



**HAL**  
open science

# Mécanismes responsables de l'activation corticale pendant le sommeil paradoxal

Leslie Renouard

► **To cite this version:**

Leslie Renouard. Mécanismes responsables de l'activation corticale pendant le sommeil paradoxal. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2011. Français. NNT : 2011LYO10278 . tel-01137897

**HAL Id: tel-01137897**

**<https://theses.hal.science/tel-01137897>**

Submitted on 31 Mar 2015

**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 NEUROSCIENCE ET COGNITION  
DIPLOME DE DOCTORAT  
(arrêté du 7 août 2006)  
soutenue publiquement le 30 Novembre 2011  
par  
Mlle Leslie RENOUARD

Thèse réalisée sous la direction de Pierre-hervé LUPPI et Patrice FORT  
Centre de recherche en neurosciences de Lyon, INSERM U108, CNRS UMR 5292  
Equipe Physiopathologie des réseaux neuronaux du cycle veille sommeil

# **Mécanismes responsables de l'activation corticale pendant le sommeil paradoxal**

JURY :

Dr. Anne Didier	Président
Dr. Pierre Maquet	Rapporteur
Dr. Medhi Tafti	Rapporteur
Dr. Monique Esclapez	Examineur
Dr. Pierre-Hervé Luppi	Directeur de thèse



Afin d'avancer sur la fonction du sommeil paradoxal, il est nécessaire d'étudier son impact sur le fonctionnement cortical. Nous avons ainsi comparé l'expression génique corticale à l'aide de puces à ADN chez trois groupes de rats présentant différentes quantités de sommeil paradoxal (SP) : témoins, privé de SP ou en hypersomnie de SP.

71 et 83 transcrits montrent un niveau d'expression modifié par notre protocole dans le néocortex et l'hippocampe, respectivement. Ces résultats moléculaires ont été confirmés par PCR quantitative. Dans l'hippocampe l'expression des gènes de plasticité (Fos, Arc, Cox2, Homer1...) augmente en hypersomnie de SP. Au contraire, dans le néocortex le niveau d'expression de ces gènes augmente après privation de SP.

Au niveau systémique, les aires limbiques (le gyrus dentelé, le cortex cingulé antérieur et rétrosplénial et le claustrum) contiennent un nombre de neurones immunoréactifs au FOS, un marqueur d'activation indirect, élevé après hypersomnie de sommeil paradoxal. En revanche, le nombre de neurones immunoréactifs au FOS dans les cortex sensoriels est diminué après hypersomnie par rapport à la privation de sommeil paradoxal

L'éjection de traceurs rétrogrades dans le gyrus dentelé, le cortex rétrosplénial et le cortex cingulaire antérieur des rats en hypersomnie de SP a permis d'observer des neurones afférents et actifs dans les noyaux supramamillaires et le claustrum.

Nous avons ensuite observé que le nombre de neurones immunoréactifs pour FOS, ARC dans le gyrus dentelé, le claustrum et certaines structures limbiques est fortement diminué pendant l'hypersomnie de SP chez des rats porteurs d'une lésion des noyaux supramamillaires. De plus, la lésion du Sum est accompagnée d'une diminution de la puissance du thêta enregistrée par l'électroencéphalogramme pendant le sommeil paradoxal en hypersomnie.

Il semble donc que les projections des noyaux supramamillaires soient responsables de l'activation des régions limbiques corticales pendant le SP.



