



**HAL**  
open science

# Rôle du noyau paragigantocellulaire latéral dans le réseau du sommeil paradoxal chez le rat

Chrystelle Sirieix

► **To cite this version:**

Chrystelle Sirieix. Rôle du noyau paragigantocellulaire latéral dans le réseau du sommeil paradoxal chez le rat. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2011. Français. NNT : 2011LYO10049 . tel-00857424

**HAL Id: tel-00857424**

**<https://theses.hal.science/tel-00857424>**

Submitted on 3 Sep 2013

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

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

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE NEUROSCIENCES ET COGNITION

DIPLOME DE DOCTORAT de NEUROSCIENCES

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 21 Mars 2011

par

**Chrystelle SIRIEIX**

**ROLE DU NOYAU PARAGIGANTOCELLULAIRE LATERAL DANS LE RESEAU  
DU SOMMEIL PARADOXAL CHEZ LE RAT.**

Thèse réalisée sous la direction du Dr Lucienne Léger

Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon, INSERM U1028, CNRS UMR5292

Lyon, France

JURY

|                       |                     |
|-----------------------|---------------------|
| Pr. Rémi GERVAIS      | Président           |
| Dr Véronique FABRE    | Rapporteur          |
| Dr Jean CHAMPAGNAT    | Rapporteur          |
| Dr Luis VILLANUEVA    | Examineur           |
| Dr Nicolas MAURICE    | Examineur           |
| Dr Pierre-Hervé LUPPI | Examineur           |
| Dr Lucienne LEGER     | Directrice de thèse |

## UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

### **Président de l'Université**

Vice-président du Conseil Scientifique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Secrétaire Général

**M. le Professeur L. Collet**

M. le Professeur J-F. Mornex

M. le Professeur G. Annat

M. le Professeur D. Simon

M. G. Gay

### **COMPOSANTES SANTE**

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Directeur : M. le Professeur P. Farge

### **COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE**

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

Département Sciences de la Terre

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire de Lyon

Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon 1

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Institut de Science Financière et d'Assurances

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. le Professeur F. Gieres

Directeur : M. le Professeur F. Fleury

Directeur : Mme le Professeur H. Parrot

Directeur : M. N. Siauve

Directeur : M. le Professeur S. Akkouche

Directeur : M. le Professeur A. Goldman

Directeur : M. le Professeur H. Ben Hadid

Directeur : Mme S. Fleck

Directeur : Mme le Professeur I. Daniel

Directeur : M. C. Collignon

Directeur : M. B. Guiderdoni

Directeur : M. P. Fournier

Directeur : M. le Professeur C. Coulet

Directeur : M. le Professeur J-C. Augros

Directeur : M. R. Bernard

*A mon père, A ma mère,  
A ma sœur et mon frère.*



*Je remercie particulièrement*

***Monsieur le Professeur Rémi Gervais*** pour le soutien qu'il m'a apporté durant ces années et m'avoir fait l'honneur de présider le jury de cette thèse. Je le remercie sincèrement d'avoir pris le temps d'examiner ce manuscrit avec attention.

***Madame le Docteur Véronique Fabre et Monsieur le Docteur Jean Champagnat*** qui ont bien voulu accepter d'être les rapporteurs de cette thèse. Je les remercie vivement d'avoir pris le temps d'examiner avec attention et intérêt ce manuscrit et pour les commentaires constructifs qu'ils ont formulés.

***Monsieur le Docteur Luis Villanueva*** pour son soutien et ses conseils dont j'ai pu profiter au cours des réunions du comité de suivi de thèse. Je tiens à le remercier d'avoir accepté d'examiner cette thèse.

***Monsieur le Docteur Nicolas Maurice*** pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail en acceptant de participer au jury de cette thèse.

***Monsieur le Docteur Pierre-Hervé Luppi*** pour avoir accepté que je réalise ce travail de thèse au sein de son laboratoire.

***Madame le Docteur Lucienne Léger.*** Je la remercie vivement d'avoir accepté de diriger cette thèse et de m'avoir accordé son soutien, sa confiance et sa grande disponibilité au cours de ces années.

*Je tiens à remercier également*

*Guy Chouvet* pour son soutien au cours de cette thèse et ses très nombreux conseils avisés en électrophysiologie,

*Nadine Ravel* pour avoir accepté de faire parti de mon comité de suivi de thèse et pour ses précieux conseils.

*Emilie Combet-Aspray* qui m'a donné envie de me lancer dans la recherche. Thank you so much !

*Un grand Merci à tous les membres du laboratoire UMR5167 pour le soutien que chacun à su m'apporter au cours des ces années de thèse,*

*Valérie Charlon pour son aide dans les démarches administratives,*

*Patrice Fort, Paul Salin, Christelle Peyron, Gaël Malleret, Régis Parmentier pour leurs conseils,*

*Céline Scoté-Blachon pour son soutien et son amitié,*

*Leslie, Olivier, Madhy, Sara, Mickael, Léa, Manu mais également les anciens (p'tit) Marc, Marie, Nico, Sonia, Paul que je remercie pour leur soutien, les fous rire salvateurs pendant la thèse et la bonne humeur ambiante au laboratoire. Je leur souhaite à tous bonheur et réussite pour la suite !*

*Un merci tout particulier à mes stagiaires : Mélodie, Marie, Johnny et Natasa. Je les remercie d'avoir accepté de travailler à mes côtés et d'avoir participé à l'aventure du rat en contention,*

*Je remercie également Domenico Tupone pour son aide et son amitié,*

*Je remercie vivement l'équipe pédagogique en neurosciences avec laquelle j'ai effectué mon monitorat. Je les remercie de m'avoir intégrée dans l'équipe pédagogique, soutenu et conseillé dans mes premiers pas d'enseignante.*

*Je tiens à remercier de tout cœur ceux et celles qui m'ont prouvé qu'il existe une vie après le labo,*

*Mes copines « de promo », Koliane, Nolwen et Laeticia, nous voilà maintenant Docteur...je tiens à les remercier pour leur amitié et leur soutien qu'elles m'ont apporté au cours des ces années...à très bientôt à Washington ou Chicago ?!*

*Mes ami(e)s, Chloé (♥), Sly (un chinois ?), Greg, Alexis, Pavel, Alex, Sophie, Boris, Josip. Je les remercie d'avoir été là depuis le début, de me soutenir et de m'accorder leur amitié.*

*Enfin, je souhaite remercier mes plus fervents supporter, ceux sans qui rien n'aurait été possible : mon papa, ma maman, ma sœur Anne-Laure, mon frère Clément, Mamie Lyon et mes grands-parents. Je les remercie vraiment de tout mon cœur pour leur soutien notamment dans les moments de découragement et de doute. Merci d'être toujours là !*





## RESUME GENERAL

La configuration du réseau qui sous-tend la genèse et le maintien du sommeil paradoxal (SP) n'est à ce jour que partiellement connue. Ce réseau met en jeu deux types neuronaux, les neurones SP-On, plus actifs au cours du SP et silencieux au cours de l'éveil et les neurones SP-Off, au contraire, silencieux au cours du SP et actifs au cours de l'éveil. Plusieurs travaux ont montré que le noyau paragigantocellulaire latéral (LPGi), situé dans le bulbe rachidien ventrolatéral, pourrait jouer un rôle au sein de ce réseau. Ce noyau est bien connu pour son implication dans la régulation sympathique des fonctions cardio-vasculaires.

Le LPGi est la région bulbaire qui contient le plus grand nombre de neurones exprimant Fos, une protéine d'expression précoce, après hypersomnie de SP suivant une privation sélective de cet état. De plus, environ 10% de ces neurones Fos dans le LPGi projettent au locus coeruleus (LC), une région SP-Off. Récemment, il a été montré que 70% des neurones exprimant Fos après hypersomnie de SP sont de nature GABAergique. Notre hypothèse est que le LPGi contient des neurones de nature SP-On dont une partie participerait à l'inhibition des noyaux SP-Off. Nous cherchons, d'une part, à vérifier cette hypothèse, d'autre part à identifier les régions afférentes au LPGi actives au cours du SP et susceptibles de le contrôler au cours de cet état et, enfin, à identifier les projections du LPGi afin de déterminer le rôle qu'il pourrait jouer au cours du SP.

Pour ce faire, nous avons utilisé l'enregistrement extracellulaire des neurones du LPGi chez le rat vigile en contention stéréotaxique. Nous avons couplé cette technique avec le protocole de privation/ rebond de SP par la technique de la piscine sur trois groupes de rats : le groupe contrôle, le groupe privé de SP et le groupe rebond de SP.

L'analyse du taux de décharge des neurones enregistrés au sein du LPGi montre que celui-ci contient trois types neuronaux différents : 1/ des neurones de nature SP-On, qui augmentent de façon significative leur taux de décharge au cours du SP ; 2/ des neurones de nature SP-Off, qui diminuent de façon significative leur taux de décharge au cours du SP ; 3/ des neurones ayant un taux de décharge indifférent aux variations d'état de vigilance. L'analyse des données neuroanatomiques montre que l'afférence majeure du LPGi, active au cours du SP, réside dans le noyau sublatérodorsal (SLD). Les autres afférences actives se trouvent dans la substance grise périaqueducule et l'hypothalamus latéral. Le LPGi envoie des projections sur le LC, le noyau parabrachial latéral et aussi sur le noyau moteur facial VII. Certaines des projections sur le VII sont actives au cours du SP.

Le LPGi est donc bien impliqué dans le réseau du SP car il contient des neurones faisant varier leur taux de décharge avec les différents états de vigilance. Le SLD, considéré comme la structure exécutive du SP, de nature glutamatergique, exciterait le LPGi au cours du SP. Ce dernier, de nature GABAergique, inhiberait le noyau moteur facial. Ce travail met pour la première fois en évidence l'activité de la voie SLD-bulbe rachidien ventral et suggère que le LPGi participe en partie à l'atonie musculaire caractéristique du SP.

# SOMMAIRE

## RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

|             |  |           |
|-------------|--|-----------|
| <b>I.</b>   | <b>PHENOMENOLOGIE DES ETATS DE VIGILANCE.....</b>  | <b>19</b> |
| A.          | L'éveil .....  | 19        |
| B.          | Le sommeil lent .....  | 20        |
| C.          | Le sommeil paradoxal .....   | 20        |
| <b>II.</b>  | <b>ORGANISATION DU CYCLE VEILLE-SOMMEIL CHEZ LE RAT .....</b>  | <b>22</b> |
| <b>III.</b> | <b>LES FONCTIONS DU SOMMEIL PARADOXAL .....</b>  | <b>23</b> |
| A.          | Le sommeil paradoxal et le rêve.....   | 23        |
| B.          | Le sommeil paradoxal et la maturation cérébrale .....  | 24        |
| C.          | Le sommeil paradoxal et la mémoire .....   | 25        |
| D.          | Le sommeil paradoxal et la neurogenèse .....   | 25        |
| <b>IV.</b>  | <b>LE RESEAU DU SOMMEIL PARADOXAL .....</b>  | <b>26</b> |
| A.          | Une structure exécutive du sommeil paradoxal : le noyau sublatérodorsal .....                            | 26        |
| 1.          | Découverte du péri-LC alpha chez le chat .....   | 26        |
| 2.          | Le noyau sublatérodorsal chez le rat .....   | 27        |
| B.          | Le contrôle du noyau sublatérodorsal .....   | 28        |
| 1.          | Afférences GABAergiques du SLD inactives au cours du sommeil paradoxal.....                              | 28        |
| ◆           | <i>Cas de la substance grise périaqueducale ventrolatérale et du noyau profond du mésencéphale .....</i> | <i>29</i> |
| ◆           | <i>Autres hypothèses .....</i>   | <i>29</i> |
| 2.          | Afférences glutamatergiques du SLD actives au cours du SP .....  | 30        |
| C.          | Rôle du locus coeruleus et du noyau du raphé dorsal dans le contrôle des états de vigilance .....        | 30        |
| 1.          | Neuronanatomie .....   | 30        |
| 2.          | Neurophysiologie .....   | 31        |
| D.          | Rôle de l'hypothalamus postérieur dans la régulation des états de vigilance .....                        | 33        |
| E.          | Mécanismes de l'activation corticale et de l'atonie musculaire au cours du sommeil paradoxal .....       | 35        |
| 1.          | Mécanismes responsables de l'activation corticale.....   | 35        |
| 2.          | Mécanismes responsables de l'atonie musculaire .....   | 37        |
| ◆           | <i>La voie noyau gigantocellulaire ventral- motoneurones spinaux et crâniens .....</i>                   | <i>37</i> |
| ◆           | <i>La voie noyau sublatérodorsal-noyau gigantocellulaire ventral .....</i>                               | <i>38</i> |
| <b>V.</b>   | <b>MODELISATION DU RESEAU DU SOMMEIL PARADOXAL.....</b>  | <b>39</b> |
| A.          | Modèle d'interaction réciproque .....  | 39        |
| B.          | Le modèle « Flip-Flop» .....   | 40        |
| C.          | Le modèle du laboratoire.....  | 40        |

|              |  |           |
|--------------|--|-----------|
| <b>VI.</b>   | <b>LE NOYAU PARAGIGANTOCELLULAIRE LATERAL.....</b>   | <b>41</b> |
| A.           | Anatomie .....   | 41        |
| 1.           | Localisation et définition.....  | 41        |
| 2.           | Propriétés neurochimiques des neurones du LPGi.....  | 43        |
| ♦            | <i>Neurones adrénérgiques</i> .....  | 43        |
| ♦            | <i>Neurones glutamatergiques</i> .....   | 43        |
| ♦            | <i>Neurones GABAergiques</i> .....   | 43        |
| ♦            | <i>Neurones glycinérgiques</i> .....   | 44        |
| ♦            | <i>Neurones sérotoninérgiques</i> .....  | 44        |
| ♦            | <i>Neurones cholinérgiques</i> .....   | 44        |
| 3.           | Afférences .....   | 44        |
| 4.           | Efférences.....  | 47        |
| B.           | Fonctions du LPGi .....  | 47        |
| 1.           | Rôle du LPGi dans la régulation sympathique cardiovasculaire.....  | 47        |
| 2.           | Propriétés électrophysiologiques des neurones du LPGi .....  | 51        |
| 3.           | Rôle dans le contrôle de la respiration .....  | 52        |
| ♦            | <i>Noyau Bötzing</i> .....   | 53        |
| ♦            | <i>Noyau pré-Bötzing</i> .....   | 53        |
| 4.           | Autres rôles du LPGi.....  | 54        |
| ♦            | <i>Rôle dans le contrôle de l'érection au cours du SP</i> .....  | 54        |
| ♦            | <i>Contrôle du mouvement des vibrisses</i> .....   | 54        |
| <b>VII.</b>  | <b>RELATION ENTRE LE LPGI ET LE SOMMEIL PARADOXAL.....</b>   | <b>55</b> |
| A.           | Travaux antérieurs chez le chat .....  | 56        |
| B.           | Travaux antérieurs chez le rat .....   | 56        |
| <b>VIII.</b> | <b>HYPOTHESES ET OBJECTIFS .....</b>   | <b>58</b> |
| A.           | Le LPGi contient-il des neurones à profil de décharge SP-On et quelles en sont les caractéristiques ? .....                | 58        |
| B.           | Quelles sont les structures afférentes au LPGi susceptibles de le contrôler au cours du SP ? 58                            |           |
| C.           | Quelles sont les régions contrôlées par le LPGi au cours du SP, autrement dit quel rôle joue le LPGi au cours du SP ?..... | 59        |

## **MATERIEL & METHODES**

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| <b>I.</b> | <b>LE MODELE DU RAT VIGILE EN CONTENTION .....</b>                       | <b>61</b> |
| A.        | Le système de contention .....   | 61        |
| 1.        | Présentation du système de contention.....                               | 61        |
| 2.        | Pertinence du modèle pour l'étude du cycle veille-sommeil .....          | 62        |
| B.        | Préparation des animaux pour la contention .....                         | 64        |
| 1.        | Implantation des animaux .....   | 64        |
| ♦         | <i>Protocole général d'implantation</i> .....                            | 64        |
| ♦         | <i>Implantation pour l'enregistrement de l'électrocardiogramme</i> ..... | 65        |
| ♦         | <i>Etude de la respiration</i> .....                                     | 66        |

|              |   |           |
|--------------|---|-----------|
| C.           | Habitude à la contention .....                                    | 66        |
| D.           | Résection de la dure-mère .....                                   | 66        |
| E.           | Déroulement des sessions d'enregistrements .....                  | 67        |
| <b>II.</b>   | <b>ENREGISTREMENT DES DONNEES POLYSOMNOGRAPHIQUES .....</b>       | <b>69</b> |
| A.           | Rappels théoriques .....  | 69        |
| B.           | Mise en œuvre .....   | 70        |
| C.           | Détermination des états de vigilance.....                         | 70        |
| D.           | Analyse des données polysomnographiques .....                     | 71        |
| <b>III.</b>  | <b>ENREGISTREMENT DE L'ELECTROCARDIOGRAMME ET DE LA</b>           |           |
|              | <b>RESPIRATION .....</b>  | <b>72</b> |
| A.           | Enregistrement de l'électrocardiogramme .....                     | 72        |
| B.           | Enregistrement de la respiration.....                             | 72        |
| C.           | Analyse des données électrocardiographique et respiratoire .....  | 72        |
| <b>IV.</b>   | <b>ENREGISTREMENT EXTRACELLULAIRE UNITAIRE .....</b>              | <b>73</b> |
| A.           | Rappels théoriques .....  | 73        |
| B.           | Mise en œuvre .....   | 73        |
| C.           | Analyse des données électrophysiologiques .....                   | 74        |
| <b>V.</b>    | <b>PHARMACOLOGIE LOCALE PAR MICROIONTOPHORESE .....</b>           | <b>76</b> |
| A.           | Rappels théoriques .....  | 76        |
| B.           | Mise en œuvre .....   | 77        |
| 1.           | Fabrication des pipettes .....                                    | 77        |
| 2.           | Préparation des solutions.....                                    | 78        |
| C.           | Analyse des résultats pharmacologiques.....                       | 79        |
| <b>VI.</b>   | <b>LES TECHNIQUES DE TRAÇAGE DE VOIES .....</b>                   | <b>80</b> |
| A.           | Le traçage rétrograde de voies nerveuses.....                     | 80        |
| 1.           | Principe du traçage rétrograde de voies nerveuses.....            | 80        |
| 2.           | La sous-unité b de la toxine cholérique.....                      | 80        |
| B.           | Le traçage antérograde de voies nerveuses .....                   | 81        |
| 1.           | Principe du traçage antérograde .....                             | 81        |
| 2.           | La leucoagglutinine du Phaseolus vulgaris .....                   | 81        |
| C.           | Mise en œuvre .....   | 82        |
| <b>VII.</b>  | <b>PRIVATION ET REBOND DE SOMMEIL PARADOXAL.....</b>              | <b>84</b> |
| <b>VIII.</b> | <b>L'UTILISATION D'UN MARQUEUR FONCTIONNEL : LA PROTEINE FOS.</b> |           |
|              | <b>.....</b>  | <b>87</b> |
| A.           | Intérêt des marqueurs fonctionnels .....                          | 87        |
| B.           | Mécanisme de la synthèse de la protéine Fos .....                 | 87        |
| C.           | Fos et cycle veille-sommeil.....                                  | 88        |

|             |  |           |
|-------------|--|-----------|
| <b>IX.</b>  | <b>ETUDE FOS/NEUN .....</b>                                  | <b>89</b> |
| <b>X.</b>   | <b>ETUDES COMPLEMENTAIRES .....</b>                          | <b>89</b> |
|             | A. Etude MCH/CTb .....                                       | 89        |
|             | B. Etude TH/CTb .....  | 89        |
| <b>XI.</b>  | <b>PERFUSION ET PREPARATION HISTOLOGIQUE .....</b>           | <b>89</b> |
|             | A. Perfusion.....  | 89        |
|             | B. Réalisation et conservation des coupes histologiques..... | 90        |
|             | C. Immunohistochimie.....                                    | 90        |
|             | 1. Principe.....   | 90        |
|             | 2. Protocole expérimental général .....                      | 91        |
|             | D. Analyse des données anatomiques .....                     | 93        |
|             | 1. Marquage Fos-CTb .....                                    | 93        |
|             | 2. Marquage Fos-NeuN .....                                   | 94        |
|             | 3. Marquage Fos-PHA-L.....                                   | 94        |
|             | 4. Cartographie et analyses statistiques.....                | 94        |
| <b>XII.</b> | <b>RESUME DU PROTOCOLE : DECOURS TEMPOREL.....</b>           | <b>95</b> |

## **RESULTATS, CHAPITRE 1: Etude électrophysiologique et pharmacologique des neurones du LPGi**

|             |  |            |
|-------------|--|------------|
| <b>I.</b>   | <b>ENREGISTREMENT UNITAIRE DES NEURONES DU LPGi.....</b>                         | <b>98</b>  |
|             | A. Identification du LPGi.....   | 98         |
|             | B. Marquage immunohistochimique Fos/NeuN .....                                   | 99         |
|             | C. Activité spontanée et taux de décharge .....                                  | 100        |
|             | 1. Les neurones SP-On .....  | 100        |
|             | 2. Les neurones SP-Off .....   | 103        |
|             | D. Mode de décharge .....  | 105        |
|             | E. Durée des potentiels d'action .....   | 107        |
|             | F. Corrélation du taux de décharge.....  | 109        |
| <b>II.</b>  | <b>EJECTION DE SUBSTANCES PHARMACOLOGIQUES .....</b>                             | <b>110</b> |
|             | A. Ejections contrôle de NaCl au sein du LPGi.....                               | 110        |
|             | B. Ejections de muscimol et d'acide kainique dans le LPGi .....                  | 110        |
| <b>III.</b> | <b>DISCUSSION .....</b>  | <b>114</b> |
|             | A. Considérations techniques.....  | 114        |
|             | B. Fos/NeuN .....  | 114        |
|             | C. Les neurones SP-On .....  | 115        |
|             | D. Les neurones SP-Off .....   | 116        |
|             | E. Autres types neuronaux .....  | 117        |
|             | F. Hypothèse quant au réseau responsable de la genèse et du maintien du SP ..... | 117        |

## **RESULTATS, CHAPITRE 2: Etude neuroanatomique du LPGi**

|             |  |            |
|-------------|--|------------|
| <b>I.</b>   | <b>AFFERENCES DU LPGi .....</b>                    | <b>119</b> |
| <b>II.</b>  | <b>EFFERENCES DU LPGi .....</b>                    | <b>130</b> |
| <b>III.</b> | <b>AFFERENCES DU NOYAU MOTEUR FACIAL VII .....</b> | <b>133</b> |
| <b>IV.</b>  | <b>ETUDES COMPLEMENTAIRES .....</b>                | <b>135</b> |
|             | A. Marquage TH/CTb .....                           | 135        |
|             | B. Marquage CTb/MCH .....                          | 135        |
| <b>V.</b>   | <b>DISCUSSION .....</b>                            | <b>137</b> |
|             | A. Afférences au LPGi .....                        | 137        |
|             | B. Afférences Fos/CTb .....                        | 138        |
|             | C. Efférences du LPGi .....                        | 141        |
|             | D. Afférences au noyau du nerf facial (VII) .....  | 142        |

## **DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES**

|            |                          |            |
|------------|--------------------------|------------|
| <b>I.</b>  | <b>DISCUSSION .....</b>  | <b>144</b> |
| <b>II.</b> | <b>PERSPECTIVES.....</b> | <b>146</b> |

**ARTICLE 1 : Role of the lateral paragigantocellular nucleus in the network of paradoxical sleep in the rat.**

## LISTE DES ABREVIATIONS

|   |   |
|---|---|
| A1 : groupe noradrénergique A1                    | NRD : noyau du raphé dorsal                               |
| ABC : complexe avidine-biotine                    | NTS : noyau du faisceau solitaire                         |
| AC : alternative current                          | PAG : substance grise périaqueducule                      |
| ADN : acide désoxyribonucléique                   | PB : tampon phosphate                                     |
| ARNm : ARN messenger                              | PBL : noyau parabrachial latéral                          |
| C1 : groupe adrénérgique C1                       | PBST : tampon phosphate salin-triton                      |
| CRF : corticotropin releasing factor              | PHA-L : leucoagglutinine du <i>phaseolus</i>              |
| CTb : sous unité b de la toxine cholérique        | PnC : formation réticulée pontique caudale                |
| cVRG : groupe respiratoire ventral caudal         | PnO : formation réticulée pontique orale                  |
| CVLM : caudal ventrolateral medulla               | PPT : noyau pédonculo-pontin                              |
| DAB : 3,3' diaminobenzidine<br>tétrahydrochloride | PSC: paradoxical sleep control                            |
| DC : direct current                               | PSD: paradoxical sleep deprivation                        |
| DPGi : noyau paragigantocellulaire dorsal         | PSR: paradoxical sleep rebound                            |
| DpMe : noyau profond du mésencéphale              | REM: rapid eye-movements                                  |
| ECG : électrocardiogramme                         | RVLM : rostral ventro lateral medulla                     |
| EEG : électroencéphalogramme                      | rVRG : groupe respiratoire ventral rostral                |
| EMG : électromyogramme                            | RVL : Rostral VentroLateral reticular<br>nucleus          |
| EOG : électrooculogramme                          | SL : sommeil lent   |
| GABA : acide gamma amino butyrique                | SLD : noyau sublatérodorsal                               |
| GAD : glutamate décarboxylase                     | SP : sommeil paradoxal                                    |
| GiA : noyau gigantocellulaire alpha               | VGluT2 : transporteur vésiculaire du<br>glutamate 2       |
| GiV : noyau gigantocellulaire ventral             | VII : noyau moteur facial VII                             |
| LC : locus coeruleus                              | vIPAG : substance grise périaqueducule<br>ventrolatérale  |
| LDT : noyau latéro-dorsal                         | WGA HRP: wheat germ agglutinin-<br>horseradish peroxydase |
| LPGi : noyau paragigantocellulaire latéral        |   |
| LPT : tegmentum pontique latéral                  |   |
| MCH : hormone de mélan-concentration              |   |
| NMDA : N-méthyl-D-aspartate                       |   |

# ***INTRODUCTION GENERALE***



Dans la mythologie grecque, Hypnos, le dieu du sommeil, est le frère de Thanatos, le dieu de la mort. Cette parenté mythique n'est pas un hasard, car on a longtemps pensé que pendant le sommeil, le cerveau était pratiquement aussi inactif que celui d'un mort. Ainsi, pendant des millénaires, le sommeil a été décrit comme un phénomène purement passif, résultant d'une diminution progressive de la vigilance. Rien n'était connu quant à sa fonction, sinon celle du bon sens populaire lui attribuant un rôle de récupération physique et psychique suivant les efforts accumulés durant l'éveil.

Il a fallu attendre la fin des années 1950, et la mise en évidence de périodes d'activation corticale au cours du sommeil profond pour conduire à une totale remise en cause de cette interprétation. En effet, chez l'Homme (Aserinsky et Kleitman 1953) puis chez le chat (Jouvet et Michel 1959), les enregistrements polygraphiques ont permis d'observer la survenue périodique, durant le sommeil, d'un troisième état de vigilance, que Jouvet a appelé Sommeil Paradoxal (SP) et qui est le siège de l'activité onirique (Dement et Kleitman 1957). Dans sa description originelle, le SP se caractérise par une activité cérébrale rapide et désynchronisée semblable à celle de l'éveil, et paradoxalement associée à un relâchement musculaire complet ou atonie.

Si le sommeil conventionnel, appelé depuis sommeil lent (SL), semble avoir principalement une fonction de récupération, que dire alors du SP ? Quelles nécessités ont poussé l'évolution à dissocier le SL du SP chez les homéothermes ? Pour certains, le SP est lié au développement du cerveau, pour d'autres c'est la perte de certaines capacités chez les homéothermes (comme la neurogenèse) qui nécessiterait la création d'un nouveau système de programmation génétique, fonction alors assurée par le SP.

Pourquoi et comment rêvons-nous ? Plus de 50 ans de recherche ont tenté de répondre à cette question. Mais, même si nos connaissances fondamentales se sont considérablement accrues depuis la caractérisation physiologique de ce troisième état de conscience par Michel Jouvet, il nous reste toujours à assembler les pièces du puzzle pour mieux appréhender son fonctionnement, sa régulation et enfin aborder la question de ses fonctions physiologiques et/ou cognitives. Alors que quelques équipes de recherche abordent depuis quelques années l'étude des fonctions du SP chez l'animal et aussi chez l'Homme, nous considérons qu'il est également indispensable de comprendre les mécanismes neurobiologiques et de décrire les réseaux neuronaux complexes responsables du déclenchement et du maintien de cet état de sommeil. C'est dans ce contexte de recherches fondamentales et mécanistiques que s'inscrivent nos travaux décrits dans la suite de ce manuscrit.

Ce travail de thèse s'inscrit dans la continuité des travaux entrepris depuis plus de 50 ans pour tenter d'avancer dans la connaissance du réseau sous-tendant la régulation du SP.

Son but est de comprendre la place et le rôle que joue une structure du bulbe rachidien nommée noyau paragigantocellulaire latéral (LPGi).

L'introduction de ce manuscrit traitera des différents éléments composant le réseau du SP, des travaux princeps chez le chat aux découvertes récentes chez le rat. Puis nous aborderons un chapitre consacré au LPGi lui-même afin de comprendre ses fonctions d'ores et déjà connues. L'introduction se terminera sur le lien qui existe entre cette région du tronc cérébral et le réseau du SP.

Chaque protocole expérimental sera décrit dans la partie « Matériel et Méthodes » puis l'exposé des résultats sera divisé en deux chapitres : 1/ La caractérisation électrophysiologique des neurones du LPGi, 2/ L'étude neuroanatomique des neurones du LPGi. Enfin, nous discuterons nos résultats en les comparant à la littérature.

# ***RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES***

## **I. PHENOMENOLOGIE DES ETATS DE VIGILANCE**

L'avènement de l'électroencéphalographie (EEG) a marqué le début de l'histoire moderne de la recherche sur le cycle veille-sommeil. En effet, grâce à cet outil et aux travaux de Berger sur l'activité électrique du cerveau humain, les rythmes corticaux de sujets éveillés ou endormis ont pu être enregistrés (Berger 1929). Plus tard, l'application de cette technique chez l'animal a permis de distinguer sans ambiguïté les différents états de vigilance à l'aide de critères objectifs (Timo-Iaria et al. 1970). Les enregistrements de l'activité musculaire (électromyogramme, EMG) et des mouvements oculaires (Electrooculogramme, EOG) associés à l'EEG, ont permis de définir précisément trois états de vigilance : l'éveil, le sommeil lent (SL) et le sommeil paradoxal (SP), appelé également « sommeil du rêve » puisqu'il est le siège de la plus grande partie de l'activité onirique (Jouvet et al. 1959; Dement et Kleitman 1957). Selon les espèces, il est possible de subdiviser le SL en plusieurs stades dénotant la profondeur du sommeil. Ainsi chez le chat sont décrits deux stades de SL (stade I et stade II) alors que chez l'Homme, quatre stades sont classiquement différenciés (I à IV). Chez le rat, notre modèle expérimental, seul un stade est généralement décrit (Timo-Iaria et al. 1970), même si une classification plus complexe basée sur des critères électroencéphalographiques et comportementaux a été décrite (Gottesmann 1992). Ci-dessous sont détaillés les critères comportementaux et polygraphiques permettant de distinguer les différents états d'éveil et de sommeil chez le rat.

### **A. L'éveil**

Le rat adulte en laboratoire est éveillé en moyenne 60% du temps lors de la période d'obscurité et 30% du temps lors de la période d'éclairement. Au cours de cet état, l'animal est réactif aux stimuli de l'environnement. Comportementalement, il peut être engagé dans une activité motrice (éveil actif) ou être immobile et garder les yeux ouverts (éveil calme). L'EEG se caractérise par une activité électrique dite activée ou désynchronisée, c'est-à-dire de bas voltage et de haute fréquence. Elle est essentiellement constituée d'ondes rapides de type bêta (20-30Hz) et gamma (30-60Hz). Des ondes thêta peuvent être enregistrées au niveau de l'hippocampe lors de l'éveil attentif et lors de l'éveil calme (Vanderwolf 1969). Ce rythme thêta peut ainsi passer de 5-6.5 Hz lors de l'éveil calme à environ 7.5Hz lors de l'éveil actif ou lors d'un éveil attentif (lorsque le rat est placé face à un défi comportemental par exemple) (Vyazovskiy et Tobler 2005). L'activité motrice que l'animal présente au cours de l'éveil se

traduit par un EMG dont l'amplitude varie selon la locomotion et les contractions des muscles enregistrés. De nombreux mouvements oculaires sont enregistrés sur l'EOG. Enfin, le rythme cardiaque est élevé et la respiration rapide (Figure 1).

### **B. Le sommeil lent**

Ce stade occupe 60% de la période d'éclaircissement et 35% de la période d'obscurité. Au cours du SL, l'animal est immobile, les yeux fermés et est moins réceptif aux stimuli extérieurs. Il adopte une posture caractéristique « en boule », la tête repliée sous le corps. Le SL se caractérise par une activité corticale dite synchronisée. L'EEG est de haut voltage et de basse fréquence. Les ondes delta (0.5 à 4Hz) prédominent et des fuseaux (10 à 14Hz) se superposent. Le tonus musculaire est fortement diminué (Figure 1). Les températures cérébrale et corporelle diminuent, ainsi que la fréquence des rythmes cardiaque et respiratoire.

### **C. Le sommeil paradoxal**

Chez le rat adulte, le SP occupe environ 10% de la période d'éclaircissement et 5% de la période d'obscurité. Chez l'animal sain, ce stade apparaît toujours après une phase de SL, sans changement notable de la posture caractéristique du SL. Les enregistrements polysomnographiques permettent de distinguer au cours de ce stade des phénomènes toniques et des phénomènes phasiques. Les phénomènes toniques se caractérisent par un EEG semblable à celui de l'éveil avec cependant une activité plus ample et soutenue des ondes thêta. Une atonie complète des muscles de la posture s'associe paradoxalement à cette intense activité corticale (Figure 1), d'où la dénomination de « sommeil paradoxal » donnée par Jouvet (1959). Au cours du SP, le rythme cardiaque et la respiration deviennent irréguliers. Il a de plus été montré, chez le chat, que des neurones spécifiquement actifs au cours du SP présentent un mode de décharge corrélé aux mouvements respiratoires. Ces neurones sont situés dans le noyau gigantocellulaire et la partie ventrolatérale du bulbe rachidien (Netick et al. 1977).

Les phénomènes phasiques du SP sont constitués par des secousses des muscles des extrémités de la face (vibrisses, oreilles) et des membres, ainsi que par des mouvements rapides des globes oculaires. Les Anglo-Saxons désignent également ce stade par « Rapid Eye Movement » (REM sleep) du fait de l'apparition ponctuelle de ces saccades oculaires à haute

fréquence (Aserinsky et Kleitman 1953; Dement et Kleitman 1957). Récemment, la survenue d'érections pénienues apparaissant de façon aléatoire au cours du SP a été démontrée chez le rat. (Schmidt et al. 2000).

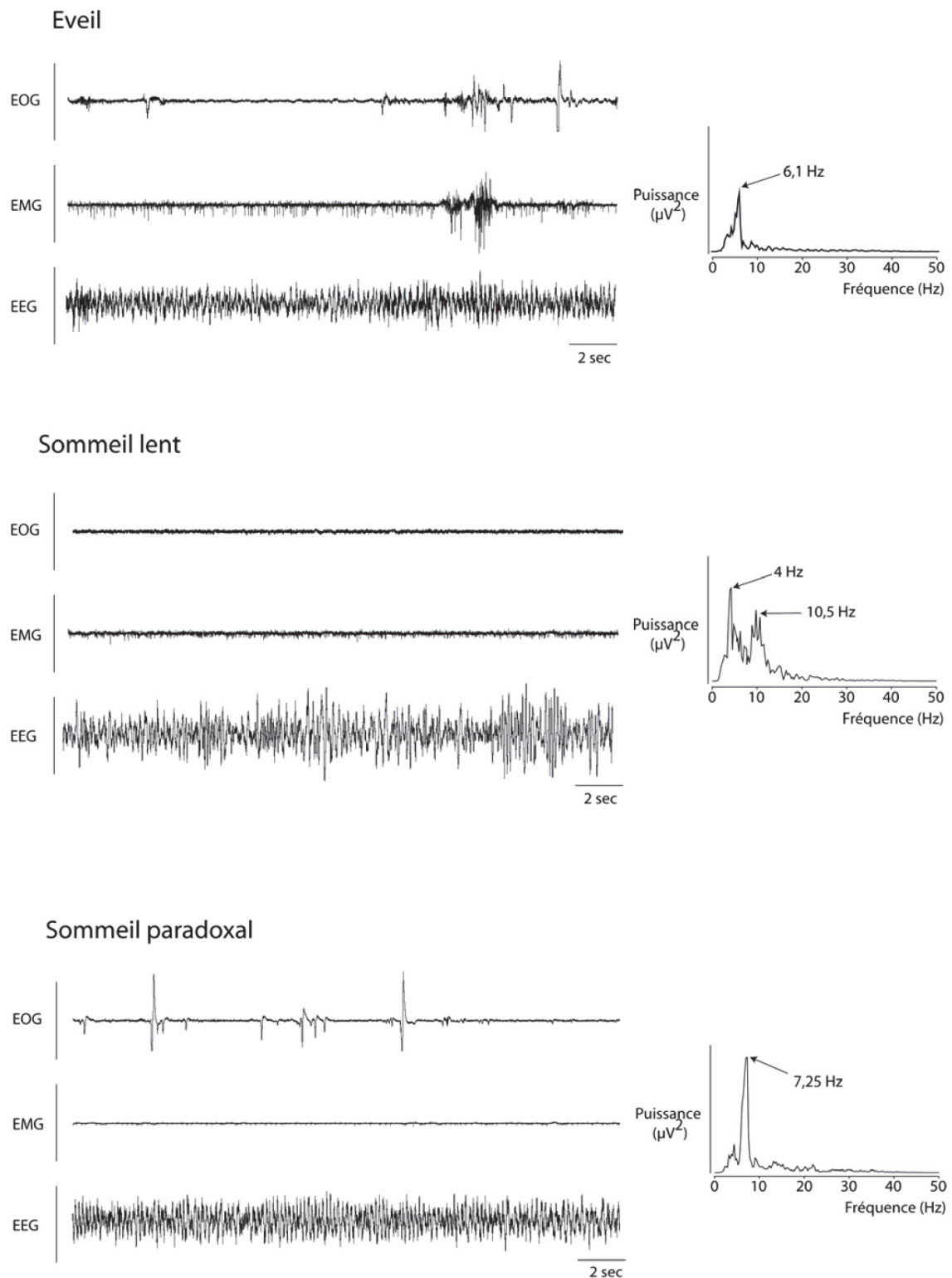


Figure 1. Enregistrements polygraphiques et décomposition spectrale de l'EEG lors des différents états de vigilance chez le rat.

## II. ORGANISATION DU CYCLE VEILLE-SOMMEIL CHEZ LE RAT

La répartition inégale du sommeil entre la période d'éclairement et la période d'obscurité traduit l'influence du rythme circadien sur le cycle veille-sommeil. A ce cycle de 24h se surimpose un rythme dit ultradien qui détermine l'apparition de chacun des trois états de vigilance. Chez le rat, une phase de SP apparaît environ toutes les 10 minutes et dure en moyenne 2 minutes pendant la période d'éclairement (Trachsel et al. 1991). Il est classique de représenter l'alternance veille-sommeil chez l'Homme ou chez le rat sous forme d'un hypnogramme (Figure 2). Cette représentation met en évidence la régularité d'apparition du SP pendant la phase claire et l'irrégularité pendant la phase obscure



Figure 2. Hypnogramme des trois états de vigilance chez le rat sur 24h.

### **III. LES FONCTIONS DU SOMMEIL PARADOXAL**

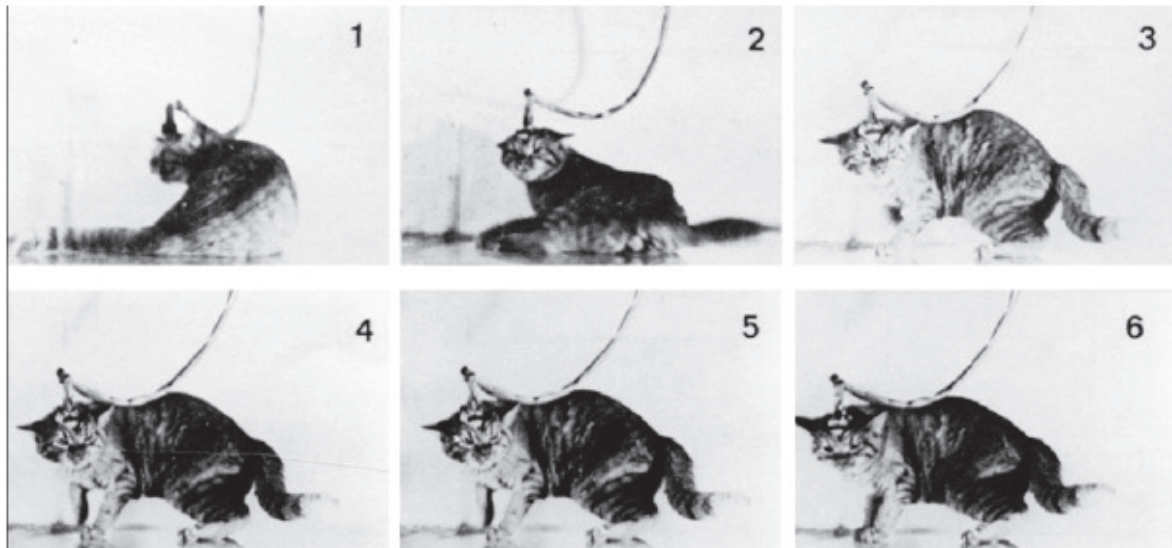
La découverte du SP chez l'Homme et les mammifères a suscité l'émergence de nombreuses questions concernant, en particulier, le rôle qu'il pourrait jouer pour un organisme homéotherme. En effet, il est intéressant de constater que pendant le SP, le cerveau humain, comme celui de l'ensemble des homéothermes, consomme des quantités de glucose et d'oxygène qui peuvent dépasser les valeurs de l'éveil alors que dans le même temps, il est complètement coupé de son environnement. Cet état de conscience particulier doit ainsi nécessairement participer à l'élaboration d'une fonction vitale pour l'organisme, sinon pourquoi sa privation totale chez le rat entraînerait la mort de l'animal en 15 à 20 jours (pour revue voir (Rechtschaffen et al. 1989))

Malgré plus de cinquante années de recherche sur ce sujet, il n'existe actuellement pas de réponse claire. Cependant, nombre d'hypothèses ont vu le jour et nous en décrivons quelques-unes dans ce chapitre.

#### **A. Le sommeil paradoxal et le rêve**

Le rêve et l'activité onirique ont été associés aux phases de SP en raison des premières observations chez l'homme (Dement et Kleitman 1957). En effet, 80% des souvenirs de rêves sont rapportés après des réveils au cours d'une phase de SP (7% suite à des rêves au cours d'une phase de SL). De plus, des comportements ont été observés chez le chat ayant subi une lésion supprimant l'atonie du SP (Sastre et Jouvet 1979). Ainsi, durant un épisode de SP, le chat présente des comportements oniriques tels que la posture caractéristique de défense en réponse à une attaque (Figure 3) ou encore des comportements de toilettage. Ceci se retrouve également chez l'Homme dans le cas de certaines pathologies comme les « désordres comportementaux du SP » (Rapid Eye Movement Behaviour Disorder : RBD) (Schenck et al. 1986).





**Figure 3. Photographies d'un chat sans atonie musculaire au cours du sommeil paradoxal. Cet animal présente des comportements oniriques suite à une lésion bilatérale du centre de contrôle de l'atonie. Il exprime une posture caractéristique d'une réaction de défense en réponse à une attaque. (D'après Sastre et Juvet 1979)**

### **B. Le sommeil paradoxal et la maturation cérébrale**

Le fait que le SP soit apparu tardivement au cours de la phylogénèse alors qu'il est présent tôt dans l'ontogénèse des mammifères semble porter plus loin encore le pourquoi de son apparition. En effet, chez les mammifères, et probablement aussi chez les oiseaux, les quantités de SP sont étroitement liées au niveau de maturation du système nerveux central (Marks et al. 1995). Ainsi, le raton et le chaton, qui naissent avec un système nerveux très immature, présentent un taux élevé de SP au cours des premières semaines de vie postnatale (Juvet et al. 1961; Valatx et al. 1964; Juvet-Mounier et Astic 1968). Au fur et à mesure de la maturation du cerveau et de l'achèvement du processus de myélinisation, le taux de SP diminue et rejoint celui de l'adulte. En revanche, le cobaye qui présente un cerveau dont la maturation est achevée à sa naissance, réalise dès les premières heures de sa vie des quantités de SP comparables à celles de l'adulte. Cependant, si l'on enregistre son sommeil in utero, à un stade où son développement cérébral est analogue à celui d'un raton nouveau-né, on observe des quantités de SP très importantes, équivalentes à celles relevées chez le raton à sa naissance (Juvet-Mounier et al. 1970). Chez l'Homme, les quantités de SP apparaissent aussi comme un indice du niveau de maturation cérébrale (Mirmiran 1995), cet état prédominant lors de la mise en place des processus les plus complexes du développement du système nerveux.

### **C. Le sommeil paradoxal et la mémoire**

De nombreux travaux suggèrent un rôle du SP dans les processus de mémorisation. Chez l'Homme, il a été montré une augmentation des quantités de SP suite à une période d'apprentissage intense (Smith et Lapp 1991). Chez le rat, Smith et Rose (1996) ont observé une augmentation des quantités de SP, suite à un apprentissage spatial. De plus, une privation de SP conduit à une altération des performances des rats à des tâches de mémorisation spatiale (Youngblood et al. 1997). Une étude récente montre que les motifs spatio-temporels d'activation des cellules de lieu de l'hippocampe, observés au cours d'un apprentissage spatial pendant l'éveil, sont rejoués durant le SP qui suit l'apprentissage (Louie et Wilson 2001). Le rôle du SP dans l'apprentissage semble surtout intervenir lors des processus de consolidation de tâches hippocampo-dépendantes (Stickgold et Walker 2005; Stickgold et al. 2001).

### **D. Le sommeil paradoxal et la neurogenèse**

L'apparition de l'homéothermie s'est accompagnée d'une diminution considérable de la neurogenèse postnatale. En effet, chez les poissons, amphibiens et reptiles, il existe une croissance continue du cerveau pendant toute la vie des individus, assurée par une neurogenèse constante. Chez les mammifères adultes, la neurogenèse persiste au sein du gyrus denté de l'hippocampe et dans la zone sous-ventriculaire du bulbe olfactif (Gross 2000). L'hypothèse actuelle est que le SP influence la prolifération, la migration et la différenciation des neurones néoformés. Hairston et al. (2005) ont ainsi montré qu'une privation de SP pouvait altérer la neurogenèse au sein de l'hippocampe. De plus, il a été montré qu'une privation totale de sommeil altère l'apprentissage de tâches hippocampo-dépendantes, connues pour stimuler la survie des neurones hippocampiques néoformés (Guzman-Marin et al. 2005).

## IV. LE RESEAU DU SOMMEIL PARADOXAL

### A. Une structure exécutive du sommeil paradoxal : le noyau sublatérodorsal

#### 1. Découverte du péri-LC alpha chez le chat

Le modèle du chat pontique est un chat dont tout le cerveau en avant du pont a été détruit. Ce modèle a montré que le SP persistait, malgré l'absence d'une grande partie du cerveau, suggérant que le centre générateur du SP se situe dans le tronc cérébral. Chez le chat, la lésion de la partie dorsale du noyau pontique oral (PnO) et du noyau pontique caudal (PnC) supprime spécifiquement le SP. Il en résulte que les neurones responsables de la genèse et du maintien du SP sont situés dans le PnO et/ou le PnC (Carli et Zanchetti 1965; Webster et Jones 1988).

En 1964, (George et al. 1964) il a été montré que l'injection bilatérale d'un agoniste cholinergique, le carbachol, dans le PnO et le PnC pouvait induire le SP. La région inductrice a été centrée sur un noyau situé dans le PnO dorsal au voisinage du Locus Coeruleus (LC), le péri-LC alpha (Sakai et al. 1979). En effet, après injection de carbachol dans cette structure, le SP est induit avec une courte latence (Vanni-Mercier et al. 1989). De plus, les enregistrements unitaires des neurones du péri-LC alpha ont montré que la grande majorité des neurones de cette région augmentent leur taux de décharge avant et pendant le SP : il s'agit donc de neurones SP-On, selon la définition de Sakai (1988). Ce dernier a défini deux types différents de neurones SP-On :

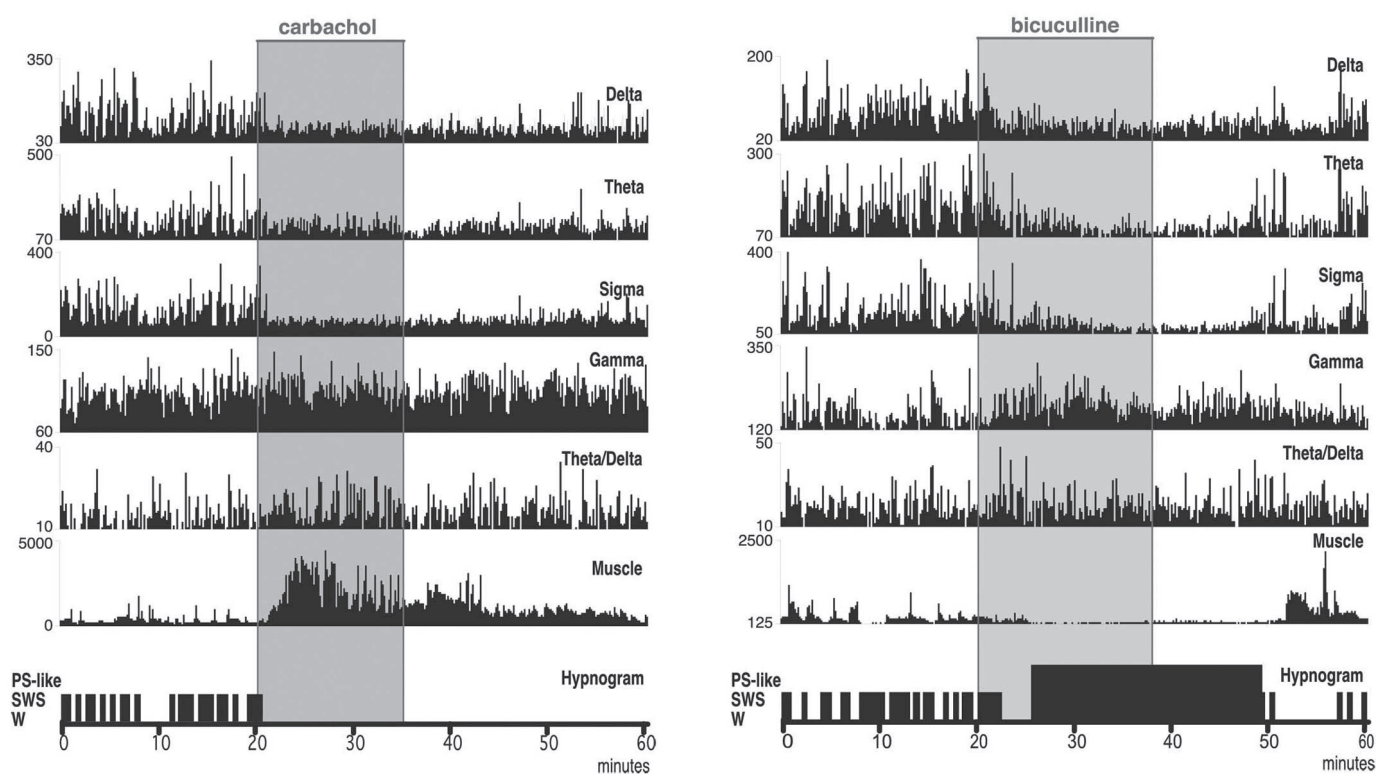
- les neurones SP-On au sens strict du terme, déchargeant seulement au cours du SP et étant silencieux dans les autres états ;
- les neurones SP-On qui possèdent une fréquence de décharge significativement plus élevée au cours du SP mais déchargent aussi au cours de l'éveil et du SL. Ce type de neurones représente la majorité des neurones SP-On.

Les neurones SP-On ont donc en général quatre caractéristiques : un taux de décharge faible ou nul au cours de l'éveil calme, une augmentation significative du taux de décharge anticipant le début des épisodes de SP, une décharge tonique au cours des épisodes de SP et une absence complète de décharge pendant les transitions du SP à l'éveil. (Sakai 1988).

## 2. Le noyau sublatérodorsal chez le rat

La région du PnO par laquelle il est possible d'agir sur le SP chez le rat se situe ventralement au noyau LC et correspond au noyau sublatérodorsal (SLD) tel qu'il a été défini par Swanson (1998). Il s'agit de l'équivalent du péri-LC alpha du chat. Cependant, des différences fonctionnelles existent entre les deux noyaux. En effet, chez le chat, l'injection de carbachol dans le péri-LC alpha permet l'induction du SP. Chez le rat, l'injection de cette même drogue dans le SLD induit de l'éveil (Boissard et al. 2002). En revanche, l'injection d'un antagoniste des récepteurs GABA<sub>A</sub> (la bicuculline ou la GABAzine) induit un état proche du SP dénommé SP-like (Figure 4) (Boissard et al. 2002). Cet état se caractérise par une atonie musculaire continue associée à un EEG de faible amplitude et désynchronisé ainsi qu'à une augmentation du seuil de réactivité aux stimulations extérieures. Cet état se distingue du SP physiologique par l'absence de phénomènes phasiques tels que les saccades oculaires et les érections pénienues.

Les enregistrements unitaires ont confirmé la présence de neurones SP-On au sein du SLD (Figure 5) (Boissard 2002).



**Figure 4.** Effet de l'éjection iontophorétique d'un agoniste cholinergique (carbachol) et d'un antagoniste GABAergique (bicuculline) dans le SLD, sur les états de vigilance chez le rat. Il est intéressant de noter que le carbachol n'entraîne pas de SP contrairement aux résultats observés chez le chat. En revanche, la bicuculline entraîne un SP continu pendant plusieurs dizaines de minutes (Boissard et al., 2002).

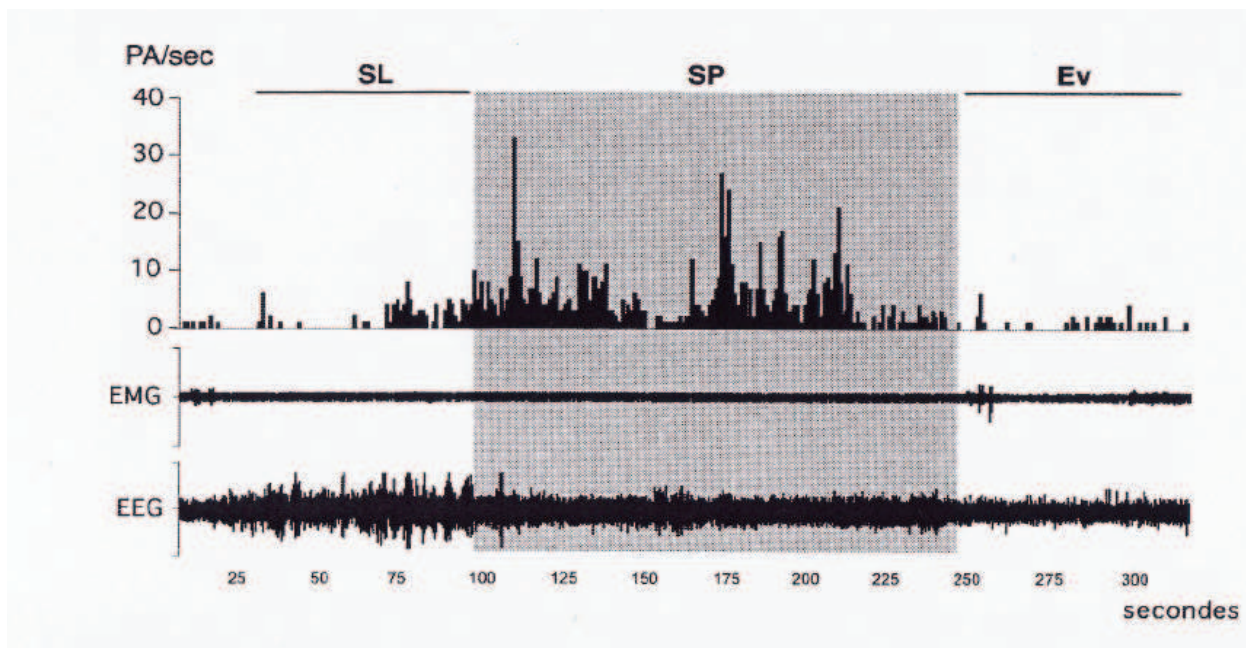


Figure 5. Neuron SP-On enregistré au sein du SLD chez le rat vigile en contention. Le taux de décharge augmente fortement au cours du SP et anticipe de quelques secondes la survenue du stade (Boissard, 2002)

Il apparaît alors nettement que le SLD correspond à un centre générateur du SP, ce qui lui confère un rôle « exécutif ». Dans une étude récente, des auteurs ont suggéré la nature glutamatergique des neurones SP-On du SLD (Lu et al. 2006). Les travaux acquis au laboratoire, obtenus par immunohistochimie de Fos suite à une hypersomnie de SP après privation, couplée à l'hybridation in situ du transporteur vésiculaire du glutamate (VGluT2), confirment que les neurones actifs au cours du SP sont de nature glutamatergique (Clément et al. 2011).

