. Lu et al. further hypothesized that the SLD also contains a population of GABAergic PS-on neurons inhibiting at the onset of and during PS the vlPAG/dDpMe PS-off neurons. They proposed that a flip-flop switch between these 2 populations of GABAergic neurons control PS occurrence. In our model, PS-on GABAergic neurons also control PS occurrence by means of their projections to the vlPAG/dDpMe PS-off GABAergic neurons, but they are localized in the vlPAG/dDpMe and a medullary nucleus named the dorsal paragigantocellular reticular nucleus (DPGi).[2,3] We propose that their activation at the onset of PS is due to an intrinsic "clock like" mechanism.
Another major difference between the two models concerns the pathways by which SLD triggers the muscle atonia during PS. We propose that SLD PS-on glutamatergic neurons activate glycinergic/GABAergic neurons localized in the GiV, which in turn, hyperpolarize cranial and spinal motoneurons, leading to muscle atonia. Lu et al. proposed that SLD PS-on glutamatergic neurons inhibit spinal motoneurons via direct projections to spinal interneurons co-containing GABA and glycine. One could argue that these two hypotheses are not mutually exclusive. We finally propose that SLD PS-on neurons activate the cortex by means of their projection to intralaminar thalamic nuclei whereas Lu et al. proposed that a small nucleus close to the SLD named precoeruleus (PC) generate theta oscillations during PS via projections to the medial septum.
DPGi, dorsal paragigantocellular reticular nucleus; dDpMe, dorsal part of the deep mesencephalic nucleus; GiV, ventral gigantocellular reticular nucleus; PC, precoeruleus nucleus; SLD, sublaterodorsal tegmental nucleus; vlPAG, ventrolateral periaqueductal gray.

supporting these results, Xi et al. reported in cats that inactivation of GABAergic neurons of the SLD induces a decrease in waking and an increase in PS.[17] The present results are also in agreement with Lu et al., who reported the presence within the SLD of vGLUT2 expressing neurons.[4]

Functional Significance

It is known that the SLD projects rostrally to the intralaminar nuclei of the thalamus, and caudally to the ventral part of the gigantocellular reticular nucleus (GiV),[1] the rat equivalent of the cat Mc, and the spinal cord.[4] Based on these and additional data, we previously proposed that PS-on neurons of the SLD activate the cortex by means of their ascending projections to the intralaminar thalamic nuclei and induce muscle atonia via their descending projections to glycinergic premotoneurons located in the GiV.[1] Our results indicate that the neurons at the origin of these projections are likely glutamatergic (Figure 2).

ACKNOWLEDGMENTS

The work was performed in the laboratory, CNRS UMR 5167, Physiopathologie des réseaux neuronaux du cycle veille-sommeil, Lyon, France. This work was supported by CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon and the French ministry of research. Olivier Clement has a grant from the French ministry of research.

DISCLOSURE STATEMENT

This was not an industry supported study. The authors have indicated no financial conflicts of interest.

REFERENCES

1. Boissard R, Gervasoni D, Schmidt MH, Barbagli B, Fort P, Luppi PH. The rat ponto-medullary network responsible for paradoxical sleep onset and maintenance: a combined microinjection and functional neuroanatomical study. Eur J Neurosci 2002;16:1959-73.
2. Fort P, Bassetti CL, Luppi PH. Alternating vigilance states: new insights regarding neuronal networks and mechanisms. Eur J Neurosci 2009;29:1741-53.
3. Luppi PH, Gervasoni D, Verret L, et al. Paradoxical (REM) sleep genesis: the switch from an aminergic-cholinergic to a GABAergic-glutamatergic hypothesis. J Physiol Paris 2006;100:271-83.
4. Lu J, Sherman D, Devor M, Saper CB. A putative flip-flop switch for control of REM sleep. Nature 2006;441:589-94.

5. Verret L, Leger L, Fort P, Luppi PH. Cholinergic and noncholinergic brainstem neurons expressing Fos after paradoxical (REM) sleep deprivation and recovery. Eur J Neurosci 2005;21:2488-504.
6. Sapin E, Lapray D, Bérod A, et al. Localization of the brainstem GABAergic neurons controlling paradoxical (REM) sleep. PLoS ONE 2009;4:e4272.
7. Kodama T, Lai YY, Siegel JM. Enhanced glutamate release during REM sleep in the rostromedial medulla as measured by in vivo microdialysis. Brain Res 1998;780:178-81.
8. Lai YY, Siegel JM. Medullary regions mediating atonia. J Neurosci 1988;8:4790-96.
9. Sapin E, Bérod A, Léger L, Herman PA, Luppi PH, Peyron C. A very large number of GABAergic neurons are activated in the tuberal hypothalamus during paradoxical (REM) sleep hypersomnia. PLoS ONE 2010;5:e11766.
10. Goutagny R, Luppi PH, Salvert D, Gervasoni D, Fort P. GABAergic control of hypothalamic melanin-concentrating hormone-containing neurons across the sleep-waking cycle. Neuroreport 2005;16:1069-73.
11. Koyama Y, Takahashi K, Kodama T, Kayama Y. State-dependent activity of neurons in the perifornical hypothalamic area during sleep and waking. Neuroscience 2003;119:1209-19.
12. Goutagny R, Luppi PH, Salvert D, Lapray D, Gervasoni D, Fort P. Role of the dorsal paragigantocellular reticular nucleus in paradoxical (rapid eye movement) sleep generation: a combined electrophysiological and anatomical study in the rat. Neuroscience 2008;152:849-57.
13. Hassani OK, Lee MG, Jones BE. Melanin-concentrating hormone neurons discharge in a reciprocal manner to orexin neurons across the sleep-wake cycle. PNAS 2009;106:2418-22.
14. Sakai K, Koyama Y. Are there cholinergic and non-cholinergic paradoxical sleep-on neurones in the pons? Neuroreport 1996;7:2449-53.
15. Luppi PH, Boissard R, Gervasoni D, et al. The network responsible for paradoxical sleep onset and maintenance: a new theory based on the head-restrained rat model. In: Luppi PH, ed. Sleep: circuits and function. CRC Press, 2004.
16. Herzog E, Bellenchi GC, Gras C, et al. The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. J Neurosci 2001;21:RC181.
17. Xi MC, Morales FR, Chase MH. Evidence that wakefulness and REM sleep are controlled by a GABAergic pontine mechanism. J Neurophysiol 1999;82:2015-19.

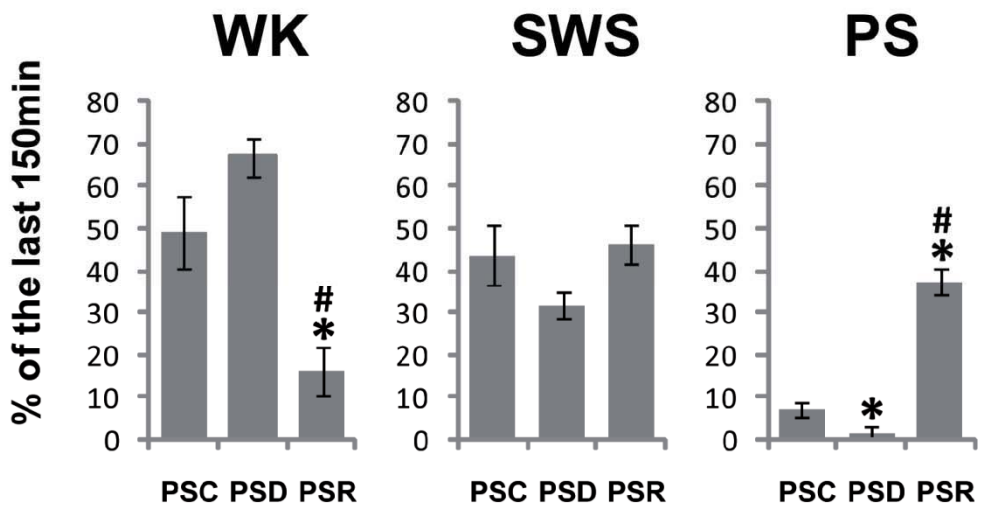
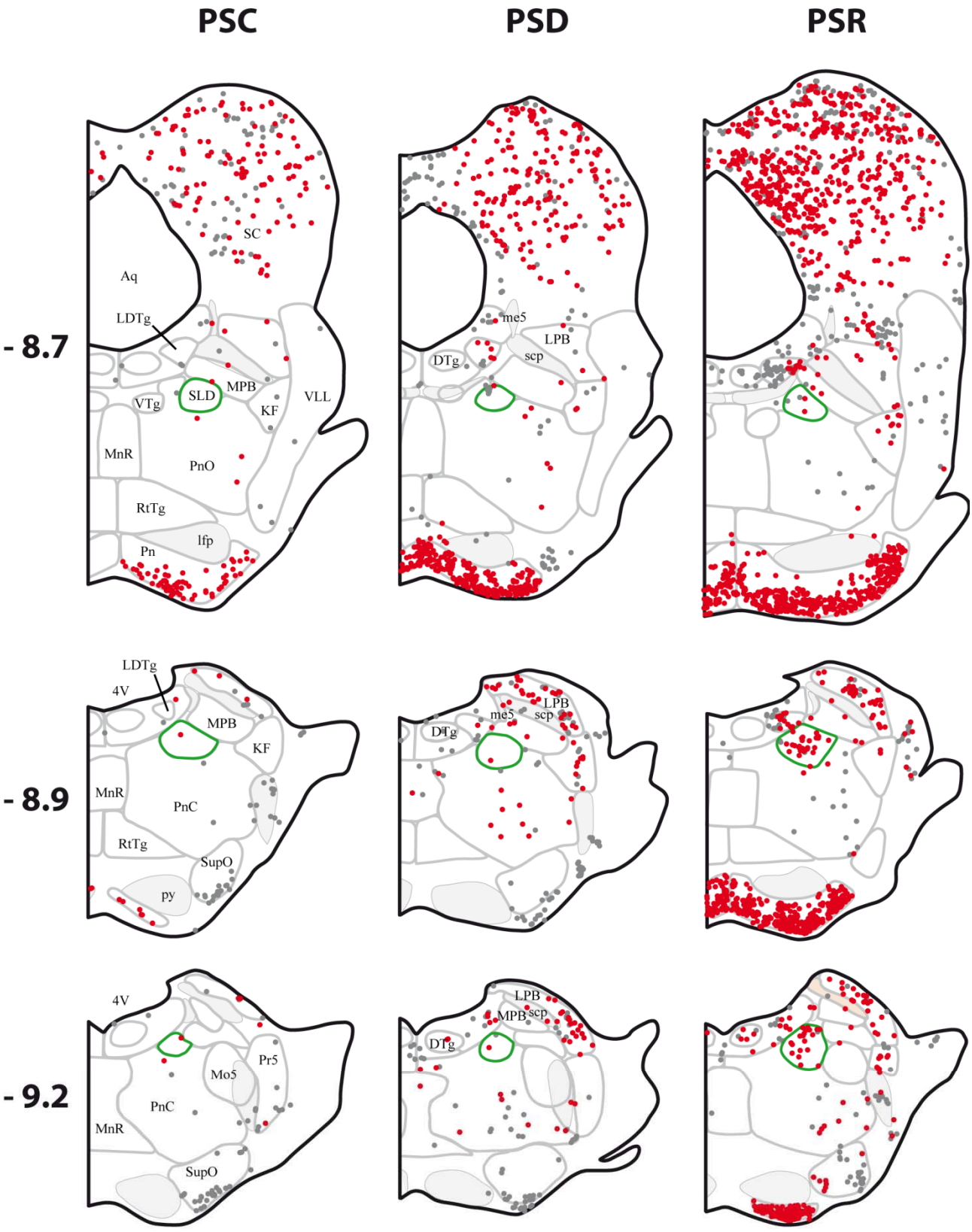


Figure S1—Time spent in waking, slow-wave sleep and paradoxical sleep. Percentage of time spent in waking (WK), slow-wave sleep (SWS) and paradoxical sleep (PS) scored by 5sec epochs during the last 150 min before sacrifice for control (PSC), PS-deprived (PSD) and PS-recovery (PSR) rats (n = 4 in each group). Graphs represent means with standard errors. *P < 0.05 compared to PSC, #P < 0.05 compared to PSD.

Table S1—Number of Fos+ and Fos/vGLUT2+ neurons in controls (PSC), PS-deprived (PSD) and PS-recovery (PSR) rats

		Fos+ total			Fos/vGLUT2+		
	n	PSC	PSD	PSR	PSC	PSD	PSR
CGPn	3	19.8 ± 4.6	47.1 ± 17.8	55.3 ± 8.3	4.4 ± 1.5	8.5 ± 2.2	13.0 ± 2.7
DTg	3	0.5 ± 0.2	1.9 ± 0.7	9.9 ± 4.6	0.1 ± 0.1	1.0 ± 0.5	4.6 ± 2.7
KF	2	14.0 ± 6.6	15.9 ± 1.7	18.3 ± 2.3	5.9 ± 3.2	9.3 ± 1.5	13.4 ± 2.2
LDTg	2	6.5 ± 2.9	11.6 ± 3.2	33.3 ± 6.4*#	2.6 ± 1.4	3.3 ± 0.8	15.3 ± 1.5*#
LPB	3	33.0 ± 11.2	106.6 ± 22.5*#	82.4 ± 9.4*	17.0 ± 6.4	72.0 ± 15.4*	55.9 ± 4.8*
MPB	3	7.3 ± 3.8	15.6 ± 5.3	15.3 ± 6.1	3.8 ± 1.8	7.9 ± 1.7	11.0 ± 4.2
PnC	2	11.3 ± 4.0	26.4 ± 5.9	39.9 ± 7.7*	3.3 ± 1.4	8.9 ± 2.8	16.4 ± 4.6
PnO	1	3.1 ± 0.7	4.9 ± 1.9	16.0 ± 5.2*#	0.9 ± 0.4	2.4 ± 1.0	8.0 ± 3.6
SLD	3	4.8 ± 1.4	13.5 ± 7.0	42.6 ± 4.5*#	2.3 ± 0.8	2.6 ± 0.4	35.6 ± 3.8*#

Neurons were counted on 3 sections taken at 300µm interval through the full rostrocaudal extension of the SLD. Displayed values are mean (± sem) of 4 animals in each group of all Fos labelled neurons (Fos+ Total) and Fos/vGLUT2 double-labelled neurons (Fos/vGLUT2+) counted on one or several sections (column n) depending on the rostrocaudal extent of the structures. *P < 0.05 compared to PSC, #P < 0.05 compared to PSD. CGPn, central gray of the pons; DTg, dorsal tegmental nucleus; KF, Kölliker-Fuse nucleus; LDTg, laterodorsal tegmental nucleus; LPB, lateral parabrachial nucleus; MPB, medial parabrachial nucleus; PnC, pontine reticular nucleus, caudal part; PnO, pontine reticular nucleus, oral part; SLD, sublaterodorsal tegmental nucleus.



Localisation des neurones glutamatergiques activés lors d'une hypersomnie de SP
Cartographie de la localisation des neurones C-FOS+ (points gris) et c-FOS/*vglut2*+ (points rouges) chez un animal contrôle (PSC), privé de SP pendant 72h (PSD) et un animal ayant réalisé une hypersomnie de SP suite à cette même privation. La localisation rostrocaudale des niveaux est donnée en mm à partir du bregma (à gauche). Le SLD est entouré en vert.

CHAPITRE II - localisation des neurones glycinergiques activés lors d'une hypersomnie de SP et potentiellement impliqués dans la régulation de l'atonie musculaire : une étude préliminaire

Il est généralement admis que l'atonie musculaire observée durant le SP résulte d'un tonus glycinergique sur les motoneurones spinaux et crâniens. En effet l'hyperpolarisation spécifique de ces derniers au cours de cet état est bloquée par l'application de strychnine (antagoniste glycinergique) et les concentrations extracellulaires en glycine augmentent durant le SP dans la moelle épinière et le noyau de l'hypoglosse (Kodama *et al.*, 2003). De plus, des souris modifiées génétiquement présentant une altération de la transmission GABAergique et glycinergique montrent des mouvements musculaires anormaux durant ce stade (Brooks and Peever, 2011).

De très nombreuses études suggèrent que la région bulbaire ventrale, en particulier le GiV et le GiA seraient responsables de cette inhibition. En effet, ils contiennent de nombreux neurones glycinergiques activés lors d'une hypersomnie de SP, reçoivent des projections du SLD (Boissard *et al.*, 2002) et projettent densément et de manière monosynaptique sur les motoneurones spinaux et de l'hypoglosse (Holstege and Bongers, 1991; Fort *et al.*, 1993; Rampon *et al.*, 1996). De plus, la lésion du GiV/GiA abolit l'atonie musculaire lors du SP (Holmes and Jones, 1994) alors que leur stimulation diminue le tonus musculaire (Lai and Siegel, 1991). Toutefois, des résultats récents suggèrent que cette inhibition glycinergique pourrait provenir non pas du GiV/GiA mais d'interneurones glycinergiques localisés dans la moelle épinière elle-même (Lu *et al.*, 2006b; Vetrivelan *et al.*, 2009).

Afin de tenter de résoudre la polémique quand à la localisation des neurones glycinergiques responsables de l'inhibition des motoneurones au cours du SP, nous avons entrepris de cartographier les neurones glycinergiques activés lors du SP.

Pour cela, nous avons combiné l'hybridation *in situ* de *glyt2* (transporteur de la glycine, marqueur spécifique des neurones glycinergiques) avec l'immunohistochimie du marquer c-FOS chez des animaux contrôles, privés de SP pendant 72h par la méthode de la piscine et des rats réalisant une hypersomnie de SP suite à une telle privation. La localisation des neurones glycinergiques activés a été observée au sein des structures bulbaires mais également au niveau de la moelle épinière.

Cette étude étant préliminaire, nous avons pour l'instant analysé de manière quantitative la localisation des neurones c-FOS/*glyt2* pour les animaux ayant réalisé une privation et une hypersomnie de SP mais seulement au niveau bulbaire.

Résultats

	% de SP	% de SL	% d'Av	Nombre d'épisodes de SP	Durée des épisodes de SP
PSC	8.7 ± 2.4	45.1 ± 5.2	46.2 ± 7.4	8.3 ± 2.6	2 ± 0.5
PSD	0.0 ± 0.0 *	28.7 ± 1.3 *	71.3 ± 1.3 *	0 ± 0 *	0 ± 0 *
PSR	36.7 ± 3.0 *, #	45.6 ± 4.2 #	17.8 ± 5.0 *, #	21 ± 3.1 *, #	2.8 ± 0.5 #

Tableau 1 : Quantification des états de vigilance durant les 150 min avant le sacrifice
PSC, groupe contrôle, PSD, groupe privé de SP pendant 72 h par la technique de la piscine, PSR, groupe ayant réalisé une hypersomnie de SP suite à cette privation. Les valeurs représentées sont les moyennes ± sem (n = 4 dans chaque groupe). une * indique une valeur significative ($p<0,05$) par rapport au groupe PSC, et # indique une valeur significative ($p<0,05$) par rapport au groupe PSD.

Comme présenté dans le **Tableau 1**, les animaux du groupe PSR présentent une profonde hypersomnie de SP par rapport aux animaux des groupes PSC et PSD. En effet ils passent 36,7 % de leurs dernières 150 min dans cet état contre respectivement 8,7 % et 0 % pour les animaux PSC et PSD. Cette augmentation de SP est due à une augmentation du nombre d'épisodes et de la durée des épisodes de SP. A l'opposé, le groupe PSD présente une totale suppression de SP pendant les 150 dernières minutes du protocole. Une diminution des quantités de SL et une augmentation des quantités d'éveil sont également observées chez ces animaux. Ces données sont en accord avec les données classiquement obtenues avec un

		c-FOS+		c-FOS/*glyt2*+		% doubles/c-FOS	
	n	PSR	PSD	PSR	PSD	PSR	PSD
DPGi	8	47.3 ± 18.6	6.5 ± 1.6	10.0 ± 1.4	2.5 ± 1.0	34.4 ± 11.3	27.5 ± 5.6
Gi	10	16.0 ± 7.7	13.5 ± 8.9	7.8 ± 2.9	4.3 ± 1.7	62.9 ± 12.9	25.0 ± 10.8
GiA	4	9.0 ± 2.1	4.8 ± 2.6	5.3 ± 0.9	3.0 ± 1.6	69.2 ± 18.4	41.5 ± 23.4
GiV	6	43.0 ± 15.3	8.8 ± 2.6	35.0 ± 12.2	4.3 ± 2.3	78.1 ± 10.6	30.2 ± 11.9
LPGi	10	126.0 ± 35.0	23.5 ± 10.8	80.8 ± 23.7	17.5 ± 12.2	61.4 ± 6.0	51.6 ± 22.4
PCRT	10	20.5 ± 9.6	81.0 ± 68.4	4.8 ± 2.1	6.8 ± 5.1	32.0 ± 10.4	11.8 ± 5.2
Pr	8	7.5 ± 3.4	4.5 ± 3.1	2.5 ± 1.9	0.0 ± 0.0	17.5 ± 11.8	0.0 ± 0.0
RMg	4	2.8 ± 1.8	2.3 ± 1.1	1.0 ± 1.0	0.3 ± 0.3	12.5 ± 12.5	12.5 ± 12.5
ROb	5	3.8 ± 2.1	24.5 ± 5.9	1.3 ± 1.3	0.0 ± 0.0	12.5 ± 12.5	0.0 ± 0.0
RPa	5	5.5 ± 2.1	0.0 ± 0.0	2.8 ± 0.8	0.0 ± 0.0	68.8 ± 18.8	0.0 ± 0.0

Tableau 2 : Nombre de neurones c-FOS+ et c-FOS/*glyt2*+ pour les groupes PSD et PSR
n représente le nombre de demi section compté pour chaque structure. Les valeurs présentées sont la moyenne ± sem (n=4 dans chaque groupe).
Abréviations : DPGi, noyau réticulé paragigantocellulaire dorsal ; Gi, noyau gigantocellulaire ; GiA, noyau gigantocellulaire alpha ; GiV, noyau gigantocellulaire ventral ; LPGi, noyau réticulé paragigantocellulaire latéral ; PCRt, noyau réticulé parvocellulaire ; Pr, noyau prépositus ; RMg, noyau du raphe magnus ; ROb, raphe obscurus ; RPa, raphe palidus.
tel protocole.

La **Figure 1** illustre la localisation des neurones glycinergiques et non glycinergiques activés lors d'une privation et d'une hypersomnie de SP et le tableau 2 donne le nombre de neurones c-FOS+, c-FOS/*glyt2*+ ainsi que le pourcentage de neurones doublements marqués par rapport au nombre total de neurones c-FOS+.
Chez les animaux privés, de nombreux neurones c-FOS+ sont retrouvés dans le raphe palidus (RPa) ainsi que le noyau réticulé paragigantocellulaire latéral (LPGi). Toutefois, aucun neurones c-FOS+ du RPa n'est de nature glycinergique alors que 50 % de ceux du LPGi expriment *glyt2* (**Figure 1A et Tableau 2**). Ce pourcentage est toutefois à relativiser puisque de fortes variations sont observées entre les animaux.

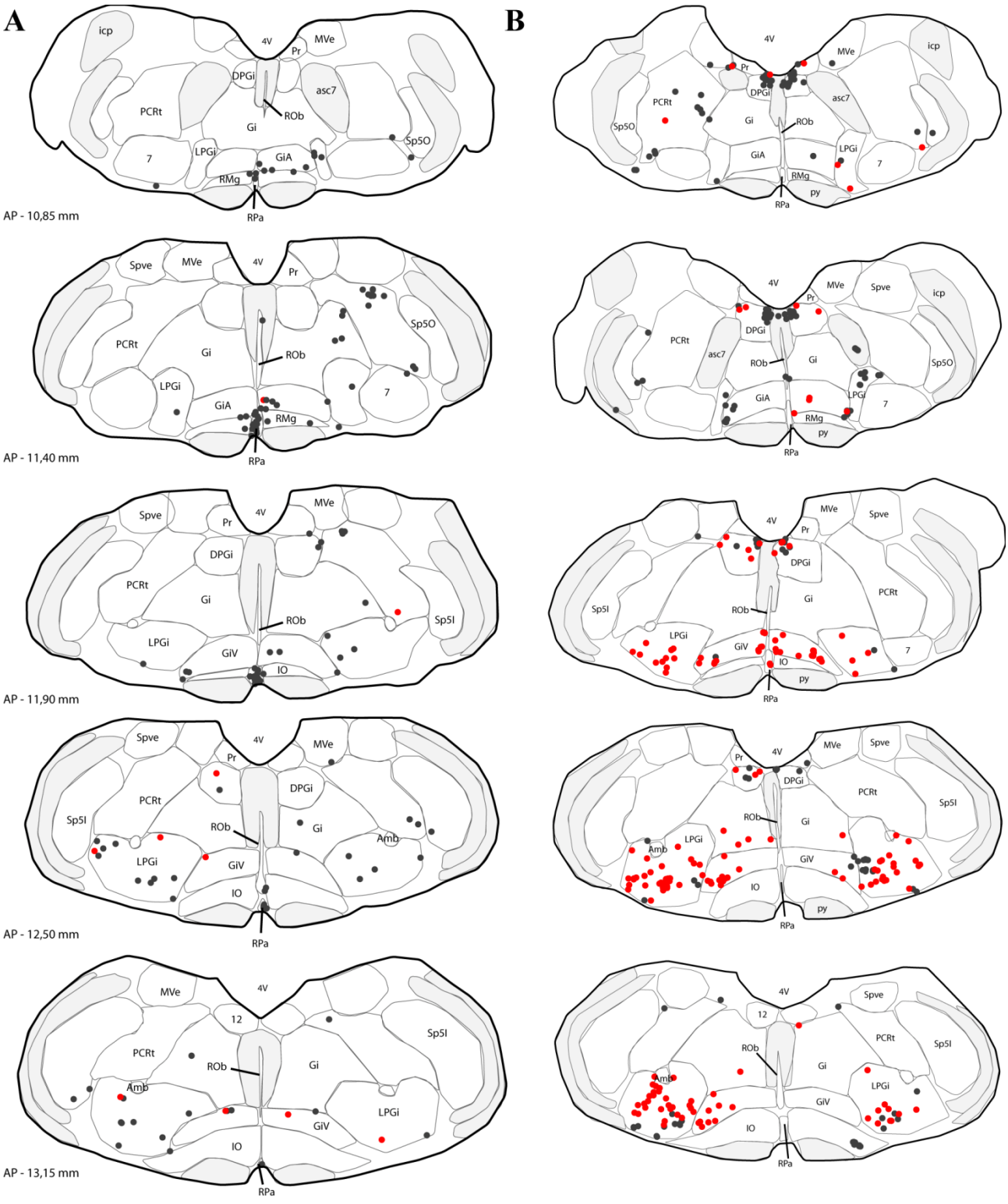


Figure 1: Cartographie de la localisation des neurones c-FOS+ et c-FOS/*glytT*+ après privation et hypersomnie de SP

Organisation rostrocaudale des coupes pour un animal représentatif du groupe PSD (**A**) et PSR (**B**). La localisation antéropostérieure est indiquée en bas à gauche de chaque niveau (en mm par rapport au bregma). Les points gris représentent les neurones c-FOS+ et les rouges les neurones c-FOS/*glyt2*+.

Abréviations: 4V, 4ième ventricule ; 7N, nerf facial ; 12N, noyau de l'hypoglosse ; Amb, noyau ambigu ; DPGi, noyau réticulé paragigantocellulaire dorsal ; Gi, noyau gigantocellulaire ; GiA, noyau gigantocellulaire alpha ; GiV, noyau gigantocellulaire ventral ; icp, pédoncule cérébelleux inférieur ; IO, olive inférieure ; LPGi, noyau réticulé paragigantocellulaire latéral ; MVe, noyau vestibulaire médian ; PCRt, noyau réticulé parvocellulaire ; Pr, noyau prépositus ; py, pyramidal tract ; RMg, noyau du raphe magnus ; RPa, raphe palidus ; sp5, faisceau trigéminal spinal ; SpVe, noyau vestibulaire spinal.

En ce qui concerne les animaux ayant réalisé une hypersomnie de SP, de nombreux neurones c-FOS+ sont retrouvés au niveau du noyau réticulé paragigantocellulaire dorsal et latéral (DPGi, LPGi), des noyaux gigantocellulaire ventral (GiV) et alpha (GiA) (**Figure 1B et Tableau 2**). Ces données, tout comme celles pour le groupe PSD, sont en accord avec les données de la littérature (Verret *et al.*, 2005; Sapin *et al.*, 2009). En ce qui concerne la nature glycinergique ou non de ces cellules, deux grandes populations sont clairement identifiables : la partie rostro-dorsale semble plutôt non glycinergique alors que la partie ventro-caudale apparait comme majoritairement glycinergique.
En effet, dans le GiV et le LPGi, respectivement 78.1 % et 61.4 % des neurones c-FOS+ sont également *glyt2*+. Au contraire, si l'on considère le noyau du DPGi, ce pourcentage tombe à 34% (**Tableau 2**). La **Figure 2** illustre bien cette dichotomie entre les neurones non-glycinergiques du DPGi et ceux glycinergiques du GiV.

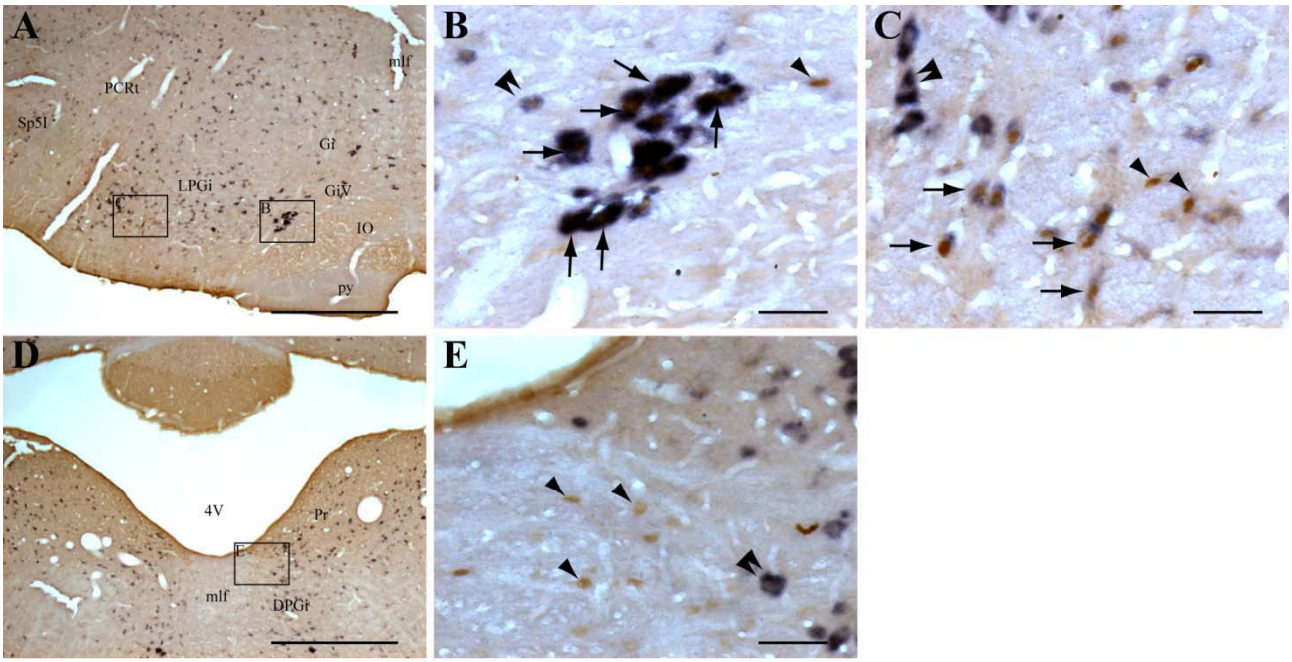


Figure 3 : Caractérisation glycinergique des neurones c-FOS+ au niveau du GiV, du LPGi et du DPGi chez un animal PSR.
Les rectangles en **A** et **D** correspondent aux zones agrandies dans les photos **B, C** et **E**. Les flèches noires indiquent des neurones doublement marqués. Les têtes de flèches simples et doubles montrent respectivement des neurones c-FOS+ et *glyt2*+. Barres d'échelle : 400 µm en **A** et **D**, 100 µm en **B**, **C** et **E**. Abréviations: 4V, 4ième ventricule ; DPGi, noyau réticulé paragigantocellulaire dorsal ; Gi, noyau gigantocellulaire ; GiV, noyau gigantocellulaire ventral ; IO, olive inférieure ; LPGi, noyau réticulé paragigantocellulaire latéral ; PCRt, noyau réticulé parvocellulaire ; Pr, noyau prépositus ; py, pyramidal tract.

En ce qui concerne le marquage au niveau de la moelle épinière, nous n'avons pas réalisé d'étude exhaustive de la localisation des neurones c-FOS+ et c-FOS/*glyt2*+. En effet, la qualité des marquages obtenus sur les moelles épinières n'était pas suffisante pour permettre une analyse fiable et représentative de la réalité physiologique. En particulier, le marquage immunohistochimique du c-FOS ne révélait pas suffisamment de neurones lorsqu'il était couplé à l'hybridation *in-situ* par rapport au nombre marqués lors d'une immunohistochimie classique.
Comme illustré en **Figure 3**, la moelle épinière contient des neurones c-FOS+ après hypersomnie de SP. Toutes les photos présentées dans cette figure sont tirées du même animal. Elles ont été prises au niveau des vertèbres cervicales. Sur la série du haut, les neurones c-FOS+ ne sont pas glycinergiques, alors que sue la

série du bas, on voit nettement 3 neurones c-FOS/*glyt2*+. Ces résultats montrent donc que l'on peut observer des neurones glycinergiques activés lors d'une hypersomnie de SP. Toutefois, la majorité des neurones de la moelle épinière c-FOS+ après hypersomnie ne semblent pas être glycinergiques.

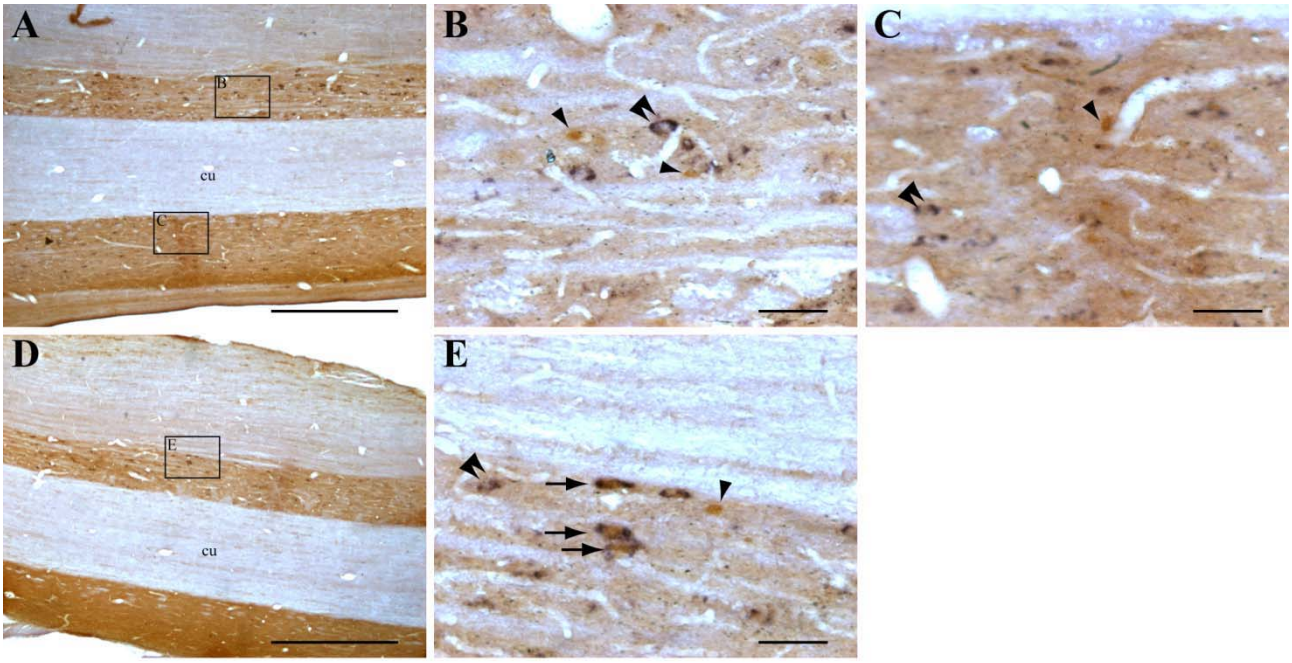


Figure 3 : Présence de neurones c-FOS/*glyt2*+ au niveau dans la moelle épinière des animaux PSR.
Les rectangles en **A** et **D** correspondent aux zones agrandies dans les photos **B, C** et **E**. Les flèches noires indiquent des neurones doublement marqués. Les têtes de flèches simples et doubles montrent respectivement des neurones c-FOS+ et *glyt2*+. Barres d'échelle : 400 µm en **A** et **D**, 100 µm en **B**, **C** et **E**. Abréviations: cu, tractus cunéiforme.

Discussion

Ces données préliminaires sont donc à prendre avec précaution. En effet, les animaux du groupe contrôle n'ont pour l'instant pas été analysés, ce qui empêche toute conclusion définitive. Toutefois, les nombreuses études déjà publiées et utilisant le même protocole ont montré que, chez les animaux contrôles, peu de neurones c-FOS+ sont retrouvés au niveau bulbaire (Verret *et al.*, 2005; Sapin *et al.*, 2009). Par conséquent, nous nous attendons à un nombre limité de neurones c-FOS/*glyt2*+ chez le groupe PSC ce qui ne devrait donc pas modifier les enseignements tirés de cette étude.

Ces données indiquent donc que seuls les animaux ayant réalisés une profonde hypersomnie de SP présentent une forte activation de certaines populations glycinergiques localisées au niveau du bulbe postérieur, en particulier au sein du GiV et du LPGi. De plus, dans ces noyaux, et dans le GiA dans une moindre mesure, la grande majorité des neurones actifs durant l'hypersomnie de SP est de nature glycinergique. Ces donnés sont en accord avec celles de Morales et al. qui ont montré que 40 % des neurones glycinergiques du GiV/GiA ainsi que du LPGi sont c-FOS+ lors de l'induction de SP par l'application de carbachol dans le SLD (Morales *et al.*, 2006). Enfin, même s'ils demandent à être confirmés, les résultats obtenus au niveau de la moelle épinière suggèrent qu'il n'y a que peu de neurones glycinergiques activés après hypersomnie de SP dans cette région.

A la lumière des données de la littérature, nos résultats semblent confirmer que l'inhibition des motoneurones lors des phases de SP est due à des neurones glycinergiques localisés au sein du GiV et du GiA et non à des pré-motoneurones de la moelle épinière. De plus, en accord avec cette hypothèse, il a été montré que les neurones SP-on du SLD projettent bien sur le GiV mais pas sur la moelle épinière. Les neurones du SLD afférents à cette dernière ont en effet une activité unitaire non corrélée au SP (Sakai *et al.*, 1981).

La comparaison de ces résultats avec ceux obtenus par Sapin et al. suggère en réalité que ces neurones ne seraient pas exclusivement glycinergiques mais qu'ils contiendraient également le GABA. En effet, Sapin et al. ont rapporté que suite à ce même protocole, 87 % et 70 % des neurones c-FOS+ du GiV et du LPGi expriment *gad67*, enzyme de synthèse du GABA (Sapin *et al.*, 2009). Par conséquent, il apparait clairement qu'une majorité des neurones du GiV et du LPGi activés lors du SP est de nature GABAergique et glycinergique.

En ce qui concerne le DPGi, Sapin et al. ont rapporté une distinction entre la partie rostrale, dont les neurones c-FOS+ sont non-GABAergique, et la partie caudale, GABAergique. Dans nos résultats, nous n'avons pas fait de distinction entre ces deux sous structures. Toutefois, la **Figure 1** semble montrer que la partie rostrale est complètement non-glycinergique alors que la partie caudale peut contenir quelques rares neurones c-FOS+ glycinergiques. Ces données nous amènent donc à la conclusion que les neurones du DPGi caudal activés lors du SP seraient en majorité GABAergiques/non-glycinergiques alors que ceux de la partie rostrale sont non-GABAergiques/non-glycinergiques. Cette hypothèse est d'ailleurs en accord avec des observations personnelles montrant que la majorité de ces neurones sont de nature glutamatergiques puisqu'ils expriment *vglut2*, transporteur vésiculaire du glutamate. Cette conclusion est également en accord avec le fait que le raphé dorsal (DR) et le locus coeruleus (LC), inhibés pendant le SP par le DPGi (Gervasoni *et al.*, 2000; Verret *et al.*, 2006), voient leurs concentration extracellulaire en GABA augmenter alors que celles en glycine restent constantes (Nitz and Siegel, 1997a; Nitz and Siegel, 1997b).

Toutefois, ces données sont à prendre avec précautions puisqu'il ne s'agit que d'une étude préliminaire, surtout en ce qui concerne les données sur la moelle épinière.

CHAPITRE III – Implication de l'aire latérale de l'hypothalamus dans la régulation du SP via ses projections sur les neurones GABAergiques SP-off de la VLPAG/dDpMe

Les neurones glutamatergiques du SLD sont généralement considérés comme responsables de la mise en place du SP. En effet, ils projettent sur les neurones glycinergiques du GiV responsables de l'inhibition des motoneurones durant le SP, mais également sur les noyaux intralaminaires du thalamus qui participent à l'activation corticale observée lors du SP (Boissard *et al.*, 2002). En dehors du SP, le SLD serait maintenu inactif par des neurones GABAergiques localisés à la limite de la VLPAG et du DpMe (Boissard *et al.*, 2003) dont l'inhibition ou la lésion provoque une augmentation importante des quantités de SP (Sastre *et al.*, 1996; Crochet *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2006b; Sapin *et al.*, 2009). Par conséquent, si l'on veut mieux comprendre les mécanismes de régulation du SP, une meilleure connaissance du contrôle de la VLPAG/dDpMe (le dDpMe étant la partie dorsale du DpMe, accolé à la VLPAG) est nécessaire.

Récemment, il a été proposé que cette structure serait sous le contrôle de neurones GABAergiques localisés au sein du SLD lui même (Lu *et al.*, 2006b). Toutefois, cette hypothèse n'est pas en accord avec les résultats du laboratoire montrant que les neurones activés lors d'une hypersomnie de SP ne sont pas de nature GABAergiques (Sapin *et al.*, 2009). En outre, nous avons démontré au cours de cette thèse que la quasi-totalité de ces neurones (85 %) est en fait de nature glutamatergique (**voir Chapitre I**). De plus, il a été rapporté que l'inactivation des neurones GABAergiques du SLD par application locale d'oligonucléotides anti-sens dirigés le gène *gad* (enzyme de synthèse du GABA) diminue les quantités d'éveil et augmente celles de SP (Xi *et al.*, 1999), soit un effet diamétralement opposé aux prévisions de ce modèle.

Par conséquent, et dans le but de clore cette question en suspend, nous avons choisi de réaliser une cartographie exhaustive de toutes les afférences à la VLPAG/dDpMe activées lors d'une privation ou d'une hypersomnie de SP. Cette cartographie a été réalisée à l'aide d'un traceur rétrograde (la CTb) injecté dans la VLPAG/dDpMe et d'un marqueur d'activation neuronale (le c-FOS). Les conditions de privation et d'hypersomnie de SP ont été obtenues à l'aide de la méthode de la piscine.

Cette première partie a permis de révéler que l'afférence majeure à la VLPAG/dDpMe activée lors d'une hypersomnie de SP n'est autre que la LH, région déjà connue pour son implication dans l'homéostasie du SP (Verret *et al.*, 2003). Afin de confirmer ces résultats neuroanatomiques, nous avons choisi de les vérifier à l'aide d'injections intratissulaires dans la LH permettant ainsi une modulation de son activité. Nous avons alors analysé les effets sur le cycle veille-sommeil mais aussi sur l'activation de certaines populations neuronales contrôlant les états de vigilance, notamment la VLPAG/dDpMe.

Evidence that the lateral hypothalamic area contains a population of neurons controlling paradoxical (REM) sleep by means of their projection to PS-off brainstem GABAergic neurons.

Olivier CLEMENT[1,2,3], Emilie SAPIN[4,5], Paul-Antoine LIBOUREL[1,2,3], Sébastien ARTHAUD[1,2,3], Patrice FORT[1,2,3], Pierre-Hervé LUPPI[1,2,3,*]

[1] INSERM, U1028; CNRS, UMR5292; Lyon Neuroscience Research Center, Team Physiopathologie des réseaux neuronaux du cycle veille-sommeil, 7 Rue Guillaume Paradin, F-69372 Lyon, France ; [2] University Lyon, F-69000 Lyon, France ; [3] University Lyon 1, F-69000 Lyon, France ; [4] INSERM U1042, Grenoble, F-38043, France; [5] Université de Grenoble, Grenoble, F-38043, France.

* corresponding author
Pierre-Hervé LUPPI
INSERM, U1028; CNRS, UMR5292
Centre de Recherche en Neuroscience de Lyon
Equipe Physiopathologie des réseaux neuronaux du cycle veille-sommeil
7 Rue Guillaume Paradin
69372 Lyon
France
Phone : +33 (0)4 78 77 10 39
Fax : +33 (0)4 78 77 10 22
Email : luppi@sommeil.univ-lyon1.fr

Authors declare no conflict of interest

Pages # 23
Figures # 6
Tables # 1

Number of words :
Abstract # 199
Introduction # 546
Discussion # 2044

ABSTRACT

A large body of data indicates that the ventrolateral part of the periaqueductal gray (VLPAG) and the dorsal deep mesencephalic nucleus (dDpMe), just ventral to it, contain GABAergic neurons inhibiting paradoxical (REM) sleep (PS) onset by means of their projection to the glutamatergic PS-on neurons of the SLD. To pursue the identification of mechanisms controlling PS, it was therefore crucial to identify the neuronal populations responsible for the cessation of activity of the VLPAG/dDpMe GABAergic PS-off neurons at the onset and during PS. For that purpose, we combined in rats c-FOS and retrograde labeling after CTb injection in the VLPAG/dDpMe and selective PS deprivation and recovery. We found out that the lateral hypothalamus contained the largest number of c-FOS-labeled neurons projecting to the VLPAG/dDpMe after PS hypersomnia. We further demonstrated that 44 % of these neurons contain MCH. We then showed that inactivation of the lateral hypothalamus by bilateral injection of muscimol or clonidine induced a strong decrease in PS quantities and an activation of VLPAG/dDpMe GABAergic neurons projecting to the SLD. Altogether, these and previous results suggest for the first time that MCH and GABAergic PS-on neurons located in the lateral hypothalamus constitute the primary generator of PS.

INTRODUCTION

Paradoxical sleep (PS), also called rapid eye movement sleep (REM sleep), is characterized by rapid eye movements, cortical activation and muscle atonia. A large body of data indicates that a small core of glutamatergic neurons specifically active during PS (PS-on) located in the pontine sublaterodorsal tegmental nucleus (SLD) generates PS (Sakai and Koyama, 1996; Boissard *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2006b; Clément *et al.*, 2011). It has been further shown that blockade of GABA receptors in the SLD by bicuculline is sufficient to induce the activation of SLD PS-on neurons and the state of PS (Boissard *et al.*, 2002) suggesting that the removal of a tonic GABAergic input on SLD PS-on neurons is necessary and sufficient to activate them. It has been then shown that most GABAergic neurons projecting to the SLD are localized in the ventrolateral part of the periaqueductal gray (VLPAG) and the dorsal part of the deep mesencephalic reticular nuclei (dDpMe) (Boissard *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2006b). Then, it has been demonstrated that this region is the only brainstem region containing GABAergic neurons activated during PS deprivation by the flower pot method (Sapin *et al.*, 2009). Finally, it was established that inactivation of the VLPAG/dDpMe region by muscimol application or its neurochemical lesion are followed by a strong increase in PS quantities (Crochet *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2006b; Sapin *et al.*, 2009). From all these results, it has been proposed that the inactivity during waking and SWS of SLD PS-on neurons is due to their tonic inhibition by PS-off GABAergic neurons located in the VLPAG/dDpMe region. The mechanisms responsible for the inactivation of these neurons at the onset and during PS remain to be identified. Based on our demonstration that the VLPAG region also contains a large number of GABAergic neurons activated during PS hypersomnia, we proposed that these putative PS-on neurons could be responsible of the inactivation of the closely located PS-off GABAergic neurons. We also hypothesized that MCH/GABAergic neurons located in the posterior hypothalamus, specifically active during PS and projecting to the VLPAG/dDpMe region (Bittencourt *et al.*, 1992; Hassani *et al.*, 2009; Hassani *et al.*, 2010) could also be responsible for the inhibition of the GABAergic PS-off neurons (Fort *et al.*, 2009; Luppi *et al.*, 2011). Based on a functional neuroanatomical study, it has been alternatively suggested that a mutually inhibitory interaction between GABAergic SLD PS-on and the GABAergic VLPAG/dDpMe PS-off neurons constitutes a brainstem flip–flop switch controlling PS onset and maintenance (Lu *et al.*, 2006b).

In an attempt to test these hypotheses, we decided to exhaustively map in rats the afferents to the VLPAG/dDpMe activated after either a selective PS-deprivation (PSD) or a PS hypersomnia (PSR) following such a deprivation. Retrograde labeling was obtained by injection of the retrograde tracer cholera toxin b-subunit (CTb) into the VLPAG/dDpMe and combined with c-FOS immunostaining as a marker of neuronal activation. We found out that the lateral hypothalamus (LH) is the structure containing the greatest number of neurons activated during PS hypersomnia projecting to the VLPAG/dDpMe. To verify whether

such neurons could be responsible for the inhibition of VLPAG/dDpMe neurons at the onset and during PS, we then determined the effect of pharmacological inactivation of LH neurons on PS and on the activation of VLPAG/dDpMe GABAergic neurons.

RESULTS

Modification of sleep quantities by the inverted flower pot method

We used the well characterized and reproducible inverted flower pot method to modulate PS quantities in rats (Maloney *et al.*, 1999; 2000; 2002; Verret *et al.*, 2003; Verret *et al.*, 2005; Verret *et al.*, 2006; Leger *et al.*, 2009; Sapin *et al.*, 2009; Sapin *et al.*, 2010; Clément *et al.*, 2011). During the last 150 min before sacrifice, PS quantities were significantly higher in PSR (47.33 ± 4.84 %) than in PSC (12.18 ± 2.05 %, $p = 0.0209$) and PSD (0.23 ± 0.17 %, $p = 0.0209$) animals. PS quantities were also significantly reduced in PSD rats compared to PSC ($p = 0.0209$) animals. In PSD animals, the reduction in PS was associated with a significant reduction in SWS compared to control (32.6 ± 4.89 % vs 53.23 ± 4.15 %, $p = 0.0433$) and a significant increase in WK (67.15 ± 4.87 % vs 34.58 ± 5.35 %, $p = 0.0209$). In PSR group, SWS was also decreased compared to PSC animals (33.95 ± 2.03 % vs 53.23 ± 4.15 %, $p = 0.0209$) but did not differ from PSD ones (32.6 ± 4.89 %, $p > 0.9999$). The increase of PS-duration in PSR rats results from an increase in the duration of PS episodes compared to control (3,4 ± 0.41 min vs 1,5 ± 0.19 min, $p = 0.0209$), whereas the dramatic reduction in PS quantities observed in PSD animals was due to a reduction in both the number (1.25 ± 0.75 vs 12.75 ± 2.87 for PSC, $p = 0.0209$) and the duration (0,13 ± 0.08 min vs 1,5 ± 0.19 min for PSC, $p = 0.0209$) of PS episodes.

Afferents to the VLPAG/dDpMe activated during PS recovery

The retrograde tracer CTb (Luppi et al., 1988) was iontophoretically injected at the border between the VLPAG and the dDpMe (Figure 1A). We then combined the immunodetection of CTb with that of c-FOS in order to reveal the afferents activated by the PS-deprivation/recovery procedure (Table 1). The localization of c-FOS immunoreactive (c-FOS+) neurons in PSC, PSD and PSR animals was similar with our previously published data (Verret *et al.*, 2003; Verret *et al.*, 2005; Verret *et al.*, 2006; Leger *et al.*, 2009; Sapin *et al.*, 2009; Sapin *et al.*, 2010; Clément *et al.*, 2011). The distribution of retrogradely labeled neurons was in line with previous studies of the afferents of the VLPAG/dDpMe region. A large number of CTb-labeled neurons was observed in the bed nucleus of the stria terminalis (BST), the central nucleus of the amygdala (Ce), the lateral hypothalamic area (LH), the zona incerta (ZI), the periaqueductal gray (PAG), the superior colliculus (SC), the DpMe and the nucleus pontis oralis (PnO).

The presence of numerous c-FOS+ neurons within the CTb injection site in PSD animals confirmed that the GABAergic PS-off neurons were effectively targeted (Figure 1A).

A large number of CTb/c-FOS double-labeled cells (CTb/c-FOS+) was seen only in PSR animals. Most of these cells were localized in the posterior part of the hypothalamus and the PAG (Table 1). The LH (55.8 ± 4) and to a minor extent the ZI (27.5 ± 5.8) contained a large number of CTb/c-FOS+ double-labeled cells compared to PSD and PSC animals ($p < 0.05$ for each paired comparison). The posterior hypothalamic area contained a substantial number of double-labeled neurons compared to the PSC group (PH, 12.5 ± 2.8 vs 3.3 ± 0.3, $p = 0.02$). In the LH and ZI, ipsilaterally to the injection site, the double-labeled neurons accounted respectively for 13 % and 7 % of the total number of CTb+ labeled neurons. The rostromedial (RMPAG), dorsomedial (DMPAG) and to a minor extent dorsolateral (DLPAG) contained a large number of double-labeled cells in PSR animals compared to the PSC and PSD groups ($p < 0.05$ for all paired comparison). To be noted, the number of CTb/c-FOS+ cells in the DMPAG was significantly smaller in PSD animals compared to PSC ones (2.3 ± 0.9 vs 4.8 ± 0.5, $p = 0.433$).