## B. Le contrôle du noyau sublatérodorsal

### 1. Afférences GABAergiques du SLD inactives au cours du sommeil paradoxal

L'injection d'un antagoniste GABAergique (bicuculline ou GABazine) au sein du SLD a montré l'induction d'un état proche du SP (Figure 4) (Boissard et al. 2002). De plus, l'enregistrement unitaire de neurones SP-On du SLD chez le rat vigile en contention a montré que ceux-ci étaient excités suite à l'éjection de gabazine (Boissard 2002). Le SLD serait donc sous influence GABAergique au cours de l'éveil et du SL. Cette inhibition serait levée au cours du SP (Boissard et al. 2002). Afin de déterminer l'origine des afférences GABAergiques du SLD, l'injection d'un traceur rétrograde, la sous-unité b de la toxine



cholérique (CTb), et le double marquage de la GAD (glutamate décarboxylase, enzyme de synthèse du GABA) ont été combinés (Boissard et al. 2003). Les afférences inhibitrices majeures du SLD identifiées sont le noyau profond du mésencéphale (DpMe), la substance grise périaqueducale ventrolatérale (vlPAG), le PnC, le PnO et le noyau réticulé parvocellulaire.

◆ Cas de la substance grise périaqueducale ventrolatérale et du noyau profond du mésencéphale

Le rôle de ces deux régions dans la régulation du SP remonte à des études plus anciennes. En effet, la lésion électrolytique de la vlPAG à la jonction ponto-mésencéphalique, chez le chat, est suivie d'une augmentation de SP durant 4 à 5 jours (Petitjean et al. 1975). L'éjection d'un agoniste des récepteurs GABA<sub>A</sub> dans la même zone entraîne, de façon réversible, une hypersomnie de SP chez le chat (Sastre et al. 1996; Crochet et al. 2006a) et le rat (Sapin et al. 2009). La zone critique regroupe, en fait, la vlPAG et la partie dorsale du DpMe. Ces données suggèrent la présence de neurones répresseurs du SP, encore appelés neurones SP-Off, au sein de la vlPAG et du DpMe.

◆ Autres hypothèses

Lu et al. (2006) ont montré que, suite à l'injection d'un traceur rétrograde dans la vlPAG et le tegmentum pontique latéral (LPT correspondant au DpMe) combiné à l'hybridation in situ de la GAD, des neurones GABAergiques sont rétrogradement marqués dans le SLD. Ces auteurs suggèrent alors un nouveau mécanisme pour le réseau sous-tendant le SP : « un flip-flop ». L'hypothèse serait que le SLD possède des neurones GABAergiques SP-On qui inhiberaient des neurones SP-Off également GABAergiques situés dans la vlPAG et le DpMe.

Cette hypothèse n'est toutefois pas soutenue par les travaux du laboratoire. En effet, le nombre de neurones doublement marqués Fos/GAD, au cours du rebond de SP qui suit une privation instrumentale, est très faible au sein du SLD (Sapin et al. 2009). Ceci suggère que les neurones SP-On du SLD ne sont principalement pas GABAergiques, ce que confirme l'étude récente de Clément et al. (2011) montrant que la majorité des neurones exprimant Fos après rebond de SP sont de nature glutamatergique.

## 2. Afférences glutamatergiques du SLD actives au cours du SP

Chez le chat, l'injection par microdialyse d'un agoniste glutamatergique, le kainate, au sein du péri-LCalpha a permis l'induction d'un état proche du SP (Onoe et Sakai 1995). De même, chez le rat, l'injection iontophorétique de cette même drogue pharmacologique au sein du SLD a permis d'induire le SP (Boissard et al. 2002). Nous avons vu que l'injection de bicuculline au sein du SLD entraîne la survenue du SP. Toutefois, si un antagoniste glutamatergique, le kynurénate, est appliqué, en même temps que la bicuculline, le SP est supprimé (Boissard et al. 2002). Ces données suggèrent que le SLD est sous un tonus GABAergique au cours du SP mais également sous un tonus glutamatergique constant au cours des trois états de vigilance.

Boissard et al. (2003) ont montré que plusieurs afférences du SLD ne contiennent pas la GAD, il s'agit donc d'afférences non GABAergiques. Ces structures sont le LPGi, la vIPAG, l'hypothalamus latéral, le noyau central de l'amygdale, le noyau de la strie terminale et l'aire motrice primaire du cortex frontal. Parmi ces afférences non-GABAergiques pourraient se trouver des neurones glutamatergiques.

### **C. Rôle du locus coeruleus et du noyau du raphé dorsal dans le contrôle des états de vigilance**

#### 1. Neuronanatomie

Chez le rat, le LC est un noyau très compact décrit comme le groupe noradrénergique A6 par Dahlstrom et Fuxe (1964). Le LC représente environ 50% des neurones noradrénergiques du cerveau et projette sur l'ensemble du système nerveux central. Le LC est la seule source de noradrénaline de l'hippocampe, du néocortex et du cervelet (Olson et Fuxe 1971; Jones et Moore 1977). Il projette également sur le thalamus, la région préoptique et le télencéphal basal via de longues projections ascendantes (Foote et al. 1983). Le LC innerve également les noyaux associatifs et sensoriels du tronc cérébral (Levitt et Moore 1979) et les cornes dorsale et ventrale de la moelle épinière (Nygren et Olson 1977).

Le LC reçoit de nombreuses afférences (Luppi et al. 1995a), notamment du LPGi, du noyau paraventriculaire dorsal (DPGi) (Aston-Jones et al. 1986), de la région préoptique, de l'aire hypothalamique postérieure (Peyron et al. 1998) et de la PAG.

Chez le rat, le noyau du raphé dorsal (NRD) rassemble environ la moitié des neurones sérotoninergiques du cerveau (Vertes et Crane 1997). Ces neurones sérotoninergiques constituent un tiers des neurones du NRD (Descarries et al. 1982). Le NRD envoie des projections ascendantes sur le cortex, l'hippocampe, l'hypothalamus, le télencéphale basal, le noyau préoptique, le striatum, le thalamus, la PAG et la formation réticulée mésencéphalique (Vertes 1991; Vertes et Kocsis 1994). Ses projections descendantes se terminent sur le noyau parabrachial et les formations réticulées pontique et bulbaire (Vertes 1991; Vertes et Kocsis 1994). Le NRD reçoit des afférences des cortex cingulaire, orbital, infralimbique et insulaire, des aires préoptiques médiane et latérale, des aires hypothalamiques dorsale, postérieure et périfornicale, de la formation réticulée mésencéphalique, de la PAG, du noyau parabrachial, du DPGi, du LPGi et du noyau du faisceau solitaire (NTS) (Peyron et al. 1996).

## 2. Neurophysiologie

Des études électrophysiologiques ont montré que les neurones noradrénergiques du LC et sérotoninergiques du NRD cessent de décharger au cours du SP (Hobson et al. 1975; Aghajanian et Vandermaelen 1982). Ce résultat a été à l'origine du modèle d'interaction réciproque mettant en jeu des neurones silencieux au cours du SP, donc SP-Off, et des neurones cholinergiques du péri-LC alpha chez le chat (McCarley et Hobson 1975; Sakai et al. 1981).

L'application de noradrénaline par microdialyse dans le péri-LC alpha du chat provoque une forte diminution des quantités de SP (Crochet et Sakai 1999c). Cet effet inhibiteur passerait par l'activation de récepteurs noradrénergiques alpha-2 (Crochet et Sakai 1999a). L'application de sérotonine dans la même région n'a, en revanche, pas d'effet (Crochet et Sakai 1999b). Ces données suggèrent que la noradrénaline induit une suppression du SP en inhibant les neurones SP-On du péri-LC alpha. Toutefois, les travaux de Léger et al. (2009) montrent que les neurones du LC n'expriment pas la protéine Fos après 72h de privation spécifique de SP, contrairement au groupe adrénérgique/noradrénérgique C1/A1 du LPGi et de la CVLM dont certains neurones expriment fortement Fos dans la même condition. Ce groupe C1/A1 a de nombreuses projections rostrales, en particulier dans la PAG (Herbert et Saper 1992). Or l'injection de noradrénaline au sein du complexe vIPAG/DpMe induit une augmentation des quantités d'éveil et une diminution des quantités de SL et de SP (Crochet et al. 2006b). Ces résultats laissent donc penser que contrairement à une inhibition



des neurones SP-On du SLD (péri-LC alpha), les neurones monoaminergiques du LC et du NRD contribueraient à l'excitation des neurones PS-Off GABAergiques de la vIPAG et du DpMe au cours de l'éveil.

La mesure de l'activité électrophysiologique des neurones du LC et du NRD montre que ceux-ci cessent de décharger au cours du SP (Aston-Jones et Bloom 1981; Jacobs et al. 1981). Des études utilisant le modèle du rat vigile en contention ont montré que l'application de bicuculline (antagoniste GABAergique) et de strychnine (antagoniste glycinergique) au niveau des neurones de ces deux noyaux au cours du SP, restaurait leur activité (Figure 6) (Darracq et al. 1996; Gervasoni et al. 1998; 2000). De plus, la détection de GABA par microdialyse dans ces mêmes noyaux a permis de mettre en évidence une forte augmentation de la libération de ce neurotransmetteur au cours du SP (Nitz et Siegel 1997a; 1997b). Ces données suggèrent que les neurones monoaminergiques du LC et du NRD sont sous l'influence d'une inhibition tonique GABAergique et glycinergique au cours du SP et que cette inhibition serait plus particulièrement de source GABAergique. Verret et al. (2006) ont montré que la vIPAG, le DPGi et le LPGi sont des afférences du LC. Le DPGi contient effectivement des neurones SP-On susceptibles d'inhiber le LC au cours du SP (Goutagny et al. 2008). De plus, la vIPAG et le LPGi contiennent des neurones GABAergiques qui expriment Fos après une hypersomnie de SP (Sapin et al. 2009).

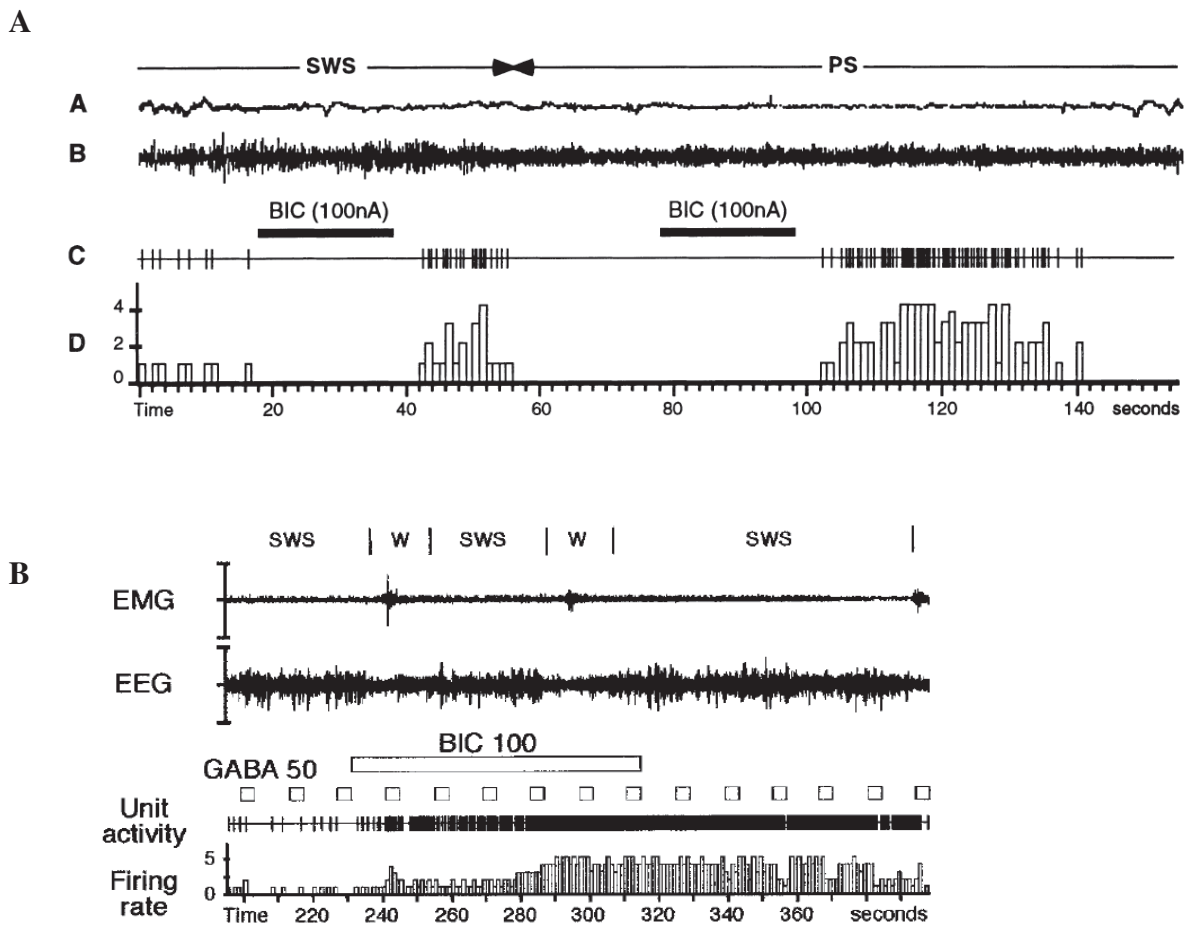


Figure 6. Effet de l'application iontophorétique de bicuculline sur un neurone du LC (A) et du NRD (B) chez le rat vigile en contention (Gervasoni et al., 1998 ; 2000). La substance pharmacologique provoque une augmentation de la fréquence de décharge des deux types de neurones.

#### D. Rôle de l'hypothalamus postérieur dans la régulation des états de vigilance

Il est connu, depuis plus de 40 ans avec les travaux princeps de Jouvet (1962) que les structures suffisantes à la genèse et au maintien du SP se trouvent dans le tronc cérébral. Sur la base de ces anciens travaux, le rôle de l'hypothalamus dans la régulation du SP a été largement négligé, malgré les observations anatomo-pathologiques de von Economo et Horn (1930) et les travaux expérimentaux de Nauta (1946). Cependant, des résultats obtenus avec la préparation du chat pontique laissent penser que l'hypothalamus pouvait intervenir dans le réseau du SP. En effet, le SP disparaît progressivement en faveur de l'éveil après 5 jours de survie. D'autre part, aucun rebond de SP n'est observé lorsque ces animaux sont soumis à une privation sélective de cet état (Jouvet 1988). En revanche, si un isolat d'hypothalamus est laissé intact dans le crâne, alors ces animaux présentent des quantités normales de SP et

peuvent survivre plusieurs mois. Ces observations suggèrent que le tronc cérébral contient les structures responsables de l'apparition du SP, mais pas celles nécessaires à son homéostasie.

Ce rôle de l'hypothalamus postérieur dans la régulation du SP a par la suite été confirmé par des études pharmacologiques et électrophysiologiques. Ainsi, l'inactivation réversible de l'aire latérale de l'hypothalamus par le muscimol, un agoniste des récepteurs GABA<sub>A</sub> induit une disparition du SP chez le chat (Lin et al. 1989). De plus, des neurones actifs spécifiquement au cours du SP ont été enregistrés dans cette même région chez le rat (Steininger et al. 1999; Alam et al. 2002; Koyama et al. 2003).

Verret et al. (2003) ont montré l'existence d'une population de neurones hypothalamiques activés chez le rat après une hypersomnie de SP, les neurones exprimant l'hormone de mélano-concentration (MCH). Chez les mammifères, la MCH est considérée comme un neurotransmetteur. Elle est en particulier connue pour son rôle dans la prise alimentaire et l'équilibre énergétique (Qu et al. 1996; Shimada et al. 1998; Ludwig et al. 2001). Les neurones à MCH sont localisés exclusivement dans la région périfornicale, l'hypothalamus latéral, le noyau hypothalamique dorso-médian, l'aire hypothalamique dorsale et la zona incerta (Bittencourt et al. 1992). Une étude récente menée sur le rat vigile en contention a montré que les neurones à MCH présentent une activité électrique corrélée aux états de vigilance. Ces neurones déchargent en effet presque uniquement au cours du SP (Hassani et al. 2009). Les neurones à MCH participeraient à la régulation du SP via l'inhibition des structures d'éveil.

Deux études récentes suggèrent un rôle capital d'une autre population neuronale de l'hypothalamus, celle des neurones GABAergiques, dans la régulation du SP chez le rat. Par double marquage de la GAD et du Fos au cours du protocole privation-hypersomnie de SP, Sapin et al. (2010) ont mis en évidence l'activation d'une forte population de neurones GABAergiques pendant l'hypersomnie. Hassani et al. (2010) ont montré, par marquage juxtacellulaire sur la préparation du rat vigile en contention, la présence de neurones GABAergiques déchargeant avec une fréquence significativement plus élevée pendant le SP que pendant le SL. Fait intéressant à noter ici, 85% des neurones à MCH sont aussi GABAergiques (Sapin et al. 2010) mais nous ne savons pas si les neurones GABAergiques enregistrés par Hassani et al (2010) sont aussi à MCH.

Les neurones de l'hypothalamus postérieur expriment toutefois un grand nombre de neurotransmetteurs et de neuropeptides. Aujourd'hui, en l'absence de démonstration expérimentale, la nature neurochimique de tous les neurones hypothalamiques impliqués dans la régulation du SP reste à déterminer.

## **E. Mécanismes de l'activation corticale et de l'atonie musculaire au cours du sommeil paradoxal**

Chez le chat, les neurones du péri-LC alpha peuvent être divisés en deux populations (Sakai et Koyama, 1996) :

- la première est composée de neurones localisés dans la partie dorsale et rostrale du péri-LC alpha, inhibés par le carbachol et projetant aux noyaux intralaminaires du thalamus, à l'hypothalamus postérieur et au télencéphale.

L'hypothèse est que ces neurones participent à **l'activation corticale** au cours du SP.

- La seconde est composée de neurones excités par le carbachol, possédant une distribution large dans l'ensemble du péri-LC alpha et projetant au noyau gigantocellulaire ventral.

L'hypothèse est que ces neurones participent à **l'atonie musculaire** au cours du SP.

### **1. Mécanismes responsables de l'activation corticale**

Les mécanismes responsables de l'activation corticale au cours du SP sont très peu connus. La littérature actuelle est, en effet, plus riche en ce qui concerne l'étude des mécanismes mis en jeu au cours du SL. Néanmoins, plusieurs travaux sont en cours et permettent d'étoffer nos connaissances.

L'EEG du SL est constitué d'oscillations lentes qui sont synchronisées avec le mode de décharge de tous les neurones corticaux. Il a été montré que ceux-ci adoptent au cours du SL un mode de décharge différent de celui qu'ils adoptent au cours de l'éveil et du SP (Evarts 1964; Steriade et Deschênes 1974). Au cours du SL, il est observé une alternance d'hyperpolarisations et de dépolarisations des neurones néocorticaux à la fréquence de 0.75Hz. Ces hyperpolarisations sont de longue durée, cycliques et ne seraient pas médiées par des événements GABAergiques ou une ouverture des conductances potassiques, mais plutôt par une diminution ou un arrêt des influences excitatrices (Contreras et al. 1996; Timofeev et al. 1996). Ces hyperpolarisations au cours du SL sont les premiers signes intracellulaires de transition de l'état de SL à celui de SP ou de transition du SL à l'éveil (Figure 7).

De plus, Steriade et al. (1990) ont montré que les noyaux cholinergiques du pont sont de bons candidats pour la genèse et le maintien des processus d'activation tonique des

systèmes thalamo-corticaux. En effet, l'enregistrement de ces neurones cholinergiques a montré qu'ils augmentent leur taux de décharge environ 10-20 secondes avant l'activation corticale. Les neurones néocorticaux suivraient cette augmentation d'activité par des relais thalamiques.

Chez le rat, l'analyse spectrale d'un EEG au cours du SP montre la présence d'une onde dite onde thêta. Cette onde serait détectable grâce à la conductance volumique de la boîte crânienne. Sa fréquence se situe entre 4 et 8Hz. Cette onde est visible au cours de l'éveil attentif et/ou actif, lorsque l'EEG cortical est de bas voltage (Vanderwolf et Robinson 1981), mais prédomine au cours du SP. Les générateurs des oscillations thêta sont situés dans plusieurs structures, en particulier dans le cortex entorhinal, les régions CA3/CA1 de l'hippocampe, dans le septum médian et la bande diagonale de Broca. (Buzsáki 1997; 2002; Petsche et al. 1962; Vertes et Kocsis 1997). Récemment, il a été suggéré que l'hippocampe en lui-même serait capable de générer des oscillations thêta (Goutagny et al. 2009).

D'après Lu et al., 2006, la lésion de la région précoeruleus entrainerait la suppression du rythme thêta au cours du sommeil (Lu et al. 2006). Ces auteurs ont défini cette région comme étant située médianement au LC, dorsalement au SLD et contenant des neurones SP-On. Leur travaux ont montré que suite à l'injection d'un traceur rétrograde, la CTb, au sein du septum médian, des neurones rétrogradement marqués sont situés dans la région SP-On précoeruleus. Les neurones de cette région sont en majorité de glutamatergique et environ la moitié exprime Fos après hypersomnie de SP. Les neurones glutamatergiques de la région précoeruleus SP-On projetant au septum médian pourraient donc jouer un rôle-clé dans les mécanismes de genèse du thêta hippocampique au cours du SP.

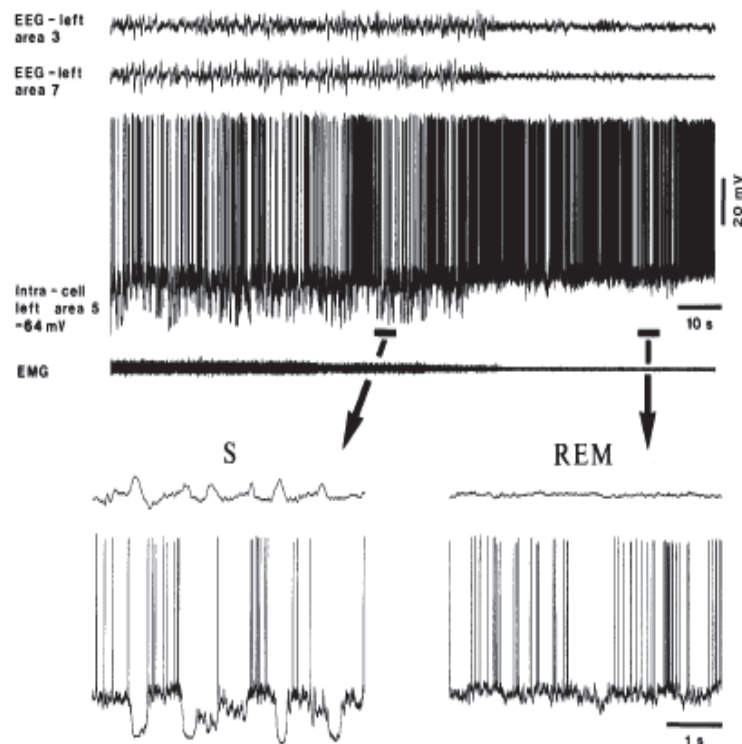


Figure 7. Enregistrement de l'EEG, de l'EMG et du signal intracellulaire cortical. Le SL (S) est caractérisé par des hyperpolarisations cycliques. Celles-ci sont bloquées au cours du SP (REM) (Steriade et al., 2001).

## 2. Mécanismes responsables de l'atonie musculaire

Il est connu que les motoneurones crâniens et spinaux sont hyperpolarisés au cours du SP, induisant de ce fait l'atonie musculaire caractéristique de cet état (Chase et al. 1980; Chase et Morales 1990). Ainsi, l'atonie musculaire du SP serait un phénomène actif, résultant de l'activation de neurones inhibiteurs projetant aux motoneurones crâniens (Chase et al. 1984) et spinaux (Holstege et Bongers 1991).

### ◆ La voie noyau gigantocellulaire ventral- motoneurones spinaux et crâniens

Le noyau magnocellulaire chez le chat ou gigantocellulaire ventral (GiV) chez le rat est situé dans la partie ventrale du bulbe rachidien.

Il a été montré qu'une lésion cytotoxique du GiV induit une diminution des quantités de SP et augmente le tonus musculaire au cours de cet état (Holmes et Jones 1994). Cette donnée confirme la contribution essentielle du GiV à l'atonie musculaire observée au cours du SP. De plus, une étude neuroanatomique combinant le double marquage Fos à

l'immunohistochimie de la glycine, pendant la période de SP induite par l'administration de bicuculline dans le SLD, montre que la moitié des neurones immunomarqués Fos dans le GiV sont de nature glycinergique (Boissard et al. 2002). Ces résultats suggèrent que le GiV contient des neurones de type SP-On de nature glycinergique. Ils sont corroborés par des études précédentes chez le chat montrant que des neurones de type SP-On projettent aux motoneurones de la moelle épinière (Jones 2004). Il a de plus été montré que la glycine est responsable de l'inhibition des motoneurones, du noyau moteur trijumeau et du noyau moteur de l'hypoglosse (Morales et al. 1999; Yamuy et al. 1999).

◆ La voie noyau sublatérodorsal-noyau gigantocellulaire ventral

Chez le chat, le noyau magnocellulaire, équivalent du GiV chez le rat, reçoit des afférences de neurones SP-On excités par le carbachol et repartis dans l'ensemble du péri-LC alpha (Sakai et Koyama 1996). Chez le rat, les neurones du SLD projettent sur les pré-motoneurones du GiV et des noyaux voisins (noyau gigantocellulaire alpha et raphé magnus) (Boissard 2002). Cette voie ne serait pas cholinergique (Luppi et al. 1988). Elle pourrait être de nature glutamatergique puisque la libération de glutamate au sein du GiV et du noyau gigantocellulaire alpha (GiA) augmente au cours du SP (Kodama et al. 1998). Boissard et al. (2002) ont montré que les neurones glycinergiques du GiV, du GiA et du Raphé Magnus sont immunomarqués Fos suite à l'induction de SP par éjection longue de bicuculline dans le SLD. De plus, l'injection d'agoniste non-NMDA au sein du GiV entraîne la suppression de l'atonie musculaire au cours du SP (Lai et Siegel 1991) suggérant que celle-ci est médiée par des récepteurs glutamatergiques non-NMDA. Ces données suggèrent l'existence d'une voie directe entre les neurones SP-On glutamatergiques du SLD et les neurones glycinergiques du GiV au cours du SP

Toutefois, une étude récente suggère qu'il existerait une voie directe entre les neurones glutamatergiques SP-On de la partie ventrale du SLD et des interneurones spinaux, entraînant ainsi l'atonie musculaire au cours du SP (Lu et al. 2006).

Il est alors bien admis que l'atonie musculaire est due à une voie SLD-GiV/GiA descendante, excitatrice au cours du SP. Les neurones SP-On du GiV inhiberaient les motoneurones via la glycine au cours du SP, provoquant alors l'atonie musculaire caractéristique de cet état.

## V. MODELISATION DU RESEAU DU SOMMEIL PARADOXAL

### A. Modèle d'interaction réciproque

Au milieu des années 70, Hobson et McCarley ont proposé pour la première fois un modèle dit d'interaction réciproque pour expliquer la genèse du SP (Hobson et al. 1975; McCarley et Hobson 1975). Ce modèle met en jeu le LC et le noyau gigantocellulaire bulbaire. Plus tard, le développement de la fluorescence induite par le formol, révélant la nature neurochimique des neurones, a permis de développer un nouveau modèle de la genèse du SP. En effet, il a été montré que les neurones du LC et NRD sont respectivement noradrénergiques et sérotoninergiques. De plus, les neurones de ces deux noyaux ne déchargent plus au cours du SP mais augmentent leur fréquence de décharge au cours du SL et d'autant plus au cours de l'EV. Ces neurones sont donc de type SP-Off (McGinty et Harper 1976; Aston-Jones et Bloom 1981). D'autre part, les neurones des noyaux latéro-dorsal (LDT) et pédonculo-pontin (PPT) sont de nature cholinergique et sont considérés comme SP-On (Jouvet 1962; Mitani et al. 1988).

En intégrant ces données, McCarley et Massaquoi ont révisé le modèle initial d'interaction réciproque (Massaquoi et McCarley 1992; McCarley et Massaquoi 1992) et mis en jeu la formation réticulée (Figure 8).

Sakai (1988) propose que la genèse du SP est due à une interaction inhibitrice mutuelle entre des neurones SP-On cholinergiques/cholinocetifs et des neurones SP-Off monoaminergiques.

Ce modèle d'interaction réciproque a été bien accepté jusqu'à l'avancée des travaux montrant qu'un autre modèle pour la genèse et le maintien du SP est envisageable.

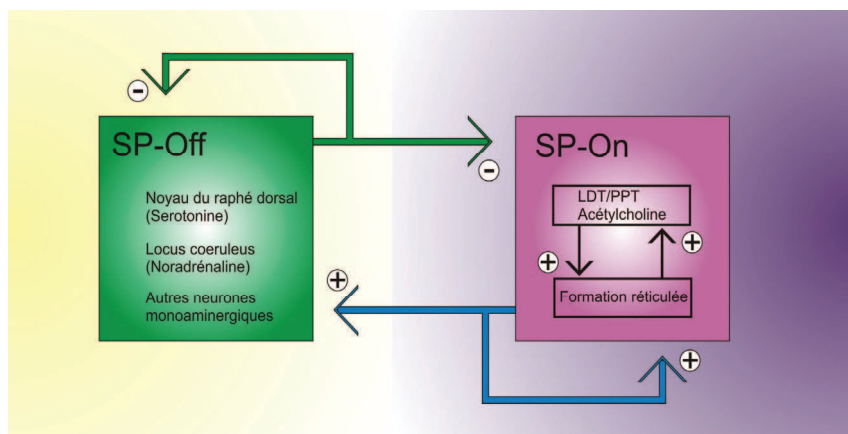


Figure 8. Schéma du modèle d'interaction réciproque (D'après McCarley et Massaquoi, 1992).



## B. Le modèle « Flip-Flop »

Ce modèle a été proposé par Lu et al. (2006) et récemment étoffé par la même équipe (Saper et al. 2010). Ces auteurs proposent que les neurones monoaminergiques du LC et du NRD excitent les neurones de la vIPAG et du LPT et inhibent les neurones du PPT et du LDT. Le mécanisme de « flip-flop » proposé par ces auteurs est mis en jeu entre les neurones GABAergiques de la vIPAG/LPT qui seraient de nature SP-Off et les neurones GABAergiques du SLD et de la région précoeruleus qui sont de nature SP-On. Il s'agit en fait d'une inhibition mutuelle (Figure 9).

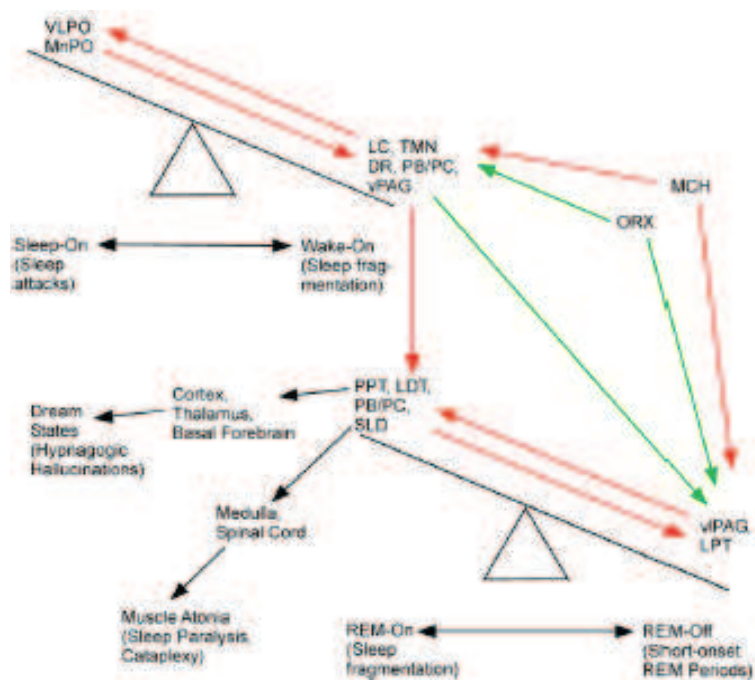


Figure 9. Modèle dit de « flip-flop » mettant en jeu une inhibition mutuelle entre les neurones GABAergiques SP-On du SLD et des neurones GABAergiques SP-Off de la vIPAG. Ce modèle montre également la place d'autres régions connues pour leur implication dans le réseau du SP. (Saper et al., 2010).

Flèches rouges : inhibition, flèches vertes : excitation

Récemment, Sapin et al. (2009) puis Luppi et al. en 2010 (Luppi et al. 2010; Sapin et al. 2009) ont proposé un autre modèle intégrant toutes les nouvelles données acquises (Figure 10). Ce modèle met en jeu deux types neuronaux : les neurones SP-On, plus actifs au cours du SP et les neurones SP-Off, silencieux au cours du SP. Le SLD, SP-On, est considéré comme le centre exécutif du SP. Ce dernier envoie des projections descendantes sur le GiV responsable de l'atonie musculaire et des projections ascendantes sur le thalamus, structure responsable de l'activation corticale au cours du SP.

La vIPAG et le DpMe contiennent à la fois des neurones de type SP-On et de type SP-Off. Ces derniers, de nature GABAergique, inhibent le SLD au cours de l'éveil et du SL.

Toutefois, au cours du SP, cette inhibition est levée. De plus, les neurones SP-Off du complexe vIPAG/DpMe seraient inhibés par les neurones à MCH de l'hypothalamus postérieur.

Les noyaux monoaminergiques du LC et du DRN sont tous deux de type SP-Off. Au cours du SP, il est alors nécessaire que ces noyaux soient inhibés. Cette inhibition se ferait par le DPGi et aussi par la partie SP-On du complexe vIPAG/DpMe.

Ce modèle est celui sur lequel nous allons, dans la suite de ce travail, baser nos résultats et conclusions.

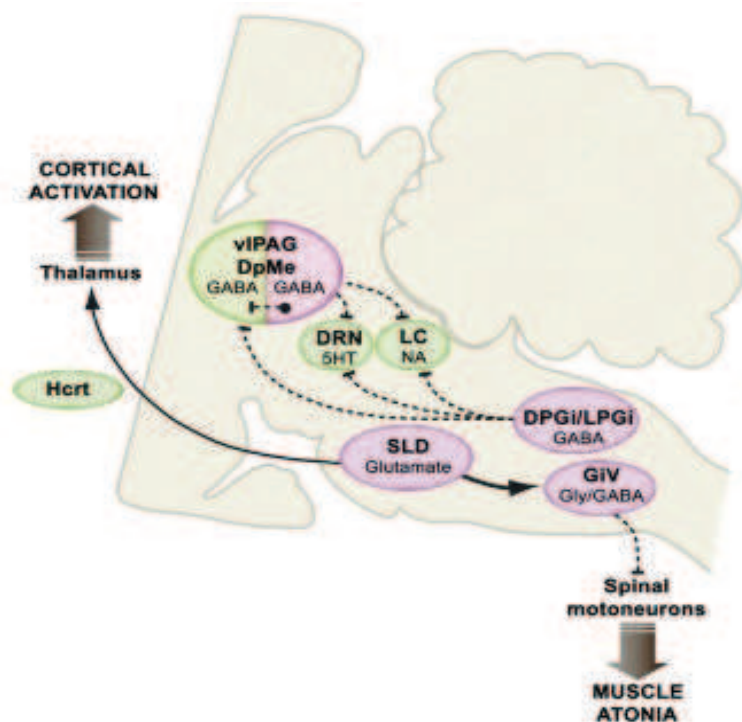


Figure 10. Schéma du réseau sous-tendant la genèse et le maintien du SP. Les noyaux SP-On sont représentés en rose et les noyaux SP-Off sont représentés en vert. Les traits pleins représentent les voies excitatrices et les traits pointillés représentent les voies inhibitrices (Sapin et al., 2009).

## VI. LE NOYAU PARAGIGANTOCELLULAIRE LATÉRAL

### A. Anatomie

#### 1. Localisation et définition

Le noyau paragigantocellulaire latéral (LPGi) est situé dans la partie ventro-latérale du bulbe rachidien. Il a été décrit chez le rat par Andrezik et al. en 1981. Plusieurs auteurs ont fait référence au LPGi en utilisant différents noms (pour revue (Bourassa et al. 2009) : la

RVLM (dénomination anglosaxonne : Rostral VentroLateral reticular Medulla) (Pilowsky et al. 1986; Morris et al. 1987; Blessing et al. 1987) ; le noyau subrétrofacial (Dampney et al. 1987; Head et Howe 1987; Allen et al. 1988) ; le noyau ambigu ventral (Swanson 2004); le noyau réticulé rostro-ventrolatéral (Paxinos et Watson 1986; 2005) ; la colonne rostrale longitudinale du noyau réticulé rostro-ventrolatéral (Ruggiero et al. 1994) ; la région vasopressive (Willette et al. 1983; Sapru 1996) ; C1 composé de neurones adrénérgiques (Reis et al. 1984; Atkinson et al. 1986). Toutefois, il est maintenant admis que la région C1 n'est pas synonyme de RVLM car elle s'étend aussi caudalement dans le bulbe rachidien ventrolatéral caudal (CVLM).

Dans ce travail de thèse, nous définissons le LPGi comme l'ensemble des deux noyaux nommés LPGi et RVL (dénomination anglosaxonne : rostroventrolateral reticular nucleus) par Paxinos et Watson (1998) (Figure 11). Selon cette définition, le LPGi comprend une partie rostrale, médiane au noyau du nerf facial, et une partie caudale à ce noyau. Cette deuxième partie est la plus étendue : de -11.5 mm jusqu'à -13 mm en arrière du Bregma (soit sur 1.5 mm caudalement au noyau du facial), de -1.5 à -2.5 mm médio-latéralement (soit 1 mm) et de 8 à 9,5 mm sous la surface du cervelet (soit 1,5 mm). C'est dans cette deuxième partie que nous avons enregistré l'activité des neurones et injecté les traceurs anatomiques. Pratiquement, nous considérons que le LPGi est situé juste ventralement après le dernier neurone respiratoire enregistré.

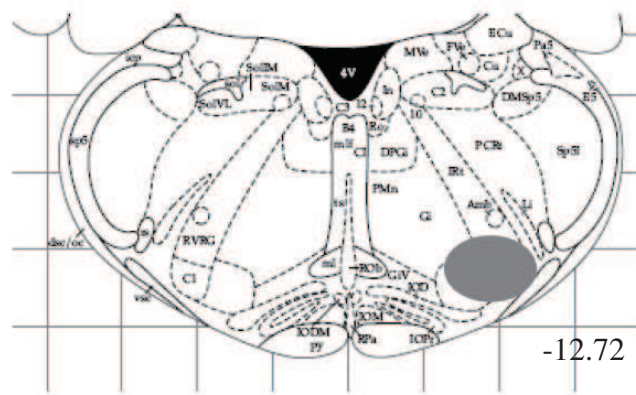


Figure 11. Schéma de la localisation du LPGi : cercle gris (Paxinos et Watson, 1998)

## 2. Propriétés neurochimiques des neurones du LPGi

Plusieurs populations neuronales, utilisant divers neurotransmetteurs, ont été identifiées au sein du LPGi, principalement par des techniques d'immunohistochimie ou d'hybridation *in situ* :

### ◆ Neurones adrénérgiques

Une population de neurones catécholaminérgiques a été identifiée il y a plus de 40 ans par Dahlström et Fuxe (1964) dans le bulbe rachidien ventro-latéral. Ce sont les travaux de Ross et al. (1984) et Hökfelt et al. (1984) qui ont révélé l'existence de deux populations catécholaminérgiques, l'une noradrénérgique (appelée A1) s'étendant très caudalement dans le bulbe rachidien ventrolatéral (depuis la jonction avec la moelle épinière jusqu'au noyau réticulaire latéral) et l'autre adrénérgique, située juste rostralement à la précédente, dans ce que nous nommons ici le LPGi.

### ◆ Neurones glutamatergiques

Le LPGi contient de nombreux neurones qui expriment le VGLUT 2 (Stornetta et al. 2002), l'un des transporteurs vésiculaires du glutamate et reconnu comme marqueur des neurones glutamatergiques. Dans cette même étude les auteurs montrent que près de 80% des neurones adrénérgiques expriment le VGLUT 2 et sont donc sans doute de nature glutamatergique.

### ◆ Neurones GABAérgiques

L'hybridation *in situ* de la GAD (enzyme de synthèse du GABA) a montré que le LPGi contient de nombreux neurones GABAérgiques, repartis de façon uniforme dans tout le noyau (Ruggiero et al. 1985).

◆ Neurones glycinergiques

L'immunohistochimie de la glycine a montré que le LPGi contient un nombre important de cellules glycinergiques également répartis uniformément dans le noyau. Ceci a été montré chez le chat (Fort et al. 1993) et chez le rat (Rampon et al. 1996a).

◆ Neurones sérotoninergiques

Grâce à l'immunohistochimie de la sérotonine, Steinbusch (1981) a révélé la présence de neurones sérotoninergiques dans la partie médiane et antérieure (juxtafaciale) du LPGi. Ces neurones sont en continuité avec ceux du noyau gigantocellulaire alpha, eux-mêmes en continuité avec ceux du noyau raphé magnus.

◆ Neurones cholinergiques

La démonstration la plus récente de l'existence de neurones cholinergiques dans le LPGi est celle de Verret et al. (2005).

### 3. Afférences

Différentes structures du système nerveux central ont été montrées comme afférentes au LPGi (Tableau 1). Plusieurs auteurs ont utilisé l'injection de traceurs rétrogrades chez le rat, au sein du LPGi, pour définir ces afférences (Andrezik et al. 1981; Van Bockstaele et al. 1989). Ces auteurs ont, en particulier, utilisé la Horseradish Peroxydase HRP (Andrezik et al. 1981), la WGA-HRP et le Fluorogold (Van Bockstaele et al. 1989; 1993). Chez le chat, Lovick en 1988 a montré que la stimulation de quatre des plus importantes afférences entraînait une réponse différentielle au sein du LPGi. En effet, la stimulation du NTS et du raphé magnus entraîne une réponse majoritairement inhibitrice contrairement à la stimulation du noyau parabrachial latéral (PBL) et de la PAG dorsale qui entraîne une réponse majoritairement excitatrice.

La moelle épinière est également une région afférente au LPGi. En effet, après l'injection de traceur rétrograde au sein du LPGi, des neurones rétrogradement marqués sont

observés tout le long de la moelle épinière dans les couches iV, V, VII, VIII et X (Andrezik et al. 1981; Van Bockstaele et al. 1989).

D'autres auteurs ont par ailleurs montré que suite à une injection de Fluorogold au sein du LPGi, des neurones rétrogradement marqués sont localisés dans les cortex sensorimoteur et insulaire (M'hamed et al. 1993).

**Tableau 1. Liste des structures connues comme afférentes au LPGi.**

| <b>STRUCTURES</b>                         | <b>AUTEURS</b>  |
|---|---|
| Moelle épinière                           | (Van Bockstaele et al. 1989; Andrezik et al. 1981)                                      |
| LPGi contralatéral                        | (Van Bockstaele et al. 1989; Andrezik et al. 1981)                                      |
| Raphé pallidus                            | (Van Bockstaele et al. 1989; Andrezik et al. 1981)                                      |
| Noyau ambigu                              | (Dampney et al. 1987)   |
| Noyau du faisceau solitaire               | (Van Bockstaele et al. 1989; Andrezik et al. 1981; Ross et al. 1985; Lovick 1988)       |
| Noyau gigantocellulaire                   | (Van Bockstaele et al. 1989; Andrezik et al. 1981)                                      |
| Noyau réticulé parvocellulaire            | (Van Bockstaele et al. 1989; Oskutyte et al. 2006)                                      |
| Noyau paratrigéminale                     | (de Sousa Buck et al. 2001)   |
| Raphé magnus                              | (Andrezik et al. 1981; Lovick 1988)   |
| Noyau vestibulaire médian                 | (Van Bockstaele et al. 1989; Andrezik et al. 1981)                                      |
| A5  | (Van Bockstaele et al. 1989)  |
| Noyau parabrachial latéral                | (Van Bockstaele et al. 1989; Andrezik et al. 1981; Lovick 1988)                         |
| Kolliker Füse                             | (Van Bockstaele et al. 1989; Dampney et al. 1987)                                       |
| Noyau réticulé du pont                    | (Andrezik et al. 1981)  |
| Substance grise périaqueducale            | (Van Bockstaele et al. 1989; Lovick 1988)   |
| Noyau supraoculomoteur                    | (Van Bockstaele et al. 1989)  |
| Noyau paraventriculaire de l'hypothalamus | (Van Bockstaele et al. 1989; Andrezik et al. 1981; Badoer 2001; Tagawa et Dampney 1999) |
| Hypothalamus latéral                      | (Van Bockstaele et al. 1989; Andrezik et al. 1981; Dampney et al. 1987)                 |
| Noyau ventral lemniscus latéral           | (Andrezik et al. 1981)  |
| Noyau cunéiforme                          | (Andrezik et al. 1981)  |
| Amygdale centrale                         | (Saha 2005)   |
| Cortex sensorimoteur                      | (M'hamed et al. 1993)   |
| Cortex insulaire                          | (M'hamed et al. 1993)   |

#### 4. Efférences

Les projections du LPGi ont tout d'abord été décrites par Guyenet et Young (1987). Ces auteurs ont utilisé un traceur antérograde, la Leucoagglutinine du *Phaseolus* (PHA-L) afin de déterminer les régions efférentes au LPGi rétrofacial (Tableau 2). Selon la localisation des sites de PHA-L dans le LPGi, des différences ont été notées. Lorsque le site est plus dorsal, le Kolliker-Fuse et le noyau parabrachial latéral sont plus marqués. Néanmoins, aucun des sites ne projette sur la partie médiane du noyau parabrachial. Dans tous les cas le LC reçoit de fortes projections du LPGi. Cela est confirmé par les travaux de Ennis et Aston-Jones (1988). En effet, ces derniers ont montré que le LPGi est une des afférences excitatrices majeures au LC. Ces auteurs considéraient que le LC reçoit des afférences de deux régions principales : le LPGi et le Noyau prepositus hypoglossi. Toutefois, les travaux de Luppi et al. (1995a), utilisant le traceur rétrograde CTb, ont montré que le LPGi n'était pas l'une des seules afférences au LC mais que celui-ci recevait des projections de nombreuses autres structures cérébrales.

Enfin, le LPGi projette de façon importante sur la colonne intermédiolatérale de la moelle épinière (Ross et al. 1984).

**Tableau 2. Liste des structures efférentes du LPGi (d'après Guyenet et Young., 1987). 0 : ne projette pas ; + : faible projection ; ++ : projections modérées ; +++ : forte projection. CVL : caudal ventrolateral medulla, C5 : 5th cervical level, spinal cord, KF : Kolliker-Füse, LC : Locus coeruleus, L1 : 1st lumbar level, spinal cord, NIH : nucleus interpositus hypoglossi, NTS : nucleus of the solitary tract, PBN : parabrachial nuclei, RPa : Raphe pallidus, TVH : Thoracic ventral horn, XII : hypoglossal nucleus, T2 : 2<sup>nd</sup> thoracic level, spinal cord, T10 : 10th thoracic level, spinal cord.**

| Case no. | PBN | KF  | LC  | NIH | RPa | NTS | XII | CVL | TVH | C <sub>5</sub> | T <sub>2</sub> | T <sub>10</sub> | L <sub>1</sub> |
|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----------------|----------------|-----------------|----------------|
| 1        | 0   | -   | ++  | +++ | 0   | ++  | 0   | ++  | 0   | 0              | +++            | +++             | +++            |
| 2        | +   | 0   | ++  | +   | 0   | +   | ±   | ++  | 0   | 0              | +++            | +++             | +++            |
| 3        | ++  | +   | +   | 0   | 0   | +   | +   | ++  | +   | -              | ++             | ++              | ++             |
| 4        | +++ | +++ | ++  | 0   | 0   | +++ | ++  | ++  | ++  | +              | ++             | ++              | ++             |
| 5        | +   | 0   | +++ | 0   | +   | ++  | 0   | 0   | 0   | 0              | +++            | +++             | +++            |
| 6        | ++  | ++  | +   | 0   | +   | ++  | +++ | +   | 0   | 0              | ++             | ++              | ++             |
| 7        | ±   | ±   | +++ | 0   | +   | +   | 0   | +   | 0   | +              | ++             | ++              | ++             |

### **B. Fonctions du LPGi**

#### 1. Rôle du LPGi dans la régulation sympathique cardiovasculaire

La région du LPGi est particulièrement bien connue pour son implication dans la régulation des fonctions cardiovasculaires (Guyenet 2000; Dampney 1994a; Ross et al. 1984).



Ces fonctions regroupent le contrôle de la pression artérielle, ceux du rythme cardiaque et de la composition chimique du sang. Elles reposent sur la mise en jeu du système nerveux autonome, avec ses deux composantes, sympathique et parasympathique (Figure 12) qui ont des rôles antagonistes. En effet, la stimulation du système nerveux sympathique entraîne l'augmentation de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque et la stimulation du système nerveux parasympathique entraîne, au contraire, la diminution de ces deux constantes biologiques.

Le système sympathique est constitué de neurones pré-ganglionnaires cholinergiques dont les corps cellulaires sont situés dans la moelle épinière, principalement dans la colonne intermédiolatérale. Ces derniers se projettent sur les neurones ganglionnaires noradrénergiques situés dans les ganglions de la chaîne sympathique, adjacente à la colonne vertébrale. Les axones des neurones ganglionnaires innervent différents organes, dont le cœur et les vaisseaux sanguins (Figure 13).

Les éléments périphériques capteurs de la pression artérielle et de la composition du sang sont, respectivement, les barorécepteurs et les chémorécepteurs. Ils sont positionnés à des endroits-clés du système circulatoire, tels que le sinus carotidien, la crosse aortique et les oreillettes et ventricules. Les informations qu'ils envoient au système nerveux central sont transmises par la neuvième et la dixième paire de nerfs crâniens et sont reçues par le NTS qui les relaie et les transmet à de nombreuses régions du cerveau, dont le LPGi (Ross et al. 1985; Renaud et al. 1992).

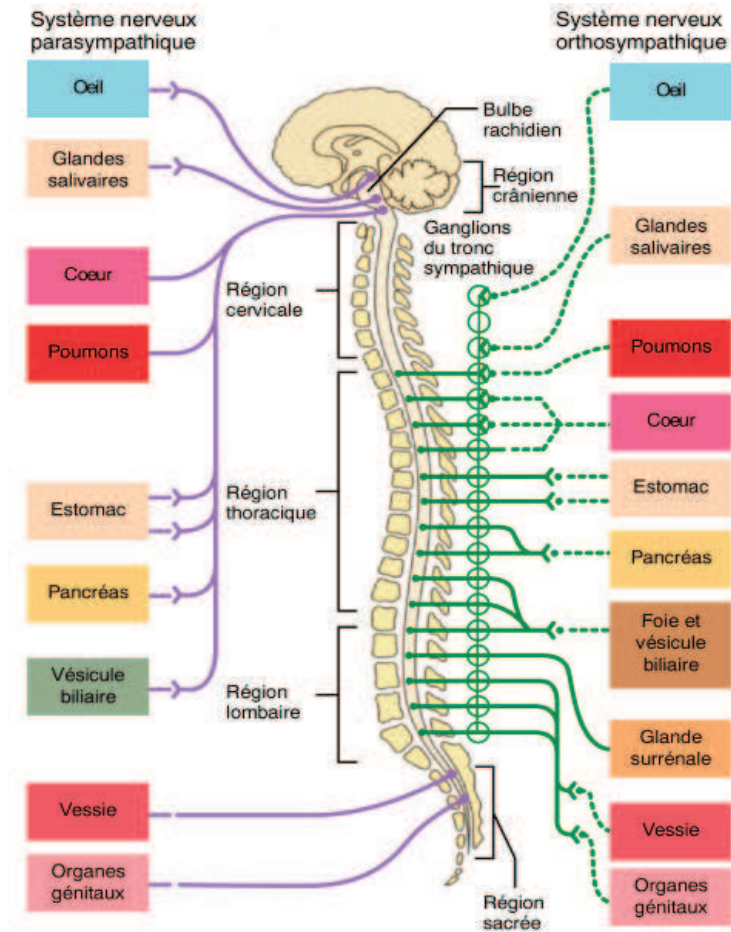


Figure 12. Schéma général de l'organisation du système nerveux sympathique.

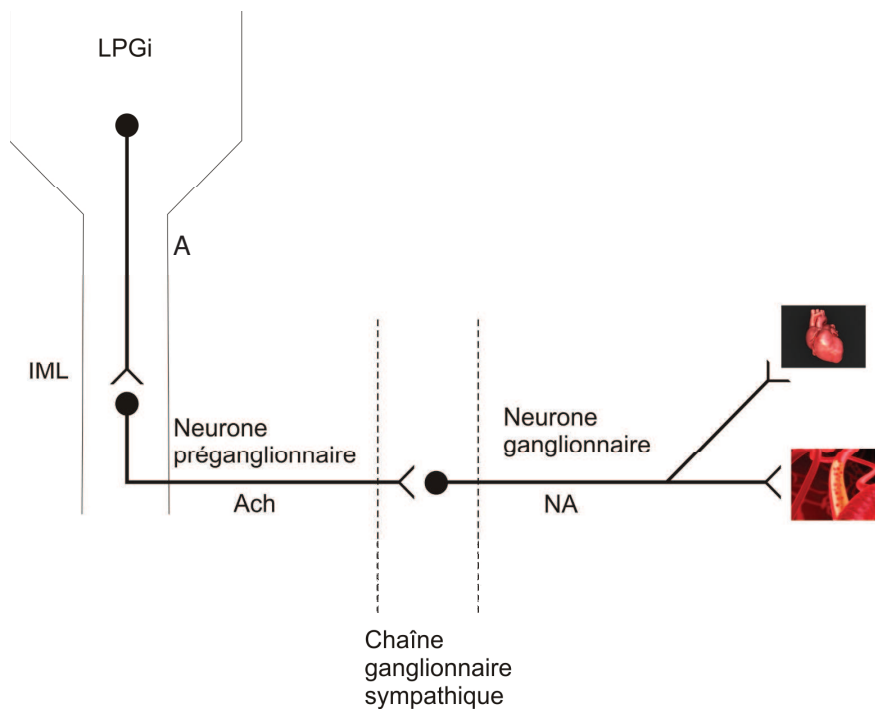


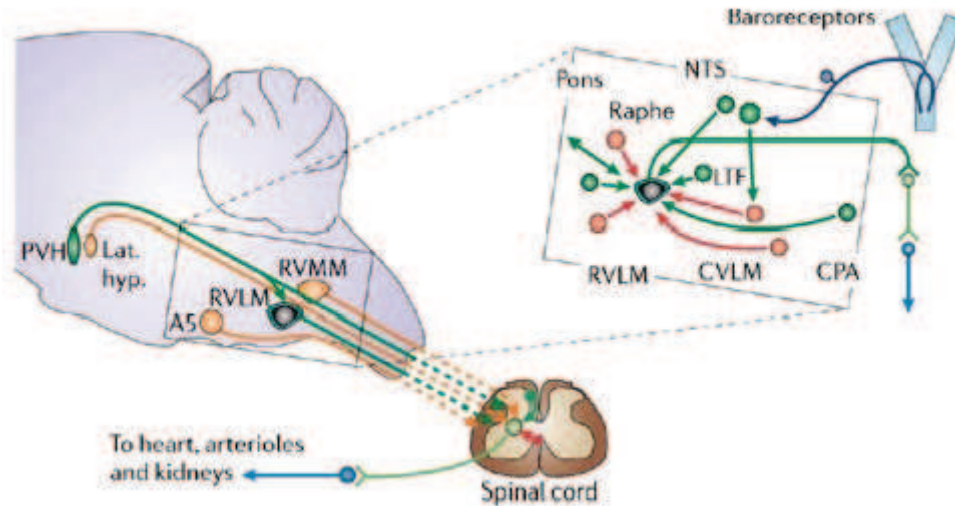
Figure 13. Schéma détaillé montrant la place du LPGi dans la régulation sympathique. Les neurones du LPGi impliqués dans la régulation cardiovasculaire excitent les neurones préganglionnaires dont les corps cellulaires sont situés dans la colonne intermédiolatérale (IML) de la moelle épinière. Ces neurones de nature cholinergique excitent les neurones noradrénergiques ganglionnaires situés dans la chaîne ganglionnaire sympathique. Ces derniers entraînent alors l'augmentation de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle.

Les premières études suggérant un rôle de la région du LPGi dans les fonctions cardiovasculaires datent d'il y a presque 40 ans. Guertzenstein et Silver (1974) ont été les premiers à montrer qu'une inhibition de cette région, par application unilatérale de glycine ou par destruction bilatérale, produit une chute importante de la pression artérielle chez le chat anesthésié. Il a été ensuite montré, sur le même type de préparation, que l'injection locale d'un acide aminé exciteur provoque une forte augmentation de la pression artérielle et que la stimulation des barorécepteurs périphériques provoque une inhibition des neurones de la région (McAllen 1986). Cette région est donc barosensible et sympathoexcitatrice.

Des études complémentaires ont permis de préciser la localisation de la zone impliquée ainsi que la nature des neurones mis en jeu et de leurs récepteurs. La zone impliquée correspond à l'ensemble du LPGi tel que nous le définissons dans ce travail, y compris sa partie antérieure située médialement au noyau du nerf facial. C'est en fait la RVLM définie par la plupart des auteurs. Parmi les neurones mis en jeu figurent les neurones adrénergiques du groupe C1, même si l'adrénaline seule n'est pas le neurotransmetteur sympathoexcitateur, contrairement à l'hypothèse avancée pendant plusieurs années (Ross et al. 1984; Dampney 1981). En effet, les travaux plus récents indiquent que le neurotransmetteur sympathoexcitateur libéré par les terminaisons des neurones de cette région serait le glutamate (Kapoor et al. 1992; Morrison et al. 1989). Fait intéressant, ce glutamate pourrait être synthétisé et libéré en partie par les neurones adrénergiques (Nicholas et al. 1990). Les neurones sympathoexcitateurs de la région du LPGi se projettent sur la colonne intermédiolatérale de la moelle épinière (Ross et al. 1984) et, par cette voie, complètent l'arc réflexe périphérie-système nerveux central-périphérie qui permet le contrôle tonique des paramètres sanguins (Figure 14).