Interestingly, the LPAG contained a large number of double-labeled cells compared to PSC animals both in PSD and PSR animals (19.3 ± 2.5 and 21.8 ± 2.5 respectively vs 5 ± 1.5, $p < 0.05$). Finally, the VLPAG contained a large and a substantial number of double-labeled cells in PSR and PSD animals

respectively compared to the PSC ones ($p < 0.05$ for all paired comparison). The percentage of CTb/c-FOS+ versus the total number of CTb+ neurons in PSR animals was of 12, 18, 13, 8 and 6 % in the RMPAG, DMPAG, DLPAG, LPAG and VLPAG, respectively. A substantial number of double-labeled neurons was also seen in the DpMe in PSR animals compared to PSC ones (14.3 ± 5.1 vs 0.8 ± 0.8, $p = 0.02$). Finally, a small number of double-labeled cells but significantly above PSD and PSC animals was seen in PSR animals in the dorsal paragigantocellular reticular nucleus (DPGi) and to a minor extent the caudal (PnC) and oral (PnO) pontine reticular nuclei and the gigantocellular reticular nucleus (Gi) ($p<0.05$ for all paired comparison). Interestingly, the percentage of CTb/c-FOS+ double-labeled cells over the total number of CTb+ cells climbed to 60 % in the DPGi.

Importantly, three structures previously involved in PS control (review in (Luppi et al., 2006), the lateral preoptic area (including the extended ventrolateral preoptic area), the SLD and the laterodorsal tegmental nucleus (LDTg) did not display double-labeled cells in PSR animals although they all contained a substantial number of singly CTb+ and singly c-FOS+ neurons (Figure 1C,F, Table 1).

Contribution of the MCH neurons to the LH VLPAG/dDpMe pathway

Since LH MCH neurons (Bittencourt et al., 1992) are known to play a key role in PS control (Verret *et al.*, 2003; Fort *et al.*, 2009; Saper *et al.*, 2010), we determined their contribution to the innervation of VLPAG/dDpMe by means of a triple-labeling combining immunofluorescent detection of MCH and CTb and DAB immunostaining of c-FOS (Figure 1D). We observed a substantial number of triple-labeled cells only within the LH (Figure 1E). They constituted 44 % of the total number of CTb/c-FOS+ double-labeled cells.

Local Pharmacology in the LH

Our tract tracing analysis (see above) clearly showed that the LH contained by far the largest number of neurons activated during PS hypersomnia and projecting to the VLPAG/dDpMe. These neurons could therefore play a key role in PS control by means of the inhibition at the onset and during PS of the PS-off neurons located in the VLPAG/dDpMe. To test this hypothesis, we determined the effect on sleep of muscimol ($GABA_A$ agonist) or clonidine (alpha 2 agonist) injections in the LH by means of bilaterally inserted cannula. We then confirmed for the 8 animals used in the study that the injections were localized in the LH (Figure 2 A, B).

Muscimol injection in LH induces a SWS-like state and inhibits PS

Muscimol injection in the LH induced a significant increase in SWS quantities during 16 h (Figure 4A-C). This increase was associated with a decrease of wake quantities (data not illustrated) and was mainly due to an increase in the duration and the number of SWS episodes (Figure 4D,E). During the first six hours following the application of muscimol in the LH, the animals spent more than 80 % of their time in SWS and PS was nearly absent (Figure 4B). PS latency was indeed of 389.7 ± 14.8 min after muscimol injection compared to 67.5 ± 7.1 min for Nacl ($p = 0.01$). In contrast, SWS latency was not affected (9.7 ± 2.5 min vs 8.2 ± 1.5 min, $p = 0.67$) (Figure 4F).

Importantly, power spectrum analysis of the EEG during SWS for the second and third hours after muscimol injections showed that delta power doubled ($p = 0.02$) and the peak of delta was significantly lowered compared to control SWS (2.5 ± 0.1 Hz versus 2.9 ± 0.1 Hz, $p = 0.02$) (Figure 3). Conversely, power of all the other frequency bands was significantly reduced compared to NaCl (theta, sigma, beta and gamma, $p < 0.05$). In addition, the EMG displayed a low tonic EMG activity similar to that seen in control condition but with the occurrence of muscle twitches. Despite these phasic movements, rats remained in a typical sleeping position (lying curled up on one side) and their eyes were closed.

After 6h, PS episodes reappeared progressively (Figure 4) and the amount of PS increased above control between 9 and 16 h after muscimol injection (Figure 4) allowing the animals to recover the PS quantities lost during the first six hours as reflected by PS quantities cumulated values at 16 h (94.3 ± 5.1 min vs 92.9 ± 7.4

min, p = 0.4838) (Figure 4C). The increase in PS quantities was due to an increase in the number and duration of PS episodes (Figure 4D,E).

Clonidine application in the LH selectively inhibits PS

It has been shown that MCH neurons express alpha 2 adrenergic inhibitory receptors whereas hypocretin neurons express alpha1 adrenergic excitatory receptors (van den Pol *et al.*, 2004; Bayer *et al.*, 2005; Grivel *et al.*, 2005; Modirrousta *et al.*, 2005). Therefore, in an attempt to determine the effect on PS of the inhibition of the MCH neurons without a simultaneous silencing of the hypocretin neurons, we injected clonidine (a specific alpha 2 antagonist) in the LH. During the first 2 h after clonidine injection, PS quantities were decreased compared to Nacl (3 ± 0.9 min Vs 6.1 ± 1.4 min, p = 0.0173). The decrease was due to a reduction in the number of PS episodes (3.5 ± 1.1 vs 6.6 ± 1.2, p = 0.0357) and not of their duration (0,7 ± 0.2 min vs 0,9 ± 0.2 min, p = 0.3270) (Figure 4G). Although SWS latency was decreased by 46.5 % (from 8.2 ± 1.5 min to 4.4 ± 1.2 min, p = 0.0251), PS latency was increased by 53.5 % (from 67.5 ± 7.1 min to 103.6 ± 9.5 min, p = 0.01) (Figure 4F). WK and SWS quantities were not significantly altered by clonidine injection within the LH (data not shown).

Effect of muscimol injection in the LH on c-FOS labeling

To determine whether muscimol injection in the LH induced a local inhibition, we counted the number of hypocretin (HCRT) and MCH neurons expressing c-FOS in animals perfused three hours after muscimol (n=4) or NaCl (n=4) injections. As shown in Figure 2C-E, the injections of muscimol inside the LH induced a significant 60 % reduction in the number of HCRT neurons expressing c-FOS compared to NaCl (p = 0.02). The number of MCH/c-FOS+ neurons already low following NaCl was slightly but not significantly reduced after muscimol injection (p = 0.47).

In addition, cortices of muscimol treated rats display only a small number of c-FOS labeled neurons in line with previous studies of c-FOS labeling after a long period of sleep. The number of c-FOS labeled neurons was inferior in muscimol than in NaCl injected rats.

Then, to determine whether the suppression of PS by muscimol application in the LH was due to an increased activation of VLPAG/dDpMe GABAergic neurons, we analyzed the number of VLPAG/dDpMe neurons expressing *gad67* mRNA and immunostained for c-FOS in muscimol and NaCl injected rats. As illustrated in Figure 5A-D, the number of c-FOS/*gad67*+ double-stained neurons was 3.7 times higher in VLPAG (p = 0.02) and 8.2 times higher in dDpMe (p = 0.02) after muscimol than after NaCl injection. These neurons represented 75 % of the total number of c-FOS+ neurons.

Two rats subjected to muscimol injection in the VLPAG/dDpMe region had also received a CTb injection in the SLD (Figure 7E). As already reported (Boissard et al., 2003), many CTb labeled neurons were observed in the VLPAG/dDpMe area. Among all of these CTb labeled neurons, many also express c-FOS (Figure 7F).

DISCUSSION

This study provides for the first time an exhaustive analysis of the VLPAG/dDpMe afferents activated after a selective PS deprivation and hypersomnia. It reveals that even if VLPAG/dDpMe receives projections from many parts of the brain, only a few are activated following a profound PS hypersomnia. We found out that the LH is the main structure containing activated neurons during PS that project to VLPAG/dDpMe. MCH neurons account for about 45 % of this activated projection. Muscimol inhibition of LH induced a total suppression of PS and a strong activation of VLPAG/dDpMe GABAergic neurons that project to the SLD.

Methodological consideration

In order to map activated neurons, we used c-FOS as a maker of neuronal activation since even if it is not a perfect marker (Kovacs, 2008), it is still the best available to extensively map activated neurons.

Further, during the last 15 years, c-FOS has been extensively used by our and other groups to explore the sleep/wake neuronal network (Sherin *et al.*, 1996; Maloney *et al.*, 1999; 2000; Boissard *et al.*, 2002; Maloney *et al.*, 2002; Verret *et al.*, 2003; Verret *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2006b; Verret *et al.*, 2006; Leger *et al.*, 2009; Sapin *et al.*, 2009; Sapin *et al.*, 2010; Clément *et al.*, 2011), and in several structures containing c-FOS+ neurons after PSR condition, electrophysiological recordings revealed the presence of PS-on neurons (Koyama *et al.*, 2003; Luppi *et al.*, 2004; Goutagny *et al.*, 2005; Goutagny *et al.*, 2008; Hassani *et al.*, 2009; Hassani *et al.*, 2010). Similarly, the ventrolateral nucleus of the preoptic area (VLPO) which contains a large number of c-FOS+ neurons following a SWS-hypersomnia (Sherin et al., 1996) was shown to contain SWS-on neurons (Szymusiak et al., 1998).

Role of the MCH and GABAergic lateral hypothalamic neurons in the inactivation of VLPAG/dDpMe GABAergic PS-off neurons during PS

We show here that after PS hypersomnia, the LH, ZI and to a minor extent the PH contained the largest number of c-FOS/CTb double-labeled cells in animals with a CTb injection in the VLPAG/dDpMe. We further showed that 44 % of these neurons express MCH. We previously showed that 76 % and more than 90 % of the neurons expressing c-FOS after PS-hypersomnia in the LH and ZI respectively, also express *gad67* (enzyme of synthesis of GABA) mRNA (Sapin et al., 2010). We also reported that one third of these neurons co-express MCH (Sapin et al., 2010). A large number of MCH immunoreactive fibers and MCH receptor 1 have been observed in the VLPAG/dDpMe region (Bittencourt et al., 1992; Hervieu et al., 2000). Further, electrophysiological recordings coupled with juxtacellular labeling revealed that approximately half of the LH PS-on neurons express the vesicular GABA transporter (vGAT) and the other half MCH (Hassani *et al.*, 2009; Hassani *et al.*, 2010). Interestingly, it was also shown that PS-on GABAergic neurons of the LH start to increase their activity before PS-onset while in contrast MCH PS-on neurons just start at PS-onset (Hassani *et al.*, 2009; Hassani *et al.*, 2010). These results indicate that MCH neurons co-express GAD67 but not vGAT and therefore synthesize GABA without having the possibility to release it by means of synaptic vesicles. MCH neurons are nevertheless rather inhibitory neurons since MCH has been shown to be primarily an inhibitory peptide (Gao and van den Pol, 2001). More importantly, from the present and previous data, it can be concluded that PS-on neurons of the LH and ZI strongly project to the VLPAG/dDpMe and are divided in two populations of equal weight containing GABA or MCH.

To determine the function in PS control of this pathway, we attempted to inactivate all LH neurons with muscimol or only those bearing alpha-2 adrenergic receptors using clonidine. We found out that muscimol and to a lesser degree clonidine bilateral injections in the LH induce a decrease in PS quantities. Further, both drugs induced an increase in PS latency and only clonidine decreased SWS latencies while muscimol also induced a long lasting increase in SWS quantities. Our results are in line with a previous study in cats which reported a strong SWS-hypersomnia with a total suppression of PS after muscimol injection in the LH (Sakai et al., 1990). These and our results strongly support the hypothesis that MCH and GABAergic PS-on neurons projecting to the VLPAG/dDpMe region play a key role in PS onset and maintenance. We further showed that muscimol injections in the LH induced a strong increase in the number of c-FOS/*gad67*+ and c-FOS/CTb+ double-labeled neurons in the VLPAG/dDpMe region in animals with CTb injections in the SLD. We previously showed that the VLPAG/dDpMe region is the only brainstem region containing a large number of c-FOS/GAD67+ neurons after PS deprivation (Sapin *et al.*, 2009). We also showed that it contains a population of GAD67 neurons projecting to the SLD (Boissard *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2006b) which itself contain the glutamatergic PS-on neurons generating PS (Clement et al., 2011). Finally, it was shown in rats and cats that inactivation of the VLPAG/dDpMe region induces a strong increase in PS quantities (Sastre *et al.*, 1996; Crochet *et al.*, 2006; Sapin *et al.*, 2009). Taken together, these and our present result strongly suggest that GABAergic and MCH neurons of the LH are in ideal position to induce PS by their direct inhibition of VLPAG/dDpMe PS-off GABAergic neurons. Since their inhibition abolishes PS, it can be proposed that they constitute the main generator of PS. However, this concept is not in line with the classical hypothesis that the brainstem is necessary and sufficient to generate PS since it is

still present after the removal of the forebrain. It is also not fitting with studies showing that lesions of the posterior hypothalamus do not induce a long lasting decrease in PS quantities (Sallanon et al., 1989). To reconcile these results and as illustrated in Figure 6, we propose that the GABA and MCH neurons of the lateral hypothalamus constitute the primary generator of PS in intact animals but that a second generator normally slaved to the hypothalamic one is present in the brainstem. In animals with an ablation of the hypothalamic generator, the brainstem generator would still be able to generate PS. Based on our and other previous studies, we propose that the brainstem generator is either located in the PAG or the SLD.

Role of other structures in the control of VLPAG/dDpMe GABAergic PS-off neurons

In addition to the LH and ZI, the dorsal and dorsolateral PAG also contain a large number of c-FOS/CTb double-labeled neurons specifically in PSR rats, while the lateral and ventrolateral PAG contained such cells both in PSD and PSR animals. We previously showed that 50 % of the VLPAG c-FOS labeled neurons in PSR animals expressed *gad67* and are therefore GABAergic. In contrast, the great majority of the c-FOS labeled neurons located in LPAG, DLPAG and DMPAG in PSD and PSR animals did not express *gad67* (Sapin et al., 2009) and based on vGlut2 *in situ* hybridization combined with c-FOS immunohistochemistry (Sherin *et al.*, 1996; Maloney *et al.*, 1999; 2000; Boissard *et al.*, 2002; Maloney *et al.*, 2002; Verret *et al.*, 2003; Verret *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2006b; Verret *et al.*, 2006; Leger *et al.*, 2009; Sapin *et al.*, 2009; Sapin *et al.*, 2010; Clément *et al.*, 2011) could be glutamatergic (unpublished results). Altogether, these results indicate that glutamatergic and GABAergic PS-off and PS-on neurons located in the different subdivisions of the PAG might control the activity of PS-off GABAergic neurons of the VLPAG/dDpMe. They more generally confirm as proposed previously that since the PAG contains both PS-off and PS-on neurons with probably reciprocal interconnections, it constitutes without a doubt a key brainstem structure for PS control and could be the slaved brainstem generator mentioned above. Additional studies are now necessary to test this hypothesis and decipher the function of each of the subpopulations of neurons revealed.

Importantly, we also found that although the structure known to generate PS, the SLD, contains CTb labeled neurons, they were not c-FOS+ in PSR animals. These results strongly suggest that SLD neurons projecting to the VLPAG/dDpMe region are not PS-on neurons. Our results are at variance with those of Lu et al. (2006) demonstrating that a large proportion of the SLD neurons projecting to the VLPAG/dDpMe region are c-FOS+ after PS hypersomnia and are GABAergic. We also previously failed to confirm that SLD c-FOS+ neurons labeled after PS hypersomnia are GABAergic (Sapin et al., 2009). In contrast, we found that most of them are glutamatergic (Sherin *et al.*, 1996; Maloney *et al.*, 1999; 2000; Boissard *et al.*, 2002; Maloney *et al.*, 2002; Verret *et al.*, 2003; Verret *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2006b; Verret *et al.*, 2006; Leger *et al.*, 2009; Sapin *et al.*, 2009; Sapin *et al.*, 2010; Clément *et al.*, 2011). The reasons for the discrepancies between our and Lu et al. study are not clear. It can be due to the fact that the PS hypersomnia was not induced by the same method and was much stronger in our study. In addition, they did not examine c-FOS expression in control animals (Lu *et al.*, 2006b; Vetrivelan *et al.*, 2009) and we therefore cannot rule out that the c-FOS-labeled neurons they observed after PS hypersomnia would not have been labeled in basal condition.

Also at variance with Lu et al. (2006), we did not find CTb/c-FOS labeled neurons in LPO including the extended ventrolateral preoptic area although both c-FOS and CTb singly labeled neurons were present in this structure. Our results are therefore not in favor of a control of PS-off GABAergic neurons of the VLPAG/dDpMe by PS-on GABAergic neurons of the extended VLPO. Finally, we also reported a large number of CTb+/c-FOS- neurons in the central amygdala and the lateral bed nucleus of the stria terminalis after CTb injection in the VLPAG/dDpMe region. This pathway putatively GABAergic (Ni *et al.*, 1995; Jia *et al.*, 1997; Hisano *et al.*, 2000; Herzog *et al.*, 2001; Jia *et al.*, 2005) could play a role in the induction of cataplexy in narcoleptics since these two nuclei have been involved in emotion processing. Indeed, cataplectic episodes are triggered by a positive emotion in the absence of hypocretin transmission (Scammell et al., 2009). It is therefore possible that the descending pathway from the central amygdala and the lateral

bed nucleus of the stria terminalis is GABAergic and terminate on the GABAergic PS-off neurons of the VLPAG/dDpMe. In healthy individual, its activation by positive emotion would lead to the inhibition of the PS-off GABAergic neurons of the VLPAG/dDpMe but cataplexy would be prevented because hypocretin neurons would at the same time excite the VLPAG/dDpMe PS-off neurons and more generally the motor system.

Neurons responsible for the induction of SWS by muscimol application in the lateral hypothalamic area

We report here that muscimol inhibition of LH induces a permanent SWS state. Induction of SWS by muscimol application in the LH was already reported in cats (Sakai et al., 1990). In addition to this early study, we interestingly show here that the EEG during the effect is characterized by a significant increase in delta power and a decrease in sigma and theta power compared to control SWS. These results indicate that neurons located in the LH specifically inhibit cortical delta oscillations and therefore likely play a crucial role in cortical activation during W. This region is very heterogeneous and contains a large number of c-FOS labeled cells after a period of W, some of which have been shown to contain hypocretin (Estabrooke et al., 2001). Further, ICV injection of hypocretin (Piper et al., 2000) and optogenetic stimulation of Hrct neurons (Adamantidis et al., 2007) both induce W whereas acute optogenetic inhibition of HCRT neurons induces SWS (Tsunematsu et al., 2011). Therefore, inhibition of the hypocretin neurons located in the LH could be responsible for the induction of SWS observed. However, other types of uncharacterized W-active neurons could also be involved.

In summary, our results indicate that in intact animals, the activation of neurons located in the lateral hypothalamus is a necessary step to trigger PS. The present and previous results further indicate that these neurons likely use MCH and GABA as neurotransmitters and control PS onset and maintenance by means of inhibitory projections to VLPAG/dDpMe PS-off neurons.

MATERIALS AND METHODS

All experiments were conducted in accordance to the French and European Community guidelines for the use of research animals and approved by the institutional animal care and use committee of the University of Lyon 1. Sprague-Dawley male rats were housed individually in recording barrels under a constant 12 h light-dark cycle (light on at 08:00). Room temperature was maintained at 21 ± 1°C, and standard rodent food and water were available *ad libitum* throughout the experiment.

Surgery

CTb injection

As previously described (Boissard *et al.*, 2002; Boissard *et al.*, 2003; Verret *et al.*, 2006), rats (290-300g, Charles River, France) received an injection CTb inside the VLPAG/dDpMe (n=12) or the SLD (n=2). Rats were anesthetized with a Ketamin/Xylazin mix (100 $mg.kg^{-1}$ and 10 $mg.kg^{-1}$ respectively, i.p.) and mounted in a stereotaxic frame (David Kopf Instruments, CA). Following incision of the scalp, a hole was drilled in the skull and a borosilicate glass micropipette (3-5 µm external tip diameter) backfilled with a low salt CTb solution (0.5 % in 0.1 M PB, pH 6; List Biological Laboratories, CA) was slowly lowered by means of a hydraulic micropositioner (David Kopf Instruments) into the structures according to their stereotaxic coordinates (VLPAG/dDpMe: anteroposterior bregma (β) - 7 mm, mediolateral β + 0.8 mm, dorsoventral - 5.2 mm from the brain surface; SLD AP β - 9.6 mm, ML β + 1.2 mm, DV - 5.8 mm from the brain surface). The pipette was left in place for 5 min before the tracer was iontophoretically ejected. For this purpose, the pipette was connected by a silver wire immersed in the CTb solution to a current generator (CS4, Transkinetics, MA) that delivered pulsed positive current (7 seconds on/7 seconds off) for 15 minutes (Luppi

et al., 1995). At the end of the ejection, the pipette was left in place for at least 10 minutes to avoid leakage of the tracer along the pipette track.

Cannulas implantation

In addition to the 2 rats injected with CTb inside the SLD, 8 other rats (290-310g) were bilaterally implanted with guide cannulas inside the HLA (AP β - 3.3 mm, ML β ± 1.8 mm, DV - 8.5 mm). Using the stereotaxic apparatus, guide cannulas (Plastics One Inc., CT) were lowered inside the brain down to 2.6 mm above the targeted area (cannulas used are 2.6 mm longer than the guide cannula). Due to space conflict, guide cannulas were implanted with a lateral 10° angle (Figure 4A). They were then cemented to the skull using acrylic cement (Superbond, Sun Medical Co. Ldt., Japan) and dental cement (Paladur, Heraeus Kulzer, Germany).

EEG/EMG implantation

All the rats used in this study were implanted for electroencephalographic (EEG) and electromyographic (EMG) recordings. As previously described (Verret *et al.*, 2005; Verret *et al.*, 2006; Sapin *et al.*, 2009), four stainless-steel screws (Anthogyr, France) were inserted over the frontal (AP β + 3 mm, ML β + 1 mm), parietal (AP β - 4 mm, ML β + 3 mm), occipital (AP β - 8 mm, ML β + 3 mm) and cerebellar (AP β - 12 mm, ML β + 2 mm) cortices. Two gold-coated electrodes were also inserted into the neck muscles in order to record EMG activity. All EMG and EEG electrodes were than fixed to the skull using acrylic cement (Superbond) and connected to a miniature plug (Plastics One Inc.) that was cemented using dental cement (Paladur). Due to space conflicts, rats implanted with cannulas inside the HLA did not receive the parietal EEG electrode.

Paradoxical sleep deprivation and recovery

After the surgery, rats were allowed to recover for 5 days, habituated to the recording conditions for at least 4 more days and recorded for a 2-day baseline. Then PS deprivation was performed using the well characterized flower pot technique (Maloney *et al.*, 1999; 2000; 2002; Verret *et al.*, 2003; Verret *et al.*, 2005; Verret *et al.*, 2006; Leger *et al.*, 2009; Sapin *et al.*, 2009; Sapin *et al.*, 2010; Clément *et al.*, 2011). Three groups of rats were done (n=4 in each group). Rats of the control group (PSC) remained on a bed of woodchips throughout the experiment. Rats deprived of PS (PSD) were placed at 11:00 am and for about 75 h in a cage containing a small platform (6.5 cm in diameter) surrounded by water. Rats of the last group (PSR for PS-recovery) were submitted to the same deprivation than PSD but during only 72 h. The last day at 11:00 am, PSR rats were removed from the deprivation box and put in a new cage containing a dry bed of woodchips where they can recover from PS-deprivation. PSR rats were sacrificed at about 2:00 pm, exactly 150 min after the first PS episode which generally occurs after 30 min of exploration and grooming. PSC and PSD rats were also sacrificed at about 2:00 pm. During PS-deprivation, PSD and PSR animals were removed daily from their cage for about 30-45 min to allow motor activity while the cages were cleaned.

Pharmacology

Animals were allowed to recover for 5 days after the surgery and were then handled daily for at least 15 min during one more week to minimize non-specific stress. 0.3 µL of muscimol (GABAa receptor agoniste, 1 $\mu g.\mu L^{-1}$ in NaCl; Sigma-Aldrich, MO), clonidine hydrochloride (alpha-2 adrenoreceptor agoniste, 0.53 $\mu g.\mu L^{-1}$ in NaCl; Tocris Bioscience, UK) or NaCl (0.9%) were injected at the rate of 0.1 $\mu L.min^{-1}$ using an Hamilton syringe (Hamilton, Swiss) connected to the cannula with the appropriate polyethylene tubing (Plastics One Inc.) and inserted into a micro-pump (New Era Pump System, NY). Injection sessions started at 9:20 am. Cannulas were lowered down the brain and left in place 5 min before and 5 min after the injection. At the end of the injection session, animals were immediately put back in their cage and vigilance states were recorded during 16 h. All drugs were stored at final concentration at - 20 °C and one new batch was used for each injection session. Two injections were spaced by at least 3 days and the sequence of drug injections was randomized.

Polygraphic recordings

Rats were connected to a cable attached to a rotating connector (Plastics One Inc.) to allow free movements of the animal within its cage. EEG and EMG signals were first amplified (MCP PLUS, Alpha-Omega Engineering, Israel) before been collected on a computer via a CED interface using Spike2 software (Cambridge Electronic Design, UK). For all animals, the same amplifications were used and each animal remained in the same box during the entire experiment. Sampling frequency for polygraphic recordings was 250.8 Hz.

Perfusion, fixation and section

Under profound pentobarbital anesthesia (Ceva santé animale, 150 $mg.kg^{-1}$, i.p.), rats were transcardially perfused with Ringer's lactate solution containing 0.1 % heparin, followed by 500 ml of a fixative solution composed of 4 % paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4). Brains were removed and stored at 4 °C for 1 night in the fixative solution and then for 3 days in 30 % sucrose in 0.1 M PB. Brains were then rapidly frozen in methyl-butane cooled with dry ice and 30 mm thick coronal sections were cut on a cryostat (Microm, France). Free-floating sections were collected and stored at - 20 °C in a RNase free cryoprotectant solution (Sapin *et al.*, 2009; Sapin *et al.*, 2010; Clément *et al.*, 2011).

Immunohistochemistry

As previously described (Boissard et al., 2002; Verret et al., 2006), brain sections were successively incubated in (i) a rabbit anti-serum to c-FOS (1:10,000; Merck, Germany) in PBST-Az (PBST containing 0.1 % of azide) for 3 days at 4°C; (ii) a biotinylated goat anti-rabbit IgG solution (1:1,000; Vector Laboratories, CA); and (iii) an ABC-HRP solution (1:1,000; Elite kit, Vector Laboratories) both for 90 min at room temperature. Finally, the sections were immersed in a 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.6) containing 0.025% 3,3'-diaminobenzidine-4 HCl (DAB; Sigma-Aldrich), 0.003% H_2O_2 and 0.6 % nickel ammonium sulphate. Three washes of 10 min were performed between each step. The c-FOS stained sections were then incubated the following day in either a goat polyclonal antibody to hypocretin (1:5,000; Santa Cruz Biotechnology Inc., CA), either a rabbit anti-serum to MCH (1:20,000; Phoenix Pharmaceutical, CA) or a goat anti-serum against CTb (1:40,000; Merck) in PBST-Az over 3 days at 4°C. Amplification steps were similar to those above but revelation was performed in DAB solution without nickel. Finally, the sections were mounted on slides, dried and coverslipped with DePex.

For the triple labeling against c-FOS, MCH and CTb, the first step for c-FOS was done as described above. Then c-FOS stained sections were incubated (i) 3 nights at 4 °C in PBST-Az containing rabbit anti-serum angaint MCH (1:5,000) and goat anti-serum against CTb (1:10000); (ii) 2 hours in PBST containing fluorescent antibodies (donkey anti-rabbit-α488 and donkey anti-goat-α546, Invitrogen, UK). Finally, sections were quickly rinsed in PBST, mounted and coverslipped with Mowiol 4-88 (Merck). The Analysis of immunolabeled neurons was done immediately to prevent decrease of fluorescence.

c-FOS immunohistochemistry combined with *gad67* mRNA *in situ* hybridization

The anti-sense and sense digoxigenin-labeled probe against *gad67* mRNA were synthesized from a recombinant linearized plasmid containing the *gad67* cDNA using a nonradioactive RNA labeling kit (Roche Diagnostic, Switzerland). Briefly and as described before (Sapin *et al.*, 2009; Sapin *et al.*, 2010; Clément *et al.*, 2011), brain sections were successively incubated with a rabbit anti-serum to c-FOS (1:4000; Merck), a biotinylated goat anti-rabbit IgG solution (1:1000; Vector Laboratories) and an ABC-HRP solution (1:1000; Elite kit, Vector Laboratories). Then sections were immersed for around 15 min in 3,3-diaminobenzidine-4 HCl (DAB, Sigma-Aldrich) and 0.003% H_2O_2. All the buffers contained 0.2% of RNase inhibitor (solution Protect RNA RNase inhibitor, Sigma-Aldrich). They were then rinsed in PBST containing 10 mM dithio-threitol (DTT, Sigma-Aldrich) and in standard saline citrate solution (SSC 2X). Sections were then placed overnight at 65°C in the hybridization buffer containing 0.5 $\mu g.mL^{-1}$ of the digoxigenin-labeled probe. Sections were washed in SSC 1X, 50% formamide, 0.1% Tween-20 and treated with RNase A (USB

Corporation, Cleveland, OH). Sections were then incubated with an anti-digoxigenin antibody conjugated to alkaline phosphatase (1:2000, Roche Diagnostic). Staining was revealed using nitroblue tetrazolium (NBT) and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP) (Roche Diagnostic). Finally, the sections were mounted on slides, dried and coverslipped with Vectamount (Vector Laboratories).Controls in the absence of primary antibodies (anti-c-FOS and anti-digoxigenin) or with the sense probe were run to ensure the specificity of the labeling.

Analysis of sleep-wake data

Quantification of sleep-wake cycle

For the PS-deprivation/recovery experiment, the last 150 min before sacrifice were analyzed for each animal. For pharmacological experiment, the analysis was done for the 16 h following drug injection. Vigilance states were scored by 5 sec epochs using a homemade script developed for Spike2 software. State classification was done by visual examination of polygraphic signals and the help of a sliding window showing the EEG power spectrum analyzed during the same 5 sec epoch by fast Fourier transform. Wake was characterized by desynchronized (activated) low-amplitude EEG accompanied by a sustained EMG activity; SWS was distinguished by high-voltage slow waves (1.5 - 4.0 Hz) and spindles (10 -14 Hz) and the disappearance of phasic muscle activity. The occurrence of muscle atonia with a regular and pronounced theta rhythm (4 - 9 Hz) characterized PS. We then calculated the quantities, percentages, numbers and duration of bouts for each vigilance state.

Characterization of the SWS-like state

Spectral analysis for the characterization of SWS-like state was done on frontal EEG signals and we analyzed the 2nd and 3rd hours following muscimol and NaCl injections. We first removed from analysis 20 sec apart each transition in order to have “pure” states. Then, for each 5 sec epoch of SWS, a power spectrum was calculated by fast Fourier transform (0.24 Hz bin, from 0.6 Hz to 120 Hz) before being normalized. Finally, a mean of all individual normalized spectra across the 2 h period was created. For each frequency band (delta, 0.5 - 4.6 Hz ; theta, 5.1 - 8.9 Hz ; sigma, 9.9 - 14 Hz ; beta, 15 - 30 Hz ; gamma1, 39.9 - 48.1 Hz ; gamma2, 51.9 - 120 Hz), its normalized power was calculated as well as the most represented frequency in this band. These normalized data were compared between experimental groups. We also created a time-frequency graph of raw power spectrum during the first 800 5s-epochs of the 2nd and 3rd hours following muscimol and NaCl injections.

Analysis of histological labeling

CTb/c-FOS analysis after PS-deprivation and recovery experiment

We exhaustively map the c-FOS singly, CTb singly and c-FOS/CTb double-labeled neurons from β - 12.8 mm to β + 0.4 mm. Drawings of double-labeled sections taken at 600 µm intervals were made with an Axioscope microscope (Zeiss, Germany) equipped with a motorized X–Y-sensitive stage and a video camera connected to a computerized image analysis system (Mercator; ExploraNova, France). The number of c-FOS+, CT+ and CTb/c-FOS+ neurons per structure was automatically counted and exported using Mercator (ExploraNova). When a structure was present on several sections the neurons counted on all sections were summed.

CTb/c-FOS/MCH triple labeling

For this part of the experiment, one side (ipsilateraly with the CTb injection) of 4 sections spaced by 360 µm and localized in the lateral hypothalamus were analysed. The number of CTb/c-FOS+ and CTb/c-FOS/MCH+ neurons were than counted and summed for theses 4 sections. This analysis was done only for the 4 animals of the PSR group as it is known that MCH neurons are not activated in the two other conditions (Verret et al., 2003).

Histological analysis following muscimol injection in the LH

For each animal of both muscimol and NaCl groups (n=4 in each group) The number of c-FOS/HCRT+, c-FOS/MCH+ and c-FOS/*gad67*+ neurons were counted on one section localized at Bregma -

2.5 mm for HCRT and MCH and Bregma - 7.4 mm for *gad67*. As these two labeling were similar on both brain sides, only one side was counted.

Statistical analysis

Because of the number of animals used in each experiment (n=8 in maximum), we only used non-parametric tests. For the comparison of vigilance states and number of labeled neurons across PSC, PSD and PSR condition, Kruskal-Willis tests were used, followed by post-hoc PLSD Mann-Whitney tests to identify pairwise differences. Concerning the data following pharmacological modulation, differences in state quantities, latency etc., as well as spectral band powers between NaCL and, muscimol or clonidine, were analysed with a Wilcoxon signed rank test, but differences in the number of c-FOS+ neurons (HCRT, MCH or *gad67*) was analysed with a Mann-Whitney test. All statistics were performed using StatView software and a significant effect was considered for all $p < 0.5$.

LEGENDES

Abbreviations:

3V, 3rd ventricle; 4N, trochlear nucleus; 4V, 4th ventricle; Aq, aqueduct; BST, Bed nucleus of the stria terminalis; AHC, anterior hypothalamic area, central part; AHP, anterior hypothalamic area, posterior part; APT, anterior pretectal nucleus; BL, basolateral amygdaloid nucleus; Ce, central amygdaloid nucleus; CGPn, central gray of the pons; CnF, cuneiform nucleus; DA, dorsal hypothalamus area; DLPAG, dorsolateral periaqueductal gray; DM, dorsomedial hypothalamic nucleus; DMPAG, dorsomedial periaqueductal gray; DPGi, dorsal paragigantocellular reticular nucleus; dDpMe, deep mesencephalic nucleus, dorsal part; DpMe, deep mesencephalic nucleus; DR, dorsal raphe nucleus; DTg, dorsal tegmental nucleus; f, fornix; Gi, gigantocellular reticular nucleus; GiV, gigantocellular reticular nucleus, ventral part; ic, internal capsule; IC, inferior colliculus; KF, Kîlliker-Fuse nucleus; LC, locus coeruleus; LDTg, laterodorsal tegmental nucleus; LG, lateral geniculate nucleus; LH, lateral hypothalamus; LPAG, lateral periaqueductal gray; LPB, lateral parabrachial nucleus; LPGi, lateral paragigantocellular nucleus; LPO, lateral preoptic nucleus; me5, mesencephalic trigeminal tract; mlf, medial longitudinal fasciculus; MnPO, median preoptic nucleus; Mo5, motor trigeminal nucleus; MPB, medial parabrachial nucleus; MPO, medial preoptic nucleus; mt, mammillothalamic tract; MTu, medial tuberal nucleus; opt, optic tract; Pa, paraventricular hypothalamic nucleus; PCRt, parvicellular reticular nucleus; PH, posterior hypothalamic nucleus; PMD, premammillary nucleus, dorsal part; PnC, pontine reticular nucleus, caudal part; PnO, pontine reticular nucleus, oral part; RMPAG, rostromedial periaqueductal gray; RRF, retrorubral field; scp, superior cerebellar peduncle; SC, superior colliculus; SLD, sublaterodorsal tegmental nucleus; SNC, substantia nigra, compact part; SNR, substantia nigra, reticular part; VLPAG, ventrolateral periaqueductal gray; VMH, ventromedial hypothalamic nucleus; ZI, zona incerta.

		CTb+		CTb+/c-FOS+					
				PSR		PSD		PSC	
	n	Ipsi	Contra	Ipsi	Contra	Ipsi	Contra	Ipsi	Contra
Basal forebrain									
BST	2	117.6 ± 8.8	18.5 ± 2.2	5.3 ± 0.9	1.8 ± 1.1	2.3 ± 0.5	0.5 ± 0.5	0.8 ± 0.5	0.0 ± 0.0
MnPO	1	6.3 ± 1.1		1.8 ± 0.6		0.0 ± 0.0		0.8 ± 0.3	
MPO	2	20.8 ± 0.5	7.3 ± 0.1	2.5 ± 1.5	1.3 ± 0.6	1.0 ± 0.7	0.3 ± 0.3	0.8 ± 0.5	1.0 ± 0.6
LPO	2	28.3 ± 3.5	5.3 ± 0.7	2.0 ± 0.7	0.3 ± 0.3	1.8 ± 0.8	0.5 ± 0.5	0.3 ± 0.3	0.0 ± 0.0
Thalamus									
APT	2	66.8 ± 1.3	31.8 ± 1.1	10.5 ± 3.8	8.8 ± 2.6	4.3 ± 2.1	3.8 ± 1.9	2.8 ± 0.5	4.8 ± 1.3
LG	3	14.5 ± 0.9	2.2 ± 0.4	1.5 ± 0.3	0.0 ± 0.0	0.8 ± 0.5	1.3 ± 0.9	0.5 ± 0.3	0.0 ± 0.0
Amygdala									
Ce	3	117.9 ± 13.6	9.2 ± 2.1	4.0 ± 1.0	0.5 ± 0.3	1.3 ± 0.9	0.3 ± 0.3	0.5 ± 0.5	0.0 ± 0.0
Hypothalamus									
VMH	4	97.6 ± 8.5	29.8 ± 3.0	7.8 ± 2.1	2.8 ± 1.1	2.3 ± 1.9	0.3 ± 0.3	5.3 ± 1.7	1.0 ± 0.4
PMD	1	14.3 ± 0.7	0.4 ± 0.0	0.8 ± 0.8	0.0 ± 0.0	3.3 ± 2.9	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
AHC	1	12.8 ± 1.1	5.3 ± 0.3	1.3 ± 0.5	0.8 ± 0.5	0.3 ± 0.3	0.3 ± 0.3	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.3
AHP	1	6.1 ± 0.9	2.5 ± 0.3	1.3 ± 0.6	1.0 ± 0.6	0.3 ± 0.3	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.3	0.0 ± 0.0
DA	1	25.6 ± 0.5	7.6 ± 0.5	4.8 ± 1.8	1.0 ± 0.7	2.8 ± 0.9	1.3 ± 0.8	2.3 ± 0.5	0.0 ± 0.0
DM	3	9.2 ± 0.5	3.9 ± 0.2	1.5 ± 0.6	0.3 ± 0.3	0.5 ± 0.5	0.3 ± 0.3	1.0 ± 0.6	0.3 ± 0.3
Pa	2	5.9 ± 1.0	1.4 ± 0.2	1.5 ± 0.9	0.3 ± 0.3	0.3 ± 0.3	0.3 ± 0.3	0.3 ± 0.3	0.0 ± 0.0
PH	3	97.8 ± 8.6	27.3 ± 1.7	12.5 ± 2.8 *	3.5 ± 1.0	5.0 ± 0.7	1.3 ± 0.6	3.3 ± 0.3	0.5 ± 0.3
LH	7	448.3 ± 23.0	111.8 ± 8.1	55.8 ± 4.0 *,#	21.0 ± 3.7 *,#	26.3 ± 5.9	5.3 ± 1.1	10.0 ± 1.4	4.3 ± 1.7
ZI	6	435.7 ± 25.4	62.7 ± 0.6	27.5 ± 5.8 *,#	13.0 ± 2.0 *,#	9.5 ± 2.0	2.0 ± 0.4	9.5 ± 0.6	1.0 ± 0.6
Mésencephalum									
IC	2	30.2 ± 4.2	10.5 ± 1.0	0.5 ± 0.5	0.8 ± 0.5	1.8 ± 1.2	0.8 ± 0.5	0.3 ± 0.3	0.0 ± 0.0
SC	4	533.8 ± 31.4	102.8 ± 5.6	18.0 ± 5.7	5.0 ± 1.4	11.0 ± 5.1	2.3 ± 1.0	4.3 ± 1.4	0.8 ± 0.8
DpMe	7	662.8 ± 12.2	173.8 ± 5.1	14.3 ± 5.1 *	6.3 ± 3.3	4.8 ± 1.9	2.3 ± 0.8	0.8 ± 0.8	1.0 ± 0.4
RRF	6	68.3 ± 6.1	17.0 ± 1.9	1.5 ± 0.6	0.0 ± 0.0	1.5 ± 0.9	0.3 ± 0.3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
SNC	2	49.3 ± 2.1	9.8 ± 0.4	1.3 ± 0.6	0.0 ± 0.0	1.3 ± 1.3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
SNR	4	52.5 ± 4.2	6.0 ± 0.4	1.8 ± 0.6	0.0 ± 0.0	0.8 ± 0.5	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.3	0.0 ± 0.0
Periaqueductal gray									
RMPAG	2	168.8 ± 2.0	69.2 ± 1.0	20.0 ± 3.0 *,#	9.8 ± 1.4 *,#	8.0 ± 1.7	3.5 ± 1.3	4.3 ± 0.8	2.0 ± 0.4
DMPAG	6	175.7 ± 8.6		26.0 ± 2.6 *,#		2.3 ± 0.9 *		4.8 ± 0.5	
DLPAG	5	110.8 ± 5.4	28.7 ± 1.6	13.8 ± 2.3 *,#	4.8 ± 0.9 *,#	2.0 ± 0.9	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.3	0.3 ± 0.3
LPAG	6	295.8 ± 5.8	77.5 ± 3.1	21.8 ± 2.5 *	10.3 ± 2.4 *	19.3 ± 2.5 *	4.0 ± 1.1	5.0 ± 1.5	1.8 ± 1.0
VLPAG	5	332.0 ± 5.9	138.0 ± 0.9	22.0 ± 3.7 *,#	9.8 ± 1.9 *,#	9.5 ± 1.2 *	4.3 ± 1.1	4.5 ± 1.0	3.3 ± 0.9
DR	3	42.2 ± 5.6		2.3 ± 0.9		0.5 ± 0.3		0.5 ± 0.3	
Pons									
LDTg	2	33.8 ± 2.1	11.5 ± 0.9	1.8 ± 0.6	1.5 ± 0.6	1.0 ± 0.7	0.3 ± 0.3	0.8 ± 0.5	0.0 ± 0.0
CGPn	3	42.6 ± 4.3	15.4 ± 1.3	4.0 ± 1.1	1.3 ± 0.5	2.8 ± 0.3	0.3 ± 0.3	1.8 ± 0.5	0.0 ± 0.0
CnF	2	71.6 ± 4.5	24.8 ± 0.3	1.5 ± 0.3	1.5 ± 1.0	1.0 ± 1.0	0.3 ± 0.3	1.8 ± 0.5	0.5 ± 0.5
LC	2	0.9 ± 0.2	0.7 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
KF	2	29.8 ± 2.6	11.6 ± 0.5	0.5 ± 0.5	0.3 ± 0.3	2.5 ± 1.5	2.3 ± 1.9	0.3 ± 0.3	0.5 ± 0.3
LPB	3	99.8 ± 2.7	34.8 ± 3.0	11.5 ± 2.2	5.5 ± 3.0	6.8 ± 1.3	2.3 ± 0.9	5.8 ± 0.5	1.0 ± 0.6
MPB	3	59.4 ± 5.5	15.6 ± 0.7	3.5 ± 1.0	0.8 ± 0.8	0.8 ± 0.8	0.0 ± 0.0	1.0 ± 0.4	0.0 ± 0.0
SLD	3	27.3 ± 2.5	6.3 ± 1.0	3.0 ± 2.3	0.5 ± 0.3	1.8 ± 0.9	0.3 ± 0.3	0.3 ± 0.3	0.0 ± 0.0
PnC	2	67.5 ± 3.4	34.5 ± 1.1	3.3 ± 0.6 *,#	0.8 ± 0.3	0.8 ± 0.5	0.3 ± 0.3	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.3
PnO	4	161.8 ± 6.2	77.2 ± 1.5	6.0 ± 3.1 *,#	2.0 ± 0.0	1.0 ± 0.7	0.3 ± 0.3	0.3 ± 0.3	0.5 ± 0.3
Medullary reticular formation									
LPGi	4	24.7 ± 0.6	18.8 ± 0.9	2.0 ± 0.7	1.8 ± 0.8	0.3 ± 0.3	1.3 ± 0.9	0.5 ± 0.5	0.5 ± 0.3
DPGi	4	13.3 ± 0.5	19.5 ± 1.0	8.8 ± 1.3 *,#	4.5 ± 0.3 *,#	0.3 ± 0.3	0.3 ± 0.3	0.3 ± 0.3	0.0 ± 0.0
Gi	4	17.8 ± 1.3	9.6 ± 0.5	1.3 ± 0.3 *,#	1.5 ± 0.3 *,#	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.3	0.3 ± 0.3	0.0 ± 0.0
PCRt	5	39.9 ± 3.6	18.5 ± 1.6	2.8 ± 0.9	1.5 ± 0.5	1.0 ± 0.4	0.8 ± 0.5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

Table 1: Activated afferences to VLPAG/dDpMe in control, PS deprived and PS hypersomniac animals

Number (mean ± sem) of CTb+ and CTb/c-FOS+ neurons counted in control (PSC), PS deprived (PSD) and PS hypersomniac (PSR) rats on a total of 23 sections taken at 600 µm intervals from β - 12.8 mm to β + 0.4 mm. For CTb/c-FOS+ numbers, values are an average across 4 animals in each group of the sum of all CTb/c-FOS+ neurons counted on one or several sections (column n) depending on the rostrocaudal extent of the structures. For CTb+ numbers, values are an average across the 12 animals as no difference was observed between the 3 groups. ***** indicates $p < 0.05$ compared to PSC and # indicates $p < 0.05$ compared to PSD.

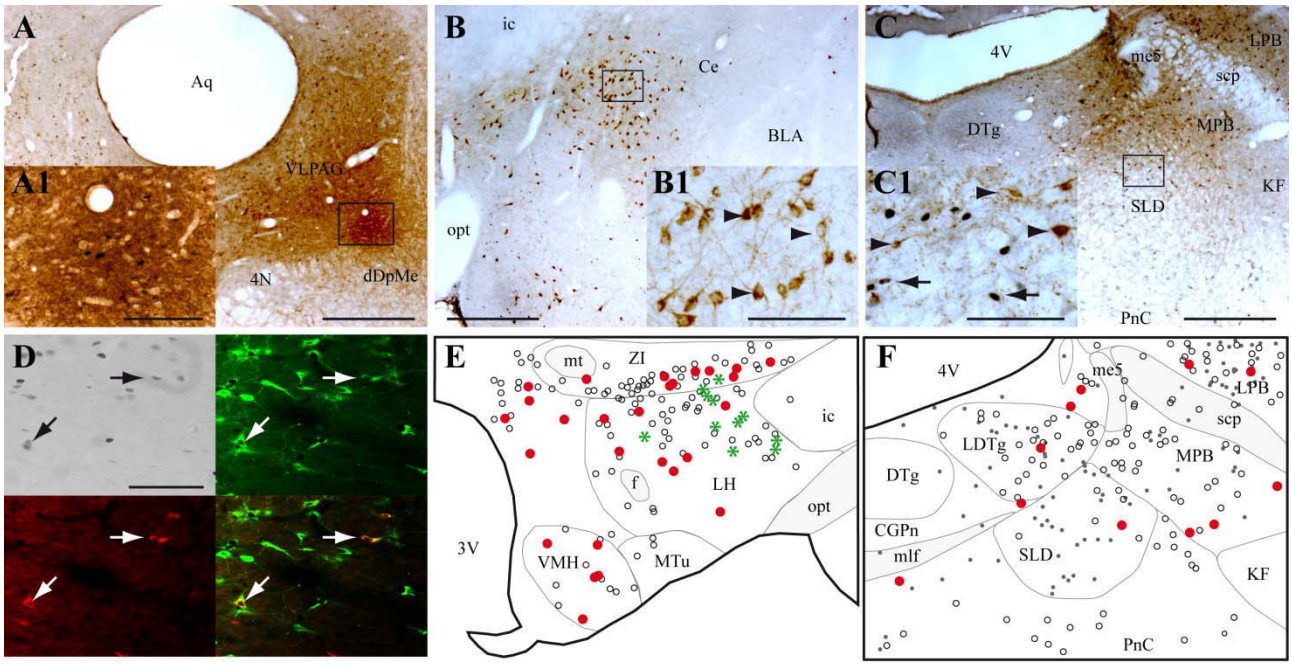


Figure 1: VLPAG/dDpMe afferents expressing c-FOS after PS-hypersomnia.
A, Illustration of a CTb injection site located at the border between VLPAG and dDpMe in a PS deprived animal. The enlargement in **A1** shows the numerous c-FOS+ neurons within the injection site indicating that we effectively targeted the neurons specifically active during PS deprivation. **B**, Photomicrograph showing the large number of CTb singly labeled cells (brown cytoplasmic labeling) in the central amygdala after CTb injection in the VLPAG/dDpMe in a PSR animal. The squared area is enlarged in **B1**. Arrowheads indicate CTb singly labeled neurons. **C**, Photomicrograph showing that the SLD only contains singly CTb+ (brown cytoplasm) and singly c-FOS+ (black nuclear staining) labeled neurons in PSR animals. The box in C is enlarged in **C1**. Arrows and arrowheads indicate c-FOS singly and CTb singly labeled neurons respectively. **D**, Composite photomicrograph illustrating a triple labeling for c-FOS (DAB staining, upper left corner), CTb (in red) and MCH (in green). An overlay photomicrograph is shown in bottom right corner. Arrows point out triple labeled neurons. **E**, Schematic distribution of CTb/c-FOS/MCH+ (green asterisks), CTb/c-FOS+ (red dots) and singly CTb+ (black circles) neurons within the LH (AP β - 2.6 mm). **F**, Schematic distribution of singly CTb+ (open circles), CTb/c-FOS+ (red dots) and singly c-FOS+ (black dots) neurons in the SLD region (AP - 9.2 mm). Scale bars: 500 µm in **A**, **B**, **C**, 100 µm in **A1**, **B1**, **C1**, and 200 µm in **D**.

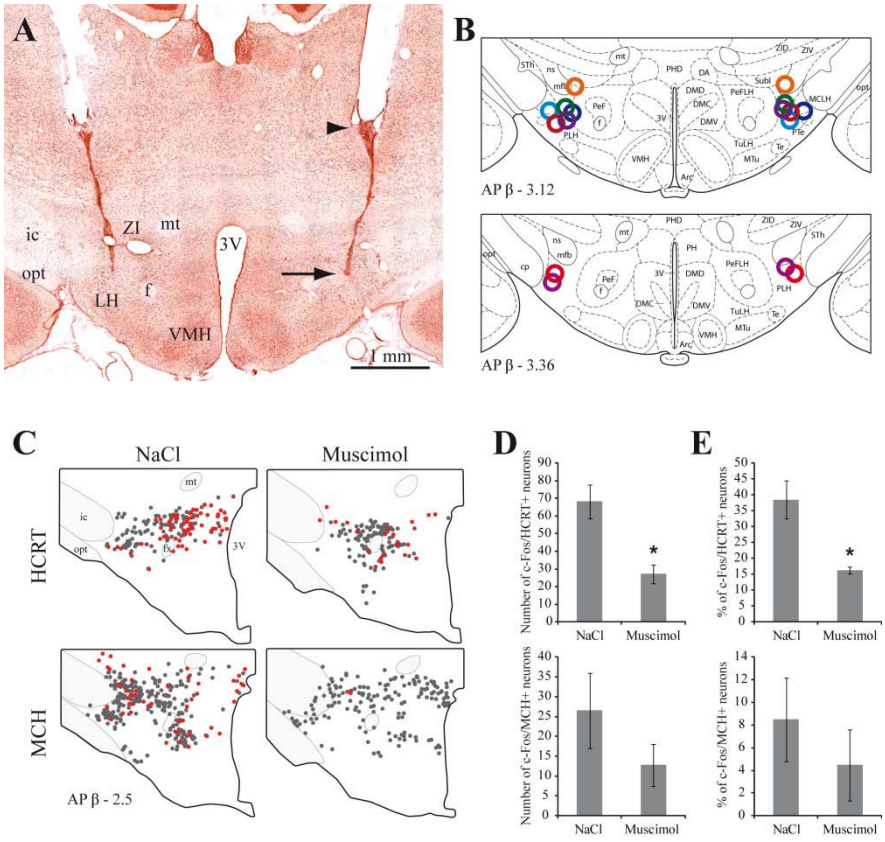


Figure 2. Localization of injection sites in the LH.

A, Example of a bilateral injection site within the LH on a neutral red counterstained section. Tip of the cannula is indicated by a black arrow and arrowhead indicates the end of the guide cannula. **B**, Atlas sections showing up all injection sites. Adapted from Paxinos and Watson Rat Brain atlas, 5th edition. **C**, Schematic drawings of one section illustrating in a representative animal singly labeled (grey dots) and c-FOS-expressing (red dots) HCRT and MCH neurons 3 h after NaCl or muscimol injection in the LH. Rostrocaudal localization is indicated in the bottom left corner (in mm from bregma). **D, E**, Histograms showing the mean ± sem number (**D**) and percentages (**E**) of HCRT and MCH neurons expressing c-FOS 3 h after muscimol and Nacl treatment (n=4 animals per group). * indicates $p < 0.05$ compared to NaCl condition.