Plusieurs neurotransmetteurs et hormones sont susceptibles de réguler les neurones barosensibles de cette région, tels que le GABA et le glutamate mais aussi l'acétylcholine, la sérotonine, le CRF (corticotropin releasing factor), l'oxytocine, la substance P, la vasopressine et l'oréxine. Le GABA est, en particulier, libéré par les axones de neurones situés caudalement au LPGi, dans la CVLM (dénomination anglo-saxonne pour Caudal Ventro-Lateral Medulla) (Schreihöfer et Guyenet 2003). Certains de ces facteurs tels que l'acétylcholine, la sérotonine et l'oréxine peuvent varier avec les états de vigilance et contribuer ainsi à la régulation circadienne du système nerveux autonome et de la pression artérielle (Barrett et al. 2001). D'autres, comme la vasopressine, l'oxytocine, le CRF et

l'angiotensine II ont été montrés comme participant à la réponse cardiovasculaire à un stress interne ou externe (Brooks et al. 2004; Li et Guyenet 1995; Allen 2002).



**Figure 14.** Schéma du mécanisme de régulation de la pression artérielle par le LPGi. Celui-ci (RVLM) est le centre intégrateur sympathique. Il reçoit en particulier des afférences excitatrices (vert) du NTS et des afférences inhibitrices (rouge) de la CVLM. La RVLM excite alors les neurones préganglionnaires sympathiques (vert clair) de la moelle épinière qui à leur tour excitent les neurones ganglionnaires sympathiques (bleu). (D'après Guyenet 2006).

## 2. Propriétés électrophysiologiques des neurones du LPGi

Le mode de décharge des neurones enregistrés au sein du LPGi et impliqués dans la régulation cardiovasculaire a été corrélé avec le mode de décharge de nerfs sympathiques (Barman et Gebber 1984). Deux types neuronaux ont été enregistrés dans le LPGi : des neurones ayant une activité de type « pacemaker » et d'autres « non-pacemaker ». Le premier type neuronal possède une activité régulière spontanée même en l'absence d'afférences synaptiques (Sun et al. 1988; 1988a). Ces neurones ne sont pas de nature catécholaminergiques, il ne s'agit donc pas des neurones de la partie adrénergique C1 (Sun et al. 1988b). L'autre type neuronal enregistré dans le LPGi est au contraire de type « non-pacemaker » et semble faire partie de C1 et donc être de nature adrénergique (Haselton et Guyenet 1989). Ces types neuronaux enregistrés au sein du LPGi sont tous deux impliqués dans le système cardiovasculaire car ils sont inhibés par les afférences baroréceptrices. Ceci signifie qu'ils sont afférents aux neurones préganglionnaires sympathiques. Toutefois, ces types neuronaux diffèrent de par leur vitesse de conduction axonale et leur taux de décharge

au repos. En effet, les cellules de type « pacemaker » ont une vitesse de conduction et un taux de décharge au repos plus importants que les neurones de type « non pacemaker » (Guyenet et al. 1989).

### 3. Rôle dans le contrôle de la respiration

Le LPGi renferme des neurones présentant un mode de décharge correspondant à différentes phases du rythme respiratoire (Smith et al. 2009).

- Les neurones « early-inspiratory » présentant une diminution du taux de décharge au cours de l'inspiration,
- Les neurones « ramp-inspiratory » présentant une augmentation de leur taux de décharge au cours de l'inspiration,
- Les neurones « post-inspiratory » présentant une diminution du taux de décharge au cours de l'expiration,
- Les neurones « augmenting-expiratory » présentant une augmentation de leur taux de décharge au cours de l'expiration
- Des neurones « pre-inspiratory » qui augmentent leur taux de décharge avant la phase d'inspiration.

La répartition de l'ensemble de ces neurones respiratoires permet de différencier plusieurs compartiments formant une colonne respiratoire rostro-caudale à partir du pôle caudal du noyau facial VII (Figure 15). La répartition rostro-caudale de ces compartiments respiratoires comprend le noyau Bötzing, le noyau pré-Bötzing, le groupe respiratoire ventral rostral (rVRG) et le groupe respiratoire ventral caudal (cVRG).

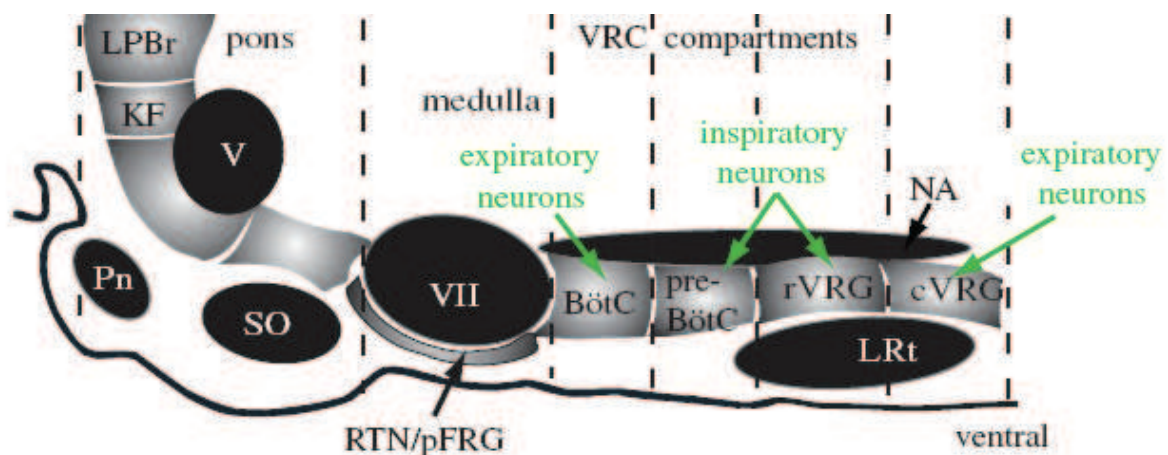


Figure 15. Schéma d'une coupe sagittale de rat s'étendant du pont (à gauche, rostral) au bulbe rachidien (à droite, caudal). Ce schéma montre l'organisation antéro-postérieure des compartiments respiratoires : Bötz, pré-Bötz, rVRG et cVRG.

KF : Kolliker-Füse, LPBr : lateral parabrachial nucleus, NA : Nucleus ambiguus, Pn : noyau du pont, RTN/pFRG : retrotrapezoid nucleus, SO : olive supérieur, V : trigeminal nucleus, VII : facial nucleus.

Nous allons définir les noyaux Bötzinger et pre-Bötzinger car ils sont adjacents à ce que nous nommons LPGi dans ce travail. Nous n'aborderons pas les groupes rVRG et cVRG localisés plus caudalement.

◆ Noyau Bötzinger

Ce noyau est situé juste caudalement au noyau facial VII. Il contient les neurones post-inspiratory et augmenting-expiratory. Schreihofer et al. (1999) ont montré que les neurones « augmenting-expiratory » sont de type glycinergique. Plus récemment, en 2003, Ezure et al., ont montré que les neurones post-I sont également de nature glycinergique. Le noyau Bötzinger est considéré comme la source d'activité expiratoire, toutefois son rôle exclusif dans la genèse de l'activité expiratoire est encore largement débattu.

Pour Smith et al. (2009) le noyau Bötzinger serait impliqué dans les transitions entre les activités inspiratoire et expiratoire.

◆ Noyau pré-Bötzinger

Le noyau pré-Bötzinger est adjacent et situé caudalement au noyau Bötzinger. Il est connu pour être à l'origine de la genèse de l'activité inspiratoire. Le noyau pré-Bötzinger possède deux fonctions importantes :

- générer l'activité inspiratoire excitatrice rythmique mettant en jeu les neurones pre-inspiratory ;
- coordonner l'alternance expiration-inspiration mis en jeu par les neurones inspiratoires inhibiteurs.

Tan et al. (2010) ont déterminé les projections du noyau pré-Bötzinger. Il s'agit de la partie contralatérale du noyau pré-Bötzinger, les parties contralatérale et ipsilatérale du complexe Bötzinger, le groupe respiratoire cVRG, le groupe respiratoire parafacial/noyau retrotrapézoïde, le NTS, le noyau parahypoglosse, le noyau parabrachial, le Kölliker-Fuse et la PAG. Par ailleurs, il a été montré qu'une lésion des neurones du pré-Bötzinger entraîne, après 4 jours, des perturbations respiratoires telles qu'une diminution de la ventilation au cours du SP (McKay et al. 2005). Ces auteurs montrent que ces perturbations s'étendent par la suite à tout le cycle veille-sommeil.



Ainsi, les limites ventrale des deux noyaux Bötzinger et pré-Bötzinger représente la limite dorsale du LPGi tel que nous le définissons dans ce travail.

#### 4. Autres rôles du LPGi

##### ◆ Rôle dans le contrôle de l'érection au cours du SP

Le contrôle de l'érection est dû à une balance des systèmes nerveux sympathique et parasympathique. Le système nerveux parasympathique contribue au rôle excitateur sur le pénis, permettant ainsi son érection. En effet, la vasodilatation entraînée par ce système permet l'afflux sanguin nécessaire au mécanisme érectile du pénis. Au contraire, le système nerveux sympathique joue un rôle inhibiteur. Ce système entraîne une vasoconstriction des vaisseaux, inhibant ainsi les mécanismes érectiles péniens.

Des auteurs tels que Liu et Sachs (1999) ont montré qu'une lésion électrolytique du LPGi entraîne une activation de l'érection pénienne chez le rat. De plus, l'injection d'un traceur transneuronal au sein du corps caverneux du pénis conduit au marquage, dans la moelle épinière, de neurones préganglionnaires sympathiques et parasympathiques et, dans le cerveau, de neurones dans la partie rostrale du LPGi (Marson et al. 1993). Ces neurones du LPGi pourraient être de nature sérotoninergique. En effet, la partie rostrale et médiane du LPGi contient des neurones sérotoninergiques qui se projettent sur la colonne intermédiolatérale de la moelle épinière (Loewy et McKellar 1981; Marson et al. 1992) et, par cette voie, pourraient être le support anatomique de l'effet inhibiteur de la sérotonine sur l'érection pénienne (Marson et McKenna 1992). Pendant le SP, la cessation de l'activité électrique des neurones sérotoninergiques (Trulsson et Jacobs 1979; McGinty et Harper 1976) permettrait une levée de l'inhibition des neurones préganglionnaires spinaux et, donc, une facilitation des érections (Hirshkowitz et Schmidt 2005).

##### ◆ Contrôle du mouvement des vibrisses

Le mouvement des vibrisses est un comportement exploratoire critique chez plusieurs espèces (Brecht et al. 1997). Ce mouvement s'effectue de façon rythmique selon une fréquence située entre 6 et 9 Hz et se trouve sous la dépendance d'un générateur bulbaire (Semba et Komisaruk 1984). Les motoneurones qui commandent ce mouvement sont situés

dans la partie latérale du noyau moteur facial et sont soumis à un contrôle sérotoninergique tonique (Hattox 2003; Cramer et al. 2007). En effet, Hattox (2003) ont montré que la partie rostrale et médiane du LPGi (juxtafacial), ainsi que les noyaux des raphés magnus, pallidus et obscurus, contiennent des neurones sérotoninergiques qui se projettent sur les motoneurones faciaux latéraux. Les mêmes auteurs ont aussi montré que la sérotonine, appliquée in vitro sur des tranches de bulbe rachidien, induit la décharge rythmique des motoneurones faciaux (Hattox 2003). De plus, l'infusion in vivo d'antagonistes sérotoninergiques inhibe le mouvement des vibrisses (Hattox 2003).

L'hypothèse actuelle est que les neurones sérotoninergiques du LPGi rostral font partie intégrante du générateur bulbaire du mouvement des vibrisses et sont soumis à un contrôle provenant du cortex moteur (Figure 16) (Hattox 2002; Castro-Alamancos 2007).

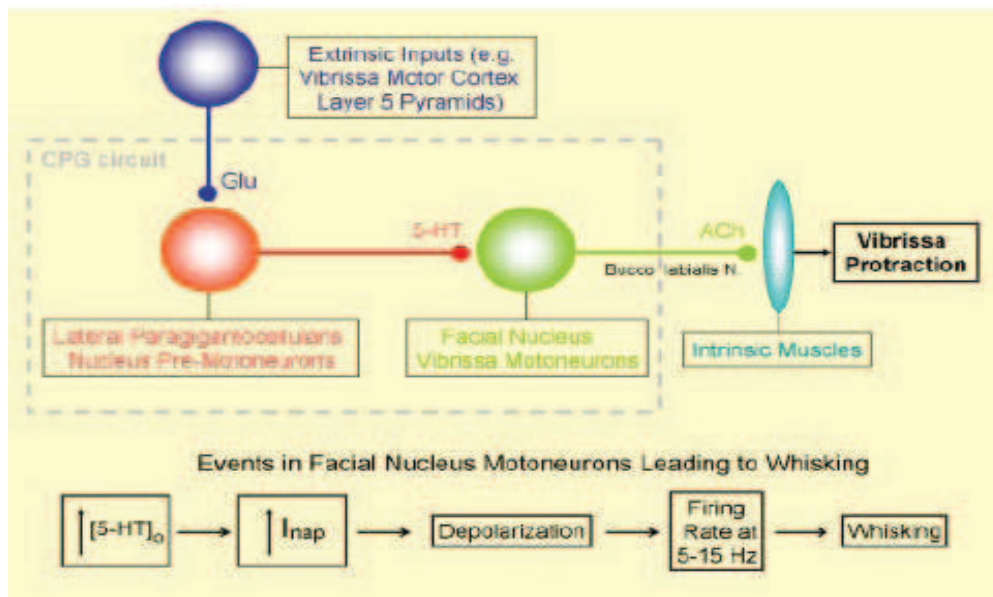


Figure 16. Modèle du mécanisme des mouvements des vibrisses. Le LPGi reçoit des afférences glutamatergiques du cortex moteur. Le LPGi entraîne ensuite une excitation des motoneurones du noyau facial. Ce dernier émet une excitation cholinergique aux muscles intrinsèques des vibrisses. Glu : glutamate ; 5-HT : sérotonine ; ACh : acétylcholine ;  $I_{nap}$  : courant sodique persistant entrant (Castro-Alamancos, 2007).

## VII. RELATION ENTRE LE LPGI ET LE SOMMEIL PARADOXAL

Comme nous l'avons mentionné précédemment, le LPGi est à l'origine bien connu pour son rôle dans la régulation sympathique des fonctions cardiovasculaires. Toutefois, plusieurs arguments désignent le LPGi comme une région qui pourrait jouer un rôle dans le réseau sous-tendant la genèse et le maintien du SP.



### **A. Travaux antérieurs chez le chat**

Le modèle d'interaction réciproque proposé par Sakai (1988) ne permet pas d'expliquer le rythme ultradien du SP (Jouvet et al. 1995). Jouvet et al. (1995) propose alors que le générateur du rythme ultradien ou pacemaker ultradien se trouve dans la partie ventrolatérale du bulbe rachidien et plus précisément dans le LPGi.

Des enregistrements ont été effectués dans le bulbe rachidien chez le chat. En effet, Sakai (1988) a montré que le LPGi contenait des neurones à profil de décharge SP-On.

### **B. Travaux antérieurs chez le rat**

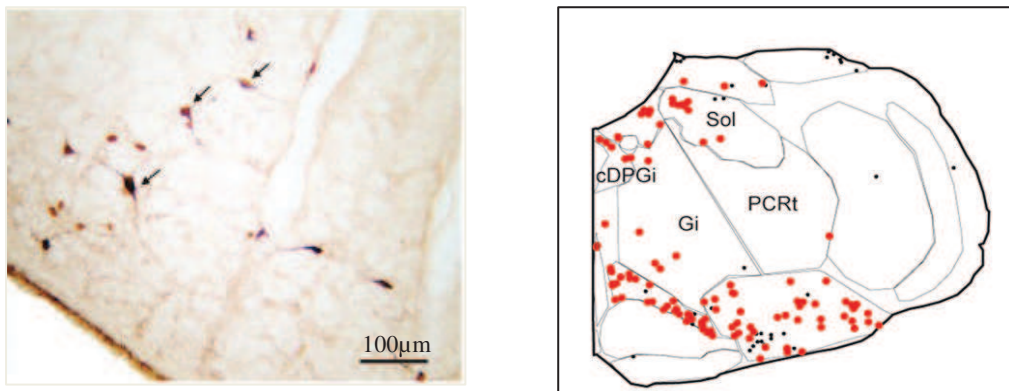
D'une part, les travaux de Verret et al. (2006) ont montré que le LPGi est la structure du tronc cérébral contenant le plus grand nombre de neurones immunomarqués Fos pendant l'hypersomnie de SP qui suit une privation instrumentale. Ces résultats ont été confirmés plus récemment par Sapin et al. (2009). Le LPGi pourrait donc contenir un grand nombre de neurones plus actifs au cours du SP, des neurones SP-On.

D'autre part, l'injection d'un traceur rétrograde, la CTb, au sein du LC, a montré que 29% des neurones rétrogradement marqués CTb dans le LPGi sont doublement marqués Fos/CTb (Verret et al. 2006). La même étude montre que 9.7% des neurones Fos, donc potentiellement SP-On, situés au sein du LPGi, sont afférents au LC (Figure 17). Ces données suggèrent qu'environ 10% des neurones potentiellement SP-On situés dans le LPGi seraient afférents au LC. D'autre part, Sapin et al. (2009) ont montré récemment que 70% des neurones Fos situés dans le LPGi sont de nature GABAergique (Figure 17). De plus, les neurones noradrénergiques du LC sont inhibés par le GABA. En effet, l'injection microiontophorétique de bicuculline, un antagoniste GABAergique, au niveau d'un neurone SP-Off noradrénergique entraîne une excitation de ces neurones (Figure 18) (Gervasoni et al. 1998). Ceci suggère que le LPGi contiendrait des neurones SP-On GABAergiques, projetant au LC et l'inhibant au cours du SP.

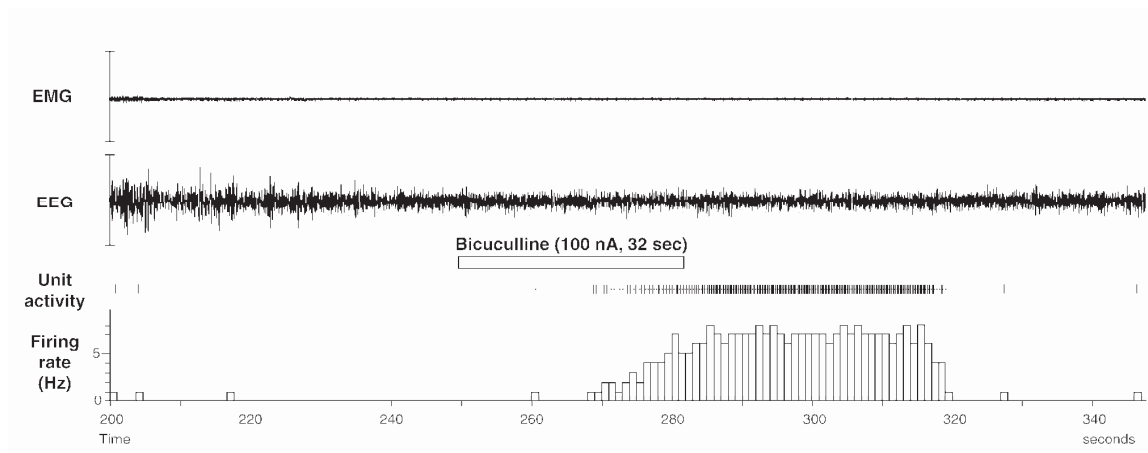
Le LPGi pourrait également contenir des neurones SP-Off. C'est ce que suggère une étude du laboratoire (Léger et al. 2009) qui avait pour but d'étudier l'activation des neurones catécholaminergiques du bulbe rachidien et du pont, dans les conditions de privation et d'hypersomnie de SP. Il s'est avéré que 20 à 25% des neurones du groupe C1 expriment Fos à

la fin de la privation, condition pendant laquelle le SP est complètement supprimé. Aucun de ces neurones n'exprime Fos pendant l'hypersomnie de SP.

Enfin, parmi les neurones Fos vus pendant l'hypersomnie de SP, certains sont de nature glycinergique et reçoivent des axones du SLD (Romuald Boissard et al. 2002). Ces neurones pourraient donc jouer le même rôle que les neurones du GiV voisin et participer à l'atonie musculaire des motoneurones spinaux et/ou crâniens. Leur proximité avec le noyau du nerf facial permet d'émettre l'hypothèse d'un rôle inhibiteur sur ce noyau pendant le SP.



**Figure 17.** A gauche : Photographie au niveau du LPGi montrant des neurones doublement marqués Fos/CTb (flèches) après une injection de CTb dans le LC et une hypersomnie de SP suivant une privation sélective de cet état (Verret et al., 2006). A droite : Cartographie des neurones immunomarqués Fos seuls (points noirs) et doublement marqués Fos/GAD (points rouges) dans le bulbe rachidien pendant le rebond de SP. Le LPGi occupe la partie ventro-latérale (Sapin et al., 2009).



**Figure 18.** Ejection d'un antagoniste GABAergique, la bicuculline, au cours de l'enregistrement d'un neurone SP-Off du LC pendant le SP. Il est intéressant de noter que l'éjection restaure l'activité du neurone, ce qui met en évidence l'inhibition GABAergique des neurones SP-Off du LC au cours du SP (Gervasoni et al., 1998).

## **VIII. HYPOTHESES ET OBJECTIFS**

Ainsi, notre hypothèse de travail principale est que le LPGi contient des neurones particulièrement actifs au cours du SP, autrement dit des neurones SP-On. Ces neurones pourraient alors être impliqués dans la genèse et/ou le maintien du SP. Un des rôles possible joué par le LPGi au cours de cet état serait l'inhibition des neurones monoaminergiques du LC et d'autres neurones SP-Off. Nous émettons également l'hypothèse que le LPGi pourrait participer à l'inhibition des neurones moteurs du noyau du nerf facial (VII) et ainsi contribuer, avec les neurones du GiV, à l'atonie musculaire caractéristique du SP.

Ce travail de thèse repose essentiellement sur trois questions :

### **A. Le LPGi contient-il des neurones à profil de décharge SP-On et quelles en sont les caractéristiques ?**

Le LPGi est une région connue pour contenir un nombre important de neurones immunomarqués Fos pendant le rebond de SP qui suit une privation sélective de cet état (Verret et al. 2006; Sapin et al. 2009). L'hypothèse qui prédomine est alors que le LPGi contiendrait des neurones qui augmenteraient leur activité au cours du SP, autrement dit des neurones de type SP-On.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons entrepris une caractérisation électrophysiologique des neurones du LPGi, en utilisant le modèle du rat vigile en contention stéréotaxique. Ce modèle permet d'effectuer des enregistrements unitaires des neurones du LPGi sur des rats non anesthésié effectuant un cycle veille-sommeil normal. (**Chapitre 1**)

### **B. Quelles sont les structures afférentes au LPGi susceptibles de le contrôler au cours du SP ?**

Afin de replacer le LPGi dans le circuit neuronal responsable de la genèse et du maintien du SP, il est primordial d'identifier les régions afférentes au LPGi susceptibles de le réguler au cours de cet état. Plusieurs auteurs ont d'ores et déjà identifié des régions afférentes au LPGi (Van Bockstaele et al. 1989; Andrezik et al. 1981) mais les régions activées au cours

du SP ne sont pas encore connues. Afin de compléter nos connaissances, nous avons choisi de coupler l'éjection d'un traceur rétrograde, la CTb, avec l'immunohistochimie de la protéine Fos chez des rats contrôle, des rats privés de SP et des rats ayant effectué un rebond de SP suite à la privation par la méthode de la piscine (Verret et al. 2003; 2005). **(Chapitre 2)**

### **C. Quelles sont les régions contrôlées par le LPGi au cours du SP, autrement dit quel rôle joue le LPGi au cours du SP ?**

Différentes régions ont été identifiées comme étant des structures efférentes du LPGi (Guyenet et Young 1987). Afin d'identifier quelles sont celles que le LPGi contrôle au cours du SP, nous avons choisi de coupler l'éjection d'un traceur antérograde, la PHA-L avec l'immunohistochimie de la protéine Fos chez des rats contrôle, des rats privé de SP et des rats ayant effectué un rebond de SP suite à une privation sélective de cet état. De plus, l'une de nos hypothèses est que le LPGi participe à l'inhibition du noyau moteur facial. Afin d'apporter des précisions quant au rôle joué par le LPGi et de vérifier cette hypothèse, nous avons couplé le traçage rétrograde par la CTb, suite à son injection dans le noyau facial VII, avec l'immunohistochimie de la protéine Fos, chez des rats ayant effectué un rebond de SP après à une privation sélective de cet état. **(Chapitre 2)**

Les réponses aux questions 2/ et 3/ devraient nous permettre d'émettre une ou des hypothèses quant à la place qu'occupe le LPGi dans le réseau du SP et quant à son rôle au cours de cet état de vigilance.

## ***MATERIEL ET METHODES***

# I. LE MODELE DU RAT VIGILE EN CONTENTION

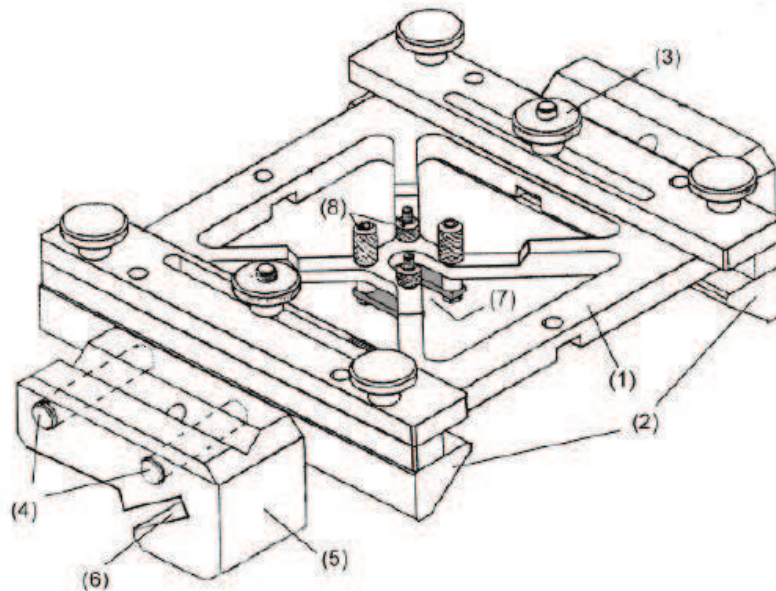
## A. Le système de contention

### 1. Présentation du système de contention

Le système de contention utilisé dans notre étude a été développé au sein du laboratoire par Laurent Darracq, en collaboration avec l'équipe du Dr Guy Chouvet et une entreprise de micro-mécanique (GFG Pierre-Bénite). Il s'inspire du dispositif développé par Marie-Hélène Bassant (1990) et a été modifié afin d'augmenter la stabilité des enregistrements électrophysiologiques (Figure 19).

Plus spécifiquement, le système se compose de deux parties :

- Une pièce en forme de « U », fixée sur la tête de l'animal lors de l'implantation qui nous permet ensuite de fixer l'animal dans l'appareil de contention.
- Un chariot mobile, monté sur glissières, qui s'insère dans un appareil stéréotaxique classique.



**Figure 19.** Schéma de notre dispositif de contention. Le chariot mobile (1) peut coulisser d'avant en arrière sur deux glissières horizontales (2). Des vis de blocage (3) maintiennent dans une position donnée. Chacune des glissières comporte deux tiges (4) engagées dans un support (5) fixé à l'appareil stéréotaxique. Lors de l'implantation, les barres d'oreilles sont insérées dans ce support (6). La pièce en « U » (7) fixée sur le crâne du rat est maintenue par quatre vis (8).

La pièce en U s'insère dans la partie centrale du cadre de contention où elle est fixée à l'aide de quatre écrous. L'ensemble assure une contention stéréotaxique stable dans un cadre présentant un faible jeu mécanique et ne requiert pas l'utilisation de barres d'oreilles. Le chariot est mobile selon l'axe antéro-postérieur grâce au système de glissières et peut être orienté dans n'importe quel sens afin de positionner l'ouverture du « U » dans l'axe rostro-caudal ou médio-latéral, permettant ainsi de multiples configurations d'implantation de cette platine et à l'accès à presque toutes les structures cérébrales du rat.

Ce dispositif a fait l'objet de plusieurs articles (Darracq et al. 1996; Gervasoni et al. 1998; 2000; Boissard et al. 2002; Goutagny et al. 2008). Ces études montrent son efficacité pour l'enregistrement des neurones durant le cycle veille-sommeil et leur étude pharmacologique.

## 2. Pertinence du modèle pour l'étude du cycle veille-sommeil

L'étude électrophysiologique des réseaux neuronaux du cycle veille-sommeil doit s'effectuer chez un animal non-anesthésié présentant une alternance normale des états de vigilance. Or, la majorité des études portant, par exemple, sur les interactions thalamo-corticales mises en jeu durant le SL ont été, et sont toujours, effectuées sur l'animal anesthésié à la kétamine-xylazine, anesthésique interagissant avec les systèmes cholinergiques, opiacés et monoaminergiques et provoquant un effet dissociatif : le système thalamo-cortical est ainsi déprimé pendant que le système limbique est activé (Steriade et al. 1991 ; 2000). Bien que ces animaux présentent un EEG caractérisé par des oscillations lentes (dans la gamme Delta : 0.5-4.5Hz) très proches des oscillations observées lors du SL chez l'animal vigile, il semble délicat de considérer que l'état induit par les anesthésiques est en tout point semblable à du SL naturel.

Le développement des techniques électrophysiologiques a permis, ces vingt dernières années de déterminer l'activité électrophysiologique de neurones chez l'animal libre de ses mouvements. Cependant, ces études utilisent le plus souvent des électrodes en tungstène et implantées à demeure présentant des désavantages certain : une sélectivité limitée lors des enregistrements électrophysiologiques (la fréquence de décharge d'un neurone donné ne peut ainsi être appréciée qu'après traitement du signal obtenu et par la sélection des potentiels d'action sur la base de leur forme) et surtout une liberté de mouvements limités.

L'utilisation du modèle du rat vigile en contention permet de s'affranchir des anesthésiques généraux, d'enregistrer l'activité des neurones avec une très bonne sélectivité grâce aux pipettes de verre et autorise des déplacements très importants (il est possible de déplacer la pipette d'enregistrement de plusieurs millimètres selon l'axe antéro-postérieur et l'axe médio-latéral) au cours d'une même séance d'enregistrement.

De plus, ce modèle permet la réalisation d'études pharmacologiques fines de part l'utilisation de l'iontophorèse. A notre connaissance, l'iontophorèse est la méthode de choix pour apprécier l'effet d'une substance pharmacologique sur la décharge unitaire d'un neurone, ou encore pour effectuer des stimulations pharmacologiques d'une zone très restreinte du cerveau. Il a en effet été montré un rapport de diffusion de 2 entre la microdialyse et l'iontophorèse (7250 $\mu$ m vs 350 $\mu$ m de diamètre de diffusion pour l'éjection d'un antagoniste GABAergique (Goutagny et al. 2005). Enfin, il a été possible de combiner ces études électrophysiologiques et pharmacologiques avec des études de neuroanatomie fonctionnelle.

La question se pose de savoir si la contention engendre un stress chez l'animal. En effet, il a été montré que la répétition d'un stress modéré diminue drastiquement le SL et provoque un fractionnement du SP (Cheeta et al. 1997). Or, après habituation, il n'a pas été rapporté de modifications de l'architecture du cycle veille-sommeil chez le rat en contention (Gervasoni et al. 2000). De plus, l'analyse spectrale révèle que le spectre de fréquence de l'EEG, d'une part, et les puissances de l'EEG dans les différentes bandes de fréquences, d'autre part, ne sont pas significativement modifiées chez le rat en contention comparativement à un rat libre de se mouvoir (Gervasoni et al. 2000). En outre, lors d'un stress chronique, il a été rapporté une augmentation du poids des glandes surrénales (Bassett et Cairncross 1975). Dans nos conditions expérimentales et après trois semaines d'expérimentation, les glandes surrénales ne présentent pas d'hypertrophie (Soulière et al. 2000). Ainsi, nous pouvons considérer que dans nos conditions expérimentales, le niveau de stress est très faible, sinon inexistant, et que le sommeil des rats en contention n'est pas modifié, tant sur le plan quantitatif que sur le plan qualitatif.

Ainsi, le rat vigile en contention, de par la possibilité de combiner électrophysiologie, pharmacologie locale et neuroanatomie fonctionnelle, est un modèle adéquat pour l'étude des réseaux neuronaux du cycle veille-sommeil.



## **B. Préparation des animaux pour la contention**

### **1. Implantation des animaux**

#### ***◆ Protocole général d'implantation***

Des rats Sprague-Dawley mâles pesant environ 220-240g sont anesthésiés au pentobarbital sodique (60mg/kg ; i.p). Ils sont ensuite installés dans un appareil stéréotaxique (D.Kopf) et maintenus par des barres d'oreilles et une pièce de maintien des incisives. Une sonde rectale couplée à une couverture chauffante permet de maintenir la température corporelle du rat. La peau du crâne est désinfectée préalablement avec de la bétadine et dégraissée à l'alcool à 70° puis incisée médianement. Les os du crâne sont ensuite exposés jusqu'aux crêtes d'insertion des muscles masticateurs. Les points de repère Bregma et Lambda sont initialement placés dans un même plan horizontal pour la mesure de la distance Lambda-Bregma. Un angle de 8 degrés est ensuite appliqué (tête relevée vers le haut) pour permettre des descentes d'électrodes sans toucher la paroi postérieure du crâne. Quatre vis d'acier inoxydable sont implantées pour l'enregistrement de l'EEG: une dans l'os frontal, deux dans les os pariétaux et une dans l'os occipital (électrode de référence). Deux fils d'acier sont insérés dans les muscles de la nuque pour l'enregistrement de l'EMG. Ces six électrodes sont reliées à un connecteur placé sur l'avant du crâne (Figure 20). Un dépôt de résine dentaire (Super-Bond, Sun medical co. Ltd) est effectué à la surface du crâne, à l'exception du Lambda et d'une zone d'environ 5 millimètres de diamètre située au-dessus du LPGi. Le chariot mobile portant la pièce de contention (pièce en "U") est alors fixé à l'appareil stéréotaxique et sa position ajustée de sorte que l'ouverture du "U" soit placée au-dessus du LPGi. Un dépôt de ciment dentaire (Paladur, Heraeus Kuzler) ménageant un puits d'accès est alors réalisé afin de fixer la pièce de contention et le connecteur. Le puits d'accès est ensuite recouvert de colle superglue et fermé à l'aide de cire de Horsley (Braun Surgical).

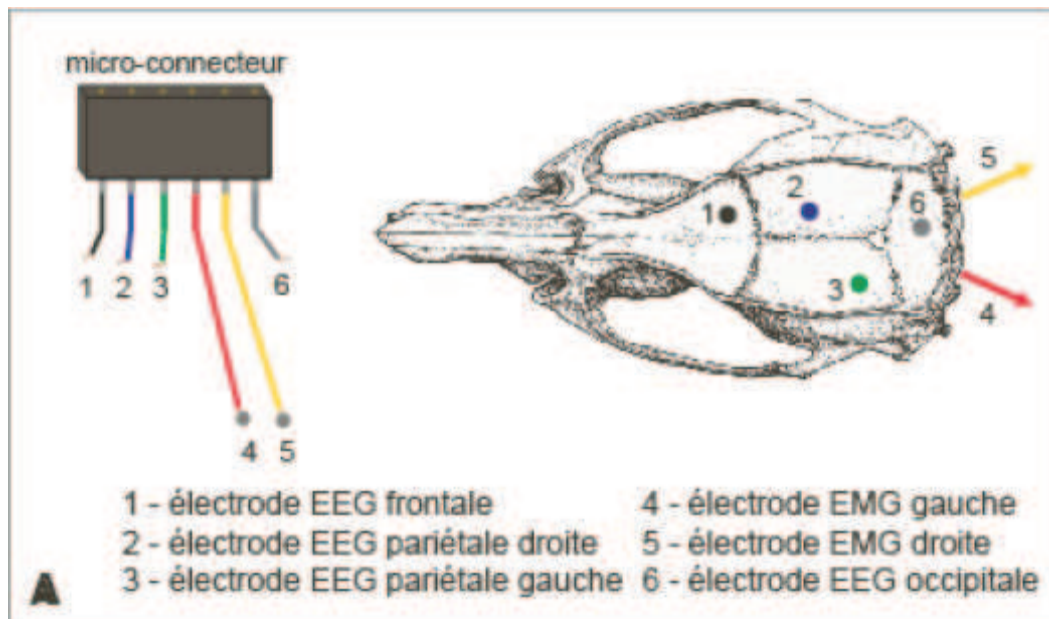


Figure 20. Schéma représentatif d'implantation des électrodes EEG et EMG (D'après E. Sapin).

◆ Implantation pour l'enregistrement de l'électrocardiogramme

Sur quelques animaux, nous avons réalisé l'implantation d'électrodes permettant l'enregistrement de l'électroencéphalogramme (EEG). La méthode a été décrite par Sgoifo et al. (1996). Un premier fil d'acier formant une boucle à son extrémité est fixée sur la surface ventrale du processus xiphoïde. Le reste du fil est remonté jusqu'au niveau du crâne par un tunnel sous-cutané. Un second fil d'acier est positionné le long de la trachée, fixé par le manchon musculaire trachéal et orienté en direction de la cavité médiastinale antérieure (Figure 21).



Figure 21. Schéma d'implantation des électrodes ECG (d'après Sgoifo et al., 1996)

◆ Etude de la respiration

Le LPGi étant situé ventralement au noyau respiratoire pré-Bötzing, il est nécessaire d'enregistrer la respiration du rat. Un capteur sensoriel piézoélectrique (AD instrument) est positionné au niveau de l'abdomen du rat pour permettre de détecter les phases d'expiration et d'inspiration de l'animal.

**C. Habituation à la content**ion

Après 48h de récupération post-opératoire, chaque rat est progressivement habitué à la content

ion stéréotaxique pendant environ 10 jours avec renforcement positif. Cet apprentissage de la contention est, comme les sessions d'enregistrements extracellulaires, réalisé l'après-midi à partir de 14 heures. Le rat est installé sur un hamac, la tête fixée à l'appareil de contention pendant des laps de temps de durées croissantes, de quelques minutes le premier jour, jusqu'à 5 heures les cinq derniers jours. L'animal est retiré de l'appareil de contention dès qu'il présente des signes persistants d'inconfort (agitation excessive, cris, mictions, défécations ou entrechoquement des incisives). A la fin de chaque séance d'habituation, le rat est récompensé avec un morceau de gâteau. La phase d'habituation est considérée comme achevée dès lors que le rat peut supporter une contention de cinq heures en présentant une alternance spontanée des trois états de vigilance comparables à celle d'un animal libre de ses mouvements.

**D. Résection de la dure-mère**

La veille du premier jour d'enregistrement, une trépanation est effectuée, sous anesthésie générale au pentobarbital sodique (60mg/kg ; i.p) au niveau de l'os laissé apparent au cours de l'implantation. La dure-mère exposée est délicatement découpée sur le pourtour de l'ouverture à l'aide d'une aiguille. Après chaque session d'enregistrement, le puits est imperméabilisé à l'aide de cire à os.

## **E. Déroulement des sessions d'enregistrements**

Un même animal est utilisé pour des sessions d'enregistrement quotidiennes pendant une à deux semaines. D'une durée théorique de cinq heures, une session expérimentale a été soit abrégée lorsque l'animal présentait une agitation excessive, entraînant la perte répétée du signal extracellulaire, soit prolongée lorsque l'ensemble des conditions expérimentales était particulièrement favorable (rat calme, enregistrement extracellulaire peu dégradé). Quelques rats ont été privés de SP la matinée ou la nuit précédant les sessions d'enregistrements afin d'augmenter les quantités de SP au cours de celles-ci.

Chaque séance d'enregistrement débute vers 14h. Le rat est installé dans l'appareil de contention et connecté au dispositif d'enregistrement à l'aide d'un câble. Le pansement couvrant le puits est retiré et, quelques gouttes d'anesthésique local, (lidocaïne) sont déposées afin de dégager les éventuels replis de dure-mère.

La pipette d'enregistrement est placée aux coordonnées stéréotaxiques du LPGi (-12.4 mm en arrière du Bregma et 1.2-2 mm latéral) en tenant compte de l'angle (8 degrés) appliqué (Figure 22). L'enregistrement se faisant "en aveugle", la première descente permet un premier repérage en profondeur. Il s'agit de détecter en particulier la limite de sortie du cervelet et d'entrée dans le bulbe ainsi que la profondeur du complexe Bötzinger/ pré-Bötzinger contenant des neurones respiratoires. Suivant les activités neuronales rencontrées lors des descentes successives, nous avons procédé au réajustement des coordonnées de la pipette d'enregistrement par pas de 200µm médio-latéralement ou antéro-postérieurement. Dès que le signal d'un neurone est détecté aux coordonnées du LPGi, l'acquisition sur l'ordinateur est déclenchée et l'on procède à un enregistrement de l'activité unitaire spontanée au cours d'un cycle veille-sommeil complet (EV, SL et SP).

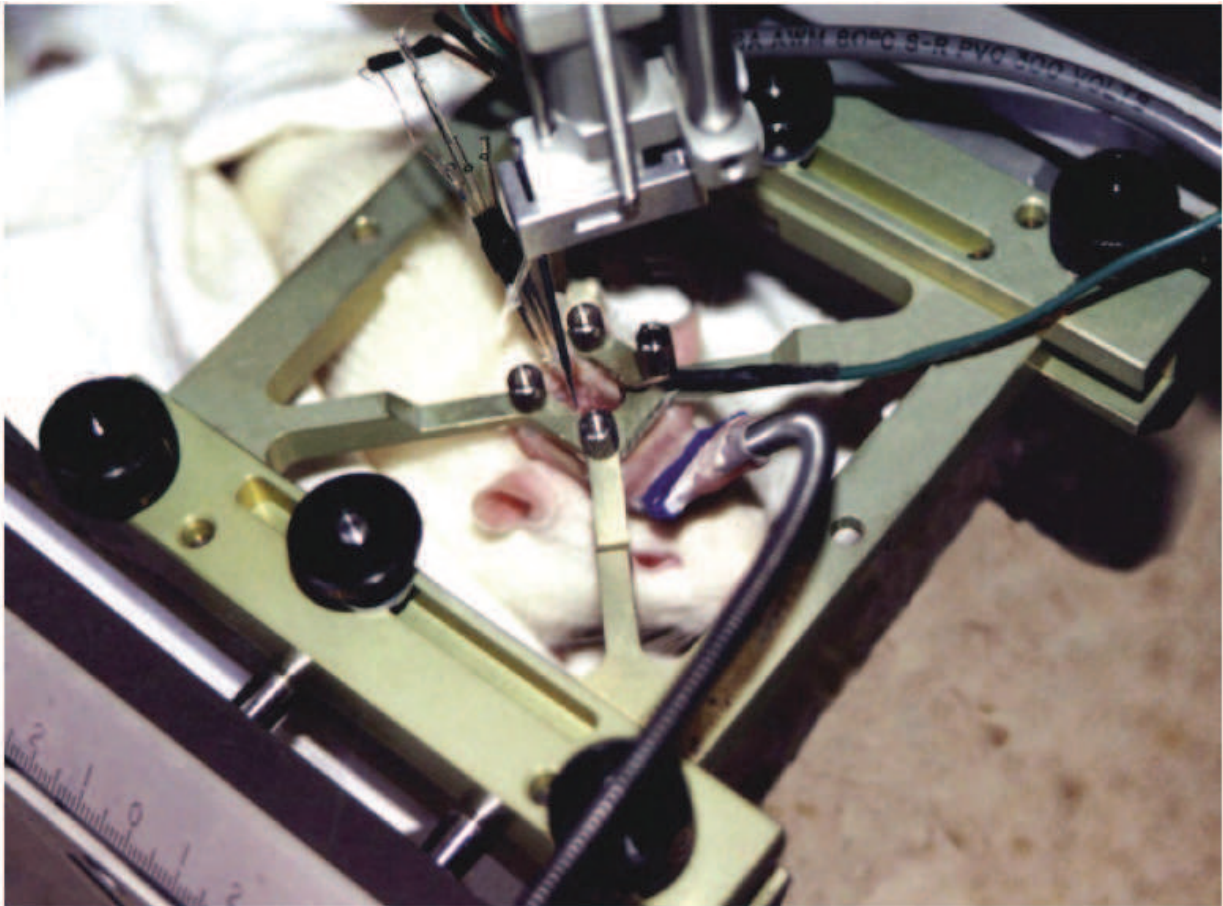
Dans le cadre des expériences de pharmacologie locale, les paramètres d'éjection sont fixes (100nA, 15 min). Ces éjections sont effectuées après une période d'enregistrement contrôlé de 60 min. L'acquisition est arrêtée après une période de récupération d'une heure.

Au cours de ces différentes sessions expérimentales, des éjections de traceurs rétrograde, (CTb) et antérograde, (PHA-L) sont effectuées lorsque des neurones à profil de décharge intéressant (SP-On, SP-Off) sont enregistrés dans le LPGi ou dans le cas où un effet pharmacologique est détecté. Ces éjections permettent d'une part de valider le site

d'enregistrement électrophysiologique dans le LPGi et d'autre part, de mettre en évidence les afférences et efférences du LPGi.

Afin de suivre le comportement de l'animal au cours de chaque session d'enregistrement, une webcam est placée devant le rat de façon à visualiser les mouvements de sa tête. L'acquisition se fait par une application du logiciel Spike 2 (Cambridge Electronic Design) afin de démarrer le film en même temps que l'acquisition des signaux polygraphiques.

Une semaine après la dernière session d'enregistrement, les rats sont soumis au protocole de privation/rebond de SP afin de localiser, par double marquage, les afférences du LPGi actives en absence de SP et en hypersomnie de SP.



**Figure 22. Photographie d'un rat vigile en contention.**

## **II. ENREGISTREMENT DES DONNEES POLYSOMNOGRAPHIQUES**

### **A. Rappels théoriques**

La détermination des états de sommeil et d'éveil s'effectue grâce à l'enregistrement polygraphique de l'EEG et du tonus musculaire, EMG (Grace et Bunney 1983a; 1983b).

L'EEG permet de détecter les fluctuations électriques associées à la sommation de l'activité d'une large gamme de population de neurones. A la surface du crâne, les potentiels enregistrés reflètent surtout l'activité des neurones corticaux situés au voisinage des électrodes et davantage les potentiels post-synaptiques inhibiteurs et excitateurs que les potentiels d'action. L'amplitude de l'EEG, son degré de synchronisation, les fréquences qui le composent sont les paramètres qui permettent de discriminer les différents états de vigilance de l'animal. L'EEG peut être référentiel (unipolaire), il consiste alors en une mesure de la différence de potentiel entre une électrode corticale et une électrode de référence placée à distance) ou différentiel (bipolaire), il mesure dans ce cas la différence de potentiel entre deux électrodes corticales.

Le signal recueilli par les électrodes corticales peut varier en fonction de la localisation de ces électrodes. En effet, il est admis que le signal EEG diffère fortement entre une électrode placée sur le cortex frontal (prédominance des ondes lentes, dans la gamme delta) et le cortex pariétal (prédominance des ondes thêtas, du fait de la proximité de l'hippocampe chez les rongeurs). Ainsi, l'utilisation de plusieurs électrodes d'EEG permet de déterminer des variations locales de l'activité corticale.

L'EMG permet une mesure de l'activité musculaire tonique et des événements phasiques (secousses). Les électrodes musculaires sont classiquement placées au niveau des muscles posturaux de la nuque. D'autres paramètres tels que l'EOG, permettant de mettre en évidence les mouvements oculaires rapides dont ceux survenant durant le SP, l'activité ponto-géniculé-occipitale, la température cérébrale et le rythme cardiaque et respiratoire peuvent compléter les mesures polygraphiques. L'EEG et l'EMG sont toutefois suffisants pour la détermination les différentes phases du cycle veille-sommeil chez le rat et la souris.



## **B. Mise en œuvre**

Les signaux EEG et EMG sont obtenus à partir de dérivations bipolaires. Amplifiés (P15, Grass) et filtrés (Bande passante EEG 0.1-100Hz, EMG 1Hz-1kHz), ces signaux sont ensuite numérisés par un convertisseur analogique-digital 16 bits (CED 1401plus, Cambridge Electronic Design) à une fréquence d'échantillonnage de 512Hz. L'acquisition sur ordinateur (PC Philips) est effectuée à l'aide du logiciel Spike 2 (Cambridge Electronic Design).

## **C. Détermination des états de vigilance**

L'éveil, le SL et le SP sont déterminés suivant les critères définis par Timo-Iaria et al. (1970) et Aston-Jones et Bloom (1981) sur des périodes de dix secondes présentant les caractéristiques décrites ci-dessous.

Eveil : L'EEG est de faible amplitude et activé ou « désynchronisé ». Des activités de hautes fréquences (40Hz) sont observées ainsi que des ondes thêtas (5-9Hz). 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. Le rat est réceptif aux stimuli extérieurs

Sommeil lent : l'EEG est de plus haut et présente des oscillations très lentes, des ondes delta (0.5-4Hz) et des fuseaux (10-14Hz). L'EEG est dit « synchronisé » et ne comporte pratiquement plus de fréquences rapides. L'activité musculaire est faible et sans bouffée phasique. Le rat a les yeux fermés et est moins réceptif aux stimuli extérieurs.

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 - 9Hz correspondant au rythme thêta généré par les structures hippocampiques. L'activité musculaire est très faible (atonie) avec parfois de brèves bouffées phasiques (« twitches »). Le rat a les yeux fermés et présente des mouvements phasiques des globes oculaires et des secousses des vibrisses.

## D. Analyse des données polysomnographiques

Les enregistrements sont soumis à une analyse visuelle semi-automatique à l'aide d'un script développé sous Spike 2 au sein du laboratoire (Figure 23). Ce script permet d'effectuer une lecture séquentielle de chaque enregistrement numérique par plage de 5 secondes en visualisant le signal de l'EEG et l'EMG. Une analyse du spectre de fréquence de l'EEG est effectuée afin d'aider à la détermination des stades. L'expérimentateur affecte alors un stade à chaque période considérée, selon les critères décrits précédemment.

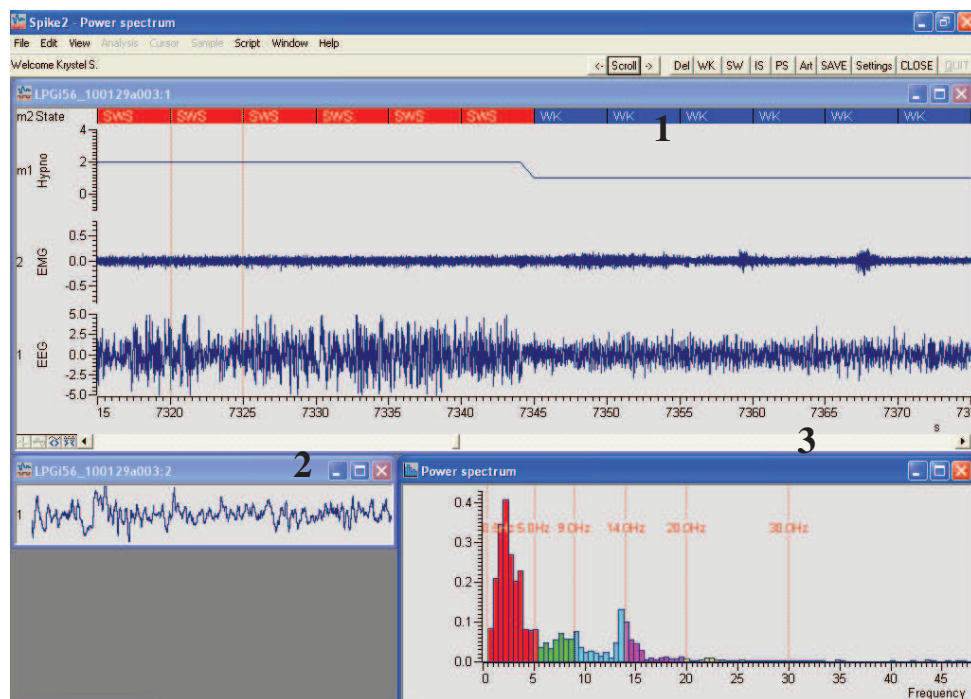


Figure 23. Copie d'écran du script développé au laboratoire permettant l'analyse des états de vigilance par période de 5 secondes. 1/ Un stade de vigilance (Eveil, SL ou SP) est attribué pour chaque période de 5 secondes en fonction de la lecture des paramètres EEG et EMG. 2/ Agrandissement de l'EEG sur la période de 5 secondes étudiée. 3/ Spectre de fréquence de l'EEG correspondant à la période de 5 secondes étudiée.



### **III. ENREGISTREMENT DE L'ELECTROCARDIOGRAMME ET DE LA RESPIRATION**

#### **A. Enregistrement de l'électrocardiogramme**

Le signal ECG est obtenu à partir de la dérivation entre les deux électrodes implantées au niveau de processus xiphoïde et de la trachée. Le signal est amplifié (P55, Grass), filtré (Bande passante 3-3000Hz) et numérisé par un convertisseur analogique-digital 16 bits (CED 1401plus, Cambridge Electronic Design) à une fréquence d'échantillonnage de 512Hz. L'acquisition sur ordinateur (PC Philips) est effectuée à l'aide du logiciel Spike 2 (CED).

#### **B. Enregistrement de la respiration**

Le capteur sensoriel placé sous l'abdomen du rat est directement relié à un convertisseur analogique-digital 16 bits (CED). Le signal est échantillonné à une fréquence de 20 Hz. L'acquisition (PC Philips) est effectuée à l'aide du logiciel Spike 2.

#### **C. Analyse des données électrocardiographique et respiratoire**

L'analyse des fréquences cardiaque et respiratoire sont seulement de nature qualitative afin d'apporter une information sur la corrélation éventuelle qui existerait entre ces paramètres et le mode de décharge des neurones enregistrés dans le LPGi. La fréquence cardiaque est convertie en battement par seconde. L'analyse se fait à l'aide du logiciel Spike 2.

## **IV. ENREGISTREMENT EXTRACELLULAIRE UNITAIRE**

### **A. Rappels théoriques**

L'enregistrement extracellulaire mesure les variations de potentiel au voisinage d'une cellule à travers la résistance constituée par le milieu extracellulaire. Les potentiels enregistrés, bien que de faible amplitude (de l'ordre du microvolt), reflètent fidèlement les fluctuations électriques de la membrane cellulaire. Suivant les options de filtrage utilisées, le potentiel extracellulaire peut être considéré comme la dérivée seconde du potentiel transmembranaire (Grace et Bunney 1983a; 1983b).

La mesure de l'activité extracellulaire peut être réalisée avec une sensibilité décroissante à l'aide de fibres de carbone, d'électrodes métalliques, ou de pipettes de verre. Ces dernières présentent toutefois une meilleure sélectivité et sont par conséquent plus adaptées à l'enregistrement unitaire (Geddes 1972).

### **B. Mise en œuvre**

Les potentiels d'action extracellulaire sont enregistrés à l'aide de capillaires de borosilicate avec filament (GC-150F-10, KWICK) étirés (étireuse PE10, NARISHIGE), cassés à la pointe à un diamètre extrême de  $2\mu\text{m}$  et remplis d'une solution d'acétate de sodium 0.5M. L'impédance mesurée en courant continu et à 10Hz est de 5 à 10 mégohms. La référence électrique (potentiel zéro) est constituée d'un fil d'argent chloruré placé dans le puits et rempli d'une solution de NaCl à 0.9%.

L'électrode d'enregistrement est descendue dans le cerveau par paliers successifs à l'aide d'un microdescendeur. Le signal recueilli est pré-amplifié (P16, GRASS), filtré (signal AC : alternative current ; bande passante 0.3-10kHz) ou non filtré (signal DC : direct current ; bande passante 0-10kHz). Le signal AC est amplifié et filtré par un audiomoniteur (GRASS). Les potentiels d'action extracellulaires sont visualisés sur deux oscilloscopes suivant les deux modalités AC et DC et détectés par un sélecteur d'amplitude (Spike trigger, Neurolog). Le signal de ce dernier ainsi que le signal AC, échantillonné à 15kHz, sont enregistrés en ligne simultanément aux signaux polysomnographiques.

### **C. Analyse des données électrophysiologiques**

Seuls les neurones enregistrés pendant les trois états de vigilance ont été analysés et considérés dans notre étude. La fréquence et le mode de décharge des neurones sont mesurés en temps différé pour chaque état de vigilance à l'aide du logiciel Spike 2. De manière générale, les fréquences moyennes de décharge sont mesurées pendant au minimum trois épisodes de 10 secondes d'EV, de SL et de SP. Les fréquences de décharge sont analysées par un test de Friedman pour séries appariées suivi d'un test post-hoc de Wilcoxon ( $p < 0.05$ ).

Les modes de décharge des neurones du LPGi sont appréciés à l'aide :

- des histogrammes d'intervalles entre potentiels d'action, qui représentent la distribution des intervalles entre les potentiels d'action successifs.

- un index d'asymétrie a été calculé pour chaque état de vigilance. Cet index d'asymétrie est défini par le rapport entre le mode (correspondant à l'intervalle inter-potentiel d'action le plus souvent rencontré) et la moyenne de la distribution de l'intervalle d'histogramme (correspondant à l'inverse de la fréquence moyenne de décharge). Un index d'asymétrie proche de 1 correspond à un mode de décharge régulier alors qu'un index d'asymétrie proche de 0, correspond à un mode de décharge irrégulier (Urbain et al. 2000). Les index d'asymétrie sont analysés par un test de Friedman suivi d'un test post-hoc de Wilcoxon ( $p < 0.05$ ).

- Un coefficient de variation des intervalles entre potentiels d'action a été calculé pour chaque état de vigilance. Le coefficient de variation est déterminé par le rapport de la déviation standard de l'histogramme d'intervalle sur la moyenne des intervalles inter-potentiel d'action. Ainsi, plus le coefficient de variation est élevé, plus le neurone considéré présente un mode de décharge phasique (Koyama et al. 2003). Les coefficients de variation sont analysés par un test de Friedman suivi d'un test post-hoc de Wilcoxon ( $p < 0.05$ ).

Pour chaque groupe de neurones, la fréquence de décharge, l'index d'asymétrie et le coefficient de variation ont été analysés.

Pour les neurones SP-On enregistrés lors des transitions SL-SP, nous avons déterminé leur degré d'anticipation par rapport au changement d'état. Pour chacun de ces neurones, nous avons sélectionné un intervalle centré sur le début de la phase de SP identifié visuellement par

la présence simultanée d'un EEG désynchronisé et d'une atonie musculaire. De -60 secondes à +60 secondes autour du début de la phase de SP, le nombre de potentiels d'action a été mesuré par période de 10 secondes puis divisé par le nombre total de potentiels d'action dans l'intervalle (fréquence de décharge normalisée). Une moyenne de référence et une erreur standard de la moyenne ont ensuite été calculées pour chacune de ces périodes de 10 secondes. Le début d'activation d'un neurone a alors pu être défini comme l'instant où la fréquence de décharge normalisée dépassait sa fréquence de référence de plus de deux S.E.M pendant au moins 3 secondes. Pour la représentation de l'ensemble de la population, nous avons ensuite aligné tous les intervalles sur le début des phases de SP et calculé par seconde la moyenne et l'erreur standard de la moyenne de la fréquence normalisée. Les données numériques sont fournies sous la forme de moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne.

## **V. PHARMACOLOGIE LOCALE PAR MICROIONTOPHORESE**

### **A. Rappels théoriques**

La technique de microiontophorèse consiste à faire passer un courant électrique constant de l'ordre de quelques dizaines de nano-ampères à travers les canaux d'une micropipette de verre contenant des substances ionisées (Bloom 1974; Stone 1985). La quantité de charge alors éjectée de la micropipette obéit à la loi de Faraday :

$$Q=n*(I*t)/(Z*F)$$

Q correspond à la quantité de charge en Coulomb, n au nombre de transport de la molécule, I à l'intensité du courant appliqué, t à la durée d'éjection, Z à la valence de la molécule ionisée et F à la constante de Faraday, soit 96500.

Le nombre n est un facteur complexe dépendant à la fois de la solubilité, de la polarité, du degré de dissociation de la molécule et du milieu dans lequel elle se trouve. Cette valeur conditionne la mobilité électrophorétique de la molécule, mais elle n'est pas toujours déterminée pour une molécule donnée. Il en résulte que la quantité de molécules éjectées ne peut être connue exactement. Selon la loi énoncée précédemment, elle est néanmoins proportionnelle à l'intensité et à la durée d'éjection :

$$Q=n'*I*t$$

Les molécules chargées positivement, ou cations, sont éjectées au moyen d'un courant positif et retenues grâce à un courant négatif. L'inverse s'applique aux molécules chargées négativement, ou anions.

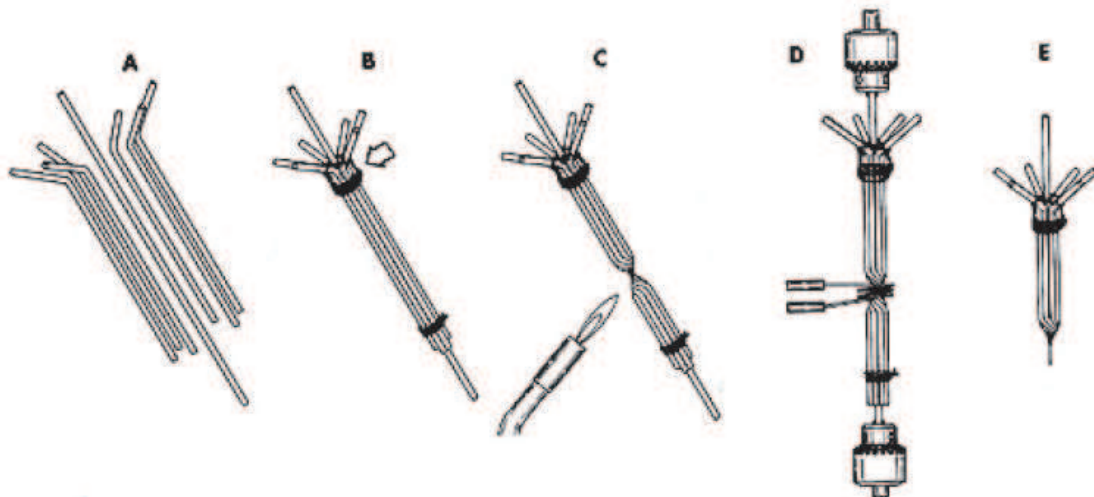
Si en théorie le début de l'éjection est instantané, en pratique elle se produit avec une certaine latence qui dépend notamment de l'intensité et de la durée du courant de rétention. En effet, un courant de rétention est appliqué en permanence afin d'éviter un phénomène de diffusion de la substance pharmacologique dans le milieu extracellulaire. Le seul passage d'un courant d'éjection vers la référence électrique peut affecter l'excitabilité de la membrane d'un neurone enregistré. Pour limiter cet effet courant, il est nécessaire d'utiliser un canal de

balance, rempli de NaCl 0.9%, auquel est appliqué un courant de sens contraire et d'intensité égale à la somme algébrique des courants éjectés dans les autres canaux.

## **B. Mise en œuvre**

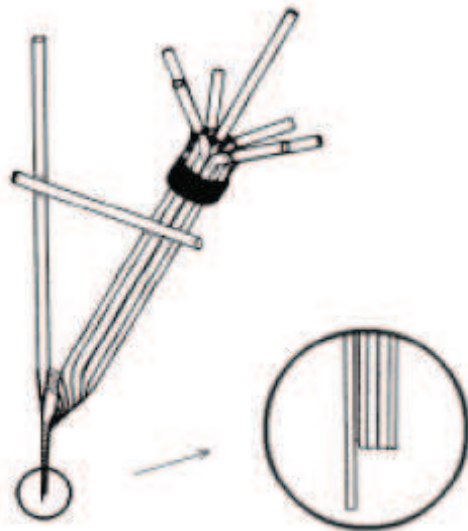
### 1. Fabrication des pipettes

Un assemblage de six tubes capillaires avec filament interne (GC-150F-10, KWICK) maintenus autour d'un tube central (GC-150F-15, KWICK) par des anneaux thermocollants est d'abord vrillé de 120 degrés puis pré-étiré d'environ 2 à 3 mm. La pipette multicanaux est ensuite étirée, cassée à la pointe à un diamètre externe de 12 à 15  $\mu\text{m}$  sous contrôle microscopique et coudée à 10 mm de son extrémité (Figure 24).



**Figure 13. Principe de fabrication des pipettes multicanaux (D'après Reader, 1978).**

Elle est ensuite accolée à l'électrode d'enregistrement après alignement des pointes sous contrôle binoculaire. La pointe multicanaux est placée en retrait de l'extrémité de l'électrode d'enregistrement d'environ 10 à 15  $\mu\text{m}$ . Ceci permet de limiter les artéfacts dus au passage du courant d'iontophorèse et améliore le rapport signal/bruit de l'enregistrement. Les pointes sont ensuite solidarisées avec une résine dentaire photo-polymérisable (Scotchbond Multipurpose, 3M). Un étai joignant les parties supérieures des tubes renforce l'ensemble (Figure 25).



**Figure 25. Assemblage d'une électrode d'enregistrement et d'une pipette multicanaux. La pipette multicanaux est placée en retrait de la pointe de l'électrode d'enregistrement de 15 à 20  $\mu\text{m}$  (configuration « piggy-back » ; d'après Gervasoni, 2000).**

## 2. Préparation des solutions

Les substances testées ont été préalablement dissoutes dans de l'eau distillée et conservées à  $-20^{\circ}\text{C}$  (Tableau 3). De faibles concentrations ont été utilisées pour les drogues peu solubles. Le pH de chacune des solutions est vérifié à l'aide de papier pH et ajusté à l'aide d'acide chlorhydrique (HCl, 0.1N) ou d'hydroxyde de sodium (0.1N). Dans notre étude nous avons utilisé un agoniste glutamatergique (acide kainique) et un agoniste GABAergique (muscimol).

**Tableau 3. Liste des substances pharmacologiques utilisées.**

| Substance      | Concentration (M) | pH    |
|----------------|-------------------|-------|
| Acide kainique | 0.005             | 8-9   |
| Muscimol       | 0.01              | 3.5-4 |

Chaque canal de la pipette remplie avec les solutions pharmacologiques est relié à un module générateur (BIONIC INSTRUMENTS) permettant d'ajuster et de visualiser les intensités des courants d'éjection. Le courant d'éjection appliqué est de  $\pm 100\text{nA}$  durant 15 minutes afin d'éjecter la substance pharmacologique dans l'ensemble du LPGi. Afin de réduire la diffusion passive des substances testées (due notamment au gradient de

concentration), un courant de rétention de 5 à 10 nA est appliqué en dehors des périodes d'éjection. La drogue pharmacologique utilisée est appliquée sur quelques neurones rencontrés au cours de la descente dans le LPGi (par exemple des cellules granulaires du cervelet) afin de vérifier si celle-ci engendre bien un effet pharmacologique.

### **C. Analyse des résultats pharmacologiques**

Afin de mettre en évidence une éventuelle modification du rythme veille-sommeil, nous avons analysé l'effet des éjections de substances pharmacologiquement actives (et ce durant une période d'au moins 1h après l'éjection). L'effet est alors estimé en analysant ces éjections comparées à celle de NaCl, utilisées comme témoin. Pour ce faire, nous avons utilisé un script développé au laboratoire permettant de coder chaque état de vigilance. Nous avons analysé les résultats sur un rat ayant reçu des injections de kainate et de muscimol et les injections contrôle de NaCl correspondantes. Nous avons quantifié, pour chaque état, la durée des épisodes et le pourcentage d'épisode durant l'heure qui suit chaque injection. Nous avons calculé le rapport  $\theta/\delta$  et l'EMG redressé pour l'ensemble de la période étudiée. Etant donné le faible nombre de rats, nous n'avons pas effectué d'analyses statistiques.



## **VI. LES TECHNIQUES DE TRACAGE DE VOIES**

### **A. Le traçage rétrograde de voies nerveuses**

#### **1. Principe du traçage rétrograde de voies nerveuses**

Le traçage rétrograde est utilisé pour déterminer les afférences à une région cérébrale donnée. Il repose sur la capacité des neurones à capter par leurs terminaisons certaines molécules, puis à les transporter rétrogradement jusqu'à leurs corps cellulaires où elles s'accumulent (pour revue (Luppi et al. 1990)). Après un temps de survie nécessaire à ce transport, la présence du traceur est révélée par immunohistochimie. Le choix du traceur est crucial et il dépend des paramètres suivants :

- sa sensibilité. Plus le traceur sera sensible, plus le marquage rétrograde sera complet.
- sa spécificité. Le traceur ne doit pas être capté par des fibres de passage ni franchir les synapses.
- son mode d'injection in situ. Le traceur doit pouvoir créer des sites d'injection de taille restreinte sans lésion de tissu et perte de traçage.

#### **2. La sous-unité b de la toxine cholérique**

La CTb est une protéine de 11.5 kDa qui se fixe spécifiquement sur les glycoconjugués, les monogangliosides GM1, présents en grand nombre au niveau de la membrane des neurones. De ce fait, la CTb a une diffusion restreinte et une grande quantité de traceur est captée au niveau du site. Une fois fixée, la CTb est internalisée, puis transportée rétrogradement et antérogradement à l'intérieur du neurone (Stoeckel et al. 1977; Trojanowski 1983). Le marquage antérograde peut en effet être obtenu mais il est toutefois préférable d'utiliser un traceur antérograde, tel que la PHA-L, qui fournira un meilleur marquage. De plus, la CTb présente l'avantage de ne pas être captée par les fibres de passage non lésées et peut être injectée par iontophorèse.

La révélation de la CTb par les méthodes classiques d'immunohistochimie fait apparaître un marquage cytoplasmique granulaire. Ce marquage granulaire permet de coupler

la révélation de la CTb avec celle de neurotransmetteurs ou de leurs enzymes comme l'acétylcholine, le GABA ou la glycine (Peyron et al. 1996; Rampon et al. 1996; Gervasoni et al. 1998; 2000 ; Peyron et al. 1998; Rampon et al. 1999; Boissard et al. 2003) ou de protéine nucléaire comme le Fos (Maloney et al. 1999).

Pour nos études neuroanatomiques, nous avons choisi d'utiliser la sous-unité b de la toxine cholérique, ou CTb. En effet, ce traceur, dont les techniques d'éjection et de révélation ont été élaborées par Luppi et al. (1990) , demeure aujourd'hui encore l'un des plus sensibles et il répond parfaitement aux exigences citées ci-dessus.

## **B. Le traçage antérograde de voies nerveuses**

### 1. Principe du traçage antérograde

Le traçage antérograde est utilisé pour déterminer les cibles d'une population neuronale donnée. Le traceur est capté par les corps cellulaires, et transporté, le plus souvent, le long de l'axone de manière active, à l'intérieur des vésicules. Ainsi, un transport axonal rapide peut atteindre une vitesse d'environ 2 cm/jour (Köbber et al. 2000). Après un temps de survie nécessaire à ce transport, la présence du traceur est révélée par immunohistochimie. Dans notre étude, nous avons choisi d'utiliser la leucoagglutinine du *Phaseolus vulgaris* (PHA-L), l'un des traceurs antérogrades les plus sensibles.

### 2. La leucoagglutinine du Phaseolus vulgaris

La technique du traçage antérograde par la PHA-L a été mise au point par Gerfen et Sawchenko (1984). D'après leurs travaux, la PHA-L satisfait nombre de critères importants pour le traçage de voies :

- une grande sensibilité
- un marquage de type Golgi qui remplit pleinement les axones
- une possibilité d'éjection par micro-iontophorèse et donc une absence de lésion des fibres de passage
- une absence de capture par les fibres de passage

- la distinction entre les fibres de passage et celle de boutons terminaux.

La PHA-L est une lectine extraite de haricots verts, pesant 126 kDa. Elle est composée de deux sous-unités, les formes E et L, qui ont respectivement la capacité d'agglutiner préférentiellement les érythrocytes ou les leucocytes. Elle a, d'autre part, la capacité de stimuler la croissance et la division des lymphocytes.

Les lectines présentent la particularité de se fixer à diverses glycoprotéines et glycolipides présents à la surface de la membrane des neurones. Elles sont alors internalisées, puis transportées rétrogradement et antérogradement. Néanmoins, les études faites avec la PHA-L montrent qu'elle n'est pas un traceur rétrograde (Gerfen et Sawchenko 1984). A la différence de la CTb, les sites d'injection de PHA-L sont souvent entourés d'une zone de marquage diffus. Il est alors difficile de connaître précisément l'étendue du site d'injection et donc le volume du tissu qui a capté le traceur. Mais il n'en reste pas moins que la PHA-L reste aujourd'hui l'un des traceurs antérogrades le plus utilisé en neuroanatomie. Différents travaux ont montré que le traçage antérograde, au moyen de la PHA-L, pouvait être couplé à l'immunohistochimie de différents neurotransmetteurs comme le GABA ou la glycine (Luppi et al. 1995b; Peyron et al. 1998). D'autres travaux ont également montré l'intérêt du couplage de la PHA-L avec un marqueur fonctionnel comme le c-Fos pour comprendre le fonctionnement d'un réseau par stimulation chimique ou électrique (Wan et al. 1992; Rizvi et al. 1996).

### **C. Mise en œuvre**

Afin de déterminer les afférences et efférences du noyau LPGi, nous avons utilisé les deux traceurs, CTb et PHA-L préparés selon le protocole suivant :

- CTb : la CTb lyophilisée (500µg) est reconstituée dans 100µL de tampon phosphate (PB) 0.1M à pH6. Cette préparation donne une solution où la CTb est chargée positivement, pouvant ainsi être injectée par iontophorèse.

- PHA-L : La PHA-L lyophilisée (5mg) est reconstituée dans 200µL de PB 0.01M contenant 0.5% de NaCl 0.9% à pH8. Cette préparation donne une solution où la PHA-L est chargée positivement, pouvant ainsi être éjectée par iontophorèse.

Les traceurs sont éjectés par iontophorèse au sein du LPGi, soit chez l'animal vigile en contention, soit chez l'animal anesthésié au sein du LPGi.

Dans tous les cas, nous procédons à l'éjection des traceurs suivant le protocole suivant :

- CTb : 15 min en courant alternatif (7 sec on/7sec off) à une intensité de +2 $\mu$ A.
- PHA-L : 2 min en courant continu suivi de 15 min en courant alternatif (7 sec on/7sec off) à une intensité de +5 $\mu$ A.

Nous considérons le traçage effectif après 10 jours de survie. Au bout de 10 jours, les rats peuvent donc être sacrifiés pour une révélation immunohistochimique ultérieure.

Afin de compléter cette étude, des éjections de CTb seules ont été effectuées suivant le même protocole au sein du noyau moteur facial VII. Les coordonnées d'éjections sont de 11 mm antéro-postérieur en arrière du Bregma, 2 mm de latéralité et 8.9 mm de profondeur par rapport à la surface du cerveau.

## **VII. PRIVATION ET REBOND DE SOMMEIL PARADOXAL**

Il est bien démontré, chez le chat et surtout chez le rat, que toute privation spécifique de SP est suivie d'une phase de récupération pendant laquelle la dette en SP est partiellement remboursée. Plusieurs protocoles de privation spécifique de SP ont été mis au point, présentant chacun des intérêts et des inconvénients spécifiques.

Dans notre étude, nous avons décidé d'utiliser la méthode dite de la piscine. Cette technique, maîtrisée au sein du laboratoire, a déjà démontré son utilité pour l'étude des réseaux neuronaux responsables de la régulation du SP (Verret et al. 2003; 2005). De plus, il a été montré que cette technique n'entraîne pas d'augmentation du poids des glandes surrénales (Mendelson et al. 1974).

Le protocole de privation et de rebond de SP se déroule sur environ 10 jours pour une série expérimentale (Figure 26). Durant 5 à 6 jours, les rats sont tout d'abord habitués aux conditions expérimentales. Ils sont placés, dans des barils individuels dans la chambre d'enregistrement présentant une alternance lumière/obscurité (12h-12h) et une température ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ).

Les rats sont ensuite répartis en 3 groupes expérimentaux différents :

- 1/ Les rats témoins (PSC) qui restent dans les conditions standard d'hébergement décrites précédemment jusqu'à leur sacrifice le dernier jour.
- 2/ les rats privés de SP (PSD) jusqu'à leur sacrifice.
- 3/ Les rats rebonds (PSR), autorisés à récupérer pendant trois heures suite à la privation spécifique.

Après l'habituation, les animaux PSD et PSR sont placés sur une plate-forme de 6.5 cm de diamètre, entourée d'environ 1 cm d'eau. Cette plate-forme est de taille suffisante pour que l'animal puisse s'y maintenir et s'endormir en SL. En revanche, sa taille est insuffisante pour permettre à l'animal d'effectuer du SP (du fait de l'atonie musculaire caractérisant cet état). Une mangeoire et un biberon d'eau sont installés de manière à ce que les animaux puissent facilement atteindre nourriture et boisson durant toute la durée de la privation. Durant les 3 jours de privation de SP, les rats sont tous les jours transférés de leur plate-forme

vers un baril classique pendant environ 40 min, le temps que le baril de privation soit nettoyé et l'eau changée.

Soixante-douze heures après le début de la privation, le rat rebond est replacé dans un baril avec une litière propre pour la récupération de SP. Lorsque le rat est replacé dans ce baril, il suit une période d'éveil d'environ 30-40 min, consécutive au changement d'environnement. Durant ce laps de temps, l'animal procède à une observation des lieux et surtout à une toilette générale. Puis il se calme, s'endort, et commence alors le rebond de SP proprement dit. Trois heures après la fin de la privation, l'animal est profondément anesthésié au pentobarbital sodique (150mg/kg ; i.p) et rapidement perfusé. En conséquence et conformément à la cinétique de la protéine Fos, les neurones exprimant Fos observés pour ces animaux refléteront leur activation lors du rebond de SP. Les rats témoins et privés sont alors successivement euthanasiés.

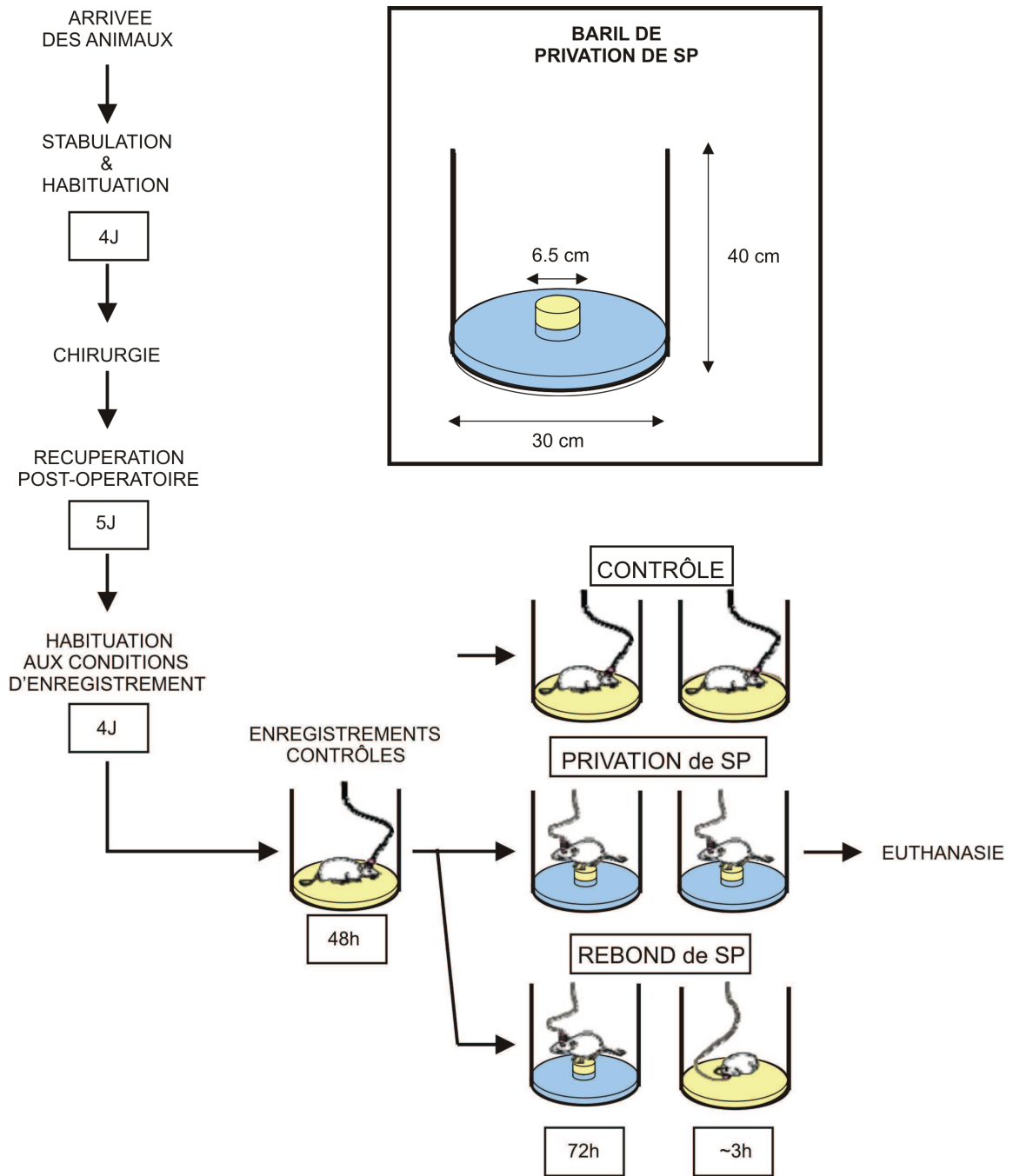


Figure 26. Protocole de privation et de rebond de SP par la méthode de la piscine.

## **VIII. L'UTILISATION D'UN MARQUEUR FONCTIONNEL : LA PROTEINE FOS**

### **A. Intérêt des marqueurs fonctionnels**

Dans le cadre de notre étude, l'utilisation de traceurs permet de déterminer les efférences et les afférences au LPGi. Cependant, il est indispensable de savoir parmi ces efférences/afférences, lesquelles sont spécifiquement actives durant le SP.

Un moyen de répondre à cette question est l'utilisation d'un marqueur de l'activité cellulaire comme le proto-oncogène *Fos*. En effet Sagar et al. (1988a) ont montré que l'expression de ce gène traduit l'activation d'une cellule par stimulus. Le *Fos* fait partie de la famille des gènes précoces. Ces gènes ont une transcription qui est rapidement induite par une stimulation extracellulaire (Morgan et Curran 1986; 1989; 1991) pour réguler la transcription d'un gène cible (Kerppola et Curran 1991).

### **B. Mécanisme de la synthèse de la protéine Fos**

Les réponses du neurone aux diverses stimulations dont il est en permanence l'objet sont réparties en deux classes : les réponses précoces et les réponses tardives. Les réponses précoces surviennent de quelques millisecondes à quelques minutes après la stimulation. Elles résultent de l'interaction entre les premiers messages extracellulaires (neurotransmetteurs ou facteurs de croissance) et des récepteurs de surface, interactions dont la résultante est l'activation de seconds messagers intercellulaires. Ce mécanisme passe soit par l'activation de récepteurs ionotropiques, soit par l'activation de récepteurs métabotropiques. La résultante en est une augmentation de la concentration intracellulaire en ions calcium qui peuvent alors agir sur des protéines kinases. Ces protéines kinases activent des protéines spécifiques par phosphorylation. Celle-ci est généralement courte du fait d'une régulation par des phosphatases. L'induction du gène *Fos* fait partie des réponses précoces. Elle est associée à l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium.

La réponse tardive survient dans une fenêtre de quelques heures à quelques jours et, dans certaines circonstances, peut devenir permanente comme c'est le cas dans les mécanismes d'apprentissage ou de mémoire. Des modifications de l'expression génomique sont nécessaires pour ce type de réponse. Ces modifications surviennent soit par des mécanismes directs (le complexe hormone stéroïde-récepteur), soit par des mécanismes



indirects (action d'un second messenger). Ces modifications sont le fait de molécules regroupées sous l'appellation de « molécules effectrices liant l'ADN » (DNA binding effector molecules). S'en suit la production d'un ARNm spécifique et de la protéine associée qui va alors modifier le phénotype de la cellule. Les gènes codant pour ces protéines sont dénommés gènes de réponse tardive (late-response genes).

Dans notre cas, la transcription de l'ARNm Fos atteint un pic entre trente et soixante minutes après le stimulus, alors que le taux maximal de la protéine Fos s'observe entre une et trois heures après cette stimulation (Dragunow et Faull 1989). Il s'agit de la réponse précoce. La visualisation de la protéine Fos par immunohistochimie chez un animal sacrifié dans les premières heures qui suivent un stimulus permet donc de tracer à l'échelle cellulaire les réseaux neuronaux recrutés par cette stimulation.

### **C. Fos et cycle veille-sommeil**

L'immunohistochimie du Fos a été utilisée dans de nombreuses études du cycle veille-sommeil et particulièrement du SP. Différents travaux ont notamment montré que l'expression de Fos est modulée par les états de vigilance (pour revue, (Tononi et Cirelli 2001)). Ainsi quand l'animal est endormi pendant les 3 à 8 heures qui précèdent son sacrifice, l'expression de c-Fos est faible voire nulle dans la plupart des régions cérébrales. Au contraire, son expression est forte dans de nombreuses régions cérébrales si l'animal est éveillé spontanément ou privé de sommeil.

Le Fos est nucléaire et sa détection immunohistochimique peut être combinée avec la détection immunohistochimique de substances cytoplasmiques, comme des neurotransmetteurs et leurs enzymes de synthèse. Cette approche a permis d'identifier la nature et la localisation de certains neurones actifs spécifiquement au cours du SP (Maloney et al. 1999; Verret et al. 2005).

Enfin Verret et al. (2006) ont également montré l'intérêt du c-Fos couplé à l'immunohistochimie d'un traceur rétrograde (la CTb) afin de mieux comprendre l'organisation des réseaux neuronaux à l'origine de la régulation d'une structure cérébrale donnée, au cours des états de vigilance.

Ces données montrent l'intérêt de l'utilisation de l'immunohistochimie du Fos pour une approche fonctionnelle des réseaux neuronaux impliqués dans la régulation du cycle veille-sommeil.

## **IX. ETUDE FOS/NEUN**

NeuN est un marqueur nucléaire spécifique des neurones post-mitotiques (Wolf et al. 1996; Mullen et al. 1992). Dans notre étude, l'immunohistochimie de NeuN est utilisée suite au marquage Fos dans le cas de rats ayant subi un rebond de SP. En effet, le double marquage Fos/NeuN permet de connaître le pourcentage de neurones exprimant Fos après privation ou hypersomnie de SP par rapport au nombre total de neurones localisés dans le LPGi.

Nous avons effectué le double marquage sur un groupe de quatre rats ayant effectué un rebond de SP consécutive à une privation de SP par la méthode de la piscine. Les résultats sont exprimés sous forme de pourcentage.

## **X. ETUDES COMPLEMENTAIRES**

### **A. Etude MCH/CTb**

Nos avons procédé au double marquage MCH/CTb sur des coupes au niveau hypothalamique. Ce marquage permet d'identifier si le LPGi reçoit des afférences MCHergiques de l'hypothalamus latéral.

### **B. Etude TH/CTb**

La tyrosine hydroxylase (TH) est l'enzyme de synthèse des catécholamines. Par conséquent, nous avons procédé au double marquage TH/CTb afin de positionner les sites de CTb par rapport aux neurones adrénergiques de la région C1.

## **XI. PERFUSION ET PREPARATION HISTOLOGIQUE**

### **A. Perfusion**

Les animaux sont anesthésiés puis perfusés par le cœur avec 100mL d'une solution à température ambiante de Ringer-Lactate héparinée à 0.1%, puis avec 500mL d'une solution

de fixation maintenue à 4°C-6°C. La solution de fixation est composée de paraformaldéhyde 4% tamponnée avec du PB 0.1M à pH 7.4. A la fin de la perfusion, le cerveau est prélevé puis plongé dans une solution de PB 0.1M contenant 30% de saccharose pendant au moins 3 jours à 4°C, dans le but de préserver le tissu lors de la congélation.

## **B. Réalisation et conservation des coupes histologiques**

Pour la réalisation des coupes histologiques, les cerveaux sont congelés dans de l'isopentane porté à -50°C par de la carboglace. Ils sont ensuite entièrement sectionnés au cryostat (Microm) dans une enceinte à -20°C en coupes frontales sériées de 25µm d'épaisseur, depuis la partie la plus rostrale de la moelle épinière jusqu'au cortex frontal. Ces coupes flottantes sont recueillies dans une solution de tampon phosphate PB 0.1M à pH 7.4 contenant 0.9% de NaCl et 0.3% de triton X-100 (PBST).

Après avoir été récupérées, les coupes sont rincées deux fois 30 min à température ambiante, puis sont conservées à 4°C dans une solution de PBST contenant 0.1% d'azide de sodium (PBST-Azide). L'azide de sodium est un agent antibactérien qui assure une bonne conservation des tissus.

## **C. Immunohistochimie**

### **1. Principe**

L'immunohistochimie est une technique qui permet de visualiser sur un échantillon de tissu post-mortem la présence d'un marqueur donné (l'antigène) de nature endogène, comme un neurotransmetteur, une enzyme de synthèse, une protéine nucléaire ou membranaire, ou de nature exogène, comme c'est le cas pour un traceur rétrograde ou antérograde.

Cette technique consiste à fixer sur l'antigène d'intérêt un anticorps, monoclonal ou polyclonal, qui lui est spécifique, dit anticorps primaire. La présence de celui-ci est révélée par un système de marquage utilisant des composés colorés visualisables par microscopie en lumière transmise ou à fluorescence. Dans le cas où le composé coloré est fixé directement sur l'anticorps primaire, la technique est dite d'immunohistochimie directe. Cependant dans le but d'augmenter la sensibilité de la réaction, un second anticorps ou anticorps secondaire,

dirigé contre l'espèce chez laquelle l'anticorps primaire a été produit, peut être utilisé. Il s'agit alors d'une technique d'immunohistochimie indirecte presque universellement utilisée aujourd'hui. Ces anticorps secondaires sont polyclonaux et peuvent donc se fixer sur différents épitopes de l'anticorps primaire. Le système de coloration étant porté par les anticorps secondaires, une plus grande quantité de marqueur coloré est fixée par anticorps primaire.

La technique de révélation la plus couramment utilisée en microscopie optique exploite les propriétés enzymatiques de la peroxydase du raifort (Horse Radish Peroxydase, HRP). La HRP transforme son substrat, le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) en eau ( $H_2O$ ), libérant ainsi un proton ( $H^+$ ). Cet ion hydrogène oxyde alors la molécule de révélation choisie, qui a pour propriété de précipiter et de changer de couleur sous sa forme oxydée.

Les travaux présentés ici ont été réalisés grâce à l'utilisation de la 3,3'-diaminobenzidine tétrahydrochloride (DAB) qui, en présence de protons, donne un précipité marron insoluble (technique DAB simple). Si du sulfate d'ammonium et de nickel est ajouté à la solution de révélation, alors le précipité obtenu est de couleur bleu-noire (technique DAB-Ni). Cette possibilité d'obtention de deux couleurs différentes facilement distinguables au microscope optique permet d'effectuer des doubles marquages sur un même tissu.

Dans le but d'accroître la qualité et la sensibilité des méthodes de révélation indirecte, le moyen de fixation du système de coloration par la HRP sur l'anticorps secondaire a été perfectionné. Ainsi, une procédure utilisant la très forte affinité de l'avidine pour la molécule de biotine a été introduite par Hsu (1981). Cette technique nécessite l'emploi d'anticorps secondaires portant plusieurs molécules de biotine sur lesquelles vient se lier de manière extrêmement stable un composé d'avidine et de HRP. L'avidine possède quatre sites de liaison pour la biotine mais, du fait de l'encombrement stérique du complexe ainsi formé, le nombre de molécules de biotine qui se fixent est inférieur à quatre. C'est pourquoi une nouvelle génération de complexe avidine-biotine (ABC) couplés à la HRP a été élaborée. La HRP n'est alors pas liée de façon covalente directement à l'avidine mais par l'intermédiaire de la biotine. Ainsi un plus grand nombre de molécules d'enzyme (HRP) peut se fixer sur le complexe ABC, amplifiant encore l'intensité de la réaction immunohistochimique.

## 2. Protocole expérimental général

Pour la totalité des doubles marquages immunohistochimiques réalisés dans ce travail, la procédure suivante est entièrement exécutée une première fois en utilisant la DAB-Ni

comme chromogène. Elle est alors suivie de plusieurs rinçages. Après un minimum d'une nuit de délai, elle est réalisée une deuxième fois mais en employant la DAB simple comme chromogène. La liste des anticorps utilisée est décrite dans le tableau 4.

Procédure :

- Les coupes flottantes sont incubées durant trois jours à 4°C dans une solution d'anticorps primaire, spécifiquement dirigé contre l'antigène à détecter, diluée au PBST azide.

- Après deux rinçages de 30 minutes dans du PBST, les coupes sont incubées 90 minutes à température ambiante dans une solution d'anticorps secondaire biotinylé.

- Après deux nouveaux rinçages au PBST pendant 30 minutes, les coupes sont placées pendant 90 minutes à température ambiante dans une solution contenant le complexe ABC.

- Après deux rinçages de 30 minutes dans du PBST, les coupes sont incubées dans une solution de Tris-HCl 0,05M à pH 7,6 contenant 0,025% de DAB et 0.003% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avec du sulfate d'ammonium et de nickel, ce qui permet d'obtenir un marquage bleu-noir. La réaction d'une durée maximale de 30 minutes, se déroule à température ambiante. L'intensité et le contraste (rapport signal spécifique/bruit) de la réaction sont régulièrement contrôlés sous microscope. Lorsque la réaction est jugée optimale, elle est arrêtée par plusieurs rinçages successifs avec une solution de PBST-Azide. En effet, l'action enzymatique de la HRP est fortement inactivée en présence d'azide.

- Pour le deuxième marquage, le protocole suivi est le même. Toutefois, le marquage est révélé sans l'utilisation de sulfate d'ammonium et de nickel, ce qui entraîne un marquage de couleur marron.

**Tableau 4. Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés en immunohistochimie**

|                      | <b>FOS</b>                              | <b>CTB</b>                                  | <b>PHA-L</b>                            | <b>NEUN</b>                                 | <b>TH</b>                               | <b>MCH</b>  |
|----------------------|---|---|---|---|---|---|
| Anticorps Primaire   | Lapin<br>(Oncogene)<br><br>1 :10000     | Chèvre<br>(List Biol.labs)<br><br>1 :40000  | Lapin<br>(Vector Labs)<br><br>1/5000    | Souris<br>(Abcys)<br><br>1 :20000           | Lapin<br>(Jacques Boy)<br><br>1 :5000   | Lapin<br>(Phoenix pharmaceuticals Inc.)<br><br>1 :16000 |
| Anticorps Secondaire | Anti-lapin<br>(Rockland)<br><br>1 :1000 | Anti-chèvre<br>(Vector Labs)<br><br>1 :1000 | Anti-lapin<br>(Rockland)<br><br>1 :1000 | Anti-souris<br>(Vector Labs)<br><br>1 :1000 | Anti-lapin<br>(Rockland)<br><br>1 :1000 | Anti-lapin<br>(Rockland)<br><br>1 :1000                 |

#### **D. Analyse des données anatomiques**

Les cartographies et les analyses quantitatives ont été réalisées à l'aide du logiciel d'analyse d'images (Mercator, ExploraNova, La Rochelle, France). Les coupes sont visualisées avec un microscope dont la platine est équipée de capteurs de coordonnées en X et en Y et d'une caméra vidéo connectée à un moniteur. Ce système permet de dessiner à faible grossissement (objectif 2.5) le contour des coupes et les structures anatomiques et de pointer à plus fort grossissement (objectif 10) les différents types de neurones marqués.

##### **1. Marquage Fos-CTb**

L'analyse est effectuée sur 4 animaux de chaque série expérimentale, contrôle (PSC), privé de SP (PSD) et rebond de SP (PSR). Pour les 12 animaux, l'analyse se fait sur des coupes espacées de 600µm, du plan -13.3mm au plan +2.30 mm par rapport au Bregma. Nous avons suivi l'atlas de Paxinos et Watson (1998) afin de dessiner le contour des régions neuroanatomiques. Toutefois, la délimitation du noyau SLD provient de l'atlas de Swanson (1998). Nous avons étudié deux catégories de neurones : les neurones simplement marqués CTb, afin d'étudier les afférences au LPGi, et les neurones doublement marqués Fos-CTb, afin d'étudier les afférences au LPGi actives pendant la privation ou le rebond de SP.

Dans le cas de l'étude Fos-CTb après injection de CTb dans le noyau moteur facial, l'analyse est effectuée sur des coupes espacées de 600  $\mu$ m du plan -13.30 mm au plan -10.90 mm par rapport au Bregma.

## 2. Marquage Fos-NeuN

Nous avons procédé de la même manière pour l'analyse de ce marquage. L'analyse est effectuée sur des coupes espacées de 600  $\mu$ m du plan -13.30 mm au plan -10.90 mm par rapport au Bregma.

Nous avons deux catégories de neurones : les neurones simplement marqués NeuN afin de calculer le nombre total de neurones présents dans le LPGi, et les neurones doublement marqués Fos-NeuN, afin de déterminer le nombre total de neurones activés en hypersomnie de SP dans le LPGi.

## 3. Marquage Fos-PHA-L

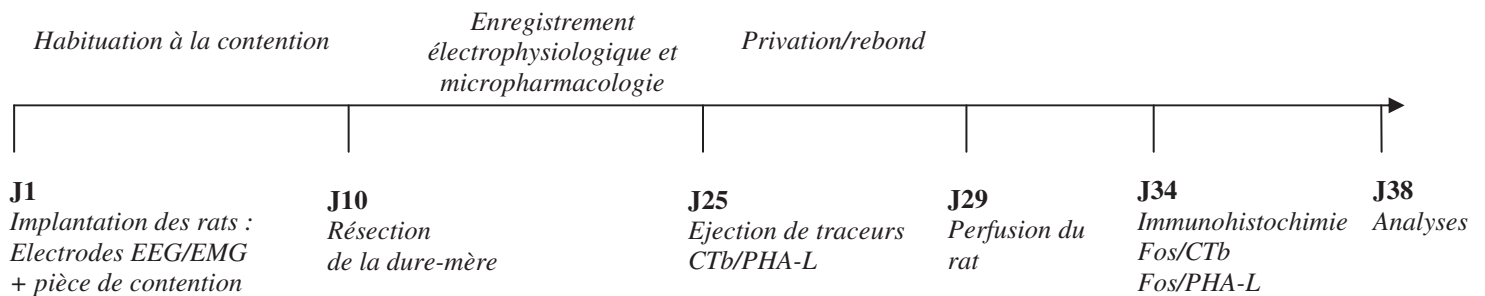
Nous avons étudié les principales projections du LPGi de façon qualitative. Nous avons en effet pris plusieurs photographies grâce au logiciel MorphoLite (ExploraNova).

## 4. Cartographie et analyses statistiques.

Les cartographies obtenues sont ensuite exportées vers le logiciel Adobe Illustrator 10, où elles sont mises en page. Le logiciel Mercator permet également de compter le nombre de neurones pointés de chaque catégorie dans la région anatomique dans laquelle ils se trouvent. Les résultats sont alors exportés sous format texte, permettant une analyse plus fine grâce au tableur Excel. Nous utilisons pour ce faire une macro, développée sous Excel au laboratoire par Pascal Ravassard, permettant le regroupement de chaque coupe par régions anatomiques. Les résultats sont exprimés sous forme moyenne  $\pm$  S.E.M. L'analyse statistique consiste en un test de Kruskal et Wallis pour séries indépendantes puis un test de Mann et Whitney ( $p < 0.05$ ).

## **XII. RESUME DU PROTOCOLE : DECOURS TEMPOREL**

En résumé, le protocole expérimental complet dure environ un mois. Les rats sont, dans un premier temps, implantés avec des électrodes EEG et EMG ainsi qu'une pièce en forme de « U » afin de pouvoir les maintenir en contention. Un puits est formé à l'aplomb du LPGi. Les rats sont habitués au système de contention d'environ dix jours puis la dure-mère est réséquée. Les séances d'enregistrements/pharmacologie durent environ dix jours au cours desquels les deux traceurs CTb et PHA-L sont éjectés. Le rat est par la suite mis en privation/rebond de SP et perfusé afin de révéler par immunohistochimie les double marquages.



**Figure 14. Déroulement temporel de l'ensemble du protocole expérimental**



# ***RESULTATS***

# ***CHAPITRE 1***

## ***Etude électrophysiologique et pharmacologique des neurones du LPGi***

# **I. ENREGISTREMENT UNITAIRE DES NEURONES DU LPGi**

## **A. Identification du LPGi**

Le LPGi s'est avéré difficile à localiser au cours des expérimentations du fait du peu de données répertoriées dans la littérature sur les propriétés électrophysiologiques de ses neurones. Nous avons donc été amenés à explorer électrophysiologiquement la région du LPGi incluant les structures adjacentes dans un rayon de 1 mm.

Selon nos coordonnées de descente théorique, le LPGi se situe sous le noyau ambigu, latéralement au GiV et sa limite rostrale se trouve au pôle caudal du noyau moteur facial.

En pratique, les neurones que nous avons enregistrés dans le LPGi se situent en majorité à 2 mm de latéralité par rapport à la ligne médiane. De plus, nous avons au cours de nos descentes prêté une grande attention à la limite entre le cervelet et le bulbe rachidien. En effet, il est plutôt aisé de différencier les cellules de Purkinje et granulaires du cervelet. De cette façon, lorsque ces deux types cellulaires ne sont plus distinguables, nous considérons que nous avons atteint la surface dorsale du bulbe rachidien. La profondeur visée se situe alors entre 6 et 9 mm. L'indice électrophysiologique le plus efficace pour déterminer la profondeur d'enregistrement du LPGi est la présence de neurones respiratoires. Ces types neuronaux appartiennent soit au complexe Bötzing, soit au noyau pré-Bötzing. Nous avons considéré que les neurones du LPGi intéressants pour notre étude se situaient ventralement au dernier neurone respiratoire enregistré. En effet, selon toutes nos expériences d'enregistrement, il semble que les neurones du LPGi corrélés au cycle veille-sommeil ne sont pas colocalisés avec les neurones respiratoires enregistrés (Figure 28). La limite ventrale du LPGi est le plancher du cerveau, identifiable par une perte du signal électrophysiologique.

Les coordonnées rostro-caudales du LPGi ont été les plus difficiles à déterminer. En effet, le LPGi s'étend sur environ 2.5 mm d'avant en arrière (Paxinos et Watson 1998). Dans cette étude, nous avons exploré la partie caudale du LPGi, située caudalement au noyau facial, lui-même facilement identifiable car il contient des motoneurones ayant un mode de décharge corrélé aux mouvements de la face et des potentiels d'action de grande amplitude. La limite caudale du LPGi se situe environ 1.5 mm en arrière de cette limite rostrale.

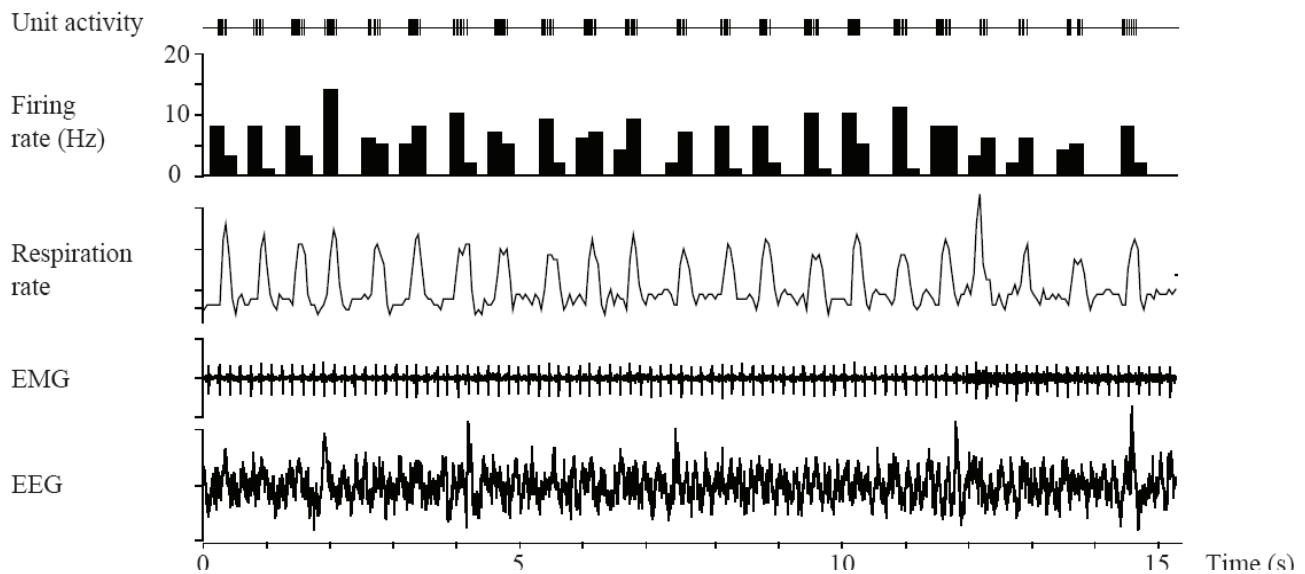


Figure 28. Enregistrement d'un neurone respiratoire situé à la limite dorsale du LPGi.

### B. Marquage immunohistochimique Fos/NeuN

Un marquage Fos après rebond de SP suivant une privation sélective de SP a été réalisée en combinaison avec l'immunomarquage NeuN (Figure 29).

Ainsi,  $794 \pm 116$  neurones immunomarqués NeuN sont comptés dans le LPGi. Parmi ces neurones,  $123 \pm 27$  sont doublement marqués Fos, ce qui représente 17% du total des neurones.

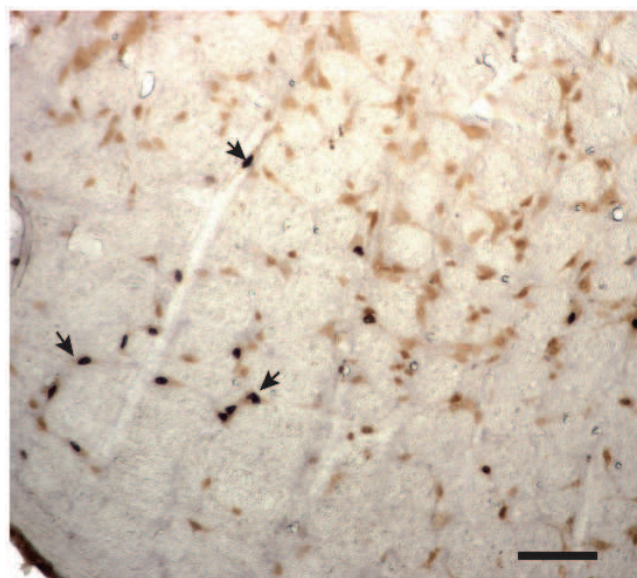


Figure 29. Illustration des résultats de l'immunohistochimie de Fos (noir)/NeuN (marron) au sein du LPGi, réalisée sur des rats ( $n=4$ ) ayant effectué une hypersomnie de SP consécutive à une privation sélective par la méthode de la piscine. Les flèches montrent quelques-uns des neurones doublement marqués. Echelle : 150  $\mu$ m.

### **C. Activité spontanée et taux de décharge**

L'activité spontanée des neurones du LPGi a été étudiée sur 50 neurones enregistrés sur un total de 10 rats habitués à la contention stéréotaxique durant au moins un cycle complet d'éveil et de sommeil (Eveil, SL et SP). Ces neurones ont été classés selon leur taux de décharge pendant les trois états de vigilance. Nous avons différencié trois groupes :

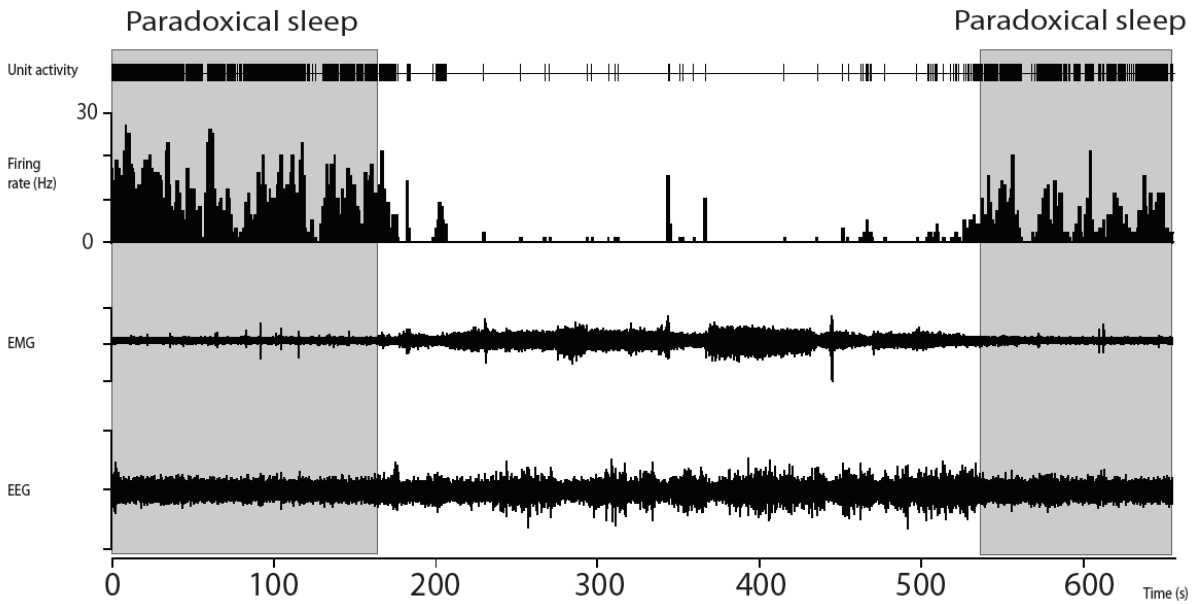
- 21 neurones à profil de décharge SP-On
- 8 neurones à profil de décharge SP-Off
- 21 neurones ne présentant pas de profil spécifique aux états de vigilance.

#### **1. Les neurones SP-On**

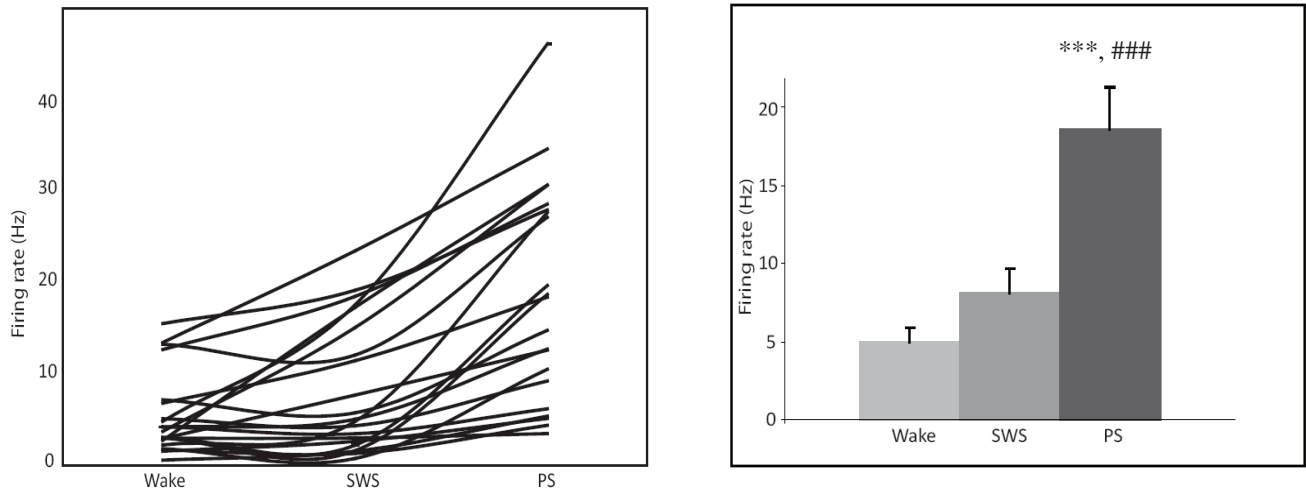
Le taux de décharge des neurones SP-On augmente par définition au cours du SP (Figures 30 et 31). Cette augmentation est significative par rapport aux deux autres états de vigilance, Eveil et SL (Tableau 5). On note toutefois une tendance à une augmentation progressive du taux de décharge entre états de vigilance (EV<SL<SP). La différence entre Eveil et SL n'est cependant pas significative.

L'étude du taux de décharge neurone par neurone ne nous permet pas de définir des sous-groupes éventuels de neurones SP-On car le taux de décharge au cours du SP est très variable puisqu'il est compris entre 2.99 et 46.51 Hz.

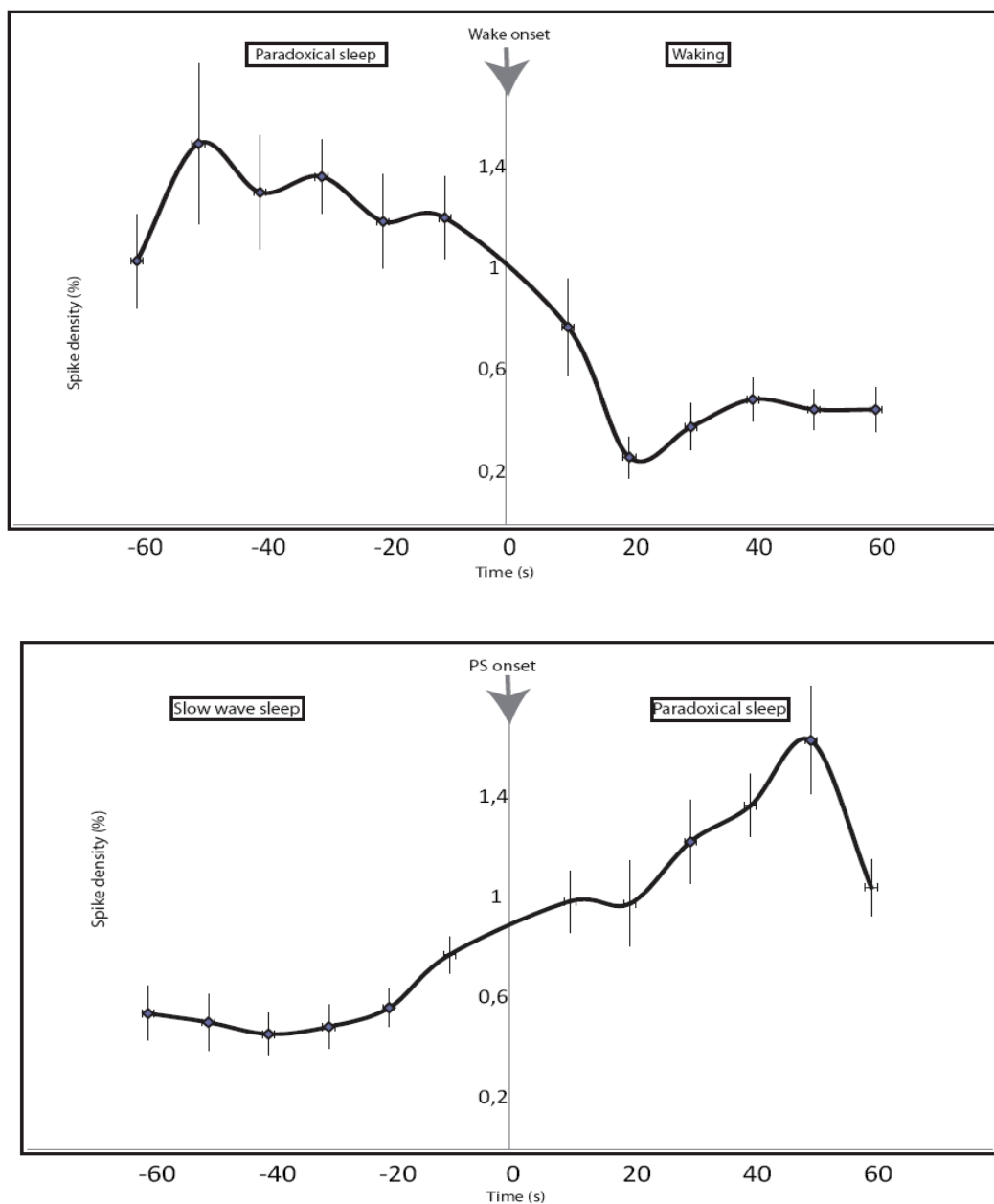
L'étude de la transition SL/SP indique que la moyenne du taux de décharge des neurones SP-On anticipe le début du SP, augmentant environ 10 secondes avant le début du SP. Au cours de la transition SP/EV, la moyenne du taux de décharge des neurones SP-On revient à une ligne de base environ 10 secondes après le début de l'éveil (Figure 32).