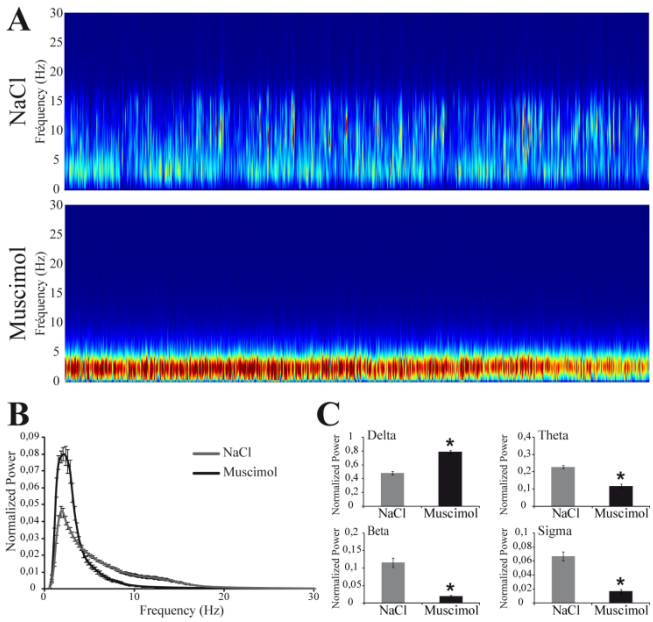


Figure 3. Characterization of the SWS-like state induced by muscimol injection in the LH.
A, Time-frequency graphs of raw power spectrum during the first 800 SWS 5s-epochs of the 2nd and 3rd hours following muscimol and NaCl injections for one representative animal. **B**, Normalized power spectra during SWS occurring during the 2nd and 3rd hours after NaCl (in grey) or muscimol (in black) injection. **C**, Average power in delta, theta, beta and sigma bands calculated during SWS after Nacl and muscimol injection. (n=8 in each group). Values are mean ± sem, * indicates $p < 0.05$ compared to NaCl values.

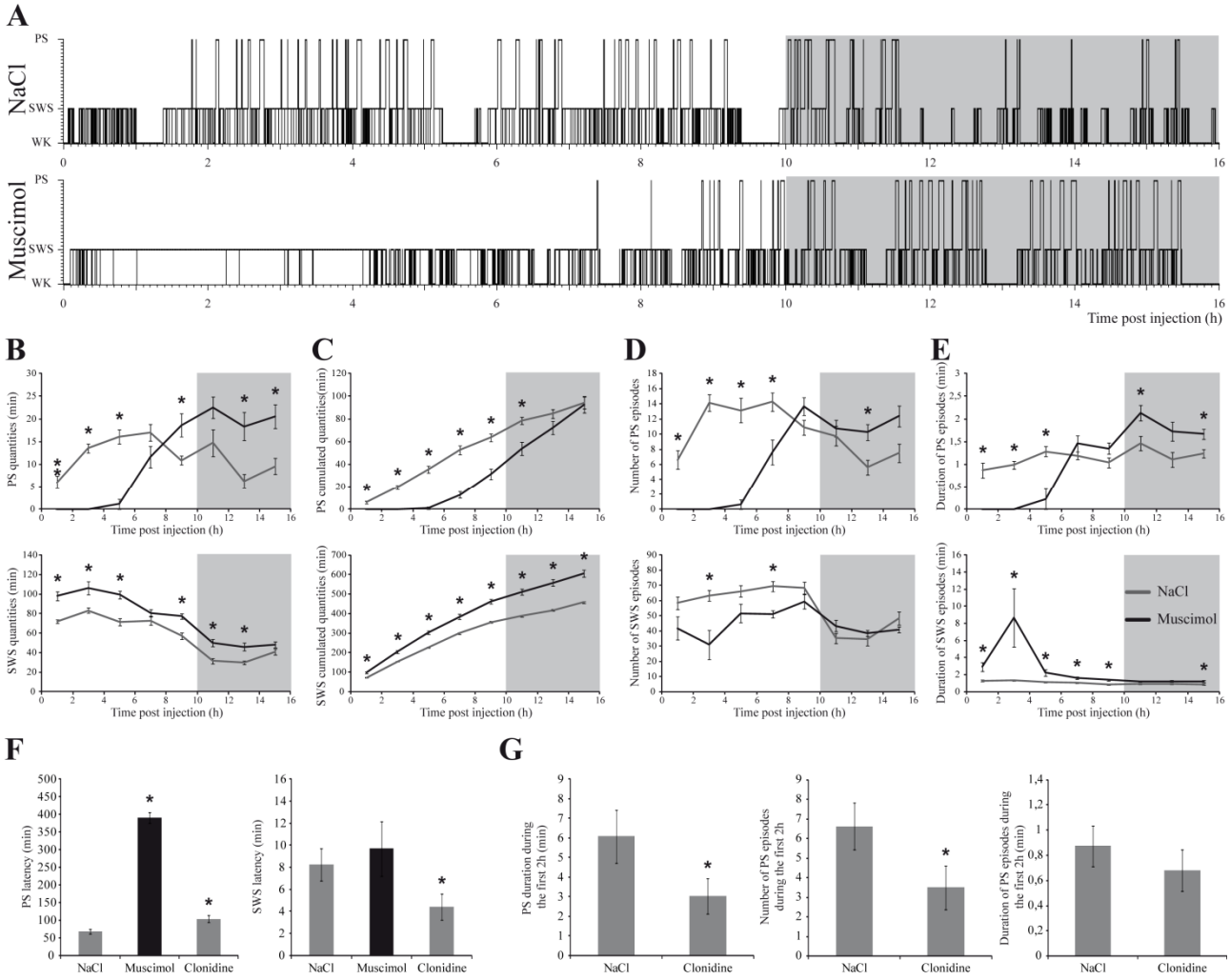


Figure 4. Pharmacological inhibition of LH neurons strongly affects sleep-wake cycle

A, Hypnograms illustrating the organization of the sleep-waking cycle during the 16 h (between 10 AM to 2 AM) following a NaCl and a muscimol injection in the LH in a representative animal. Dark periods is differentiated by a grey background. **B-E**, Quantitative analysis of sleep by 2 h blocks during the 16 h after muscimol (in black) or NaCl (in grey) application in LH. The quantities per 2 h block (**B**), the cumulated quantities across the 16 h (**C**), the number of episodes (**D**) and the mean duration of episodes (**E**) are given for PS and SWS. **F**, PS and SWS latencies after NaCl, muscimol or clonidine injections in the LH. **G**, Quantities, number and duration of PS episodes during the first 2 h after NaCl or clonidine application in the LH. For all graphs, n=8 in each group, values are mean ± sem and * indicates $p < 0,05$.

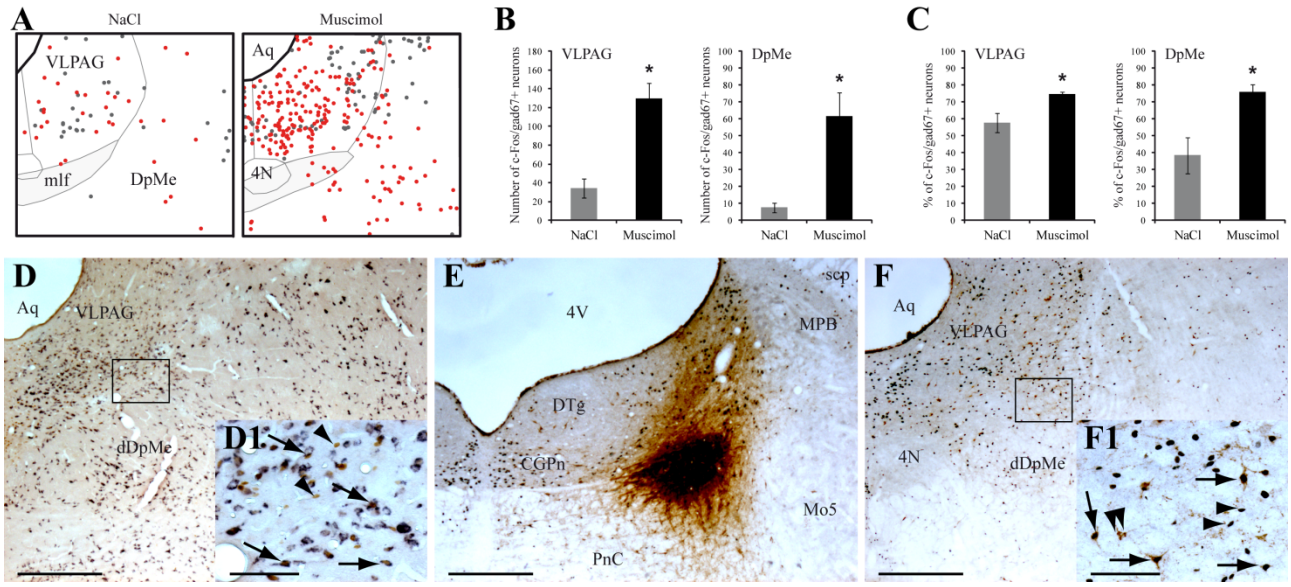


Figure 5. Muscimol inhibition of LH induces an activation of VLPAG/dDpMe GABAergic neurons projecting to the SLD

A, Schematic illustration of singly c-FOS+ (grey dots) and c-FOS/*gad67*+ (red dots) neurons in the VLPAG/dDpMe region on one section of a representative animal perfused 3 h after muscimol or NaCl injection in the LH. B ,C, Histograms showing the mean ± sem number (**B**) and percentage over the total number of c-FOS+ neurons (**C**) of c-FOS/*gad67* double-labeled neurons in the VLPAG and dDpMe in animals with injections of Nacl or muscimol in the LH (n=4 per group). * indicates $p < 0,05$. **D**, Photomicrographs illustrating *gad67* and c-FOS+ neurons in the VLPAG/dDpMe region after a muscimol injection. c-FOS is revealed by immunohistochemistry (DAB brown nuclear staining) and GABAergic neurons by *in situ* hybridization of *gad67* mRNA (blue diffuse cytoplasmic staining). The framed area in **D** is enlarged in **D1**. Arrows show double-labeled neurons and arrowheads c-FOS singly labeled cells. **E**, Localization of a CTb injection site within the SLD. **F**, Photomicrographs illustrating CTb and c-FOS+ labeled neurons in the VLPAG/dDpMe in an animal with a CTb injection in the SLD and a muscimol application in the LH. The framed area in **F** is enlarged in **F1**. Arrows point out double-labeled, arrowheads c-FOS singly, and double arrowheads CTb singly labeled cells. Scale bars: 500 µm in **D**, **E**, **F**; 100 µm in **D1**, **F1**.

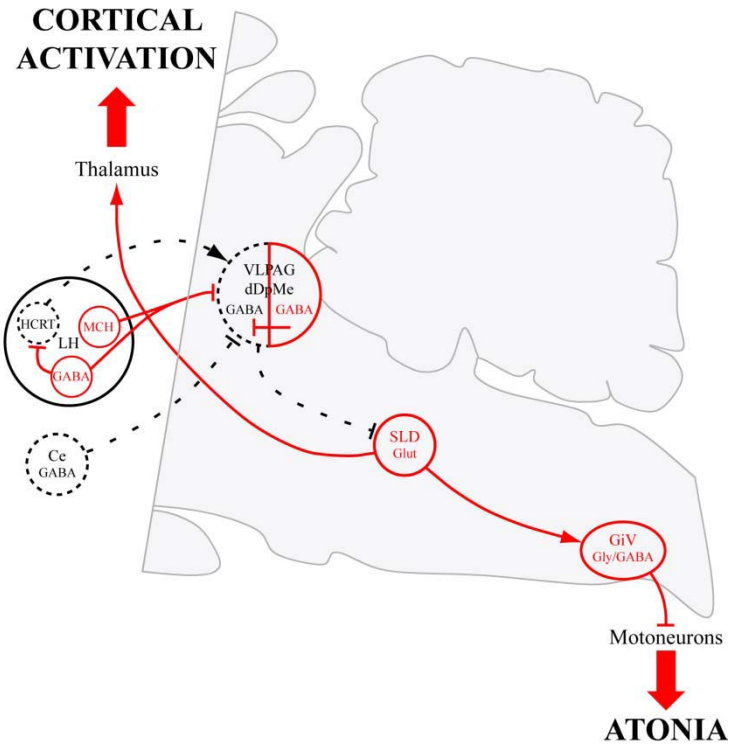


Figure 6. Model of the network responsible for PS onset and maintenance
The main PS generator would be localized inside the LH. MCH and non-MCH GABAergic neurons would be responsible for the inhibition of LH HCRT and VLPAG/dDpMe GABAergic SP-off neurons, thus triggering the activation of SLD glutamatergic PS-on cells which in turn induce muscle atonia and cortical activation. PS-on and PS-off regions are in red whole and black dashed circles respectively. Activated projections and in whole lines whereas inhibited ones are in dashed lines. Excitatory and inhibitory projections are represented by an arrow and a dash at the end of the line respectively. In order to clarify the role of LH, we intentionally omit locus coeruleus noradrenergic and dorsal raphe serotoninergic neurons which are inhibited by SP-on GABAergic neurons located in the VLPAG and the DPGi.

REFERENCES

Adamantidis, A.R., Zhang, F., Aravanis, A.M., Deisseroth, K. and de Lecea, L. (2007) Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons. *Nature*, **450**, 420-424.

Bayer, L., Eggermann, E., Serafin, M., Grivel, J., Machard, D., Muhlethaler, M. and Jones, B.E. (2005) Opposite effects of noradrenaline and acetylcholine upon hypocretin/orexin versus melanin concentrating hormone neurons in rat hypothalamic slices. *Neuroscience*, **130**, 807-811.

Bittencourt, J.C., Presse, F., Arias, C., Peto, C., Vaughan, J., Nahon, J.L., Vale, W. and Sawchenko, P.E. (1992) The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. *J Comp Neurol*, **319**, 218-245.

Boissard, R., Gervasoni, D., Schmidt, M.H., Barbagli, B., Fort, P. and Luppi, P.H. (2002) The rat ponto-medullary network responsible for paradoxical sleep onset and maintenance: a combined microinjection and functional neuroanatomical study. *Eur J Neurosci*, **16**, 1959-1973.

Boissard, R., Fort, P., Gervasoni, D., Barbagli, B. and Luppi, P.H. (2003) Localization of the GABAergic and non-GABAergic neurons projecting to the sublaterodorsal nucleus and potentially gating paradoxical sleep onset. *Eur J Neurosci*, **18**, 1627-1639.

Clément, O., Sapin, E., Berod, A., Fort, P. and Luppi, P.H. (2011) Evidence that neurons of the sublaterodorsal tegmental nucleus triggering paradoxical (REM) sleep are glutamatergic. *Sleep*, **34**, 419-423.

Crochet, S., Onoe, H. and Sakai, K. (2006) A potent non-monoaminergic paradoxical sleep inhibitory system: a reverse microdialysis and single-unit recording study. *Eur J Neurosci*, **24**, 1404-1412.

Estabrooke, I.V., McCarthy, M.T., Ko, E., Chou, T.C., Chemelli, R.M., Yanagisawa, M., Saper, C.B. and Scammell, T.E. (2001) Fos expression in orexin neurons varies with behavioral state. *J Neurosci*, **21**, 1656-1662.

Fort, P., Bassetti, C.L. and Luppi, P.H. (2009) Alternating vigilance states: new insights regarding neuronal networks and mechanisms. *Eur J Neurosci*, **29**, 1741-1753.

Gao, X.B. and van den Pol, A.N. (2001) Melanin concentrating hormone depresses synaptic activity of glutamate and GABA neurons from rat lateral hypothalamus. *J Physiol*, **533**, 237-252.

Goutagny, R., Luppi, P.H., Salvert, D., Gervasoni, D. and Fort, P. (2005) GABAergic control of hypothalamic melanin-concentrating hormone-containing neurons across the sleep-waking cycle. *Neuroreport*, **16**, 1069-1073.

Goutagny, R., Luppi, P.H., Salvert, D., Lapray, D., Gervasoni, D. and Fort, P. (2008) Role of the dorsal paragigantocellular reticular nucleus in paradoxical (rapid eye movement) sleep generation: a combined electrophysiological and anatomical study in the rat. *Neuroscience*, **152**, 849-857.

Grivel, J., Cvetkovic, V., Bayer, L., Machard, D., Tobler, I., Muhlethaler, M. and Serafin, M. (2005) The wake-promoting hypocretin/orexin neurons change their response to noradrenaline after sleep deprivation. *J Neurosci*, **25**, 4127-4130.

Hassani, O.K., Lee, M.G. and Jones, B.E. (2009) Melanin-concentrating hormone neurons discharge in a reciprocal manner to orexin neurons across the sleep-wake cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 2418-2422.

Hassani, O.K., Henny, P., Lee, M.G. and Jones, B.E. (2010) GABAergic neurons intermingled with orexin and MCH neurons in the lateral hypothalamus discharge maximally during sleep. *Eur J Neurosci*, **32**, 448-457.

Hervieu, G.J., Cluderay, J.E., Harrison, D., Meakin, J., Maycox, P., Nasir, S. and Leslie, R.A. (2000) The distribution of the mRNA and protein products of the melanin-concentrating hormone (MCH) receptor gene, slc-1, in the central nervous system of the rat. *Eur J Neurosci*, **12**, 1194-1216.

Herzog, E., Bellenchi, G.C., Gras, C., Bernard, V., Ravassard, P., Bedet, C., Gasnier, B., Giros, B. and El Mestikawy, S. (2001) The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. *J Neurosci*, **21**, RC181.

Hisano, S., Hoshi, K., Ikeda, Y., Maruyama, D., Kanemoto, M., Ichijo, H., Kojima, I., Takeda, J. and Nogami, H. (2000) Regional expression of a gene encoding a neuron-specific Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter (DNPI) in the rat forebrain. *Brain Res Mol Brain Res*, **83**, 34-43.

Jia, H.G., Rao, Z.R. and Shi, J.W. (1997) Evidence of gamma-aminobutyric acidergic control over the catecholaminergic projection from the medulla oblongata to the central nucleus of the amygdala. *J Comp Neurol*, **381**, 262-281.

Jia, H.G., Zhang, G.Y. and Wan, Q. (2005) A GABAergic projection from the central nucleus of the amygdala to the parabrachial nucleus: an ultrastructural study of anterograde tracing in combination with post-embedding immunocytochemistry in the rat. *Neurosci Lett*, **382**, 153-157.

Kovacs, K.J. (2008) Measurement of immediate-early gene activation- c-fos and beyond. *J Neuroendocrinol*, **20**, 665-672.

Koyama, Y., Takahashi, K., Kodama, T. and Kayama, Y. (2003) State-dependent activity of neurons in the perifornical hypothalamic area during sleep and waking. *Neuroscience*, **119**, 1209-1219.

Leger, L., Goutagny, R., Sapin, E., Salvert, D., Fort, P. and Luppi, P.H. (2009) Noradrenergic neurons expressing Fos during waking and paradoxical sleep deprivation in the rat. *J Chem Neuroanat*, **37**, 149-157.

Lu, J., Sherman, D., Devor, M. and Saper, C.B. (2006) A putative flip-flop switch for control of REM sleep. *Nature*, **441**, 589-594.

Luppi, P.H., Sakai, K., Fort, P., Salvert, D. and Jouvet, M. (1988) The nuclei of origin of monoaminergic, peptidergic, and cholinergic afferents to the cat nucleus reticularis magnocellularis: a double-labeling study with cholera toxin as a retrograde tracer. *J Comp Neurol*, **277**, 1-20.

Luppi, P.H., Aston-Jones, G., Akaoka, H., Chouvet, G. and Jouvet, M. (1995) Afferent projections to the rat locus coeruleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing with cholera-toxin B subunit and Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *Neuroscience*, **65**, 119-160.

Luppi, P.H., Boissard, R., Gervasoni, D., Verret, L., Goutagny, R., Peyron, C., Salvert, D., Leger, L., Barbagli, B. and Fort, P. (2004) The network responsible for paradoxical sleep onset and maintenance: a new theory based on the head-restrained rat model. In *Sleep: Circuits and Function* (Luppi, P.H., ed. Boca Raton, FL: CRC Press, p. 272.

Luppi, P.H., Gervasoni, D., Verret, L., Goutagny, R., Peyron, C., Salvert, D., Leger, L. and Fort, P. (2006) Paradoxical (REM) sleep genesis: the switch from an aminergic-cholinergic to a GABAergic-glutamatergic hypothesis. *J Physiol Paris*, **100**, 271-283.

Luppi, P.H., Clément, O., Sapin, E., Gervasoni, D., Peyron, C., Leger, L., Salvert, D. and Fort, P. (2011) The neuronal network responsible for paradoxical sleep and its dysfunctions causing narcolepsy and rapid eye movement (REM) behavior disorder. *Sleep Med Rev*, **15**, 153-163.

Maloney, K.J., Mainville, L. and Jones, B.E. (1999) Differential c-Fos expression in cholinergic, monoaminergic, and GABAergic cell groups of the pontomesencephalic tegmentum after paradoxical sleep deprivation and recovery. *J Neurosci*, **19**, 3057-3072.

Maloney, K.J., Mainville, L. and Jones, B.E. (2000) c-Fos expression in GABAergic, serotonergic, and other neurons of the pontomedullary reticular formation and raphe after paradoxical sleep deprivation and recovery. *J Neurosci*, **20**, 4669-4679.

Maloney, K.J., Mainville, L. and Jones, B.E. (2002) c-Fos expression in dopaminergic and GABAergic neurons of the ventral mesencephalic tegmentum after paradoxical sleep deprivation and recovery. *Eur J Neurosci*, **15**, 774-778.

Modirrousta, M., Mainville, L. and Jones, B.E. (2005) Orexin and MCH neurons express c-Fos differently after sleep deprivation vs. recovery and bear different adrenergic receptors. *Eur J Neurosci*, **21**, 2807-2816.

Ni, B., Wu, X., Yan, G.M., Wang, J. and Paul, S.M. (1995) Regional expression and cellular localization of the Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter of rat brain. *J Neurosci*, **15**, 5789-5799.

Piper, D.C., Upton, N., Smith, M.I. and Hunter, A.J. (2000) The novel brain neuropeptide, orexin-A, modulates the sleep-wake cycle of rats. *Eur J Neurosci*, **12**, 726-730.

Sakai, K., El Mansari, M., Lin, J.S., Zhang, J.G. and Vanni-Mercier, G. (1990) The posterior Hypothalamus in the Regulation of Wakefulness and Paradoxical Sleep. In *The Diencephalon and sleep* (Mancia, M. and Marini, G., eds). New York: Raven Press.

Sakai, K. and Koyama, Y. (1996) Are there cholinergic and non-cholinergic paradoxical sleep-on neurones in the pons? *Neuroreport*, **7**, 2449-2453.

Sallanon, M., Denoyer, M., Kitahama, K., Aubert, C., Gay, N. and Jouvet, M. (1989) Long-lasting insomnia induced by preoptic neuron lesions and its transient reversal by muscimol injection into the posterior hypothalamus in the cat. *Neuroscience*, **32**, 669-683.

Saper, C.B., Fuller, P.M., Pedersen, N.P., Lu, J. and Scammell, T.E. (2010) Sleep state switching. *Neuron*, **68**, 1023-1042.

Sapin, E., Lapray, D., Berod, A., Goutagny, R., Leger, L., Ravassard, P., Clément, O., Hanriot, L., Fort, P. and Luppi, P.H. (2009) Localization of the brainstem GABAergic neurons controlling paradoxical (REM) sleep. *PLoS One*, **4**, e4272.

Sapin, E., Berod, A., Leger, L., Herman, P.A., Luppi, P.H. and Peyron, C. (2010) A very large number of GABAergic neurons are activated in the tuberal hypothalamus during paradoxical (REM) sleep hypersomnia. *PLoS One*, **5**, e11766.

Sastre, J.P., Buda, C., Kitahama, K. and Jouvet, M. (1996) Importance of the ventrolateral region of the periaqueductal gray and adjacent tegmentum in the control of paradoxical sleep as studied by muscimol microinjections in the cat. *Neuroscience*, **74**, 415-426.

Scammell, T.E., Willie, J.T., Guilleminault, C. and Siegel, J.M. (2009) A consensus definition of cataplexy in mouse models of narcolepsy. *Sleep*, **32**, 111-116.

Sherin, J.E., Shiromani, P.J., McCarley, R.W. and Saper, C.B. (1996) Activation of ventrolateral preoptic neurons during sleep. *Science*, **271**, 216-219.

Szymusiak, R., Alam, N., Steininger, T.L. and McGinty, D. (1998) Sleep-waking discharge patterns of ventrolateral preoptic/anterior hypothalamic neurons in rats. *Brain Res*, **803**, 178-188.

Tsunematsu, T., Kilduff, T.S., Boyden, E.S., Takahashi, S., Tominaga, M. and Yamanaka, A. (2011) Acute optogenetic silencing of orexin/hypocretin neurons induces slow-wave sleep in mice. *J Neurosci*, **31**, 10529-10539.

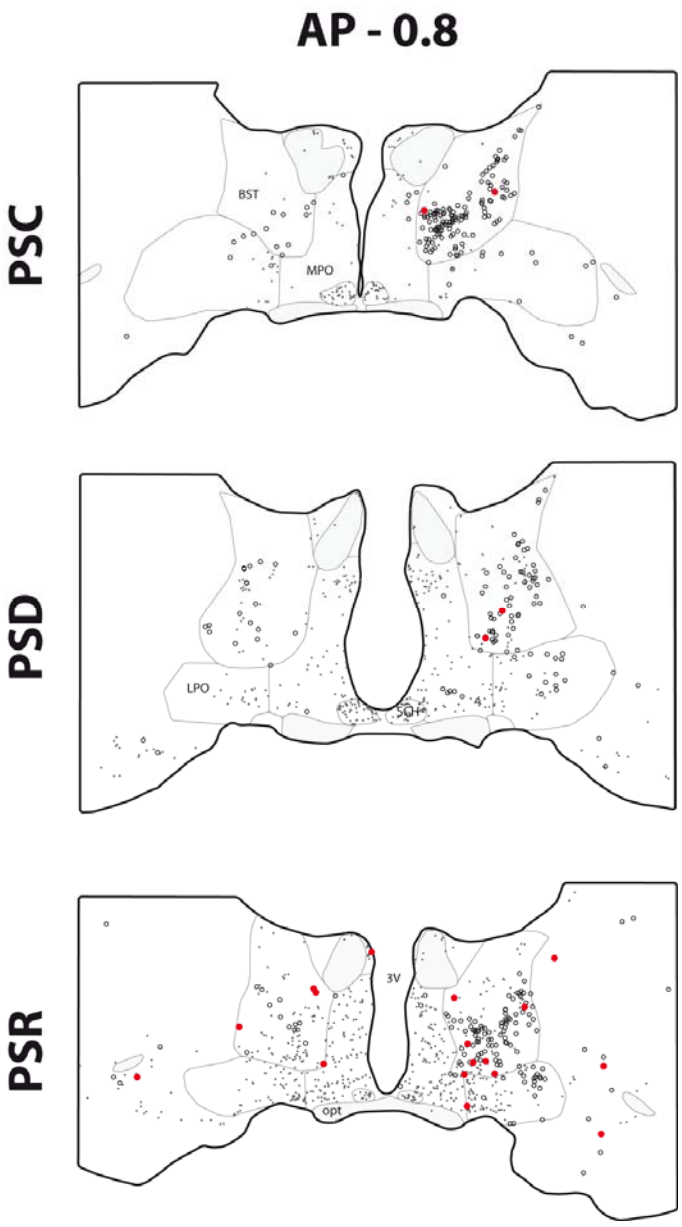
van den Pol, A.N., Acuna-Goycolea, C., Clark, K.R. and Ghosh, P.K. (2004) Physiological properties of hypothalamic MCH neurons identified with selective expression of reporter gene after recombinant virus infection. *Neuron*, **42**, 635-652.

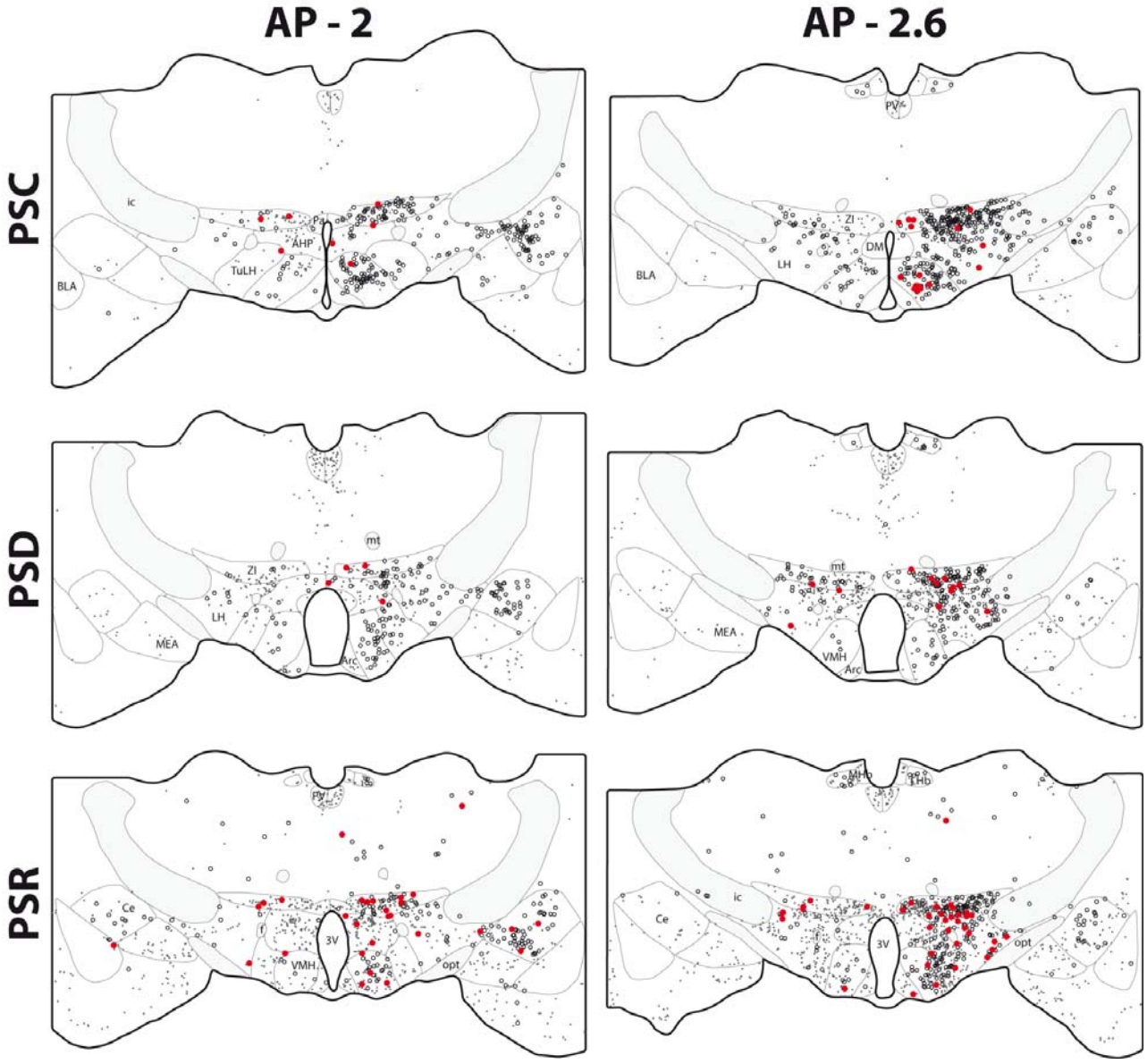
Verret, L., Goutagny, R., Fort, P., Cagnon, L., Salvert, D., Leger, L., Boissard, R., Salin, P., Peyron, C. and Luppi, P.H. (2003) A role of melanin-concentrating hormone producing neurons in the central regulation of paradoxical sleep. *BMC Neurosci*, **4**, 19.

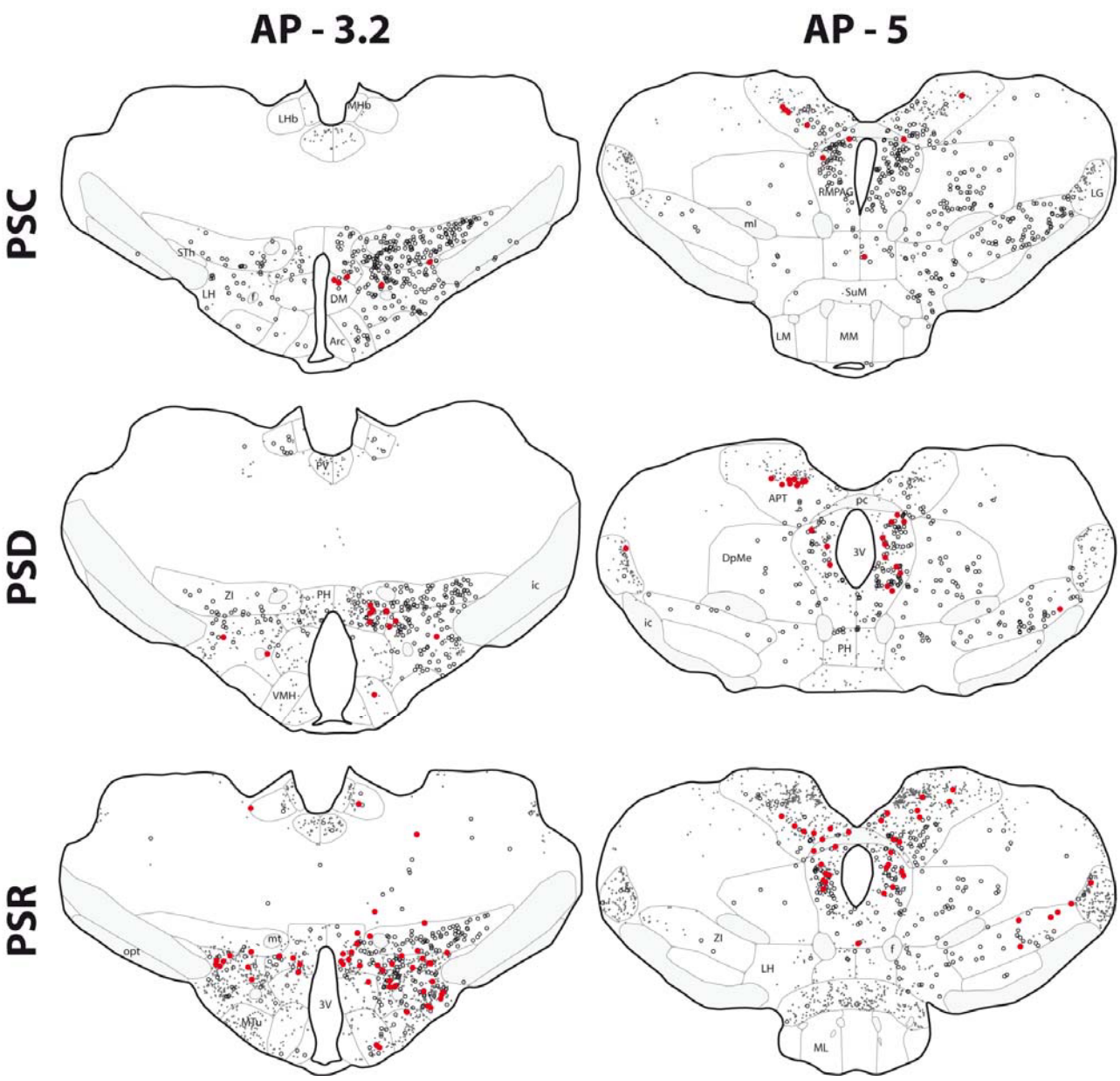
Verret, L., Leger, L., Fort, P. and Luppi, P.H. (2005) Cholinergic and noncholinergic brainstem neurons expressing Fos after paradoxical (REM) sleep deprivation and recovery. *Eur J Neurosci*, **21**, 2488-2504.

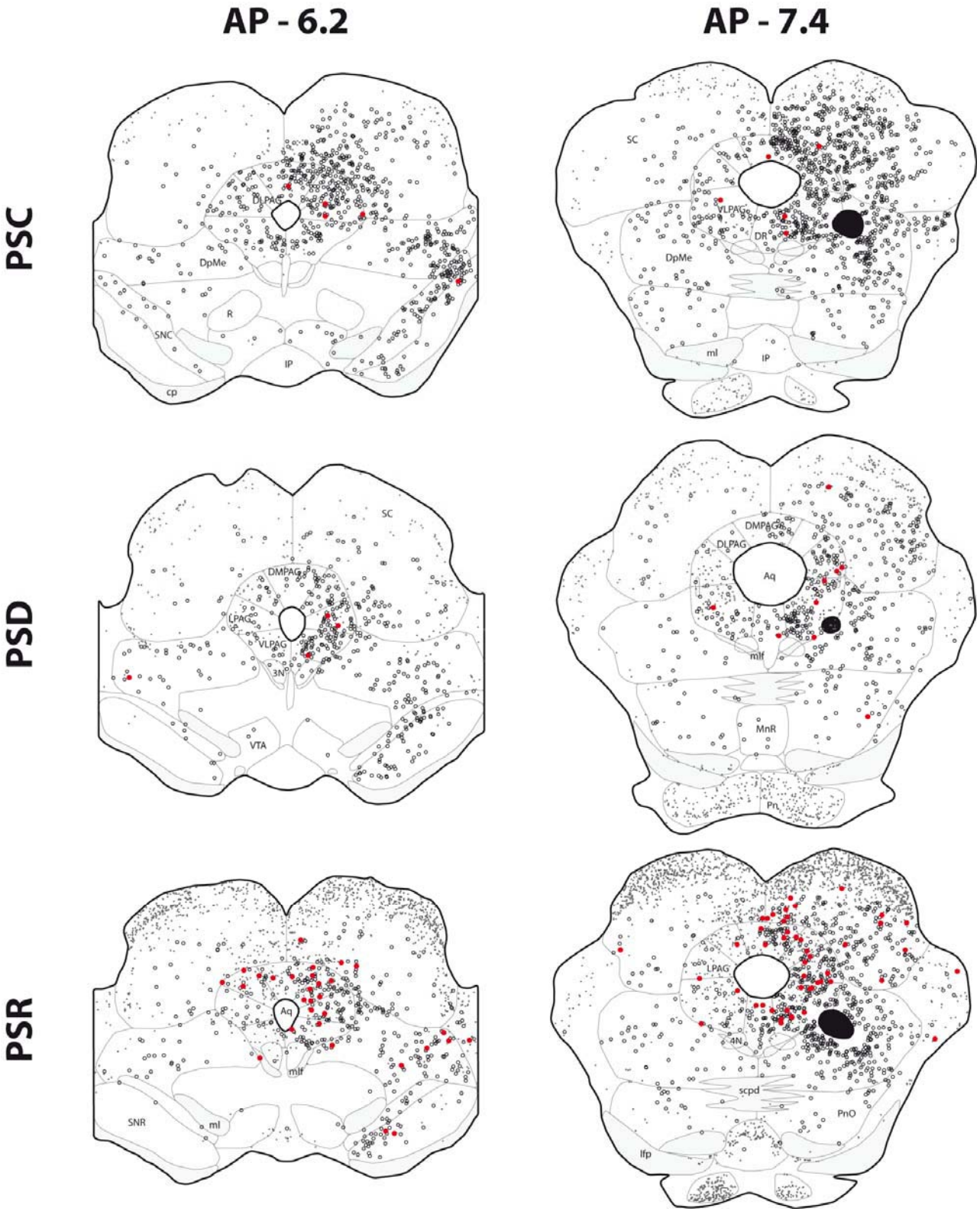
Verret, L., Fort, P., Gervasoni, D., Leger, L. and Luppi, P.H. (2006) Localization of the neurons active during paradoxical (REM) sleep and projecting to the locus coeruleus noradrenergic neurons in the rat. *J Comp Neurol*, **495**, 573-586.

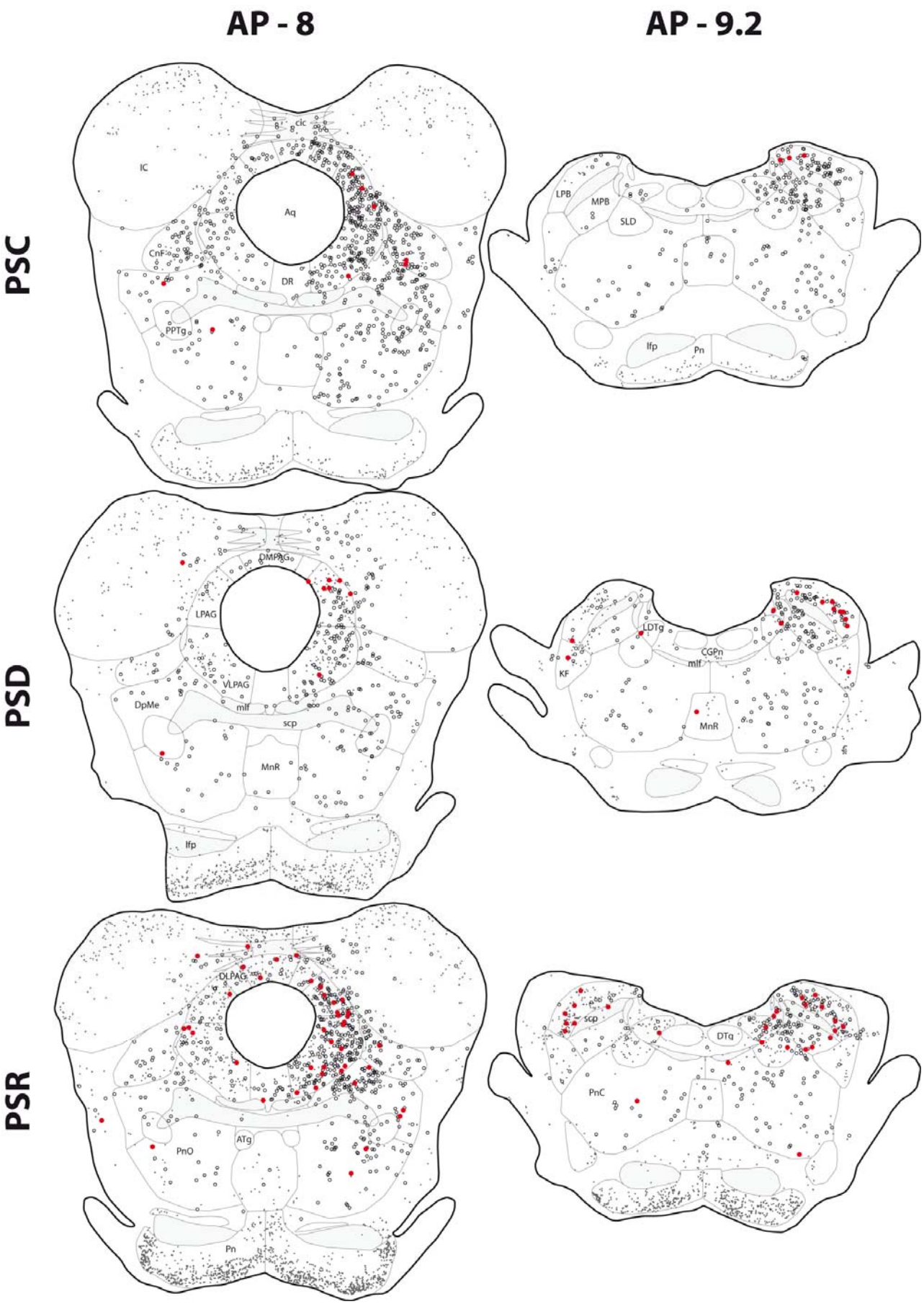
Vetrivelan, R., Fuller, P.M., Tong, Q. and Lu, J. (2009) Medullary circuitry regulating rapid eye movement sleep and motor atonia. *J Neurosci*, **29**, 9361-9369.


AP - 0.8
PSC
BST
MPO
PSD
LPO
SCH
PSR
3V
opt


AP - 2
AP - 2.6
PSC
PSD
PSR
ic
BLA
Pa
AHP
TuLH
PV
ZI
DM
LH
mt
MEA
Arc
VMH
Pv
Ce
3V
opt
MHb
LHb


AP - 3.2
AP - 5
PSC
PSD
PSR
LHb
MHb
STh
LH
f
DM
Arc
RMPAG
LG
ml
SuM
LM
MM
PV
ZI
PH
ic
VMH
APT
pc
3V
DpMe
opt
mt
Mu
ZI
LH
f
ML


AP - 6.2
AP - 7.4
PSC
PSD
PSR
DLPAG
DpMe
R
SNC
IP
cp
SC
VLPAG
DR
ml
DMPAG
LPAG
Aq
VLPAG
3N
VTA
mlf
MnR
Pn
SNR
scpd
PnO
lfp


AP - 8
AP - 9.2
PSC
PSD
PSR
cic
IC
Aq
CnF
DR
PPTg
LPB
MPB
SLD
lfp
Pn
DMPAG
LPAG
VLPAG
DpMe
mlf
scp
MnR
LDTg
CGPn
KF
DLPAG
ATg
PnO
SCp
DTg
PnC

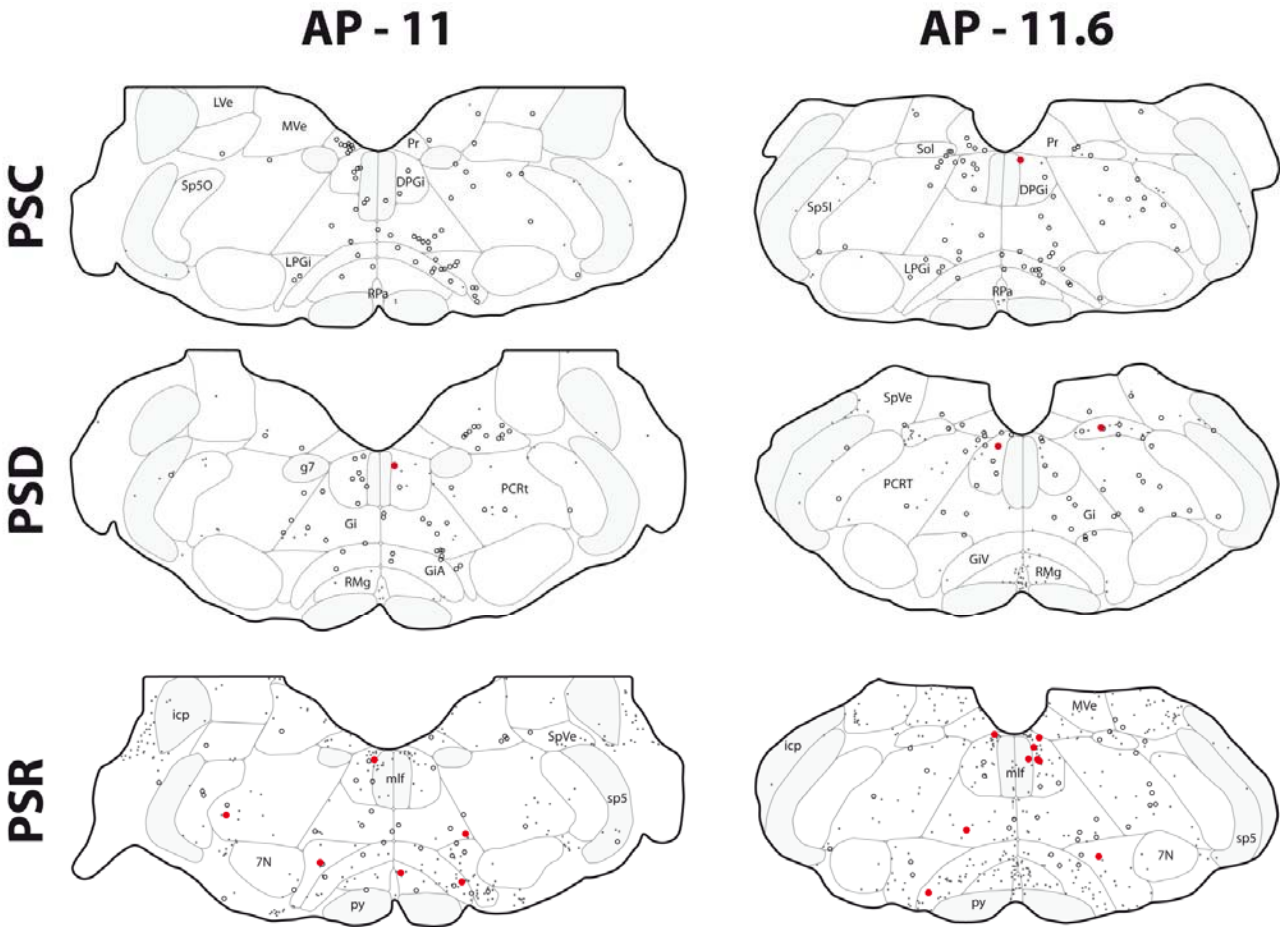


Figure supplémentaire 1 : Localisation des afférences à la VLPAG/dDpMe activées chez les animaux PSC, PSD et PSR

Un animal représentatif de chaque condition a été représenté. Les petits points noirs correspondent aux neurones c-FOS+, les cercles noirs aux neurones CTb+ et les gros points rouges aux neurones c-FOS/CTb+. Les sites de CTb sont colorés en noir. La localisation rostrocaudale de chaque niveau (en mm par rapport au bregma) est indiquée en haut de la colonne correspondante.

Abréviations : 3N, noyau occulomoteur ; 3V, 3ième ventricule ; 4N, noyau trochléaire ; 7N, noyau du nerf facial ; AHP, aire hypothalamique antérieure, partie postérieure ; APT, noyau prétectal antérieur ; Aq, aqueduc ; Arc, noyau arqué ; ATg, noyau tegmental antérieur ; BST, noyau de la strie terminale ; BLA,noyau amygdalien basolatéral ; Ce, noyau amygdalien central ; CGPn, substance grise pontique ; CnF,noyau cunéiforme ; cp, pédoncule cérébral ; DLPAG, substance grise périaqueducale, partie dorsolatérale ; DM, noyau hypothalamique dorsomedian ; DMPAG, substance grise périaqueducale, partie dorsomédiane ; DPGi, noyau réticulé paragigantocellulaire dorsal ; DpMe, noyau réticulé mésencéphalique profond ; DR, noyau du raphé dorsal ; DTg, noyau tegmental dorsal ; f, fornix ; g7, genoux du nerf facial ; Gi, noyau gigantocellulaire ; GiA, noyau gigantocellulaire alpha ; GiV, noyau gigantocellulaire ventral ; icp, pédoncule cérébelleux inférieur ; ic, capsule interne ; IC, colliculus inférieur ; IP, noyau interpédonculaire ; KF, noyau de Kîlliker-Fuse ; LDTg, noyau tegmental latérodorsal ; lfp, faisceau longitudinal pontique ; LG, corps genouillé latéral ; LHb, noyau de l'habenula latérale ; LM, corps mammillaire latéral ; LPAG, substance grise périaqueducale, partie latérale ; LPB, noyau parabrachial latéral ; LPGi, noyau réticulé paragigantocellulaire latéral ; LPO, aire préoptique latérale ; LVe, noyau vestibulaire latéral ; MEA, noyau amygdalien médian ; MHb, noyau de l'habenula médiane ; ml, lemniscus médian ; ML, corps mammillaire

médiane, partie latérale ; mlf, faisceau longitudinal médian ; MM, corps mammillaire médian, partie médiane ; MnR, noyau du raphé médian ; MPB, noyau parabrachial médian ; MPO, aire préoptique médiane ; mt, faisceau mammillothalamique ; Mtu, noyau tubéral médian ; MVe, noyau vestibulaire médian ; opt, tractus optique ; Pa, noyau hypothalamique paraventriculaire ; pc, commissure postérieure ; PCRt, noyau réticulé parvocellulaire ; PH, noyau hypothalamique postérieur ; Pn, noyau pontique ; PnC, noyau pontique, partie caudale ; PnO, noyau pontique, partie rostrale ; PPT, noyau tegmental pédonculopontin ; Pr, noyau prépositus ; PV, noyau paraventriculaire du thalamus ; py, pyramidal tract ; R, noyau rouge ; RMg, noyau du raphe magnus ; RMPAG, substance grise périaqueducale, partie rostromédiane ; RPa, raphe palidus ; SC, colliculus supérieue ; SCH, noyau suprachiasmatique ; scp, pédoncule cérébelleux supérieur ; scpd, pédoncule cérébelleux supérieur, branche descendante ; SLD, noyau sublatérodorsal ; SNC, substance noir, zone compacte ; SNR, substance noir, zone réticulée ; Sol, noyau du faisceau solitaire ; sp5, faisceau trigéminal spinal ; SpVe, noyau vestibulaire spinal ; STh, noyau subthalamique ; SuM, noyau supramammillaire ; VLPAG, substance grise périaqueducale partie ventrolatérale ; VMH, noyau hypothalamique ventromédian ; VTA, aire tegmentale ventrale ; ZI, zona incerta.