**Figure 30.** Exemple de l'enregistrement d'un neurone SP-On au cours du cycle veille-sommeil. La fréquence de décharge d'un neurone SP-On augmente significativement au cours du SP par rapport aux autres états de vigilance.



**Figure 31.** Taux de décharge des neurones de type SP-On enregistrés au sein du LPGi au cours des états de vigilance. A gauche : représentation du taux de décharge pour chaque neurone enregistré. A droite : Histogramme des moyennes du taux de décharge de l'ensemble des neurones SP-On (moyenne±sem).  
 \*\*\* :  $p < 0.001$  entre SP et l'éveil, ### :  $p < 0.001$  entre SP et SL



**Figure 32.** Graphique de la fréquence de décharge normalisée (fréquence normalisée  $\pm$  S.E.M) des neurones SP-On en fonction du temps et du début du SP ou de l'éveil. En haut : transition du SL au SP. En bas : transition du SP à l'éveil.

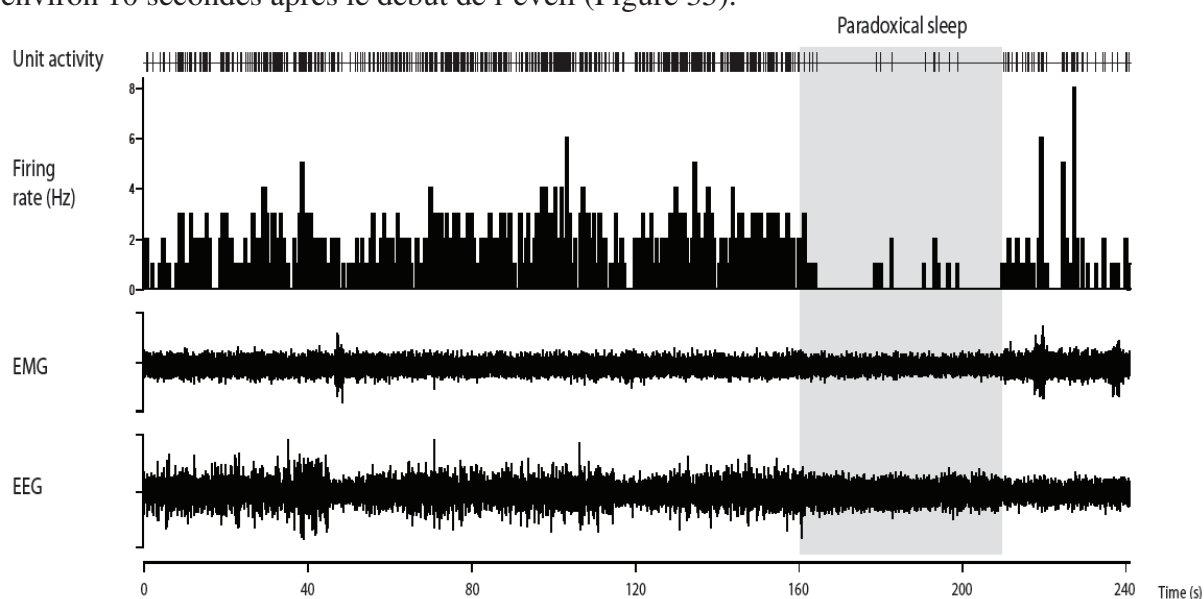
## 2. Les neurones SP-Off

Les 8 neurones SP-Off ont été enregistrés sur 5 rats au sein du LPGi.

Le taux de décharge des neurones SP-Off diminue par définition au cours du SP (Figures 33 et 34). Cette diminution est significative par rapport aux deux autres états de vigilance Eveil et SL (Tableau 5). Il n'y a aucune différence significative entre le taux de décharge présent au cours de l'Eveil et au cours du SL.

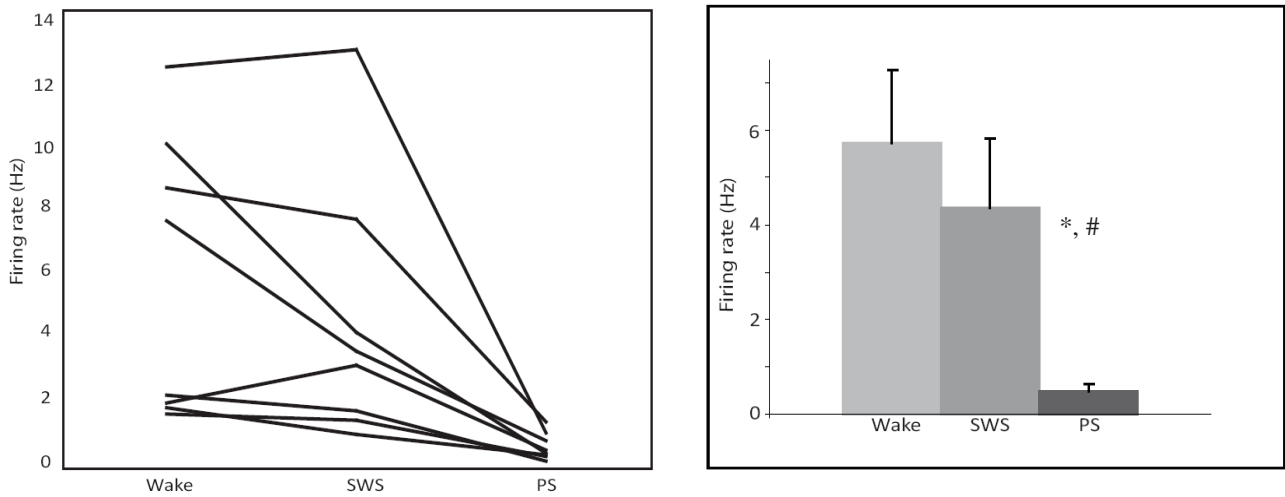
L'étude du taux de décharge neurone par neurone ne nous permet pas de définir des sous-groupes éventuels de neurones SP-Off. Il est toutefois intéressant de noter que leur taux de décharge au cours du SP est compris entre 0 et 1.24Hz.

L'étude de la transition SL/SP indique que la moyenne du taux de décharge des neurones SP-Off enregistrés au sein du LPGi diminue dès le début des phases de SP. Au cours de la transition SP/EV, la moyenne du taux de décharge des neurones SP-Off augmente environ 10 secondes après le début de l'éveil (Figure 35).

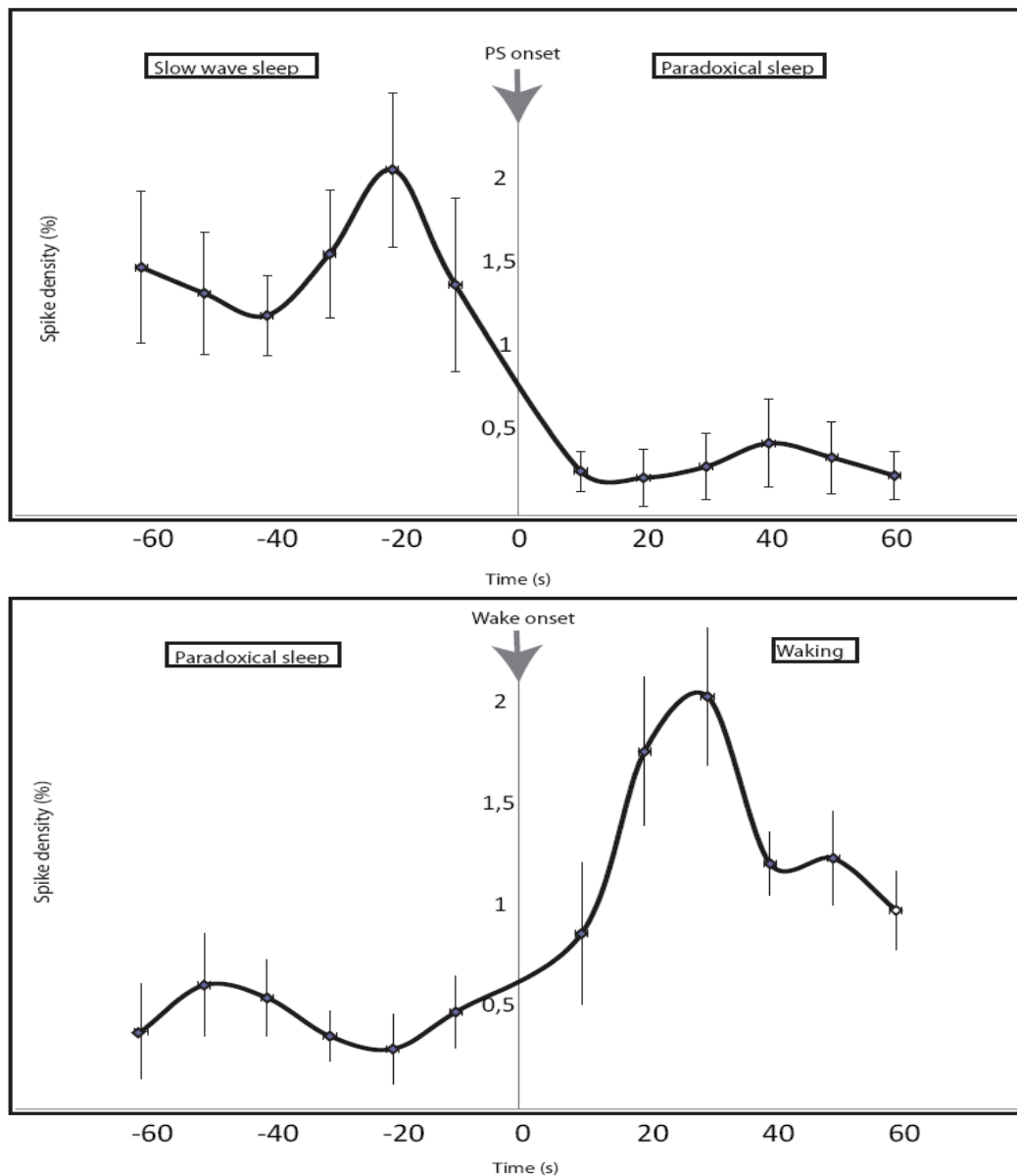


**Figure 33. Exemple de l'enregistrement d'un neurone SP-Off au cours du cycle veille-sommeil. La fréquence de décharge d'un neurone SP-Off diminue significativement au cours du SP par rapport aux autres états de vigilance.**





**Figure 34.** Taux de décharge des neurones de type SP-Off enregistrés au sein du LPGi au cours des états de vigilance. A gauche : représentation du taux de décharge pour chaque neurone enregistré. A droite : Histogramme des moyennes du taux de décharge de l'ensemble des neurones SP-Off (moyenne±sem).  
\* :  $p < 0.001$  entre SP et l'éveil, # :  $p < 0.001$  entre SP et SL



**Figure 35.** Graphique de la fréquence de décharge normalisée (fréquence normalisée ± s.em) des neurones SP-off en fonction du temps et du début du SP ou de l'éveil. En haut : transition du SL au SP. En bas : transition du SP à l'éveil.

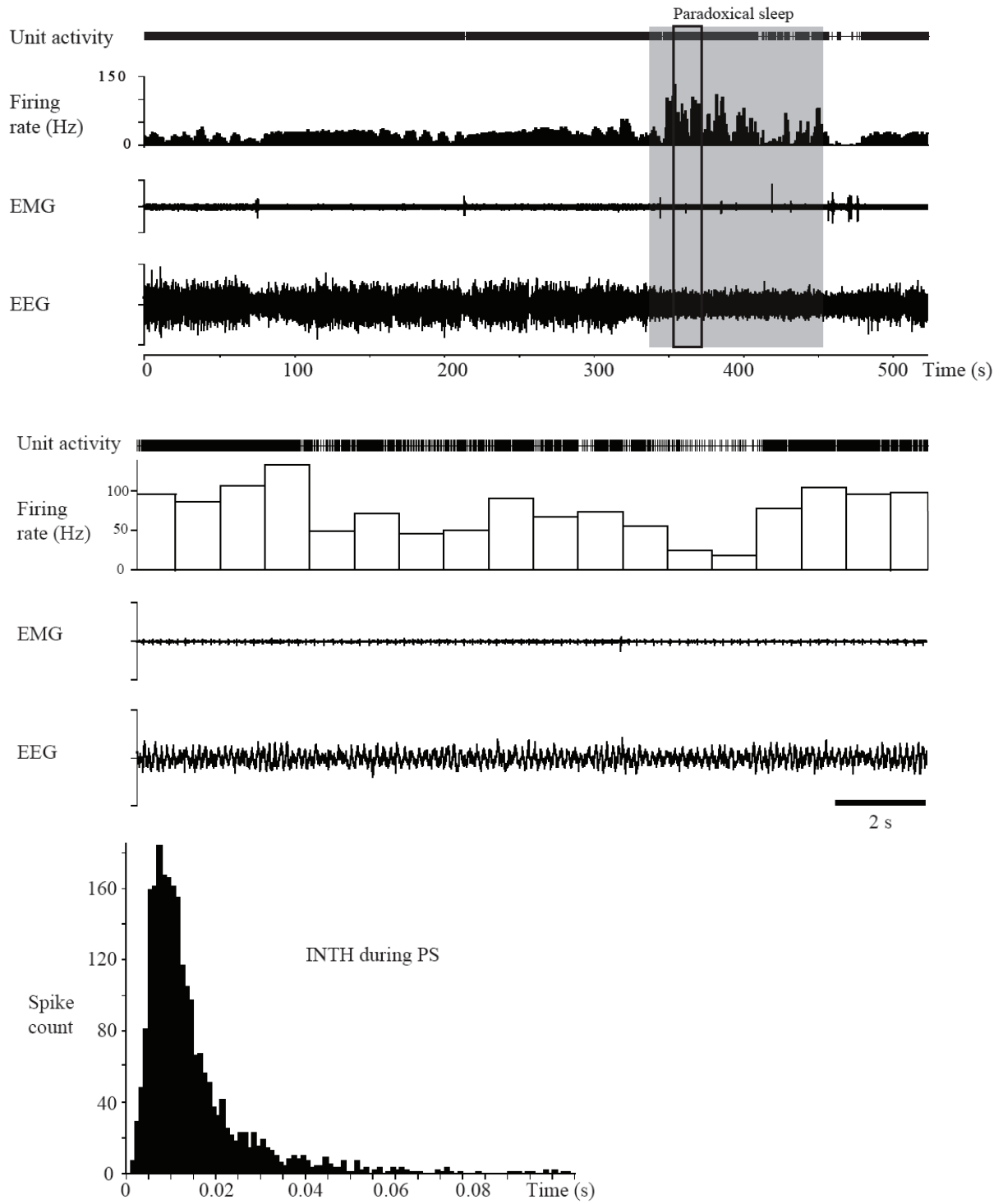
## D. Mode de décharge

Les index d'asymétrie calculés pour le groupe de neurones SP-On ne présentent pas de différence significative entre état de vigilance. Au contraire, les coefficients de variation calculés pour ce même groupe montrent une différence significative entre l'éveil et le SL et l'éveil et le SP. Le calcul des index d'asymétrie et du coefficient de variation pour le groupe des neurones SP-On indique que ces neurones adoptent un mode de décharge irrégulier pendant les trois états de vigilance et avec une tendance plus phasique au cours de l'éveil qu'au cours du SP et du SL. Ceci est confirmé par l'histogramme d'intervalle des neurones SP-On qui montre que ceux-ci ont pendant le SP un mode de décharge relativement tonique sur lequel se superpose une activité phasique (Tableau 5 ; Figure 36).

Les index d'asymétrie et les coefficients de variation calculés pour le groupe de neurones SP-Off indiquent que ceux-ci ont un mode de décharge tonique. Il en est de-même pour les autres types neuronaux qui ne présentent aucun lien avec le cycle veille-sommeil.

**Tableau 5. Fréquences de décharge, Index d'asymétrie et coefficients de variation des neurones SP-On, SP-Off et des autres types de neurones enregistrés au sein du LPGi. \*\*\* : p<0.001, \*\* : p<0.01, \* p<0.05 entre SP et l'éveil, ### : p<0.001, ## : p<0.01, # : p<0.05 entre SP et SL, ° : p<0.05 entre l'éveil et SL. N/A : not available**

|                                  | Firing rate (Hz) |                 |                               | Asymmetric index |                 |                          | Coefficient of variation |                        |                         |
|----------------------------------|------------------|-----------------|-------------------------------|------------------|-----------------|--------------------------|--------------------------|------------------------|-------------------------|
|                                  | Wake             | Slow wave sleep | Paradoxical sleep             | Wake             | Slow wave sleep | Paradoxical sleep        | Wake                     | Slow wave sleep        | Paradoxical sleep       |
| <b>PS-On neurons</b>             | 4.94±0.99        | 8.11±1.61       | 18.61±2.64 <sup>***,###</sup> | 0.30±0.06        | 0.28±0.06       | 0.26±0.05                | 4.08±1.03                | 2.28±0.31 <sup>°</sup> | 1.98±0.11 <sup>**</sup> |
| <b>PS-Off neurons</b>            | 5.72±1.57        | 4.36±1.45       | 0.45±0.14 <sup>*,#</sup>      | 0.35±0.09        | 0.40±0.08       | N/A                      | 2.90±0.32                | 2.81±0.67              | N/A                     |
| <b>State-indifferent neurons</b> | 13.08±3.66       | 13.15±3.21      | 13.72±3.81                    | 0.33±0.06        | 0.39±0.07       | 0.25±0.05 <sup>***</sup> | 3.85±0.49                | 3.50±1.01              | 2.76±0.65 <sup>**</sup> |



**Figure 36. A/** Exemple de l'enregistrement d'un neurone SP-On au sein du LPGi. **B/** Agrandissement de cet enregistrement au cours du SP. **C/** Histogramme d'intervalle de ce neurone au cours du SP, l'histogramme montre que le neurone SP-On adopte un mode de décharge plutôt tonique au cours du SP.

## **E. Durée des potentiels d'action**

L'analyse de la durée des potentiels d'action des neurones enregistrés peut apporter des précisions quant à la nature de ces neurones. Théoriquement, tous les neurones monoaminergiques et cholinergiques, présentent des potentiels d'action longs (Grace et Bunney 1983b; Koyama et al. 1998). Nous avons ainsi mesuré la durée des potentiels d'action enregistrés au sein du LPGi pour déterminer leur classification (Figure 37). Les potentiels d'action extracellulaires sont généralement caractérisés par une déflexion positive suivie d'une déflexion négative. Koyama et al. (1998) classe les neurones en deux catégories :

- les neurones à potentiels d'action «longs» ayant une déflexion positive supérieure à 0.75 ms et une déflexion négative supérieure à 1 ms ;
- les neurones à potentiels d'action « brefs » ayant une déflexion positive inférieure à 0.75 ms et une déflexion négative inférieure à 1 ms.

Selon ces critères, l'ensemble des neurones enregistrés au sein du LPGi ont des potentiels d'action brefs (Tableau 6, Figure 37).

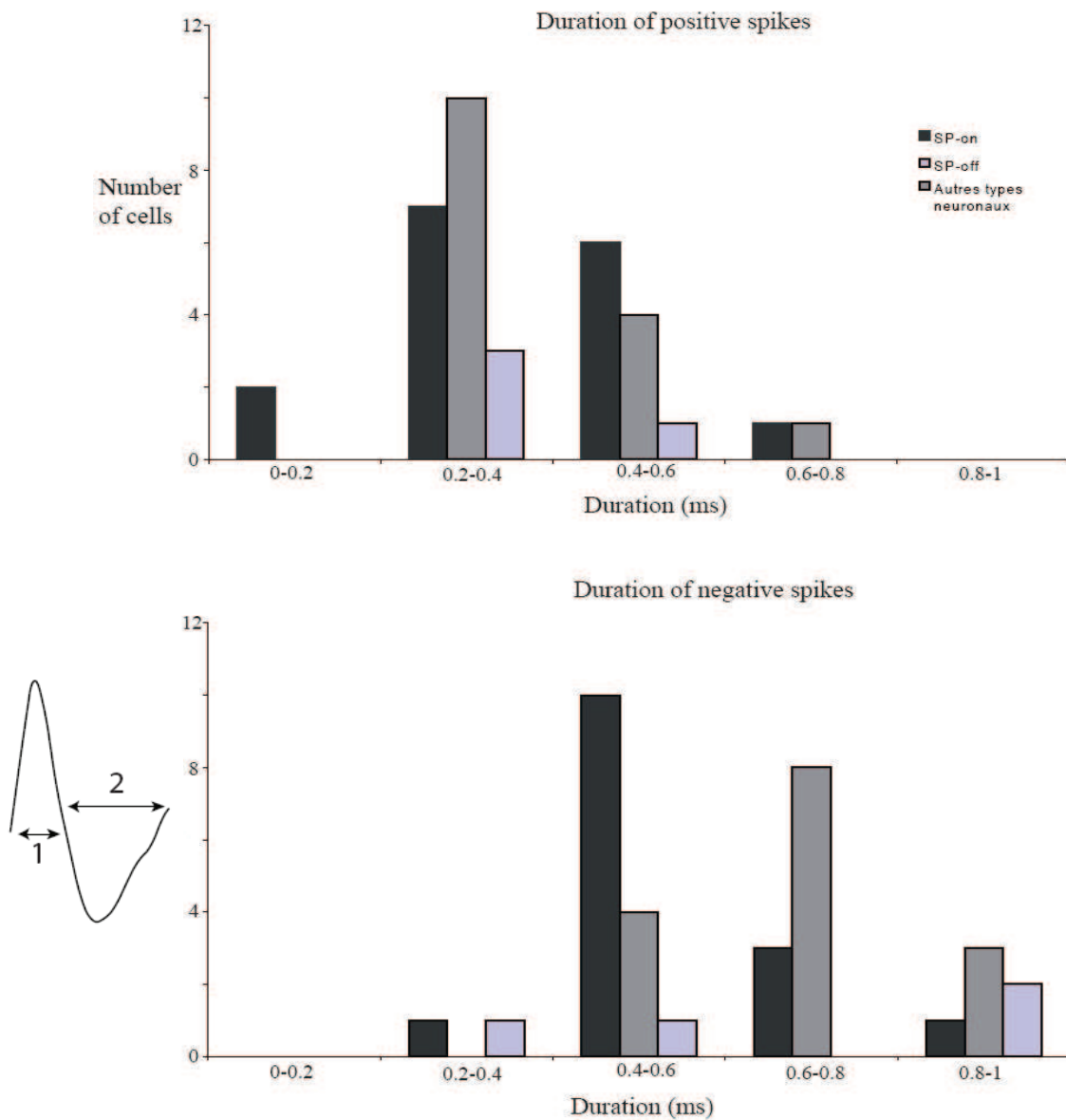


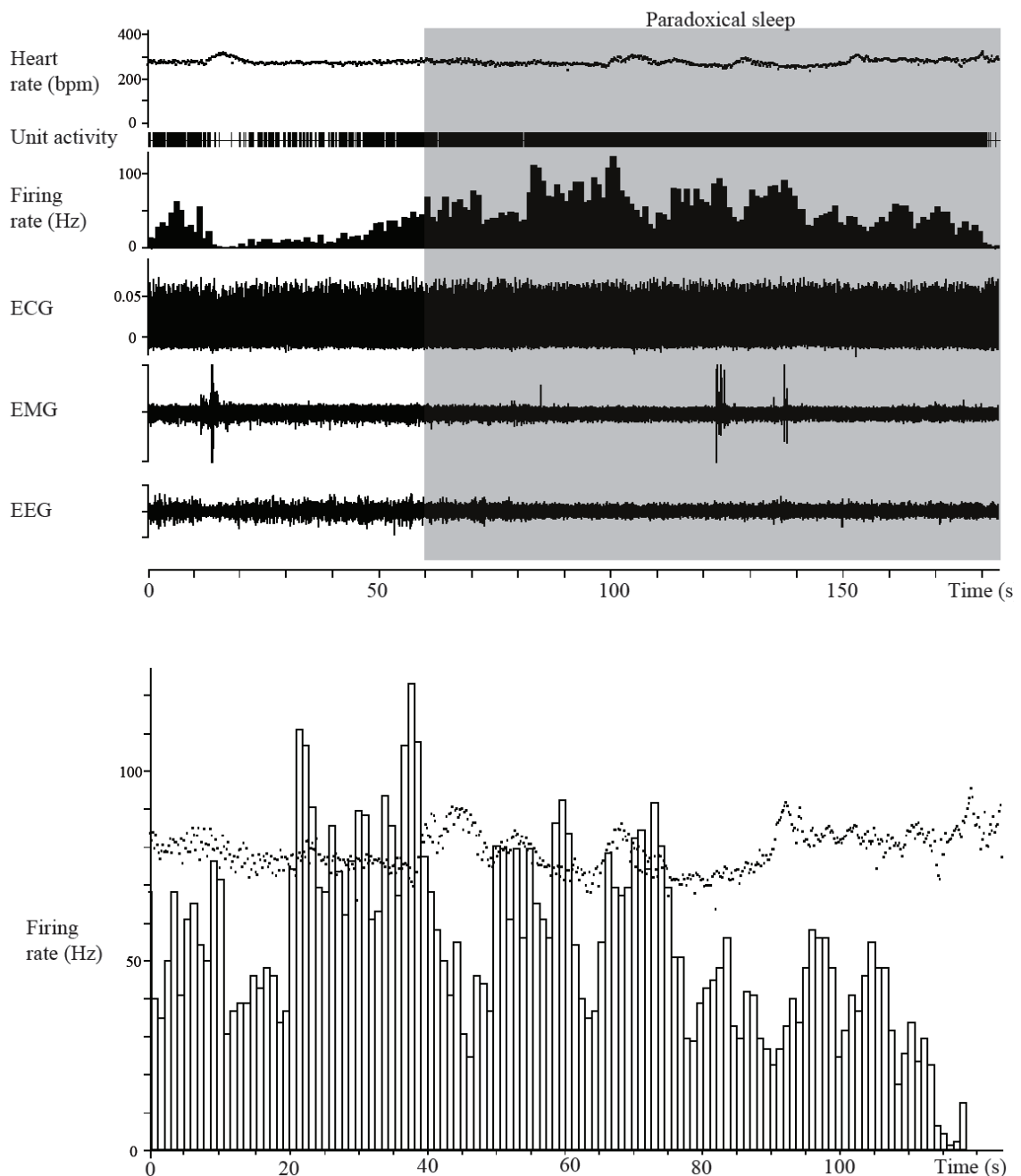
Figure 37. A gauche : Forme d'un potentiel d'action obtenu suite à l'enregistrement extracellulaire unitaire. 1 : durée de la déflexion positive, 2 : durée de la déflexion négative. A droite : Histogrammes du nombre de neurones pour chaque groupe en fonction de la durée des déflexions positives (enhaut) et négatives (en bas).

Tableau 6. Durée (moyenne  $\pm$  S.E.M) des déflexions positives et négatives des PA des neurones enregistrés dans le LPGi.

|                              | Déflexion positive (ms) | Déflexion négative (ms) |
|------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <b>SP-On</b>                 | 0,36 $\pm$ 0,03         | 0,64 $\pm$ 0,06         |
| <b>SP-Off</b>                | 0,35 $\pm$ 0,07         | 0,66 $\pm$ 0,12         |
| <b>Autres type neuronaux</b> | 0,36 $\pm$ 0,03         | 0,67 $\pm$ 0,03         |

## F. Corrélation du taux de décharge

Le LPGi étant une structure connue pour son implication dans le système cardiovasculaire, nous avons comparé le taux de décharge, au cours des trois états de vigilance pour quelques neurones à profil de décharge SP-On avec la fréquence cardiaque de l'animal au cours de ces mêmes états de vigilance. Aucune corrélation ne semble exister entre le taux de décharge de ces neurones et la fréquence cardiaque (Figure 38).



**Figure 38. A/ Exemple de l'enregistrement d'un neurone SP-On et de l'ECG au sein du LPGi. B/ Superposition de la fréquence de décharge de ce même neurone SP-On et de l'ECG au cours du SP.**

## **II. EJECTION DE SUBSTANCES PHARMACOLOGIQUES**

### **A. Ejections contrôle de NaCl au sein du LPGi**

L'analyse a été effectuée sur une période de 1 heure après l'éjection. Les tableaux ci-dessous (Tableaux 7 et 8) exposent les résultats des injections contrôle de NaCl au sein du LPGi. Nous avons calculé la durée de l'ensemble des épisodes de chaque état (Eveil, SL et SP) et le pourcentage de chaque état dans l'heure analysée suivant l'éjection.

**Tableau 7. Durée et pourcentage des épisodes d'éveil, de SL et de SP après des injectons contrôle dans le LPGi.**

| <b>NaCl 1</b>            | <b>Durée (min)</b> | <b>pourcentage</b> |
|--------------------------|--------------------|--------------------|
| <b>Eveil</b>             | <b>37.9</b>        | <b>63.1</b>        |
|                          | <b>8.3</b>         | <b>55</b>          |
| <b>Sommeil lent</b>      | <b>20.3</b>        | <b>33.7</b>        |
|                          | <b>75.8</b>        | <b>35.3</b>        |
| <b>Sommeil paradoxal</b> | <b>1.9</b>         | <b>3.2</b>         |
|                          | <b>20.1</b>        | <b>9.3</b>         |

| <b>NaCl 2</b>            | <b>Durée (min)</b> | <b>pourcentage</b> |
|--------------------------|--------------------|--------------------|
| <b>Eveil</b>             | <b>42.1</b>        | <b>70</b>          |
|                          | <b>45.1</b>        | <b>75</b>          |
| <b>Sommeil lent</b>      | <b>17.4</b>        | <b>29</b>          |
|                          | <b>12.1</b>        | <b>20.1</b>        |
| <b>Sommeil paradoxal</b> | <b>0.6</b>         | <b>1</b>           |
|                          | <b>2.9</b>         | <b>4.9</b>         |

### **B. Ejections de muscimol et d'acide kainique dans le LPGi**

L'analyse a été effectuée sur une période de 1 heure après l'éjection. Les tableaux ci-dessous exposent les résultats des injections de muscimol et de kainate au sein du LPGi. L'éjection de muscimol a été effectuée avant l'éjection de kainate. Les résultats obtenus après l'éjection de muscimol doivent donc être comparés à ceux du NaCl 1 et ceux obtenus après l'éjection de kainate doivent être comparés à ceux du NaCl 2. Nous avons calculé la durée de

l'ensemble des épisodes de chaque état (Eveil, SL et SP) et le pourcentage de chaque état dans l'heure analysée suivant l'éjection.

**Tableau 8. Durée et pourcentage des épisodes d'éveil, de SL et de SP après des injections de muscimol et d'acide kainique dans le LPGi.**

| <b>Muscimol</b>          | <b>Durée (min)</b> | <b>pourcentage</b> |
|--------------------------|--------------------|--------------------|
| <b>Eveil</b>             | <b>45</b>          | <b>75.3</b>        |
|                          | <b>28.9</b>        | <b>48.3</b>        |
| <b>Sommeil lent</b>      | <b>14.3</b>        | <b>23.8</b>        |
|                          | <b>29.8</b>        | <b>49.8</b>        |
| <b>Sommeil paradoxal</b> | <b>0.5</b>         | <b>0.8</b>         |
|                          | <b>1.2</b>         | <b>1.9</b>         |

| <b>Kainate</b>           | <b>Durée (min)</b> | <b>pourcentage</b> |
|--------------------------|--------------------|--------------------|
| <b>Eveil</b>             | <b>42.8</b>        | <b>71.2</b>        |
|                          | <b>33.4</b>        | <b>55.6</b>        |
| <b>Sommeil lent</b>      | <b>14</b>          | <b>23.3</b>        |
|                          | <b>24.4</b>        | <b>40.6</b>        |
| <b>Sommeil paradoxal</b> | <b>3.3</b>         | <b>5.5</b>         |
|                          | <b>2.3</b>         | <b>3.7</b>         |

L'analyse a été effectuée sur deux injections contrôle et de muscimol sur le même rat, à la même heure mais à des jours différents (Figures 39 et 40). Nous pouvons constater qu'il existe une différence entre les deux jours d'injection pour les injections contrôles et de muscimol. La durée de SP ne semble pas être différente entre l'éjection témoin et l'éjection de muscimol (Durée de SP NaCl=1,9 min ; durée de SP muscimol = 0.5 min). Toutefois, si l'on se réfère à la seconde injection de NaCL (durée de SP=20,1 min), il semblerait que la durée de SP est diminuée par rapport à l'éjection contrôle. L'analyse de l'EMG redressée et du rapport delta/thêta ne semble pas montrer de différences entre les éjections de muscimol et contrôle. En revanche, aucune différence ne semble exister entre les injections kainate et leur contrôle (Figures 39 et 40).



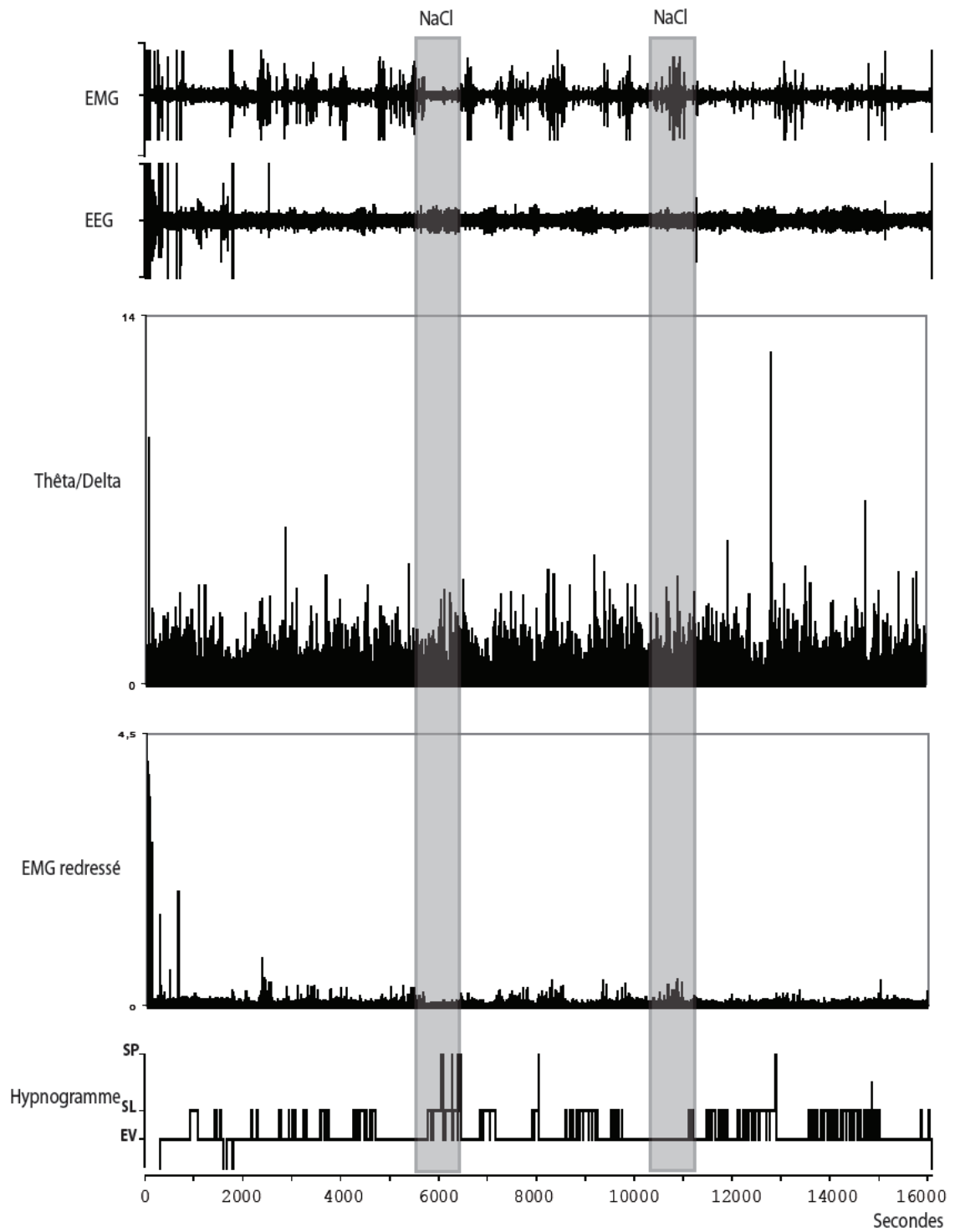


Figure 39. Tracés de l'EEG, de l'EMG, de l'EMG redressé, du rapport Delta/thêta et de l'hypnogramme suite à deux injections de NaCl.

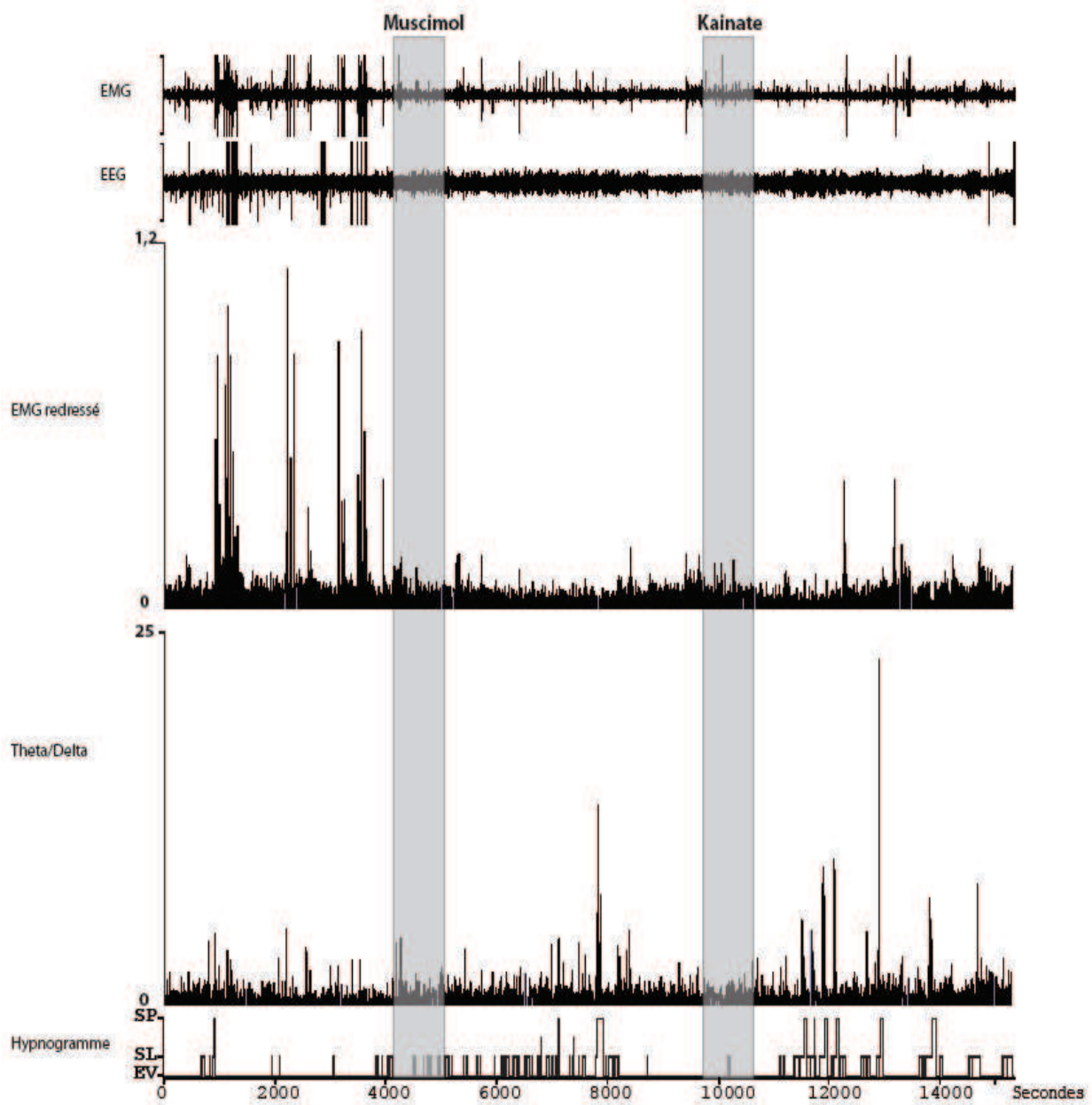


Figure 40. Tracés de l'EEG, de l'EMG, de l'EMG redressé, du rapport Delta/thêta et de l'hypnogramme suite à une injection de Muscimol et de Kainate au sein du LPGi.

### **III. DISCUSSION**

#### **A. Considérations techniques**

Le modèle du rat vigile en contention stéréotaxique nécessite plusieurs étapes telles que l'habituation et les différentes chirurgies (implantation et résection de la dure-mère). Au cours des séances d'habituation, il est important que le rat développe une certaine confiance en l'expérimentateur afin qu'il puisse effectuer une alternance quasi-normale d'éveil et de sommeil et surtout fournisse une quantité suffisante de SP. Ce dernier point est crucial afin d'optimiser les séances d'enregistrements extracellulaires unitaires. En effet, seuls les neurones enregistrés au cours des trois états de vigilance sont considérés. Ceci signifie qu'un grand nombre de neurones a en fait été enregistré au sein du LPGi mais que seul un nombre restreint de ces neurones a été retenu par la suite.

De plus, la localisation du LPGi est ventrale (proche du plancher du cerveau) et très caudale et donc située près de la moelle épinière. Ce point peut être problématique car chaque mouvement du rat, par exemple suite à un réveil, peut entraîner la perte du neurone en cours d'enregistrement.

Il est donc impossible de quantifier avec exactitude le nombre de neurones à profil de décharge SP-On ou SP-Off qui sont localisés dans le LPGi. Nous pouvons seulement indiquer qu'un grand nombre de neurones ont été enregistrés mais que seulement un total de 50 neurones sur 10 rats a réuni tous les critères utiles à leur prise en considération et leur analyse.

Le marquage Fos/NeuN s'avère donc utile afin d'apporter des précisions quant au nombre de neurones SP-On situés dans le LPGi.

#### **B. Fos/NeuN**

Le marquage NeuN au sein du LPGi a montré que cette région de la formation réticulée bulbaire contient un nombre important de neurones. Nos résultats montrent par ailleurs que 17% des neurones du LPGi expriment Fos pendant le rebond de SP qui suit une privation sélective de cet état. Sagar et al. (1988a) ont montré que l'expression du gène Fos traduit l'activation d'une cellule suite à un stimulus. Considérant que le rebond de SP soit le

stimulus en question, alors le LPGi contiendrait 15% de cellules activées au cours du SP, soit 15% de cellules SP-On.

### **C. Les neurones SP-On**

Les enregistrements chez le rat vigile en contention stéréotaxique ont montré l'existence de trois populations neuronales distinctes au sein du LPGi. Nos résultats ont confirmés l'hypothèse que le LPGi contenait des neurones à profil de décharge SP-On. Sakai (1988) a proposé une définition des neurones SP-On grâce aux enregistrements électrophysiologiques qu'il a effectué chez le chat. Les neurones SP-On doivent remplir plusieurs critères. En effet, ces neurones doivent montrer une augmentation significative du taux de décharge au cours du SP et anticiper les phases de SP. Ces deux conditions sont réunies concernant les neurones SP-on enregistrés au sein du LPGi. Cependant, Sakai (1988) propose aussi que les neurones de type SP-On, au sens strict du terme, doivent être totalement silencieux au cours de l'éveil calme et pendant les transitions du SP à l'éveil. Certains neurones SP-on enregistrés au sein du LPGi adoptent un taux de décharge proche de 0 au cours de l'éveil et du SL et pourraient donc appartenir à cette catégorie. Toutefois, la majorité des neurones que nous avons enregistrés font partie du groupe de neurone SP-On majoritairement rencontrés par Sakai (1988), à savoir des neurones dont le taux de décharge augmente progressivement de l'éveil au SL et du SL au SP. Le type de neurones SP-On que nous avons enregistré a également été retrouvé au sein du SLD (Boissard et al. 2002) et au sein du DPGi (Goutagny et al. 2008) chez le rat vigile en contention.

De plus, les neurones de type SP-On du LPGi anticipent le début des phases de SP suggérant qu'ils peuvent participer à la genèse et également au maintien de cet état.

Les neurones du LPGi déchargent de façon tonique au cours du SP avec, cependant, une superposition d'activités phasiques. Ce mode de décharge laisse penser que ces neurones pourraient être impliqués dans les évènements phasiques du SP.

Une question importante subsiste sur le rôle possible des neurones SP-On du LPGi. La stimulation ou l'inhibition du LPGi par éjection de substances pharmacologiques n'a pas permis d'apporter des éléments concluant à cette question. En effet, le nombre d'essais réalisés est trop faible. Il serait très intéressant de renouveler ce type d'expérience sur un plus grand nombre d'animaux et un plus grand nombre d'essais par animal. Outre le muscimol et le kainate, des données intéressantes seraient obtenues par l'éjection d'agonistes ou d'antagonistes de récepteurs des neurotransmetteurs libérés dans le LPGi.

La comparaison du taux de décharge de ces neurones SP-On du LPGi avec l'enregistrement de l'ECG montre qu'il n'y a pas de lien direct entre ces deux paramètres. En effet, l'activité cardiaque a été enregistrée car il est bien connu qu'une partie des neurones du LPGi participe à la régulation sympathique des fonctions cardiovasculaires (Dampney 1994b; Guyenet 2000). Toutefois, ce type de neurones est sympathoexcitateur et le neurotransmetteur mis en jeu serait le glutamate (Stornetta et al. 2002; Kapoor et al. 1992; Morrison et al. 1989). Or, les travaux de Stornetta et al. (2003) ont montré que les neurones impliqués dans le système nerveux sympathique, au sein du LPGi, ne sont ni de nature GABAergique ni de nature glycinergique. Plus récemment, les travaux de Sapin et al. (2009) ont montré que 70% des neurones activés Fos après un rebond de SP sont de nature GABAergique. Ceci suggère que les neurones SP-On enregistrés seraient de nature GABAergique et donc non sympathoexcitateurs.

D'autres travaux ont montré qu'une population importante de neurones glycinergiques existe dans le LPGi (Rampon et al. 1996b). De plus, les mêmes auteurs ont montré que les neurones glycinergiques du LPGi projettent aux noyaux monoaminergiques SP-Off du LC et du NRD, participant ainsi à leur inhibition (Rampon et al. 1999). Enfin, les travaux en cours au laboratoire tendent à montrer que certains des neurones du LPGi immunomarqués Fos après hypersomnie de SP seraient de nature glycinergique (Clément, communication personnelle). Il serait intéressant de déterminer si ce sont en partie ou totalement les mêmes neurones que les neurones GABAergiques car il est connu que les deux neurotransmetteurs peuvent être exprimés par les mêmes neurones dans le bulbe rachidien (Stornetta et al. 2004).

#### **D. Les neurones SP-Off**

Nos résultats montrent que le LPGi contient, en plus des neurones SP-On, des neurones à profil de décharge SP-Off. Nous pouvons émettre deux hypothèses quant à la nature du (des) neurotransmetteur(s) utilisé(s) par ces neurones SP-Off.

Dans la condition privation de SP, condition où nous supposons que les neurones SP-Off sont activés pour supprimer le SP, la moitié des neurones du LPGi qui exprime Fos sont de nature GABAergique (Sapin et al. 2009). Certains des neurones SP-Off que nous avons enregistrés dans ce travail pourraient donc être GABAergiques.

Les travaux de Léger et al. (2009) montrent que le groupe adrénergique/noradrénergique (C1/A1), localisé dans le LPGi, contient 23% de neurones doublement marqués Fos/TH par rapport au nombre total de Fos activés suite à une privation sélective de SP. Ces données suggèrent que la région A1/C1 joue un rôle dans l'inhibition du

SP pendant la privation de SP (Léger et al. 2009). En revanche, moins de 2% de neurones exprimant Fos après privation sont observés dans le LC. Ce dernier ne semble alors pas jouer un rôle dans l'inhibition du SP. En conséquence, parmi les neurones SP-Off que nous avons enregistrés dans le LPGi, certains pourraient appartenir au groupe adrénérgique C1 et de jouer un rôle différent de celui déjà connu pour le LC.

#### **E. Autres types neuronaux**

D'autres types neuronaux indifférents au cycle veille sommeil ont été enregistrés au sein du LPGi. Ceci suggère que cette région est hétérogène en termes de fonction. Cette hypothèse est étayée par nos résultats obtenus par le double marquage Fos/NeuN. En effet 15% de neurones du LPGi seraient de nature SP-On et donc 85% de ces neurones auraient une autre fonction.

#### **F. Hypothèse quant au réseau responsable de la genèse et du maintien du SP**

La présence de neurones de deux types opposés, SP-On et SP-Off, au sein du LPGi laisse penser que ces deux types neuronaux joueraient un rôle complémentaire dans le réseau qui sous-tend le SP. En effet, il est tentant de penser que les neurones SP-On, de type GABAérgique (Sapin et al. 2009) inhiberaient les neurones SP-Off locaux au moment de la survenue du SP. Au contraire, les neurones SP-Off, qu'ils soient adrénérgiques ou GABAérgiques, pourraient inhiber de façon réciproque ces mêmes neurones SP-On au cours de l'éveil. Dans le cas de neurones adrénérgiques, il serait nécessaire que les neurones SP-On possèdent des récepteurs adrénérgiques de type alpha-2. En effet, ces adrénorécepteurs entraînent une inhibition postsynaptique (Langer et al. 1985).

***CHAPITRE 2***  
***Etude neuroanatomique du LPGi***

## **I. AFFERENCES DU LPGi**

Les sites de CTb (n=12) sont tous correctement situés aux coordonnées stéréotaxiques du LPGi (Figures 42A et 43A). Nous avons compté les neurones simplement immunomarqués avec la CTb et les neurones doublement marqués Fos/CTb sur 4 animaux en condition contrôle (PSC), 4 animaux privés de SP (PSD) et 4 animaux rebond de SP (PSR) dans 32 régions du cerveau. L'ensemble des résultats est représenté dans le Tableau 9 par région en fonction de leur localisation ipsi/contralatérale par rapport au site d'injection, sauf pour les noyaux médians notés en une fois seulement. Les régions contenant le plus grand nombre de neurones rétrogradement marqués CTb sont le LPGi (117 neurones) (Figure 41A, B et C), le DpMe (105 neurones) (Figure 41E et F), la LPAG (93 neurones) (Figure 41E et F), le Gi (79 neurones) (Figure 41A, B et C), la vLPAG (70 neurones) (Figure 41E) et le NTS (70 neurones) (Figure 41A, B et C).

Cinq régions présentent un nombre de neurones doublement marqués Fos/CTb significativement plus important en condition PSR qu'en condition PSC : le GiA ( $p<0.001$ ) (Figure 41C), le RMg ( $p<0.001$ ) (Figure 41C), le DpMe ( $p<0.05$ ) (Figures 41E et F), la DMPAG ( $p<0.001$ ) (Figures 41E et F) et la LH ( $p<0.001$ ) (Figures 41G, 42D). Le nombre de neurones Fos/CTb comptabilisés au sein de la LH n'est pas significativement différent entre la condition PSR et PSD. Toutefois, nous pouvons noter que ce nombre est presque deux fois plus important en PSR qu'en PSD.

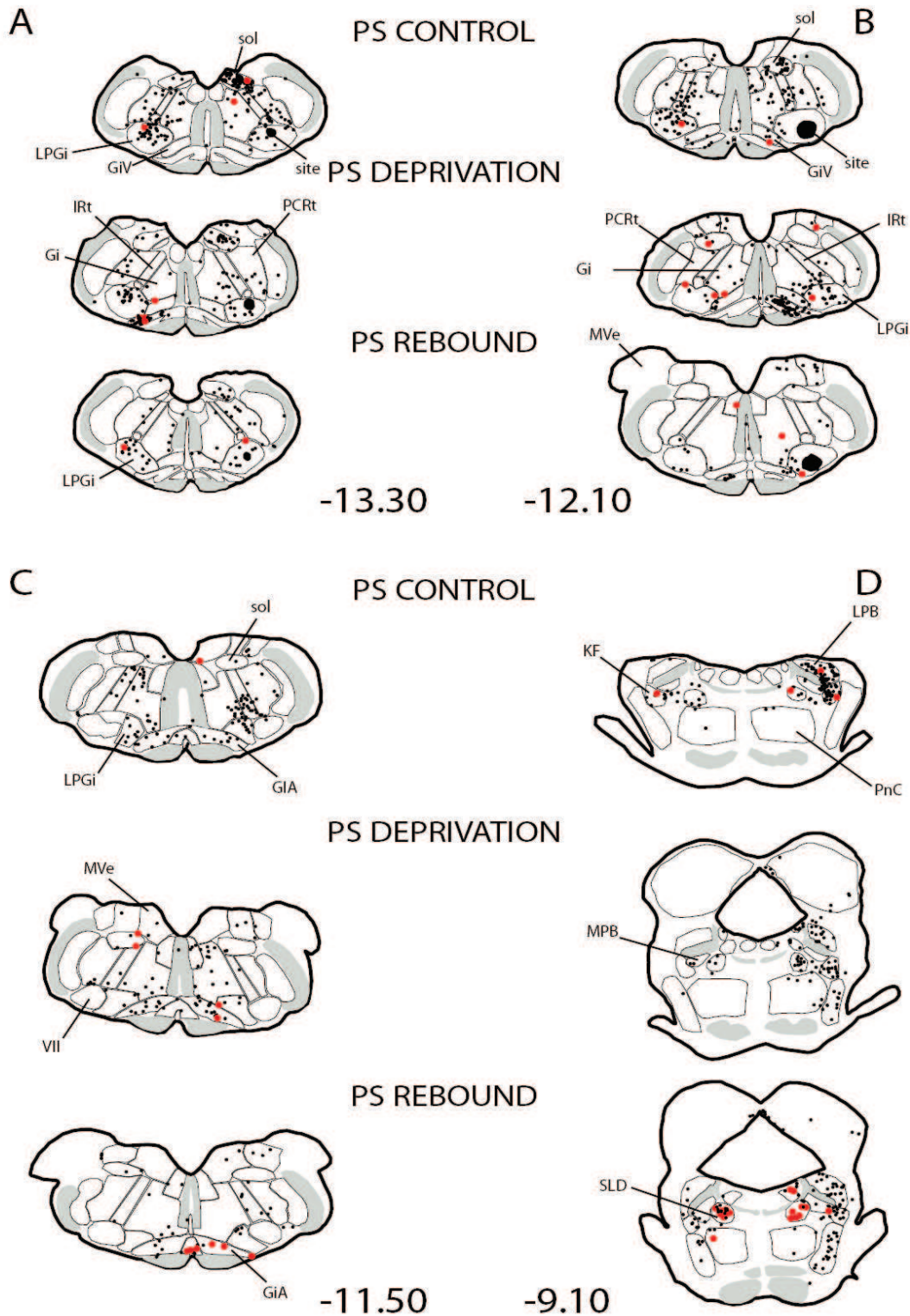
Deux régions possèdent un nombre de neurones Fos/CTb significativement plus élevé en condition PSD qu'en condition PSC : la LPAG ( $p<0.001$ ) (Figure 41E et F) et la vLPAG ( $p<0.001$ ) (Figures 41E et 43C). De plus, le nombre de neurones Fos/CTb est significativement plus important en condition PSR qu'en condition PSD dans quatre régions : le SLD ( $p<0.001$ ) (Figures 41D et 42B), le DpMe ( $p<0.001$ ) (Figures 41E et F), la DMPAG ( $p<0.05$ ) (Figures 41E et F) et la LPAG ( $p<0.05$ ) (Figures 41E et F). Le SLD possède le nombre le plus élevé de neurones Fos/CTb parmi les régions contenant des neurones Fos/CTb. De plus, 48.2% (pour le coté ipsilatéral) et 38.8% (pour le coté contralatéral) des neurones immunomarqués CTb sont doublement marqués Fos en condition PSR dans ce noyau.



**Tableau 9. Nombre (moyenne  $\pm$ S.E.M) de neurones immunomarqués CTb et Fos/CTb après injection de CTb dans le LPGi dans trois conditions expérimentales (PSC, PSD et PSR n=12). Le comptage a été effectué sur 27 plans espacés de 600 $\mu$ m. Abréviations: contra : partie contralatérale ; ipsi : partie ipsilatérale.**

**antPAG : substance grise périaqueducule antérieure, CeM : amygdale centrale, DA : aire hypothalamique dorsale, DLPAG : substance grise périaqueducule dorso-latérale, DM : aire hypothalamique médiane, DMPAG : substance grise périaqueducule médiane, DPGi : noyau paragigantocellulaire dorsal, DpMe : noyau profond du mésencéphale, Gi : noyau gigantocellulaire, GiA ; noyau gigantocellulaire alpha, GiV : noyau gigantocellulaire ventral, Irt : noyau réticulé intermédiaire, KF : Kolliker-Füse, LH : hypothalamus latéral, LPB : noyau parabrachial latéral, LPAG : substance grise périaqueducule latérale, LPGi : noyau paragigantocellulaire latéral, MPB : noyau parabrachial médian, Pa : noyau paraventriculaire de l'hypothalamus ; PCRt : noyau parvocellulaire, PeF : aire périfornicale, PH : hypothalamus postérieur, PnC : noyau pontique caudal, PnO : noyau pontique oral, PnV : noyau pontique ventral, RMg : raphé magnus, Rob : raphé obscurus, Rpa : raphé pallidus, SLD : noyau sublatérodorsal, sol ; noyau du faisceau solitaire, vIPAG : substance grise périaqueducule ventro-latérale, ZI : zona incerta ;. \* p<0.05 , \*\*\* p<0.001 entre PSR et PSC ou PSD et PSC, # p<0.05, ### p<0.001 entre PSR et PSD.**

|                        |        | No of sections | CTb contra | CTb ipsi    | PSC            |              | PSD            |              | PSR            |                |
|------------------------|--------|----------------|------------|-------------|----------------|--------------|----------------|--------------|----------------|----------------|
|                        |        |                |            |             | Fos/CTb contra | Fos/CTb ipsi | Fos/CTb contra | Fos/CTb ipsi | Fos/CTb contra | Fos/CTb ipsi   |
| Medulla oblongata      | LPGi   | 5              | 69,5±14,20 | 48,42±4,50  | 1±0,41         | 0,25±0,25    | 2,25±0,85      | 3±0,57       | 3,5±2,25       | 2±1,41         |
|                        | DPGi   | 3              | 6,75±1,69  | 2,83±0,47   | 0              | 0            | 0,25±0,25      | 0,25±0,25    | 1,75±1,03      | 0,75±0,48      |
|                        | Gi     | 6              | 34,67±7,22 | 44,17±9,17  | 0,25±0,25      | 0,25±0,25    | 0,5±0,29       | 1,75±0,75    | 1±0,57         | 2,25±1,31      |
|                        | Irt    | 6              | 20,92±4,19 | 23,67±4,97  | 0              | 0            | 0,5±0,29       | 0,25±0,25    | 0,5±0,50       | 0,75±0,48      |
|                        | PCRt   | 6              | 23,58±5,39 | 37,58±9,57  | 0,75±0,48      | 0,25±0,25    | 0,5±0,29       | 1±0,57       | 0              | 1±0,70         |
|                        | GiV    | 3              | 9,92±2,51  | 8,92±0,92   | 0              | 0,25±0,25    | 0,75±0,48      | 0            | 1±1,00         | 0,75±0,48      |
|                        | GiA    | 3              | 13,08±2,11 | 26,58±5,85  | 0              | 0            | 0,25±0,25      | 4,5±2,84     | 2,25±0,94      | 4,5±2,10***    |
|                        | Sol    | 4              | 11±0,69    | 59,09±15,09 | 0              | 0,25±0,25    | 0,25±0,25      | 1,75±1,03    | 0,5±0,29       | 1,5±1,50       |
|                        | Rob    | 4              | 9,42±1,49  |             | 0              |              | 0              |              | 1±0,70         |                |
|                        | Rpa    | 5              | 5,33±0,61  |             | 0              |              | 0,25±0,25      |              | 0,25±0,25      |                |
|                        | RMg    | 4              | 13±2,56    |             | 0              |              | 1,5±0,64       |              | 2,25±0,48***   |                |
| Pons                   | KF     | 1              | 2,58±0,07  | 13,42±2,34  | 0,5±0,29       | 0,5±0,29     | 0              | 0,25±0,25    | 0,25±0,25      | 0,25±0,25      |
|                        | LPB    | 2              | 4,42±0,26  | 32,5±8,43   | 0              | 1,5±0,95     | 0,25±0,25      | 0,75±0,48    | 0,25±0,25      | 0,75±0,48      |
|                        | MPB    | 2              | 3,25±0,69  | 10,83±1,87  | 0              | 0            | 0              | 1,25±0,94    | 0              | 0,5±0,29       |
|                        | PnV    | 1              | 1,92±0,26  | 4,17±1,42   | 0              | 0            | 0              | 0            | 0              | 0,5±0,29       |
|                        | PnC    | 2              | 12±1,73    | 14,17±2,88  | 0,25±0,25      | 0            | 1,25±0,48      | 0            | 0,75±0,25      | 0,25±0,25      |
|                        | PnO    | 3              | 9,42±1,46  | 14±3,46     | 0,25±0,25      | 0            | 1±0,70         | 0,75±0,75    | 0,25±0,25      | 1,25±0,63      |
|                        | SLD    | 2              | 8,5±1,65   | 12,33±0,95  | 0,25±0,25      | 1,75±1,18    | 0,25±0,25      | 0            | 4,75±2,49      | 6,75±2,25***   |
| Mesencephalon          | DpMe   | 5              | 42,62±6,64 | 62,58±8,07  | 0,25±0,25      | 0,5±0,29     | 0              | 0            | 2,75±1,37      | 4,5±1,32*.,*** |
|                        | DMPAG  | 6              | 27,58±4,82 |             | 0,25±0,25      |              | 0,5±0,50       |              | 3,25±0,63***.# |                |
|                        | DLPAG  | 6              | 5,83±0,97  | 13,75±3,15  | 0              | 0            | 0,5±0,29       | 0,25±0,25    | 0,5±0,50       | 1,5±0,64       |
|                        | LPAG   | 6              | 26,33±4,40 | 67±14,57    | 0,5±0,29       | 0,25±0,25    | 0,5±0,50       | 3±0,70***    | 2±0,41         | 4,5±1,44#      |
|                        | vIPAG  | 3              | 17,75±5,41 | 53,83±13,23 | 0,25±0,25      | 0,5±0,29     | 1,25±0,94      | 2,5±0,29***  | 2,75±0,63      | 4,25±2,62      |
| Posterior hypothalamus | antPAG | 2              | 6,33±1,33  | 9,42±1,22   | 0              | 0,25±0,25    | 0              | 0,75±0,48    | 0              | 1±0,00         |
|                        | PH     | 3              | 4,25±0,50  | 7,58±0,07   | 0              | 0,25±0,25    | 0              | 0            | 0              | 0              |
|                        | DA     | 2              | 4,25±0,50  | 9,17±1,89   | 0              | 0,25±0,25    | 0              | 0,5±0,29     | 0,5±0,29       | 1±0,41         |
|                        | DM     | 2              | 2,33±0,52  | 3,42±1,65   | 0              | 0            | 0,25±0,25      | 0,25±0,25    | 0              | 0,5±0,29       |
|                        | LH     | 6              | 16,33±4,99 | 52,17±13,80 | 0              | 1±0,57       | 1,5±1,19       | 3,5±1,32     | 1±0,41         | 6,25±1,37***   |
|                        | Pa     | 1              | 6,17±1,13  | 34,33±6,24  | 0              | 0,5±0,29     | 0,75±0,75      | 3,5±2,02     | 0,25±0,25      | 0,75±0,48      |
|                        | PeF    | 1              | 1,67±0,38  | 3,92±1,28   | 0              | 0            | 0,75±0,48      | 0,5±0,29     | 0,5±0,50       | 1,25±0,48      |
| ZI                     | 5      | 4,50±0,33      | 15,75±3,75 | 0           | 0,25±0,25      | 0            | 0,25±0,25      | 0            | 1,5±0,95       |                |
| Amygdala               | CeM    | 2              | 0,92±0,50  | 38,25±6,71  | 0              | 0            | 0              | 0,25±0,25    | 0              | 0,75±0,48      |

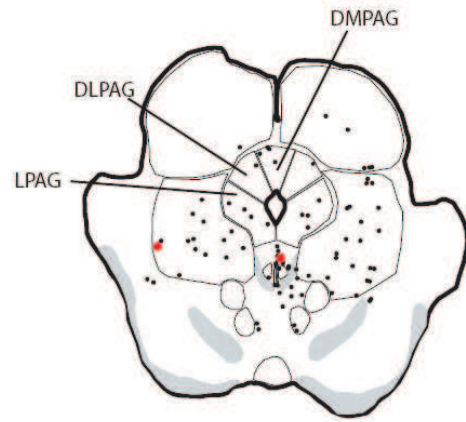
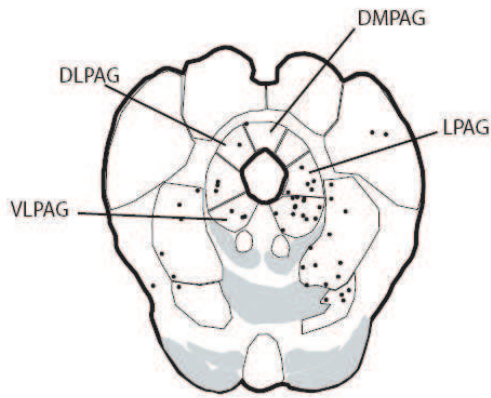


**Figure 41. A-J.** Cartographie des distributions de l'immunomarquage des neurones CTb (points noirs) et des neurones Fos/CTb (points rouges) contralatérales (partie gauche des coupes) et ipsilatérales (partie droite des coupes) au site de CTb dans le LPGi. Les représentations sont effectuées sur 10 niveaux représentatifs des distributions pour des rats contrôle (en haut), privé (au milieu), rebond (en bas). A-C : Coupes au niveau du bulbe rachidien caudal et rostral (AP-13.30 mm, -12.10 mm et -11.50 mm). D: Coupes au niveau pontique (AP-9.10 mm).

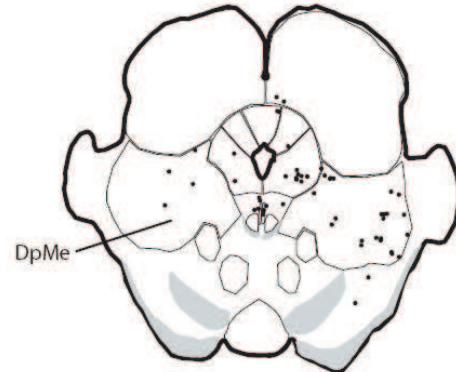
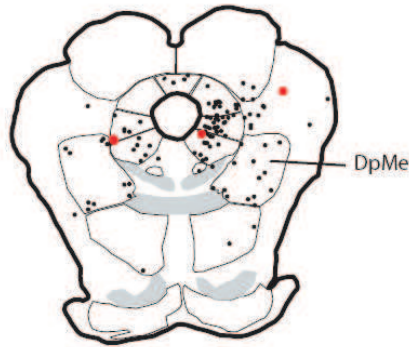
E

F

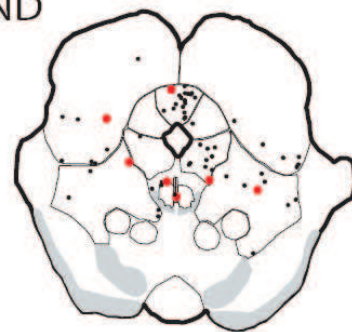
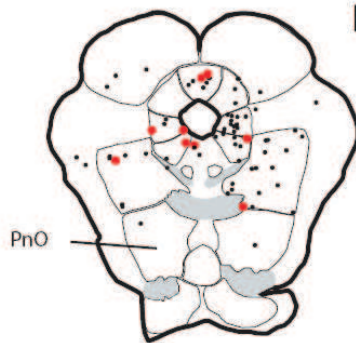
PS CONTROL



PS DEPRIVATION



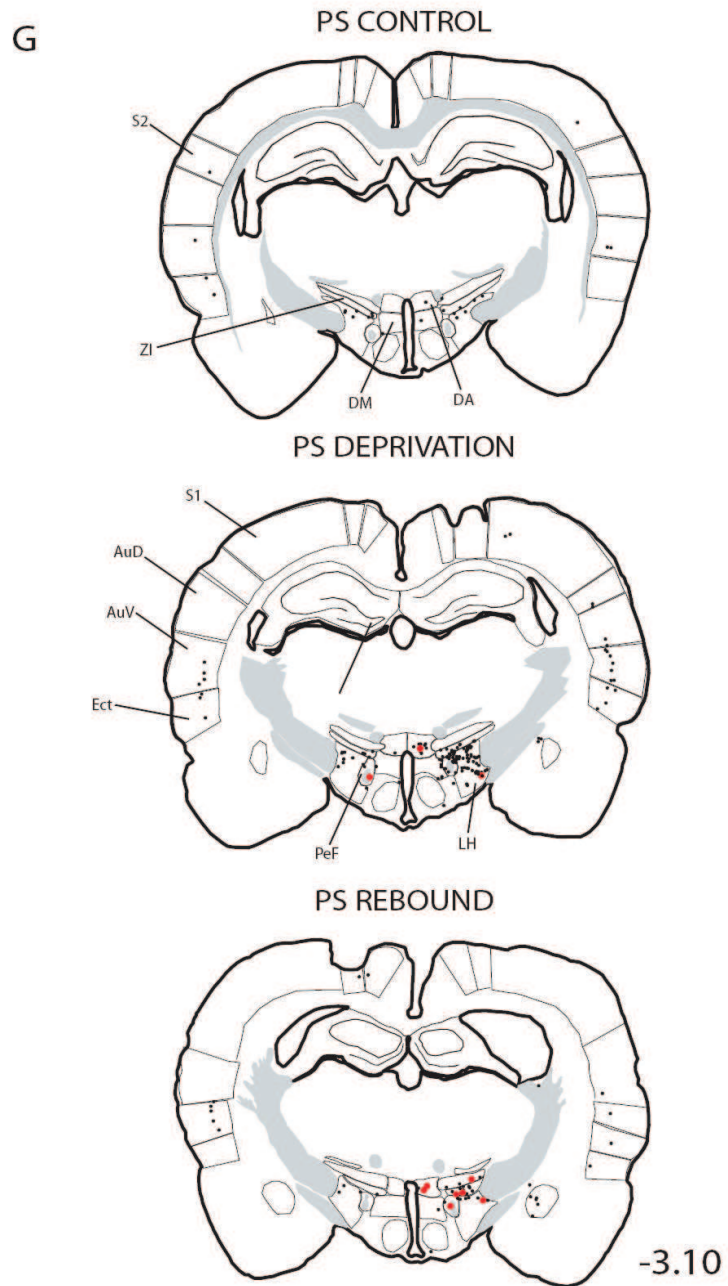
PS REBOUND



-7.30

-6.10

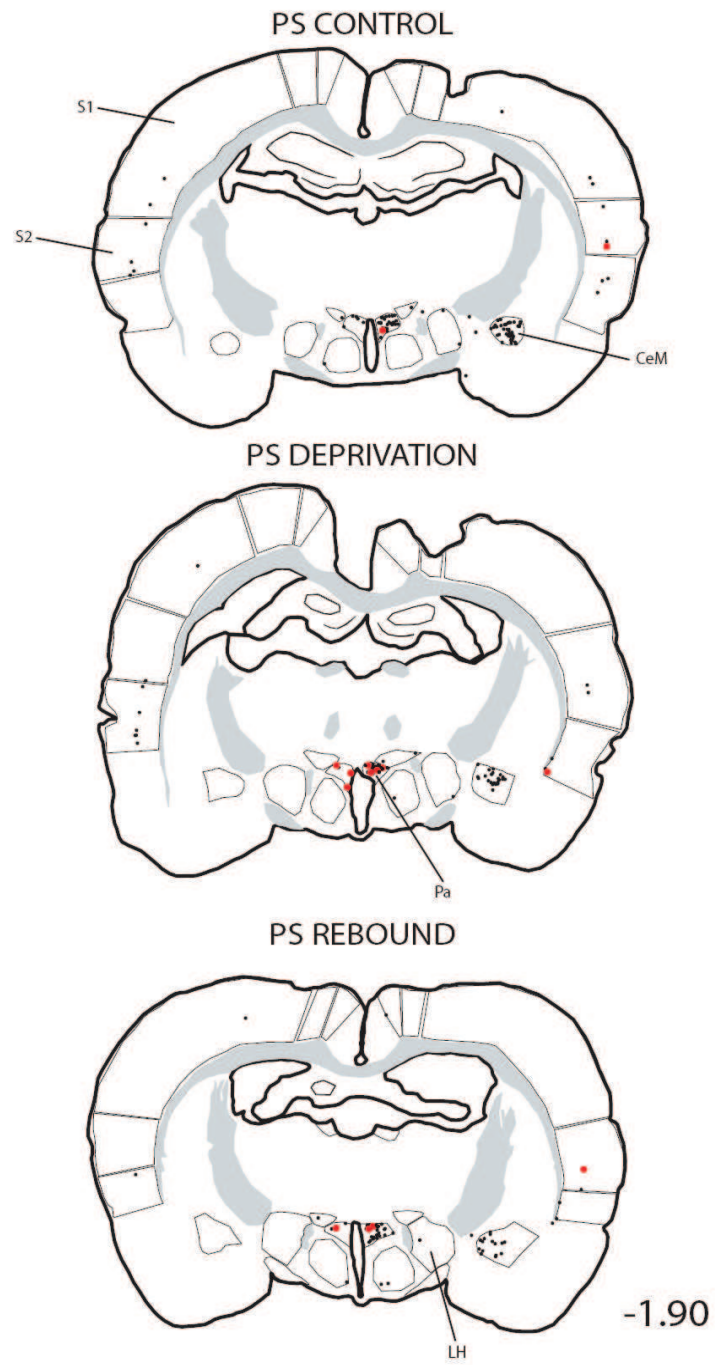
E-F : Coupes au niveau de la substance grise périaqueducale (AP -7.30, -6.10 mm).



**G : Coupes au niveau hypothalamique (AP -3.10 mm).**

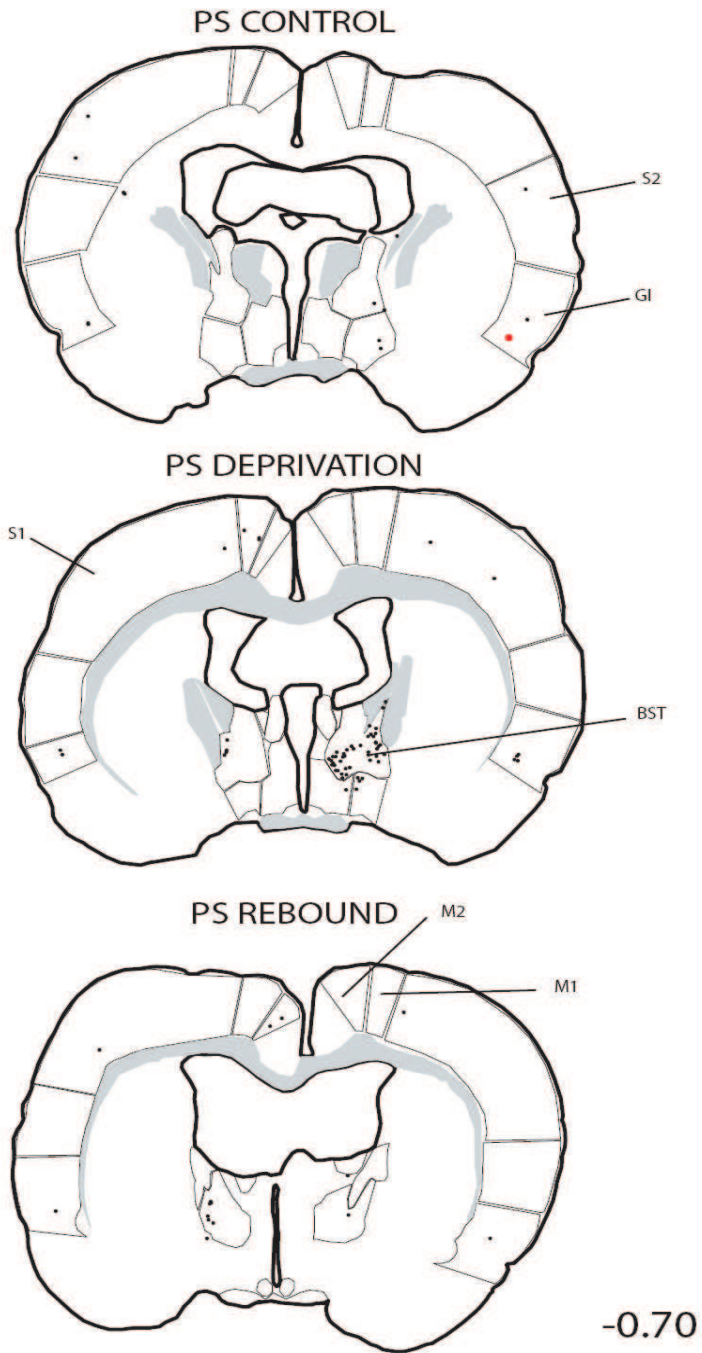


H



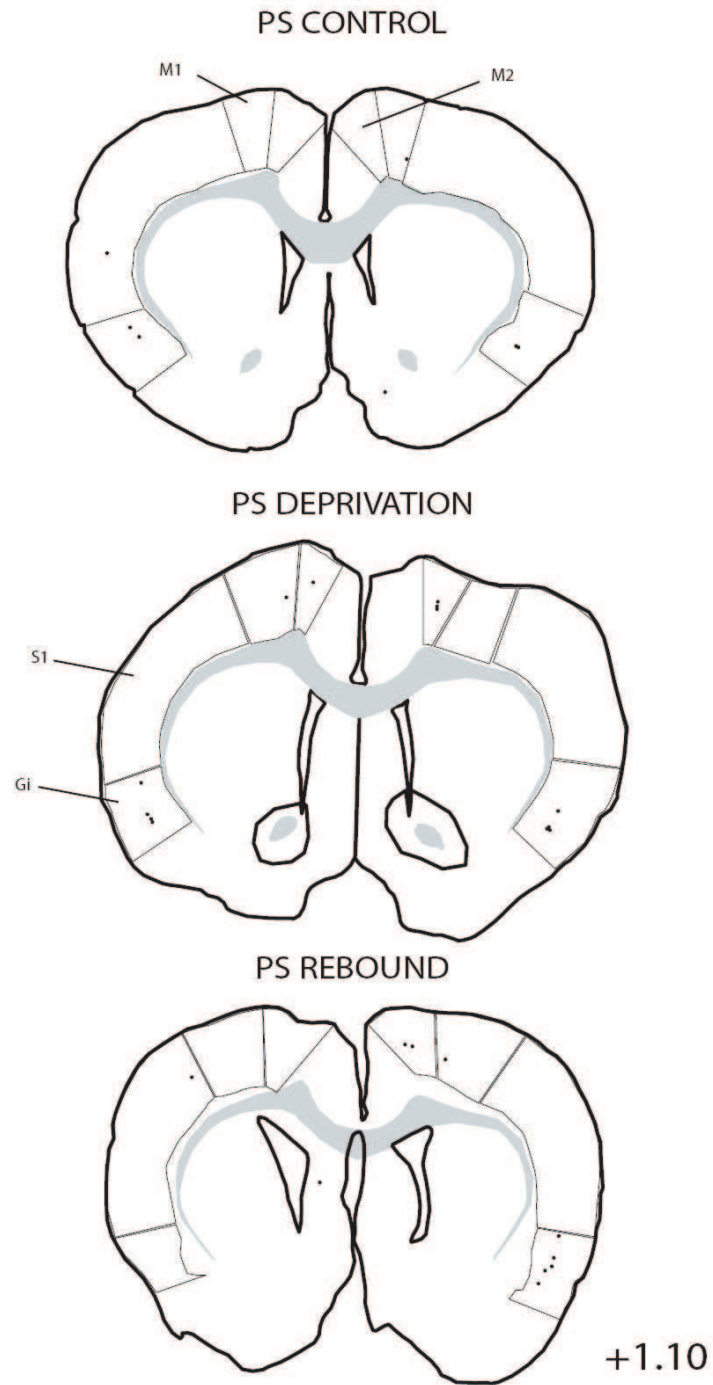
H : Coupes au niveau hypothalamique antérieur (AP -1.90 mm).

I



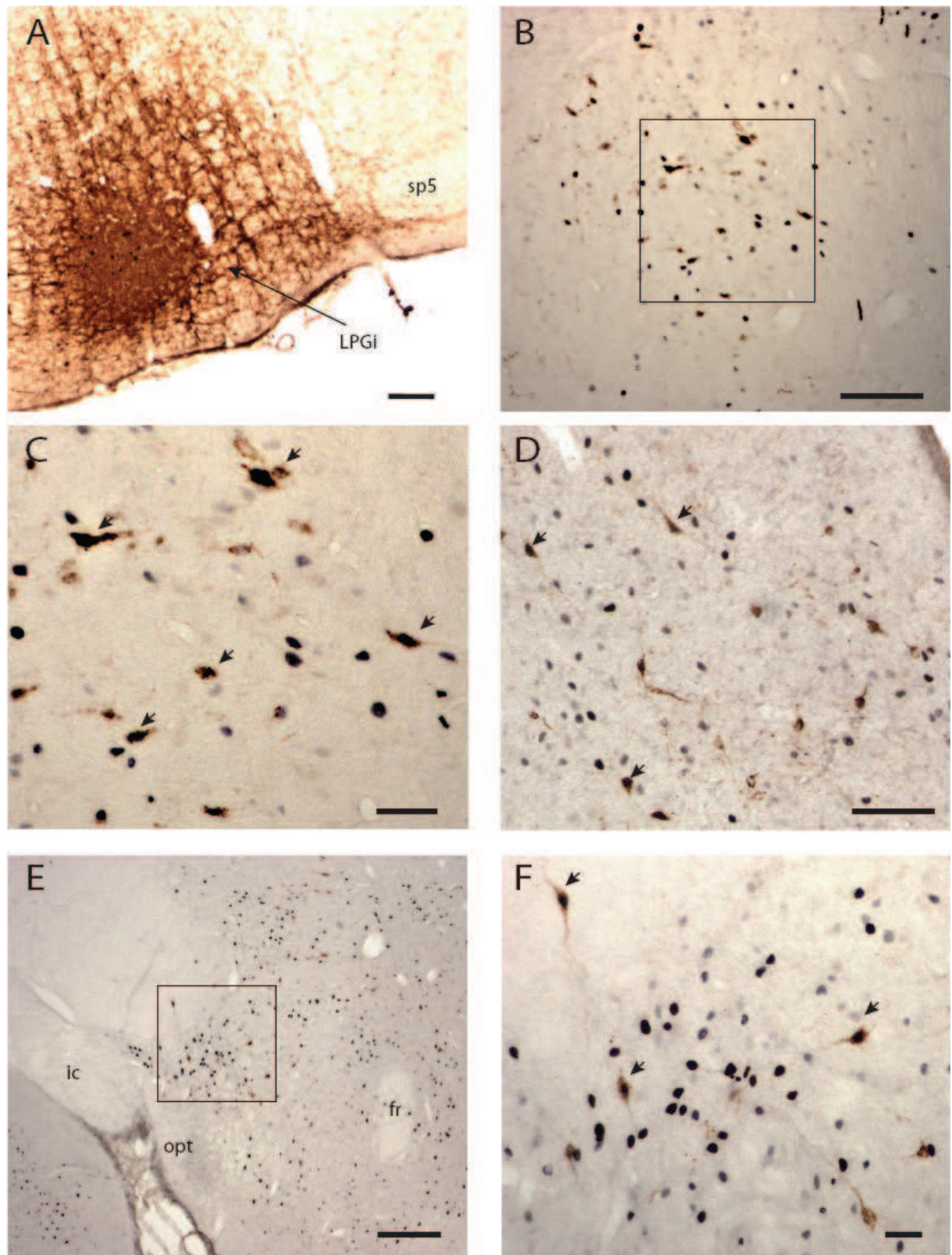
I : Coupes au niveau de l'aire préoptique (AP -0.70 mm).

J

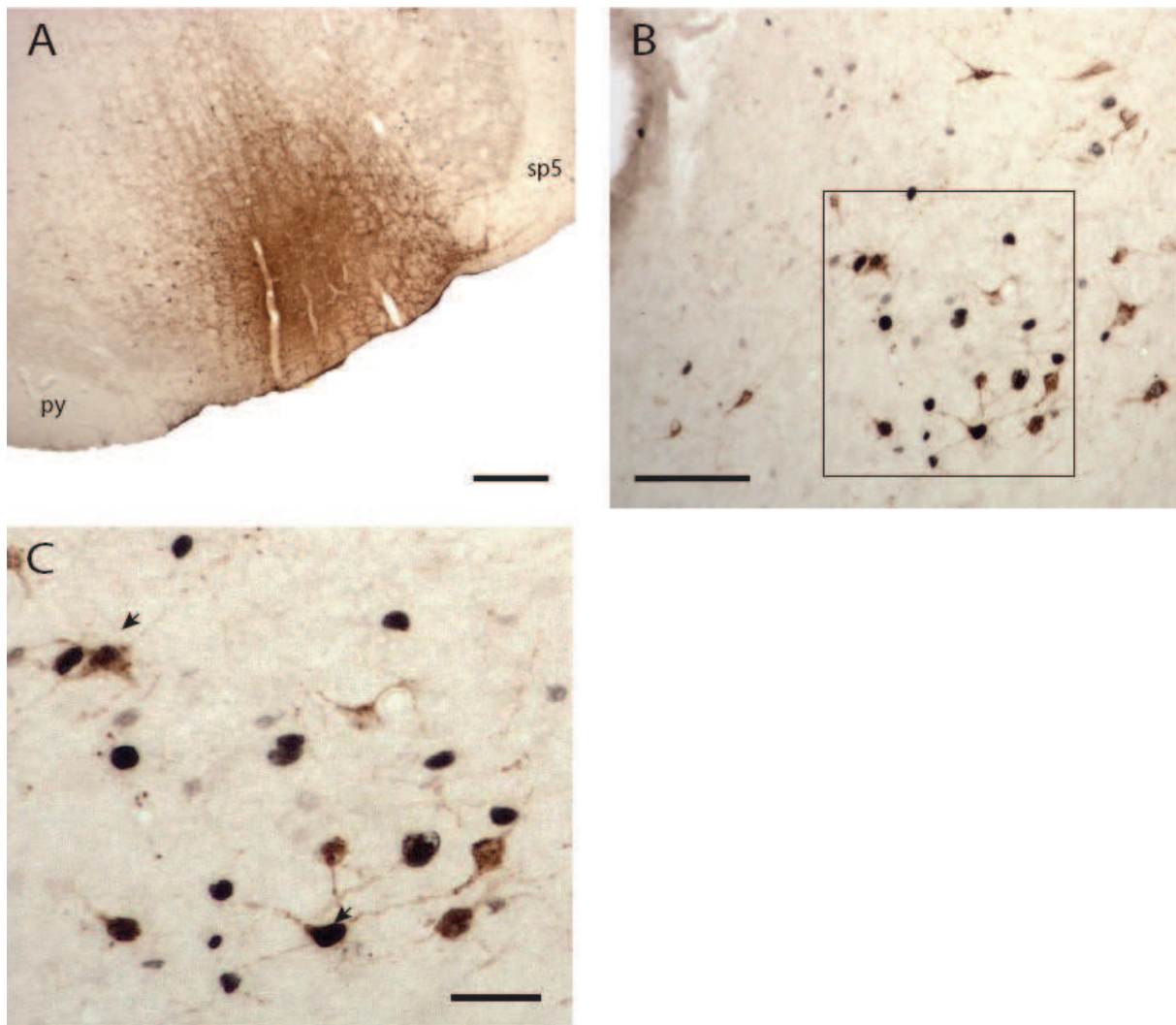


J. Coupes au niveau du cortex frontal (AP +1.10 mm)





**Figure 42. A-E.** Illustration des résultats de l'immunohistochimie de Fos/CTb réalisée sur des rats présentant une hypersomnie de SP consécutive à une privation sélective de SP par la méthode de la piscine. Les flèches montrent les neurones doublement marqués. A/ Site d'injection de CTb (marron) dans le LPGi doublement marqué Fos (noir). B/ Double marquage Fos /CTb dans le SLD. C/ Agrandissement de l'encart Fig.42B, D/ Double marquage Fos/CTb dans la vPAG. E/ Double marquage Fos (noir)/CTb (marron) dans la LH. F/ Agrandissement de l'encart Fig.42E, Echelle : A 250µm, B, D 150 µm, E 300µm, C,F 100µm.

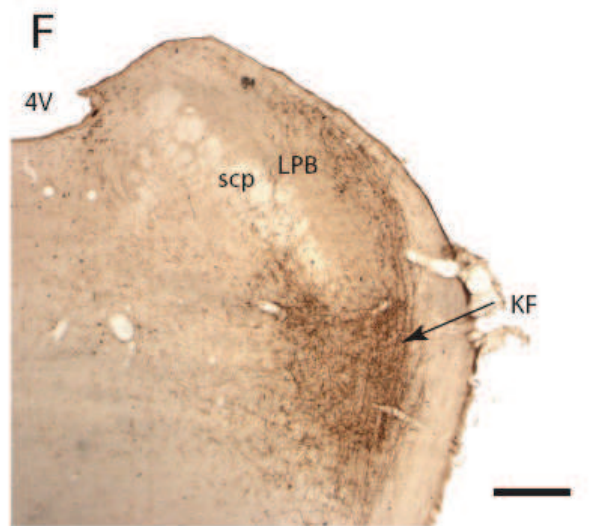
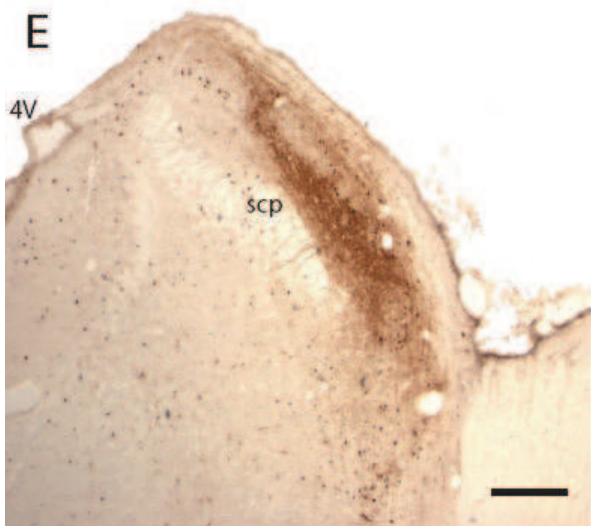
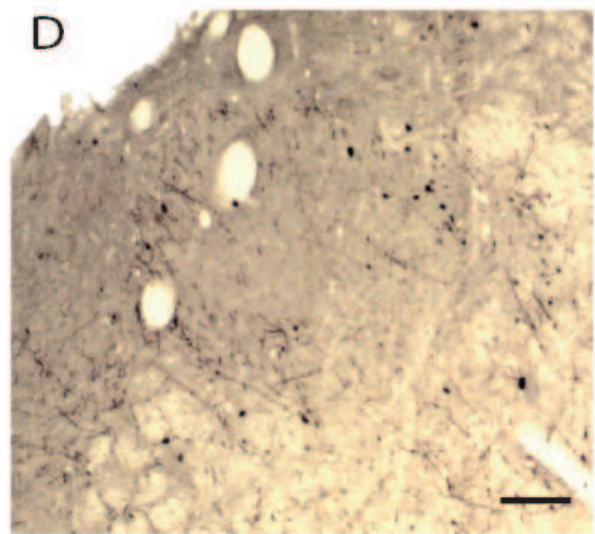
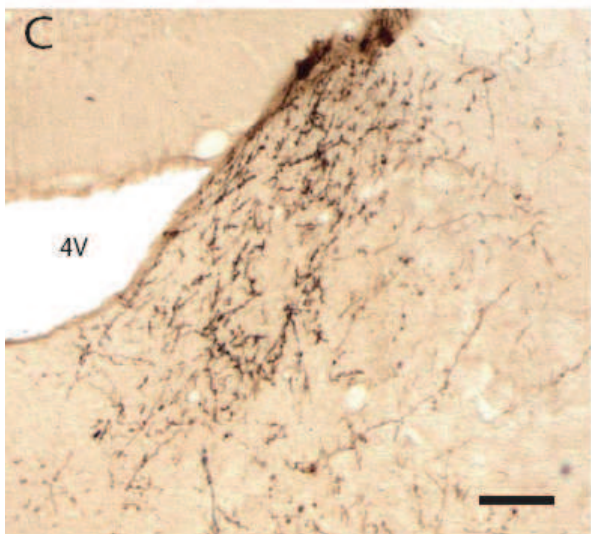
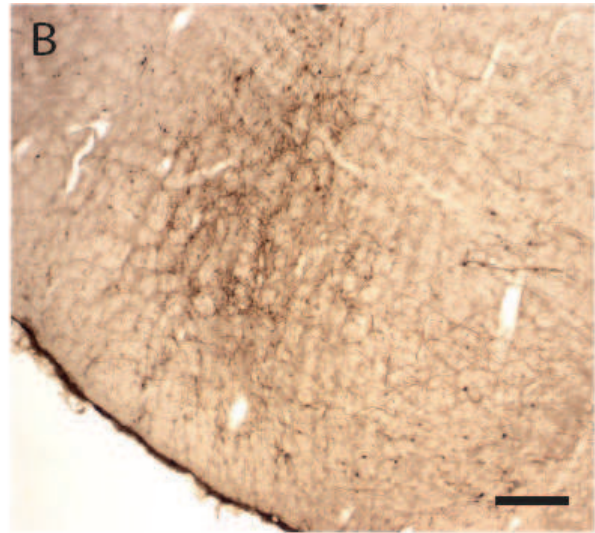
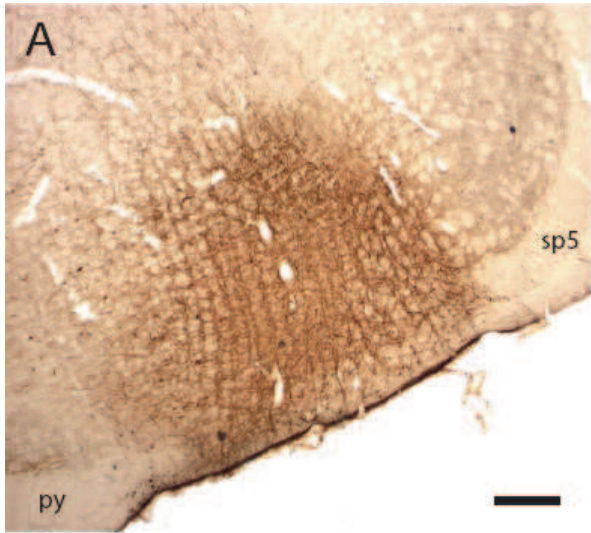


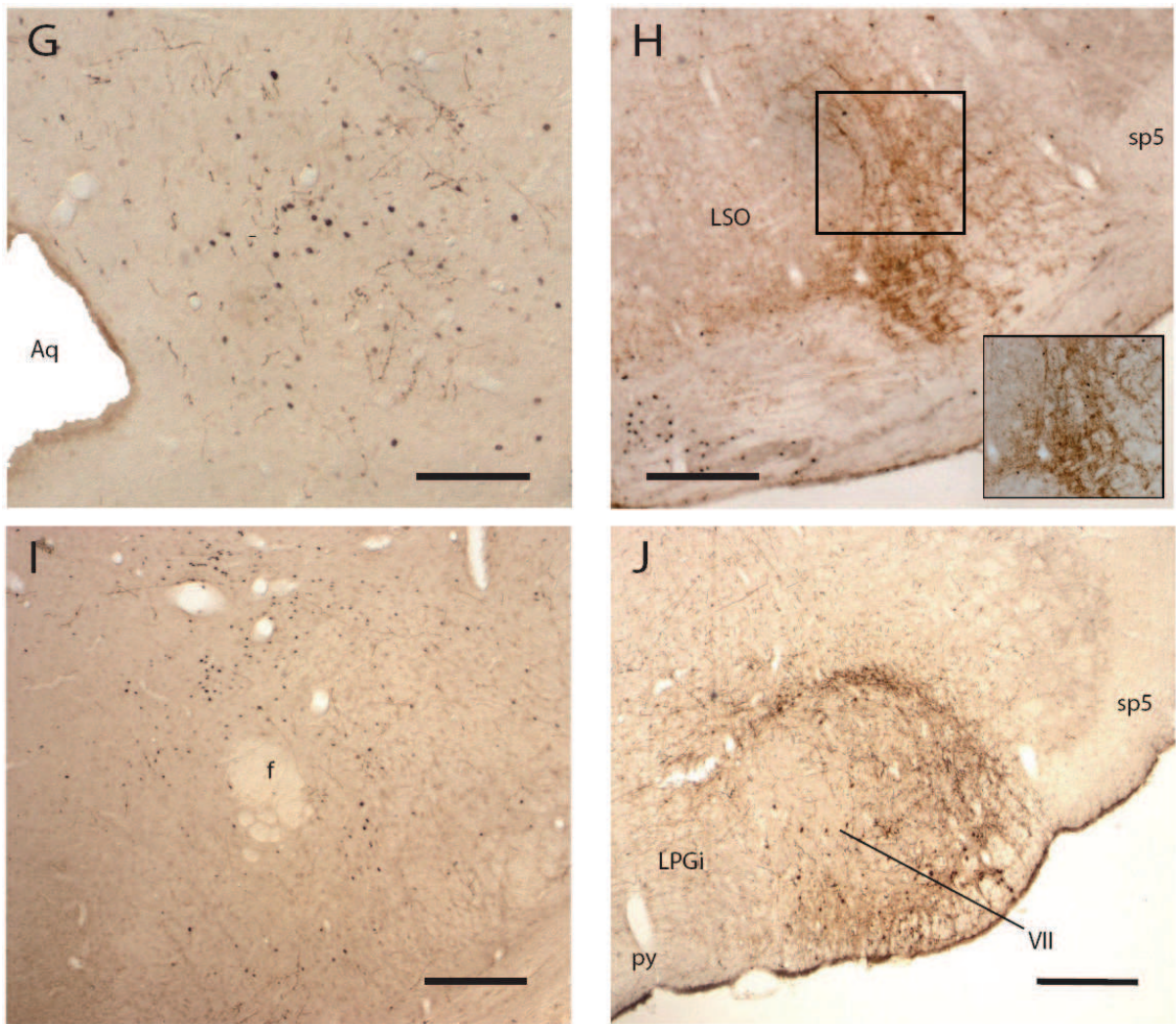
**Figure 43. Illustration des résultats de l'immunohistochimie de Fos/CTb réalisée sur des rats privés de SP par la méthode de la piscine. Les flèches montrent les neurones doublement marqués. A/ Site d'injection de CTb (marron) dans le LPGi doublement marqué Fos (noir). B/ Double marquage Fos/CTb dans la vIPAG. C/ Agrandissement de l'insert Fig. 43B Echelle : A 250µm, B 150µm, C 100µm.**

## **II. EFFERENCES DU LPGi**

Les sites d'éjection de la PHA-L sont tous situés dans le LPGi (Figure 44A). Le traçage antérograde par la PHA-L ou par la CTb montre que le LPGi projette de façon importante vers la partie contralatérale du LPGi (Figure 44B), vers le NTS (Figure 44D), la partie latérale du noyau moteur VII (Figure 44J), le LC (Figure 44C), le PBL (Figure 44E) et le KF (Figure 44F) et la région A5 (figure 44H). Des projections moins importantes ont été notées dans la vIPAG (Figure 44G) et l'aire périfornicale (Figure 44I). Dans tous les noyaux, les axones sont plus nombreux du côté ipsilatéral que du côté contralatéral.







**Figure 44.** Illustration des résultats du marquage antérograde obtenue avec la PHA-L ou la CTb. A/ Site d'injection de la PHA-L dans le LPGi. B/ Fibres immunomarquées par la PHA-L dans le LPGi contralatéral. C/ Fibres immunomarquées par la PHA-L dans le LC. D/ Fibres immunomarquées par la PHA-L dans le NTS. E/ Fibres immunomarquées par la CTb dans le PBL. F/ Fibres immunomarquées par la CTb dans le KF. G/ Fibres immunomarquées par la CTb dans la viPAG. H/ Fibres immunomarquées par la CTb dans la région A5. En insert, agrandissement de la région encadrée I/ Fibres immunomarquées par la CTb dans l'hypothalamus. J/ Fibres immunomarquées par la CTb dans le noyau facial. Echelle : A, H 400  $\mu$ m, B, C, D, E, F, G 250  $\mu$ m, I 300  $\mu$ m, J 500  $\mu$ m.

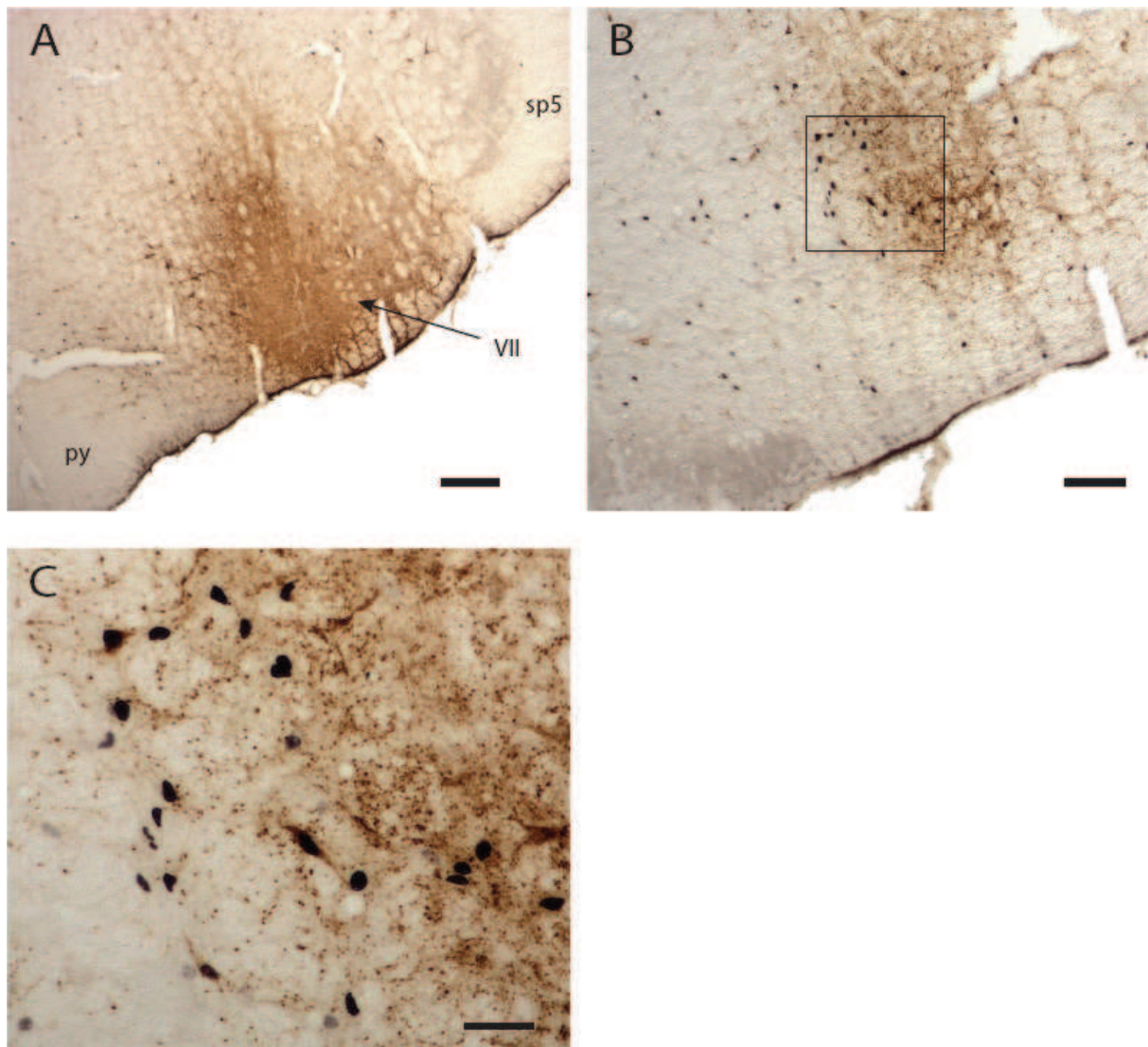


### III. AFFERENCES DU NOYAU MOTEUR FACIAL VII

Le nombre de neurones immunomarqués CTb et Fos/CTb suite à l'injection de CTb dans le noyau VII (Figure 45A) a été comptabilisé sur cinq coupes au niveau bulbaire sur trois rats ayant effectué un rebond de SP après privation. Le nombre le plus important de neurones rétrogradement marqués CTb se situe dans le noyau réticulé intermédiaire (195.3 neurones CTb) (Tableau 10). Le nombre le plus important de neurones doublement marqués Fos/CTb se situe dans le LPGi (10.7 neurones Fos/CTb). Ce nombre représente 28.32% de l'ensemble des neurones doublement marqués Fos/CTb comptabilisés dans le bulbe rachidien (Tableau 10, Figure 45B).

**Tableau 10. Nombre (moyenne  $\pm$ S.E.M) de neurones immunomarqués CTb et Fos/CTb après injection de CTb dans le VII chez des rats ayant effectué un rebond de SP (n=3). Le comptage a été effectué sur 5 plans espacés de 600  $\mu$ m. Abréviations : GiA : noyau gigantocellulaire alpha, Gi : noyau gigantocellulaire, GiV : noyau gigantocellulaire ventral, Irt : noyau réticulé intermédiaire, LPGi : noyau paragigantocellulaire ventral, PCRt : noyau parvocellulaire, RMg : Raphé Magnus.**

|      | No of sections | Fos/CTb contra  | Fos/CTb ipsi    | CTb contra       | CTb ipsi          | %Fos-CTb/total double |
|------|----------------|-----------------|-----------------|------------------|-------------------|-----------------------|
| GiA  | 2,00           | 2,67 $\pm$ 1,16 | 3 $\pm$ 1,36    | 8,33 $\pm$ 1,20  | 12,67 $\pm$ 1,67  | 15,04                 |
| Gi   | 5,00           | 1,67 $\pm$ 0,81 | 2 $\pm$ 1,28    | 30 $\pm$ 6,00    | 47 $\pm$ 9,01     | 9,73                  |
| GiV  | 3,00           | 4 $\pm$ 1,00    | 3,67 $\pm$ 0,33 | 8 $\pm$ 1,53     | 12 $\pm$ 2,65     | 20,35                 |
| Irt  | 5,00           | 2,33 $\pm$ 1,42 | 3,67 $\pm$ 0,81 | 86,33 $\pm$ 7,22 | 109 $\pm$ 15,58   | 15,93                 |
| LPGi | 5,00           | 3,67 $\pm$ 0,87 | 7 $\pm$ 0,87    | 42 $\pm$ 14,01   | 66,33 $\pm$ 27,75 | 28,32                 |
| PCRt | 5,00           | 0,33 $\pm$ 0,29 | 2,67 $\pm$ 0,58 | 39,33 $\pm$ 8,03 | 106 $\pm$ 0,58    | 7,96                  |
| RMg  | 2,00           | 1 $\pm$ 0,00    |                 | 5 $\pm$ 1,16     |                   | 2,65                  |



**Figure 45. Illustration des résultats de l'injection de CTb dans le noyau facial réalisée sur des rats présentant une hypersomnie de SP consécutive à une privation sélective de SP par la méthode de la piscine. A/ Site de CTb au sein du noyau VII. B/ Double marquage Fos (noir)/CTb (marron) dans le LPGi. C/ Agrandissement de la zone encadrée Fig.45B. Echelle : A 500  $\mu$ m, B 250  $\mu$ m, C 100 $\mu$ m.**

## **IV. ETUDES COMPLEMENTAIRES**

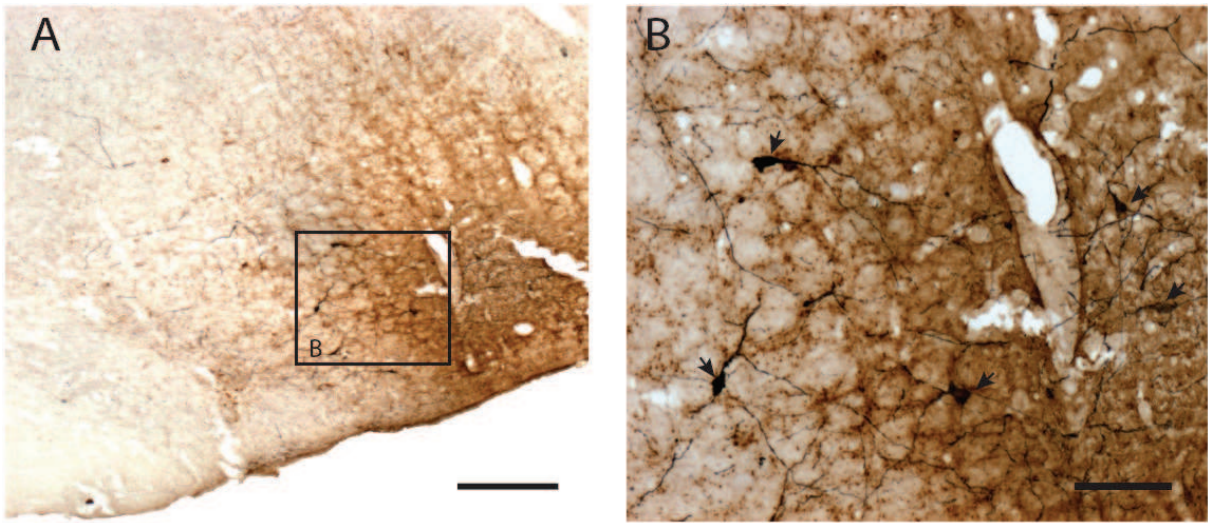
### **A. Marquage TH/CTb**

Le marquage par la TH couplé à l'immunohistochimie de la CTb montre que les neurones marqués TH (appartenant à la région C1), dans le LPGi, sont situés dans le site d'injection de la CTb (Figure 46).

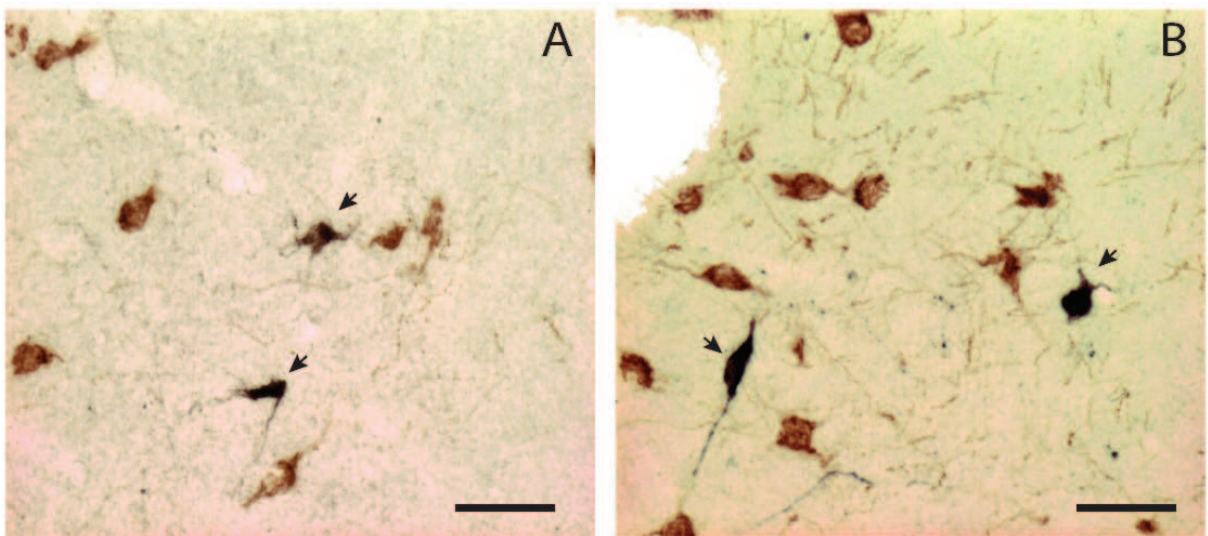
### **B. Marquage CTb/MCH**

Le double marquage CTb/MCH montre qu'un petit nombre de neurones rétrogradement marqués dans l'hypothalamus latéral après injection dans le LPGi est de nature MCHergique (Figure 47).





**Figure 46.** Illustration des résultats de l'immunohistochimie de la CTb et de la TH. A/ Site d'injection de la CTb (marron) et du marquage TH (noir) dans le LPGi. B/ Agrandissement de la partie encadrée en A. Site d'injection de la CTb (marron) et neurones immunomarqués à la TH. (noir). Les flèches montrent les neurones immunomarqués TH dans le LPGi. Echelle : A 400  $\mu$ m, B 100  $\mu$ m.



**Figure 47.** Illustration des résultats de l'immunohistochimie du double marquage CTb (noir) /MCH (marron) au niveau de l'hypothalamus latéral, après injection de CTb au sein du LPGi. Les flèches montrent les neurones immunomarqués MCH/CTb. Echelle A, B 50  $\mu$ m.

## V. DISCUSSION

### A. Afférences au LPGi

De nombreuses afférences au LPGi ont auparavant été identifiées grâce à l'utilisation de traceurs rétrogrades tels que la Horseradish Peroxydase HRP (Andrezik et al. 1981), la WGA-HRP et le Fluorogold (Van Bockstaele et al. 1989).

Dans notre étude, nous avons choisi d'utiliser la CTb, traceur dont la spécificité à été démontrée dans de nombreuses études (Luppi et al. 1991; Verret et al. 2006; Vercelli et al. 2000). Nos résultats sont en bonne conformité avec les études antérieures. En effet, nous avons mis en évidence plusieurs régions afférentes au LPGi, rétrogradement marquées après injection de CTb dans le LPGi, et déjà décrites dans la littérature :

- le LPGi contralatéral, les noyaux raphé pallidus et gigantocellulaire (Andrezik et al. 1981; Van Bockstaele et al. 1989) ;
- le noyau du faisceau solitaire (Van Bockstaele et al. 1989; Andrezik et al. 1981; Ross et al. 1985; Lovick 1988)
- le noyau réticulé parvocellulaire (Van Bockstaele et al. 1989; Oskutyte et al. 2006) ;
- le raphé magnus (Andrezik et al. 1981; Lovick 1988)
- le noyau parabrachial latéral et le Kolliker-Fuse (Van Bockstaele et al. 1989; Andrezik et al. 1981; Lovick 1988);
- les noyaux du pont : PnC et PnO (Andrezik et al. 1981)
- la substance grise périaqueducule (Van Bockstaele et al. 1989; Lovick 1988) ;
- le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (Van Bockstaele et al. 1989; Andrezik et al. 1981; Badoer 2001; Tagawa et Dampney 1999);
- l'hypothalamus latéral (Van Bockstaele et al. 1989; Andrezik et al. 1981; Dampney et al. 1987).
- L'amygdale centrale (Saha 2005),
- Les cortex insulaire et sensorimoteur (M'hamed et al. 1993).