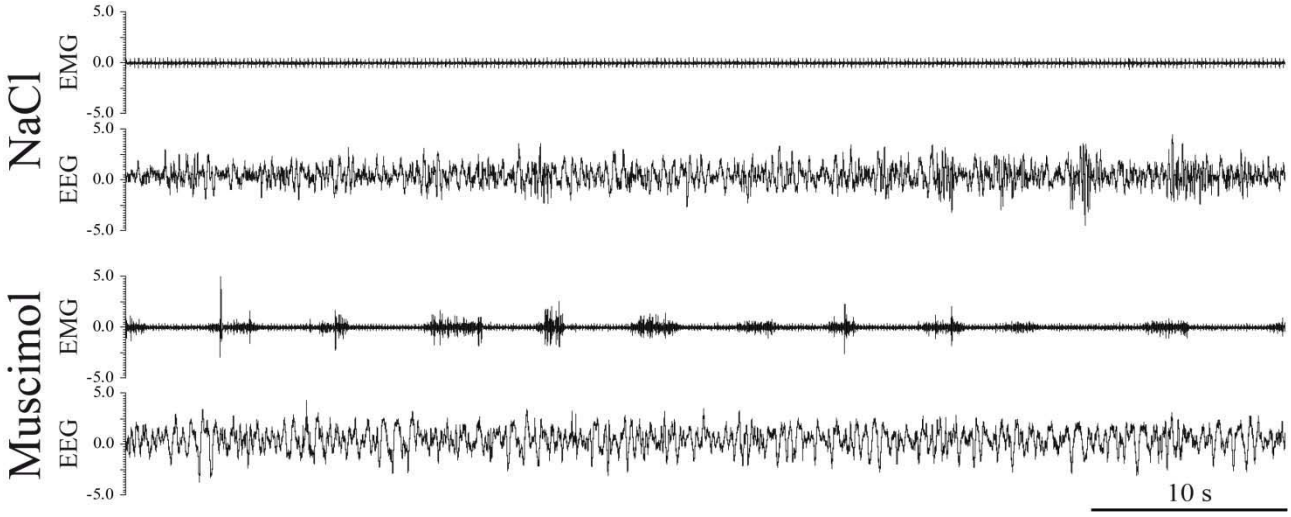


Figure supplémentaire 2 : EEG et EMG enregistrés après application de NaCl (en haut) et de muscimol (en bas) dans la LH

Ces deux enregistrements d'une minute illustrent le stade de SL enregistré après application de NaCl ou de muscimol dans la HLA. Noter la présence de mouvements musculaires phasiques et rythmiques après application de muscimol comme expliqué dans l'article.

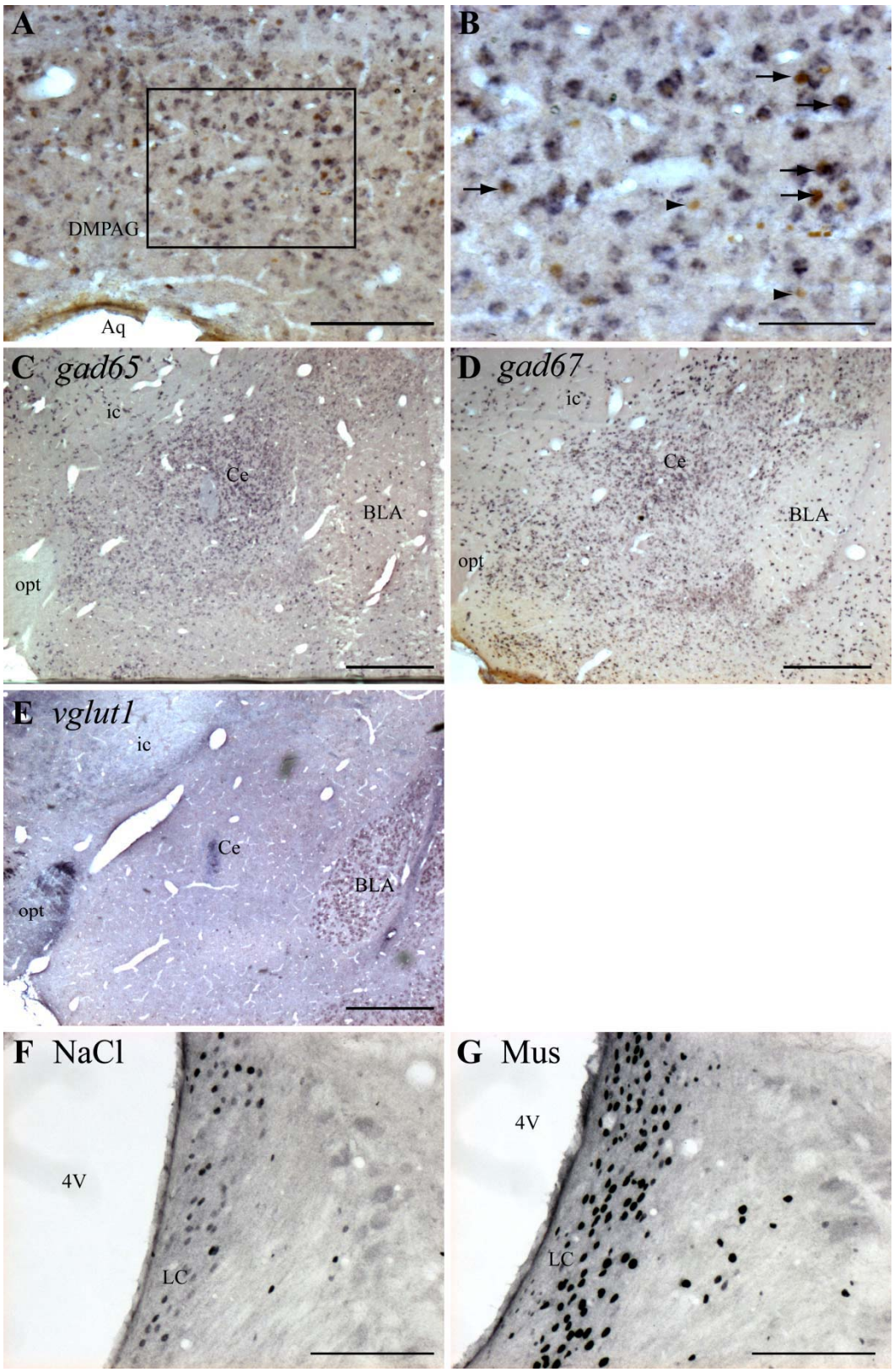


Figure supplémentaire 3 : Photomicrographies de coupes coronales illustrant :
A-B. le marquage immunohistologique de c-FOS (marquage nucléaire marron) couplé à l'hybridation *in situ* de *vglut2* (marquage cytoplasmique bleuté) au niveau de la DMPAG chez un animal ayant réalisé une hypersomnie de SP. Le rectangle noir en **A** représente la partie de la photographie aggrandie en **B** où les flèchent indiquent des neurones c-FOS/*vglut2*+ et les têtes de flèches des neurones c-FOS+ seulement.

C-E. Illustration de l'hybridation *in situ* de *gad65*, *gad67* et *vglut1* au niveau de l'amygdale et montrant la nature GABAergique du noyau central de l'amygdale.
F-G. Immunoquages de c-FOS au niveau du LC après injection de NaCl ou de muscimol (Mus) dans la LH. Échelles A, F, G : 100 µm ; B, 50 µm ; C, D, E : 500 µm.

			% doubles/total CTb+					
			PSR		PSD		PSC	
		n	Ipsi	Contra	Ipsi	Contra	Ipsi	Contra
Basal forebrain								
	BST	2	4.7 ± 1.3	9.7 ± 6.7	2.1 ± 0.5	2.0 ± 2.0	0.9 ± 0.5	0.0 ± 0.0
	MnPO	1	16.8 ± 7.6		0.0 ± 0.0		22.3 ± 10.6	
	MPO	2	17.2 ± 9.9	16.3 ± 6.8	3.5 ± 2.4	2.8 ± 2.8	4.2 ± 2.9	11.3 ± 7.0
	LPO	2	8.2 ± 2.5	1.8 ± 1.8	4.2 ± 0.8	3.1 ± 3.1	2.8 ± 2.8	0.0 ± 0.0
Thalamus								
	APT	2	14.3 ± 2.0	24.1 ± 1.9	5.8 ± 2.0	13.4 ± 9.3	4.6 ± 0.9	16.3 ± 4.1
	LG	3	8.4 ± 0.6	0.0 ± 0.0	14.1 ± 12.1	0.1 ± 0.1	3.4 ± 2.2	0.1 ± 0.1
Amygdala								
	Ce	3	3.8 ± 1.2	1.8 ± 1.0	1.0 ± 0.6	2.8 ± 2.8	0.7 ± 0.7	0.0 ± 0.0
Hypothalamus								
	VMH	4	9.3 ± 2.1	9.9 ± 2.1	2.7 ± 2.0	1.5 ± 1.5	3.9 ± 1.1	2.2 ± 0.7
	PMD	1	2.8 ± 2.8	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1
	AHC	1	10.8 ± 4.2	16.3 ± 9.9	4.2 ± 4.2	2.8 ± 2.8	0.0 ± 0.0	9.2 ± 5.3
	AHP	1	30.0 ± 12.2	30.0 ± 23.8	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	4.2 ± 4.2	0.1 ± 0.1
	DA	1	16.4 ± 6.9	6.6 ± 4.7	14.1 ± 6.4	9.9 ± 5.9	10.9 ± 4.0	0.0 ± 0.0
	DM	3	15.7 ± 7.2	8.3 ± 8.3	4.2 ± 4.2	12.5 ± 12.5	6.8 ± 4.0	5.0 ± 5.0
	Pa	2	16.9 ± 6.9	0.1 ± 0.1	2.1 ± 2.1	8.3 ± 8.3	6.3 ± 6.3	0.1 ± 0.1
	PH	3	10.3 ± 2.0	12.2 ± 4.6	7.6 ± 0.7	6.6 ± 3.0	3.2 ± 0.4	1.8 ± 1.1
	LH	7	12.5 ± 1.8	15.9 ± 2.5	5.6 ± 1.2	5.1 ± 1.3	2.8 ± 0.3	5.0 ± 1.8
	ZI	6	7.1 ± 1.1	21.8 ± 4.1	2.6 ± 0.7	4.3 ± 1.9	1.8 ± 0.2	1.5 ± 0.9
Mésencephalum								
	IC	2	4.5 ± 4.5	6.5 ± 3.7	2.6 ± 1.8	3.2 ± 1.9	0.8 ± 0.8	0.0 ± 0.0
	SC	4	4.2 ± 1.3	5.5 ± 2.1	1.9 ± 0.5	1.9 ± 1.0	0.7 ± 0.3	1.3 ± 1.3
	DpMe	7	2.2 ± 0.8	4.0 ± 2.1	0.7 ± 0.4	1.3 ± 0.6	0.1 ± 0.1	0.6 ± 0.3
	RRF	6	2.6 ± 1.1	0.0 ± 0.0	1.9 ± 1.1	2.5 ± 2.5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	SNC	2	3.6 ± 2.1	0.0 ± 0.0	1.3 ± 1.3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	SNR	4	2.8 ± 1.1	0.0 ± 0.0	1.6 ± 1.1	0.0 ± 0.0	1.4 ± 0.9	0.0 ± 0.0
Periaqueductal gray								
	RMPAG	2	12.4 ± 1.6	13.6 ± 2.0	4.9 ± 1.1	5.1 ± 1.1	2.6 ± 0.6	2.8 ± 0.5
	DMPAG	6	18.3 ± 0.9		1.6 ± 0.9		2.8 ± 0.6	
	DLPAG	5	13.7 ± 0.8	16.7 ± 3.1	1.7 ± 0.7	0.0 ± 0.0	0.6 ± 0.4	1.8 ± 1.8
	LPAG	6	8.0 ± 1.1	11.8 ± 2.4	7.1 ± 1.2	6.1 ± 1.5	1.7 ± 0.5	2.1 ± 1.2
	VLPAG	5	6.4 ± 1.0	7.5 ± 0.9	2.9 ± 0.5	3.0 ± 0.5	1.5 ± 0.3	2.4 ± 0.8
	DR	3	5.4 ± 1.7		1.3 ± 1.0		2.9 ± 1.8	
Pons								
	LDTg	2	6.3 ± 3.9	16.3 ± 7.8	4.4 ± 3.6	2.5 ± 2.5	2.6 ± 2.0	0.0 ± 0.0
	CGPn	3	10.7 ± 4.8	6.6 ± 2.8	5.5 ± 0.8	1.9 ± 1.9	8.7 ± 3.4	0.0 ± 0.0
	CnF	2	3.1 ± 0.6	6.3 ± 3.7	0.5 ± 0.5	0.4 ± 0.4	2.3 ± 0.3	2.1 ± 2.1
	LC	2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	KF	2	2.5 ± 2.5	1.9 ± 1.9	5.8 ± 1.9	11.0 ± 7.1	1.0 ± 1.0	5.6 ± 3.3
	LPB	3	12.0 ± 2.8	15.4 ± 8.9	6.8 ± 1.6	6.0 ± 2.2	7.4 ± 1.9	4.2 ± 2.9
	MPB	3	8.2 ± 4.8	4.7 ± 4.7	0.6 ± 0.6	0.0 ± 0.0	3.2 ± 1.1	0.0 ± 0.0
	SLD	3	5.4 ± 3.3	5.6 ± 3.3	8.0 ± 4.0	4.2 ± 4.2	1.3 ± 1.3	0.0 ± 0.0
	PnC	2	5.5 ± 2.0	2.8 ± 1.1	1.1 ± 0.7	0.5 ± 0.5	0.0 ± 0.0	0.8 ± 0.8
	PnO	4	4.1 ± 2.1	2.9 ± 0.3	0.6 ± 0.4	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.2	0.7 ± 0.4
Medullary reticular formation								
	LPGi	4	9.4 ± 3.9	11.3 ± 5.3	1.9 ± 1.9	7.9 ± 6.9	2.5 ± 2.5	1.8 ± 1.0
	DPGi	4	60.1 ± 5.1	24.3 ± 4.1	3.1 ± 3.1	1.0 ± 1.0	2.5 ± 2.5	0.0 ± 0.0
	Gi	4	9.5 ± 2.1	22.1 ± 6.8	0.0 ± 0.0	1.5 ± 1.5	2.3 ± 2.3	0.0 ± 0.0
	PCRt	5	9.3 ± 3.9	8.0 ± 2.6	2.8 ± 1.4	7.5 ± 4.8	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

Tableau supplémentaire 1 : Pourcentages des neurones rétrogradement marqués exprimant également le c-FOS pour les groupes PSC, PSD et PSR.
Les valeurs présentées sont les pourcentages ± sem (n = 4 dans chaque condition). Cette valeur représente, pour chaque structure, le pourcentage de neurones CTb+/c-FOS+ par rapport au nombre total de neurones CTb+ observé dans cette même structure. La colonne n indique le nombre de sections sur lesquelles chaque structure a été analysée.

		% doubles/total doubles					
		PSR		PSD		PSC	
	n	Ipsi	Contra	Ipsi	Contra	Ipsi	Contra
Basal forebrain							
BST	2	1.1 ± 0.1	0.3 ± 0.2	1.2 ± 0.2	0.2 ± 0.2	0.8 ± 0.5	0.0 ± 0.0
MnPO	1	0.4 ± 0.1		0.0 ± 0.0		0.7 ± 0.3	
MPO	2	0.5 ± 0.3	0.3 ± 0.2	0.5 ± 0.3	0.1 ± 0.1	0.7 ± 0.5	0.9 ± 0.6
LPO	2	0.4 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.9 ± 0.4	0.3 ± 0.3	0.2 ± 0.2	0.0 ± 0.0
Thalamus							
APT	2	2.1 ± 0.7	1.9 ± 0.5	2.0 ± 1.0	2.3 ± 1.4	2.8 ± 0.6	4.6 ± 1.2
LG	3	0.3 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.2	0.6 ± 0.4	0.5 ± 0.3	0.0 ± 0.0
Amygdala							
Ce	3	0.8 ± 0.2	0.1 ± 0.1	0.6 ± 0.4	0.1 ± 0.1	0.4 ± 0.4	0.0 ± 0.0
Hypothalamus							
VMH	4	1.6 ± 0.4	0.6 ± 0.2	1.1 ± 0.9	0.1 ± 0.1	5.1 ± 1.7	0.9 ± 0.3
PMD	1	0.2 ± 0.2	0.0 ± 0.0	1.2 ± 1.2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
AHC	1	0.3 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.3
AHP	1	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.3	0.0 ± 0.0
DA	1	1.0 ± 0.4	0.2 ± 0.1	1.5 ± 0.4	0.6 ± 0.4	2.1 ± 0.4	0.0 ± 0.0
DM	3	0.3 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.2	0.1 ± 0.1	0.9 ± 0.6	0.2 ± 0.2
Pa	2	0.4 ± 0.3	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.2	0.0 ± 0.0
PH	3	2.8 ± 0.7	0.8 ± 0.2	2.7 ± 0.5	0.7 ± 0.3	3.2 ± 0.3	0.5 ± 0.3
LH	7	12.2 ± 1.8	4.7 ± 1.2	13.2 ± 2.5	2.9 ± 0.7	9.9 ± 1.6	3.9 ± 1.4
ZI	6	5.7 ± 1.0	2.8 ± 0.4	5.2 ± 1.4	1.1 ± 0.2	9.3 ± 0.5	1.1 ± 0.6
Mésencephalum							
IC	2	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.8 ± 0.6	0.4 ± 0.2	0.2 ± 0.2	0.0 ± 0.0
SC	4	3.6 ± 1.1	1.1 ± 0.3	5.5 ± 2.3	1.1 ± 0.5	3.9 ± 1.1	0.6 ± 0.6
DpMe	7	2.9 ± 1.0	1.3 ± 0.7	2.3 ± 0.9	1.1 ± 0.3	0.6 ± 0.6	1.0 ± 0.4
RRF	6	0.3 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.7 ± 0.4	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
SNC	2	0.2 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.6 ± 0.6	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
SNR	4	0.3 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.3	0.0 ± 0.0
Periaqueductal gray							
RMPAG	2	4.2 ± 0.5	2.1 ± 0.2	4.5 ± 1.4	1.9 ± 0.6	4.2 ± 0.8	2.1 ± 0.5
DMPAG	6	5.6 ± 0.7		1.1 ± 0.4		4.6 ± 0.4	
DLPAG	5	3.0 ± 0.5	1.0 ± 0.2	0.9 ± 0.4	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.3	0.2 ± 0.2
LPAG	6	4.6 ± 0.2	2.1 ± 0.4	10.4 ± 1.8	2.0 ± 0.4	4.9 ± 1.5	1.6 ± 1.0
VLPAG	5	4.6 ± 0.5	2.2 ± 0.7	5.0 ± 0.6	2.2 ± 0.5	4.5 ± 1.1	3.2 ± 0.9
DR	3	0.5 ± 0.2		0.3 ± 0.2		0.4 ± 0.3	
Pons							
LDTg	2	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.6 ± 0.5	0.1 ± 0.1	0.8 ± 0.5	0.0 ± 0.0
CGPn	3	0.8 ± 0.2	0.3 ± 0.1	1.4 ± 0.0	0.2 ± 0.2	1.7 ± 0.4	0.0 ± 0.0
CnF	2	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.2	0.5 ± 0.5	0.1 ± 0.1	1.8 ± 0.6	0.4 ± 0.4
LC	2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
KF	2	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	1.3 ± 0.7	1.2 ± 1.0	0.2 ± 0.2	0.5 ± 0.3
LPB	3	2.4 ± 0.3	1.1 ± 0.6	3.7 ± 1.0	1.1 ± 0.4	5.7 ± 0.6	0.9 ± 0.6
MPB	3	0.7 ± 0.2	0.2 ± 0.2	0.4 ± 0.4	0.0 ± 0.0	1.0 ± 0.4	0.0 ± 0.0
SLD	3	0.6 ± 0.5	0.1 ± 0.1	1.1 ± 0.6	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.2	0.0 ± 0.0
PnC	2	0.7 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.4 ± 0.2	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.3
PnO	4	1.2 ± 0.6	0.4 ± 0.0	0.6 ± 0.4	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.2	0.5 ± 0.3
Medullary reticular formation							
LPGi	4	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.6 ± 0.5	0.4 ± 0.4	0.5 ± 0.3
DPGi	4	1.9 ± 0.3	1.0 ± 0.1	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.2	0.3 ± 0.3	0.0 ± 0.0
Gi	4	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.2	0.0 ± 0.0
PCRt	5	0.5 ± 0.2	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

Tableau supplémentaire 2 : Pourcentages des neurones rétrogradement marqués exprimant également le c-FOS pour les groupes PSC, PSD et PSR.

Les valeurs présentées sont les pourcentages ± sem (n = 4 dans chaque condition). Cette valeur représente le pourcentage de neurones CTb+/c-FOS+ présents dans chaque structure par rapport au nombre total de neurones CTb+/c-FOS+ observé dans l'ensemble de l'encéphale. Une telle valeur permet de mieux appréhender la contribution respective de chaque structure à l'innervation de la VLPAG/dDpMe activée après hypersomnie de SP. La colonne n indique le nombre de sections sur lesquelles chaque structure a été analysée.

CHAPITRE IV – Implication du noyau paragigantocellulaire dorsal dans la régulation du SP via l'inhibition des systèmes noradrénergiques et adrénergiques

Les résultats présentés dans le chapitre précédent démontrent clairement que la LH est l'afférence à la VLPAG/dDpMe la plus activée lors d'une hypersomnie de SP. C'est pourquoi nous avons choisi d'étudier l'effet de sa modulation pharmacologique sur le cycle veille-sommeil. Toutefois, cette même étude a également mis en lumière la particularité du DPGi. En effet, bien que celui-ci ne contienne que peu de neurones CTb+/c-FOS+ comparé à la LH, ou même à la PAG, c'est le noyau dont le pourcentage de neurones rétrogradement marqués exprimant également le c-FOS après hypersomnie de SP est le plus important (près de 60%).

Or, le DPGi a déjà été impliqué dans la régulation du cycle veille-sommeil et plus particulièrement dans celle du SP. En effet, le DPGi projette sur les neurones noradrénergiques du LC (**Luppi et al 1985**) et représente l'une des afférences majeures au LC activées après hypersomnie de SP (**Verret et al 2006**). De plus, des neurones de type SP-on ont été enregistrés au sein du DPGi (**Goutagny et al**) et la majorité des neurones c-FOS+ après hypersomnie de SP sont de nature GABAergique (**Sapin et al 2009**). Ces données suggèrent donc que le DPGi pourrait participer à l'inhibition des neurones noradrénergiques du LC au cours du SP. Une telle hypothèse est étayée par des résultats montrant que la stimulation électrique du DPGi provoque, chez le rat anesthésié, l'inhibition GABAergique des neurones du LC (**Ennis and Aston-Jones, 1989**), et chez le rat vigile, un augmentation des quantités de SP (**Kaur et al., 2001**).

De part sa relative homogénéité, sa projection sur la VLPAG/dDpMe, et son implication supposée dans l'inhibition des neurones noradrénergiques du LC (dont l'activité supprime le SP), il nous semblait donc intéressant d'étudier le rôle du DPGi dans la régulation du SP.

Pour cela, nous avons quantifié l'effet sur le cycle veille-sommeil de l'inhibition pharmacologique du DPGi. De plus, afin de mieux comprendre les mécanismes neuronaux sous-tendant ces effets, nous avons entrepris d'analyser l'activation de certaines populations neuronales après inhibition du DPGi. Nous nous sommes en particulier intéressés aux neurones noradrénergiques puisque les résultats rappelés ci-dessus tendaient à démontrer une interaction fonctionnelle entre le DPGi et le LC notamment.

Implication of the dorsal paragigantocellular reticular nucleus in the regulation of paradoxical (REM) sleep and in the inhibition of adrenergic and noradrenergic neurons

Olivier CLEMENT[1,2,3], Sébastien ARTHAUD[1,2,3], Paul-Antoine LIBOUREL[1,2,3], Patrice FORT[1,2,3] and Pierre-Hervé LUPPI[1,2,3,*]

[1] INSERM, U1028; CNRS, UMR5292; Lyon Neuroscience Research Center, Team Physiopathologie des réseaux neuronaux du cycle veille-sommeil, 7 Rue Guillaume Paradin, F-69372 Lyon, France ; [2] University Lyon, F-69000 Lyon, France ; [3] University Lyon 1, F-69000 Lyon, France.

* corresponding author
Pierre-Hervé LUPPI
INSERM, U1028; CNRS, UMR5292
Centre de Recherche en Neuroscience de Lyon
Equipe Physiopathologie des réseaux neuronaux du cycle veille-sommeil
7 Rue Guillaume Paradin
69372 Lyon
France
Phone : +33 (0)4 78 77 10 39
Fax : +33 (0)4 78 77 10 22
Email : luppi@sommeil.univ-lyon1.fr

Authors declare no conflict of interest

Pages # 24
Figures # 7
Tables # 1

Number of words :
Abstract # 168
Introduction # 541
Discussion # 1881

ABSTRACT

Many evidences show that adrenergic and noradrenergic neurons are responsible, at least in part, for PS inhibition explaining that they stop firing during PS. As the dorsal paragigantocellular reticular nucleus (DPGi) contains GABAergic neurons specifically activated during PS and projecting to A6 (the most important noradrenergic group in the rat brain), it has been suggested that it could be responsible for its inhibition during PS. However, the effect of pharmacological modulation of DPGi activity on the sleep wake cycle has not been studied so far. We showed that muscimol inhibition of DPGi induces a long lasting wake state and an even longer suppression of PS. We then showed that this effect is accompanied by an activation of all adrenergic and noradrenergic neurons within the brain. Finally, we reported that application of clonidine (an α2 agonist) in the DPGi also suppresses PS. Given these results and others, we thus propose that DPGi would trigger PS by inhibiting all adrenergic and noradrenergic neurons and then allowing the occurrence of PS.

INTRODUCTION

For the last years, mechanisms of paradoxical (REM) sleep regulation have received growing attention, probably due to an increasing number of sleep related syndromes. However, precise neuronal mechanisms underlying such a physiological state need to be better characterise. It is now well established that noradrenergic neurons promotes wakefulness (WK) and inhibits PS (Jones, 2005) as enhancing noradrenergic transmission increases WK and decreases PS in both humans and animals (Cohen *et al.*, 1982; Ross *et al.*, 1995; Gervasoni *et al.*, 2002) whereas reducing noradrenalin as the opposite effect (Leppavuori, 1980).

Among noradrenergic neurons, those of locus coeruleus (LC) have been extensively studied and were shown to be specifically active during waking (WK) (Aston-Jones and Bloom, 1981b; a; Gervasoni *et al.*, 1998). Moreover pharmacological or optogenetical stimulation of LC produces cortical activation and waking (Berridge and Foote, 1991; Carter *et al.*, 2010), whereas pharmacological inactivation of LC increases delta power in the anesthetized rat (Berridge *et al.*, 1993). As a consequence, it is generally accepted that inhibition of noradrenergic neurons is necessary for PS induction (Fort *et al.*, 2009; Saper *et al.*, 2010; Luppi *et al.*, 2011).

Although LC noradrenergic neurons are under a permanent glycinergic and GABAergic tone, only the latter is increased during SWS and event more during PS (Nitz and Siegel, 1997b; Gervasoni *et al.*, 1998). The dorsal paragigantocellular reticular nucleus (DPGi) is believed to be responsible for LC inhibition during PS. Indeed, DPGi is one of the main LC afferences activated during PS-hypersomnia (Verret *et al.*, 2006), most of these activated neurons are of GABAergic nature(Sapin *et al.*, 2009) and DPGi contains neurons specifically activated during PS (Goutagny *et al.*, 2008). In addition, it has already been shown in anesthetized rats that electrical stimulation of the dorsomedial rostral medulla (area containing the DPGi) induces with a short latency an inhibition of LC neurons and that this inhibition is mediated by GABAergic mechanisms (Ennis and Aston-Jones, 1989). More recently, it has been demonstrated in freely moving rats

that electrical stimulation of the prepositus hypoglossi (just dorsal to DPGi) increases PS and that simultaneous application of picrotoxin (a $GABA_A$ antagonist) in the LC reverses this effect (Kaur *et al.*, 2001).

All these data strongly suggest that DPGi GABAergic neurons would be responsible for the inactivation of LC noradrenergic neurons during PS and would thus be of particular importance for PS regulation. However, the effect of DPGi inhibition on the sleep-wake cycle has never been studied so far in freely moving animals. Moreover, if the control of LC by DPGi is well documented, its putative implication in the regulation of other noradrenergic and adrenergic groups remains unknown although a recent study suggested that they could be of great importance for PS inhibition (Leger *et al.*, 2009).

In order to tackle these questions, we pharmacologically inhibited DPGi by injection of muscimol in freely moving rats and we then looked at the sleep-wake cycle during the following 8 h. Using c-FOS as a marker of neuronal activation, we also reported the activation of adrenergic, noradrenergic, dopaminergic and hypocretinergic populations following such an inhibition. To investigate a putative reciprocal interaction between DPGi and noradrenergic/adrenergic neurons, we finally assessed the effect of clonidine hydrochloride (an α-2 adrenergic receptor agonist) injection in the DPGi on sleep-wake cycle.

RESULTS

Muscimol inhibition of DPGi induces wakefulness and strongly suppresses PS

We first looked at the effects of local application of muscimol, a $GABA_A$ agonist, in the DPGi (Figure 1) on the sleep-wake cycle. 8 h hypnograms following NaCl or muscimol treatments are shown in Figure 2A for one representative animal. During the first 2 h after muscimol injection, animals are almost completely awake as they spend 118.5 ± 1.5 min in this state whereas control animals are awake during only 40.7 ± 3.8 min ($p = 0.0117$, Figure 2B). Consequently, SWS and PS, which are respectively almost and completely suppress (1.5 ± 1.5 min and 0 ± 0 min respectively) during this period, are dramatically and significantly reduced compared to control values (71.7 ± 3.7 min, $p = 0.0117$ and 7.6 ± 0.5 min, $p = 0.0117$ respectively). During the next 2 h, WK is still significantly increased compared to control (96.7 ± 10.5 min vs 27.7 ± 4.8 min, $p = 0.0117$). Furthermore, SWS starts to come back but remains under normal values (23 ± 10.2 min vs 77.4 ± 3.6 min, $p = 0.0117$) whereas PS is still almost completely absent (0.3 ± 0.2 min compared to 14.9 ± 1.9 min in control, $p = 0.0117$). During the period 4-6 h after injection, WK and SWS quantities return to normal control values (42.8 ± 10.8 min vs 29 ± 2.9 min, $p = 0.4$ for WK and 68.6 ± 8.8 min vs 74.1 ± 2.3 min, $p = 0.674$ for SWS). During this same period of time, PS tends to decrease compared to control (8.7 ± 3.8 min vs 16.9 ± 1.6 min) without reaching significance ($p = 0.0687$). Finally, no difference is observed in PS, SWS and WK durations during the 6-8 h block ($p = 0.327$, $p = 0.124$, $p = 0.069$ respectively). As showed in Figure 2C,D the observed reduction in PS is due to a reduction of both the number and the duration of PS-episodes. Concerning SWS, the number of episodes is significantly reduced during the entire 8 h following muscimol injection compared to control. However, when compared to

controls, the duration of SWS episodes is significantly reduced during the first two hours ($p = 0.0173$) but is increased starting from 4 h after the injection.

As a consequence of these effects, SWS and PS latencies are significantly increased by 8.7 times (from 14.7 ± 2.9 min to 177.2 ± 27 min, $p = 0.0117$) and 6 times (from 51.7 ± 3.8 min to 299.1 ± 25.1 min, $p = 0.0117$) respectively after muscimol injection compared to control (Figure 2E). More interestingly, the duration between the first SWS episode and the first PS episode is also multiplied by 3 (from 37.1 ± 4.6 min to 121.9 ± 36.6 min, $p = 0.0117$) after muscimol application in the DPGi (Figure 2F).

Spectral characterisation of WK and SWS following muscimol injection in the DPGi

In order to further characterize the effects of DPGi inhibition on the sleep wake cycle, we analyzed the power spectra of WK and SWS following muscimol injection. WK power spectrum was calculated from a 2 h period starting 1 h after the end of injection whereas the SWS one was calculated from a 1 h period starting at the first SWS episode following injection.

The analysis of WK revealed slight changes in EEG power spectrum (Figure 3A, C, E). If sigma band frequency (from 9.9 to 14 Hz) power is significantly decreased in muscimol treated animals (0.04 ± 0.003 vs 0.07 ± 0.003 in control, $p = 0.012$), delta and theta powers tends to increase but without reaching significance ($p = 0.327$ and $p = 0.161$, respectively). However, visual examination of animals' behavior revealed that rats treated with muscimol stay, for a few hours, quite calm, without moving and with a prominent EEG theta rhythm as during attentive waking (data not shown).

Concerning SWS, the quality of the first periods of SWS is modified in muscimol treated animals. As illustrated in Figure 3B, D, F, delta power is increased during the first hour of SWS following muscimol injection compared to control conditions (0.57 ± 0.03 vs 0,46 ± 0.02, $p = 0.012$). This increase is accompanied by a significant decrease of sigma and beta powers ($p = 0.012$ and $p = 0.012$ respectively) and only a tendency of decrease concerning theta power ($p = 0.484$).

Muscimol inhibition of DPGi leads to a strong activation of noradrenergic and adrenergic neurons

To investigate the neuronal mechanisms that can trigger this waking effect, and given the presumed role of DPGi in the inhibition of A6, we then looked at the activation of noradrenergic and adrenergic neurons 3 h after local application of either muscimol or NaCl in the DPGi. During these 3 h, rats which received muscimol are completely awake as they spend 177.7 ± 2.4 min in waking. On the contrary, control animals spend 45.7 ± 4.9 min in WK, 112.1 ± 3.2 min in SWS and 15.3 ± 3.9 min in PS. The number and localization of TH+ neurons expressing c-FOS after pharmacological treatment are presented in Figure 4 and Table 1. In all but C3 noradrenergic and adrenergic groups, the number of TH immunoreactives neurons (TH+) which also express c-FOS (c-FOS+) is significantly increased by muscimol treatment as compared to control. For example, the number of TH/c-FOS+ neurons in A6 significantly increases from 18.3 ± 9.3 after NaCl to 158.5 ± 18.5 after muscimol ($p = 0.0209$, Figure 5A,B), which represents an 8.7 times increase. This increase is respectively 7.1, 4.1, 3.3, 8.3 and 10.3 times for A1/C1, A2/C2, A5, A6 and A7 groups. C3 is the only noradrenergic/adrenergic structure for which this increase does not occur (0.8 ± 0.3 vs 1.5 ± 1, $p =$

0.7728). This result is consistent with the fact that C3 is located in the DPGi (Figure 4) which receives muscimol injection. This result also confirms the efficiency of our inhibition procedure.

Following muscimol inhibition of DPGi, a very large majority of noradrenergic and adrenergic neurons are c-FOS+. Indeed, excepting in C3 (for the same reason than above), the percentage of TH/c-FOS+ double-labeled over TH+ cells is significantly increased in muscimol compared to control. For muscimol treated animals, this percentage reaches more than 70 %, and even about 80 % in A1/C1, whereas it never exceeds 21 % in control animals (Table 1).

In sharp contrast to what is observed for noradrenergic/adrenergic neurons, the expression of c-FOS by dopaminergic neurons is not modified by muscimol inhibition of DPGi. Indeed, the number, as well as the percentage, of TH/c-FOS+ neurons in A10 (in the ventral tegmental area - VTA -), A9 (in the substancia nigra compacta - SNC - and reticulata - SNR -) and A11 (in the periaqueductal gray - PAG -) are neither increased nor decreased by pharmacological treatment (Table 1). In these structures and in both experimental groups, TH/c-FOS+ neurons represent a small minority of TH cells, as double labeled cell account for less than 5 % of TH+ cells in A9 and A10 and a little bit more than 10 % in A11 (Table 1).

Muscimol inhibition of DPGi also induces activation of hypocretin neurons but not of serotoninergic neurons

In order to assess the specificity of the DPGi in the regulation of noradrenergic/adrenergic groups, we also analyzed the effect of muscimol injection on the activation of hypocretin (HCRT) and serotoninergic (5-HT) neurons, two other populations strongly implicated in wake regulation. As illustrated in Figure 6A,C, muscimol inhibition of DPGi results in an increase of the number of HCRT/c-FOS+ neurons compared to control (102 ± 11.4 vs 38.3 ± 2.7, $p = 0.0209$). Indeed, 60.4 ± 3.31 % of the HCRT neurons express c-FOS after muscimol treatment whereas only 23 ± 2.3 % are c-FOS+ after NaCl. On the contrary, muscimol treatment does not trigger the activation of 5-HT neurons as they do not express c-FOS following such a treatment (Figure 6B).

Clonidine hydrochloride selectively affects PS when injected inside the DPGi

We just showed that noradrenergic and adrenergic neurons seem to be controlled by DPGi neurons as its inhibition induces their strong activation which leads to the establishment of a sustained waking. Given the known opposite effects of these two neuronal populations on sleep, we thus wondered if a reciprocal inhibition could exist between them. For this purpose, we injected clonidine hydrochloride, an α-2 adrenergic receptor agonist, in the DPGi and we analyzed the sleep-wake cycle induced changes. Hypnograms of a representative animal are presented in Figure 7A.

Compared to control animals, those injected with clonidine only show an alteration of PS but not of WK and SWS. Indeed, the number and the mean duration of episodes, as well as the global duration remain unchanged for SWS and WK during 8 h after injection ($p > 0.05$ for all 2 h blocs, Figure 7B-D). On the other hand, PS quantities are significantly reduced during the first 2 h after clonidine injection compared to control (4.4 ± 0.8 min, vs 6.4 ± 0.6 min, $p = 0.049$). A tendency to decrease is also observed during the 4-6h bloc but

do not reach significance (13.4 ± 1.6 min vs 16.9 ± 1.7 min, p = 0.124) (Figure 7B). These effects are only due to a decrease of PS-episodes duration, which reaches significance only during the 0-2 h and 4-6 h blocs (p = 0.049 and p = 0.049 respectively, Figure 7C), as the number of PS-episodes is not modified by pharmacological treatment (Figure 7D). Moreover, clonidine treatment significantly delays PS (from 48.8 ± 5.2 min to 75.1 ± 5.7 min, p = 0.012) without affecting latency of SWS (Figure 7E).

DISCUSSION

In this study, we reported that the inactivation of DPGi by muscimol injection induces a sustained waking during at least 3 hours during which the animals remain attentive. We also showed that this effect is accompanied by a strong activation of noradrenergic and adrenergic populations, except C3, as at least 70 % of noradrenergic and adrenergic cells express c-FOS following such a treatment. In agreement with such a sustained state, 60 % of HCRT neurons also express c-FOS. Finally, we also reported that application of clonidine hydrochloride (an α-2 adrenergic receptor agonist) inside the DPGi selectively inhibits PS by a reduction of PS episodes duration and an increase in PS latency.

Methodological consideration

It is well established that noradrenalin neurons of the central nervous system are very reactive to stressful stimuli (for review see (Glavin, 1985; Wong and Tank, 2007)). However, there is no reason to think that the noradrenergic and adrenergic activation reported in this study could be a consequence of an acute stress. Indeed, animals are habituated during many days to recording conditions, handling and injection procedure. Moreover, injections of the different pharmacological agents were randomized in order to prevent experimental bias and animals express normal behaviour during all injections included that of muscimol.

We are also pretty confident that the results reported here result from pharmacological modulation of DPGi activity. Indeed, as illustrated in Figure 1, all injection sites were localized inside this structure. Moreover, the analysis of TH cells after muscimol injection revealed that those located inside the DPGi (C3) are c-FOS negative (in accordance with the inhibitory effect of muscimol) whereas those of A2/C2, which are located only 1 mm away from the caudal part of the DPGi are c-FOS+. Finally, even if DPGi is located just ventrally to the 4th ventricle, cannula were left in place 5 min after the end of the injection to prevent back flow of the liquid, and analysis of c-FOS after NaCl or muscimol injections revealed no activation of ependimal cells along the 4th ventricle. All this data support the idea that pharmacological effects were mainly restricted to DPGi area without reaching ventricle.

In order to assess neuronal activation after pharmacological treatment, we chose to use the c-FOS protein. Although we are aware that c-FOS is not a perfect marker of neuronal activation as its expression do not strictly correlates neuronal discharge (Morgan and Curran, 1986; Kovacs, 2008), it has been extensively used to map sleep-wake circuitry (Sherin *et al.*, 1996; Maloney *et al.*, 1999; 2000; 2002; Verret *et al.*, 2003; Verret *et al.*, 2005; Verret *et al.*, 2006; Leger *et al.*, 2009; Sapin *et al.*, 2009; Sapin *et al.*, 2010; Clément *et al.*, 2011) as well as activation of noradrenergic neurons following diverse experimental paradigms (Erickson

and Millhorn, 1994; Haxhiu *et al.*, 1996; Han *et al.*, 2003; Deurveilher *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2006a). In this study, we report that 3 h after NaCl injection in the DPGi, corresponding to our control group, 5 to 21 % of TH+ neurons express c-FOS. In 2009, Léger et al. reported that in undisturbed animals, TH+ neurons of all noradrenergic and adrenergic areas but A2 do not express c-FOS, whereas after 3 h of exposition to a new environment, 16 to 40 % of noradrenergic and adrenergic cells are c-FOS+. The comparison of these and our data indicates that the light activation of noradrenergic and adrenergic systems observed in our control condition probably results from the injection procedure. Indeed, rats are handled during around 20 min before being put back in their home cage where they stay awake during 10 to 15 min.

Functional significance

We found out that muscimol inhibition of DPGi induces a drastic activation of all noradrenergic and adrenergic groups as for each group, 71.6 to 79.6 % of the TH+ neurons also express c-FOS. An increase of c-FOS expression is also observed in HCRT neurons but in a lesser extent than in TH cells. As far as we know, such activation of noradrenergic and adrenergic neurons has rarely been reported. Similar activation have for example been shown after 1 h exposition to hypercapnic stress (Haxhiu *et al.*, 1996) or after administration of high dose of caffeine (Deurveilher *et al.*, 2006). In this latter case, the observed increased was only measured in A6 which is known to be primarily implicated in waking. In all other studies, the percentage of activated noradrenergic/adrenergic neurons is much lower. For example, after visceral painful stimulation, about 30 % of the TH+ neurons in A1/C1 and A2, and only 8 % in A6 also express c-FOS. After subcutaneous painful stimulation, percentages were 36 %, 25 % and 22 % respectively (Han *et al.*, 2003). Moreover, after a few hours of a new environmental stimulation less than 30 %, except for A5 with 37.9 %, of noradrenergic neurons express c-FOS (Leger *et al.*, 2009), and administration of light doses of caffeine only activates less than 30 % of noradrenergic A6 neurons (Deurveilher *et al.*, 2006). On the contrary, the report that most of HCRT neurons are c-FOS+ after an experimental condition is not rare. Indeed, about 50 % of HCRT neurons express c-FOS; naturally during the dark phase, after methamphetamine treatment or after sleep deprivation (Estabrooke *et al.*, 2001). Interestingly, after administration of light or strong doses of caffeine (from 10 to 75 $mg.kg^{-1}$) there are always about 50 % of HCRT cells that express c-FOS, whereas only 16 % are c-FOS+ after control injection (Deurveilher *et al.*, 2006). Moreover, after caffeine administrations, all rats remain awake during the 90 min between injections and sacrifices (Murphy *et al.*, 2003). All these data strongly suggest that DPGi inhibition induces activation of almost all noradrenergic and adrenergic neurons and that the observed activation of HCRT neurons results from the waking effect due to the increased noradrenergic and adrenergic transmission (Jones, 2005).

Consequently, we hypothesize that DPGi would provide an inhibitory tone during all behavioural states onto noradrenergic and adrenergic neurons. Supporting this idea, it has been shown that DPGi densely projects to the Kölliker-Fuse nucleus (containing A7), A6, the lateral paragigantocellular nucleus (containing A1/C1) and the nucleus of the solitary tract (containing A2/C2) (Ohtake, 1992; Goutagny *et al.*, 2008). A6 neurons have been extensively studied and they were shown to be under a tonic GABAergic tone during all

behavioural states that increase during PS leading to their total silencing (Nitz and Siegel, 1997b; Gervasoni *et al.*, 1998). Most of the PS-activated neurones projecting to A6 are localized in the DPGi (Verret *et al.*, 2006) and many of these A6 projecting neurons are GABAergic (Luppi *et al.*, 1995). In addition to PS-on neurons, electrophysiological recordings in head restrain rats revealed that DPGi also contains neurons that are tonically active during all behavioural states (Goutagny *et al.*, 2008). Thus, these neurons could be responsible for noradrenergic down regulation during all behavioural state. Even PS-on neurons could participate in this down regulation as they are not totally silent during WK and SWS. Their firing rate is 4.24 ± 0.9 Hz during WK, tend to increase during SWS (7.34 ± 1.1 Hz) and is much higher during PS (46.06 ± 5.1 Hz) (Goutagny *et al.*, 2008). Although other noradrenergic and adrenergic neurons were less studied for their relation with the sleep-wake cycle, electrophysiological recordings reported that A5 noradrenergic cells are silent during PS-like state elicited by pontine carbachol injection (Fenik *et al.*, 2002). Moreover, noradrenergic and adrenergic cells of all groups do not express c-FOS during PS-hypersomnia (Leger *et al.*, 2009). Even if we are aware that unitary recordings along the sleep-wake cycle of all noradrenergic and adrenergic groups are needed, these data raise the hypothesis that all these neurons could have similar activity pattern indicating a possible common mechanism for their inhibition during sleep. We hypothesize that DPGi could be responsible for their down regulation during WK and SWS and their total inhibition during PS.

DPGi would thus be of particular importance for PS generation. Indeed, during SWS, it is generally assumed that noradrenergic and adrenergic neurons are silenced by SWS-on GABAergic neurons localized in the ventrolateral preoptic area (VLPO) (Fort *et al.*, 2009; Saper *et al.*, 2010). The fact that these neurons decrease their activity during PS (Szymusiak *et al.*, 1998; Takahashi *et al.*, 2009) whereas noradrenergic and adrenergic cells are even more inhibited strongly suggests that another structure relays VLPO. This mechanism is necessary for PS induction as a decrease of noradrenergic and adrenergic transmission is needed for the occurrence of this state (Jones, 2005). We believe that DPGi could play this role. Indeed, our results show that muscimol inhibition of DPGi more profoundly affects PS than SWS as the delay between the first SWS-episode and the first PS-episode is significantly increased following muscimol application (122 ± 36.6 min) as compared to control (37.1 ± 4.6 min). Moreover, it is well established that DPGi is responsible for LC inhibition during PS as electrical stimulation of DPGi induces inhibition of A6 neurons and enhances PS (Ennis and Aston-Jones, 1989; Kaur *et al.*, 2001). Furthermore, there is a close time-correlation between DPGi and A6 activities: DPGi PS-on neurons start to increase their firing rate about 15 s before PS onset (Goutagny *et al.*, 2008), whereas A6 noradrenergic WK-on neurons stop firing 10-20 s before PS onset (Aston-Jones and Bloom, 1981a; b; Gervasoni *et al.*, 2000). As a consequence the transition from SWS to PS would require DPGi activation in order to completely silence noradrenergic cells. The inactivation of all noradrenergic groups is critical as a recent study suggested that PS inhibitory effect of noradrenalin and adrenalin would arise from A1/C1, A2 and A5 rather than A6 (Leger *et al.*, 2009). Given all these results, we hypothesize that DPGi could inhibits in a synchronized manner all noradrenergic and adrenergic neurons allowing then PS genesis. To test this hypothesis, it would be of great interest to perform

a retrograde multiple-labelling study to see if some DPGi neurons send collateral projections to at least two noradrenergic/adrenergic groups as it was demonstrated for LC and dorsal raphe nucleus (Lee *et al.*, 2005a).

Another interesting result in this study is the fact that the injection of clonidine hydrochloride (alpha-2 adrenoreceptor agonist) in the DPGi selectively affects PS by increasing PS-latency and decreasing PS-episode duration. This result means that a reciprocal interaction would exist between DPGi and one (or more) noradrenergic/adrenergic groups. Anatomical study of the catecholaminergic system showed that DPGi contains a few scattered DBH fibers (dopamine β-hydroxylase, noradrenaline/adrenaline synthesising hormone) (Swanson and Hartman, 1975; Kalia *et al.*, 1985). This reciprocal interaction would be inhibitory in nature as clonidine appeared to inhibits DPGi neurons (inhibition of PS), and inhibition of DPGi leads to an activation of noradrenergic/adrenergic neurons. Such an interaction would participate in the classically observed rapid and complete transition from on state to another (Gervasoni *et al.*, 2004; Saper *et al.*, 2010).

CONCLUSION

This study revealed for the first time that a common pathway originating from DPGi could be responsible for the down regulation of noradrenergic/adrenergic neurons during WK and SWS and their complete inhibition during PS. The down regulation of these neurons during WK would allow their activation depending on the situation the animal has to face, whereas their total silencing during PS would prevent aberrant transition from PS to WK.

MATERIALS AND METHODS

All experiments were conducted in accordance to the French and European Community guidelines for the use of research animals and approved by the institutional animal care and use committee of the University of Lyon 1. Sprague-Dawley male rats were housed individually in recording barrels under a constant 12 h light-dark cycle (light on at 08:00). Room temperature was maintained at 21 ± 1°C, and standard rodent food and water were available *ad libitum* throughout the experiment.

Surgery

Cannula implantation

Rats (290-300g), Charles River, France) were implanted for cannula injection inside the DPGi (anteroposterior bregma (β) - 12 mm, mediolateral β + 0 mm, dorsoventral **-** 7.8 mm from the brain surface). For this purpose, rats were anesthetized with a Ketamin/Xylazin mix (100 $mg.kg^{-1}$ and 10 $mg.kg^{-1}$ respectively, i.p.) and mounted in a stereotaxic frame (David Kopf Instruments, CA). Following incision of the scalp, a hole was drilled in the skull and a guide cannula (Plastics One Inc., CT) was lowered inside the brain down to 2.6 mm above the targeted area (cannula used are 2.6 mm longer than the guide cannula).

Cannula was then cemented to the skull using acrylic cement (Superbond, Sun Medical Co. Ldt., Japan) and dental cement (Paladur, Heraeus Kulzer, Germany).

EEG/EMG implantation

All the rats used in this study were implanted for electroencephalographic (EEG) and electromyographic (EMG) recordings. As previously described (Verret *et al.*, 2005; Verret *et al.*, 2006; Sapin *et al.*, 2009), four stainless-steel screws (Anthogyr, France) were inserted over the frontal (AP β + 3 mm, ML β + 1 mm), parietal (AP β - 4 mm, ML β + 3 mm), occipital (AP β - 8 mm, ML β + 3 mm) and cerebellar (AP β - 12 mm, ML β + 2 mm) cortices. Two gold-coated electrodes were also inserted into the neck muscles in order to record EMG activity. All EMG and EEG electrodes were than fixed to the skull using acrylic cement (Superbond) and connected to a miniature plug (Plastics One Inc.) that was cemented using dental cement (Paladur).

Pharmacology

Animals were allowed to recover for 5 days after the surgery and were then handled daily for at least 15 min during one more week to minimize non-specific stress. 0.3 µL of muscimol (GABAa receptor agoniste, 1 $\mu g.\mu L^{-1}$ in NaCl; Sigma-Aldrich, MO), clonidine hydrochloride (alpha-2 adrenoreceptor agoniste, 0.53 $\mu g.\mu L^{-1}$ in NaCl; Tocris Bioscience, UK) or NaCl (0.9%) were injected at the rate of 0.1 $\mu L.min^{-1}$ using an Hamilton syringe (Hamilton, Swiss) connected to the cannula with the appropriate polyethylene tubing (Plastics One Inc.) and inserted into a micro-pump (New Era Pump System, NY). Injection sessions started at 9:00 am. Cannula was lowered down the brain and left in place 5 min before and 5 min after the injection. At the end of the injection session, animals were immediately put back in their cage and vigilance states were recorded during 8 h. All drugs were stored at final concentration at - 20 °C and one new batch was used for each injection session. Two injections were spaced by at least 3 days and the sequence of drug injections was randomized.

Polygraphic recordings

Rats were connected to a cable attached to a rotating connector (Plastics One Inc.) to allow free movements of the animal within its cage. EEG and EMG signals were first amplified (MCP PLUS, Alpha-Omega Engineering, Israel) before been collected on a computer via a CED interface using Spike2 software (Cambridge Electronic Design, UK). For all animals, the same amplifications were used and each animal remained in the same box during the entire experiment. Sampling frequency for polygraphic recordings was 250.8 Hz.

Perfusion, fixation and section

Rats were sacrificed 3 h after injection of either muscimol or NaCl in the DPGi. Under profound pentobarbital anesthesia (Ceva santé animale, 150 $mg.kg^{-1}$, i.p.), rats were transcardially perfused with Ringer's lactate solution containing 0.1 % heparin, followed by 500 ml of a fixative solution composed of 4 % paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4). Brains were removed and stored at 4 °C for 1

night in the fixative solution and then for 3 days in 30 % sucrose in 0.1 M PB. Brains were then rapidly frozen in methyl-butane cooled with dry ice and 30 mm thick coronal sections were cut on a cryostat (Microm, France). Free-floating sections were collected and stored at - 20 °C in a cryoprotectant solution (Sapin *et al.*, 2009; Sapin *et al.*, 2010; Clément *et al.*, 2011).

Immunohistochemistry

As previously described (Boissard *et al.*, 2002; Verret *et al.*, 2005), brain sections were successively incubated in (i) a rabbit anti-serum to c-FOS (1:10,000; Merck, Germany) in PBST-Az (PBST containing 0.1 % of azide) for 3 days at 4°C; (ii) a biotinylated goat anti-rabbit IgG solution (1:1,000; Vector Laboratories, CA); and (iii) an ABC-HRP solution (1:1,000; Elite kit, Vector Laboratories) both for 90 min at room temperature. Finally, the sections were immersed in a 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.6) containing 0.025% 3,3'-diaminobenzidine-4 HCl (DAB; Sigma-Aldrich), 0.003% H_2O_2 and 0.6 % nickel ammonium sulphate. Three washes of 10 min were performed between each step. The c-FOS stained sections were then incubated the following day in either a goat polyclonal antibody to hypocretin (1:5,000; Santa Cruz Biotechnology Inc., CA), either a rabbit anti-serum against tyrosine hydroxylase (TH) (1:5,000; Institut de Biotechnologies Jacques Boy, France) or a mouse monoclonal antibody against serotonin (5-HT) (1/300,000, generated by Y. Charnay, (Leger *et al.*, 1998) in PBST-Az over 3 days at 4°C. Amplification steps were similar to those above but revelation was performed in DAB solution without nickel. Finally, the sections were mounted on slides, dried and coverslipped with DePex.