Dans cette étude, nous avons mis en évidence d'autres régions afférentes au LPGi : Le DPGi, le noyau réticulé intermédiaire, le GiV, GiA, le PnV, le Raphé obscurus, le noyau parabrachial médian, le SLD, le DpMe, l'hypothalamus postérieur, les aires hypothalamiques

dorsale et médiane, l'aire périfornicale et la zona incerta, les cortex auditifs et les cortex moteurs primaire et secondaire.

L'importance des afférences au LPGi peut être déterminée par le nombre de neurones simplement marqués par la CTb dans chaque région. Toutefois, cela doit être pondéré par l'étendue de chaque structure. Ainsi, les afférences majeures au LPGi se trouvent dans la partie contralatérale du LPGi, le DpMe, la partie latérale de la PAG le noyau gigantocellulaire puis la vIPAG et le noyau du faisceau solitaire. Ces données montrent que les deux parties du LPGi ipsilatérale et contralatérale communiquent de façon importante entre elles.

## **B. Afférences Fos/CTb**

Dans notre étude, Fos est utilisé comme un marqueur fonctionnel mettant en évidence une activation cellulaire consécutive à un stimulus (Sagar et al. 1988b). Ici, les stimuli sont dus soit à l'hypersomnie de SP, soit à la privation de SP. Le marquage Fos résultant montre donc l'activation de cellules en réponse à ces deux stimuli. Ainsi, nous pouvons penser que les cellules immunomarquées Fos suite à une hypersomnie de SP sont impliquées dans la genèse et/ou le maintien du SP car elles augmenteraient leur activité au cours du SP. Il a par ailleurs été montré plusieurs fois que des régions immunomarquées Fos après rebond de SP contiennent des neurones à profil de décharge SP-On. Ceci a, par exemple, été montré pour le SLD (Boissard et al. 2002) et le DPGi (Goutagny et al. 2008). Ici encore, notre travail de thèse étaye cette hypothèse car des neurones SP-On ont été enregistrés dans le LPGi, région contenant un grand nombre de neurones immunomarqués Fos après rebond de SP (Sapin et al. 2009; Verret et al. 2005; Luppi et al. 2006).

D'autre part, les neurones immunomarqués Fos après privation de SP pourraient jouer deux rôles distincts : inhiber l'apparition du SP ou activer l'apparition de l'éveil. En effet, Léger et al. (2009) ont montré que les neurones adrénérgiques de la région C1 expriment Fos après privation de SP contrairement aux neurones SP-Off noradrénérgiques du LC. Les neurones de la région C1 joueraient donc un rôle dans l'inhibition du SP et les neurones du LC auraient un rôle activateur de l'éveil.

Les résultats de l'étude Fos/CTb, dans trois conditions expérimentales (Contrôle, Privé de SP, Rebond de SP), après injection de CTb dans le LPGi, montrent que la plupart des régions étudiées ne présentent pas de différences significatives entre les trois conditions. Ceci met en évidence que ces régions ne jouent pas un rôle essentiel dans le réseau qui sous-tend le SP.

Dans notre étude, le noyau GiA, le raphé magnus, le DpMe, la DMPAG et l'hypothalamus latéral présentent une augmentation significative du nombre de neurones doublement marqués Fos/CTb en condition de rebond de SP par rapport au contrôle. Ces régions représentent donc des afférences au LPGi actives au cours du SP. Toutefois, le GiA, le raphé magnus, et l'hypothalamus latéral ne présentent pas de différence significative entre les groupes rebond et privé. Ces résultats tendent à montrer que ces neurones activés dans les conditions privé et rebond, ne jouent pas un rôle essentiel dans le contrôle du SP. Il est néanmoins intéressant de nuancer ces données en ce qui concerne l'hypothalamus latéral car le nombre de neurones Fos/CTb comptabilisés en condition rebond est presque le double de ceux comptabilisés en condition PSD, malgré le fait que cette différence ne soit pas significativement différente d'un point de vue statistique.

Ainsi, seules les régions du DpMe et de la DMPAG présentent des différences significatives entre les conditions rebond et privé et aussi rebond et contrôle. Il a été montré que le complexe PAG/DpMe contient un nombre important de neurones GABAergiques activés suite à une privation ou un rebond de SP (Sapin et al. 2009). Ceci suggère que ce groupe de noyaux contiendrait à la fois des neurones SP-Off et des neurones SP-On de nature GABAergique. Dans notre étude, nous montrons que le DpMe et la partie dorsomédiane de la PAG sont des afférences au LPGi spécifiquement activées suite à un rebond de SP. Ainsi, les neurones de ces deux régions afférents au LPGi seraient possiblement SP-On et pour tout ou partie de nature GABAergique. Par contre, étant donné que nous n'observons pas de neurones afférents au LPGi activés par la privation dans ces deux régions, nous pouvons dire que les neurones GABAergiques, possiblement SP-Off, ne se projettent pas au LPGi.

La situation serait différente pour la LPAG et la vIPAG. En effet, nos résultats montrent que le nombre de neurones doublement marqués Fos/CTb dans la LPAG est significativement plus important en condition rebond que en condition privation. D'autre part, le nombre de neurones doublement marqués Fos/CTb en condition privation est significativement plus important qu'en condition contrôle. Ces résultats suggèrent que la LPAG contient des neurones activés pendant le rebond de SP et suite à une privation de SP et,

dans les deux cas, afférents au LPGi. Sapin et al. (2009) ont montré que la LPAG contient des neurones GABAergiques possiblement SP-On et SP-Off. Nos résultats suggèrent donc que les neurones afférents au LPGi et actifs dans les deux conditions expérimentales seraient de nature GABAergique.

D'autre part, les neurones doublement marqués Fos/CTb au sein de la vLPAG sont activés de façon significativement plus importante suite à une privation de SP que dans la condition contrôle. Aucune différence significative entre les conditions privé et rebond n'a été montrée. Toutefois, les résultats du laboratoire suggèrent que la vLPAG est une région SP-Off GABAergique. En effet, Sapin et al (2009) ont montré que l'inactivation de la vLPAG par éjection iontophorétique de muscimol entraîne une forte augmentation des quantités de SP et que le nombre de neurones GABAergiques activés dans cette région est significativement accru après privation de SP. Nos résultats, couplés aux données de la littérature, suggèrent donc que le LPGi reçoit des afférences de type SP-Off GABAergiques issues de la vLPAG.

L'hypothalamus latéral contient des neurones exprimant la MCH et qui sont actifs au cours du SP et inactifs au cours de l'éveil. Ces neurones sont colocalisés avec des neurones à oréxine ou hypocrétine, qui sont au contraire actifs au cours de l'éveil et inactifs au cours du SP. Ces types neuronaux ont donc des modes de décharge réciproques au cours du cycle veille-sommeil (Hassani et al. 2009). D'autre part, ces deux types neuronaux sont colocalisés avec des neurones GABAergiques présentant un taux de décharge plus important au cours du sommeil (Hassani et al. 2010). Nos résultats montrent que la LH contient des neurones activés après un rebond de SP et afférents au LPGi. Ces neurones peuvent alors être de nature GABAergique et/ou MCHergique mais non oréxinergique. Le double marquage CTb/MCH montre qu'une partie des neurones afférents au LPGi est de nature MCHergique. En outre, une étude récente suggère que les neurones activés après rebond de SP doublement marqués MCH/GABA participeraient à l'homéostasie du SP (Sapin et al. 2010). Nos résultats, couplés à ceux de la littérature, suggèrent donc que le LPGi recevrait des afférences MCH/GABAergique de la partie latérale de l'hypothalamus, actives pendant le SP.

Nos résultats mettent en évidence une augmentation très significative du nombre de neurones doublement marqués Fos/CTb dans le SLD en condition de rebond par rapport à la condition de privation. Ces données suggèrent que le SLD contient des neurones actifs au cours du SP et afférents au LPGi. Le SLD serait la structure exécutive du SP (Luppi et al.



2010). Il a été montré qu'il contient des neurones à profil de décharge SP-On (Boissard et al. 2002). De plus, les neurones activés Fos après hypersomnie de SP ne sont pas de nature GABAergique (Sapin et al. 2009) mais de nature glutamatergique (Clément et al. 2011). Boissard et al. (2002) avaient déjà montré l'existence de projections directes du SLD sur le LPGi en utilisant le marquage antérograde à la PHA-L après injection au sein du SLD. Notre étude met alors en évidence pour la première fois une voie directe de nature glutamatergique, donc excitatrice, entre le centre exécutif du SP, le SLD, et le LPGi.

### **C. Efférences du LPGi**

Afin de déterminer les projections émanant du LPGi, nous avons utilisé un traceur antérograde, la PHA-L, injecté dans le LPGi. Nous avons aussi utilisé le traçage antérograde par la CTb. Nos résultats permettent d'identifier les régions efférentes du LPGi mais nous ne pouvons pas savoir si les fibres connectent précisément des neurones immunomarqués Fos après rebond ou privation de SP.

Nos résultats sont cohérents avec ceux décrits dans la littérature. En effet, nous avons identifié une forte projection du LPGi sur le LC. Cette projection a déjà été identifiée par traçage antérograde utilisant la PHA-L (Guyenet et Young 1987; Ennis et Aston-Jones 1988). De plus, Ennis et Aston-Jones (1988) proposent que le LPGi soit une afférence principalement excitatrice du LC, mais qu'une partie des neurones du LPGi soit à l'origine d'une inhibition du LC. Les travaux de Verret et al. (2006) et Sapin et al. (2009) vont dans le même sens puisqu'ils suggèrent que le LPGi est une afférence GABAergique au LC, active au cours du SP. Par ailleurs, nos résultats mettent en évidence une forte projection du LPGi sur la région noradrénergique A5, comme l'ont observé (McKellar et Loewy 1982).

Le traçage antérograde de la PHA-L montre une projection dense du LPGi sur la partie contralatérale du LPGi. Ces résultats suggèrent une connexion réciproque bilatérale. Ces résultats sont corroborés par (McMullan et al. 2010) montrant que l'injection de microsphères fluorescentes comme traceur rétrograde au sein du LPGi, entraîne un marquage de la partie contralatérale du LPGi. De plus, la majorité de ces neurones ne sont pas doublement marqués PNMT (enzyme de synthèse de l'adrénaline), donc ne sont pas de nature adrénérergique.

Nos travaux mettent en évidence une forte projection du LPGi sur le NTS. Cette projection a auparavant été visualisée par Guyenet et Young (1987) et par Frugière et al. (1998) qui ont respectivement utilisé la PHA-L et la BDA (Biotinylated Dextran Amine). Les axones issus du LPGi sont répartis dans l'ensemble du NTS mais de façon plus importante dans la partie caudale de ce noyau. Le NTS joue un rôle particulièrement important dans la régulation des fonctions cardiovasculaires, tout comme le LPGi.

Nos résultats ont montré des projections très importantes du LPGi vers le noyau parabrachial latéral et le noyau Kolliker-Füese. Ce résultat est corroboré par les travaux de Guyenet et Young (1987). Le LPGi possède donc des connexions réciproques avec le noyau parabrachial latéral et le Kolliker-Füese impliqués dans le contrôle des fonctions autonomes.

Nos résultats mettent en évidence une faible projection du LPGi vers la vIPAG. Le LPGi est donc connecté de façon réciproque avec la vIPAG, une région SP-Off GABAergique. Le LPGi étant lui-même SP-On supposé GABAergique, il pourrait participer à l'inhibition de la vIPAG au cours du SP.

En ce qui concerne les projections en avant du mésencéphale, il est intéressant de noter que le LPGi émet des projections rostrales jusqu'au niveau hypothalamique, en particulier dans l'aire hypothalamique latérale. Une faible projection vers l'aire périfornicale a de plus été mise en évidence dans notre étude. Ici aussi, les connexions sont donc réciproques.

#### **D. Afférences au noyau du nerf facial (VII)**

Nos résultats ont mis en évidence une projection du LPGi sur le noyau facial VII. Une de nos hypothèses de départ quant au rôle du LPGi était que celui-ci participe à l'inhibition de ce noyau moteur pendant le SP. Nous avons alors procédé à l'injection d'un traceur rétrograde, la CTb au sein du noyau VII, couplée à l'immunohistochimie de Fos en condition de rebond de SP. Nos résultats montrent que le LPGi contient un nombre important de neurones doublement marqués Fos/CTb dans le LPGi. Ces résultats suggèrent que le LPGi contient des neurones activés pendant le rebond de SP, donc potentiellement SP-On, afférents au noyau VII. De plus, nous avons calculé que ces neurones doublement marqués Fos/CTb représentent 28% de l'ensemble des neurones doublement marqués Fos/CTb dans le bulbe rachidien. En ce sens, le LPGi contribue plus que les autres régions du bulbe rachidien, Le LPGi contenant des neurones GABAergiques et glycinergiques activés pendant un rebond de SP, pourrait ainsi contribuer de façon importante à l'inhibition des motoneurones faciaux au cours du SP.

***DISCUSSION GENERALE et  
CONCLUSION***



## **I. DISCUSSION**

Ce travail de thèse repose essentiellement sur l'hypothèse suivant laquelle le LPGi jouerait un rôle dans le réseau du SP. Nous avons cherché à répondre à trois questions : 1/ Le LPGi contient-il des neurones à profil de décharge SP-On et quelles en sont les caractéristiques ? 2/ Quelles sont les structures afférentes au LPGi susceptibles de le contrôler au cours du SP ? 3/ Quelles sont les régions contrôlées par le LPGi au cours du SP, autrement dit quel rôle joue le LPGi au cours du SP ? Les principaux résultats obtenus dans ce travail sont :

- le LPGi contient non seulement des neurones à profil de décharge SP-On mais aussi des neurones à profil de décharge SP-Off. Les neurones SP-On anticipent le début du SP, suggérant que le LPGi participe à la genèse de ce stade de sommeil.
- Le LPGi est fortement contrôlé par le SLD au cours du SP.
- Le LPGi contrôle de façon importante les motoneurones faciaux du VII.

Comme nous l'avons discuté dans les chapitres 1 et 2, ces résultats, confrontés aux données de la littérature, nous ont permis d'émettre plusieurs hypothèses. Ainsi, les neurones SP-On du LPGi seraient de nature GABAergique (Sapin et al., 2009) et/ou glycinergique (Boissard et al. 2003) et pourraient même exprimer les deux neurotransmetteurs (Stornetta et al. 2004). Parmi les neurones SP-Off, existeraient des neurones adrénérgiques (Léger et al. 2009) mais aussi des neurones GABAergiques (Sapin et al., 2009). De plus, les neurones SP-On du LPGi seraient excités par les neurones glutamatergiques du SLD et inhiberaient les motoneurones faciaux, participant ainsi à l'atonie musculaire caractéristique du SP.

Les neurones SP-On de la LPAG et les neurones à MCH de la LH pourraient participer à l'inhibition des neurones SP-Off du LPGi au cours du SP. Enfin, les neurones SP-Off GABAergiques de la vLPAG et de la LPAG, inhiberaient les neurones SP-On du LPGi au cours de l'éveil.

En intégrant nos résultats et hypothèses dans ce qui est connu du réseau neuronal sous-tendant la régulation du SP, nous pouvons proposer un schéma plus complet pour expliquer la genèse et le maintien de cet état de vigilance. Ce schéma est exposé Figure 48. Par souci de clarté, nous avons représenté l'inhibition locale réciproque au sein du LPGi et seulement les voies SLD-LPGi et LPGi-VII.

En conclusion, le LPGi ne semble pas être une structure participant à la genèse du SP mais serait importante dans la régulation de fonctions essentielles à cet état de vigilance.

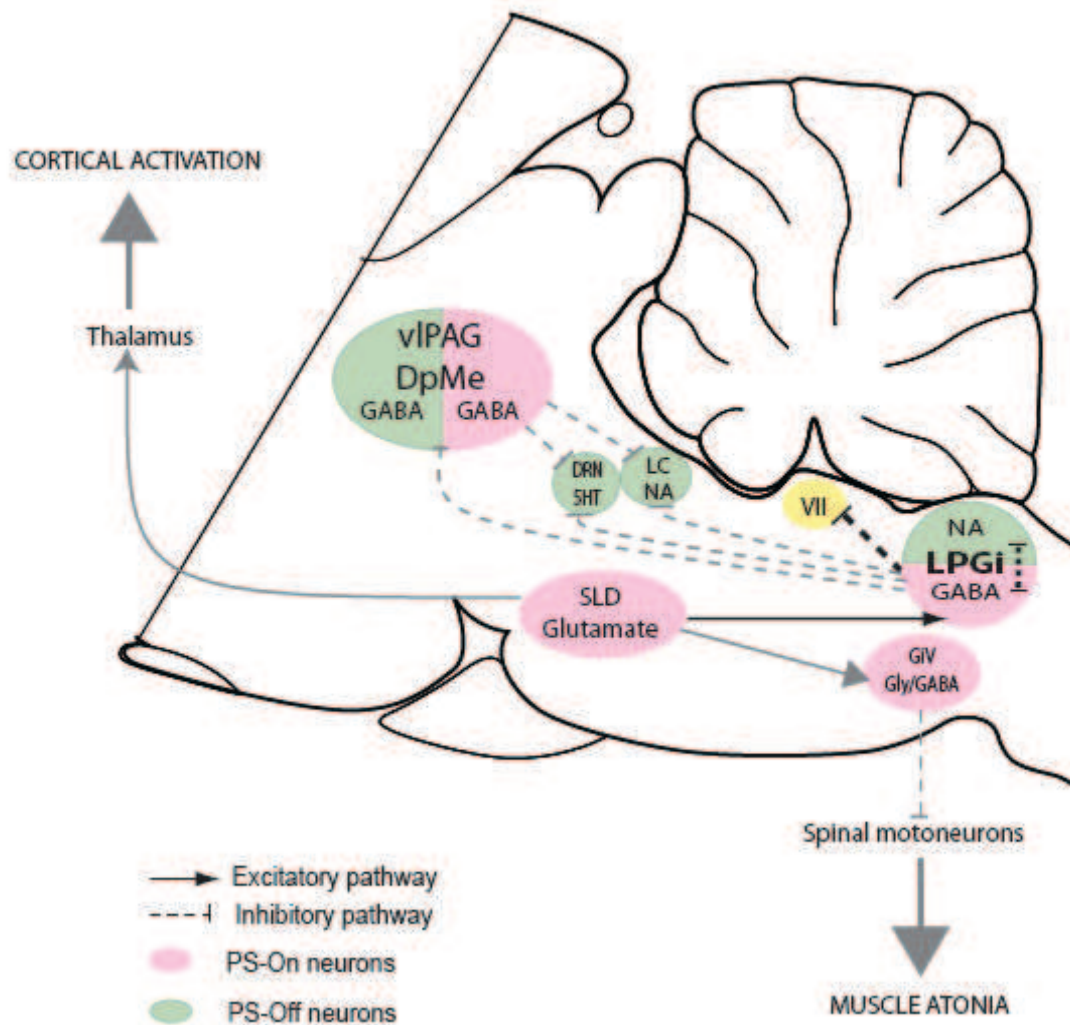


Figure 48. Schéma du réseau neuronal responsable de la genèse et du maintien du SP. Les données obtenues dans ce travail de thèse ont été intégrées au réseau (flèches noires). Par souci de clarté, les voies impliquant la LPAG, la vIPAG et la LH n'apparaissent pas dans ce schéma. Les flèches grisées indiquent les voies déjà identifiées avant ce travail.

## **II. PERSPECTIVES**

L'étude du rôle du LPGi dans le réseau du SP nécessite quelques approfondissements que nous pouvons diviser en trois points essentiels.

### **- Confirmer l'implication du LPGi dans le réseau qui sous-tend l'atonie musculaire au cours du SP**

Il serait intéressant de poursuivre les éjections micropharmacologiques dans le LPGi, chez le rat vigile en contention afin d'identifier d'un point de vue plus physiologique dans quelle mesure le LPGi est impliqué dans l'atonie musculaire. Il s'agirait d'inhiber l'ensemble de la région par des éjections de longue durée d'un agoniste GABAergique tel que le muscimol, Il serait également intéressant d'effectuer des stimulations du LPGi en éjectant un agoniste glutamatergique tel que l'acide kainique ou un antagoniste GABAergique tel que la bicuculline.

Par ailleurs, l'étude neuroanatomique que nous avons menée dans ce travail pourrait être étendue aux autres noyaux moteurs crâniens tels que le noyau moteur de l'hypoglosse et le noyau moteur trijumeau. Ainsi, l'éjection de CTb couplée à l'immunohistochimie de Fos pendant le rebond de SP permettrait de démontrer l'implication du LPGi dans le contrôle de ces noyaux moteurs crâniens au cours du SP. Ce travail a déjà été partiellement réalisé sur le noyau moteur du trijumeau chez le chat, suggérant que le LPGi contrôle ce noyau au cours du SP (Morales et al. 1999).

### **- Déterminer la nature neurochimique des neurones SP-On et SP-Off**

L'utilisation de la technique de marquage juxtacellulaire (Pinault 1996) des neurones SP-On et SP-Off, couplée à l'immunohistochimie de neurotransmetteurs permettrait de connaître la nature neurochimique de ceux-ci. Ce marquage pourrait être réalisé pendant les enregistrements extracellulaires unitaires chez le rat vigile en contention.

- **Déterminer d'autres rôles possibles joués par le LPGi au cours du SP**

Le LPGi étant bien connu pour son implication dans le contrôle de la pression artérielle, il serait intéressant d'étudier ce paramètre en relation avec le cycle veille sommeil. En effet, nous pourrions coupler l'enregistrement extracellulaire unitaire chez le rat vigile en contention avec l'enregistrement de la pression artérielle. Pour obtenir une bonne résolution temporelle des variations de cette pression, il serait nécessaire d'implanter un cathéter (muni d'un barorécepteur et d'un émetteur) à demeure dans l'artère carotidienne ou l'artère fémorale. La lecture de la pression pourrait se faire par télémetrie. Une mise au point de cette préparation serait nécessaire, mais est tout à fait envisageable sur la préparation chronique du rat vigile en contention.

## ***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

Aghajanian, G.K. & Vandermaelen, C.P. Intracellular identification of central noradrenergic and serotonergic neurons by a new double labeling procedure. *J. Neurosci* **2**, 1786-1792 (1982).

Alam, M.N. et al. Sleep-waking discharge patterns of neurons recorded in the rat perifornical lateral hypothalamic area. *J. Physiol. (Lond.)* **538**, 619-631 (2002).

Allen, A.M. Inhibition of the hypothalamic paraventricular nucleus in spontaneously hypertensive rats dramatically reduces sympathetic vasomotor tone. *Hypertension* **39**, 275-280 (2002).

Allen, A.M., Dampney, R.A. & Mendelsohn, F.A. Angiotensin receptor binding and pressor effects in cat subretrofacial nucleus. *Am. J. Physiol* **255**, H1011-1017 (1988).

Andrezik, J.A., Chan-Palay, V. & Palay, S.L. The nucleus paragigantocellularis lateralis in the rat. Demonstration of afferents by the retrograde transport of horseradish peroxidase. *Anat. Embryol* **161**, 373-390 (1981).

Aserinsky, E. & Kleitman, N. Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep. *Science* **118**, 273-274 (1953).

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

Aston-Jones, G., Ennis, M., Pieribone, V.A., Nickell, W.T. & Shipley, M.T. The brain nucleus locus coeruleus: restricted afferent control of a broad efferent network. *Science* **234**, 734-737 (1986).

Atkinson, J. et al. Chronic clonidine treatment and its withdrawal: effects on blood pressure and catecholamine synthesizing enzymes in brain-stem nuclei. *Eur. J. Pharmacol* **121**, 97-106 (1986).

Badoer, E. Hypothalamic paraventricular nucleus and cardiovascular regulation. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol* **28**, 95-99 (2001).

Barman, S.M. & Gebber, G.L. Spinal interneurons with sympathetic nerve-related activity. *Am. J. Physiol* **247**, R761-767 (1984).

Barrett, C.J., Navakatikyan, M.A. & Malpas, S.C. Long-term control of renal blood flow: what is the role of the renal nerves? *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol* **280**, R1534-1545 (2001).

Bassant, M.H., Baleyte, J.M. & Lamour, Y. Effects of acetylcholine on single cortical somatosensory neurons in the unanesthetized rat. *Neuroscience* **39**, 189-197 (1990).

Bassett, J.R. & Cairncross, K.D. Time course for plasma 11-hydroxycorticosteroid elevation in rats during stress. *Pharmacol. Biochem. Behav* **3**, 139-142 (1975).

Berger, H. Über das Elektroenkephalogramm des Menschen. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten*. **87**, 527-70 (1929).

Bittencourt, J.C. et al. The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. *J. Comp. Neurol* **319**, 218-245 (1992).

Blessing, W.W., Oliver, J.R., Hodgson, A.H., Joh, T.H. & Willoughby, J.O. Neuropeptide Y-like immunoreactive C1 neurons in the rostral ventrolateral medulla of the rabbit project to sympathetic preganglionic neurons in the spinal cord. *J. Auton. Nerv. Syst* **18**, 121-129 (1987).

Bloom, F.E. To spritz or not to spritz: the doubtful value of aimless iontophoresis. *Life Sci* **14**, 1819-1834 (1974).

Boissard, R. et al. 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 (2002).

Boissard, R. Etude des réseaux neuronaux responsables du sommeil paradoxal chez le rat: approches neuropharmacologiques, neuroanatomiques et électrophysiologiques. (2002).

Boissard, R., Fort, P., Gervasoni, D., Barbagli, B. & Luppi, P. 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 (2003).

Bourassa, E.A., Sved, A.F. & Speth, R.C. Angiotensin modulation of rostral ventrolateral medulla (RVLM) in cardiovascular regulation. *Mol. Cell. Endocrinol* **302**, 167-175 (2009).

Brecht, M., Preilowski, B. & Merzenich, M.M. Functional architecture of the mystacial vibrissae. *Behav. Brain Res* **84**, 81-97 (1997).

Brooks, V.L., Freeman, K.L. & Clow, K.A. Excitatory amino acids in rostral ventrolateral medulla support blood pressure during water deprivation in rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol* **286**, H1642-1648 (2004).

Buzsáki, G. Functions for interneuronal nets in the hippocampus. *Can. J. Physiol. Pharmacol* **75**, 508-515 (1997).

Buzsáki, G. Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron* **33**, 325-340 (2002).

Carli, G. & Zanchetti, A. A study of pontine lesions suppressing deep sleep in the cat. *Arch Ital Biol* **103**, 751-788 (1965).

Castro-Alamancos, M.A. What generates whisking? Focus on: "The whisking rhythm generator: a novel mammalian network for the generation of movement". *J. Neurophysiol* **97**, 1883-1884 (2007).

Chase, M.H. & Morales, F.R. The atonia and myoclonia of active (REM) sleep. *Annu Rev Psychol* **41**, 557-584 (1990).

Chase, M.H. et al. Role of medullary reticular neurons in the inhibition of trigeminal motoneurons during active sleep. *Exp. Neurol* **84**, 364-373 (1984).

Chase, M.H., Chandler, S.H. & Nakamura, Y. Intracellular determination of membrane potential of trigeminal motoneurons during sleep and wakefulness. *J. Neurophysiol* **44**, 349-358 (1980).

Cheeta, S., Ruigt, G., van Proosdij, J. & Willner, P. Changes in sleep architecture following chronic mild stress. *Biol. Psychiatry* **41**, 419-427 (1997).

Clément, O., Sapin, E., Bérod, A., Fort, P. & Luppi, P. Evidence that Neurons of the Sublaterodorsal Tegmental Nucleus Triggering Paradoxical (REM) Sleep Are Glutamatergic. *Sleep* **34**, 419-423 (2011).

Contreras, D., Timofeev, I. & Steriade, M. Mechanisms of long-lasting hyperpolarizations underlying slow sleep oscillations in cat corticothalamic networks. *J. Physiol. (Lond.)* **494 ( Pt 1)**, 251-264 (1996).

Cramer, N.P., Li, Y. & Keller, A. The whisking rhythm generator: a novel mammalian network for the generation of movement. *J. Neurophysiol* **97**, 2148-2158 (2007).

Crochet, S. & Sakai, K. Alpha-2 adrenoceptor mediated paradoxical (REM) sleep inhibition in the cat. *Neuroreport* **10**, 2199-2204 (1999).

Crochet, S. & Sakai, K. Alpha-2 adrenoceptor mediated paradoxical (REM) sleep inhibition in the cat. *Neuroreport* **10**, 2199-2204 (1999).

Crochet, S. & Sakai, K. Effects of microdialysis application of monoamines on the EEG and behavioural states in the cat mesopontine tegmentum. *Eur. J. Neurosci* **11**, 3738-3752 (1999).

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

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

Dampney, R.A. Functional organization of central cardiovascular pathways. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol* **8**, 241-259 (1981).

Dampney, R.A. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. *Physiol. Rev* **74**, 323-364 (1994).

Dampney, R.A., Goodchild, A.K. & McAllen, R.M. Vasomotor control by subretrofacial neurones in the rostral ventrolateral medulla. *Can. J. Physiol. Pharmacol* **65**, 1572-1579 (1987).

Darracq, L. et al. Effect of strychnine on rat locus coeruleus neurones during sleep and wakefulness. *Neuroreport* **8**, 351-355 (1996).

de Sousa Buck, H., Caous, C.A. & Lindsey, C.J. Projections of the paratrigeminal nucleus to the ambiguous, rostroventrolateral and lateral reticular nuclei, and the solitary tract. *Auton Neurosci* **87**, 187-200 (2001).



Dement, W. & Kleitman, N. The relation of eye movements during sleep to dream activity: an objective method for the study of dreaming. *J Exp Psychol* **53**, 339-346 (1957).

Descarries, L., Watkins, K.C., Garcia, S. & Beaudet, A. The serotonin neurons in nucleus raphe dorsalis of adult rat: a light and electron microscope radioautographic study. *J. Comp. Neurol* **207**, 239-254 (1982).

Dragunow, M. & Faull, R. The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *J. Neurosci. Methods* **29**, 261-265 (1989).

Economo, C.V. & Horn, L. Über Windungsrelief, Maße und Rindenarchitektonik der Supratemporalfläche, ihre individuellen und ihre Seitenunterschiede. *Zschr Ges Neurol Psychiatr* **130**, 678-757 (1930).

Ennis, M. & Aston-Jones, G. Activation of locus coeruleus from nucleus paragigantocellularis: a new excitatory amino acid pathway in brain. *J. Neurosci* **8**, 3644-3657 (1988).

Evarts, E.V. Temporal patterns of discharge of pyramidal tract neurons during sleep and waking in the monkey. *J. Neurophysiol* **27**, 152-171 (1964).

Ezure, K., Tanaka, I. & Kondo, M. Glycine is used as a transmitter by decrementing expiratory neurons of the ventrolateral medulla in the rat. *J. Neurosci* **23**, 8941-8948 (2003).

Foote, S.L., Bloom, F.E. & Aston-Jones, G. Nucleus locus ceruleus: new evidence of anatomical and physiological specificity. *Physiol. Rev* **63**, 844-914 (1983).

Fort, P., Luppi, P.H. & Jouvet, M. Glycine-immunoreactive neurones in the cat brain stem reticular formation. *Neuroreport* **4**, 1123-1126 (1993).

Frugière, A., Nunez, E., Pasaro, R., Gaytan, S. & Barillot, J.C. Efferent projection from the rostral ventrolateral medulla to the area postrema in rats. *J. Auton. Nerv. Syst* **72**, 34-45 (1998).

Geddes, I. Electrodes and measurement of bioelectrics events. The measurement of action potentials with extracellular electrodes. 251-85 (1972).

George, R., Haslett, W.L. & Jenden, D.J. A cholinergic mechanism in the brainstem reticular formation: induction of paradoxical sleep. *Int J Neuropharmacol* **3**, 541-552 (1964).

Gerfen, C.R. & Sawchenko, P.E. An anterograde neuroanatomical tracing method that shows the detailed morphology of neurons, their axons and terminals: immunohistochemical localization of an axonally transported plant lectin, Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L). *Brain Res* **290**, 219-238 (1984).

Gervasoni et al. Electrophysiological evidence that noradrenergic neurons of the rat locus coeruleus are tonically inhibited by GABA during sleep. *Eur. J. Neurosci* **10**, 964-970 (1998).

Gervasoni, D. et al. Role and origin of the GABAergic innervation of dorsal raphe serotonergic neurons. *J. Neurosci* **20**, 4217-4225 (2000).

- Gottesmann, C. Detection of seven sleep-waking stages in the rat. *Neurosci Biobehav Rev* **16**, 31-38 (1992).
- Goutagny, R. et al. 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 (2008).
- Goutagny, R., Jackson, J. & Williams, S. Self-generated theta oscillations in the hippocampus. *Nat. Neurosci* **12**, 1491-1493 (2009).
- Goutagny, R., Luppi, P., Salvert, D., Gervasoni, D. & Fort, P. GABAergic control of hypothalamic melanin-concentrating hormone-containing neurons across the sleep-waking cycle. *Neuroreport* **16**, 1069-1073 (2005).
- Grace, A.A. & Bunney, B.S. Intracellular and extracellular electrophysiology of nigral dopaminergic neurons--1. Identification and characterization. *Neuroscience* **10**, 301-315 (1983).
- Grace, A.A. & Bunney, B.S. Intracellular and extracellular electrophysiology of nigral dopaminergic neurons--2. Action potential generating mechanisms and morphological correlates. *Neuroscience* **10**, 317-331 (1983).
- Gross, C.G. Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nat. Rev. Neurosci* **1**, 67-73 (2000).
- Guertzenstein, P.G. & Silver, A. Fall in blood pressure produced from discrete regions of the ventral surface of the medulla by glycine and lesions. *J. Physiol. (Lond.)* **242**, 489-503 (1974).
- Guyenet, P.G. & Young, B.S. Projections of nucleus paragigantocellularis lateralis to locus coeruleus and other structures in rat. *Brain Res* **406**, 171-184 (1987).
- Guyenet, P.G. Neural structures that mediate sympathoexcitation during hypoxia. *Respir Physiol* **121**, 147-162 (2000).
- Guyenet, P.G., Haselton, J. & Sun, M. Sympathoexcitatory neurons of the rostroventrolateral medulla and the origin of the sympathetic vasomotor tone. *Progress in Brain Research* **81**, 105-16 (1989).
- Guzman-Marin, R. et al. Sleep deprivation suppresses neurogenesis in the adult hippocampus of rats. *Eur. J. Neurosci* **22**, 2111-2116 (2005).
- Hairston, I.S. et al. Sleep restriction suppresses neurogenesis induced by hippocampus-dependent learning. *J. Neurophysiol* **94**, 4224-4233 (2005).
- Hassani, O.K., Henny, P., Lee, M.G. & Jones, B.E. GABAergic neurons intermingled with orexin and MCH neurons in the lateral hypothalamus discharge maximally during sleep. *Eur. J. Neurosci* **32**, 448-457 (2010).
- Hassani, O.K., Lee, M.G. & Jones, B.E. 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 (2009).

- Hattox, A. Serotonin regulates rhythmic whisking. *Neuron* **39**, 343-352 (2003).
- Hattox, A.M. Functional circuitry involved in the regulation of whisker movements. *J. Comp. Neurol* **442**, 266-276 (2002).
- Head, G.A. & Howe, P.R. Effects of 6-hydroxydopamine and the PNMT inhibitor LY134046 on pressor responses to stimulation of the subretrofacial nucleus in anaesthetized stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J. Auton. Nerv. Syst* **18**, 213-224 (1987).
- Herbert, H. & Saper, C.B. Organization of medullary adrenergic and noradrenergic projections to the periaqueductal gray matter in the rat. *The Journal of Comparative Neurology* **315**, 34-52 (1992).
- Hirshkowitz, M. & Schmidt, M.H. Sleep-related erections: clinical perspectives and neural mechanisms. *Sleep Med Rev* **9**, 311-329 (2005).
- Hobson, J.A., McCarley, R.W. & Wyzinski, P.W. Sleep cycle oscillation: reciprocal discharge by two brainstem neuronal groups. *Science* **189**, 55-58 (1975).
- Hökfelt, T., Martensson, R., Björklund, A., Kleinau, S. & Goldstein, M. Distribution maps of tyrosine-hydroxylase-immunoreactive neurons in the rat brain. *Handbook of cheical neuroanatomy* **2**, 277-287 (1984).
- Holmes, C.J. & Jones, B.E. 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 (1994).
- Holstege, J.C. & Bongers, C.M. A glycinergic projection from the ventromedial lower brainstem to spinal motoneurons. An ultrastructural double labeling study in rat. *Brain Res* **566**, 308-315 (1991).
- Hsu, S.M., Raine, L. & Fanger, H. A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *Am. J. Clin. Pathol* **75**, 734-738 (1981).
- Jacobs, B.L., Heym, J. & Trulson, M.E. Behavioral and physiological correlates of brain serotonergic unit activity. *Journal of Physiology, Paris* **77**, 431-6 (1981).
- Jones, B.E. & Moore, R.Y. Ascending projections of the locus coeruleus in the rat. II. Autoradiographic study. *Brain Res* **127**, 25-53 (1977).
- Jones, B.E. Paradoxical REM sleep promoting and permitting neuronal networks. *Arch Ital Biol* **142**, 379-396 (2004).
- Jouvet, D., Valatx, J.L. & Jouvet, M. [Polygraphic study of sleep in the kitten]. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil* **155**, 1660-1664 (1961).
- Jouvet, M. & Michel, F. [Electromyographic correlations of sleep in the chronic decorticate & mesencephalic cat.]. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil* **153**, 422-425 (1959).

- Jouvet, M. [Research on the neural structures and responsible mechanisms in different phases of physiological sleep]. *Arch Ital Biol* **100**, 125-206 (1962).
- Jouvet, M. The regulation of paradoxical sleep by the hypothalamo-hypophysis. *Arch Ital Biol* **126**, 259-274 (1988).
- Jouvet, M., Buda, C. & Sastre, J.P. [Is there a bulbar pacemaker responsible for the ultradian rhythm of paradoxical sleep?]. *Arch Ital Biol* **134**, 39-56 (1995).
- Jouvet, M., Michel, F. & Courjon, J. [On a stage of rapid cerebral electrical activity in the course of physiological sleep.]. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil* **153**, 1024-1028 (1959).
- Jouvet-Mounier, D. & Astic, L. [Study of the course of sleep in the young rat during the 1st postnatal month]. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil* **162**, 119-123 (1968).
- Jouvet-Mounier, D., Astic, L. & Lacote, D. Ontogenesis of the states of sleep in rat, cat, and guinea pig during the first postnatal month. *Dev Psychobiol* **2**, 216-239 (1970).
- JR Haselton & Guyenet, P. Electrophysiological characterization of putative C1 adrenergic neurons in the rat. *Neuroscience* **30**, 199-214 (1989).
- Kapoor, V., Minson, J. & Chalmers, J. Ventral medulla stimulation increases blood pressure and spinal cord amino acid release. *Neuroreport* **3**, 55-58 (1992).
- Kerppola, T.K. & Curran, T. Fos-Jun heterodimers and Jun homodimers bend DNA in opposite orientations: implications for transcription factor cooperativity. *Cell* **66**, 317-326 (1991).
- Köbber, C. et al. Current concepts in neuroanatomical tracing. *Prog. Neurobiol* **62**, 327-351 (2000).
- Kodama, T., Lai, Y.Y. & Siegel, J.M. Enhanced glutamate release during REM sleep in the rostromedial medulla as measured by in vivo microdialysis. *Brain Res* **780**, 178-181 (1998).
- Koyama, Y., Honda, T., Kusakabe, M., Kayama, Y. & Sugiura, Y. In vivo electrophysiological distinction of histochemically-identified cholinergic neurons using extracellular recording and labelling in rat laterodorsal tegmental nucleus. *Neuroscience* **83**, 1105-1112 (1998).
- Koyama, Y., Takahashi, K., Kodama, T. & Kayama, Y. State-dependent activity of neurons in the perifornical hypothalamic area during sleep and waking. *Neuroscience* **119**, 1209-1219 (2003).
- Lai, Y.Y. & Siegel, J.M. Pontomedullary glutamate receptors mediating locomotion and muscle tone suppression. *J. Neurosci* **11**, 2931-2937 (1991).
- Langer, S.Z., Duval, N. & Massingham, R. Pharmacologic and therapeutic significance of alpha-adrenoceptor subtypes. *J. Cardiovasc. Pharmacol* **7 Suppl 8**, S1-8 (1985).
- Léger, L. et al. Noradrenergic neurons expressing Fos during waking and paradoxical sleep deprivation in the rat. *J. Chem. Neuroanat* **37**, 149-157 (2009).

Levitt, P. & Moore, R.Y. Origin and organization of brainstem catecholamine innervation in the rat. *J. Comp. Neurol* **186**, 505-528 (1979).

Li, Y.W. & Guyenet, P.G. Neuronal excitation by angiotensin II in the rostral ventrolateral medulla of the rat in vitro. *Am. J. Physiol* **268**, R272-277 (1995).

Lin, J.S., Sakai, K., Vanni-Mercier, G. & Jouvet, M. 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 (1989).

Liu, Y.C. & Sachs, B.D. Erectile function in male rats after lesions in the lateral paragigantocellular nucleus. *Neurosci. Lett* **262**, 203-206 (1999).

Loewy, A.D. & McKellar, S. Serotonergic projections from the ventral medulla to the intermediolateral cell column in the rat. *Brain Res* **211**, 146-152 (1981).

Louie, K. & Wilson, M.A. Temporally structured replay of awake hippocampal ensemble activity during rapid eye movement sleep. *Neuron* **29**, 145-156 (2001).

Lovick, T.A. Convergent afferent inputs to neurones in nucleus paragigantocellularis lateralis in the cat. *Brain Res* **456**, 183-187 (1988).

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

Ludwig, D.S. et al. Melanin-concentrating hormone overexpression in transgenic mice leads to obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest* **107**, 379-386 (2001).

Luppi, P. et al. Anatomical and electrophysiological evidence for a glycinergic inhibitory innervation of the rat locus coeruleus. *Neuroscience Letters* **128**, 33-36 (1991).

Luppi, P. et al. Paradoxical (REM) sleep genesis: the switch from an aminergic-cholinergic to a GABAergic-glutamatergic hypothesis. *J. Physiol. Paris* **100**, 271-283 (2006).

Luppi, P. et al. The neuronal network responsible for paradoxical sleep and its dysfunctions causing narcolepsy and rapid eye movement (REM) behavior disorder. *Sleep Med Rev* (2010).

Luppi, P.H., Aston-Jones, G., Akaoka, H., Chouvet, G. & Jouvet, M. 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 (1995).

Luppi, P.H., Fort, P. & Jouvet, M. Iontophoretic application of unconjugated cholera toxin B subunit (CTb) combined with immunohistochemistry of neurochemical substances: a method for transmitter identification of retrogradely labeled neurons. *Brain Res* **534**, 209-224 (1990).

Luppi, P.H., Sakai, K., Fort, P., Salvert, D. & Jouvet, M. 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 (1988).

Maloney, K.J., Mainville, L. & Jones, B.E. 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 (1999).

Marks, G.A., Shaffery, J.P., Oksenberg, A., Speciale, S.G. & Roffwarg, H.P. A functional role for REM sleep in brain maturation. *Behav. Brain Res* **69**, 1-11 (1995).

Marson, L. & McKenna, K.E. A role for 5-hydroxytryptamine in descending inhibition of spinal sexual reflexes. *Exp Brain Res* **88**, 313-320 (1992).

Marson, L., List, M.S. & McKenna, K.E. Lesions of the nucleus paragigantocellularis alter ex copula penile reflexes. *Brain Res* **592**, 187-192 (1992).

Marson, L., Platt, K.B. & McKenna, K.E. Central nervous system innervation of the penis as revealed by the transneuronal transport of pseudorabies virus. *Neuroscience* **55**, 263-280 (1993).

Massaquoi & McCarley Extension of the Limit Cycle Reciprocal Interaction Model of REM cycle control. An integrated sleep control model. *J Sleep Res* **1**, 138-143 (1992).

McAllen, R.M. Identification and properties of sub-retrofacial bulbospinal neurones: a descending cardiovascular pathway in the cat. *J. Auton. Nerv. Syst* **17**, 151-164 (1986).

McCarley & Massaquoi Neurobiological structure of the revised limit cycle reciprocal interaction model of REM cycle control. *J Sleep Res* **1**, 132-137 (1992).

McCarley, R.W. & Hobson, J.A. Neuronal excitability modulation over the sleep cycle: a structural and mathematical model. *Science* **189**, 58-60 (1975).

McGinty, D.J. & Harper, R.M. Dorsal raphe neurons: depression of firing during sleep in cats. *Brain Res* **101**, 569-575 (1976).

McKay, L.C., Janczewski, W.A. & Feldman, J.L. Sleep-disordered breathing after targeted ablation of preBötzinger complex neurons. *Nat. Neurosci* **8**, 1142-1144 (2005).

McKellar, S. & Loewy, A. Efferent projections of the A1 catecholamine cell group in the rat: An autoradiographic study. *Brain Research* **241**, 11-29 (1982).

McMullan, S., Farnham, Lung, M. & Pilowsky Excitatory and inhibitory network interactions between presympathetic neurons in the rostral ventrolateral medulla. (2010).

Mendelson, W.B., Guthrie, R.D., Frederick, G. & Wyatt, R.J. The flower pot technique of rapid eye movement (REM) sleep deprivation. *Pharmacol. Biochem. Behav* **2**, 553-556 (1974).

M'hamed, S.B., Sequeira, H., Poulain, P., Bennis, M. & Roy, J.C. Sensorimotor cortex projections to the ventrolateral and the dorsomedial medulla oblongata in the rat. *Neurosci. Lett* **164**, 195-198 (1993).

Mitani, A. et al. Cholinergic projections from the laterodorsal and pedunculopontine tegmental nuclei to the pontine gigantocellular tegmental field in the cat. *Brain Res* **451**, 397-402 (1988).



- Morales, F.R., Sampogna, S., Yamuy, J. & Chase, M.H. c-fos expression in brainstem premotor interneurons during cholinergically induced active sleep in the cat. *J. Neurosci* **19**, 9508-9518 (1999).
- Morgan, J.I. & Curran, T. Role of ion flux in the control of c-fos expression. *Nature* **322**, 552-555 (1986).
- Morgan, J.I. & Curran, T. Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes. *Trends Neurosci* **12**, 459-462 (1989).
- Morgan, J.I. & Curran, T. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu. Rev. Neurosci* **14**, 421-451 (1991).
- Morris, M.J., Pilowsky, P.M., Minson, J.B., West, M.J. & Chalmers, J.P. Microinjection of kainic acid into the rostral ventrolateral medulla causes hypertension and release of neuropeptide Y-like immunoreactivity from rabbit spinal cord. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol* **14**, 127-132 (1987).
- Morrison, S.F. et al. A glutamate mechanism in the intermediolateral nucleus mediates sympathoexcitatory responses to stimulation of the rostral ventrolateral medulla. *Prog. Brain Res* **81**, 159-169 (1989).
- Mullen, R.J., Buck, C.R. & Smith, A.M. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* **116**, 201-211 (1992).
- Nauta, W. Hypothalamic regulation of sleep in rats; an experimental study. *Journal of Neurophysiology* **9**, 285-316 (1946).
- Netick, A., Orem, J. & Dement, W. Neuronal activity specific to REM sleep and its relationship to breathing. *Brain Res* **120**, 197-207 (1977).
- Nicholas, A.P., Cuello, A.C., Goldstein, M. & Hökfelt, T. Glutamate-like immunoreactivity in medulla oblongata catecholamine/substance P neurons. *Neuroreport* **1**, 235-238 (1990).
- Nitz, D. & Siegel, J. GABA release in the dorsal raphe nucleus: role in the control of REM sleep. *Am. J. Physiol* **273**, R451-455 (1997).
- Nitz, D. & Siegel, J.M. GABA release in the locus coeruleus as a function of sleep/wake state. *Neuroscience* **78**, 795-801 (1997).
- Nygren, L.G. & Olson, L. 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 (1977).
- Olson, L. & Fuxe, K. On the projections from the locus coeruleus noradrenaline neurons: the cerebellar innervation. *Brain Res* **28**, 165-171 (1971).
- Onoe, H. & Sakai, K. Kainate receptors: a novel mechanism in paradoxical (REM) sleep generation. *Neuroreport* **6**, 353-356 (1995).

Oskutyte, D., Ishizuka, K., Satoh, Y. & Murakami, T. Rostral parvicellular reticular formation neurons projecting to rostral ventrolateral medulla receive cardiac inputs in anesthetized rats. *Neurosci. Lett* **405**, 236-240 (2006).

Paxinos & Watson *The rat brain in stereotaxic coordinates*. (Academic press: 1986).

Paxinos & Watson *The rat brain in stereotaxic coordinates*. (Academic press: 1998).

Paxinos & Watson *The rat brain in stereotaxic coordinates*. (Academic press: 2005).

Petitjean, F., Sakai, K., Blondaux, C. & Jouvet, M. [Hypersomnia by isthmus lesion in cat. II. Neurophysiological and pharmacological study]. *Brain Res* **88**, 439-453 (1975).

Petsche, H., STUMPF, C. & GOGOLAK, G. [The significance of the rabbit's septum as a relay station between the midbrain and the hippocampus. I. The control of hippocampus arousal activity by the septum cells]. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **14**, 202-211 (1962).

Peyron, C. et al. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J. Neurosci* **18**, 9996-10015 (1998).

Peyron, C., Luppi, P.H., Fort, P., Rampon, C. & Jouvet, M. Lower brainstem catecholamine afferents to the rat dorsal raphe nucleus. *J. Comp. Neurol* **364**, 402-413 (1996).

Peyron, C., Petit, J.M., Rampon, C., Jouvet, M. & Luppi, P.H. Forebrain afferents to the rat dorsal raphe nucleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing methods. *Neuroscience* **82**, 443-468 (1998).

Pilowsky, P., Minson, J., Hodgson, A., Howe, P. & Chalmers, J. Does substance P coexist with adrenaline in neurones of the rostral ventrolateral medulla in the rat? *Neurosci. Lett* **71**, 293-298 (1986).

Pinault, D. A novel single-cell staining procedure performed in vivo under electrophysiological control: morpho-functional features of juxtacellularly labeled thalamic cells and other central neurons with biocytin or Neurobiotin. *J. Neurosci. Methods* **65**, 113-136 (1996).

Qu, D. et al. A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature* **380**, 243-247 (1996).

Rampon, C. et al. Origin of the glycinergic innervation of the rat trigeminal motor nucleus. *Neuroreport* **7**, 3081-3085 (1996).

Rampon, C. et al. Origins of the glycinergic inputs to the rat locus coeruleus and dorsal raphe nuclei: a study combining retrograde tracing with glycine immunohistochemistry. *Eur. J. Neurosci* **11**, 1058-1066 (1999).

Rampon, C., Luppi, P.H., Fort, P., Peyron, C. & Jouvet, M. Distribution of glycine-immunoreactive cell bodies and fibers in the rat brain. *Neuroscience* **75**, 737-755 (1996).

Rechtschaffen, A., Bergmann, B.M., Everson, C.A., Kushida, C.A. & Gilliland, M.A. Sleep deprivation in the rat: X. Integration and discussion of the findings. *Sleep* **12**, 68-87 (1989).



Reis, D.J. et al. Brain stem catecholamine mechanisms in tonic and reflex control of blood pressure. *Hypertension* **6**, 117-115 (1984).

Renaud, L.P. et al. Synaptic and neurotransmitter regulation of activity in mammalian hypothalamic magnocellular neurosecretory cells. *Prog. Brain Res* **92**, 277-288 (1992).

Rizvi, T.A., Murphy, A.Z., Ennis, M., Behbehani, M.M. & Shipley, M.T. Medial preoptic area afferents to periaqueductal gray medullo-output neurons: a combined Fos and tract tracing study. *J. Neurosci* **16**, 333-344 (1996).

Ross, C.A. et al. Tonic vasomotor control by the rostral ventrolateral medulla: effect of electrical or chemical stimulation of the area containing C1 adrenaline neurons on arterial pressure, heart rate, and plasma catecholamines and vasopressin. *J. Neurosci* **4**, 474-494 (1984).

Ross, C.A., Ruggiero, D.A. & Reis, D.J. Projections from the nucleus tractus solitarii to the rostral ventrolateral medulla. *J. Comp. Neurol* **242**, 511-534 (1985).

Ross, C.A., Ruggiero, D.A., Joh, T.H., Park, D.H. & Reis, D.J. Rostral ventrolateral medulla: selective projections to the thoracic autonomic cell column from the region containing C1 adrenaline neurons. *J. Comp. Neurol* **228**, 168-185 (1984).

Ruggiero, D.A. et al. Adrenergic and non-adrenergic spinal projections of a cardiovascular-active pressor area of medulla oblongata: quantitative topographic analysis. *Brain Res* **663**, 107-120 (1994).

Ruggiero, D.A., Meeley, M.P., Anwar, M. & Reis, D.J. Newly identified GABAergic neurons in regions of the ventrolateral medulla which regulate blood pressure. *Brain Res* **339**, 171-177 (1985).

Sagar, S.M., Sharp, F.R. & Curran, T. Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science* **240**, 1328-1331 (1988).

Saha, S. Role of the central nucleus of the amygdala in the control of blood pressure: descending pathways to medullary cardiovascular nuclei. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol* **32**, 450-456 (2005).

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

Sakai, K. et al. State-specific neurones in the ponto-medullary reticular formation with special reference to the postural atonia during paradoxical sleep in the cat. *Brain mechanisms of perceptual awareness and purposeful behavior* 405-429 (1981).

Sakai, K. et al. Tegmentoreticular projections with special reference to the muscular atonia during paradoxical sleep in the cat: an HRP study. *Brain Res* **176**, 233-254 (1979).

Sakai, K. Executive mechanisms of paradoxical sleep. *Arch Ital Biol* **126**, 239-257 (1988).

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

Sapin, E. et al. A very large number of GABAergic neurons are activated in the tuberal hypothalamus during paradoxical (REM) sleep hypersomnia. *PLoS ONE* **5**, e11766 (2010).

Sapin, E. et al. Localization of the brainstem GABAergic neurons controlling paradoxical (REM) sleep. *PLoS ONE* **4**, e4272 (2009).

Sapru, H. Carotid chemoreflex. Neural pathways and transmitters. *Advances in experimental medicine and biology* **410**, 357-64 (1996).

Sastre, J.P. & Jouvet, M. [Oneiric behavior in cats]. *Physiol. Behav* **22**, 979-989 (1979).

Sastre, J.P., Buda, C., Kitahama, K. & Jouvet, M. 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 (1996).

Schenck, C.H., Bundlie, S.R., Ettinger, M.G. & Mahowald, M.W. Chronic behavioral disorders of human REM sleep: a new category of parasomnia. *Sleep* **9**, 293-308 (1986).

Schmidt, M.H., Valatx, J.L., Sakai, K., Fort, P. & Jouvet, M. Role of the lateral preoptic area in sleep-related erectile mechanisms and sleep generation in the rat. *J. Neurosci* **20**, 6640-6647 (2000).

Schreihöfer, A.M. & Guyenet, P.G. Baro-activated neurons with pulse-modulated activity in the rat caudal ventrolateral medulla express GAD67 mRNA. *J. Neurophysiol* **89**, 1265-1277 (2003).

Schreihöfer, A.M., Stornetta, R.L. & Guyenet, P.G. Evidence for glycinergic respiratory neurons: Bötzing neurons express mRNA for glycinergic transporter 2. *J. Comp. Neurol* **407**, 583-597 (1999).

Semba, K. & Komisaruk, B.R. Neural substrates of two different rhythmical vibrissal movements in the rat. *Neuroscience* **12**, 761-774 (1984).

Sgoifo, A. et al. Electrode Positioning for Reliable Telemetry ECG Recordings During Social Stress in Unrestrained Rats. *Physiology & Behavior* **60**, 1397-1401 (1996).

Shimada, M., Tritos, N.A., Lowell, B.B., Flier, J.S. & Maratos-Flier, E. Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. *Nature* **396**, 670-674 (1998).

Smith, C. & Lapp, L. Increases in number of REMS and REM density in humans following an intensive learning period. *Sleep* **14**, 325-330 (1991).

Smith, C. & Rose, G.M. Evidence for a paradoxical sleep window for place learning in the Morris water maze. *Physiol. Behav* **59**, 93-97 (1996).

Smith, J.C., Abdala, A.P.L., Rybak, I.A. & Paton, J.F.R. Structural and functional architecture of respiratory networks in the mammalian brainstem. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci* **364**, 2577-2587 (2009).

Soulière, F. et al. Single-unit and polygraphic recordings associated with systemic or local pharmacology: a multi-purpose stereotaxic approach for the awake, anaesthetic-free, and head-restrained rat. *J. Neurosci. Res* **61**, 88-100 (2000).

Steinbusch, H.W. Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. *Neuroscience* **6**, 557-618 (1981).

Steininger, T.L., Alam, M.N., Gong, H., Szymusiak, R. & McGinty, D. Sleep-waking discharge of neurons in the posterior lateral hypothalamus of the albino rat. *Brain Res* **840**, 138-147 (1999).

Steriade, M. & Deschênes, M. Inhibitory processes and interneuronal apparatus in motor cortex during sleep and waking. II. Recurrent and afferent inhibition of pyramidal tract neurons. *J. Neurophysiol* **37**, 1093-1113 (1974).

Steriade, M. Corticothalamic resonance, states of vigilance and mentation. *Neuroscience* **101**, 243-276 (2000).

Steriade, M., Datta, S., Paré, D., Oakson, G. & Curró Dossi, R.C. Neuronal activities in brainstem cholinergic nuclei related to tonic activation processes in thalamocortical systems. *J. Neurosci* **10**, 2541-2559 (1990).