Analysis of sleep-wake data

Quantification of sleep-wake cycle

Sleep-wake cycle was analysed during 8 h following pharmacological treatment. Vigilance states were scored by 5 sec epochs using a homemade script developed for Spike2 software. State classification was done by visual examination of polygraphic signals and the help of a sliding window showing the EEG power spectrum analyzed during the same 5 sec epoch by fast Fourier transform. Wake was characterized by desynchronized (activated) low-amplitude EEG accompanied by a sustained EMG activity; SWS was distinguished by high-voltage slow waves (1.5 - 4.0 Hz) and spindles (10 - 14 Hz) and the disappearance of phasic muscle activity. The occurrence of muscle atonia with a regular and pronounced theta rhythm (4 - 9 Hz) characterized PS. We then calculated the quantities, percentages, numbers and duration of bouts for each vigilance state.

Wake and SWS spectral analysis

Spectral analysis for the characterisation of SWS and WK was done on frontal EEG signals. For WK, we analysed the 2nd and 3rd hours following muscimol and NaCl injections, whereas for SWS, only 1 h starting at the first SWS-episode after injection was analysed. For these two analyses, we first removed from analysis 20 sec apart each transition in order to have “pure” states. Then, for each 5 sec epoch of the considered state, a power spectrum was calculated by fast Fourier transform (0.24 Hz bin, from 0.6 Hz to 120 Hz) before being normalized. Finally a mean of all individual normalized spectra across the analysis

period was created. For each frequency band (delta, 0.5 - 4.6 Hz ; theta, 5.1 - 8.9 Hz ; sigma, 9.9 - 14 Hz ; beta, 15 - 30 Hz ; gamma1, 39.9 - 48.1 Hz ; gamma2, 51.9 - 120 Hz), its normalized power was calculated. These normalized data were compared between experimental groups.

Analysis of histological labelling

For the analysis of TH neurons expressing c-FOS after pharmacological treatment, 9 sections taken at 600 µm intervals from β - 8.8 mm to β - 14.2 mm were analyzed for the adrenergic and noradrenergic groups, and one section at β - 6 mm for the dopaninergic groups A9-A11. For the analysis of hypocretinergic neurons, only one section taken at β - 2.5 mm was counted. Drawings of double-labeled hemi-sections were made with an Axioscope microscope (Zeiss, Germany) equipped with a motorized X–Y-sensitive stage and a video camera connected to a computerized image analysis system (Mercator; ExploraNova, France). The number of single and double labeled neurons per structure was automatically counted and exported using Mercator (ExploraNova). When a structure was present on several sections the neurons counted on all sections were summed.

The denomination of the noradrenergic and adrenergic groups followed the classical nomenclature (Dahlstrom and Fuxe, 1964; Leger *et al.*, 2009). The A1 and A2 groups are located in the ventrolateral medulla and caudal commissural solitary tract nucleus respectively. Included in our counts are the adrenergic neurons of the C1 group, as a rostral continuation of the noradrenergic A1 group, from the rostral pole of the lateral reticular nucleus to the caudal pole of the facial nucleus. Therefore this group was denominated as A1/C1. Similarly, A2 and C2 neurons were pooled in the same A2/C2 group. The A4 group, composed of a very limited number of noradrenergic cells located along the ventral surface of the cerebellum, was not considered in this study. The A5 group is just lateral to the superior olivary complex. The A6 group corresponds to the LC and its neurons are virtually all NA. The A7 group, representing the most rostral noradrenergic group, is located in the lateral pontine reticular formation, just ventral to the Kölliker-Fuse nucleus. Finally, subCD group corresponds to noradrenergic cells located beneath A6 and can expend ventrally along the motor pool of the V.

Statistical analysis

Because of the number of animals used in each experiment (n=8 in maximum), we only used non-parametric tests. The number of labeled neurons across experimental conditions was compared using a Mann-Whitney test. The effects of pharmacological treatments on the sleep-wake cycle (quantities, latencies, power spectra etc.) were analysed with a Wilcoxon signed rank test. All statistics were performed using StatView software and a significant effect was considered for all $p < 0.5$.

LEGENDES

Abbréviations:

Abbreviations: 4N, trochlear nucleus; 4V, 4th ventricle; 7N, facial nerve; 12N, hypoglossal nucleus; A1, A1 noradrenergic group; A1/C1, area with mixed noradrenergic and adrenergic neurons; A2, A2 noradrenergic group; A2/C2, area with mixed noradrenergic and adrenergic neurons; A5, A5 noradrenergic group; A6, A6 noradrenergic group; A7, A7 noradrenergic group; A9, A9 noradrenergic group; A10, A10 noradrenergic group; A11, A11 noradrenergic group; Amb, ambiguus nucleus; Aq, aqueduct; C3, C3 adrenergic group; CGPn, central gray of the pons; DPGi, dorsal paragigantocellular reticular nucleus; DTg, dorsal tegmental nucleus; DpMe, deep mesencephalic nucleus; DR, dorsal raphe nucleus; f, fornix; Gi, gigantocellular reticular nucleus; GiV, gigantocellular reticular nucleus, ventral part; icp, inferior cerebellar peduncle; ic, internal capsule; IO, inferior olive; lfp, longitudinal fasciculus of the pons; LPB, lateral parabrachial nucleus; LVe, lateral vestibular nucleus; Md, medullary reticular nucleus; me5, mesencephalic trigeminal tract; mlf, medial longitudinal fasciculus; MnR, median raphe nucleus; Mo5, motor trigeminal nucleus; MPB, medial parabrachial nucleus; mt, mammillothalamic tract; MVe, medial vestibular nucleus; opt, optic tract; PCRt, parvicellular reticular nucleus; Pn, pontine nuclei; PnC, pontine reticular nucleus, caudal part; PnO, pontine reticular nucleus, oral part; Pr, prepositus nucleus; Pr5, principal sensory trigeminal nucleus; py, pyramidal tract; RMg, raphe magnus nucleus; scp, superior cerebellar peduncle; SLD, sublaterodorsal tegmental nucleus; SNC, substantia nigra, compact part; SNR, substantia nigra, reticular part; Sol, nucleus of the solitary tract; sp5, spinal trigeminal tract; Sp5I, ;Sp5O, spinal trigeminal nucleus, oral part; SpVe, spinal vestibular nucleus; SupO, superior olive; Tz, nucleus of the trapezoid body; VLPAG, ventrolateral periaqueductal gray.

		n	TH+	TH/c-FOS+ NaCl	TH/c-FOS+ Muscimol	% TH/c-FOS+ vs TH+ NaCl	% TH/c-FOS+ vs TH+ Muscimol
NorA/A	A1/C1	5	110.4 ± 7.6	13.0 ± 4.6	93.5 ± 6.6 *	11.6 ± 3.7	79.6 ± 3.0 *
	A2/C2	4	52.6 ± 5.3	8.3 ± 2.4	34.0 ± 4.3 *	14.4 ± 4.2	75.6 ± 9.3 *
	A5	3	45.0 ± 2.0	9.8 ± 2.1	32.0 ± 3.8 *	21.3 ± 4.5	75.1 ± 10.5*
	A6	3	221.8 ± 15.9	21.0 ± 9.6	174.8 ± 20.8*	10.3 ± 4.7	71.4 ± 2.8 *
	A7	1	20.6 ± 1.5	1.3 ± 0.6	13.5 ± 2.2 *	5.1 ± 2.5	75.0 ± 5.1 *
	C3	2	13.1 ± 1.1	0.8 ± 0.3	1.5 ± 1.0	7.1 ± 2.6	10.7 ± 6.8
Dopamine	A11	1	13.6 ± 1.6	1.5 ± 0.9	1.3 ± 0.9	10.4 ± 5.7	14.0 ± 12.1
	A9 (SNR)	1	40.0 ± 6.3	2.0 ± 0.7	1.8 ± 1.1	5.2 ± 2.2	4.4 ± 2.9
	A9 (SNC)	1	173.5 ± 11.9	5.0 ± 1.3	5.3 ± 1.9	2.6 ± 0.7	3.4 ± 1.2
	A10	1	427.6 ± 33.2	13.5 ± 2.9	11.0 ± 0.7	2.8 ± 0.5	2.8 ± 0.1

Table 1. Number of TH singly and TH/c-FOS double labeled neurons 3 h after NaCl and muscimol injections in the DPGi

Number (mean ± sem) of TH+ and TH/c-FOS+ neurons counted on a total of 11 sections from bregma - 6 mm to bregma - 14.2 mm in NaCl or muscimol treated animals (n=4 in each group). The number of counted section for each structure is reported is the column n. As no difference was seen for TH+ neurons, values are

the mean for all 8 animals. The percentages of TH/c-FOS+ neurons over TH+ ones are also reported for each group. * indicates $p < 0.05$ when compared to NaCl.

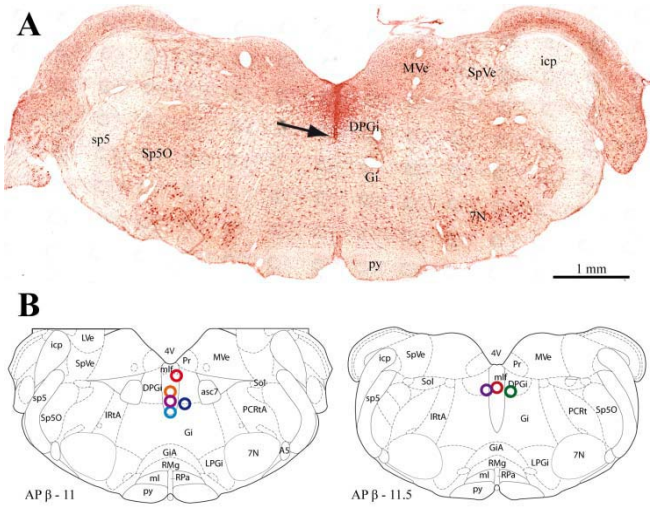


Figure 1. Localization of injection sites within the DPGi.

For each animal, the targeted area was verified at the end of the protocol. **A**, Example of a DPGi injection site on a neutral red counterstained section. Tip of the cannula is indicated by a black arrow. **B**, Location sum up of all injection sites used in this study. Adapted from Paxinos and Watson Rat Brain atlas, 5th edition.

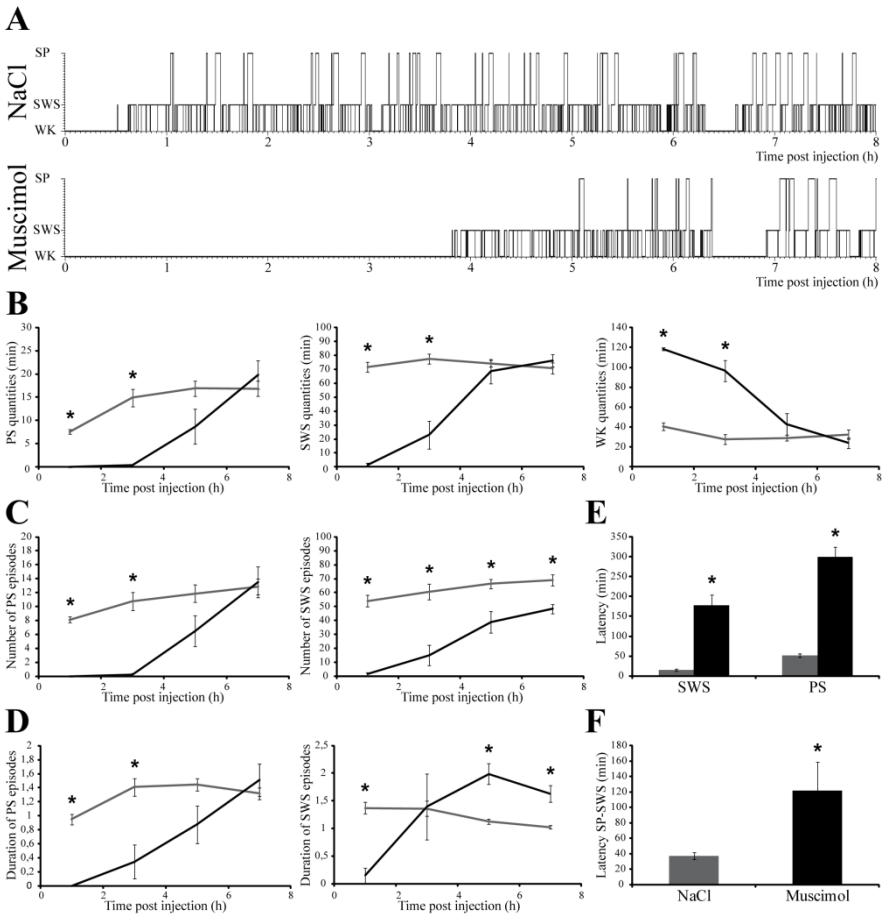


Figure 2. Muscimol inhibition of the DPGi induces waking and suppresses PS.

A, Hypnograms representing the sleep-wake cycle following control (NaCl) or muscimol injections in the DPGi for one representative animal. **B-F**, Group data illustrating the effects of muscimol (in black) or NaCl (in grey) applications in the DPGi on: PS, SWS and WK quantities (**B**), number of PS and SWS episodes (**C**), duration of PS and SWS episodes (**D**). PS and SWS latency are represented in **E** and the duration between the first SWS episode and the first PS episode is given in **F** (n=8 in each group). Values are mean ± sem, * indicates $p < 0.05$ compared to NaCl values.

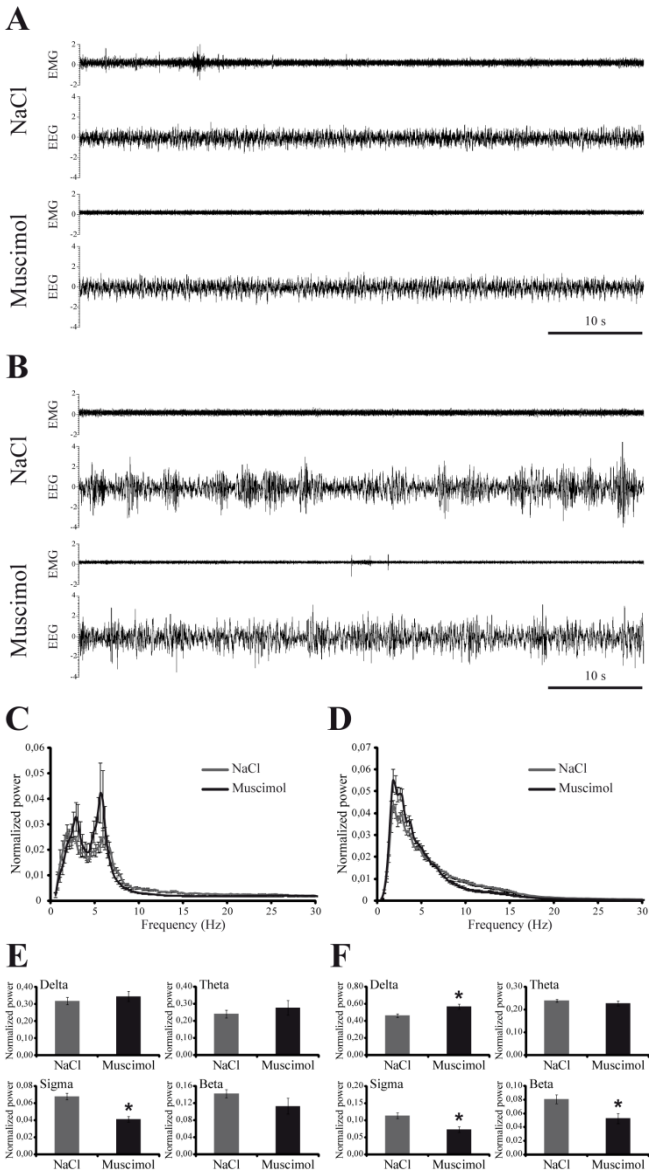


Figure 3. WK and SWS spectra are altered by muscimol injection in the DPGi.

Representatives EMG (top) and EEG (bottom) traces during WK (**A**) and SWS (**B**) following NaCl or muscimol treatments. **C-F**, EEG power spectral analysis of WK during the 2nd hour following injection (left panel) and of SWS during one hour starting at the first SWS episode after injection (right panel). The average power densities in delta, theta, beta and sigma bands for WK and SWS are represented respectively in **E** and **F** (n=8 in each group). Values are mean ± sem, * indicates $p < 0.05$ compared to NaCl values.

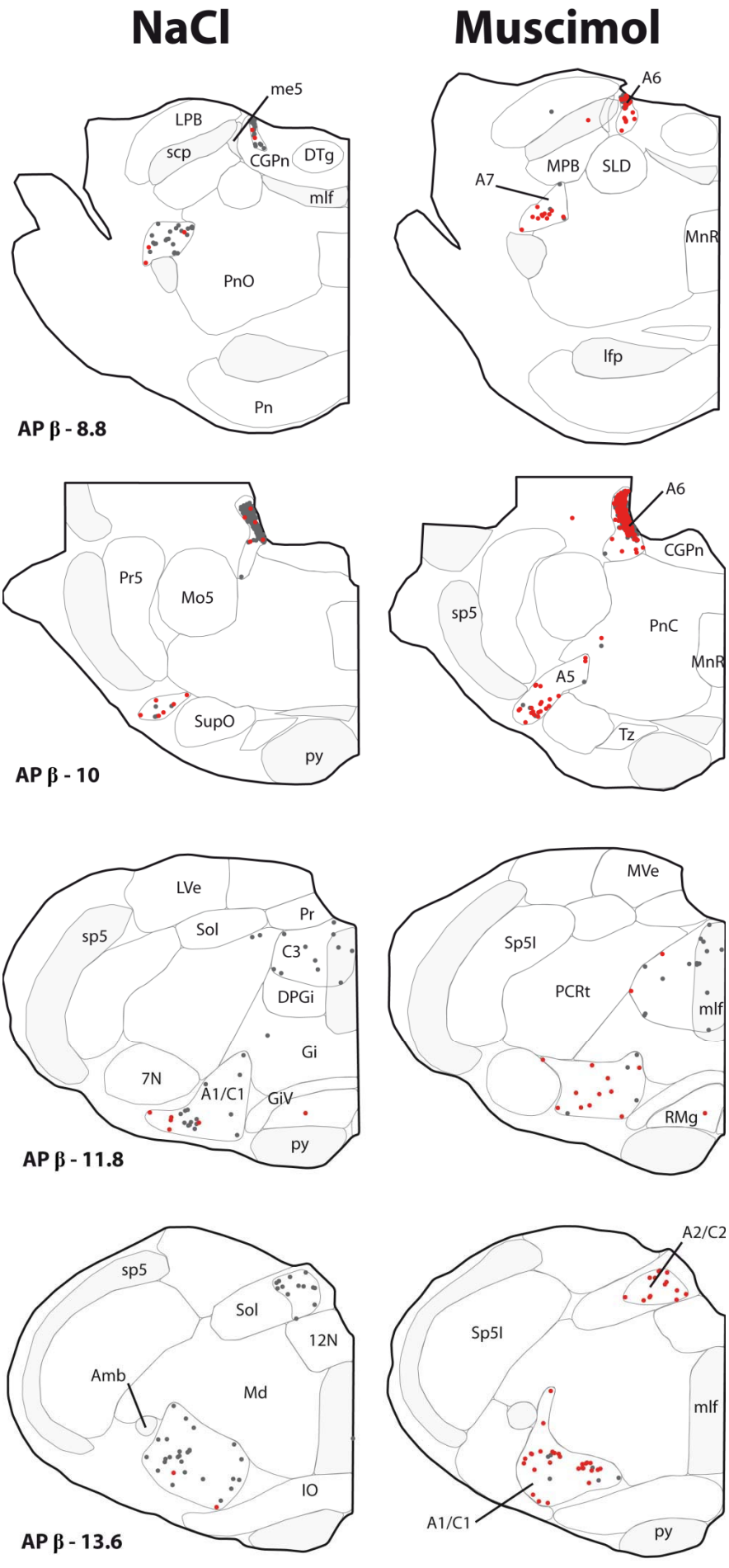

NaCl
Muscimol
me5
LPB
scp
CGPn
DTg
mlf
PnO
Pn
AP β - 8.8
A6
MPB
SLD
A7
MnR
lfp
Pr5
Mo5
SupO
py
AP β - 10
A6
CGPn
sp5
PnC
MnR
A5
Tz
LVe
sp5
Sol
Pr
C3
DPGi
Gi
7N
A1/C1
GiV
py
AP β - 11.8
MVe
Sp5I
PCRt
mlf
RMg
sp5
Sol
12N
Amb
Md
IO
AP β - 13.6
A2/C2
Sp5I
mlf
A1/C1
py

Figure 4. Localization of noradrenergic and adrenergic neurons expressing c-FOS after muscimol application in the DPGi.

Rats were sacrificed 3 h after NaCl (left panel) or muscimol (right panel) injection in the DPGi. TH singly labeled neurons (grey dots) and TH/c-FOS double labeled neurons (red dots) were then mapped on 11 coronal hemi sections. Only some of the levels counted for this study are represented. The anteroposterior location is indicated in the bottom left corner of each level (in mm from bregma).

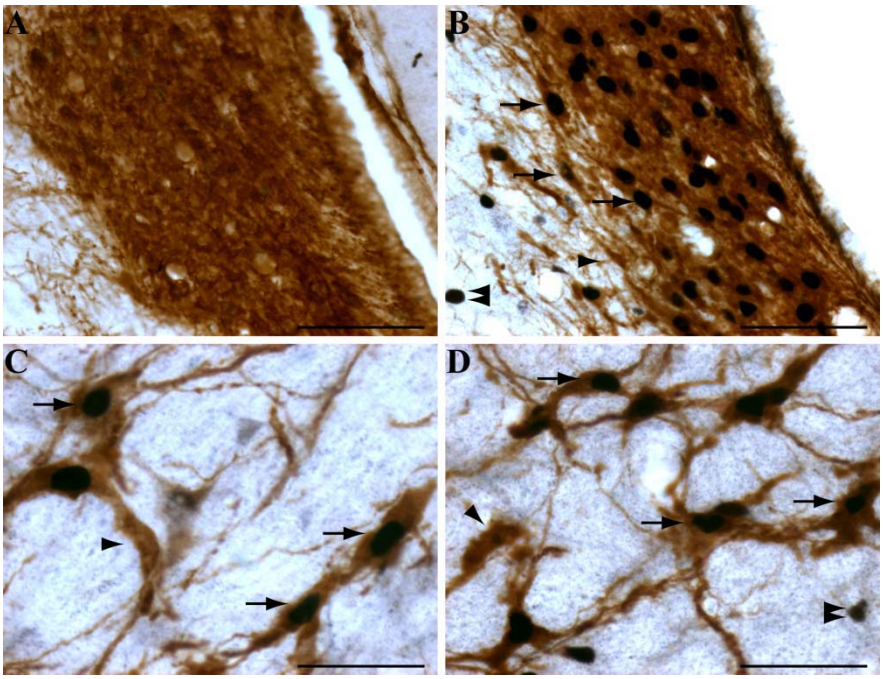


Figure 5. Noradrenergic and adrenergic neurons strongly express c-FOS after muscimol inhibition of the DPGi.

Combined immunohistochemistry of TH (brown cytoplasmic staining) and c-FOS (black nuclear staining) in A6 after NaCl treatment (**A**), and in A6 (**B**), A5 (**C**) and A1/C1 (**D**) after muscimol treatment. Black arrows indicate double labeled neurons whereas black arrowheads and double arrowheads indicate TH singly and c-FOS singly labeled neurons respectively. Scale bars, 100 µm for **A**, **B** and 50 µm for **C**, **D.**

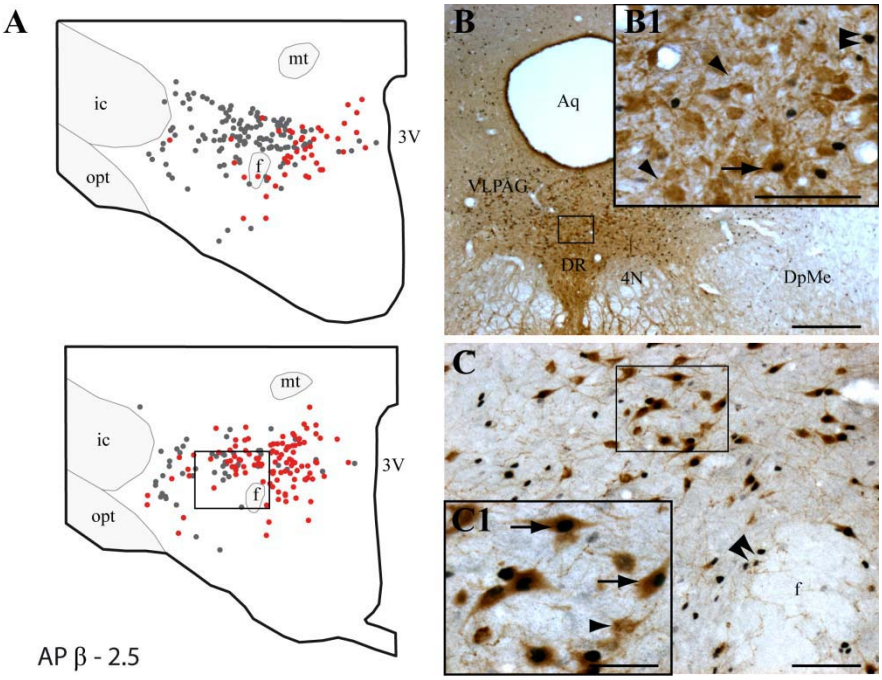


Figure 6. Hypocretinergic and serotoninergic neurons are respectively relatively and no activated by muscimol inhibition of the DPGi

A, Mapping of hypocretinergic neurons expressing c-FOS (red dots) or not (grey dots) 3 h after application of either NaCl (top) or muscimol (bottom) in the DPGi. Rostrocaudal localization is indicated in the bottom left corner (in mm from bregma). The black rectangle indicates the area illustrated by the picture in **C**. **B**, Double staining for 5-HT (brown cytoplasmic staining) and c-FOS (black nuclear staining) at the level of the dorsal raphe nucleus (DRN). Black rectangle is enlarged in **B1**. **C**, Double staining for HCRT (brown cytoplasmic staining) and c-FOS (black nuclear staining) in the lateral hypothalamus (LH). Black rectangle is enlarged in **C1**. Black arrows indicate double labeled neurons. Black arrowheads indicate 5-HT (or HCRT) singly labeled neurons and double arrowheads indicate c-FOS singly labeled neurons. Scale bars, 400 µm for **B** 100 µm for **C**, **B1** and 50 µm for **C1.**

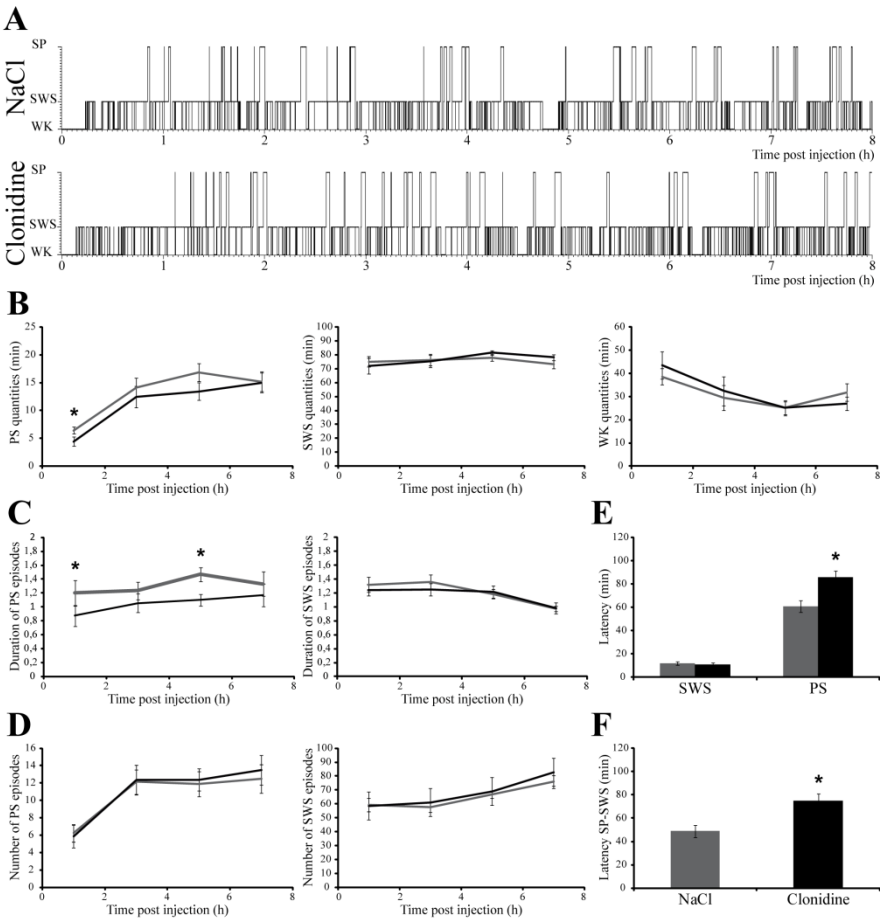


Figure 7. Clonidine injection in the DPGi specifically suppresses PS.

A, Hypnograms representing the sleep-wake cycle following control (NaCl) or muscimol injections in the DPGi for one representative animal. **B-F**, Group data illustrating the effects of clonidine (in black) or NaCl (in grey) applications in the DPGi on: PS, SWS and WK quantities (**B**), number of PS and SWS episodes (**C**), duration of PS and SWS episodes (**D**). PS and SWS latency are represented in **E** and the duration between the first SWS episode and the first PS episode is given in **F** (n=8 in each group). Values are mean ± sem, * indicates $p < 0.05$ compared to NaCl values.

REFERENCES

Aston-Jones, G. and Bloom, F.E. (1981a) Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep-waking cycle. *J Neurosci*, **1**, 876-886.

Aston-Jones, G. and Bloom, F.E. (1981b) Norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats exhibit pronounced responses to non-noxious environmental stimuli. *J Neurosci*, **1**, 887-900.

Berridge, C.W. and Foote, S.L. (1991) Effects of locus coeruleus activation on electroencephalographic activity in neocortex and hippocampus. *J Neurosci*, **11**, 3135-3145.

Berridge, C.W., Page, M.E., Valentino, R.J. and Foote, S.L. (1993) Effects of locus coeruleus inactivation on electroencephalographic activity in neocortex and hippocampus. *Neuroscience*, **55**, 381-393.

Boissard, R., Gervasoni, D., Schmidt, M.H., Barbagli, B., Fort, P. and Luppi, P.H. (2002) The rat ponto-medullary network responsible for paradoxical sleep onset and maintenance: a combined microinjection and functional neuroanatomical study. *Eur J Neurosci*, **16**, 1959-1973.

Carter, M.E., Yizhar, O., Chikahisa, S., Nguyen, H., Adamantidis, A., Nishino, S., Deisseroth, K. and de Lecea, L. (2010) Tuning arousal with optogenetic modulation of locus coeruleus neurons. *Nat Neurosci*, **13**, 1526-1533.

Clément, O., Sapin, E., Berod, A., Fort, P. and Luppi, P.H. (2011) Evidence that neurons of the sublaterodorsal tegmental nucleus triggering paradoxical (REM) sleep are glutamatergic. *Sleep*, **34**, 419-423.

Cohen, R.M., Pickar, D., Garnett, D., Lipper, S., Gillin, J.C. and Murphy, D.L. (1982) REM sleep suppression induced by selective monoamine oxidase inhibitors. *Psychopharmacology (Berl)*, **78**, 137-140.

Dahlstrom, A. and Fuxe, K. (1964) Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia*, **20**, 398-399.

Deurveilher, S., Lo, H., Murphy, J.A., Burns, J. and Semba, K. (2006) Differential c-Fos immunoreactivity in arousal-promoting cell groups following systemic administration of caffeine in rats. *J Comp Neurol*, **498**, 667-689.

Ennis, M. and Aston-Jones, G. (1989) GABA-mediated inhibition of locus coeruleus from the dorsomedial rostral medulla. *J Neurosci*, **9**, 2973-2981.

Erickson, J.T. and Millhorn, D.E. (1994) Hypoxia and electrical stimulation of the carotid sinus nerve induce Fos-like immunoreactivity within catecholaminergic and serotoninergic neurons of the rat brainstem. *J Comp Neurol*, **348**, 161-182.

Estabrooke, I.V., McCarthy, M.T., Ko, E., Chou, T.C., Chemelli, R.M., Yanagisawa, M., Saper, C.B. and Scammell, T.E. (2001) Fos expression in orexin neurons varies with behavioral state. *J Neurosci*, **21**, 1656-1662.

Fenik, V., Marchenko, V., Janssen, P., Davies, R.O. and Kubin, L. (2002) A5 cells are silenced when REM sleep-like signs are elicited by pontine carbachol. *J Appl Physiol*, **93**, 1448-1456.

Fort, P., Bassetti, C.L. and Luppi, P.H. (2009) Alternating vigilance states: new insights regarding neuronal networks and mechanisms. *Eur J Neurosci*, **29**, 1741-1753.

Gervasoni, D., Darracq, L., Fort, P., Souliere, F., Chouvet, G. and Luppi, P.H. (1998) Electrophysiological evidence that noradrenergic neurons of the rat locus coeruleus are tonically inhibited by GABA during sleep. *Eur J Neurosci*, **10**, 964-970.

Gervasoni, D., Peyron, C., Rampon, C., Barbagli, B., Chouvet, G., Urbain, N., Fort, P. and Luppi, P.H. (2000) Role and origin of the GABAergic innervation of dorsal raphe serotonergic neurons. *J Neurosci*, **20**, 4217-4225.

Gervasoni, D., Panconi, E., Henninot, V., Boissard, R., Barbagli, B., Fort, P. and Luppi, P.H. (2002) Effect of chronic treatment with milnacipran on sleep architecture in rats compared with paroxetine and imipramine. *Pharmacol Biochem Behav*, **73**, 557-563.

Gervasoni, D., Lin, S.C., Ribeiro, S., Soares, E.S., Pantoja, J. and Nicolelis, M.A. (2004) Global forebrain dynamics predict rat behavioral states and their transitions. *J Neurosci*, **24**, 11137-11147.

Glavin, G.B. (1985) Stress and brain noradrenaline: a review. *Neurosci Biobehav Rev*, **9**, 233-243.

Goutagny, R., Luppi, P.H., Salvert, D., Lapray, D., Gervasoni, D. and Fort, P. (2008) Role of the dorsal paragigantocellular reticular nucleus in paradoxical (rapid eye movement) sleep generation: a combined electrophysiological and anatomical study in the rat. *Neuroscience*, **152**, 849-857.

Han, F., Zhang, Y.F. and Li, Y.Q. (2003) Fos expression in tyrosine hydroxylase-containing neurons in rat brainstem after visceral noxious stimulation: an immunohistochemical study. *World J Gastroenterol*, **9**, 1045-1050.

Haxhiu, M.A., Yung, K., Erokwu, B. and Cherniack, N.S. (1996) CO2-induced c-fos expression in the CNS catecholaminergic neurons. *Respir Physiol*, **105**, 35-45.

Jones, B.E. (2005) From waking to sleeping: neuronal and chemical substrates. *Trends Pharmacol Sci*, **26**, 578-586.

Kalia, M., Fuxe, K. and Goldstein, M. (1985) Rat medulla oblongata. III. Adrenergic (C1 and C2) neurons, nerve fibers and presumptive terminal processes. *J Comp Neurol*, **233**, 333-349.

Kaur, S., Saxena, R.N. and Mallick, B.N. (2001) GABAergic neurons in prepositus hypoglossi regulate REM sleep by its action on locus coeruleus in freely moving rats. *Synapse*, **42**, 141-150.

Kovacs, K.J. (2008) Measurement of immediate-early gene activation- c-fos and beyond. *J Neuroendocrinol*, **20**, 665-672.

Lee, H.S., Kim, M.A. and Waterhouse, B.D. (2005) Retrograde double-labeling study of common afferent projections to the dorsal raphe and the nuclear core of the locus coeruleus in the rat. *J Comp Neurol*, **481**, 179-193.

Leger, L., Charnay, Y., Burlet, S., Gay, N., Schaad, N., Bouras, C. and Cespuglio, R. (1998) Comparative distribution of nitric oxide synthase- and serotonin-containing neurons in the raphe nuclei of four mammalian species. *Histochem Cell Biol*, **110**, 517-525.

Leger, L., Goutagny, R., Sapin, E., Salvert, D., Fort, P. and Luppi, P.H. (2009) Noradrenergic neurons expressing Fos during waking and paradoxical sleep deprivation in the rat. *J Chem Neuroanat*, **37**, 149-157.

Leppavuori, A. (1980) The effects of an alpha-adrenergic agonist or antagonist on sleep during blockade of catecholamine synthesis in the cat. *Brain Res*, **193**, 117-128.

Lu, J., Jhou, T.C. and Saper, C.B. (2006) Identification of wake-active dopaminergic neurons in the ventral periaqueductal gray matter. *J Neurosci*, **26**, 193-202.

Luppi, P.H., Aston-Jones, G., Akaoka, H., Chouvet, G. and Jouvet, M. (1995) Afferent projections to the rat locus coeruleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing with cholera-toxin B subunit and Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *Neuroscience*, **65**, 119-160.

Luppi, P.H., Clément, O., Sapin, E., Gervasoni, D., Peyron, C., Leger, L., Salvert, D. and Fort, P. (2011) The neuronal network responsible for paradoxical sleep and its dysfunctions causing narcolepsy and rapid eye movement (REM) behavior disorder. *Sleep Med Rev*, **15**, 153-163.

Maloney, K.J., Mainville, L. and Jones, B.E. (1999) Differential c-Fos expression in cholinergic, monoaminergic, and GABAergic cell groups of the pontomesencephalic tegmentum after paradoxical sleep deprivation and recovery. *J Neurosci*, **19**, 3057-3072.

Maloney, K.J., Mainville, L. and Jones, B.E. (2000) c-Fos expression in GABAergic, serotonergic, and other neurons of the pontomedullary reticular formation and raphe after paradoxical sleep deprivation and recovery. *J Neurosci*, **20**, 4669-4679.

Maloney, K.J., Mainville, L. and Jones, B.E. (2002) c-Fos expression in dopaminergic and GABAergic neurons of the ventral mesencephalic tegmentum after paradoxical sleep deprivation and recovery. *Eur J Neurosci*, **15**, 774-778.

Morgan, J.I. and Curran, T. (1986) Role of ion flux in the control of c-fos expression. *Nature*, **322**, 552-555.

Murphy, J.A., Deurveilher, S. and Semba, K. (2003) Stimulant doses of caffeine induce c-FOS activation in orexin/hypocretin-containing neurons in rat. *Neuroscience*, **121**, 269-275.

Nitz, D. and Siegel, J.M. (1997) GABA release in the locus coeruleus as a function of sleep/wake state. *Neuroscience*, **78**, 795-801.

Ohtake, T. (1992) Ascending projections from the gigantocellular reticular and dorsal paragigantocellular nuclei of the medulla oblongata in the rat: an anterograde PHA-L tracing study. *Neurosci Res*, **14**, 96-116.

Ross, R.J., Gresch, P.J., Ball, W.A., Sanford, L.D. and Morrison, A.R. (1995) REM sleep inhibition by desipramine: evidence for an alpha-1 adrenergic mechanism. *Brain Res*, **701**, 129-134.

Saper, C.B., Fuller, P.M., Pedersen, N.P., Lu, J. and Scammell, T.E. (2010) Sleep state switching. *Neuron*, **68**, 1023-1042.

Sapin, E., Lapray, D., Berod, A., Goutagny, R., Leger, L., Ravassard, P., Clément, O., Hanriot, L., Fort, P. and Luppi, P.H. (2009) Localization of the brainstem GABAergic neurons controlling paradoxical (REM) sleep. *PLoS One*, **4**, e4272.

Sapin, E., Berod, A., Leger, L., Herman, P.A., Luppi, P.H. and Peyron, C. (2010) A very large number of GABAergic neurons are activated in the tuberal hypothalamus during paradoxical (REM) sleep hypersomnia. *PLoS One*, **5**, e11766.

Sherin, J.E., Shiromani, P.J., McCarley, R.W. and Saper, C.B. (1996) Activation of ventrolateral preoptic neurons during sleep. *Science*, **271**, 216-219.

Swanson, L.W. and Hartman, B.K. (1975) The central adrenergic system. An immunofluorescence study of the location of cell bodies and their efferent connections in the rat utilizing dopamine-beta-hydroxylase as a marker. *J Comp Neurol*, **163**, 467-505.

Szymusiak, R., Alam, N., Steininger, T.L. and McGinty, D. (1998) Sleep-waking discharge patterns of ventrolateral preoptic/anterior hypothalamic neurons in rats. *Brain Res*, **803**, 178-188.

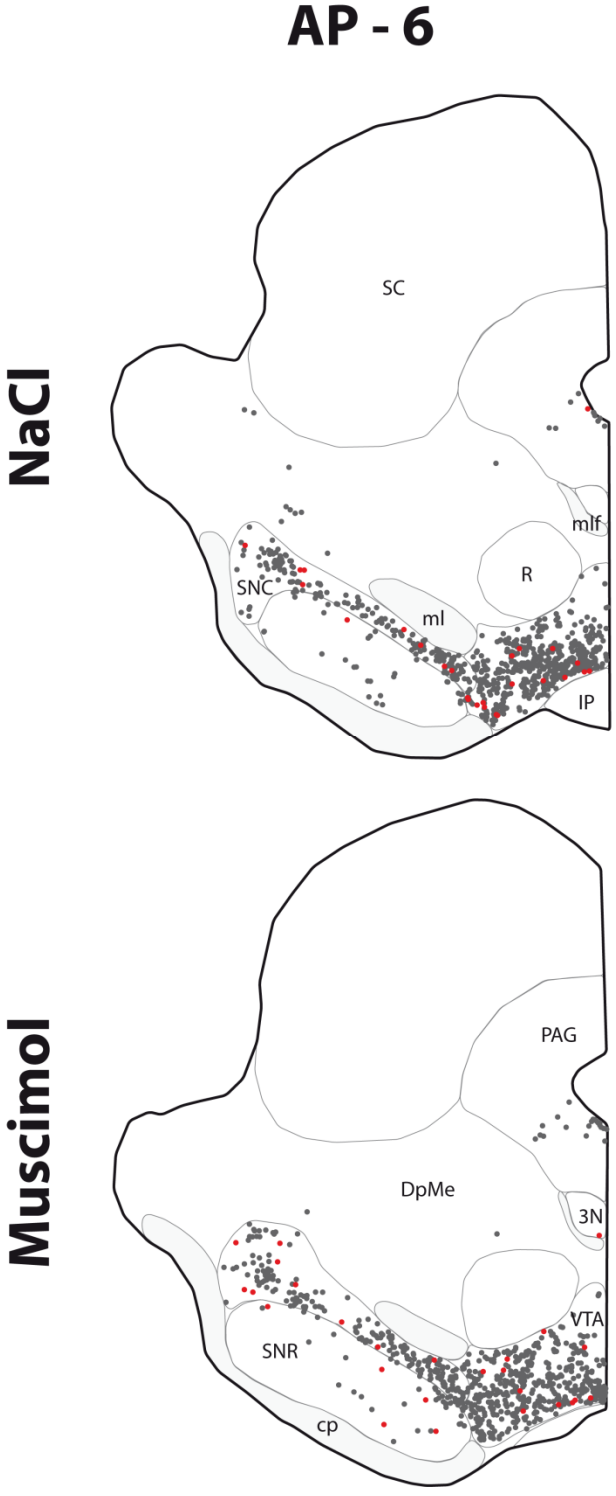
Takahashi, K., Lin, J.S. and Sakai, K. (2009) Characterization and mapping of sleep-waking specific neurons in the basal forebrain and preoptic hypothalamus in mice. *Neuroscience*, **161**, 269-292.

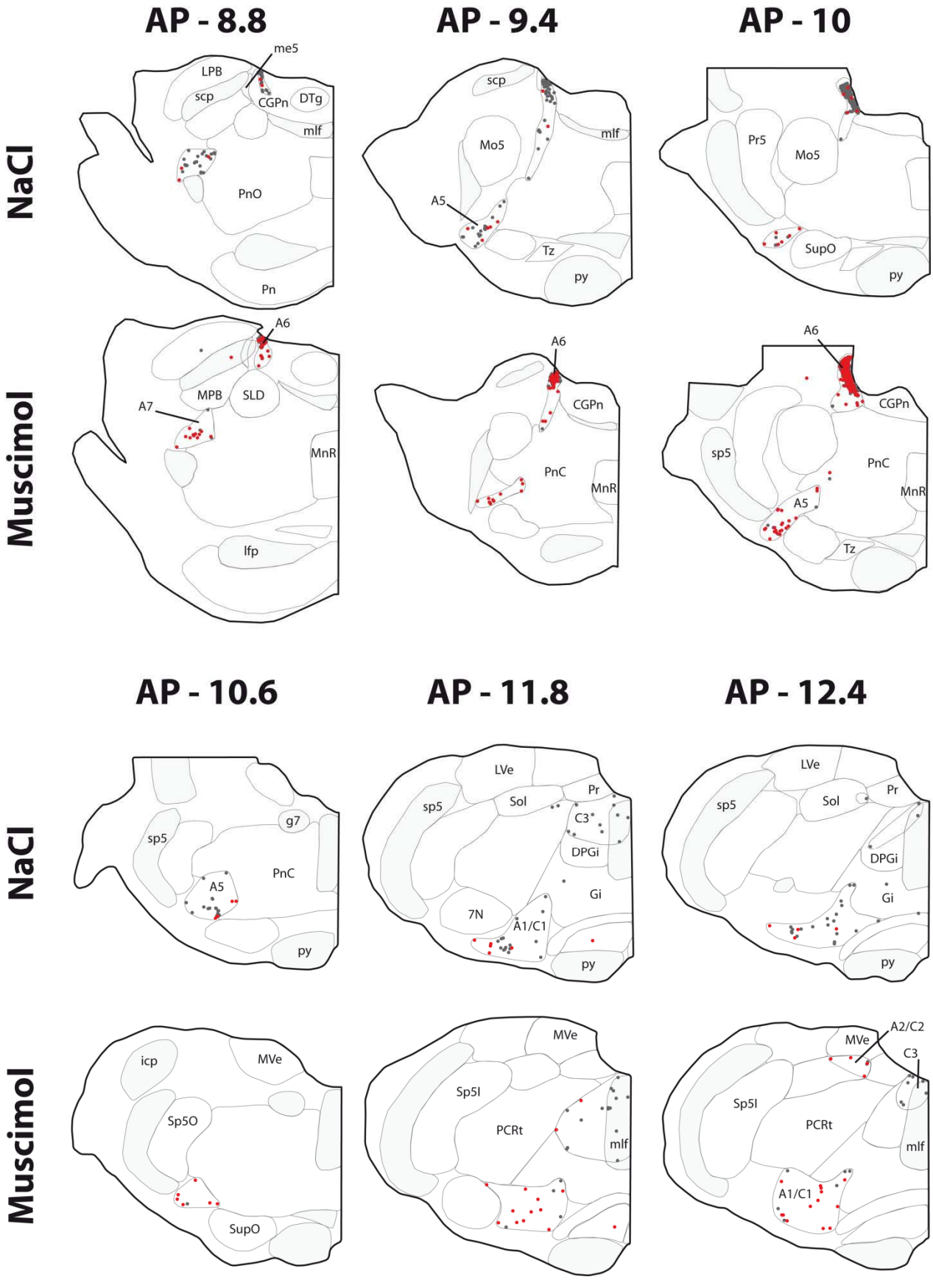
Verret, L., Goutagny, R., Fort, P., Cagnon, L., Salvert, D., Leger, L., Boissard, R., Salin, P., Peyron, C. and Luppi, P.H. (2003) A role of melanin-concentrating hormone producing neurons in the central regulation of paradoxical sleep. *BMC Neurosci*, **4**, 19.

Verret, L., Leger, L., Fort, P. and Luppi, P.H. (2005) Cholinergic and noncholinergic brainstem neurons expressing Fos after paradoxical (REM) sleep deprivation and recovery. *Eur J Neurosci*, **21**, 2488-2504.

Verret, L., Fort, P., Gervasoni, D., Leger, L. and Luppi, P.H. (2006) Localization of the neurons active during paradoxical (REM) sleep and projecting to the locus coeruleus noradrenergic neurons in the rat. *J Comp Neurol*, **495**, 573-586.

Wong, D.L. and Tank, A.W. (2007) Stress-induced catecholaminergic function: transcriptional and post-transcriptional control. *Stress*, **10**, 121-130.


AP - 6
NaCl
SC
mlf
R
SNC
ml
IP
Muscimol
PAG
DpMe
3N
VTA
SNR
cp


AP - 8.8
AP - 9.4
AP - 10
NaCl
Muscimol
me5
LPB
scp
CGPn
DTg
mlf
PnO
Pn
Mo5
A5
Tz
py
Pr5
SupO
A6
MPB
SLD
A7
MnR
lfp
CGPn
PnC
sp5
AP - 10.6
AP - 11.8
AP - 12.4
g7
LVe
Sol
Pr
C3
DPGi
Gi
7N
A1/C1
icp
MVe
Sp5O
SupO
Sp5I
PCRt
A2/C2
C3

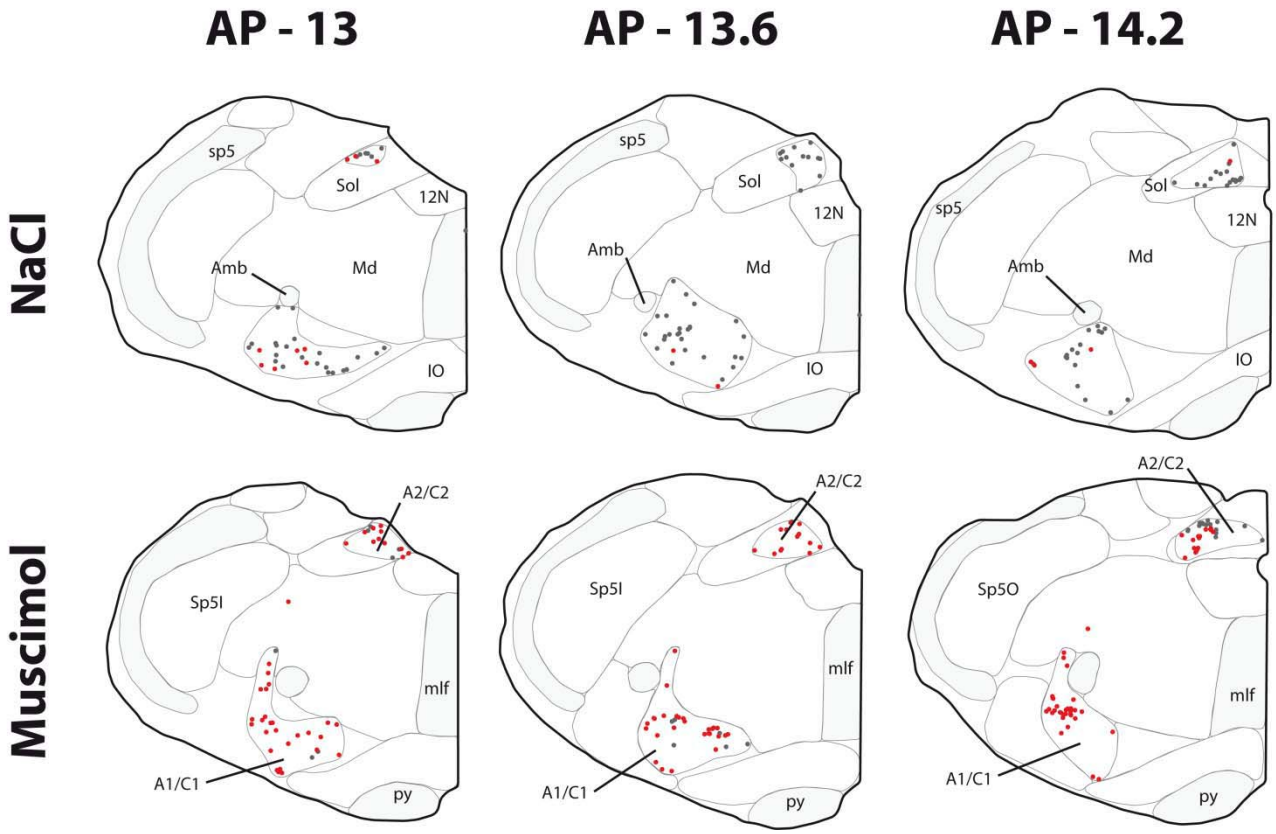


Figure supplémentaire 1: Localisation des neurones TH+ et TH/c-FOS+ après application de NaCl ou de muscimol dans le DPGi

Un animal représentatif de chaque condition a été représenté. Les points gris correspondent aux neurones c-FOS+ et les rouges aux neurones TH/c-FOS+. La localisation rostrocaudale de chaque section (en mm par rapport au bregma) est indiquée en haut de chaque niveau.

Abréviations : 3N, noyau occulomoteur ; 7N, noyau du nerf facial ; A1, groupe noradrénergique A1 ; A2 groupe noradrénergique A2 ; A5 groupe noradrénergique A5 ; A6 groupe noradrénergique A6 ; A7 groupe noradrénergique A7 ; C1 groupe adrénergique C1 ; C2 groupe adrénergique C2 ; C3 groupe adrénergique C3 ; CGPn, substance grise pontique ; DPGi, noyau réticulé paragigantocellulaire dorsal ; DpMe, noyau réticulé mésencéphalique profond ; DTg, noyau tegmental dorsal ; g7, genoux du nerf facial ; Gi, noyau gigantocellulaire ; LPB, noyau parabrachial latéral ; mlf, faisceau longitudinal médian ; MnR, noyau du raphé médian ; MPB, noyau parabrachial médian ; PAG, substance grise périaqueducale ;PCRt, noyau réticulé parvocellulaire ; Pn, noyau pontique ; PnC, noyau pontique, partie caudale ; PnO, noyau pontique, partie rostrale ; Pr, noyau prépositus ; py, pyramidal tract ; SC, colliculus supérieue ; scp, pédoncule cérébelleux supérieur ; SLD, noyau sublatérodorsal ; SNC, substance noir, zone compacte ; SNR, substance noir, zone réticulée ; Sol, noyau du faisceau solitaire ; sp5, faisceau trigéminal spinal ; VTA, aire tegmentale ventrale.

DISCUSSION GENERALE

Résumé des principaux résultats obtenus

L'objectif général de cette thèse consistait à mieux caractériser certaines populations clefs impliquées dans la régulation du sommeil paradoxal, tant du point de vu de leur nature neurochimique que de leurs interconnections fonctionnelles. Pour cela, nous avons combiné plusieurs approches complémentaires : neuroanatomie fonctionnelle, polysomnographie et pharmacologie. Les principaux résultats obtenus sont récapitulés ci-dessous.

Nous avons tout d'abord démontré, pour la première fois, la nature glutamatergique des neurones SP-on du SLD connus pour êtres responsables de la mise en place de l'atonie musculaire et de l'activation corticale lors du SP. Ce résultat tend à clore de manière définitive la question de la nature neurochimique de ces neurones qui restait en suspend depuis près de 50 ans.

Si l'implication de ces neurones dans la mise en place de l'atonie musculaire lors du SP fait consensus, deux théories s'affrontent quand aux mécanismes par lesquels ils induisent l'hyperpolarisation des motoneurones. Notre étude préliminaire concernant la localisation des neurones glycinergiques activés lors d'une hypersomnie de SP, et donc susceptibles d'intervenir dans l'inhibition des motoneurones spinaux au cours de cet état, tend à soutenir l'hypothèse classique selon laquelle l'atonie musculaire est générée par l'activation de neurones glycinergiques bulbaires, et non spinaux comme proposé à plusieurs reprises.

Nous nous sommes également particulièrement intéressés aux mécanismes ayant lieu en amont du SLD et qui permettent sa régulation (et donc la mise en place du SP). Pour cela, nous avons étudié le contrôle des neurones GABAergiques SP-off de la VLPAG/dDpMe. Nous avons montré que cette région reçoit des afférences de nombreuses structures cérébrales mais que seules la LH, la ZI et la PAG contiennent un nombre significatif de neurones afférents spécifiquement actifs durant une privation et/ou une hypersomnie de SP. Parmi ces régions, nous nous sommes ensuite focalisés sur la LH qui représente l'afférence majeure activée lors du SP. Nous avons alors mis en évidence que la moitié de ces afférences activées en SP est composée de neurones à MCH. Nous avons également démontré que l'inactivation de la LH induit un état de type-SL avec une disparition prolongée des phases de SP. En outre, cette inhibition de la LH induit l'activation des neurones GABAergiques de la VLPAG/dDpMe projetant sur le SLD.

Enfin, de part sa projection sur la VLPAG/dDpMe, certes relativement faible comparé à la LH ou la PAG mais très homogène, et de part sa précédente implication dans la régulation du SP nous nous sommes également intéressés à l'implication du DPGi dans la régulation du cycle veille-sommeil. Nous avons ainsi mis en évidence que son inhibition par application de muscimol induit une longue et robuste phase d'éveil attentif avec une inhibition du SP qui perdure même lors du retour du SL. De plus, l'inhibition du DPGi provoque l'activation de l'ensemble des systèmes noradrénergiques et adrénergiques de l'encéphale. Nous avons donc mis en évidence l'existence d'un mécanisme permettant l'inhibition simultanée de l'ensemble des neurones noradrénergiques et adrénergiques au cours du SP.

Considérations méthodologiques

Dans chacun de ces travaux, la détection des populations neuronales activées lors de nos protocoles expérimentaux était indispensable. Or, une telle analyse peut être réalisée soit à l'aide de techniques d'électrophysiologie, soit grâce à la détection de marqueurs moléculaires d'activation neuronale. Cette deuxième solution nous a semblé plus pertinente pour cette étude car elle permet d'établir une cartographie précise, avec une résolution cellulaire, des neurones activés suite à un comportement ou un stimulus donné. De plus, cette technique est non invasive et autorise l'observation fine de cette activation dans l'ensemble de l'encéphale. En outre, elle peut être couplée à la détection d'autres marqueurs (traçage de voies et détermination de la nature neurochimique des cellules notamment).

Nous avons choisi d'utiliser comme marqueur d'activation neuronale le proto-oncogène c-FOS. Bien que son niveau d'expression ne soit pas strictement corrélé au taux de décharge des neurones (Morgan and Curran, 1986), le c-FOS possède de nombreux atouts. C'est est un gène d'activation précoce dont le niveau d'expression basal relativement faible en fait un marqueur très discriminant, et sa courte demi-vie de seulement 40 min permet une analyse fine de sa dynamique temporelle d'activation (Stancovski *et al.*, 1995; Ito *et al.*, 2005; Kovacs, 2008). De nombreuses études électrophysiologiques ont par ailleurs confirmé les résultats obtenus avec le c-FOS puisque des neurones SP-on ont été retrouvés dans le SLD (Luppi et al., 2004), le DPGi (Goutagny et al., 2008), la LH (Hassani *et al.*, 2009; Hassani *et al.*, 2010) et le GiV (Sakai et al., 1979; Siegel et al., 1979), régions connues pour contenir de nombreux neurones c-FOS+ lors d'une hypersomnie de SP. Il en est de même pour les régions SL-on et Ev-on avec les neurones du VLPO et les neurones à HCRT respectivement (Szymusiak *et al.*, 1998; Suntsova *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2005c; Mileykovskiy *et al.*, 2005). Enfin, ce marqueur a été utilisé par de nombreux groupes à travers le monde pour la compréhension des réseaux neuronaux du cycle veille-sommeil (Sherin *et al.*, 1996; Maloney *et al.*, 1999; Morales *et al.*, 1999; Maloney *et al.*, 2000; Boissard *et al.*, 2002; Maloney *et al.*, 2002; Verret *et al.*, 2003; Ito *et al.*, 2005; Verret *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2006b; Morales *et al.*, 2006; Verret *et al.*, 2006; Leger *et al.*, 2009; Sapin *et al.*, 2009; Sapin *et al.*, 2010). Cependant, nous ne pouvons pas exclure que certains neurones puissent être actifs sans pour autant exprimer c-FOS. A ce propos, j'ai mentionné des travaux récents du laboratoire montrant que les neurones du SLD projetant au noyau intralaminaire du thalamus ne sont pas c-FOS+ lors d'une hypersomnie de SP (Valencia-Garcia, communication personnelle) alors que ces mêmes neurones avaient été montrés comme SP-on par des techniques d'électrophysiologie (Sakai et al., 1979).

Une autre critique possible est l'utilisation de la technique de privation sélective du SP par la méthode de la piscine qui pourrait être source de stress pour les animaux. En effet, au cours d'un autre travail réalisé au cours de ma thèse, mais non présenté dans ce manuscrit, nous avons pu mettre en évidence qu'une exposition brève de 30 min à ces conditions de privation induit bien un état de stress chez l'animal, avec notamment une augmentation forte et significative des concentrations plasmatiques de corticostérone (Clément et al., 2010). Toutefois, après 3 jours de privation, les niveaux de corticostérones reviennent à un niveau basal (Ravassard *et al.*, 2009; Clément *et al.*, 2010; Renouard *et al.*, 2010). On peut donc penser qu'un tel environnement est source de stress pour les animaux en début de protocole mais qu'ils s'y habituent ensuite rapidement. On ne peut cependant pas exclure la présence d'un stress chronique tout au long de cette expérience, et donc l'activation de certains neurones liés à cet état dans la condition PSD. Malgré cet inconvénient, cette méthode de privation est la seule permettant de visualiser les circuits neuronaux impliqués dans l'inhibition du SP puisque dans ce paradigme expérimental, c'est le rat lui-même qui inhibe la mise en place du SP pour empêcher sa chute dans l'eau. En ce qui concerne le groupe comportemental réalisant une hypersomnie de SP suite à une telle privation, les animaux sont sacrifiés le

plus tardivement possible par rapport à la fin de la privation afin de limiter au maximum tout marquage potentiellement dû à la privation.

Enfin, il est nécessaire d'être conscient des limites inhérentes à l'utilisation de la pharmacologie. Outre l'aspect invasif de la méthode, il n'est pas aisé de connaitre avec précision la taille de l'aire cérébrale affectée par la substance injectée. En effet, celle-ci dépend de nombreux paramètres comme le volume injecté, l'organisation histologique de la région visée, mais également la nature de la substance pharmacologique et son affinité pour son récepteur. De plus, la spécificité des molécules appliquées est également à prendre en compte, notamment en ce qui concerne des aires comme la LH qui sont composées de nombreux types cellulaires différents.
Cependant, certaines observations nous permettent tout de même d'estimer l'étendue du site d'injection et nous laissent penser que les neurones affectés par nos injections sont globalement restreints aux structures visées. En particulier, l'analyse des neurones HCRT/c-FOS+ après injection de muscimol dans la LH montre que l'effet du muscimol est plutôt circonscrit à la LH puisque les neurones à HCRT localisés plus médialement ne semblent pas être inhibés (ils sont c-FOS+). De même, l'analyse des neurones TH/c-FOS+ semble indiquer que les injections ont été plutôt restreintes au DPGi.
La spécificité d'action des molécules utilisées représente, il est vrai, un aspect hautement perfectible de nos travaux. En effet, nous avons choisi d'utiliser le muscimol, agoniste $GABA_A$, pour l'inhibition des régions d'intérêt. Tous les neurones de la zone cible sont donc hyperpolarisés, sans distinction de leur nature neurochimique ou de leur appartenance au réseau auquel nous nous intéressons ici. Si le DPGi peut paraitre relativement homogène, la LH est une région extrêmement hétérogène de part la nature et la fonction de ses neurones. L'inhibition simultanée de populations aux fonctions opposées (MCH et HCRT notamment) induit donc un état intermédiaire entre deux états de vigilance rendant difficile la compréhension des mécanismes à l'œuvre au sein de telles structures. Toutefois, l'étude des populations neuronales exprimant le c-FOS suite à ces injections fournit de précieuses informations permettant d'expliquer les effets observés. De plus, l'utilisation supplémentaire de la clonidine (agoniste des récepteurs adrénergiques α2) nous a permis d'étudier l'effet d'une inhibition plus ciblée et de conforter nos conclusions issues des injections de muscimol.

Interprétation fonctionnelle

L'ensemble des résultats que nous avons pu obtenir durant cette thèse s'articulent autour de deux grands axes. Le premier s'attache aux mécanismes responsables de la mise en place du SP, et de l'atonie musculaire en particulier. Le second vise à mieux comprendre le contrôle et la régulation de cet état. Nous aborderons donc ces deux points de manière successive.

SLD et GiV : deux structures exécutrices du sommeil paradoxal

Les neurones glutamatergiques du SLD

Aujourd'hui, il est acquis que le SLD joue un rôle capital dans la mise en place du SP puisque sa lésion, ou son activation, provoquent respectivement la disparition (Jouvet, 1965; Sastre et al., 1981; Webster and Jones, 1988) et l'induction de cet état (Onoe and Sakai, 1995; Boissard *et al.*, 2002). Nous avons démontré que près de 90 % des neurones du SLD c-FOS+ lors d'une hypersomnie de SP sont de nature glutamatergique. Nous sommes assez confiants sur le fait que ces neurones c-FOS+ représentent les neurones spécifiquement actifs lors du SP (SP-on). Comme nous l'avons déjà rappelé, de nombreux neurones de type SP-on sont enregistrés au niveau du SLD (Sakai *et al.*, 1979; Sakai and Koyama, 1996; Sakai *et al.*, 2001; Boissard *et al.*, 2002) et de nombreux travaux ont déjà suggéré une corrélation entre le caractère SP-on et l'expression de c-FOS lors d'une hypersomnie de SP. Cette nature glutamatergique des neurones SP-on du SLD (**Figure 1**) est en accord avec de nombreuses études ayant déjà rapporté que ces neurones n'étaient ni GABAergiques ni cholinergiques (Verret *et al.*, 2005; Sapin *et al.*, 2009). Ces résultats s'intègrent également parfaitement : (i) aux données montrant que la libération de glutamate augmente durant le SP dans le GiV (Kodama et al., 1998) qui reçoit des afférences en provenance du SLD (Boissard et al., 2002), (ii) et au fait que l'application d'antagonistes glutamatergiques dans le GiV bloque l'atonie musculaire normalement observée après injection de carbachol au sein du SLD (Lai and Siegel, 1988).

Le GiV/GiA, seul relai du SLD pour la mise en place de l'atonie lors du SP

Il est également bien établi que de nombreux neurones glycinergiques du GiV/GiA expriment le c-FOS lors de l'activation du SLD (Morales *et al.*, 1999; Boissard *et al.*, 2002) et projettent de manière monosynaptique sur les motoneurones spinaux (Holstege and Bongers, 1991). Leur activation provoque la diminution du tonus musculaire (Lai and Siegel, 1991) alors que leur lésion induit des phases de SP sans atonie musculaire (Holmes and Jones, 1994).

Il apparait donc clairement que les neurones glutamatergiques SP-on du SLD sont responsables de l'activation des neurones glycinergiques du GiV/GiA qui induisent à leur tour l'hyperpolarisation des motoneurones (**Figure 1**). En effet, l'hypothèse d'une activation directe par le SLD de prémotoneurones glycinergiques localisés dans la moelle épinière elle-même n'est pas soutenue par nos résultats. Bien que préliminaires, ceux-ci tendent à démontrer que peu de neurones glycinergiques c-FOS+ sont observés au sein de la moelle épinière lors d'une hypersomnie de SP fragilisant ainsi cette hypothèse. Même dans l'éventualité où le c-FOS ne permettrait pas un marquage total des neurones activés durant le SP, une telle hypothèse se heurte à deux autres arguments.

Tout d'abord, les neurones SP-on du SLD sont excités antidromiquement par une stimulation électrique du GiV/GiA mais pas de la moelle épinière. Cette dernière reçoit par contre des projections de neurones du SLD dont l'activité unitaire n'est pas corrélée au SP (Sakai et al., 1981). Ces résultats démontrent ainsi que les neurones SP-on du SLD projettent bien sur le GiV/GiA mais pas sur les motoneurones spinaux. Cette conclusion est supportée par nos observations montrant que les neurones glutamatergiques SP-on du SLD sont plutôt de petite taille, ce qui tend à diminuer la probabilité de projections à longue distance (Clément et al., 2011).
De plus, une lésion du GiV/GiA laissant les fibres de passage intactes rétablit le tonus musculaire lors du SP (Holmes and Jones, 1994), et l'atonie normalement induite par l'injection de carbachol dans le SLD est supprimée par l'application d'antagoniste glutamatergique au niveau du GiV (Lai and Siegel, 1988). Tous ces arguments sont donc en défaveur d'un rôle direct du SLD sur la moelle épinière puisque dans un tel cas, l'atonie observée durant le SP ne devrait pas être tributaire de l'intégrité du GiV/GiA.

Si le GiV/GiA apparait comme « LA » structure relai du SLD pour l'hyperpolarisation des motoneurones spinaux, certaines études suggèrent qu'il pourrait en être autrement pour les motoneurones crâniens. Notamment, une étude récente du laboratoire montre que le noyau paragigantocellulaire latéral (LPGi), sur lequel se projette de nombreux neurones SP-on du SLD, contient des neurones SP-on qui projettent sur le noyau moteur du nerf facial (Siriex, 2011). Or nous avons montré que 61 % des neurones SP-on du LPGi sont glycinergiques. Par conséquent, la contribution de ce noyau à l'hyperpolarisation des motoneurones crâniens reste à déterminer de manière plus précise.

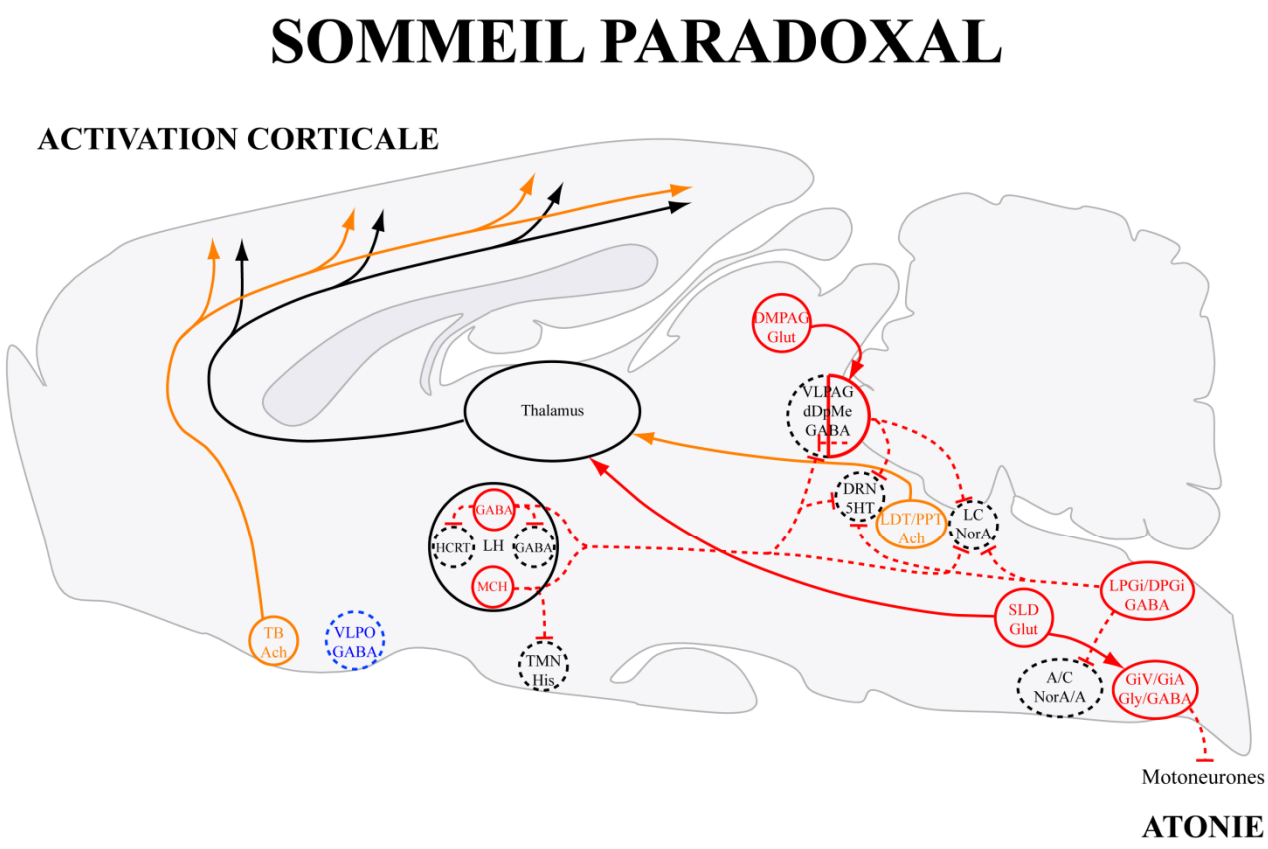


Figure 1 : Modèle permettant d'expliquer le maintien du sommeil paradoxal
Les populations représentées en orange sont des populations SP/Ev-on, en rouge des SP-on, en bleu des SL-on et en noir des Ev-on ou SP-off. La nature neurochimique des neurones est également indiquée pour chaque population. Les populations inactives sont entourées en pointillés alors que celles actives le sont d'un trait plein. Les projections dessinées en pointillés représentent des connections inhibitrices alors que celles en trait continu et se terminant par une flèche sont excitatrices.

Les neurones SP-on du GiV/GiA sont glycinergiques et GABAergiques

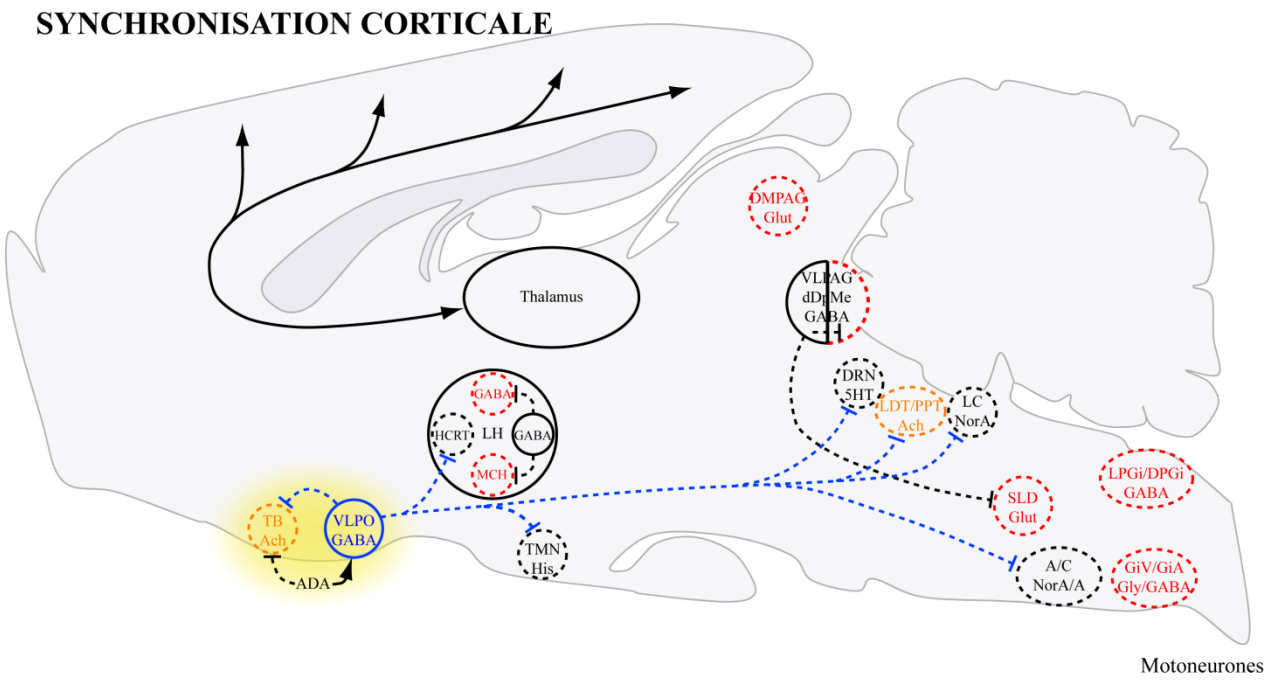
Dans les paragraphes précédents, nous avons uniquement mentionné la nature glycinergique du GiV/GIA. En effet les données historiques démontraient que l'hyperpolarisation des motoneurones résultait de la libération de glycine (Chase et al., 1989). Toutefois, après le même protocole expérimental d'hypersomnie de SP, 78 % des neurones c-FOS+ du GiV sont *glyt2*+, et 88 % sont *gad67*+ (Sapin et al., 2009). Cela implique donc qu'une majorité de neurones c-FOS+ et donc SP-on du GiV sont de nature glycinergique et GABAergique (**Figure 1**). Une telle conclusion est corroborée par les résultats de Kodama et al. qui montrent une augmentation concomitante de glycine et de GABA au sein de la moelle épinière lors de la stimulation cholinergique ou électrique du SLD (Kodama et al., 2003).

Les neurones SP-on du SLD et l'activation corticale

Dans le modèle du laboratoire permettant d'expliquer le SP, les neurones du SLD seraient également responsables de l'activation corticale via leurs projections sur les noyaux intralaminaires du thalamus (Boissard et al., 2002; Fort et al., 2009; Luppi et al., 2011). Nos données suggèrent donc que ces neurones seraient de nature glutamatergique (**Figure 1**).
En effet, il a été démontré que de nombreux neurones glutamatergiques du SLD augmentent leur taux de décharge progressivement au cours du SL pour devenir maximum durant le SP (Boucetta and Jones, 2010). De plus, de nombreux neurones SP-on du SLD projettent directement sur les noyaux intralaminaires du thalamus (Sakai *et al.*, 1979; Sakai and Koyama, 1996; Sakai *et al.*, 2001; Boissard *et al.*, 2002).
Il est intéressant de noter qu'en plus des neurones SP-on, le SLD contient également des neurones de type éveil/SP-on dont la fréquence de décharge est corrélée à l'activation corticale (Sakai *et al.*, 1979; Sakai and Koyama, 1996; Sakai *et al.*, 2001; Boissard *et al.*, 2002). Il a en outre été montré que le SLD contient des neurones probablement glutamatergiques qui déchargent en association avec l'activation corticale induite par une stimulation chez le rat anesthésié. L'augmentation de l'activité unitaire de ces neurones précède l'accélération de l'EEG, ce qui suggère que ces neurones pourraient jouer un rôle dans l'activation corticale (Boucetta and Jones, 2009).

Nous pensons que les neurones qui expriment c-FOS après hypersomnie de SP correspondent aux neurones SP-on et que les neurones de type éveil/SP-on ne sont pas c-FOS+. En effet, après 3 h d'exposition à un nouvel environnement (et donc 3 h d'activation corticale), le nombre de neurones c-FOS+ au sein du SLD ne semble être augmenté par rapport à la condition contrôle (animaux non perturbés).
L'ensemble de ces données nous amène donc à penser que les neurones glutamatergiques SP-on du SLD pourraient jouer un rôle dans l'activation corticale au cours du SP. Toutefois, d'autres populations neuronales pourraient également intervenir, qu'elles soient présentes au sein du SLD ou non. En effet, les deux études citées ci-dessus (Sakai *et al.*, 1979; Sakai and Koyama, 1996; Sakai *et al.*, 2001; Boissard *et al.*, 2002; Boucetta and Jones, 2009) rapportent que des neurones de types SP-on sont également retrouvés dans le LDT (juste dorso-rostralement au SLD), structure dans laquelle nous observons également des neurones c-FOS/*vglut2*+ après hypersomnie de SP (Clément et al., 2011). Il est donc possible que la région immédiatement rostrodorsale au SLD (et donc contenue en partie dans le LDT) soit également impliquée dans l'induction de l'activation corticale associée au SP. Cela serait en accord avec les données princeps qui ont montré que les neurones SP-on projetant au thalamus sont localisés dans la partie rostrale du SLD chez le chat (Sakai *et al.*, 1979; Sakai and Koyama, 1996; Sakai *et al.*, 2001; Boissard *et al.*, 2002). Notons également l'hypothèse de Lu et al. qui suggère que la région du précoeruleus (PC, située dans la partie la plus latérale de la substance grise périaqueducale pontique) serait responsable de cette activation (Lu *et al.*, 2006b). Par conséquent des études complémentaires sont nécessaires afin de clarifier l'implication du SLD ou de ses structures adjacentes dans le contrôle de l'activation corticale lors du SP.

A - SOMMEIL LENT



B - TRANSITION SL/SP

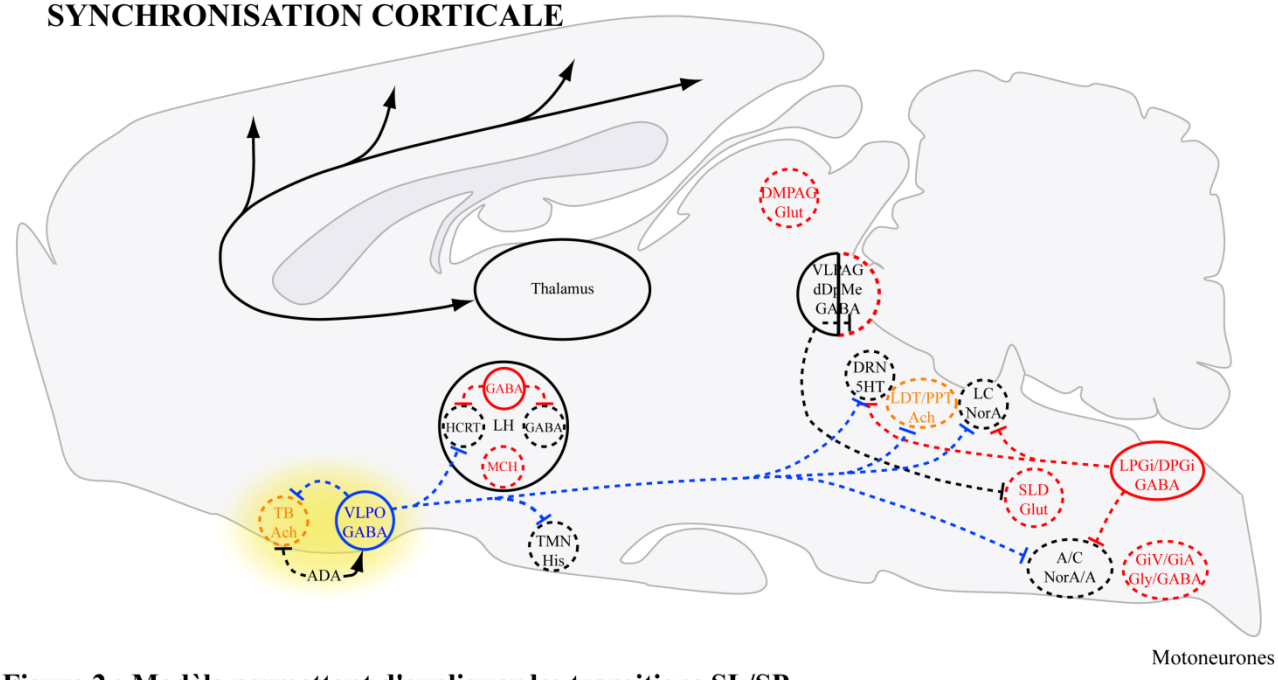


Figure 2 : Modèle permettant d'expliquer les transitions SL/SP
Un rappel du modèle du maintien du SL est rappelé en **A** et les transitions SL/SP sont présentées en **B**. Les populations représentées en orange sont des populations SP/Ev-on, en rouge des SP-on, en bleu des SL-on et en noir des Ev-on ou SP-off. La nature neurochimique des neurones est également indiquée pour chaque population. Les populations inactives sont entourées en pointillés alors que celles actives le sont d'un trait plein. Les projections dessinées en pointillés représentent des connections inhibitrices alors que celles en trait continu et se terminant par une flèche sont excitatrices.

Les mécanismes de régulation du SP

Les mécanismes inducteurs de SP

Il est maintenant bien établi que le SLD est inhibé durant l'éveil et le SL par un tonus GABAergique (Xi *et al.*, 1999; 2001a; b; Boissard, 2002) provenant de neurones SP-off de la VLAPG/dDpMe (Boissard *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2006b; Sapin *et al.*, 2009) (**Figure 2,3**). Par conséquent l'inhibition de cette dernière est indispensable à la mise en place du SP et les données obtenues pendant cette thèse permettent de mieux caractériser les mécanismes permettant cette inhibition.

Les principales afférences à la VLPAG/dDpMe activées lors d'une hypersomnie de SP sont la LH et les différentes subdivisions de la PAG. Or, nous avons montré au cours de cette thèse que les neurones SP-on de la DMPAG et de la DLPAG sont de nature glutamatergique. Nous pensons que ces neurones pourraient être responsables de l'activation des neurones GABAergiques SP-on de la VLPAG/dDpMe codistribués avec les neurones SP-off (**Figure 1**). Selon l'hypothèse émise par Sapin et al. en 2009, les neurones GABAergiques SP-on et SP-off de la VLPAG/dDpMe s'inhibent mutuellement permettant ainsi l'établissement d'un état de vigilance stable et unique. Cette hypothèse est étayée par le fait que la VLPAG contient de nombreux neurones CTb/c-FOS+ dans les conditions PSD et PSR après injection de CTb dans la VLPAG/dDpMe. De plus, 50 % de ces neurones sont de nature GABAergique (Sapin et al., 2009). Par conséquent, au cours du SP, les neurones GABAergiques SP-on de la VLPAG participeraient à l'inhibition des neurones SP-off projetant sur le SLD (**Figure 1**).

Toutefois, la VLPAG n'est pas la seule structure responsable de cette inactivation et nos données soutiennent fortement un rôle majeur de l'hypothalamus latéral (LH) dans cette inhibition. La LH est en effet l'afférence à la VLPAG/dDpMe la plus activée lors d'une hypersomnie de SP. De plus, près de 75 % des neurones SP-on de la LH sont de nature GABAergique (Sapin et al., 2010) et nous avons montré que près de 50 % des neurones SP-on de la LH projetant sur la VLPAG/dDpMe sont des neurones à MCH. Or, la MCH est un neuropeptide inhibiteur (Gao and van den Pol, 2001) et il a été montré que les neurones à MCH sont de nature SP-on (Hassani et al., 2009). Nos résultats démontrant que l'inhibition de la LH supprime le SP pendant 6 h tout en induisant une activation des neurones GABAergiques de la VLPAG/dDpMe projetant sur le SLD soutiennent cette hypothèse. Cela pourrait également expliquer que l'application intracérébroventriculaire de MCH augmente les quantités de SP (Verret et al., 2003).

Si le rôle de la LH dans l'inhibition des neurones SP-off de la VLPAG/dDpMe semble acquis, les contributions respectives de ses différentes sous populations restent à élucider. A cet égard, l'enregistrement unitaire des neurones SP-on de la LH révèle une différence physiologique entre les neurones MCH+ et les neurones GABAergiques non-MCH. Si les premiers voient leur activité augmenter une fois le SP installé, celle des seconds augmente progressivement durant les transitions SL/SP pour devenir maximale durant le SP (Hassani *et al.*, 2009; Hassani *et al.*, 2010). Cela suggère que les neurones GABAergiques non-MCH pourraient être responsables de l'inhibition première de la VLPAG/dDpMe ce qui permettrait l'entrée en SP. A ce moment, les neurones à MCH deviendraient actifs et participeraient au maintien de l'inhibition des neurones SP-off et donc du SP (**Figure 1 et 2B**).

Il apparait également que la LH (et la MCH en particulier) ne modulerait pas exclusivement l'activité de la VLPAG/dDpMe. En effet, les projections globales des neurones à MCH sur l'ensemble de l'encéphale n'est pas en faveur d'une action ciblée (Bittencourt et al., 1992; Hervieu et al., 2000; Kilduff and de Lecea, 2001). De plus, nos résultats montrent que suite à l'inhibition de la LH, une activation des neurones de la VLPAG/dDpMe, mais également du LC et du DR est observée. Ces résultats suggèrent que la LH ne serait pas simplement responsable de l'inhibition de la VLPAG/dDpMe mais qu'elle participerait à l'arrêt global

des systèmes d'éveil (**Figure** 1). Cette hypothèse est étayée par les résultats montrant que la MCH inhibe notamment les neurones du DR (Lagos et al., 2009) et que des récepteurs à MCH sont retrouvés au niveau du TMN, du DR et du LC (Bittencourt et al., 1992; Hervieu et al., 2000; Kilduff and de Lecea, 2001). De plus, le marquage par la neurobiotine des neurones GABAergiques SP-on de la LH révèle la présence de nombreuses varicosités à leur abord laissant supposer l'existence de projections locales (Hassani *et al.*, 2009; Hassani *et al.*, 2010). De telles projections pourraient permettre l'inhibition des neurones à HCRT, neurones de type SP-off (Lee *et al.*, 2005c; Mileykovskiy *et al.*, 2005), présents au sein de la LH et donc codistribués avec les neurones à MCH (**Figure 1 et 2B**). A cet égard, il a été montré que les neurones à HCRT reçoivent en majorité des projections GABAergiques (Henny and Jones, 2006). De plus l'analyse exhaustive des afférences aux neurones à HCRT en provenance de très nombreuses régions cérébrales a démontré que leur innervation la plus dense provient de neurones hypothalamiques locaux (Yoshida et al., 2006). Enfin, il a été démontré que les neurones à MCH possèdent des terminaisons sur les neurones à HCRT (Guan et al., 2002), que la MCH atténue dans les neurones à HCRT l'augmentation de la fréquence des PPSE et des potentiels d'action normalement induite par l'application d'HCRT1, et que cet effet dépend du récepteur MCH-R1 (Rao et al., 2008).

L'ensemble de ces données nous amène donc à penser que la LH, par l'intermédiaire des neurones à MCH et GABAergiques non-MCH, jouent un rôle crucial dans la mise en place du SP via l'inhibition des structures SP-off. Une telle inhibition permettrait ainsi une activation des structures exécutrices du SP, comme le SLD, et par conséquent la mise en place de cet état (**Figure 1 et 2B**). Très récemment, une étude clinique supporte un tel rôle de l'hypothalamus dans l'induction du SP. En effet, l'ablation d'une grande partie de l'hypothalamus chez un patient présentant une tumeur cérébrale, a induit l'apparition de symptômes

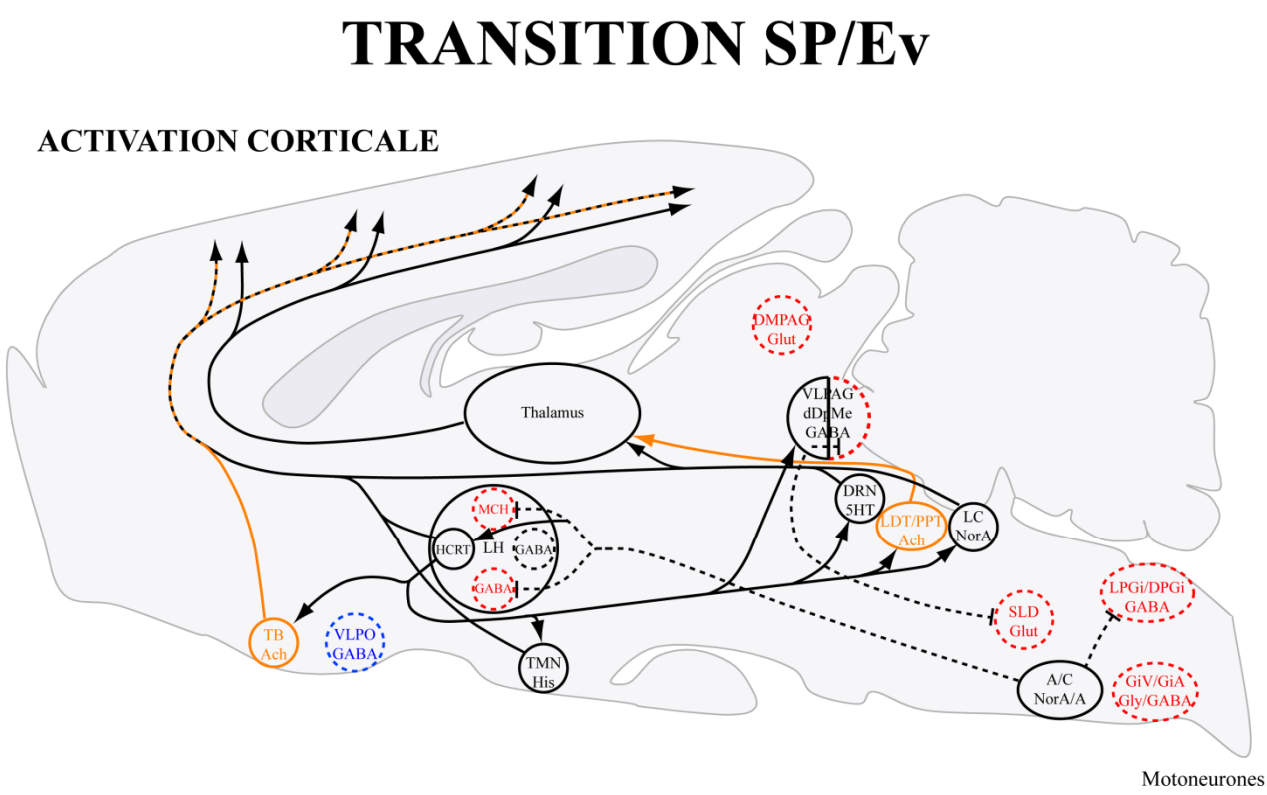


Figure 3 : Modèle permettant d'expliquer les transitions SP/éveil
Les populations représentées en orange sont des populations SP/Ev-on, en rouge des SP-on, en bleu des SL-on et en noir des Ev-on ou SP-off. La nature neurochimique des neurones est également indiquée pour chaque population. Les populations inactives sont entourées en pointillés alors que celles actives le sont d'un trait plein. Les projections dessinées en pointillés représentent des connections inhibitrices alors que celles en trait continu et se terminant par une flèche sont excitatrices.

de type narcolepsie (probablement due à la perte totale des neurones à HCRT mesurée par la concentration en HCRT dans le liquide cérébrospinal) avec une disparition totale du SP (Frahm-Falkenberg et al., 2011).

L'activation des neurones SP-on de la LH semble donc être critique pour l'induction du SP. Or, les neurones à MCH notamment, sont inhibés par la plupart des neurotransmetteurs de l'éveil et notamment la noradrénaline (van den Pol *et al.*, 2004; Bayer *et al.*, 2005). L'arrêt complet des systèmes noradrénergiques et adrénergiques est donc indispensable à l'activation des neurones SP-on. En effet, nous avons montré que l'application d'agoniste α2 au sein de la LH retarde l'apparition de SP et diminue ses quantités. Nos données suggèrent que le DPGi pourrait être responsable de cette inactivation (**Figure 1 et 2B**) puisque son inhibition conduit à l'activation quasi-totale de tous les systèmes noradrénergiques et adrénergiques et à la suppression du SP. De plus, l'augmentation de l'activité unitaire des neurones SP-on du DPGi précède l'apparition du SP de près de 15 sec (Goutagny et al., 2008). Or, physiologiquement, le SP apparait toujours après un épisode de SL durant lequel les neurones noradrénergiques et adrénergiques sont inhibés par les neurones GABAergiques du VLPO. De plus, il semble que l'activité des neurones du VLPO s'arrête avant l'apparition du SP (Takahashi et al., 2009). Par conséquent, nous pensons que le DPGi pourrait servir de relai au VLPO pour l'inhibition des systèmes noradrénergiques et adrénergiques (**Figure 2**). Cette continuité dans l'inhibition de ces systèmes permettait ainsi la mise en place, ou non, du SP en fonction de l'activation des neurones SP-on de la LH. Afin de confirmer cette hypothèse, il serait intéressant de ré-analyser les données du laboratoire concernant l'activité unitaire des neurones du DPGi, en se focalisant sur l'évolution de celle-ci au cours du SL pour voir si une augmentation de leur taux de décharge peut être observée même si aucun épisode de SP n'est mis en place.

Les mécanismes d'inhibition du SP

Si l'inactivation de la VLPAG/dDpMe permet la mise en place du SP, son activation devrait au contraire induire la suppression ou la sortie de ce stade. Plusieurs mécanismes pourraient êtres responsables de cette activation. En effet, nous montrons que les seules régions contenant des neurones afférents à la VLPAG/dDpMe activés lors d'une privation de SP sont la PAG et la LH, cette dernière étant connue pour contenir les neurones à HCRT spécifiquement actifs durant l'éveil (Lee *et al.*, 2005c; Mileykovskiy *et al.*, 2005). Or, les neurones à HCRT ne sont pas c-FOS+ chez les rats PSD (Kitka et al., 2011) et ne peuvent donc pas correspondre aux afférences c-FOS+ que nous observons chez ces rats. Par conséquent, une population neuronale de l'hypothalamus latéral autre que celle à HCRT est probablement impliquée dans l'inhibition du SP. Or, il apparaît que chez les rats PSD, une grande majorité des neurones de la LH c-FOS+ après privation de SP sont de nature GABAergiques (Sapin et al., 2010). Ce résultat suggère que les neurones de la LH actifs lors d'une privation de SP et projetant sur la VLPAG/dDpMe seraient probablement de nature GABAergique. Par conséquent, ils pourraient participer à l'inhibition des neurones GABAergiques SP-on présents dans cette région permettant ainsi la levée de l'inhibition des neurones SP-off de cette même région.

En ce qui concerne les neurones à HCRT, bien qu'ils n'expriment pas le c-FOS lors d'une privation de SP, leur stimulation optogénétique lors du SP induit de manière rapide la sortie de ce stade (Adamantidis et al., 2007) et leur disparition chez les patients narcoleptiques, ainsi que chez les modèles animaux de cette pathologie, provoque des entrées brusque en SP. De plus, la VLPAG/dDpMe contient de nombreuses fibres à HCRT (Peyron et al., 1998) et nous avons pu confirmer durant cette thèse que des neurones à HCRT sont bien rétrogradement marqués après injection de CTb dans cette structure (données non montrées). Les récepteurs à HCRT ayant une action exclusivement excitatrice (Sakurai *et al.*, 1998a), nous pensons que les neurones à HCRT pourraient exercer durant l'éveil une stimulation constante sur les neurones GABAergiques SP-off de la VLPAG/dDpMe et ainsi empêcher la survenue inopportune du SP **(Figure 3**).

Chez les patients narcoleptiques, les attaques de cataplexie surviennent en général sous le coup d'une émotion (généralement positive) mettant ainsi en lumière l'existence d'un lien entre les réseaux contrôlant l'atonie musculaire et le système limbique responsable de la gestion des émotions. Ce lien « comportemental » est également retrouvé au niveau neuronal. En effet, il a été montré que le noyau central de l'amygdale (Ce) projette sur le SLD (Boissard et al., 2003) et nous avons montré au cours de cette thèse qu'il projette de manière encore plus importante sur VLPAG/dDpMe. De plus, la voie descendante de l'amygdale centrale sur le tronc cérébral et la PAG a été relativement bien caractérisée pour la compréhension des mécanismes de conditionnement Pavlovien (que ces conditionnements soient aversifs ou au contraire à renforcement positif) (Everitt et al., 2003; Pare et al., 2004) et est de nature GABAergique (Ni *et al.*, 1995; Jia *et al.*, 1997; Hisano *et al.*, 2000; Herzog *et al.*, 2001; Jia *et al.*, 2005). Les observations que nous avons pu faire au cours de notre thèse vont en effet dans ce sens puisque la Ce possède de nombreux neurones exprimant *gad67* et *gad65* mais pas *vglut1*. Ces résultats nous amènent donc à penser que cette interrelation entre la Ce et la VLPAG/dDpMe pourrait être responsable des attaques de cataplexie. Sous le coup d'une émotion trop intense, l'activation de la Ce induirait un puissant tonus GABAergique sur la VLPAG/dDpMe qui, en l'absence d'un tonus hypocrétinergique, se retrouverait inhibé permettant ainsi l'activation du SLD et donc la mise en place d'une atonie musculaire (**Figure 4**). Toutefois, comme évoqué par le passé, l'action de la Ce pourrait également se faire directement sur le SLD (Luppi et al., 2011). Cependant, dans cette étude, les neurones projetant sur le SLD avaient été montré comme non-GABA ce qui avait conduit les auteurs à émettre l'hypothèse que la Ce pourrait activer directement les neurones SP-on du SLD. Des études complémentaires sont donc nécessaires afin de mieux comprendre les mécanismes responsables des attaques cataplectiques.

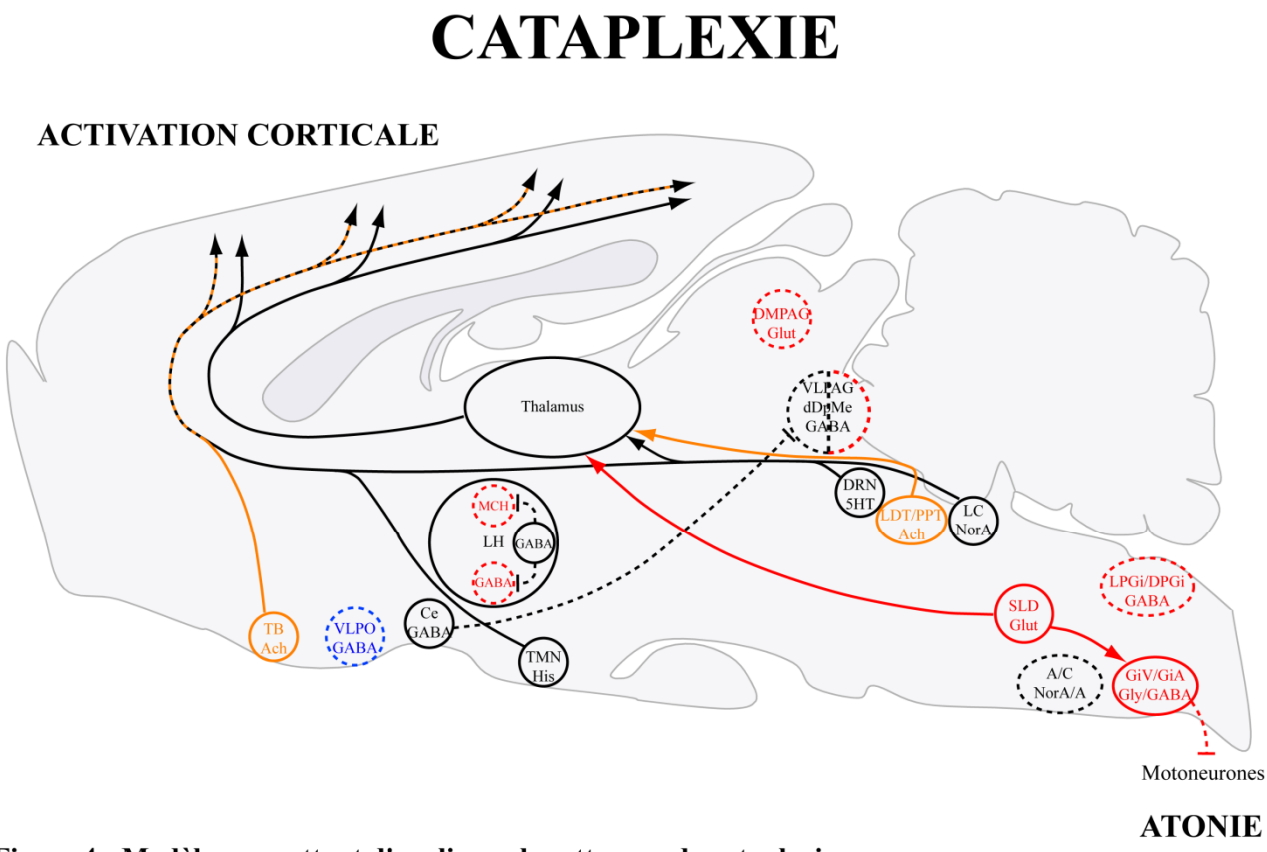


Figure 4 : Modèle permettant d'expliquer les attaques de cataplexie
Les populations représentées en orange sont des populations SP/Ev-on, en rouge des SP-on, en bleu des SL-on et en noir des Ev-on ou SP-off. La nature neurochimique des neurones est également indiquée pour chaque population. Les populations inactives sont entourées en pointillés alors que celles actives le sont d'un trait plein. Les projections dessinées en pointillés représentent des connections inhibitrices alors que celles en trait continu et se terminant par une flèche sont excitatrices.

Les résultats présentés dans ce manuscrit soulèvent également l'existence possible d'un autre mécanisme permettant l'inhibition du SP. En effet, nous avons montré que l'inhibition du DPGi provoque la disparition prolongée du SP et l'activation des systèmes noradrénergiques et adrénergiques. De plus, l'application de clonidine (agoniste des récepteurs adrénergiques α2) au sein de la LH comme du DPGi diminue les quantités de SP et retarde son apparition.
L'implication des neurones adrénergiques et noradrénergique apparaît donc comme crucial pour la régulation du SP. Toutefois, si le locus coeruleus (LC ou A6) a été la région noradrénergique la plus étudiée en ce qui concerne le cycle-veille sommeil, il ne semble pas jouer un rôle crucial dans la régulation du SP. Bien que sa stimulation optogénétique durant le SP provoque le réveil de l'animal, son inhibition tout comme son activation chronique ne modifient pas de manière significative les quantités globales de SP (Carter et al., 2010). De plus, le nombre de neurones du LC activés n'est pas augmenté par une privation sélective de 3 jours par la méthode de la piscine (Leger et al., 2009) et l'activation de ces neurones n'anticipe pas le retour à l'éveil après une phase de SP (Aston-Jones and Bloom, 1981a; Gervasoni *et al.*, 1998; Takahashi *et al.*, 2010). A l'inverse, les régions A1/C1, A2 et dans une moindre mesure A5, sont activées suite à une privation de SP (Leger et al., 2009). Par conséquent, l'effet inhibiteur de la noradrénaline sur le SP serait principalement dû à ces régions plutôt qu'à A6.

D'après nos données, ces neurones adrénergiques et noradrénergique pourraient être responsables de l'inhibition et de la sortie du SP via l'arrêt du DPGi et des neurones à MCH et non via l'activation directe des neurones SP-off de la VLPAG/dDpMe. En effet, nos données ne montrent pas d'afférences à la VLPAG/dDpMe activés après privation de SP en provenance des structures noradrénergiques et adrénergiques. Par contre, il a notamment été montré que les neurones à MCH sont hyperpolarisés par ce neurotransmetteur (Bayer et al., 2005). A l'inverse, ces mêmes travaux montrent que les neurones à HCRT sont dépolarisés en présence de noradrénaline. Cela suggère que les neurones adrénergiques et noradrénergiques supprimeraient le SP notamment via l'activation des neurones à HCRT et l'inhibition de ceux à MCH, deux populations aux effets diamétralement opposés vis-à-vis du SP (**Figure 3**).

Hypothalamus latéral, neurones à MCH et homéostasie du SP

Comme nous l'avons évoqué à plusieurs reprises au cours de cette thèse, de nombreuses données suggèrent que le tronc cérébral est nécessaire et suffisant pour permettre la mise en place du SP. Toutefois, certains résultats de cette thèse et de la littérature montrent de plus en plus que l'hypothalamus, et en particulier les neurones à MCH, joue un rôle important dans la régulation du SP.
En effet, l'application intracérébroventriculaire de MCH provoque un doublement des quantités de SP (Verret et al., 2003). A l'inverse, des souris KO pour la MCH montrent des quantités de SP inférieures à leurs congénères sauvages (Willie et al., 2008), l'injection d'un antagoniste des récepteurs MCH-R1 diminue également le SP (Ahnaou et al., 2008) et des souris MCH-ataxine dont ces neurones dégénèrent au cours du temps montrent une altération de la récupération de SP suivant une privation douce de ce même état (Fort, communication personnelle). L'ensemble de ces résultats ont amené le laboratoire à émettre l'hypothèse selon laquelle la MCH interviendrait dans la régulation homéostasique du SP (Verret *et al.*, 2003; Peyron *et al.*, 2009; Luppi *et al.*, 2011). En effet, sa position dans le réseau global responsable de la régulation du SP en fait un candidat idéal.