Steriade, M., Dossi, R.C. & Nuñez, A. Network modulation of a slow intrinsic oscillation of cat thalamocortical neurons implicated in sleep delta waves: cortically induced synchronization and brainstem cholinergic suppression. *J. Neurosci* **11**, 3200-3217 (1991).

Stickgold, R. & Walker, M. Memory consolidation and reconsolidation: what is the role of sleep? *Trends Neurosci* **28**, 408-415 (2005).

Stickgold, R., Hobson, J.A., Fosse, R. & Fosse, M. Sleep, learning, and dreams: off-line memory reprocessing. *Science* **294**, 1052-1057 (2001).

Stoeckel, K., Schwab, M. & Thoenen, H. 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 (1977).

Stone, T. *Microiontophoresis and pressure ejection*. (Chichester; New York, Wiley) (1985).

Stornetta, R.L. et al. A group of glutamatergic interneurons expressing high levels of both neurokinin-1 receptors and somatostatin identifies the region of the pre-Böttinger complex. *J. Comp. Neurol* **455**, 499-512 (2003).

Stornetta, R.L., McQuiston, T.J. & Guyenet, P.G. GABAergic and glycinergic presympathetic neurons of rat medulla oblongata identified by retrograde transport of pseudorabies virus and in situ hybridization. *J. Comp. Neurol* **479**, 257-270 (2004).

Stornetta, R.L., Sevigny, C.P. & Guyenet, P.G. Vesicular glutamate transporter DNPI/VGLUT2 mRNA is present in C1 and several other groups of brainstem catecholaminergic neurons. *J. Comp. Neurol* **444**, 191-206 (2002).

Sun, M.K., Hackett, J.T. & Guyenet, P.G. Sympathoexcitatory neurons of rostral ventrolateral medulla exhibit pacemaker properties in the presence of a glutamate-receptor antagonist. *Brain Res* **438**, 23-40 (1988).

Sun, M.K., Young, B.S., Hackett, J.T. & Guyenet, P.G. Reticulospinal pacemaker neurons of the rat rostral ventrolateral medulla with putative sympathoexcitatory function: an intracellular study in vitro. *Brain Res* **442**, 229-239 (1988).

Sun, M.K., Young, B.S., Hackett, J.T. & Guyenet, P.G. Rostral ventrolateral medullary neurons with intrinsic pacemaker properties are not catecholaminergic. *Brain Res* **451**, 345-349 (1988).

Swanson Brain maps: structure of the rat brain: a laboratory guide with printed and electronic templates for data, models, and schematics. (New York: Elsevier: 2004).

Swanson, L. Brain maps: structure of the rat brain: a laboratory guide with printed and electronic templates for data, models, and schematics. (New York: Elsevier: 1998).

Tagawa, T. & Dampney, R.A. AT(1) receptors mediate excitatory inputs to rostral ventrolateral medulla pressor neurons from hypothalamus. *Hypertension* **34**, 1301-1307 (1999).

Tan, W., Pagliardini, S., Yang, P., Janczewski, W.A. & Feldman, J.L. Projections of preBötzing complex neurons in adult rats. *J. Comp. Neurol* **518**, 1862-1878 (2010).

Timofeev, I., Contreras, D. & Steriade, M. Synaptic responsiveness of cortical and thalamic neurones during various phases of slow sleep oscillation in cat. *J. Physiol. (Lond.)* **494** ( Pt 1), 265-278 (1996).

Timo-Iaria, C. et al. Phases and states of sleep in the rat. *Physiol. Behav* **5**, 1057-1062 (1970).

Tononi, G. & Cirelli, C. Modulation of brain gene expression during sleep and wakefulness: a review of recent findings. *Neuropsychopharmacology* **25**, S28-35 (2001).

Trachsel, L., Tobler, I., Achermann, P. & Borbély, A.A. Sleep continuity and the REM-nonREM cycle in the rat under baseline conditions and after sleep deprivation. *Physiol. Behav* **49**, 575-580 (1991).

Trojanowski, J.Q. Native and derivatized lectins for in vivo studies of neuronal connectivity and neuronal cell biology. *J. Neurosci. Methods* **9**, 185-204 (1983).

Trulson, M.E. & Jacobs, B.L. Raphe unit activity in freely moving cats: correlation with level of behavioral arousal. *Brain Res* **163**, 135-150 (1979).

Urbain, N. et al. Unrelated course of subthalamic nucleus and globus pallidus neuronal activities across vigilance states in the rat. *Eur. J. Neurosci* **12**, 3361-3374 (2000).

Valatx, J.L., Jouvet, D. & Jouvet, M. [Electroencephalographic evolution of different states of sleep in the kitten]. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **17**, 218-233 (1964).

Van Bockstaele, E.J., Akaoka, H. & Aston-Jones, G. Brainstem afferents to the rostral (juxtafacial) nucleus paragigantocellularis: integration of exteroceptive and interoceptive sensory inputs in the ventral tegmentum. *Brain Res* **603**, 1-18 (1993).

Van Bockstaele, E.J., Pieribone, V.A. & Aston-Jones, G. Diverse afferents converge on the nucleus paragigantocellularis in the rat ventrolateral medulla: retrograde and anterograde tracing studies. *J. Comp. Neurol* **290**, 561-584 (1989).

Vanderwolf & Robinson Reticulo-cortical activity and behaviour: a critique of the arousal theory and a new synthesis. *Behaviour and Brain Sciences* **4**, 459-514 (1981).

Vanderwolf, C.H. Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **26**, 407-418 (1969).

Vanni-Mercier, G., Sakai, K., Lin, J.S. & Jouvet, M. Mapping of cholinceptive brainstem structures responsible for the generation of paradoxical sleep in the cat. *Arch Ital Biol* **127**, 133-164 (1989).

Vercelli, A., Repici, M., Garbossa, D. & Grimaldi, A. Recent techniques for tracing pathways in the central nervous system of developing and adult mammals. *Brain Research Bulletin* **51**, 11-28 (2000).

Verret, L. et al. A role of melanin-concentrating hormone producing neurons in the central regulation of paradoxical sleep. *BMC Neurosci* **4**, 19 (2003).

Verret, L., Fort, P., Gervasoni, D., Léger, L. & Luppi, P. 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 (2006).

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

Vertes, R.P. & Crane, A.M. Distribution, quantification, and morphological characteristics of serotonin-immunoreactive cells of the suprallemniscal nucleus (B9) and pontomesencephalic reticular formation in the rat. *J. Comp. Neurol* **378**, 411-424 (1997).

Vertes, R.P. & Kocsis, B. Brainstem-diencephalo-septohippocampal systems controlling the theta rhythm of the hippocampus. *Neuroscience* **81**, 893-926 (1997).

Vertes, R.P. & Kocsis, B. Projections of the dorsal raphe nucleus to the brainstem: PHA-L analysis in the rat. *J. Comp. Neurol* **340**, 11-26 (1994).

Vertes, R.P. A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol* **313**, 643-668 (1991).

Vyazovskiy, V.V. & Tobler, I. Theta activity in the waking EEG is a marker of sleep propensity in the rat. *Brain Res* **1050**, 64-71 (2005).

Wan, X.S., Liang, F., Moret, V., Wiesendanger, M. & Rouiller, E.M. Mapping of the motor pathways in rats: c-fos induction by intracortical microstimulation of the motor cortex correlated with efferent connectivity of the site of cortical stimulation. *Neuroscience* **49**, 749-761 (1992).

Webster, H.H. & Jones, B.E. Neurotoxic lesions of the dorsolateral pontomesencephalic tegmentum-cholinergic cell area in the cat. II. Effects upon sleep-waking states. *Brain Res* **458**, 285-302 (1988).

Willette, R., Barcas, P., Krieger, A. & Sapru, H. Vasopressor and depressor areas in the rat medulla. Identification by microinjection of L-glutamate. *Neuropharmacology* **22**, 1071-9 (1983).

Wolf, H.K. et al. NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology. *J. Histochem. Cytochem* **44**, 1167-1171 (1996).

Yamuy, J., Fung, S.J., Xi, M., Morales, F.R. & Chase, M.H. Hypoglossal motoneurons are postsynaptically inhibited during carbachol-induced rapid eye movement sleep. *Neuroscience* **94**, 11-15 (1999).

Youngblood, B.D., Zhou, J., Smagin, G.N., Ryan, D.H. & Harris, R.B. Sleep deprivation by the "flower pot" technique and spatial reference memory. *Physiol. Behav* **61**, 249-256 (1997).

# ***ARTICLE 1***



**Role of the lateral paragigantocellular nucleus in the network of paradoxical  
(REM) sleep in the rat.**

Chrystelle Sirieix, Pierre-Hervé Luppi, Damien Gervasoni and Lucienne Léger

Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon, INSERM U1028, CNRS UMR5292,  
Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, Faculté de Médecine Laënnec 7 rue  
Guillaume Paradin 69372 Lyon cedex 08, France

Pages #22

Figures # 12

Tables # 4

Corresponding author :

Lucienne Léger  
CRNL CNRS 5292,  
Faculté de Médecine Laënnec,  
7 rue Guillaume Paradin  
69372 Lyon cedex 08, France

Phone # +33 478 77 10 41

Fax # +33 478 77 10 22

Email : leger@sommeil.univ-lyon1.fr

## INTRODUCTION

Since the discovery of the second state of sleep named paradoxical (or REM) sleep (PS) fifty years ago, vigorous efforts have been accomplished to decipher the neuronal network responsible for its genesis and maintenance (McCarley and Hobson 1975; Sakai et al. 1981; Luppi et al. 2006). It is well accepted that its genesis occurs in the brainstem (Carli and Zanchetti 1965; Webster and Jones 1988) and the hypotheses proposed have evolved from a reciprocal interaction between two neuronal populations (McCarley and Hobson 1975; Sakai 1988) to a true network involving distributed groups of neurons in the brainstem (Luppi et al. 2006; Lu et al. 2006). Within this network, a small region of the dorsal pontine reticular nucleus, coined peri-locus coeruleus (LC) alpha in the cat and sublaterodorsal nucleus (SLD) in the rat, appears as a critical nucleus through which it is possible to pharmacologically induce PS with short latencies (Vanni-Mercier et al. 1989; Boissard et al. 2002).

It is well accepted that two kinds of neurons participate in the regulation of this network. On the one hand, PS-On neurons that are more active during PS and remain silent during waking (W), and on the other hand PS-Off neurons that are silent during PS and active during W (Sakai 1988). As expected, both the peri-LC alpha and the SLD contain PS-On neurons (Sakai 1988; Boissard et al. 2002). Conversely, the bulbopontine monoaminergic nuclei (noradrenergic LC and serotonergic raphe nuclei) have long been known as containing PS-Off neurons (Aston-Jones and Bloom 1981; Jacobs et al. 1981).

Recent studies have established that the lateral paragigantocellular nucleus (LPGi), located in the rostral ventrolateral medulla (RVLM) and involved in the sympathetic regulation of blood pressure (Guyenet et al. 1990; Dampney 1994), could be an integral part of the network regulating PS. Indeed, this nucleus contains a large number of neurons expressing Fos during the PS hypersomnia that follows a selective deprivation (Verret et al. 2005; 2006). Among the Fos-labelled neurons, more than two-thirds are GABAergic (Sapin et al. 2009) and more than one fourth send efferent fibers to the LC (Verret et al. 2005; 2006). Since the LC neurons are inhibited by GABA during PS (Gervasoni et al. 1998), it has been postulated that this inhibition could partly arise from the LPGi (Verret et al. 2006). In addition, the LPGi contains catecholaminergic neurons which could participate in the inhibition of PS, due to the Fos activation of some of them during PS deprivation (Léger et al. 2009). Given these data, it can be hypothesized that the LPGi contains both PS-On and PS-Off neurons but their presence remains to be demonstrated *in vivo*. Therefore, the first aim of this work was to characterize the mode of discharge of the LPGi neurons across the sleep-waking

cycle, in order to reveal the possible presence of neurons discharging specifically during PS or, on the contrary, being quiescent during PS. This was performed by using the head-restrained rat model (Darracq et al. 1996; Soulière et al. 2000; Gervasoni et al. 1998).

In the present work, we defined the LPGi as the group of neurons encompassing both the RVL and the LPGi defined by Paxinos and Watson (Paxinos and Watson 1998). Several anatomical studies, using retrograde and anterograde tracers, have disclosed the afferent and efferent connections of the LPGi (Van Bockstaele et al. 1989; Andrezik et al. 1981a; Ross et al. 1984; Guyenet and Young 1987; Card et al. 2006). However, nothing is known of the connections activated during PS, although this knowledge is necessary to determine the anatomical place of the LPGi in the PS network. Consequently, the second aim of our work was to localize the neurons that are both activated during PS and send afferents to the LPGi. Cholera toxin subunit b (CTb) was injected as a retrograde tracer in the LPGi, before submitting the animals to a PS deprivation-recovery protocol and a double immunohistochemical labelling for Fos and CTb (see Verret et al. 2006). The efferent projections were visualized with the immunohistochemical detection of PHA-L after the injection of this anterograde tracer in the LPGi.

The presence in the LPGi of a large number of neurons expressing Fos during PS hypersomnia and the anatomical vicinity of this nucleus with the ventral gigantocellular nucleus (GiV), known as the medullary relay of the PS muscle atonia, opens the possibility of a similar role for both nuclei. Indeed, like in the GiV, a substantial percentage of the LPGi Fos neurons are glycinergic and receive axons from the SLD (Boissard et al. 2002), and are thus potentially devoted to the inhibition of the spinal and/or medullary motoneurons. To explore this possibility we injected CTb in the facial nucleus commanding the face, including the whiskers muscles.

We have found that the LPGi indeed contains PS-On and PS-Off neurons. In addition, we have found that its main activated afference lies in the SLD, the executive area of PS network, and that it might be involved in the muscle atonia occurring during PS.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Electrophysiology**

#### *The head restrained rat method*

The procedure (fixation of the head restraining system and chronic implantation for the polygraphic recordings) has been previously described in detail (Goutagny et al. 2008; Boissard et al. 2002). All experiments were conducted in accordance with the European Community Council Directive (86/609/EEC). The protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of our University (BH 2006-09). Every effort was made to minimize the number of animals used and their suffering. Briefly, male Sprague-Dawley rats (220-240g, Charles River, L'Arbresle, France) were anesthetized with pentobarbital and mounted conventionally in a stereotaxic frame (David Kopf, CA, USA). Three electrodes were fixed in the skull above the frontal, parietal and occipital cortex and one more was fixed as a reference above the cerebellum to monitor the EEG. Two wire electrodes were inserted into the neck muscles to monitor the EMG. The head restraining system was then put in place. After recovery (2 days), the rats were habituated to the restraining and recording system for 8-10 days. At the end of the training, they could stay calm for 5-6 hours daily sessions during which active W (with movement), quiet W (without movement), slow wave sleep (SWS) and PS were routinely observed. After the habituation process and before the first single-unit recording session, rats were anesthetized with pentobarbital and a 4 mm hole was drilled over the LPGi. Daily recording sessions were typically performed over a maximum of 7-10 days, each session lasting 4-6 hours. The brain surface was cleaned under local lidocaine anaesthesia at the beginning of each recording session.

#### *Recording and analysis of neuronal activity*

Extracellular recordings of LPGi neurons were performed using a single-barrel glass micropipette (external tip diameter, 2-3  $\mu\text{m}$ ) filled with 0.5M sodium acetate or a neuroanatomical tracer (CTb, a retrograde tracer or PHA-L, an anterograde tracer). Electrode impedance measured at 10Hz ranged between 5 and 10 M $\Omega$ . Filtered (AC, 0.3-10kHz) and unfiltered (DC) electrode signal were amplified (P16, Grass Instruments, IR USA) and fed to storage oscilloscopes and an audio monitor (GRASS AM8 Audiomonitor). Single unit activity

(signal-to-noise ratio of at least 3:1) was isolated with an amplitude spike discriminator (Neurolog Spike Trigger, Digitimer Ltd., UK). The polygraphic signals (EEG and EMG; sample rate 500Hz each) were amplified (P15). The single unit activity, polygraphic signal, the AC trace (sampling rate 15kHz) and a video acquisition of the rat behaviour were collected and stored on a personal computer via a Cambridge Electronic Design (Cambridge, UK) interface using Spike 2 software. Neurons from the LPGi were identified 1/ by their stereotaxic location (Bregma anteroposterior, -12.4 mm; lateral 1.2 to 2.4 mm; ventral 8.5 to 9.5mm); 2/ on line by comparison with the unit recordings in adjacent brain areas during the electrode penetration through the cerebellum (dorsally), the pre-Bötzing nucleus (immediately dorsal and lateral); and 3/ off-line after injection of an anatomical tracer for localization of the recording sites.

### *Analysis*

The mean discharge rates of individual neurons recorded during W, SWS and PS were calculated by averaging spike counts made for at least 30 seconds continuous recordings in one given vigilance state. The effects of behavioural states on the discharge of each class of recorded neurons were assessed with a Friedman test followed by a Wilcoxon's test (paired data). A p value inferior to 0.05 was considered statistically significant. The discharge pattern of neurons was appreciated by first-order interspike interval (ISI) histograms (ISHs), displaying the distribution of intervals between consecutive spikes. For each vigilance state, an asymmetric index (AS) was defined as the ratio mode (the most frequent ISI) to the mean ISI (the reciprocal of the mean firing rate). Thus, an AS near the unit reveals a relatively regular discharge pattern, whereas when the index differs from the unit, the more irregular is the spike train (Urbain et al. 2000). Coefficient of variation (CV) of firing interval was calculated during all vigilance states. It is defined as the ratio of the standard deviation of ISI on the mean of inter-spikes intervals. Consequently, a bursty neurons is characterised by a high CV (Koyama et al. 2003). For PS-On and PS-Off neurons, the onset of the firing increase and decrease was defined as the time when the firing rate during three consecutive 1-s bins was at least 2 standard deviations larger or smaller than the mean rate during 30-60 seconds before the state transition. IA and CV were analysed with a Friedman test followed by a Wilcoxon's test (paired data). All data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M and the significant level for all statistical analyses was set at  $p < 0.05$ .

## Neuroanatomy

### *CTb and PHA-L injections into the LPGi*

All the animals used for the electrophysiological experiments received tracer injections, either one tracer only or both CTb and PHA-L. The injections were made during the recording sessions when a PS-On or a PS-Off neuron was recorded.

Other animals (male Sprague-Dawley rats, 220-240g) were only used for the anatomical study. In this case, they were anesthetized with pentobarbital and mounted conventionally in a stereotaxic frame with ear bars and head holder. The bone was exposed and cleaned, and a hole was made under the LPGi stereotaxic coordinates. A single-barrel glass micropipette (external tip 2-3 $\mu$ m) filled with CTb or PHA-L was lowered into the brain with a micromanipulator. The localisation of the LPGi was assessed by recording the neuronal activity along the electrode tract: 8 mm after the last neurons recorded in the cerebellum and right after the last respiratory neuron recorded in the pre-Bötzing nucleus. Once the electrode tip was in place within the LPGi, CTb or PHA-L were iontophoretically injected (+2 $\mu$ A, 7s on, 7s off, during 15 min for CTb; +5 $\mu$ A, 7s on, 7 s off, during 15 min for PHA-L). Three electrodes were fixed in the skull above the frontal, parietal and occipital cortex and one more was fixed above the cerebellum to monitor the EEG. Two wire electrodes were inserted into the neck muscles to monitor the EMG. The animals were allowed a week recovery from surgery in individual Plexiglas containers.

### *CTb injections into the facial nucleus*

In order to determine the afferents of the LPGi activated during PS, animals received an iontophoretical injection of CTb at the following coordinates: Bregma anteroposterior, -11 mm; lateral 2 mm; ventral 8.5 to 9.5mm. They were then submitted to the PS deprivation-protocol.

### *Paradoxical sleep deprivation and recovery*

PS deprivation was performed using the flowerpot technique that has been previously shown to induce a fairly selective deprivation of PS in rats. This technique is known to cause no significant change in adrenal gland weights, a measure of stress level in animals

(Mendelson et al. 1974; Maloney et al. 1999; Verret et al. 2006; Sapin et al. 2009; Léger et al. 2009). Rats were divided into 3 groups: control (PSC), deprived of PS (PSD) and PS recovery (PSR). The PSC animals remained on a bed of woodchips in the recording room throughout the experiment. After 48h of baseline recordings, PSD and PSR rats were placed (10.00 AM) for 72h on a platform surrounded by 2cm of warm water. The platform was just large enough (6.5 cm in diameter) to hold the animal. In this setting, the animal could engage in SWS but not PS because of the loss of muscle tone that occurs during PS. Each morning (between 10.00 and 11.00 AM), rats were removed from their platform in order to clean the jar and placed in another Plexiglas jar where they could groom and stretch. On the last day, PSR animals were removed from the platform (10.00AM) and returned to a dry bed of woodchips in their recording jars to allow a PS recovery for exactly 150 min after the first PS episode (generally occurring after 30-45 min of exploration and grooming). During that time, PSD rats were kept deprived on the platform. Finally, PSC animals were first anesthetized for perfusion (at 12.00AM) followed by PSD and then PSR rats.

#### *Histology and immunohistochemical procedure*

The animal were perfused with a Ringer's lactate solution containing 0.1% heparin, followed by 500mL of a fixative composed of 4% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer (PB; pH 7.4). The brains were postfixed overnight in the same fixative at 4°C and then stored at 4°C for at least 3 days in 0.1M PB with 30% sucrose. They were rapidly frozen in a -50°C-isopentane solution. Coronal 25 µm-thick sections were obtained with a cryostat (Microm, France) and stored in 0.1M PB, PH 7.4, containing 0.9% NaCl, 0.3% Triton X-100 (PBST) and 0.1% sodium azide (PBST-Az).

For double immunostaining experiments, free-floating sections were successively incubated in: 1/ a rabbit antiserum to Fos (1:10,000; Oncogene) in PBST-Az for 3 days at 4°C; 2/ a biotinylated donkey anti rabbit IgG (1:1,000; Rockeland) for 90 min at room temperature; and 3/ an ABC-HRP solution (1:1,000; Elite kit, Vector Laboratories) for 90 min at room temperature. The sections were immersed in a 0.05M Tris-HCl buffer (pH 7.6) containing 0.025% 3,3'-diaminobenzidine-4HCl (DAB; Sigma, Saint Quentin Fallavier, France), 0.003% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 0.6% nickel ammonium sulphate for about 10 min at room temperature. When judged optimal under the microscope, the reaction was stopped by two rinses in PBST-Az. After an overnight rinse in PBST-Az, the free-floating sections were incubated in 1/ a goat anti-serum to CTb (1:40,000, List Biological Laboratories) or a rabbit



anti-serum to PHA-L (1:5,000, Vector labs) in PBST-Az for 3 days at 4°C; 2/ a biotinylated horse anti-goat IgG (1:1,000, Vector Laboratories) or a biotinylated horse anti-rabbit IgG (1:1,000, Rockland) for 90 min at room temperature; and 3/ and ABC-HRP solution (1:1,000 Elite kit Vector Laboratories) for 90 min at room temperature. Finally, the sections were immersed for about 6 min at room temperature in the same DAB as above but without the nickel salt. The sections were then mounted on a gelatine-coated slides, dried, dehydrated and coverslipped with DePex.

Controls with omission of the primary or secondary antibodies were run to check for the absence of nonspecific staining and crossreactions in the dual immunostainings performed with two primary antibodies made in the same species, here rabbit for Fos/PHA-L labeling. The clear-cut presence of three populations of immunoreactive (IR)-neurons, i.e. single Fos, single CTb and double-labelled Fos/CTb neurons strongly argued against any cross-reaction. The antiserum to Fos was made against a synthetic peptide corresponding to the N-terminal part (residues 4-17) of human Fos. This part of the protein displays 100% homology between human and rat and no homology with Fos-related antigens such as Fos B, Jun B, Fra-1 and Fra-2 (Blast 2 sequences, NCBI). The antiserum to CTb was made against the purified b subunit of cholera toxin. The antiserum to PHA-L was generated against both the erythroagglutinin (E) and the leucoagglutinin (L) forms of *Phaseolus vulgaris*.

The photographs were taken with the CCD Color 10-bit QiCam camera used to plot the labelled neurons. They were imported into Adobe Photoshop 7.0, digitally adjusted for brightness and contrast, and were assembled into plates at a resolution of 300 dpi

The analysis of the neurons singly or double-labelled after the CTb injections was made on 12 animals, 4 PSC, 4 PSD and 4 PSR, similarly to previous works from our laboratory (Verret et al, 2005; 2006; Sapin et al. 2009; 2010 ; Léger et al. 2009; 2010). To illustrate the distribution of the labelling across the brain and to count the neurons, drawings of the double immunostained sections were made with an image analysis system (Mercator, ExploraNova, La Rochelle, France) coupled to a Zeiss Axioskop microscope equipped with a motorized X-Y sensitive stage. Only the single CTb and the double-labelled Fos/CTb neurons were plotted and, once plotted, were automatically counted by the software Mercator. The distribution and numbers of the single Fos neurons, in the areas of interest here, were similar to those observed in previous studies from our laboratory with rats submitted to the same experimental protocol (Verret et al. 2005; 2006; Sapin et al. 2009; 2010; Léger et al. 2009; 2010). Consequently, these single Fos neurons were not quantified in the present study. The

single CTb and double-labelled Fos/CTb neurons were plotted on sections taken at 600  $\mu$ m intervals from the caudal level of the LPGi (Bregma -13,30 mm) to the prefrontal cortex (Bregma +2,30 mm), i.e. on 27 sections (Paxinos et Watson 1998). Most of the nuclei being present in more than one section, the neurons counted in all sections were summed. For each nucleus of interest, the mean  $\pm$  S.E.M number of neurons was determined ipsilaterally and contralaterally to the CTb injection. The nuclei located on the midline were analyzed as a single entity.

### *Statistic analysis*

For each structure of interest, the mean  $\pm$  S.E.M numbers of CTb-IR cells and CTb/Fos double-labelled cells counted in the sides ipsilateral and contralateral to the CTb injection were then averaged (mean $\pm$ S.E.M) and are reported in Table 3. For each structure, a Kruskal-Wallis test was performed with group (PSC, PSD, and PSR) as a factor in order to test the differences in the number of labelled neurons between the experimental groups. A Mann and Whitney test was also used to identify significant pairwise differences. All data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M and the significant level for all statistical analyses was set at  $p < 0.05$ .

## **RESULTS**

### **Electrophysiology**

The localization of each recorded neurons was estimated post-mortem by assessing on brainstem sections the location of the CTb deposit, corresponding to the area where cells were recorded. In this context, a sample of 50 neurons was recorded in the LPGi (n=10 rats) during at least one complete sleep-waking cycle (with W, SWS and PS). Neurons recorded outside of the LPGi, i.e. the parvocellular nucleus dorsal to the LPGi, were not considered further.

Among 50 neurons recorded in the LPGi across a complete cycle, 21 could be classified as PS-On neurons (Figure 1). Their firing rate was significantly increased during PS ( $18.61 \pm 2.64$  Hz) vs W ( $4.94 \pm 0.99$  Hz) and SWS ( $8.11 \pm 1.61$  Hz). Their mean of firing rate was not significantly different between W and SWS. Some of them were almost completely silent during W and SWS (Figure 1, Table 1). The CV of the PS-On group

assessed that their firing mode was more phasic during W ( $4.08 \pm 1.03$ ) than during SWS ( $2.28 \pm 0.31$ ) and PS ( $1.98 \pm 0.11$ ). The value of the CV during PS is suggestive of a phasico-tonic pattern of discharge for these neurons. No differences were noticed for the AI during all vigilance states (W=  $0.30 \pm 0.06$ ; SWS= $0.28 \pm 0.06$ ; PS= $0.26 \pm 0.05$ ) (Table 1, Figure 6). In addition and of functional significance, these PS-On neurons start to increase their firing rate about 20 seconds before the onset of PS (Figure 2).

The second group is formed by 8 neurons that were considered as PS-Off neurons (Figure 3, 4). Indeed, their firing rate was significantly decreased during PS ( $0.45 \pm 0.14$  Hz) vs W ( $5.72 \pm 1.57$  Hz) and SWS ( $4.36 \pm 1.45$  Hz). These neurons stopped firing immediately at the onset of the PS episodes and showed a non-significant difference of their firing rate, between W and SWS (Figure 5, Table 1). The value of their CV was indicative of a tonic firing rate during both W ( $2.90 \pm 0.32$ ) and SWS ( $2.81 \pm 0.67$ ). This is also confirmed by the AI value during both W ( $0.35 \pm 0.09$ ) and SWS ( $0.40 \pm 0.08$ ).

The last group is formed by neurons located in the LPGi but not showing a state-related activity. These state-indifferent neurons mostly exhibited a tonic mode of discharge during the sleep-waking cycle. The mean firing rate was not significantly different during W ( $13.08 \pm 3.66$  Hz), SWS ( $13.15 \pm 3.21$  Hz) and PS ( $13.72 \pm 3.81$  Hz) (Table 1).

Finally, we determined whether the three groups of neurons recorded in the LPGi could be differentiated by their spike characteristics (i.e. spike waveform and duration). The extracellular action potentials are usually recorded as a positive deflection followed by a negative one. According to a previous classification for brainstem neurons (Koyama et al. 1998), spikes with a positive deflection lasting more than 0.75 ms followed by long negative deflection are classified as broad spikes. Spikes with shorter characteristics are classified as brief spikes. Here, all subgroups of neurons depicted brief spikes, therefore could not be differentiated on this ground (Table 2).

## Neuroanatomy

### *Afferent connections of the LPGi*

Only the CTb sites located in the main part of the LPGi, caudal to the facial nucleus, were considered in this study (Figure 7A).

The distribution of the CTb retrogradely labelled neurons is illustrated in Figure 11 on the 10 most representative frontal planes, according to Paxinos and Watson (1998). It is readily seen that the CTb-labelled cells are widely distributed in the brain, from the level of the LPGi caudally to the motor neocortex rostrally.

The number of single CTb and double Fos/CTb neurons was quantified in 32 areas. The numbers for each area in each experimental condition are displayed in Table 3.

When the sum of the ipsi- and contralateral sides is made, it appears that the largest number of single CTb- neurons was counted in the LPGi (117 neurons) (Figure 11A, B, C). In decreasing order, after the LPGi, are the DpMe (105 neurons) (Figure 11E, F), the lateral periaqueductal gray (PAG) (93 neurons) (Figure 11E, F), the gigantocellular nucleus (79 neurons) (Figure 11A, B, C), the ventrolateral PAG (vIPAG) and the solitary tract nucleus (70 neurons each) (Figure 11A, B, C, E). Apart from the LPGi where the number of CTb neurons was highest contralaterally, in the just mentioned nuclei the number of CTb neurons was highest ipsilaterally, sometimes by 6 times, like in the solitary tract nucleus (59 neurons ipsilaterally vs 11 contralaterally). This was also the case for all the other areas examined, apart for the dorsal paragigantocellular nucleus (Table 3). In addition, retrogradely labelled neurons were observed in the bed nucleus of the stria terminalis and in different subdivisions of the cortex, namely the insular, auditory, somatosensory and motor cortex (Figure 11G, H, I, J).

As concerns the numbers of double-labelled Fos/CTb, neurons, only the nuclei where significant differences are apparent between at least 2 conditions, will be described. The number of Fos/CTb neurons was significantly higher in the PSR condition than in the PSC condition in 5 areas. These areas were the gigantocellular nucleus, pars alpha ( $p < 0.001$ ), the raphe magnus nucleus ( $p < 0.001$ ), the deep mesencephalic nucleus (DpMe) ( $p < 0.05$ ), the dorsomedian PAG ( $p < 0.001$ ) and the lateral hypothalamic area ( $p < 0.001$ )

(Figure 7 D). Two structures displayed a significantly higher number of Fos/CTb in the PSD condition vs the PSC condition: the lateral PAG ( $p < 0.001$ ) and the ventrolateral (vIPAG) ( $p < 0.001$ ) (Figure 8C).

Moreover, 4 structures showed a significant difference between the PSR and PSD conditions: the SLD ( $p < 0.001$ ) (Figure 7 B), the DpMe ( $p < 0.001$ ), the dorsomedian PAG ( $p < 0.05$ ) and the lateral PAG ( $p < 0.05$ ). The SLD showed the greatest number of Fos/CTb labelled neurons (7 neurons ipsilaterally and 5 contralaterally), which represent 48% of the CTb-labelled neurons in the ipsilateral part and 39% in the contralateral part.

#### *Efferent projections of the LPGi*

The anterograde tracing visualized with PHA-L showed that the LPGi sends axons to a large number of nuclei from caudal to rostral levels of the brain. At the medulla level, an important projection was found in the contralateral LPGi and the solitary tract nucleus, mainly its commissural part (Figure 9B, D). A moderate number of axons was found in the lateral part of the facial nucleus (Figure 9J). At the pons level, a conspicuous projection from the LPGi was observed in the LC (Figure 9C), the lateral parabrachial nucleus (Figure 9E), the Kölliker-Fuse nucleus (Figure 9F) and the noradrenergic A5 area (Figure 9H). At the mesencephalic level, a substantial number of axons were visualized mainly in the vIPAG (Figure 9G).

#### *Afferent connections of the facial nucleus*

The distribution of the retrogradely labelled neurons after injection of CTb in the facial nucleus was in full agreement with the data of other authors (for review see Fay and Norgren 1997). The majority of the neurons was located in the neighbouring reticular formation and was particularly numerous in the intermediate reticular nucleus (Table 4).

The numbers of single CTb and double-labelled Fos/CTb neurons were quantified on 5 medullary stereotaxic levels, similar to the levels used in the Fos/CTb sections, and in the PSR condition only ( $n=3$ ) after injection of CTb in the facial nucleus (Figure 10A). The highest number of single CTb-labelled neurons was counted in the intermediate reticular nucleus. Surprisingly, the highest number of double-labelled Fos/CTb neurons was counted in the LPGi (Figure 10B). Indeed, the LPGi contained 28% of the double-labelled neurons

counted in the medulla. The second more important percentage (20%) was in the ventral gigantocellular nucleus. The intermediate nucleus only contained 16% of the double-labelled neurons (Table 4).

## **DISCUSSION**

### **Electrical activity of the LPGi neurons during the sleep-waking cycle**

Our electrophysiological results show that the LPGi is a heterogeneous structure, containing three groups of neurons, PS-On and PS-Off neurons, and neurons with a firing mode not related to the sleep-waking cycle. It is of special interest to note that both PS-on and PS-off neurons were encountered in the LPGi, two kinds of neurons involved in the control of the state of PS.

Sakai (1988) proposed a complete definition for a PS-On neuron. This author suggested that a PS-On neuron should significantly increase its firing rate during PS. Moreover, in the strictest sense of the word, a PS-On neuron must be silent during both W and SWS. Among the neurons we recorded in the LPGi, a small number was nearly silent during both these states, W and SWS. Most neurons displayed a progressive increase of their firing rate from W to SWS and more so to PS but, still, had a significantly higher rate of discharge during PS. These data are in accordance with those other authors using the head-restrained rat preparation or freely-moving animals, in different areas of the brainstem or the hypothalamus (Goutagny et al. 2008; Boissard et al. 2002; Hassani et al. 2009; 2010). In addition, we have shown that the LPGi PS-On neurons anticipate the onset of PS by a few seconds. This can be taken as a good evidence of their involvement, not only in the control of PS, but also in its genesis.

Nothing is known of the neurotransmitter(s) expressed by these PS-On neurons. From the work by Sapin et al (2009) it is tempting to speculate that part of them is GABAergic. Using juxtacellular labeling followed by immunohistochemical detection of VGAT, a marker of GABAergic neurons, would help answer the question (see Hassani et al. 2010).

The adrenergic C1 area is located within the LPGi (Reis et al. 1984; Atkinson et al. 1986; Morrison et al. 1988). Using the same PS deprivation-recovery protocol, it was recently shown that some of the adrenergic C1 neurons were labelled after PS deprivation (Léger et al. 2009), suggesting at that time that they could be PS-Off neurons. In support of this suggestion, it should be reminded that the noradrenergic LC neurons are true PS-Off neurons

(Aston-Jones and Bloom 1981; Gervasoni et al. 1998). Therefore, we can hypothesise that the neurons, recorded here in the LPGi and silent during both SWS and PS, belong to the C1 adrenergic group. One possibility to test this hypothesis would be to identify the chemical nature of these PS-Off neurons by juxtacellular labeling followed by immunohistochemical detection of PNMT, the synthesis enzyme of adrenaline.

Additionally, it can be suggested that the PS-Off neurons could be inhibited during PS by the local, potentially GABAergic neurons.

### **Afferences of the LPGi activated during PS recovery and deprivation**

Our results obtained with retrograde CTb tracing show that the axons innervating the LPGi originate in a high number of nuclei and areas distributed from the reticular formation surrounding the LPGi to the rostral most levels of the cerebral cortex. In agreement with several authors using anatomical or electrophysiological methods, we found that the LPGi receives afferences from the contralateral part of the LPGi, the raphe pallidus and the gigantocellular nuclei (Andrezik et al. 1981a; Van Bockstaele et al. 1989), the nucleus of the solitary tract (Van Bockstaele et al. 1989; Andrezik et al. 1981b; Ross et al. 1985; Lovick 1988), the parvocellular reticular nucleus (Van Bockstaele et al. 1989; Oskutyte et al. 2006), the raphe magnus nucleus (Andrezik et al. 1981a; Lovick 1988), the lateral parabrachial and the Kölliker-Fuse nuclei (Van Bockstaele et al. 1989; Andrezik et al. 1981a; Lovick 1988), the PAG (Van Bockstaele et al. 1989; Lovick 1988), the hypothalamic paraventricular nucleus (Van Bockstaele et al. 1989; Andrezik et al. 1981a; Badoer 2001; Tagawa and Dampney 1999), the lateral hypothalamic area (Van Bockstaele et al. 1989; Andrezik et al. 1981a; Dampney et al. 1987) and the central nucleus of the amygdala (Saha 2005). A small number of retrogradely labelled cell were also encountered in the insular and somatosensory cortices as observed by (M'hamed et al. 1993). In all of these anatomical works, the authors used HRP, WGA-HRP or fluorogold as retrograde tracers. In the present, using CTb known as a very sensitive retrograde tracer, we were able to identify additional afferences to the LPGi. These are the dorsal paragigantocellular nucleus, the intermediate reticular nucleus, the ventral gigantocellular nucleus, the gigantocellular nucleus pars alpha, the nucleus raphe obscurus, the medial parabrachial nucleus, the SLD, the DpMe, the posterior hypothalamus, the dorsal and dorsomedian hypothalamic nuclei, the perifornical nucleus, the zona incerta and the auditory and motor neocortex.



CTb was shown to be a very specific retrograde tracer when injected microiontophoretically, i.e. without tissue lesioning (Luppi et al. 1991). Therefore, the additional areas observed here as containing retrogradely labelled cells can safely be considered as true afferents of the LPGi. However, a definitive conclusion will only be drawn when the projections are confirmed by injecting an anterograde tracer in the mentioned areas.

With our protocol of PS deprivation and recovery double-labelled Fos/CTb neurons have been counted in several areas of the brain. Among these areas, the gigantocellular nucleus pars alpha, the raphe magnus nucleus and the lateral hypothalamic area exhibit a significantly higher number of Fos/CTb labelled neurons in the PSR condition than in the PSC condition. In these 3 areas, there is no difference between the PSR and the PSD conditions, suggesting that they are activated during PS but are not involved in PS regulation. However, the lateral hypothalamic area is known to contain PS-On neurons (Alam et al. 2002), some of which identified as MCHergic (Hassani et al. 2009) and others as GABAergic (Hassani et al. 2010). We propose that the LPGi receives some MCH or GABAergic inputs from the lateral hypothalamic area during PS.

Sapin et al. (2009) identified activated GABAergic neurons in the PAG/DpMe complex during both rebound and deprivation conditions, suggesting that there are both PS-On and PS-Off GABAergic neurons in this area. Our results show that the DMPAG and the DpMe are afferent to the LPGi and contain neurons activated during PS. In our case, the afferents coming from the DpMe and the DMPAG are activated during PS, suggesting that these neurons could be PS-On and some of them might be GABAergic. However, we do not observe any afferent neurons to the LPGi activated in the PSD condition in these areas. This suggests that GABAergic PS-Off neurons are not afferent to the LPGi.

The number of double-labelled neurons counted in the lateral PAG and the vIPAG are significantly higher in the PSD condition than in the PSC condition. The difference is also important for the lateral PAG between the PSD and the PSR conditions. These results suggest that both areas could contain PS-Off neurons projecting to the LPGi. GABAergic PS-Off neurons were found in both areas by (Sapin et al. 2009). Therefore, we propose that the PS-On neurons recorded in the LPGi might receive an inhibitory input from the LPAG and vIPAG during W and/or SWS.

One of the most salient results of this anatomical study is that the SLD constitutes the major LPGi afference activated during PS. Indeed, this nucleus contains the highest number of double-labelled Fos/CTb neurons among the areas showing double-labelled neurons in the PSR condition. Compared to the lateral hypothalamic area that displays nearly the same

number of Fos/CTb neurons but occupies a much higher volume in the brain, it is clear that the group of double-labelled neurons in the SLD is much more compact. In addition, both ipsi- and contralateral parts of the SLD contribute to this input. The SLD contains PS-On neurons and is thought to be the executive area of SP (Boissard et al. 2002; Luppi et al. 2010). Recently, it was shown that the majority (85%) of the Fos-labelled neurons in the PSR condition are glutamatergic (Clément et al. 2011). Consequently, we demonstrate for the first time that the SLD sends projections activated during PS to the LPGi. We propose that the LPGi is controlled by a glutamatergic excitatory input from the SLD during PS.

It is well known that the LPGi sends efferent axons to the LC (Ennis and Aston-Jones 1988; Van Bockstaele et al. 1989; Guyenet and Young 1987). Our PHA-L tracing confirms this data.

The second most interesting result of this anatomical study is that the LPGi sends axons onto the facial motor nucleus issued from neurons activated during PS. Indeed, nearly 30 % of the double-labelled Fos/CTb neurons counted in the medulla during the PS recovery are located in the LPGi. Since a large contingent of GABAergic neurons (Sapin et al. 2009) and glycinergic neurons (Boissard et al. 2002) was shown to be Fos-labelled in the LPGi during the PS recovery period, it is tempting to speculate that part of the Fos/CTb neurons observed here could be GABAergic and/or glycinergic. Therefore, we propose that one of the important roles of the LPGi in PS regulation is to inhibit the facial motoneurons via GABA and/or glycine. This would extend the so far recognized roles of the LPGi to an involvement in the muscle atonia that occurs during PS.

In conclusion, we propose that the LPGi is strongly excited by the SLD, the executive area of PS, and inhibits the facial motoneurons during PS to participate in the muscle atonia occurring during PS (Figure 12).

## **FIGURES AND TABLES**

*Figure 1:* Mean of firing rate of each PS-On neuron recorded in the LPGi across the three vigilance states. (see Figure 31 )

*Figure 2:* Graph of the spike density for the PS-On neurons before and after the PS onset. (see Figure 32 top)

Figure 3: Mean of firing rate of each PS-Off neuron recorded in the LPGi across the three vigilance states. (see Figure 34)

Figure 4: An example of a PS-Off neuron recorded in the LPGi. (see Figure 33, page 99)

Figure 5: Graph of the spike density for the PS-Off neurons, before and after the PS-onset. (see Figure 35 top)

Figure 6: Electrophysiological characteristics of PS-On neurons from the LPGi. (see Figure 36)

Figure 7: Photomicrograph of Fos/CTb double labelled neurons in the LPGi (site of CTb), SLD, vIPAG, LH in PSR condition. (see Figure 42 A-D)

Figure 8: Photomicrograph of Fos/CTb double labelled neurons in the vIPAG in PSD condition (see Figure 43 C)

Figure 9: Photomicrograph of PHAL or CTb anterograde labelling in the LPGi (site of PHA-L), contralateral part of the LPGi, LC, NTS, LPB, KF and VII nucleus. (see Figure 44A, B, C, D, E, F, J)

Figure 10: Photomicrograph of Fos/CTb double labelled neurons after injection of CTb in the VII nucleus. Site of CTb in the VII nucleus and Fos/CTb labelled neurons in the LPGi in PSR condition. (see Figure 45)

Figure 11: Schematic distribution of the CTb-IR cells contralateral and the CTb-IR and CTb/Fos double-labelled neurons ipsilateral to the CTb injection site in the LPGi ten brain levels in representative animals for Control (top), PS Deprivation (middle), and PS Rebound (bottom) conditions. (see Figure 41A-J)

Figure 12. Neuronal network responsible for the genesis and maintenance of paradoxical sleep. (see Figure 48)

Table 1: Electrophysiological characteristics of the three types of neurons recorded in the LPGi (see Table 5).

Table 2: Duration of the positive and negative deflections of the three types of neurons action potential. (see Table 6)

Table 3: Number of CTb and Fos/CTb labelled neurons after CTb injection in the LPGi in PSC, PSD and PSR condition (see Table 9).

Table 4: Number of CTb and Fos/CTb labelled neurons after CTb injection in the VII nucleus in PSR condition (see Table 10).

## **REFERENCES**

- Alam, M.N. et al. Sleep-waking discharge patterns of neurons recorded in the rat perifornical lateral hypothalamic area. *J. Physiol. (Lond.)* **538**, 619-631 (2002).
- Andrezik, J.A., Chan-Palay, V. & Palay, S.L. The nucleus paragigantocellularis lateralis in the rat. Conformation and cytology. *Anat. Embryol* **161**, 355-371 (1981).
- Andrezik, J.A., Chan-Palay, V. & Palay, S.L. The nucleus paragigantocellularis lateralis in the rat. Demonstration of afferents by the retrograde transport of horseradish peroxidase. *Anat. Embryol* **161**, 373-390 (1981).
- Aston-Jones, G. & Bloom, F.E. Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep-waking cycle. *J. Neurosci* **1**, 876-886 (1981).
- Atkinson, J. et al. Chronic clonidine treatment and its withdrawal: effects on blood pressure and catecholamine synthesizing enzymes in brain-stem nuclei. *Eur. J. Pharmacol* **121**, 97-106 (1986).
- Badoer, E. Hypothalamic paraventricular nucleus and cardiovascular regulation. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol* **28**, 95-99 (2001).
- Boissard, R. et al. 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 (2002).
- Card, J.P. et al. Efferent projections of rat rostroventrolateral medulla C1 catecholamine neurons: Implications for the central control of cardiovascular regulation. *J. Comp. Neurol* **499**, 840-859 (2006).

Carli, G. & Zanchetti, A. A study of pontine lesions suppressing deep sleep in the cat. *Arch Ital Biol* **103**, 751-788 (1965).

Clément, Sapin, E., Bérod, A., Fort, P. & Luppi, M. Evidence that neurons of the sublaterodorsal tegmental nucleus triggering paradoxical (REM) sleep are glutamatergic. in press (2011).

Dampney, R. The subretrofacial vasomotor nucleus: Anatomical, chemical and pharmacological properties and role in cardiovascular regulation. *Progress in Neurobiology* **42**, 197-227 (1994).

Dampney, R.A., Goodchild, A.K. & McAllen, R.M. Vasomotor control by subretrofacial neurones in the rostral ventrolateral medulla. *Can. J. Physiol. Pharmacol* **65**, 1572-1579 (1987).

Darracq, L. et al. Effect of strychnine on rat locus coeruleus neurones during sleep and wakefulness. *Neuroreport* **8**, 351-355 (1996).

Ennis, M. & Aston-Jones, G. Activation of locus coeruleus from nucleus paragigantocellularis: a new excitatory amino acid pathway in brain. *J. Neurosci* **8**, 3644-3657 (1988).

Fay, R.A. & Norgren, R. Identification of rat brainstem multisynaptic connections to the oral motor nuclei in the rat using pseudorabies virus. II. Facial muscle motor systems. *Brain Res. Brain Res. Rev* **25**, 276-290 (1997).

Gervasoni et al. Electrophysiological evidence that noradrenergic neurons of the rat locus coeruleus are tonically inhibited by GABA during sleep. *Eur. J. Neurosci* **10**, 964-970 (1998).

Goutagny, R. et al. 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 (2008).

Guyenet, P.G. & Young, B.S. Projections of nucleus paragigantocellularis lateralis to locus coeruleus and other structures in rat. *Brain Res* **406**, 171-184 (1987).

Guyenet, P.G., Darnall, R.A. & Riley, T.A. Rostral ventrolateral medulla and sympathorespiratory integration in rats. *Am. J. Physiol* **259**, R1063-1074 (1990).

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

Hassani, O.K., Lee, M.G. & Jones, B.E. 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 (2009).

Hassani, O.K., Lee, M.G., Henny, P. & Jones, B.E. Discharge profiles of identified GABAergic in comparison to cholinergic and putative glutamatergic basal forebrain neurons across the sleep-wake cycle. *J. Neurosci* **29**, 11828-11840 (2009).

Jacobs, B.L., Heym, J. & Trulson, M.E. Behavioral and physiological correlates of brain serotonergic unit activity. *Journal of Physiology, Paris* **77**, 431-6 (1981).

Koyama, Y., Honda, T., Kusakabe, M., Kayama, Y. & Sugiura, Y. In vivo electrophysiological distinction of histochemically-identified cholinergic neurons using extracellular recording and labelling in rat laterodorsal tegmental nucleus. *Neuroscience* **83**, 1105-1112 (1998).

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

Léger, L. et al. Dopaminergic neurons expressing Fos during waking and paradoxical sleep in the rat. *J. Chem. Neuroanat* **39**, 262-271 (2010).

Léger, L. et al. Noradrenergic neurons expressing Fos during waking and paradoxical sleep deprivation in the rat. *J. Chem. Neuroanat* **37**, 149-157 (2009).

Lovick, T.A. Convergent afferent inputs to neurones in nucleus paragigantocellularis lateralis in the cat. *Brain Res* **456**, 183-187 (1988).

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

Luppi, P. et al. Anatomical and electrophysiological evidence for a glycinergic inhibitory innervation of the rat locus coeruleus. *Neuroscience Letters* **128**, 33-36 (1991).

Luppi, P. et al. Paradoxical (REM) sleep genesis: the switch from an aminergic-cholinergic to a GABAergic-glutamatergic hypothesis. *J. Physiol. Paris* **100**, 271-283 (2006).

Luppi, P. et al. The neuronal network responsible for paradoxical sleep and its dysfunctions causing narcolepsy and rapid eye movement (REM) behavior disorder. *Sleep Med Rev* (2010).

Maloney, K.J., Mainville, L. & Jones, B.E. 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 (1999).

McCarley, R.W. & Hobson, J.A. Neuronal excitability modulation over the sleep cycle: a structural and mathematical model. *Science* **189**, 58-60 (1975).

Mendelson, W.B., Guthrie, R.D., Frederick, G. & Wyatt, R.J. The flower pot technique of rapid eye movement (REM) sleep deprivation. *Pharmacol. Biochem. Behav* **2**, 553-556 (1974).

M'hamed, S.B., Sequeira, H., Poulain, P., Bennis, M. & Roy, J.C. Sensorimotor cortex projections to the ventrolateral and the dorsomedial medulla oblongata in the rat. *Neurosci. Lett* **164**, 195-198 (1993).

Morrison, S.F., Milner, T.A. & Reis, D.J. Reticulospinal vasomotor neurons of the rat rostral ventrolateral medulla: relationship to sympathetic nerve activity and the C1 adrenergic cell group. *J. Neurosci* **8**, 1286-1301 (1988).

Oskutyte, D., Ishizuka, K., Satoh, Y. & Murakami, T. Rostral parvicellular reticular formation neurons projecting to rostral ventrolateral medulla receive cardiac inputs in anesthetized rats.



*Neurosci. Lett* **405**, 236-240 (2006).

Paxinos & Watson *The rat brain in stereotaxic coordinates*. (Academic press: 1998).

Reis, D.J. et al. Brain stem catecholamine mechanisms in tonic and reflex control of blood pressure. *Hypertension* **6**, II7-15 (1984).

Ross, C.A., Ruggiero, D.A. & Reis, D.J. Projections from the nucleus tractus solitarii to the rostral ventrolateral medulla. *J. Comp. Neurol* **242**, 511-534 (1985).

Ross, C.A., Ruggiero, D.A., Joh, T.H., Park, D.H. & Reis, D.J. Rostral ventrolateral medulla: selective projections to the thoracic autonomic cell column from the region containing C1 adrenaline neurons. *J. Comp. Neurol* **228**, 168-185 (1984).

Saha, S. Role of the central nucleus of the amygdala in the control of blood pressure: descending pathways to medullary cardiovascular nuclei. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol* **32**, 450-456 (2005).

Sakai, K. et al. State-specific neurones in the ponto-medullary reticular formation with special reference to the postural atonia during paradoxical sleep in the cat. *Brain mechanisms of perceptual awareness and purposeful behavior* 405-429 (1981).

Sakai, K. Executive mechanisms of paradoxical sleep. *Arch Ital Biol* **126**, 239-257 (1988).

Sapin, E. et al. A very large number of GABAergic neurons are activated in the tuberal hypothalamus during paradoxical (REM) sleep hypersomnia. *PLoS ONE* **5**, e11766 (2010).

Sapin, E. et al. Localization of the brainstem GABAergic neurons controlling paradoxical (REM) sleep. *PLoS ONE* **4**, e4272 (2009).

Soulière, F. et al. Single-unit and polygraphic recordings associated with systemic or local pharmacology: a multi-purpose stereotaxic approach for the awake, anaesthetic-free, and head-restrained rat. *J. Neurosci. Res* **61**, 88-100 (2000).

Tagawa, T. & Dampney, R.A. AT(1) receptors mediate excitatory inputs to rostral ventrolateral medulla pressor neurons from hypothalamus. *Hypertension* **34**, 1301-1307 (1999).

Urbain, N. et al. Unrelated course of subthalamic nucleus and globus pallidus neuronal activities across vigilance states in the rat. *Eur. J. Neurosci* **12**, 3361-3374 (2000).

Van Bockstaele, E.J., Pieribone, V.A. & Aston-Jones, G. Diverse afferents converge on the nucleus paragigantocellularis in the rat ventrolateral medulla: retrograde and anterograde tracing studies. *J. Comp. Neurol* **290**, 561-584 (1989).

Vanni-Mercier, G., Sakai, K., Lin, J.S. & Jouvet, M. Mapping of cholinceptive brainstem structures responsible for the generation of paradoxical sleep in the cat. *Arch Ital Biol* **127**, 133-164 (1989).

Verret, L., Fort, P., Gervasoni, D., Léger, L. & Luppi, P. 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 (2006).



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

Webster, H.H. & Jones, B.E. Neurotoxic lesions of the dorsolateral pontomesencephalic tegmentum-cholinergic cell area in the cat. II. Effects upon sleep-waking states. *Brain Res* **458**, 285-302 (1988).

---

RESUME en français

Le LPGi est la région bulbaire qui contient le plus grand nombre de neurones exprimant Fos pendant l'hypersomnie de SP. 10% de ces neurones Fos dans le LPGi projettent au locus coeruleus, une région SP-Off. Récemment, Sapin et al. ont montré que 70% des neurones exprimant Fos pendant l'hypersomnie de SP sont de nature GABAergique. Notre hypothèse est que le LPGi contient des neurones de nature SP-On dont une partie participerait à l'inhibition des noyaux SP-Off. Nous cherchons à vérifier cette hypothèse, d'autre part à identifier les régions afférentes au LPGi actives au cours du SP et enfin, à identifier les projections du LPGi. Nous avons utilisé l'enregistrement extracellulaire des neurones du LPGi chez le rat vigile en contention stéréotaxique. Nous avons couplé cette technique avec le protocole de privation/ rebond de SP par la technique de la piscine. L'analyse du taux de décharge des neurones enregistrés au sein du LPGi montre que celui-ci contient trois types neuronaux différents (SP-On, SP-Off et indifférents). L'analyse des données neuroanatomiques montre que l'afférence majeure du LPGi, active au cours du SP, réside dans le SLD. Le LPGi est donc bien impliqué dans le réseau du SP car il contient des neurones faisant varier leur taux de décharge avec les différents états de vigilance. Le SLD, considéré comme la structure exécutive du SP, de nature glutamatergique, exciterait le LPGi au cours du SP. Ce dernier, de nature GABAergique, inhiberait le noyau moteur facial. Ce travail met pour la première fois en évidence l'activité de la voie SLD-bulbe rachidien ventrolatéral et suggère que le LPGi participe en partie à l'atonie musculaire caractéristique du SP.

---

TITRE en anglais

Role of the lateral paragigantocellular nucleus in the network of paradoxical sleep in the rat.

---

RESUME en anglais

The LPGi is a ventrolateral medullary area that contains the highest number of Fos-labelled neurons during a paradoxical sleep (PS) hypersomnia. Ten % of these Fos neurons project to the locus coeruleus, a PS-Off area and 70% of these Fos neurons are GABAergic. Our hypothesis is that the LPGi contains PS-On neurons involved in the inhibition of the PS-Off nuclei. Our aim was to check this hypothesis by recording the unit activity of the LPGi neurons, by identifying the afferent areas to the LPGi and determining its projection areas activated during PS. We have used extracellular unit recordings in the unanesthetized head-restrained rat model and coupled this method to a selective PS deprivation using the flower-pot method. The analysis of the firing rate of the LPGi neurons showed that there are three different groups, SP-On, SP-Off and indifferent neurons. Moreover, the SLD, a PS-On area, is the main afferent to the LPGi activated during PS rebound. Our conclusion is that the LPGi is involved in the network generating PS. The SLD, considered as the PS executive area through glutamatergic neurons, may excite the LPGi during this state. The LPGi, through its GABAergic neurons, may inhibit the facial motor nucleus. This work provides for the first time evidence for a SLD-ventrolateral medulla pathway and suggests that the LPGi participates in the muscular atonia occurring during PS.

---

DISCIPLINE

Neurosciences

---

MOTS-CLES

Sommeil paradoxal, LPGi, réseau neuronal, atonie musculaire

---

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :

Centre de Neurosciences de Lyon  
Equipe Luppi ex UMR 5167  
Faculté de médecine Laënnec  
9-11 rue Guillaume Paradin  
69372 Lyon cedex 08