Les neurones à MCH projettent sur l'ensemble de l'encéphale et en particulier sur tous les systèmes impliqués dans la régulation de la vigilance (Bittencourt et al., 1992). De plus, ils sont localisés au sein de l'hypothalamus ce qui leur permet d'intégrer de nombreuses informations pour permettre une régulation fine du cycle veille-sommeil en fonction des besoins de l'individu. Par exemple, il a été rapporté que les neurones à MCH interviennent également dans la régulation de la prise alimentaire (Qu et al., 1996). De plus, la proximité entre le système à MCH et celui à HCRT impliqué dans la régulation de l'éveil, tant du point de vu

localisation que caractéristiques (SP-on vs SP-off, projections diffuses pour les deux systèmes) tend à supporter cette théorie.

Nous nous attendions donc à ce que l'inhibition de la LH, et donc des neurones à MCH, par application de muscimol altère la régulation homéostasique du SP. Or, les résultats que nous avons obtenus montrent clairement que l'homéostasie n'a pas été altérée. En effet, l'apparition du SP est retardée de manière drastique, mais plusieurs heures après l'injection, les animaux présentent une hypersomnie de SP comparé aux animaux contrôles, si bien qu'à la fin des 16 h d'enregistrement ces animaux tests ont récupéré la totalité du SP perdu au cours des premières heures suivant l'injection.

Un tel résultat peut signifier deux choses : soit les neurones à MCH ne sont pas responsables de l'homéostasie du SP, soit l'inhibition de la LH par le muscimol empêche « l'expression » du besoin en SP (c'est-à-dire la mise en place du SP) mais pas son « analyse » (c'est-à-dire l'augmentation de la pression de SP).
Vu l'importance de l'hypothalamus dans la régulation homéostasique de nombreux paramètres physiologiques, et notamment de l'éveil (avec les neurones à HCRT de la LH) et du SL (avec ceux GABAergiques du VLPO), il apparaitrait logique que la régulation homéostasique du SP se fasse également à ce niveau. Par conséquent si les neurones à MCH ne sont pas impliqués dans cette fonction spécifique, on pourrait peut être imaginer à l'instar de l'adénosine pour le SL, un facteur hypnogène spécifique du SP. Toutefois, cette hypothèse ne nous parait pas comme la plus probable. Nous penchons plutôt pour le fait que l'inhibition de la LH empêcherait la mise en place du SP mais pas le « décompte » du besoin en SP.
En effet, comme nous l'avons déjà rappelé, tous les neurones SP-on de la LH ne sont pas de type MCHergiques et sont même majoritairement GABAergiques/non-MCHergiques (MCH-) (Hassani *et al.*, 2009; Hassani *et al.*, 2010). De plus, une propriété fondamentale distingue ces deux populations : l'augmentation du taux de décharge des neurones SP-on GABA/MCH- anticipe l'apparition du SP, alors que celle des neurones à MCH se fait de manière concomitante (Hassani *et al.*, 2009; Hassani *et al.*, 2010). Par conséquent, nous pensons que les neurones MCH- seraient responsables de l'induction du SP via l'inhibition des systèmes d'éveil et de la VLPAG/dDpMe alors que les neuroens à MCH seraient quand à eux les garants de l'homéostasie du SP (**Figure 1 et 2B**). Par conséquent, lors de l'application de muscimol au sein de la LH, l'inhibition des premiers empêcherait la mise en place du SP mais l'inhibition des seconds n'induirait pas pour autant l'arrêt de l'accumulation de la pression de SP. En effet, l'inhibition de la décharge d'un neurone n'induit pas pour autant l'arrêt de toutes ses afférences ni des processus intracellulaires qui peuvent en résulter. Un tel processus a notamment été mis en évidence in vitro : l'inhibition prolongée d'un neurone engendre une modification de ses propriétés cellulaires le rendant par la suite d'avantage excitable (Turrigiano *et al.*, 1998; Turrigiano, 2008). Bien que cette hypothèse soit purement spéculative et nécessiterait d'être testée, nous continuons de penser que les neurones à MCH participeraient à la régulation homéostasique du SP mais sous une forme qui reste encore à définir.

Perspectives

Les travaux de cette thèse ont permis de mieux appréhender les mécanismes neuronaux sous-tendant le cycle veille-sommeil et plus particulièrement la mise en place et le maintien du SP. Toutefois ils ont également soulevé certaines questions, et certaines hypothèses faites au cours de cette discussion nécessiteront d'être testées dans le futur. Ce sont certaines de ces perspectives que nous nous proposons de développer ici.

Mieux contrôler la spécificité des populations neuronales ciblées

Les données que nos avons pu obtenir au cours de cette thèse illustrent bien la nécessité de cibler de manière plus spécifique une population neuronale donnée. En effet, le développement de nouveaux outils permet dorénavant de ne cibler qu'un type cellulaire permettant ainsi d'analyser de manière spécifique le rôle physiologique de chaque sous-population d'une structure donnée. Citons par exemple l'optogénétique qui permet d'activer/inactiver selon un patron temporel choisi une population ciblée génétiquement comme les neurones à HCRT, à MCH, etc. (Yizhar et al., 2011). L'utilisation de canaux ioniques issus des insectes permet également l'inactivation transitoire d'une population ciblée génétiquement (Abdala et al., 2010). Enfin, le développement de nouveaux traceurs comme ceux dérivés des virus de la rage permet de ne révéler que les afférences de la sous population choisi (par exemple les neurones GABAergiques, glutamatergiques, etc.), mais permet également de coupler traçage de voies et modifications génétiques des afférences. Cela permet par la suite la modulation par optogénétique de l'activité de ces afférences uniquement (Wickersham *et al.*, 2007; Marshel *et al.*, 2010).

Le contrôle de l'atonie musculaire par le SLD via le GiV

Afin de confirmer les travaux préliminaires obtenus au cours de cette thèse, l'injection de traceurs rétrogrades (CTb par exemple) au sein de la moelle épinière pourraient permettre de conforter l'hypothèse selon laquelle l'atonie musculaire du SP passerait exclusivement par le GiV/GiA. De telles injections, couplées à la méthode de privation/rebond, permettraient de localiser les neurones actifs lors du SP et projetant sur les motoneurones spinaux. Nous nous attendons à ce que des nombreux neurones CTb/c-FOS+ soient observés au niveau du GiV/GiA mais pas au niveau du SLD.

Il serait également intéressant de réaliser plusieurs injections de traceurs rétrogrades (CTb et fluorogold par exemple) à différents niveaux de la moelle épinière afin de déterminer si un même neurone glycinergique du GiV/GiA projette à plusieurs niveaux de la moelle épinière et est activé lors du SP. Si tel est le cas, cela pourrait expliquer l'apparition concomitante de l'atonie musculaire au niveau de l'ensemble des muscles posturaux.

L'ordre séquentiel d'activation des différentes populations de type SP-on

La compréhension fine des mécanismes permettant la régulation du SP nécessite de connaître les relations existantes entre les différentes structures cérébrales impliquées, mais également leur interrelations. Cette connaissance est particulièrement importante pour les transitions si l'on veut comprendre la succession des évènements menant d'un stade donné à un autre. Aujourd'hui, nous connaissons relativement bien les mécanismes permettant de maintenir un état donné puisque le maintien de celui-ci durant une longue période permet de visualiser (à l'aide de c-FOS par exemple) les régions activées lors de cet état. Malheureusement,

ceci ne peut pas être réalisé sur les phases de transitions qui sont éphémères par nature. Les données électrophysiologiques unitaires nous apportent bien des informations sur ces transitions, mais elles ne concernent pour l'heure qu'un nombre limité de populations et donnent une information subjective et partielle. En effet, le délai entre l'activation (ou l'inactivation) et le début (ou la fin) d'un état dépend du choix de l'expérimentateur pour la sélection de ce début. Par conséquent, il serait extrêmement intéressant de suivre au cours du temps, et de manière synchrone, l'évolution de l'activité de plusieurs populations neuronales impliquées dans la régulation des états de vigilance. L'utilisation de la technique d'enregistrement multi-unitaire multi-site permet justement une telle analyse. Dans ce cas, l'activation d'une population n'est pas observée par rapport à un évènement subjectif mais par rapport à l'ensemble des autres populations enregistrées. Cela permettrait de décortiquer la séquence d'activations/inactivations ayant lieu au cours du cycle veille-sommeil et plus particulièrement au cours des transitions. Cette information aiderait certainement à mieux cerner les connections existantes entres toutes les populations neuronales impliquées.

L'implication de l'amygdale centrale (Ce) dans l'apparition des crises de cataplexie

Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle la Ce pourrait être responsable, via ses projections sur les neurones de la VLPAG/dDpMe, des crises de cataplexie observées chez les patients narcoleptiques. Si cette hypothèse s'avère être juste, l'excitation optogénétique des neurones GABAergiques de la Ce devrait induire l'apparition de cataplexie chez des souris HCRT KO mais pas chez des souris sauvages. L'effet observé chez les animaux KO devrait également être supprimé par l'application exogène d'HCRT au niveau de la VLPAG/dDpMe. De manière similaire, l'activation synchrone de la Ce avec l'inhibition des terminaisons HCRT au niveau de la VLPAG/dDpMe devrait induire chez des souris sauvages des crises de cataplexie.
Une telle expérience est relativement aisée à mettre en place (sur le papier) étant donné que les natures neurochimiques des populations cibles sont bien connues et permettent de restreindre de manière certaine l'expression des canaux photosensibles à la population cible (neurones GABA pour la Ce et neurones à HCRT pour la LH).

L'implication des neurones à MCH dans la régulation de l'homéostasie du SP

Bien que les mécanismes sous-tendant l'homéostasie du SP ne soient pas encore totalement clairs, nous pensons que la MCH pourrait jouer un rôle à ce niveau. Etant donné la complexité de la LH, tant du point de vue de la nature neurochimique des neurones qui la compose que de leurs propriétés électrophysiologiques, il apparaît indispensable de pouvoir stimuler/inhiber spécifiquement ces neurones afin d'étudier leur rôle physiologique. Pour cela, l'optogénétique semble être une méthode adaptée puisque qu'elle permet de moduler l'activité de ces neurones à notre guise et que le ciblage des neurones à MCH est rendu facile grâce à leur nature neurochimique unique.
Si les neurones à MCH sont impliqués dans l'homéostasie du SP, leur inhibition après une privation sélective de SP devrait bloquer l'hypersomnie de SP normalement observée. De même, leur inhibition au cours de l'hypersomnie devrait induire un retour à des quantités de SP contrôles.
Dans le cas où les neurones à MCH sont effectivement impliqués dans l'homéostasie du SP, les mécanismes leur permettant de quantifier les besoins de l'organisme en SP restent à déterminer. Comme nous l'avons démontré au cours de cette thèse, leur inhibition ne permet pas de supprimer le « décompte » de la dette de SP ce qui semble indiquer que l'activité des neurones à MCH n'est pas indispensable à celui-ci. Si tel est le cas, leur inhibition chronique au cours d'une privation sélective de SP ne devrait pas supprimer l'hypersomnie de SP qui suit. De tels résultats signifieraient que des modifications moléculaires pourraient avoir lieu au sein des neurones à MCH même si ceux-ci sont inhibés. Il serait alors intéressant d'étudier les

propriétés électrophysiologiques et cellulaires afin de déterminer les modifications responsables de l'homéostasie. A l'instar des modifications moléculaires ayant lieu lors des phénomènes de potentialisation et de dépression à long terme, on pourrait imaginer des modifications au niveau des récepteurs membranaires amenant une modification de l'excitabilité de ces neurones et donc de leur activité permettant ainsi une augmentation ou une diminution des quantités de SP. Il n'est cependant pas impossible que les neurones à MCH ne soient que la « porte de sortie » de l'homéostasie du SP et qu'une population neuronale en amont de ces derniers soit responsable de la quantification du besoin de SP.

CONCLUSION GENERALE

Les résultats obtenus au cours de cette thèse ont donc permis de mieux comprendre les mécanismes neuronaux impliqués dans la mise en place et le maintien du SP.

Le SLD, que l'on pensait être la structure responsable de la genèse de SP apparaît de plus en plus comme l'un des derniers maillons d'une chaine complexe faisant intervenir de nombreuses structures interconnectées les unes aux autres. Il reste toutefois un acteur majeur et crucial du SP puisqu'il est responsable de l'activation corticale et de l'atonie musculaire caractéristiques de cet état. Cependant, nous pensons qu'un contrôle central en provenance de l'hypothalamus permettrait de réguler les quantités de SP en fonction du besoin de l'animal et serait donc responsable de la genèse du SP via des projections descendantes sur l'ensemble des systèmes impliqués dans la régulation du cycel-veille-sommeil.

LISTE DES PUBLICATIONS

Articles

Clément, O., Sapin, E., Libourel, P.A., Arthaud, S., Fort, P., Luppi, P.H. Evidence that the lateral hypothalamic area contains a population of neurons controlling paradoxical (REM) sleep by means of their projection to PS-off brainstem GABAergic neurons. En cours de soumission à J Neurosci.

Clément, O., Sapin, E., Libourel, P.A., Arthaud, S., Fort, P., Luppi, P.H. Implication of the dorsal paragigantocellular reticular nucleus in the regulation of paradoxical (REM) sleep and in the inhibition of adrenergic and noradrenergic neurons. En cours de soumission à J Neurosci.

Clément, O., Sapin, E., Berod, A., Fort, P., and Luppi, P.H. (2011). Evidence that neurons of the sublaterodorsal tegmental nucleus triggering paradoxical (REM) sleep are glutamatergic. Sleep *34*, 419-423.

Luppi, P.H., **Clément, O.**, Sapin, E., Peyron, C., Gervasoni, D., Léger L., and Fort, P. (2011) Brainstem mechanisms of paradoxical (REM) sleep generation. Pflugers Archiv, Sous presse

Luppi, P.H., **Clément, O.**, Sapin, E., Gervasoni, D., Peyron, C., Leger, L., Salvert, D., and Fort, P. (2011). The neuronal network responsible for paradoxical sleep and its dysfunctions causing narcolepsy and rapid eye movement (REM) behavior disorder. Sleep Med Rev *15*, 153-163.

Sapin, E., Lapray, D., Berod, A., Goutagny, R., Leger, L., Ravassard, P., **Clément, O.**, Hanriot, L., Fort, P., and Luppi, P.H. (2009). Localization of the brainstem GABAergic neurons controlling paradoxical (REM) sleep. PLoS One *4*, e4272.

Posters

Clément, O., Charrie, P., Salvert, D., Mandier, N., Libourel, P.A., Luppi, P.H., Salin, P.A., and Malleret, G. (2010). Paradoxical (REM) sleep, bdnf and the reprocessing of stressful experience. SfN (Abstract).

Clément, O., Sapin, E., Berod, A., Fort, P., and Luppi, P.H. (2009). Evidence that neurons of the sublaterodorsal tegmental nucleus triggering paradoxical (REM) sleep are glutamatergic. SfN (Abstract).

Clément, O., Sapin, E., Berod, A., Fort, P., and Luppi, P.H. (2010). Evidence that neurons of the sublaterodorsal tegmental nucleus triggering paradoxical (REM) sleep are glutamatergic. ESRS (Abstract).

Section de livre

Luppi, P.H., **Clément, O.**, Sapin, E., Gervasoni, D., Salvert, D., and Fort, P. (2011). Glutamatergic regulation of REM sleep. In Rapid eye movement sleep: regulation and function, B.N. Mallick, S.R. Pandi-Perumal, R.W. McCarley, and A.R. Morrison, eds. (Cambridge: Cambridge University Press), pp. 214-222.

Communication orale

Clément, O. (2011). Mise en évidence de la nature glutamatergique des neurones responsables de la genèse du sommeil paradoxal, Congrès de la SFRSM, Strasbourg.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abdala, A.P.L., Liu, B., Zhang, R., Rybak, I.A., Smith, J.C. and Paton, J.F. (2010) Selectively targeting glycinergic neurons in the brainstem: Role of inhibitory networks for respiratory pattern and rhythm generation. *SfN (Abstract)*.

Adam, K. and Oswald, I. (1977) Sleep is for tissue restoration. *J R Coll Physicians Lond*, **11**, 376-388.

Adamantidis, A., Salvert, D., Goutagny, R., Lakaye, B., Gervasoni, D., Grisar, T., Luppi, P.H. and Fort, P. (2008) Sleep architecture of the melanin-concentrating hormone receptor 1-knockout mice. *Eur J Neurosci*, **27**, 1793-1800.

Adamantidis, A.R., Zhang, F., Aravanis, A.M., Deisseroth, K. and de Lecea, L. (2007) Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons. *Nature*, **450**, 420-424.

Ahnaou, A., Drinkenburg, W.H., Bouwknecht, J.A., Alcazar, J., Steckler, T. and Dautzenberg, F.M. (2008) Blocking melanin-concentrating hormone MCH1 receptor affects rat sleep-wake architecture. *Eur J Pharmacol*, **579**, 177-188.

Airaksinen, M.S., Alanen, S., Szabat, E., Visser, T.J. and Panula, P. (1992) Multiple neurotransmitters in the tuberomammillary nucleus: comparison of rat, mouse, and guinea pig. *J Comp Neurol*, **323**, 103-116.

Alam, M.N., Gong, H., Alam, T., Jaganath, R., McGinty, D. and Szymusiak, R. (2002) Sleep-waking discharge patterns of neurons recorded in the rat perifornical lateral hypothalamic area. *J Physiol*, **538**, 619-631.

Amzica, F. and Steriade, M. (1995) Disconnection of intracortical synaptic linkages disrupts synchronization of a slow oscillation. *J Neurosci*, **15**, 4658-4677.

Aserinsky, E. and Kleitman, N. (1953) Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep. *Science*, **118**, 273-274.

Aston-Jones, G. and Bloom, F.E. (1981a) Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep-waking cycle. *J Neurosci*, **1**, 876-886.

Aston-Jones, G. and Bloom, F.E. (1981b) Norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats exhibit pronounced responses to non-noxious environmental stimuli. *J Neurosci*, **1**, 887-900.

Aston-Jones, G., Ennis, M., Pieribone, V.A., Nickell, W.T. and Shipley, M.T. (1986) The brain nucleus locus coeruleus: restricted afferent control of a broad efferent network. *Science*, **234**, 734-737.

Bayer, L., Eggermann, E., Serafin, M., Saint-Mleux, B., Machard, D., Jones, B. and Muhlethaler, M. (2001) Orexins (hypocretins) directly excite tuberomammillary neurons. *Eur J Neurosci*, **14**, 1571-1575.

Bayer, L., Mairet-Coello, G., Risold, P.Y. and Griffond, B. (2002) Orexin/hypocretin neurons: chemical phenotype and possible interactions with melanin-concentrating hormone neurons. *Regul Pept*, **104**, 33-39.

Bayer, L., Eggermann, E., Serafin, M., Grivel, J., Machard, D., Muhlethaler, M. and Jones, B.E. (2005) Opposite effects of noradrenaline and acetylcholine upon hypocretin/orexin versus melanin concentrating hormone neurons in rat hypothalamic slices. *Neuroscience*, **130**, 807-811.

Berger, R.J. and Phillips, N.H. (1995) Energy conservation and sleep. *Behav Brain Res*, **69**, 65-73.

Berridge, C.W. and Foote, S.L. (1991) Effects of locus coeruleus activation on electroencephalographic activity in neocortex and hippocampus. *J Neurosci*, **11**, 3135-3145.

Berridge, C.W., Page, M.E., Valentino, R.J. and Foote, S.L. (1993) Effects of locus coeruleus inactivation on electroencephalographic activity in neocortex and hippocampus. *Neuroscience*, **55**, 381-393.

Berridge, C.W. and Abercrombie, E.D. (1999) Relationship between locus coeruleus discharge rates and rates of norepinephrine release within neocortex as assessed by in vivo microdialysis. *Neuroscience*, **93**, 1263-1270.

Bittencourt, J.C., Presse, F., Arias, C., Peto, C., Vaughan, J., Nahon, J.L., Vale, W. and Sawchenko, P.E. (1992) The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. *J Comp Neurol*, **319**, 218-245.

Boissard, R., Gervasoni, D., Fort, P., Henninot, V., Barbagli, B. and Luppi, P.H. (2000) Neuronal networks responsible for paradoxical sleep onset and maintenance in rats: a new hypothesis. *Sleep*, **23 (Suppl.)**.

Boissard, R. (2002) Etude des réseaux neuronaux responsables du sommeil paradoxal chez le rat : approches neuropharmacologiques, neuroanatomiques et électrophysiologiques., Lyon: Université Claude Bernard Lyon 1.

Boissard, R., Gervasoni, D., Schmidt, M.H., Barbagli, B., Fort, P. and Luppi, P.H. (2002) The rat ponto-medullary network responsible for paradoxical sleep onset and maintenance: a combined microinjection and functional neuroanatomical study. *Eur J Neurosci*, **16**, 1959-1973.

Boissard, R., Fort, P., Gervasoni, D., Barbagli, B. and Luppi, P.H. (2003) Localization of the GABAergic and non-GABAergic neurons projecting to the sublaterodorsal nucleus and potentially gating paradoxical sleep onset. *Eur J Neurosci*, **18**, 1627-1639.

Boucetta, S. and Jones, B.E. (2009) Activity profiles of cholinergic and intermingled GABAergic and putative glutamatergic neurons in the pontomesencephalic tegmentum of urethane-anesthetized rats. *J Neurosci*, **29**, 4664-4674.

Boucetta, S. and Jones, B.E. (2010) Discharge profiles of putative glutamatergic neurons in the pontomesencephalic tegmentum across the sleep-wake cycle *SfN (Abstract)*.

Bourgin, P., Escourrou, P., Gaultier, C. and Adrien, J. (1995) Induction of rapid eye movement sleep by carbachol infusion into the pontine reticular formation in the rat. *Neuroreport*, **6**, 532-536.

Bourgin, P., Huitron-Resendiz, S., Spier, A.D., Fabre, V., Morte, B., Criado, J.R., Sutcliffe, J.G., Henriksen, S.J. and de Lecea, L. (2000) Hypocretin-1 modulates rapid eye movement sleep through activation of locus coeruleus neurons. *J Neurosci*, **20**, 7760-7765.

Boutrel, B., Franc, B., Hen, R., Hamon, M. and Adrien, J. (1999) Key role of 5-HT1B receptors in the regulation of paradoxical sleep as evidenced in 5-HT1B knock-out mice. *J Neurosci*, **19**, 3204-3212.

Boutrel, B., Monaca, C., Hen, R., Hamon, M. and Adrien, J. (2002) Involvement of 5-HT1A receptors in homeostatic and stress-induced adaptive regulations of paradoxical sleep: studies in 5-HT1A knock-out mice. *J Neurosci*, **22**, 4686-4692.

Brooks, P.L. and Peever, J.H. (2008) Glycinergic and GABA(A)-mediated inhibition of somatic motoneurons does not mediate rapid eye movement sleep motor atonia. *J Neurosci*, **28**, 3535-3545.

Brooks, P.L. and Peever, J.H. (2009) Role for GABAb-mediated inhibition in the control of somatic motoneurons during REM sleep. *SfN (Abstract)*.

Brooks, P.L. and Peever, J.H. (2011) Impaired GABA and glycine transmission triggers cardinal features of rapid eye movement sleep behavior disorder in mice. *J Neurosci*, **31**, 7111-7121.

Burlet, S., Tyler, C.J. and Leonard, C.S. (2002) Direct and indirect excitation of laterodorsal tegmental neurons by Hypocretin/Orexin peptides: implications for wakefulness and narcolepsy. *J Neurosci*, **22**, 2862-2872.

Cape, E.G. and Jones, B.E. (2000) Effects of glutamate agonist versus procaine microinjections into the basal forebrain cholinergic cell area upon gamma and theta EEG activity and sleep-wake state. *Eur J Neurosci*, **12**, 2166-2184.

Card, J.P., Sved, J.C., Craig, B., Raizada, M., Vazquez, J. and Sved, A.F. (2006) Efferent projections of rat rostroventrolateral medulla C1 catecholamine neurons: Implications for the central control of cardiovascular regulation. *J Comp Neurol*, **499**, 840-859.

Carli, G. and Zanchetti, A. (1965) A study of pontine lesions suppressing deep sleep in the cat. *Arch Ital Biol*, **103**, 751-788.

Carter, M.E. and de Lecea, L. (2010) Optogenetic dissection of the functional interactivity between hypocretin neurons and the locus coeruleus *SfN (Abstract)*.

Carter, M.E., Yizhar, O., Chikahisa, S., Nguyen, H., Adamantidis, A., Nishino, S., Deisseroth, K. and de Lecea, L. (2010) Tuning arousal with optogenetic modulation of locus coeruleus neurons. *Nat Neurosci*, **13**, 1526-1533.

Cedarbaum, J.M. and Aghajanian, G.K. (1978) Afferent projections to the rat locus coeruleus as determined by a retrograde tracing technique. *J Comp Neurol*, **178**, 1-16.

Cespuglio, R., Sarda, N., Gharib, A., Chastrette, N., Houdouin, F., Rampin, C. and Jouvet, M. (1990) Voltammetric detection of the release of 5-hydroxyindole compounds throughout the sleep-waking cycle of the rat. *Exp Brain Res*, **80**, 121-128.

Chase, M.H., Soja, P.J. and Morales, F.R. (1989) Evidence that glycine mediates the postsynaptic potentials that inhibit lumbar motoneurons during the atonia of active sleep. *J Neurosci*, **9**, 743-751.

Chase, M.H. and Morales, F.R. (1990) The atonia and myoclonia of active (REM) sleep. *Annu Rev Psychol*, **41**, 557-584.

Chemelli, R.M., Willie, J.T., Sinton, C.M., Elmquist, J.K., Scammell, T., Lee, C., Richardson, J.A., Williams, S.C., Xiong, Y., Kisanuki, Y., Fitch, T.E., Nakazato, M., Hammer, R.E., Saper, C.B. and Yanagisawa, M. (1999) Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell*, **98**, 437-451.

Chou, T.C., Bjorkum, A.A., Gaus, S.E., Lu, J., Scammell, T.E. and Saper, C.B. (2002) Afferents to the ventrolateral preoptic nucleus. *J Neurosci*, **22**, 977-990.

Clément, O., Charrie, P., Salvert, D., Mandier, N., Libourel, P.A., Luppi, P.H., Salin, P.A. and Malleret, G. (2010) Paradoxical (REM) sleep, bdnf and the reprocessing of stressful experience. *SfN (Abstract)*.

Clément, O., Sapin, E., Berod, A., Fort, P. and Luppi, P.H. (2011) Evidence that neurons of the sublaterodorsal tegmental nucleus triggering paradoxical (REM) sleep are glutamatergic. *Sleep*, **34**, 419-423.

Cohen, R.M., Pickar, D., Garnett, D., Lipper, S., Gillin, J.C. and Murphy, D.L. (1982) REM sleep suppression induced by selective monoamine oxidase inhibitors. *Psychopharmacology (Berl)*, **78**, 137-140.

Contreras, D. and Steriade, M. (1997a) State-dependent fluctuations of low-frequency rhythms in corticothalamic networks. *Neuroscience*, **76**, 25-38.

Contreras, D. and Steriade, M. (1997b) Synchronization of low-frequency rhythms in corticothalamic networks. *Neuroscience*, **76**, 11-24.

Crochet, S., Onoe, H. and Sakai, K. (2006) A potent non-monoaminergic paradoxical sleep inhibitory system: a reverse microdialysis and single-unit recording study. *Eur J Neurosci*, **24**, 1404-1412.

Dahlstrom, A. and Fuxe, K. (1964) Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia*, **20**, 398-399.

Darracq, L., Gervasoni, D., Souliere, F., Lin, J.S., Fort, P., Chouvet, G. and Luppi, P.H. (1996) Effect of strychnine on rat locus coeruleus neurones during sleep and wakefulness. *Neuroreport*, **8**, 351-355.

Davenne, D., Fregnac, Y., Imbert, M. and Adrien, J. (1989) Lesion of the PGO pathways in the kitten. II. Impairment of physiological and morphological maturation of the lateral geniculate nucleus. *Brain Res*, **485**, 267-277.

de Lecea, L., Kilduff, T.S., Peyron, C., Gao, X., Foye, P.E., Danielson, P.E., Fukuhara, C., Battenberg, E.L., Gautvik, V.T., Bartlett, F.S., 2nd, Frankel, W.N., van den Pol, A.N., Bloom, F.E., Gautvik, K.M. and Sutcliffe, J.G. (1998) The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 322-327.

Dement, W. and Kleitman, N. (1957) The relation of eye movements during sleep to dream activity: an objective method for the study of dreaming. *J Exp Psychol*, **53**, 339-346.

Denoyer, M., Buda, C. and Jouvet, M. (1989) [The destruction of perikaryas of the mesencephalic reticular formation and the posterior hypothalamus does not cause major disorders of awakening in the cat]. *C R Acad Sci III*, **309**, 265-274.

Descarries, L., Watkins, K.C., Garcia, S. and Beaudet, A. (1982) The serotonin neurons in nucleus raphe dorsalis of adult rat: a light and electron microscope radioautographic study. *J Comp Neurol*, **207**, 239-254.

Deurveilher, S., Hars, B. and Hennevin, E. (1997) Pontine microinjection of carbachol does not reliably enhance paradoxical sleep in rats. *Sleep*, **20**, 593-607.

Deurveilher, S., Lo, H., Murphy, J.A., Burns, J. and Semba, K. (2006) Differential c-Fos immunoreactivity in arousal-promoting cell groups following systemic administration of caffeine in rats. *J Comp Neurol*, **498**, 667-689.

Dielenberg, R.A. and McGregor, I.S. (2001) Defensive behavior in rats towards predatory odors: a review. *Neurosci Biobehav Rev*, **25**, 597-609.

el Mansari, M., Sakai, K. and Jouvet, M. (1989) Unitary characteristics of presumptive cholinergic tegmental neurons during the sleep-waking cycle in freely moving cats. *Exp Brain Res*, **76**, 519-529.

el Mansari, M., Sakai, K. and Jouvet, M. (1990) Responses of presumed cholinergic mesopontine tegmental neurons to carbachol microinjections in freely moving cats. *Exp Brain Res*, **83**, 115-123.

Ennis, M. and Aston-Jones, G. (1989) GABA-mediated inhibition of locus coeruleus from the dorsomedial rostral medulla. *J Neurosci*, **9**, 2973-2981.

Erickson, J.T. and Millhorn, D.E. (1994) Hypoxia and electrical stimulation of the carotid sinus nerve induce Fos-like immunoreactivity within catecholaminergic and serotoninergic neurons of the rat brainstem. *J Comp Neurol*, **348**, 161-182.

Ericson, H., Blomqvist, A. and Kohler, C. (1991) Origin of neuronal inputs to the region of the tuberomammillary nucleus of the rat brain. *J Comp Neurol*, **311**, 45-64.

Espana, R.A., Baldo, B.A., Kelley, A.E. and Berridge, C.W. (2001) Wake-promoting and sleep-suppressing actions of hypocretin (orexin): basal forebrain sites of action. *Neuroscience*, **106**, 699-715.

Estabrooke, I.V., McCarthy, M.T., Ko, E., Chou, T.C., Chemelli, R.M., Yanagisawa, M., Saper, C.B. and Scammell, T.E. (2001) Fos expression in orexin neurons varies with behavioral state. *J Neurosci*, **21**, 1656-1662.

Everitt, B.J., Cardinal, R.N., Parkinson, J.A. and Robbins, T.W. (2003) Appetitive behavior: impact of amygdala-dependent mechanisms of emotional learning. *Ann N Y Acad Sci*, **985**, 233-250.

Fenik, V., Ogawa, H., Davies, R.O. and Kubin, L. (1999) Pontine carbachol produces a spectrum of REM sleep-like and arousal-like electrocortical responses in urethane-anesthetized rats. *Sleep Res. Online*, **2(Suppl.)**, 30.

Fenik, V., Marchenko, V., Janssen, P., Davies, R.O. and Kubin, L. (2002) A5 cells are silenced when REM sleep-like signs are elicited by pontine carbachol. *J Appl Physiol*, **93**, 1448-1456.

Foote, S.L., Bloom, F.E. and Aston-Jones, G. (1983) Nucleus locus ceruleus: new evidence of anatomical and physiological specificity. *Physiol Rev*, **63**, 844-914.

Fort, P., Sakai, K., Luppi, P.H., Salvert, D. and Jouvet, M. (1989) Monoaminergic, peptidergic, and cholinergic afferents to the cat facial nucleus as evidenced by a double immunostaining method with unconjugated cholera toxin as a retrograde tracer. *J Comp Neurol*, **283**, 285-302.

Fort, P., Luppi, P.H. and Jouvet, M. (1993) Glycine-immunoreactive neurones in the cat brain stem reticular formation. *Neuroreport*, **4**, 1123-1126.

Fort, P., Luppi, P.H. and Gallopin, T. (2004) In Vitro Identification of the Presumed Sleep-Promoting Neurons of the Ventrolateral Preoptic Nucleus (VLPO). In *Sleep: Circuits and Functions* (Luppi, P.H., ed. Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 43-64.

Fort, P., Bassetti, C.L. and Luppi, P.H. (2009) Alternating vigilance states: new insights regarding neuronal networks and mechanisms. *Eur J Neurosci*, **29**, 1741-1753.

Frahm-Falkenberg, S., Knudsen, S., S., G. and Jennum, P.J. (2011) Hypothalamic craniopharyngeoma resulting in hypocretin deficiency and narcolepsy with atypical cataplexy. *EFNS (Abstract)*.

Frank, M.G., Issa, N.P. and Stryker, M.P. (2001) Sleep enhances plasticity in the developing visual cortex. *Neuron*, **30**, 275-287.

Frank, M.G. and Heller, H.C. (2003) The ontogeny of mammalian sleep: a reappraisal of alternative hypotheses. *J Sleep Res*, **12**, 25-34.

Gais, S. and Born, J. (2004) Declarative memory consolidation: mechanisms acting during human sleep. *Learn Mem*, **11**, 679-685.

Gallopin, T., Fort, P., Eggermann, E., Cauli, B., Luppi, P.H., Rossier, J., Audinat, E., Muhlethaler, M. and Serafin, M. (2000) Identification of sleep-promoting neurons in vitro. *Nature*, **404**, 992-995.

Gallopin, T., Luppi, P.H., Rambert, F.A., Frydman, A. and Fort, P. (2004) Effect of the wake-promoting agent modafinil on sleep-promoting neurons from the ventrolateral preoptic nucleus: an in vitro pharmacologic study. *Sleep*, **27**, 19-25.

Gallopin, T., Luppi, P.H., Cauli, B., Urade, Y., Rossier, J., Hayaishi, O., Lambolez, B. and Fort, P. (2005) The endogenous somnogen adenosine excites a subset of sleep-promoting neurons via A2A receptors in the ventrolateral preoptic nucleus. *Neuroscience*, **134**, 1377-1390.

Gandrillon, O., Solari, F., Legrand, C., Jurdic, P. and Samarut, J. (1996) A rapid and convenient method to prepare DIG-labelled RNA probes for use in non-radioactive in situ hybridization. *Mol Cell Probes*, **10**, 51-55.

Gao, X.B. and van den Pol, A.N. (2001) Melanin concentrating hormone depresses synaptic activity of glutamate and GABA neurons from rat lateral hypothalamus. *J Physiol*, **533**, 237-252.

George, R., Haslett, W.L. and Jenden, D.J. (1964) A Cholinergic Mechanism in the Brainstem Reticular Formation: Induction of Paradoxical Sleep. *Int J Neuropharmacol*, **3**, 541-552.

Gerashchenko, D., Chou, T.C., Blanco-Centurion, C.A., Saper, C.B. and Shiromani, P.J. (2004) Effects of lesions of the histaminergic tuberomammillary nucleus on spontaneous sleep in rats. *Sleep*, **27**, 1275-1281.

Gervasoni, D., Darracq, L., Fort, P., Souliere, F., Chouvet, G. and Luppi, P.H. (1998) Electrophysiological evidence that noradrenergic neurons of the rat locus coeruleus are tonically inhibited by GABA during sleep. *Eur J Neurosci*, **10**, 964-970.

Gervasoni, D., Peyron, C., Rampon, C., Barbagli, B., Chouvet, G., Urbain, N., Fort, P. and Luppi, P.H. (2000) Role and origin of the GABAergic innervation of dorsal raphe serotonergic neurons. *J Neurosci*, **20**, 4217-4225.

Gervasoni, D., Panconi, E., Henninot, V., Boissard, R., Barbagli, B., Fort, P. and Luppi, P.H. (2002) Effect of chronic treatment with milnacipran on sleep architecture in rats compared with paroxetine and imipramine. *Pharmacol Biochem Behav*, **73**, 557-563.

Gervasoni, D., Lin, S.C., Ribeiro, S., Soares, E.S., Pantoja, J. and Nicolelis, M.A. (2004) Global forebrain dynamics predict rat behavioral states and their transitions. *J Neurosci*, **24**, 11137-11147.

Glavin, G.B. (1985) Stress and brain noradrenaline: a review. *Neurosci Biobehav Rev*, **9**, 233-243.

Gong, H., McGinty, D., Guzman-Marin, R., Chew, K.T., Stewart, D. and Szymusiak, R. (2004) Activation of c-fos in GABAergic neurones in the preoptic area during sleep and in response to sleep deprivation. *J Physiol*, **556**, 935-946.

Goutagny, R., Luppi, P.H., Salvert, D., Gervasoni, D. and Fort, P. (2005) GABAergic control of hypothalamic melanin-concentrating hormone-containing neurons across the sleep-waking cycle. *Neuroreport*, **16**, 1069-1073.

Goutagny, R., Luppi, P.H., Salvert, D., Lapray, D., Gervasoni, D. and Fort, P. (2008) Role of the dorsal paragigantocellular reticular nucleus in paradoxical (rapid eye movement) sleep generation: a combined electrophysiological and anatomical study in the rat. *Neuroscience*, **152**, 849-857.

Graves, L.A., Heller, E.A., Pack, A.I. and Abel, T. (2003) Sleep deprivation selectively impairs memory consolidation for contextual fear conditioning. *Learn Mem*, **10**, 168-176.

Greco, M.A., Fuller, P.M., Jhou, T.C., Martin-Schild, S., Zadina, J.E., Hu, Z., Shiromani, P. and Lu, J. (2008) Opioidergic projections to sleep-active neurons in the ventrolateral preoptic nucleus. *Brain Res*, **1245**, 96-107.

Gritti, I., Mainville, L. and Jones, B.E. (1993) Codistribution of GABA- with acetylcholine-synthesizing neurons in the basal forebrain of the rat. *J Comp Neurol*, **329**, 438-457.

Grivel, J., Cvetkovic, V., Bayer, L., Machard, D., Tobler, I., Muhlethaler, M. and Serafin, M. (2005) The wake-promoting hypocretin/orexin neurons change their response to noradrenaline after sleep deprivation. *J Neurosci*, **25**, 4127-4130.

Gross, C.G. (2000) Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nat Rev Neurosci*, **1**, 67-73.

Gruart-Masso, A., Nadal-Alemany, R., Coll-Andreu, M., Portell-Cortes, I. and Marti-Nicolovius, M. (1995) Effects of pretraining paradoxical sleep deprivation upon two-way active avoidance. *Behav Brain Res*, **72**, 181-183.

Guan, J.L., Uehara, K., Lu, S., Wang, Q.P., Funahashi, H., Sakurai, T., Yanagizawa, M. and Shioda, S. (2002) Reciprocal synaptic relationships between orexin- and melanin-concentrating hormone-containing neurons in the rat lateral hypothalamus: a novel circuit implicated in feeding regulation. *Int J Obes Relat Metab Disord*, **26**, 1523-1532.

Gutwein, B.M. and Fishbein, W. (1980) Paradoxical sleep and memory (I): Selective alterations following enriched and impoverished environmental rearing. *Brain Res Bull*, **5**, 9-12.

Guyenet, P.G. and Aghajanian, G.K. (1979) ACh, substance P and met-enkephalin in the locus coeruleus: pharmacological evidence for independent sites of action. *Eur J Pharmacol*, **53**, 319-328.

Guzman-Marin, R., Suntsova, N., Methippara, M., Greiffenstein, R., Szymusiak, R. and McGinty, D. (2005) Sleep deprivation suppresses neurogenesis in the adult hippocampus of rats. *Eur J Neurosci*, **22**, 2111-2116.

Guzman-Marin, R., Suntsova, N., Bashir, T., Nienhuis, R., Szymusiak, R. and McGinty, D. (2008) Rapid eye movement sleep deprivation contributes to reduction of neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus of the adult rat. *Sleep*, **31**, 167-175.

Gvilia, I., Xu, F., McGinty, D. and Szymusiak, R. (2006) Homeostatic regulation of sleep: a role for preoptic area neurons. *J Neurosci*, **26**, 9426-9433.

Hagan, J.J., Leslie, R.A., Patel, S., Evans, M.L., Wattam, T.A., Holmes, S., Benham, C.D., Taylor, S.G., Routledge, C., Hemmati, P., Munton, R.P., Ashmeade, T.E., Shah, A.S., Hatcher, J.P., Hatcher, P.D., Jones, D.N., Smith, M.I., Piper, D.C., Hunter, A.J., Porter, R.A. and Upton, N. (1999) Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 10911-10916.

Halassa, M.M., Florian, C., Fellin, T., Munoz, J.R., Lee, S.Y., Abel, T., Haydon, P.G. and Frank, M.G. (2009) Astrocytic modulation of sleep homeostasis and cognitive consequences of sleep loss. *Neuron*, **61**, 213-219.

Hallanger, A.E., Levey, A.I., Lee, H.J., Rye, D.B. and Wainer, B.H. (1987) The origins of cholinergic and other subcortical afferents to the thalamus in the rat. *J Comp Neurol*, **262**, 105-124.

Han, F., Zhang, Y.F. and Li, Y.Q. (2003) Fos expression in tyrosine hydroxylase-containing neurons in rat brainstem after visceral noxious stimulation: an immunohistochemical study. *World J Gastroenterol*, **9**, 1045-1050.

Hara, J., Beuckmann, C.T., Nambu, T., Willie, J.T., Chemelli, R.M., Sinton, C.M., Sugiyama, F., Yagami, K., Goto, K., Yanagisawa, M. and Sakurai, T. (2001) Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron*, **30**, 345-354.

Hassani, O.K., Lee, M.G. and Jones, B.E. (2009) Melanin-concentrating hormone neurons discharge in a reciprocal manner to orexin neurons across the sleep-wake cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 2418-2422.

Hassani, O.K., Henny, P., Lee, M.G. and Jones, B.E. (2010) GABAergic neurons intermingled with orexin and MCH neurons in the lateral hypothalamus discharge maximally during sleep. *Eur J Neurosci*, **32**, 448-457.

Haxhiu, M.A., Yung, K., Erokwu, B. and Cherniack, N.S. (1996) CO2-induced c-fos expression in the CNS catecholaminergic neurons. *Respir Physiol*, **105**, 35-45.

Heimer, L. and Alheid, G.F. (1991) Piecing together the puzzle of basal forebrain anatomy. *Adv Exp Med Biol*, **295**, 1-42.

Hennevin, E., Hars, B., Maho, C. and Bloch, V. (1995) Processing of learned information in paradoxical sleep: relevance for memory. *Behav Brain Res*, **69**, 125-135.

Henny, P. and Jones, B.E. (2006) Innervation of orexin/hypocretin neurons by GABAergic, glutamatergic or cholinergic basal forebrain terminals evidenced by immunostaining for presynaptic vesicular transporter and postsynaptic scaffolding proteins. *J Comp Neurol*, **499**, 645-661.

Hervieu, G.J., Cluderay, J.E., Harrison, D., Meakin, J., Maycox, P., Nasir, S. and Leslie, R.A. (2000) The distribution of the mRNA and protein products of the melanin-concentrating hormone (MCH) receptor gene, slc-1, in the central nervous system of the rat. *Eur J Neurosci*, **12**, 1194-1216.

Herzog, E., Bellenchi, G.C., Gras, C., Bernard, V., Ravassard, P., Bedet, C., Gasnier, B., Giros, B. and El Mestikawy, S. (2001) The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. *J Neurosci*, **21**, RC181.

Hisano, S., Hoshi, K., Ikeda, Y., Maruyama, D., Kanemoto, M., Ichijo, H., Kojima, I., Takeda, J. and Nogami, H. (2000) Regional expression of a gene encoding a neuron-specific Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter (DNPI) in the rat forebrain. *Brain Res Mol Brain Res*, **83**, 34-43.

Hobson, J.A., McCarley, R.W. and Wyzinski, P.W. (1975) Sleep cycle oscillation: reciprocal discharge by two brainstem neuronal groups. *Science*, **189**, 55-58.

Holmes, C.J. and Jones, B.E. (1994) Importance of cholinergic, GABAergic, serotonergic and other neurons in the medial medullary reticular formation for sleep-wake states studied by cytotoxic lesions in the cat. *Neuroscience*, **62**, 1179-1200.

Holstege, J.C. and Bongers, C.M. (1991) A glycinergic projection from the ventromedial lower brainstem to spinal motoneurons. An ultrastructural double labeling study in rat. *Brain Res*, **566**, 308-315.

Horvath, T.L., Peyron, C., Diano, S., Ivanov, A., Aston-Jones, G., Kilduff, T.S. and van Den Pol, A.N. (1999) Hypocretin (orexin) activation and synaptic innervation of the locus coeruleus noradrenergic system. *J Comp Neurol*, **415**, 145-159.

Huang, Z.L., Qu, W.M., Li, W.D., Mochizuki, T., Eguchi, N., Watanabe, T., Urade, Y. and Hayaishi, O. (2001) Arousal effect of orexin A depends on activation of the histaminergic system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 9965-9970.

Hur, E.E. and Zaborszky, L. (2005) Vglut2 afferents to the medial prefrontal and primary somatosensory cortices: a combined retrograde tracing in situ hybridization study [corrected]. *J Comp Neurol*, **483**, 351-373.

Iranzo, A., Santamaria, J. and Tolosa, E. (2009) The clinical and pathophysiological relevance of REM sleep behavior disorder in neurodegenerative diseases. *Sleep Med Rev*, **13**, 385-401.

Ito, Y., Inoue, D., Kido, S. and Matsumoto, T. (2005) c-Fos degradation by the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in osteoclast progenitors. *Bone*, **37**, 842-849.

Jia, H.G., Rao, Z.R. and Shi, J.W. (1997) Evidence of gamma-aminobutyric acidergic control over the catecholaminergic projection from the medulla oblongata to the central nucleus of the amygdala. *J Comp Neurol*, **381**, 262-281.

Jia, H.G., Zhang, G.Y. and Wan, Q. (2005) A GABAergic projection from the central nucleus of the amygdala to the parabrachial nucleus: an ultrastructural study of anterograde tracing in combination with post-embedding immunocytochemistry in the rat. *Neurosci Lett*, **382**, 153-157.

Jones, B.E. and Moore, R.Y. (1977) Ascending projections of the locus coeruleus in the rat. II. Autoradiographic study. *Brain Res*, **127**, 25-53.

Jones, B.E. and Cuello, A.C. (1989) Afferents to the basal forebrain cholinergic cell area from pontomesencephalic--catecholamine, serotonin, and acetylcholine--neurons. *Neuroscience*, **31**, 37-61.

Jones, B.E. (1991) Paradoxical sleep and its chemical/structural substrates in the brain. *Neuroscience*, **40**, 637-656.

Jones, B.E. (2004) Activity, modulation and role of basal forebrain cholinergic neurons innervating the cerebral cortex. *Prog Brain Res*, **145**, 157-169.

Jones, B.E. (2005) From waking to sleeping: neuronal and chemical substrates. *Trends Pharmacol Sci*, **26**, 578-586.

Jouvet-Mounier, D. and Astic, L. (1968) [Study of the course of sleep in the young rat during the 1st postnatal month]. *C R Seances Soc Biol Fil*, **162**, 119-123.

Jouvet-Mounier, D., Astic, L. and Lacote, D. (1970) Ontogenesis of the states of sleep in rat, cat, and guinea pig during the first postnatal month. *Dev Psychobiol*, **2**, 216-239.

Jouvet, M. and Michel, F. (1959) [Electromyographic correlations of sleep in the chronic decorticate & mesencephalic cat]. *C R Seances Soc Biol Fil*, **153**, 422-425.

Jouvet, M., Michel, F. and Courjon, J. (1959) [On a stage of rapid cerebral electrical activity in the course of physiological sleep]. *C R Seances Soc Biol Fil*, **153**, 1024-1028.

Jouvet, M. and Michel, F. (1960) [New research on the structures responsible for the "paradoxical phase" of sleep]. *J Physiol (Paris)*, **52**, 130-131.

Jouvet, M. (1962) [Research on the neural structures and responsible mechanisms in different phases of physiological sleep]. *Arch Ital Biol*, **100**, 125-206.

Jouvet, M. (1965) [The paradoxical phase of sleep]. *Int J Neurol*, **5**, 131-150.

Jouvet, M. (1968) Insomnia and decrease of cerebral 5-hydroxytryptamine after destruction of the raphe system in the cat. *Adv Pharmacol*, **6**, 265-279.

Jouvet, M. (1969) Biogenic amines and the states of sleep. *Science*, **163**, 32-41.

Jouvet, M. (1972) The role of monoamines and acetylcholine-containing neurons in the regulation of the sleep-waking cycle. *Ergeb Physiol*, **64**, 166-307.

Jouvet, M. (1979) Le comportement onirique. *Pour la science*, **25**, 136-152.

Jouvet, M. (1980) Paradoxical sleep and the nature-nurture controversy. *Prog Brain Res*, **53**, 331-346.

Jouvet, M. (1988) The regulation of paradoxical sleep by the hypothalamo-hypophysis. *Arch Ital Biol*, **126**, 259-274.

Kalia, M., Fuxe, K. and Goldstein, M. (1985) Rat medulla oblongata. III. Adrenergic (C1 and C2) neurons, nerve fibers and presumptive terminal processes. *J Comp Neurol*, **233**, 333-349.

Kanamori, N., Sakai, K. and Jouvet, M. (1980) Neuronal activity specific to paradoxical sleep in the ventromedial medullary reticular formation of unresdrained cats. *Brain Res*, **189**, 251-255.

Kato, G., Yasaka, T., Katafuchi, T., Furue, H., Mizuno, M., Iwamoto, Y. and Yoshimura, M. (2006) Direct GABAergic and glycinergic inhibition of the substantia gelatinosa from the rostral ventromedial medulla revealed by in vivo patch-clamp analysis in rats. *J Neurosci*, **26**, 1787-1794.

Kaur, S., Saxena, R.N. and Mallick, B.N. (2001) GABAergic neurons in prepositus hypoglossi regulate REM sleep by its action on locus coeruleus in freely moving rats. *Synapse*, **42**, 141-150.

Kaur, S., Junek, A., Black, M.A. and Semba, K. (2008) Effects of ibotenate and 192IgG-saporin lesions of the nucleus basalis magnocellularis/substantia innominata on spontaneous sleep and wake states and on recovery sleep after sleep deprivation in rats. *J Neurosci*, **28**, 491-504.

Kayama, Y., Ohta, M. and Jodo, E. (1992) Firing of 'possibly' cholinergic neurons in the rat laterodorsal tegmental nucleus during sleep and wakefulness. *Brain Res*, **569**, 210-220.

Kilduff, T.S. and de Lecea, L. (2001) Mapping of the mRNAs for the hypocretin/orexin and melanin-concentrating hormone receptors: networks of overlapping peptide systems. *J Comp Neurol*, **435**, 1-5.

Kitka, T., Adori, C., Katai, Z., Vas, S., Molnar, E., Papp, R.S., Toth, Z.E. and Bagdy, G. (2011) Association between the activation of MCH and orexin immunorective neurons and REM sleep architecture during REM rebound after a three day long REM deprivation. *Neurochem Int*, **59**, 686-694.

Kodama, T., Lai, Y.Y. and Siegel, J.M. (1998) Enhanced glutamate release during REM sleep in the rostromedial medulla as measured by in vivo microdialysis. *Brain Res*, **780**, 178-181.

Kodama, T., Lai, Y.Y. and Siegel, J.M. (2003) Changes in inhibitory amino acid release linked to pontine-induced atonia: an in vivo microdialysis study. *J Neurosci*, **23**, 1548-1554.

Kohlmeier, K.A., Lopez-Rodriguez, F., Liu, R.H., Morales, F.R. and Chase, M.H. (1996) State-dependent phenomena in cat masseter motoneurons. *Brain Res*, **722**, 30-38.

Kovacs, K.J. (2008) Measurement of immediate-early gene activation- c-fos and beyond. *J Neuroendocrinol*, **20**, 665-672.

Koyama, Y. and Kayama, Y. (1993) Mutual interactions among cholinergic, noradrenergic and serotonergic neurons studied by ionophoresis of these transmitters in rat brainstem nuclei. *Neuroscience*, **55**, 1117-1126.

Koyama, Y., Takahashi, K., Kodama, T. and Kayama, Y. (2003) State-dependent activity of neurons in the perifornical hypothalamic area during sleep and waking. *Neuroscience*, **119**, 1209-1219.

Kumar, S., Szymusiak, R., Bashir, T., Suntsova, N., Rai, S., McGinty, D. and Alam, M.N. (2008) Inactivation of median preoptic nucleus causes c-Fos expression in hypocretin- and serotonin-containing neurons in anesthetized rat. *Brain Res*, **1234**, 66-77.

Lagos, P., Torterolo, P., Jantos, H., Chase, M.H. and Monti, J.M. (2009) Effects on sleep of melanin-concentrating hormone (MCH) microinjections into the dorsal raphe nucleus. *Brain Res*, **1265**, 103-110.

Lai, Y.Y. and Siegel, J.M. (1988) Medullary regions mediating atonia. *J Neurosci*, **8**, 4790-4796.

Lai, Y.Y. and Siegel, J.M. (1990) Cardiovascular and muscle tone changes produced by microinjection of cholinergic and glutamatergic agonists in dorsolateral pons and medial medulla. *Brain Res*, **514**, 27-36.

Lai, Y.Y. and Siegel, J.M. (1991) Pontomedullary glutamate receptors mediating locomotion and muscle tone suppression. *J Neurosci*, **11**, 2931-2937.

Lee, H.S., Kim, M.A. and Waterhouse, B.D. (2005a) Retrograde double-labeling study of common afferent projections to the dorsal raphe and the nuclear core of the locus coeruleus in the rat. *J Comp Neurol*, **481**, 179-193.

Lee, M.G., Hassani, O.K., Alonso, A. and Jones, B.E. (2005b) Cholinergic basal forebrain neurons burst with theta during waking and paradoxical sleep. *J Neurosci*, **25**, 4365-4369.

Lee, M.G., Hassani, O.K. and Jones, B.E. (2005c) Discharge of identified orexin/hypocretin neurons across the sleep-waking cycle. *J Neurosci*, **25**, 6716-6720.

Leger, L., Charnay, Y., Burlet, S., Gay, N., Schaad, N., Bouras, C. and Cespuglio, R. (1998) Comparative distribution of nitric oxide synthase- and serotonin-containing neurons in the raphe nuclei of four mammalian species. *Histochem Cell Biol*, **110**, 517-525.

Leger, L., Goutagny, R., Sapin, E., Salvert, D., Fort, P. and Luppi, P.H. (2009) Noradrenergic neurons expressing Fos during waking and paradoxical sleep deprivation in the rat. *J Chem Neuroanat*, **37**, 149-157.

Leppavuori, A. (1980) The effects of an alpha-adrenergic agonist or antagonist on sleep during blockade of catecholamine synthesis in the cat. *Brain Res*, **193**, 117-128.

Lin, J.S., Sakai, K. and Jouvet, M. (1988) Evidence for histaminergic arousal mechanisms in the hypothalamus of cat. *Neuropharmacology*, **27**, 111-122.

Lin, J.S., Sakai, K., Vanni-Mercier, G. and Jouvet, M. (1989) A critical role of the posterior hypothalamus in the mechanisms of wakefulness determined by microinjection of muscimol in freely moving cats. *Brain Res*, **479**, 225-240.

Lin, J.S., Sakai, K., Vanni-Mercier, G., Arrang, J.M., Garbarg, M., Schwartz, J.C. and Jouvet, M. (1990) Involvement of histaminergic neurons in arousal mechanisms demonstrated with H3-receptor ligands in the cat. *Brain Res*, **523**, 325-330.

Lin, J.S., Hou, Y., Sakai, K. and Jouvet, M. (1996) Histaminergic descending inputs to the mesopontine tegmentum and their role in the control of cortical activation and wakefulness in the cat. *J Neurosci*, **16**, 1523-1537.

Lin, L., Faraco, J., Li, R., Kadotani, H., Rogers, W., Lin, X., Qiu, X., de Jong, P.J., Nishino, S. and Mignot, E. (1999) The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell*, **98**, 365-376.

Liu, R., Jolas, T. and Aghajanian, G. (2000) Serotonin 5-HT(2) receptors activate local GABA inhibitory inputs to serotonergic neurons of the dorsal raphe nucleus. *Brain Res*, **873**, 34-45.

Liu, R.J., van den Pol, A.N. and Aghajanian, G.K. (2002) Hypocretins (orexins) regulate serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus by excitatory direct and inhibitory indirect actions. *J Neurosci*, **22**, 9453-9464.

Liu, Z.W. and Gao, X.B. (2007) Adenosine inhibits activity of hypocretin/orexin neurons by the A1 receptor in the lateral hypothalamus: a possible sleep-promoting effect. *J Neurophysiol*, **97**, 837-848.

Louie, K. and Wilson, M.A. (2001) Temporally structured replay of awake hippocampal ensemble activity during rapid eye movement sleep. *Neuron*, **29**, 145-156.

Lu, J., Shiromani, P. and Saper, C.B. (1999) Retinal input to the sleep-active ventrolateral preoptic nucleus in the rat. *Neuroscience*, **93**, 209-214.

Lu, J., Greco, M.A., Shiromani, P. and Saper, C.B. (2000) Effect of lesions of the ventrolateral preoptic nucleus on NREM and REM sleep. *J Neurosci*, **20**, 3830-3842.

Lu, J., Bjorkum, A.A., Xu, M., Gaus, S.E., Shiromani, P.J. and Saper, C.B. (2002) Selective activation of the extended ventrolateral preoptic nucleus during rapid eye movement sleep. *J Neurosci*, **22**, 4568-4576.

Lu, J., Jhou, T.C. and Saper, C.B. (2006a) Identification of wake-active dopaminergic neurons in the ventral periaqueductal gray matter. *J Neurosci*, **26**, 193-202.

Lu, J., Sherman, D., Devor, M. and Saper, C.B. (2006b) A putative flip-flop switch for control of REM sleep. *Nature*, **441**, 589-594.

Luppi, P.H., Sakai, K., Fort, P., Salvert, D. and Jouvet, M. (1988) The nuclei of origin of monoaminergic, peptidergic, and cholinergic afferents to the cat nucleus reticularis magnocellularis: a double-labeling study with cholera toxin as a retrograde tracer. *J Comp Neurol*, **277**, 1-20.

Luppi, P.H., Aston-Jones, G., Akaoka, H., Chouvet, G. and Jouvet, M. (1995) Afferent projections to the rat locus coeruleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing with cholera-toxin B subunit and Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *Neuroscience*, **65**, 119-160.

Luppi, P.H., Peyron, C., Rampon, C., gervasoni, D., Barbagli, B., Boissard, R. and Fort, P. (1998) Inhibitory mechanisms in the dorsal raphe nucleus and locus coeruleus during sleep. In *Handbook of Behavioral State Control* (Lydic, R. and Baghdoyan, H.A., eds). Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 195–211.

Luppi, P.H., Boissard, R., Gervasoni, D., Verret, L., Goutagny, R., Peyron, C., Salvert, D., Leger, L., Barbagli, B. and Fort, P. (2004) The network responsible for paradoxical sleep onset and maintenance: a new theory based on the head-restrained rat model. In *Sleep: Circuits and Function* (Luppi, P.H., ed. Boca Raton, FL: CRC Press, p. 272.

Luppi, P.H., Gervasoni, D., Verret, L., Goutagny, R., Peyron, C., Salvert, D., Leger, L. and Fort, P. (2006) Paradoxical (REM) sleep genesis: the switch from an aminergic-cholinergic to a GABAergic-glutamatergic hypothesis. *J Physiol Paris*, **100**, 271-283.

Luppi, P.H., Clément, O., Sapin, E., Gervasoni, D., Peyron, C., Leger, L., Salvert, D. and Fort, P. (2011) The neuronal network responsible for paradoxical sleep and its dysfunctions causing narcolepsy and rapid eye movement (REM) behavior disorder. *Sleep Med Rev*, **15**, 153-163.

Mahowald, M.W. and Schenck, C.H., eds. (2000) *REM sleep behavior disorder.* Principles and practice of sleep medicine.

Maloney, K.J., Mainville, L. and Jones, B.E. (1999) Differential c-Fos expression in cholinergic, monoaminergic, and GABAergic cell groups of the pontomesencephalic tegmentum after paradoxical sleep deprivation and recovery. *J Neurosci*, **19**, 3057-3072.

Maloney, K.J., Mainville, L. and Jones, B.E. (2000) c-Fos expression in GABAergic, serotonergic, and other neurons of the pontomedullary reticular formation and raphe after paradoxical sleep deprivation and recovery. *J Neurosci*, **20**, 4669-4679.

Maloney, K.J., Mainville, L. and Jones, B.E. (2002) c-Fos expression in dopaminergic and GABAergic neurons of the ventral mesencephalic tegmentum after paradoxical sleep deprivation and recovery. *Eur J Neurosci*, **15**, 774-778.

Manns, I.D., Mainville, L. and Jones, B.E. (2001) Evidence for glutamate, in addition to acetylcholine and GABA, neurotransmitter synthesis in basal forebrain neurons projecting to the entorhinal cortex. *Neuroscience*, **107**, 249-263.

Maquet, P., Peters, J., Aerts, J., Delfiore, G., Degueldre, C., Luxen, A. and Franck, G. (1996) Functional neuroanatomy of human rapid-eye-movement sleep and dreaming. *Nature*, **383**, 163-166.

Maquet, P., Laureys, S., Peigneux, P., Fuchs, S., Petiau, C., Phillips, C., Aerts, J., Del Fiore, G., Degueldre, C., Meulemans, T., Luxen, A., Franck, G., Van Der Linden, M., Smith, C. and Cleeremans, A. (2000) Experience-dependent changes in cerebral activation during human REM sleep. *Nat Neurosci*, **3**, 831-836.

Maquet, P. (2001) The role of sleep in learning and memory. *Science*, **294**, 1048-1052.

Marcus, J.N., Aschkenasi, C.J., Lee, C.E., Chemelli, R.M., Saper, C.B., Yanagisawa, M. and Elmquist, J.K. (2001) Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *J Comp Neurol*, **435**, 6-25.

Marinesco, S., Bonnet, C. and Cespuglio, R. (1999) Influence of stress duration on the sleep rebound induced by immobilization in the rat: a possible role for corticosterone. *Neuroscience*, **92**, 921-933.

Marini, G., Macchi, G. and Mancia, M. (1992) Potentiation of electroencephalographic spindles by ibotenate microinjections into nucleus reticularis thalami of cats. *Neuroscience*, **51**, 759-762.

Marshel, J.H., Mori, T., Nielsen, K.J. and Callaway, E.M. (2010) Targeting single neuronal networks for gene expression and cell labeling in vivo. *Neuron*, **67**, 562-574.

Martin, J.H. (1991) The collective electric behavior of cortical neurons: the electroencephalogram and the mechanism of epilepsy. In *Principles of neural science* (Kandel, E.R., Schwartz, J.H. and Jessel, T.M., eds). Amsterdam: Elseiver, pp. 761-775.

Matsuo, S., Jang, I.S., Nabekura, J. and Akaike, N. (2003) alpha 2-Adrenoceptor-mediated presynaptic modulation of GABAergic transmission in mechanically dissociated rat ventrolateral preoptic neurons. *J Neurophysiol*, **89**, 1640-1648.

McCarley, R.W. and Hobson, J.A. (1975) Neuronal excitability modulation over the sleep cycle: a structural and mathematical model. *Science*, **189**, 58-60.

McCormick, D.A. (1989) Cholinergic and noradrenergic modulation of thalamocortical processing. *Trends Neurosci*, **12**, 215-221.

McDermott, C.M., LaHoste, G.J., Chen, C., Musto, A., Bazan, N.G. and Magee, J.C. (2003) Sleep deprivation causes behavioral, synaptic, and membrane excitability alterations in hippocampal neurons. *J Neurosci*, **23**, 9687-9695.

McGinty, D., Alam, M.N., Szymusiak, R., Nakao, M. and Yamamoto, M. (2001) Hypothalamic sleep-promoting mechanisms: coupling to thermoregulation. *Arch Ital Biol*, **139**, 63-75.

McGinty, D.J. and Harper, R.M. (1976) Dorsal raphe neurons: depression of firing during sleep in cats. *Brain Res*, **101**, 569-575.

Mesulam, M.M., Mufson, E.J., Wainer, B.H. and Levey, A.I. (1983) Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). *Neuroscience*, **10**, 1185-1201.

Mileykovskiy, B.Y., Kiyashchenko, L.I. and Siegel, J.M. (2005) Behavioral correlates of activity in identified hypocretin/orexin neurons. *Neuron*, **46**, 787-798.

Mochizuki, T., Yamatodani, A., Okakura, K., Horii, A., Inagaki, N. and Wada, H. (1992) Circadian rhythm of histamine release from the hypothalamus of freely moving rats. *Physiol Behav*, **51**, 391-394.

Modirrousta, M., Mainville, L. and Jones, B.E. (2005) Orexin and MCH neurons express c-Fos differently after sleep deprivation vs. recovery and bear different adrenergic receptors. *Eur J Neurosci*, **21**, 2807-2816.

Morales, F.R., Sampogna, S., Yamuy, J. and Chase, M.H. (1999) c-fos expression in brainstem premotor interneurons during cholinergically induced active sleep in the cat. *J Neurosci*, **19**, 9508-9518.

Morales, F.R., Sampogna, S., Rampon, C., Luppi, P.H. and Chase, M.H. (2006) Brainstem glycinergic neurons and their activation during active (rapid eye movement) sleep in the cat. *Neuroscience*, **142**, 37-47.

Morgan, J.I. and Curran, T. (1986) Role of ion flux in the control of c-fos expression. *Nature*, **322**, 552-555.

Moruzzi, G. and Magoun, H.W. (1949) Brain stem reticular formation and activation of the EEG. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, **1**, 455-473.

Muraki, Y., Yamanaka, A., Tsujino, N., Kilduff, T.S., Goto, K. and Sakurai, T. (2004) Serotonergic regulation of the orexin/hypocretin neurons through the 5-HT1A receptor. *J Neurosci*, **24**, 7159-7166.

Murphy, J.A., Deurveilher, S. and Semba, K. (2003) Stimulant doses of caffeine induce c-FOS activation in orexin/hypocretin-containing neurons in rat. *Neuroscience*, **121**, 269-275.

Nauta, W.J. (1946) Hypothalamic regulation of sleep in rats; an experimental study. *J Neurophysiol*, **9**, 285-316.

Ni, B., Wu, X., Yan, G.M., Wang, J. and Paul, S.M. (1995) Regional expression and cellular localization of the Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter of rat brain. *J Neurosci*, **15**, 5789-5799.

Nishida, M., Pearsall, J., Buckner, R.L. and Walker, M.P. (2009) REM sleep, prefrontal theta, and the consolidation of human emotional memory. *Cereb Cortex*, **19**, 1158-1166.

Nitz, D. and Siegel, J.M. (1996) GABA release in posterior hypothalamus across sleep-wake cycle. *Am J Physiol*, **271**, R1707-1712.

Nitz, D. and Siegel, J. (1997a) GABA release in the dorsal raphe nucleus: role in the control of REM sleep. *Am J Physiol*, **273**, R451-455.

Nitz, D. and Siegel, J.M. (1997b) GABA release in the locus coeruleus as a function of sleep/wake state. *Neuroscience*, **78**, 795-801.

Novak, C.M. and Nunez, A.A. (1998) Daily rhythms in Fos activity in the rat ventrolateral preoptic area and midline thalamic nuclei. *Am J Physiol*, **275**, R1620-1626.

Novak, C.M. and Nunez, A.A. (2000) A sparse projection from the suprachiasmatic nucleus to the sleep active ventrolateral preoptic area in the rat. *Neuroreport*, **11**, 93-96.

Nygren, L.G. and Olson, L. (1977) A new major projection from locus coeruleus: the main source of noradrenergic nerve terminals in the ventral and dorsal columns of the spinal cord. *Brain Res*, **132**, 85-93.

Ohtake, T. (1992) Ascending projections from the gigantocellular reticular and dorsal paragigantocellular nuclei of the medulla oblongata in the rat: an anterograde PHA-L tracing study. *Neurosci Res*, **14**, 96-116.

Oishi, Y., Huang, Z.L., Fredholm, B.B., Urade, Y. and Hayaishi, O. (2008) Adenosine in the tuberomammillary nucleus inhibits the histaminergic system via A1 receptors and promotes non-rapid eye movement sleep. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 19992-19997.

Olson, L. and Fuxe, K. (1971) On the projections from the locus coeruleus noradrealine neurons: the cerebellar innervation. *Brain Res*, **28**, 165-171.

Onoe, H. and Sakai, K. (1995) Kainate receptors: a novel mechanism in paradoxical (REM) sleep generation. *Neuroreport*, **6**, 353-356.

Panula, P., Yang, H.Y. and Costa, E. (1984) Histamine-containing neurons in the rat hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 2572-2576.

Panula, P., Pirvola, U., Auvinen, S. and Airaksinen, M.S. (1989) Histamine-immunoreactive nerve fibers in the rat brain. *Neuroscience*, **28**, 585-610.

Pare, D., Steriade, M., Deschenes, M. and Oakson, G. (1987) Physiological characteristics of anterior thalamic nuclei, a group devoid of inputs from reticular thalamic nucleus. *J Neurophysiol*, **57**, 1669-1685.

Pare, D., Quirk, G.J. and Ledoux, J.E. (2004) New vistas on amygdala networks in conditioned fear. *J Neurophysiol*, **92**, 1-9.

Parmentier, R., Ohtsu, H., Djebbara-Hannas, Z., Valatx, J.L., Watanabe, T. and Lin, J.S. (2002) Anatomical, physiological, and pharmacological characteristics of histidine decarboxylase knock-out mice: evidence for the role of brain histamine in behavioral and sleep-wake control. *J Neurosci*, **22**, 7695-7711.

Petitjean, F., Buda, C., Janin, M., Sallanon, M. and Jouvet, M. (1985) [Insomnia caused by administration of para-chlorophenylalanine: reversibility by peripheral or central injection of 5-hydroxytryptophan and serotonin]. *Sleep*, **8**, 56-67.

Peyron, C., Luppi, P.H., Fort, P., Rampon, C. and Jouvet, M. (1996) Lower brainstem catecholamine afferents to the rat dorsal raphe nucleus. *J Comp Neurol*, **364**, 402-413.

Peyron, C., Tighe, D.K., van den Pol, A.N., de Lecea, L., Heller, H.C., Sutcliffe, J.G. and Kilduff, T.S. (1998) Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci*, **18**, 9996-10015.

Peyron, C., Faraco, J., Rogers, W., Ripley, B., Overeem, S., Charnay, Y., Nevsimalova, S., Aldrich, M., Reynolds, D., Albin, R., Li, R., Hungs, M., Pedrazzoli, M., Padigaru, M., Kucherlapati, M., Fan, J., Maki, R., Lammers, G.J., Bouras, C., Kucherlapati, R., Nishino, S. and Mignot, E. (2000) A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nat Med*, **6**, 991-997.

Peyron, C., Sapin, E., Leger, L., Luppi, P.H. and Fort, P. (2009) Role of the melanin-concentrating hormone neuropeptide in sleep regulation. *Peptides*, **30**, 2052-2059.

Piper, D.C., Upton, N., Smith, M.I. and Hunter, A.J. (2000) The novel brain neuropeptide, orexin-A, modulates the sleep-wake cycle of rats. *Eur J Neurosci*, **12**, 726-730.

Pollock, M.S. and Mistlberger, R.E. (2003) Rapid eye movement sleep induction by microinjection of the GABA-A antagonist bicuculline into the dorsal subcoeruleus area of the rat. *Brain Res*, **962**, 68-77.

Porkka-Heiskanen, T., Strecker, R.E., Thakkar, M., Bjorkum, A.A., Greene, R.W. and McCarley, R.W. (1997) Adenosine: a mediator of the sleep-inducing effects of prolonged wakefulness. *Science*, **276**, 1265-1268.

Porkka-Heiskanen, T. and Kalinchuk, A.V. (2011) Adenosine, energy metabolism and sleep homeostasis. *Sleep Med Rev*, **15**, 123-135.

Python, A., Steimer, T., de Saint Hilaire, Z., Mikolajewski, R. and Nicolaidis, S. (2001) Extracellular serotonin variations during vigilance states in the preoptic area of rats: a microdialysis study. *Brain Res*, **910**, 49-54.

Qu, D., Ludwig, D.S., Gammeltoft, S., Piper, M., Pelleymounter, M.A., Cullen, M.J., Mathes, W.F., Przypek, R., Kanarek, R. and Maratos-Flier, E. (1996) A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature*, **380**, 243-247.

Rainnie, D.G., Grunze, H.C., McCarley, R.W. and Greene, R.W. (1994) Adenosine inhibition of mesopontine cholinergic neurons: implications for EEG arousal. *Science*, **263**, 689-692.

Rampon, C., Peyron, C., Petit, J.M., Fort, P., Gervasoni, D. and Luppi, P.H. (1996) Origin of the glycinergic innervation of the rat trigeminal motor nucleus. *Neuroreport*, **7**, 3081-3085.

Ranson, S.W. (1939) Somnolence caused by hypothalamic lesions in the monkey. *Arch Neurol Psychiatry*, **41**, 1-23.

Rao, Y., Lu, M., Ge, F., Marsh, D.J., Qian, S., Wang, A.H., Picciotto, M.R. and Gao, X.B. (2008) Regulation of synaptic efficacy in hypocretin/orexin-containing neurons by melanin concentrating hormone in the lateral hypothalamus. *J Neurosci*, **28**, 9101-9110.

Ravassard, P. (2009) Etude du rôle du sommeil paradoxal dans la plasticité synaptique des neurones pyramidaux de l'hippocampe de rat, Lyon: Université Claude Bernard Lyon1.

Ravassard, P., Pachoud, B., Comte, J.C., Mejia-Perez, C., Scote-Blachon, C., Gay, N., Claustrat, B., Touret, M., Luppi, P.H. and Salin, P.A. (2009) Paradoxical (REM) sleep deprivation causes a large and rapidly reversible decrease in long-term potentiation, synaptic transmission, glutamate receptor protein levels, and ERK/MAPK activation in the dorsal hippocampus. *Sleep*, **32**, 227-240.

Rechtschaffen, A., Bergmann, B.M., Everson, C.A., Kushida, C.A. and Gilliland, M.A. (1989) Sleep deprivation in the rat: X. Integration and discussion of the findings. *Sleep*, **12**, 68-87.

Rechtschaffen, A. and Bergmann, B.M. (2002) Sleep deprivation in the rat: an update of the 1989 paper. *Sleep*, **25**, 18-24.

Renouard, L., Fort, P., Ogawa, K., Camargo, N., Abdelkarim, M., Lakhdarchaouche, Y., Gay, N., Scoté, C., Touré, R., Ravassard, P., Salvert, D., Peyron, C., Salin, P.A., Claustrat, B., Leger, L. and Luppi, P.H. (2010) Increased gene expression in the dentate gyrus during paradoxical (REM) sleep as revealed by cDNA microarray, qPCR and immunohistochemistry *SfN (Abstract)*.

Ribeiro, S., Mello, C.V., Velho, T., Gardner, T.J., Jarvis, E.D. and Pavlides, C. (2002) Induction of hippocampal long-term potentiation during waking leads to increased extrahippocampal zif-268 expression during ensuing rapid-eye-movement sleep. *J Neurosci*, **22**, 10914-10923.

Roffwarg, H.P., Muzio, J.N. and Dement, W.C. (1966) Ontogenetic development of the human sleep-dream cycle. *Science*, **152**, 604-619.

Ross, R.J., Gresch, P.J., Ball, W.A., Sanford, L.D. and Morrison, A.R. (1995) REM sleep inhibition by desipramine: evidence for an alpha-1 adrenergic mechanism. *Brain Res*, **701**, 129-134.

Saint-Mleux, B., Eggermann, E., Bisetti, A., Bayer, L., Machard, D., Jones, B.E., Muhlethaler, M. and Serafin, M. (2004) Nicotinic enhancement of the noradrenergic inhibition of sleep-promoting neurons in the ventrolateral preoptic area. *J Neurosci*, **24**, 63-67.

Saint-Mleux, B., Bayer, L., Eggermann, E., Jones, B.E., Muhlethaler, M. and Serafin, M. (2007) Suprachiasmatic modulation of noradrenaline release in the ventrolateral preoptic nucleus. *J Neurosci*, **27**, 6412-6416.

Sakai, K., Kanamori, N. and Jouvet, M. (1979) [Neuronal activity specific to paradoxical sleep in the bulbar reticular formation in the unrestrained cat]. *C R Seances Acad Sci D*, **289**, 557-561.

Sakai, K., Sastre, J.P., Kanamori, N. and Jouvet, M. (1981) State-specific neurones in the ponto-medullary reticular formation with special reference to the postural atonia during paradoxical sleep in the cat. In *Brain mechanisms of perceptual awareness and purposeful behavior* (Pompeiano, O. and Aimone Marsan, C., eds). New York: Raven Press, pp. 405-429.

Sakai, K., El Mansari, M., Lin, J.S., Zhang, J.G. and Vanni-Mercier, G. (1990) The posterior Hypothalamus in the Regulation of Wakefulness and Paradoxical Sleep. In *The Diencephalon and sleep* (Mancia, M. and Marini, G., eds). New York: Raven Press.

Sakai, K. and Koyama, Y. (1996) Are there cholinergic and non-cholinergic paradoxical sleep-on neurones in the pons? *Neuroreport*, **7**, 2449-2453.

Sakai, K., Crochet, S. and Onoe, H. (2001) Pontine structures and mechanisms involved in the generation of paradoxical (REM) sleep. *Arch Ital Biol*, **139**, 93-107.

Sakai, K. (2011) Sleep-waking discharge profiles of dorsal raphe nucleus neurons in mice. *Neuroscience*.

Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R.M., Tanaka, H., Williams, S.C., Richardson, J.A., Kozlowski, G.P., Wilson, S., Arch, J.R., Buckingham, R.E., Haynes, A.C., Carr, S.A., Annan, R.S., McNulty, D.E., Liu, W.S., Terrett, J.A., Elshourbagy, N.A., Bergsma, D.J. and Yanagisawa, M. (1998a) Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*, **92**, 573-585.

Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R.M., Tanaka, H., Williams, S.C., Richarson, J.A., Kozlowski, G.P., Wilson, S., Arch, J.R., Buckingham, R.E., Haynes, A.C., Carr, S.A., Annan, R.S., McNulty, D.E., Liu, W.S., Terrett, J.A., Elshourbagy, N.A., Bergsma, D.J. and Yanagisawa, M. (1998b) Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*, **92**, 1 page following 696.

Sakurai, T., Nagata, R., Yamanaka, A., Kawamura, H., Tsujino, N., Muraki, Y., Kageyama, H., Kunita, S., Takahashi, S., Goto, K., Koyama, Y., Shioda, S. and Yanagisawa, M. (2005) Input of orexin/hypocretin neurons revealed by a genetically encoded tracer in mice. *Neuron*, **46**, 297-308.

Sallanon, M., Denoyer, M., Kitahama, K., Aubert, C., Gay, N. and Jouvet, M. (1989) Long-lasting insomnia induced by preoptic neuron lesions and its transient reversal by muscimol injection into the posterior hypothalamus in the cat. *Neuroscience*, **32**, 669-683.

Sanford, L.D., Tang, X., Xiao, J., Ross, R.J. and Morrison, A.R. (2003) GABAergic regulation of REM sleep in reticularis pontis oralis and caudalis in rats. *J Neurophysiol*, **90**, 938-945.

Saper, C.B., Chou, T.C. and Scammell, T.E. (2001) The sleep switch: hypothalamic control of sleep and wakefulness. *Trends Neurosci*, **24**, 726-731.

Saper, C.B., Fuller, P.M., Pedersen, N.P., Lu, J. and Scammell, T.E. (2010) Sleep state switching. *Neuron*, **68**, 1023-1042.

Sapin, E. (2009) Etude anatomique des réseaux neuronaux impliqués dans la régulation du sommeil paradoxal chez le rat, Lyon: Université Claude Bernard Lyon1.

Sapin, E., Lapray, D., Berod, A., Goutagny, R., Leger, L., Ravassard, P., Clément, O., Hanriot, L., Fort, P. and Luppi, P.H. (2009) Localization of the brainstem GABAergic neurons controlling paradoxical (REM) sleep. *PLoS One*, **4**, e4272.

Sapin, E., Berod, A., Leger, L., Herman, P.A., Luppi, P.H. and Peyron, C. (2010) A very large number of GABAergic neurons are activated in the tuberal hypothalamus during paradoxical (REM) sleep hypersomnia. *PLoS One*, **5**, e11766.

Sastre, J.P. and Jouvet, M. (1979) [Oneiric behavior in cats]. *Physiol Behav*, **22**, 979-989.

Sastre, J.P., Sakai, K. and Jouvet, M. (1979) [Persistence of paradoxical sleep in the cat after destruction of the pontine gagantocellular tegmental field with kainic acid]. *C R Seances Acad Sci D*, **289**, 959-964.

Sastre, J.P., Sakai, K. and Jouvet, M. (1981) Are the gigantocellular tegmental field neurons responsible for paradoxical sleep? *Brain Res*, **229**, 147-161.

Sastre, J.P., Buda, C., Kitahama, K. and Jouvet, M. (1996) Importance of the ventrolateral region of the periaqueductal gray and adjacent tegmentum in the control of paradoxical sleep as studied by muscimol microinjections in the cat. *Neuroscience*, **74**, 415-426.

Satoh, K. and Fibiger, H.C. (1986) Cholinergic neurons of the laterodorsal tegmental nucleus: efferent and afferent connections. *J Comp Neurol*, **253**, 277-302.

Saxe, M.D., Battaglia, F., Wang, J.W., Malleret, G., David, D.J., Monckton, J.E., Garcia, A.D., Sofroniew, M.V., Kandel, E.R., Santarelli, L., Hen, R. and Drew, M.R. (2006) Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 17501-17506.

Scammell, T.E., Estabrooke, I.V., McCarthy, M.T., Chemelli, R.M., Yanagisawa, M., Miller, M.S. and Saper, C.B. (2000) Hypothalamic arousal regions are activated during modafinil-induced wakefulness. *J Neurosci*, **20**, 8620-8628.

Scammell, T.E., Gerashchenko, D.Y., Mochizuki, T., McCarthy, M.T., Estabrooke, I.V., Sears, C.A., Saper, C.B., Urade, Y. and Hayaishi, O. (2001) An adenosine A2a agonist increases sleep and induces Fos in ventrolateral preoptic neurons. *Neuroscience*, **107**, 653-663.

Scammell, T.E., Willie, J.T., Guilleminault, C. and Siegel, J.M. (2009) A consensus definition of cataplexy in mouse models of narcolepsy. *Sleep*, **32**, 111-116.

Schenck, C.H., Bundlie, S.R., Ettinger, M.G. and Mahowald, M.W. (1986) Chronic behavioral disorders of human REM sleep: a new category of parasomnia. *Sleep*, **9**, 293-308.

Schmidt, M.H., Valatx, J.L., Schmidt, H.S., Wauquier, A. and Jouvet, M. (1994) Experimental evidence of penile erections during paradoxical sleep in the rat. *Neuroreport*, **5**, 561-564.

Schmidt, M.H., Gervasoni, D., Luppi, P.H. and Fort, P. (2002) The ventrolateral preoptic area: role and origin of cholinergic input in the control of wakefulness and penile erections. *Sleep*, **25(Suppl.)**, 52.

Schmidt, M.H., Gervasoni, D., Luppi, P.H. and Fort, P. (2003) Quantitative analysis of cholinergic afferents to the ventrolateral preoptic area: role in waking mechanisms. *Sleep*, **26(Suppl.)**, 0089.

Semba, K. and Fibiger, H.C. (1992) Afferent connections of the laterodorsal and the pedunculopontine tegmental nuclei in the rat: a retro- and antero-grade transport and immunohistochemical study. *J Comp Neurol*, **323**, 387-410.

Shaffery, J.P., Oksenberg, A., Marks, G.A., Speciale, S.G., Mihailoff, G. and Roffwarg, H.P. (1998) REM sleep deprivation in monocularly occluded kittens reduces the size of cells in LGN monocular segment. *Sleep*, **21**, 837-845.

Sherin, J.E., Shiromani, P.J., McCarley, R.W. and Saper, C.B. (1996) Activation of ventrolateral preoptic neurons during sleep. *Science*, **271**, 216-219.

Sherin, J.E., Elmquist, J.K., Torrealba, F. and Saper, C.B. (1998) Innervation of histaminergic tuberomammillary neurons by GABAergic and galaninergic neurons in the ventrolateral preoptic nucleus of the rat. *J Neurosci*, **18**, 4705-4721.

Shipley, M.T., Fu, L., Ennis, M., Liu, W.L. and Aston-Jones, G. (1996) Dendrites of locus coeruleus neurons extend preferentially into two pericoerulear zones. *J Comp Neurol*, **365**, 56-68.

Shiromani, P.J. and Fishbein, W. (1986) Continuous pontine cholinergic microinfusion via mini-pump induces sustained alterations in rapid eye movement (REM) sleep. *Pharmacol Biochem Behav*, **25**, 1253-1261.

Shiromani, P.J., Winston, S. and McCarley, R.W. (1996) Pontine cholinergic neurons show Fos-like immunoreactivity associated with cholinergically induced REM sleep. *Brain Res Mol Brain Res*, **38**, 77-84.

Shors, T.J., Miesegaes, G., Beylin, A., Zhao, M., Rydel, T. and Gould, E. (2001) Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature*, **410**, 372-376.

Shouse, M.N. and Siegel, J.M. (1992) Pontine regulation of REM sleep components in cats: integrity of the pedunculopontine tegmentum (PPT) is important for phasic events but unnecessary for atonia during REM sleep. *Brain Res*, **571**, 50-63.

Siegel, J.M., Wheeler, R.L. and McGinty, D.J. (1979) Activity of medullary reticular formation neurons in the unrestrained cat during waking and sleep. *Brain Res*, **179**, 49-60.

Siegel, J.M. (2001) The REM sleep-memory consolidation hypothesis. *Science*, **294**, 1058-1063.

Siriex, C. (2011) Rôle du noyau paragigantocellulaire latéral dans le réseau du sommeil paradoxal chez le rat, Lyon: Université Claude Bernard Lyon 1.

Smart, D. and Jerman, J. (2002) The physiology and pharmacology of the orexins. *Pharmacol Ther*, **94**, 51-61.

Smith, C. (1985) Sleep states and learning: a review of the animal literature. *Neurosci Biobehav Rev*, **9**, 157-168.

Smith, C. and Rose, G.M. (1996) Evidence for a paradoxical sleep window for place learning in the Morris water maze. *Physiol Behav*, **59**, 93-97.

Smith, C. and Rose, G.M. (1997) Posttraining paradoxical sleep in rats is increased after spatial learning in the Morris water maze. *Behav Neurosci*, **111**, 1197-1204.

Soja, P.J., Lopez-Rodriguez, F., Morales, F.R. and Chase, M.H. (1991) The postsynaptic inhibitory control of lumbar motoneurons during the atonia of active sleep: effect of strychnine on motoneuron properties. *J Neurosci*, **11**, 2804-2811.

Soja, P.J., Pang, W., Taepavarapruk, N. and McErlane, S.A. (2001) Spontaneous spike activity of spinoreticular tract neurons during sleep and wakefulness. *Sleep*, **24**, 18-25.

Stancovski, I., Gonen, H., Orian, A., Schwartz, A.L. and Ciechanover, A. (1995) Degradation of the proto-oncogene product c-Fos by the ubiquitin proteolytic system in vivo and in vitro: identification and characterization of the conjugating enzymes. *Mol Cell Biol*, **15**, 7106-7116.

Steininger, T.L., Alam, M.N., Gong, H., Szymusiak, R. and McGinty, D. (1999) Sleep-waking discharge of neurons in the posterior lateral hypothalamus of the albino rat. *Brain Res*, **840**, 138-147.

Steininger, T.L., Gong, H., McGinty, D. and Szymusiak, R. (2001) Subregional organization of preoptic area/anterior hypothalamic projections to arousal-related monoaminergic cell groups. *J Comp Neurol*, **429**, 638-653.

Stenberg, D., Litonius, E., Halldner, L., Johansson, B., Fredholm, B.B. and Porkka-Heiskanen, T. (2003) Sleep and its homeostatic regulation in mice lacking the adenosine A1 receptor. *J Sleep Res*, **12**, 283-290.

Steriade, M., Deschenes, M., Domich, L. and Mulle, C. (1985) Abolition of spindle oscillations in thalamic neurons disconnected from nucleus reticularis thalami. *J Neurophysiol*, **54**, 1473-1497.

Steriade, M., McCormick, D.A. and Sejnowski, T.J. (1993) Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain. *Science*, **262**, 679-685.

Steriade, M. (2000) Corticothalamic resonance, states of vigilance and mentation. *Neuroscience*, **101**, 243-276.

Sterman, M.B. and Clemente, C.D. (1962a) Forebrain inhibitory mechanisms: sleep patterns induced by basal forebrain stimulation in the behaving cat. *Exp Neurol*, **6**, 103-117.

Sterman, M.B. and Clemente, C.D. (1962b) Forebrain inhibitory mechanisms: cortical synchronization induced by basal forebrain stimulation. *Exp Neurol*, **6**, 91-102.

Stoeckel, K., Schwab, M. and Thoenen, H. (1977) Role of gangliosides in the uptake and retrograde axonal transport of cholera and tetanus toxin as compared to nerve growth factor and wheat germ agglutinin. *Brain Res*, **132**, 273-285.

Sun, X., Whitefield, S., Rusak, B. and Semba, K. (2001) Electrophysiological analysis of suprachiasmatic nucleus projections to the ventrolateral preoptic area in the rat. *Eur J Neurosci*, **14**, 1257-1274.

Suntsova, N., Szymusiak, R., Alam, M.N., Guzman-Marin, R. and McGinty, D. (2002) Sleep-waking discharge patterns of median preoptic nucleus neurons in rats. *J Physiol*, **543**, 665-677.

Suntsova, N., Guzman-Marin, R., Kumar, S., Alam, M.N., Szymusiak, R. and McGinty, D. (2007) The median preoptic nucleus reciprocally modulates activity of arousal-related and sleep-related neurons in the perifornical lateral hypothalamus. *J Neurosci*, **27**, 1616-1630.

Swanson, L.W. and Hartman, B.K. (1975) The central adrenergic system. An immunofluorescence study of the location of cell bodies and their efferent connections in the rat utilizing dopamine-beta-hydroxylase as a marker. *J Comp Neurol*, **163**, 467-505.

Szymusiak, R., Alam, N., Steininger, T.L. and McGinty, D. (1998) Sleep-waking discharge patterns of ventrolateral preoptic/anterior hypothalamic neurons in rats. *Brain Res*, **803**, 178-188.

Szymusiak, R. and McGinty, D. (2008) Hypothalamic regulation of sleep and arousal. *Ann N Y Acad Sci*, **1129**, 275-286.

Taepavarapruk, N., Taepavarapruk, P., John, J., Lai, Y.Y., Siegel, J.M., Phillips, A.G., McErlane, S.A. and Soja, P.J. (2008) State-dependent changes in glutamate, glycine, GABA, and dopamine levels in cat lumbar spinal cord. *J Neurophysiol*, **100**, 598-608.

Taguchi, O., Kubin, L. and Pack, A.I. (1992) Evocation of postural atonia and respiratory depression by pontine carbachol in the decerebrate rat. *Brain Res*, **595**, 107-115.

Takahashi, K., Lin, J.S. and Sakai, K. (2006) Neuronal activity of histaminergic tuberomammillary neurons during wake-sleep states in the mouse. *J Neurosci*, **26**, 10292-10298.

Takahashi, K., Lin, J.S. and Sakai, K. (2009) Characterization and mapping of sleep-waking specific neurons in the basal forebrain and preoptic hypothalamus in mice. *Neuroscience*, **161**, 269-292.

Takahashi, K., Kayama, Y., Lin, J.S. and Sakai, K. (2010) Locus coeruleus neuronal activity during the sleep-waking cycle in mice. *Neuroscience*, **169**, 1115-1126.

Thannickal, T.C., Moore, R.Y., Nienhuis, R., Ramanathan, L., Gulyani, S., Aldrich, M., Cornford, M. and Siegel, J.M. (2000) Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. *Neuron*, **27**, 469-474.

Timofeev, I., Grenier, F. and Steriade, M. (2001) Disfacilitation and active inhibition in the neocortex during the natural sleep-wake cycle: an intracellular study. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 1924-1929.

Tononi, G., Pompeiano, M. and Cirelli, C. (1991) Suppression of desynchronized sleep through microinjection of the alpha 2-adrenergic agonist clonidine in the dorsal pontine tegmentum of the cat. *Pflugers Arch*, **418**, 512-518.

Torrealba, F., Yanagisawa, M. and Saper, C.B. (2003) Colocalization of orexin a and glutamate immunoreactivity in axon terminals in the tuberomammillary nucleus in rats. *Neuroscience*, **119**, 1033-1044.

Trojanowski, J.Q. (1983) Native and derivatized lectins for in vivo studies of neuronal connectivity and neuronal cell biology. *J Neurosci Methods*, **9**, 185-204.

Tsunematsu, T., Kilduff, T.S., Boyden, E.S., Takahashi, S., Tominaga, M. and Yamanaka, A. (2011) Acute optogenetic silencing of orexin/hypocretin neurons induces slow-wave sleep in mice. *J Neurosci*, **31**, 10529-10539.

Turrigiano, G.G., Leslie, K.R., Desai, N.S., Rutherford, L.C. and Nelson, S.B. (1998) Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons. *Nature*, **391**, 892-896.

Turrigiano, G.G. (2008) The self-tuning neuron: synaptic scaling of excitatory synapses. *Cell*, **135**, 422-435.

Urade, Y., Eguchi, N., Qu, W.M., Sakata, M., Huang, Z.L., Chen, J.F., Schwarzschild, M.A., Fink, J.S. and Hayaishi, O. (2003) Sleep regulation in adenosine A2A receptor-deficient mice. *Neurology*, **61**, S94-96.

Uschakov, A., Gong, H., McGinty, D. and Szymusiak, R. (2006) Sleep-active neurons in the preoptic area project to the hypothalamic paraventricular nucleus and perifornical lateral hypothalamus. *Eur J Neurosci*, **23**, 3284-3296.

Uschakov, A., Gong, H., McGinty, D. and Szymusiak, R. (2007) Efferent projections from the median preoptic nucleus to sleep- and arousal-regulatory nuclei in the rat brain. *Neuroscience*, **150**, 104-120.

Valatx, J.L., Roussel, B. and Cure, M. (1973) [Sleep and cerebral temperature in rat during chronic heat exposure]. *Brain Res*, **55**, 107-122.

Valatx, J.L. (2004) [The ontogeny and physiology confirms the dual nature of sleep states]. *Arch Ital Biol*, **142**, 569-580.

van den Pol, A.N., Acuna-Goycolea, C., Clark, K.R. and Ghosh, P.K. (2004) Physiological properties of hypothalamic MCH neurons identified with selective expression of reporter gene after recombinant virus infection. *Neuron*, **42**, 635-652.

Vanni-Mercier, G., Sakai, K., Lin, J.S. and Jouvet, M. (1989) Mapping of cholinoceptive brainstem structures responsible for the generation of paradoxical sleep in the cat. *Arch Ital Biol*, **127**, 133-164.

Vanni-Mercier, G., Gigout, S., Debilly, G. and Lin, J.S. (2003) Waking selective neurons in the posterior hypothalamus and their response to histamine H3-receptor ligands: an electrophysiological study in freely moving cats. *Behav Brain Res*, **144**, 227-241.

Velazquez-Moctezuma, J., Gillin, J.C. and Shiromani, P.J. (1989) Effect of specific M1, M2 muscarinic receptor agonists on REM sleep generation. *Brain Res*, **503**, 128-131.

Verret, L., Goutagny, R., Fort, P., Cagnon, L., Salvert, D., Leger, L., Boissard, R., Salin, P., Peyron, C. and Luppi, P.H. (2003) A role of melanin-concentrating hormone producing neurons in the central regulation of paradoxical sleep. *BMC Neurosci*, **4**, 19.

Verret, L., Leger, L., Fort, P. and Luppi, P.H. (2005) Cholinergic and noncholinergic brainstem neurons expressing Fos after paradoxical (REM) sleep deprivation and recovery. *Eur J Neurosci*, **21**, 2488-2504.

Verret, L., Fort, P., Gervasoni, D., Leger, L. and Luppi, P.H. (2006) Localization of the neurons active during paradoxical (REM) sleep and projecting to the locus coeruleus noradrenergic neurons in the rat. *J Comp Neurol*, **495**, 573-586.

Vertes, R.P. (1991) A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. *J Comp Neurol*, **313**, 643-668.

Vertes, R.P. and Kocsis, B. (1994) Projections of the dorsal raphe nucleus to the brainstem: PHA-L analysis in the rat. *J Comp Neurol*, **340**, 11-26.

Vetrivelan, R., Fuller, P.M., Tong, Q. and Lu, J. (2009) Medullary circuitry regulating rapid eye movement sleep and motor atonia. *J Neurosci*, **29**, 9361-9369.

Villablanca, J. (1966) Behavioral and polygraphic study of "sleep" and "wakefulness" in chronic decerebrate cats. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, **21**, 562-577.

Villablanca, J. (1974) Role of the thalamus in sleep: sleep-wakefulness in chronic diencephalic and athalamic cats. In *Basic sleep mechanisms* (Petre-QuadensetSchlag, O., ed. New York: Academic Press, pp. 51-78.

Vincent, S.R., Satoh, K., Armstrong, D.M., Panula, P., Vale, W. and Fibiger, H.C. (1986) Neuropeptides and NADPH-diaphorase activity in the ascending cholinergic reticular system of the rat. *Neuroscience*, **17**, 167-182.

von Economo, C. (1930) Sleep as a problem of localization. *The Journal of Nervous and Mental Disease*, **71**.

Vyazovskiy, V.V. and Tobler, I. (2005) Theta activity in the waking EEG is a marker of sleep propensity in the rat. *Brain Res*, **1050**, 64-71.

Walker, M.P. and van der Helm, E. (2009) Overnight therapy? The role of sleep in emotional brain processing. *Psychol Bull*, **135**, 731-748.

Walker, M.P. (2010) Sleep, memory and emotion. *Prog Brain Res*, **185**, 49-68.

Watanabe, T., Taguchi, Y., Shiosaka, S., Tanaka, J., Kubota, H., Terano, Y., Tohyama, M. and Wada, H. (1984) Distribution of the histaminergic neuron system in the central nervous system of rats; a fluorescent immunohistochemical analysis with histidine decarboxylase as a marker. *Brain Res*, **295**, 13-25.

Webster, H.H. and Jones, B.E. (1988) Neurotoxic lesions of the dorsolateral pontomesencephalic tegmentum-cholinergic cell area in the cat. II. Effects upon sleep-waking states. *Brain Res*, **458**, 285-302.

Wickersham, I.R., Lyon, D.C., Barnard, R.J., Mori, T., Finke, S., Conzelmann, K.K., Young, J.A. and Callaway, E.M. (2007) Monosynaptic restriction of transsynaptic tracing from single, genetically targeted neurons. *Neuron*, **53**, 639-647.

Willie, J.T., Chemelli, R.M., Sinton, C.M., Tokita, S., Williams, S.C., Kisanuki, Y.Y., Marcus, J.N., Lee, C., Elmquist, J.K., Kohlmeier, K.A., Leonard, C.S., Richardson, J.A., Hammer, R.E. and 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**, 715-730.

Willie, J.T., Sinton, C.M., Maratos-Flier, E. and Yanagisawa, M. (2008) Abnormal response of melanin-concentrating hormone deficient mice to fasting: hyperactivity and rapid eye movement sleep suppression. *Neuroscience*, **156**, 819-829.

Wilson, M.A. and McNaughton, B.L. (1994) Reactivation of hippocampal ensemble memories during sleep. *Science*, **265**, 676-679.

Woch, G., Davies, R.O., Pack, A.I. and Kubin, L. (1996) Behaviour of raphe cells projecting to the dorsomedial medulla during carbachol-induced atonia in the cat. *J Physiol*, **490 (Pt 3)**, 745-758.

Wong, D.L. and Tank, A.W. (2007) Stress-induced catecholaminergic function: transcriptional and post-transcriptional control. *Stress*, **10**, 121-130.

Xi, M.C., Morales, F.R. and Chase, M.H. (1999) Evidence that wakefulness and REM sleep are controlled by a GABAergic pontine mechanism. *J Neurophysiol*, **82**, 2015-2019.

Xi, M.C., Morales, F.R. and Chase, M.H. (2001a) Induction of wakefulness and inhibition of active (REM) sleep by GABAergic processes in the nucleus pontis oralis. *Arch Ital Biol*, **139**, 125-145.

Xi, M.C., Morales, F.R. and Chase, M.H. (2001b) The motor inhibitory system operating during active sleep is tonically suppressed by GABAergic mechanisms during other states. *J Neurophysiol*, **86**, 1908-1915.

Yamanaka, A., Tsujino, N., Funahashi, H., Honda, K., Guan, J.L., Wang, Q.P., Tominaga, M., Goto, K., Shioda, S. and Sakurai, T. (2002) Orexins activate histaminergic neurons via the orexin 2 receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, **290**, 1237-1245.

Yamuy, J., Mancillas, J.R., Morales, F.R. and Chase, M.H. (1993) C-fos expression in the pons and medulla of the cat during carbachol-induced active sleep. *J Neurosci*, **13**, 2703-2718.

Yamuy, J., Fung, S.J., Xi, M., Morales, F.R. and Chase, M.H. (1999) Hypoglossal motoneurons are postsynaptically inhibited during carbachol-induced rapid eye movement sleep. *Neuroscience*, **94**, 11-15.

Yang, Q.Z. and Hatton, G.I. (1997) Electrophysiology of excitatory and inhibitory afferents to rat histaminergic tuberomammillary nucleus neurons from hypothalamic and forebrain sites. *Brain Res*, **773**, 162-172.

Yizhar, O., Fenno, L.E., Davidson, T.J., Mogri, M. and Deisseroth, K. (2011) Optogenetics in neural systems. *Neuron*, **71**, 9-34.

Yoshida, K., McCormack, S., Espana, R.A., Crocker, A. and Scammell, T.E. (2006) Afferents to the orexin neurons of the rat brain. *J Comp Neurol*, **494**, 845-861.

Zepelin, H. (2000) Mammalian sleep. In *Principles and practice of sleep medicine* (Kryger, M.H., Roth, T. and Dement, W.C., eds). Philadelphia: Saunders, pp. 30-49.

Zimmerman, J.E., Naidoo, N., Raizen, D.M. and Pack, A.I. (2008) Conservation of sleep: insights from non-mammalian model systems. *Trends Neurosci*, **31**, 371-376.

RESUME

L'hypothalamus latéral contiendrait le générateur principal du sommeil paradoxal
Arguments neuroanatomiques et pharmacologiques chez le rat

Les mécanismes neurologiques responsables du déclenchement et de l'homéostasie du sommeil, et du sommeil paradoxal (SP) en particulier, sont l'objet d'un nombre toujours plus important d'études du fait notamment de l'attention croissante portée aux pathologies associées. Les travaux rapportés dans cette thèse s'inscrivent parfaitement dans cette dynamique puisqu'ils ont pour objectif de mieux caractériser les populations neuronales mises en jeu dans la régulation du SP ainsi que leurs interactions. Dans cette optique, nous avons combiné différentes approches techniques complémentaires à savoir : neuroanatomie fonctionnelle, polysomnographie et pharmacologie sur animal libre de se mouvoir.

Nous avons ainsi pu démontrer pour la première fois la nature glutamatergique des neurones du SLD, région pontique jouant un rôle central dans la mise en place du SP. De plus, s'il est généralement admis que ces neurones du SLD sont sous le contrôle de neurones GABAergiques situés au niveau de la partie ventrolatérale de la substance grise périaqueducale (VLPAG), le contrôle de ces derniers est encore soumis à controverse. Les résultats que nous avons obtenus suggèrent fortement que l'aire latérale de l'hypothalamus (LH) serait responsable de ce contrôle et donc de celui du SP. En effet, la LH est l'afférence majeure à la VLPAG activée lors d'une hypersomnie de SP. En outre, son inactivation par application locale de muscimol entraine la disparition totale du SP et l'activation des neurones GABAergiques de la VLPAG projetant sur le SLD.

En parallèle, nous avons étudié le rôle du noyau réticulé paragigantocellulaire dorsal (DPGi) dans la genèse du SP. Bien que le DPGi fût déjà connu pour être responsable de l'inhibition du locus coeruleus (LC) durant les phases de SP, nous apportons ici un certain nombre d'arguments suggérant que le DPGi pourrait être responsable de l'inhibition, non seulement du LC, mais également de l'ensemble des neurones adrénergiques et noradrénergiques. Cela suggère donc que ce noyau joue également un rôle majeur dans la régulation du SP.

Les données rapportées dans cette thèse permettent donc de mieux appréhender les mécanismes neuronaux contrôlant la survenue et la régulation du SP. En particulier, ils apportent de nouvelles données en faveur d'un rôle central de l'hypothalamus dans la régulation du SP puisqu'il constituerait le générateur principal de cet état.

Lateral hypothalamus would contains the primary PS generator: a neuroanatomical and pharmacological study

A growing number of studies investigate the neurological mechanisms responsible for paradoxical sleep (PS) genesis and homeostasis. The work presented in this thesis aims to better characterize the neuronal populations implicated in PS regulation and their interrelations. To this purpose, we combined complementary techniques such as functional neuroanatomy, polysomnography and pharmacological approaches on freely moving animals.

We thus demonstrated for the first time the glutamatergic nature of SLD neurons which are known to be responsible for muscle atonia and cortical activation characterizing PS. Moreover it is well established that SLD neurons are inhibited by GABAergic cells located inside the ventrolateral part of the periaqueductal gray (VLPAG). Consequently, the control of theses neurons, a crucial step for PS genesis is still a matter of debate. The results we obtained strongly suggest that the lateral hypothalamus (LH) would be responsible for this control and thus for PS. Indeed, LH is the main activated afferent to VLPAG during PS-hypersomnia and its inhibition by muscimol application totally suppresses PS and activates VLPAG GABAergic cells projecting to SLD.

We also analyzed the implication of the dorsal part of the paragigantocellular reticular nucleus in PS regulation. Even if it was known that DPGi is responsible for locus coeruleus (LC) inactivation during PS, we brought new evidences showing that DPGi would actually inhibits all noradrenergic and adrenergic cells and not only LC suggesting that DPGi could be of importance for PS genesis.

All our data allow us to better understand the PS neuronal network and suggest that, contrary to the classical view that PS is generated by the pons, LH would be the primary PS generator.

DISCIPLINE : Neuroscience

MOTS CLEFS : Sommeil paradoxal, c-FOS, MCH, cataplexie, hypothalamus, noradrenaline

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :

Centre de recherche en neuroscience de Lyon, INSERM U1028, CNRS UMR 5292

Equipe Physiopathologie des réseaux neuronaux du cycle sommeil