# TABLES DES MATIERES

---



<b>TABLES DES MATIERES</b>	<b>5</b>
<b>ABREVIATIONS</b>	<b>13</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	<b>17</b>
<b>RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>21</b>
<b>1. Les états de vigilance et leurs caractéristiques</b>	<b>23</b>
1.1 L'éveil	23
1.2 Le sommeil lent	23
1.3 Le sommeil paradoxal	24
1.4 L'organisation de cycle veille-sommeil chez le rat	25
<b>2. Les fonctions du sommeil paradoxal</b>	<b>26</b>
2.1 Le rêve	26
2.2 L'ontogenèse du sommeil paradoxal et la maturation cérébrale	27
2.3 La phylogenèse du sommeil paradoxal	28
2.4 Le sommeil paradoxal et la neurogenèse	29
2.5 Le sommeil paradoxal et la mémoire	30
2.5.1 Influence des états de sommeil sur la consolidation	31
2.5.2 Influence de l'apprentissage sur les quantités et la qualité du sommeil	31
2.5.3 Réactivation des traces mnésiques pendant le sommeil	32
2.5.4 Homéostasie et consolidation synaptique	32
2.5.5 Transfert de l'information	34
<b>3. Activation corticale pendant le sommeil paradoxal</b>	<b>36</b>
3.1 Anatomie du cortex	36
3.2 L'activation néocorticale pendant le sommeil paradoxal	37
3.2.1 Anatomie du néocortex	38
3.2.2 L'activation néocorticale pendant le sommeil paradoxal	38
3.2.2.1 L'activité néocorticale d'après l'EEG	38
3.2.2.2 Concentrations en neurotransmetteurs dans le cortex	40
3.2.2.3 Traitement sensoriel pendant le sommeil paradoxal	41
3.2.2.4 Régions néocorticales activées en sommeil paradoxal	43
3.2.3 Afférences corticales et leur implication dans l'activation néocorticale pendant le sommeil paradoxal	44
3.2.3.1 Le télencéphale basal	44
1) Les neurones cholinergiques du noyau préoptique magnocellulaire, la substance inominé et le noyau basal magnocellulaire	45
2) Les neurones GABAergiques du télencéphale basal	46
3) Les neurones glutamatergiques du télencéphale basal	47
3.2.3.2 Le thalamus	48
3.2.3.3 Les afférences corticales spécifiques de l'éveil	50
3.2.3.4 Les neurones MCHergiques de l'hypothalamus	51
3.2.3.5 Les neurones dopaminergiques mésencéphaliques	52
3.2.3.6 Les neurones glutamatergiques de la formation réticulée du tronc cérébral, en particulier ceux du noyau sublatérodorsal	53
3.2.3.7 Les neurones cholinergiques du tegmentum ponto-mesencéphalique	54
3.2.3.8 Les neurones de la formation réticulée bulbaire	55



3.3 L'activation de la formation hippocampique et ses mécanismes pendant le sommeil paradoxal	56
3.3.1 Anatomie de la formation hippocampique	56
1) L'hippocampe	56
2) Le subiculum	56
3.3.2 Anatomie des régions parahippocampiques	56
1) Le parasubiculum et le présubiculum	57
2) Le cortex entorhinal	57
3) Le cortex périrhinal et le cortex postrhinal	58
3.3.3 Activité hippocampique pendant le sommeil paradoxal	59
3.3.3.1 Coordination des réseaux hippocampiques pendant l'éveil et le sommeil paradoxal	59
3.3.3.2 Activité de l'hippocampe d'après l'imagerie	61
3.3.3.3 Modulation de la transmission synaptique dans la formation hippocampique par les neurotransmetteurs	61
3.3.4 Mécanismes de l'activation hippocampique pendant le sommeil paradoxal	64
3.3.4.1 Le Septum et la bande diagonale de Broca	64
1) Anatomie du complexe du septum médian et de la bande diagonale de Broca	64
2) Implication dans le sommeil paradoxal et dans la génération du rythme thêta	65
3.3.4.2 Le cortex entorhinal	65
3.3.4.3 Le thalamus	66
3.3.4.4 L'amygdale	66
3.3.4.5 Les neurones à MCH de l'hypothalamus latéral	66
3.3.4.6 Le noyau supramamillaire	67
1) L'anatomie du noyau supramamillaire	67
2) Afférences du Sum	67
3) Efférences du Sum	70
4) La voie supramamillaire-formation hippocampe	72
5) Rôle du Sum dans les mécanismes de génération du rythme thêta hippocampique	72
6) Implications fonctionnelles du noyau supramamillaire	73
3.3.4.7 Les systèmes afférents au Sum et au MS/DBB impliqués dans l'activité hippocampique pendant le sommeil paradoxal	74
1) Le precoeruleus	74
2) L'hypothalamus postérieur	75
3) Le noyau pontis oralis	75
4) Modèle de génération du thêta par la voie du Sum	76

#### **4. Objectifs de l'étude** \_\_\_\_\_ **77**

4.1 Quels sont les corrélats moléculaires associés aux quantités de sommeil paradoxal dans le cortex ?	77
4.2 Quelles régions corticales sont actives, et plastiques pendant le sommeil paradoxal et l'éveil ?	78
4.3 Quelles régions activent le gyrus dentelé, le cortex rétrospécial et le cingulé antérieur pendant le sommeil paradoxal ?	79
4.4 Quelle est l'implication du Sum dans l'activation corticale liée au sommeil paradoxal ?	79
4.5 Résultats préliminaires : quelles régions activent le supramamillaire, le claustrum, le cortex visuel ? Les neurones "actifs" du gyrus dentelé pendant le SP sont-ils des nouveaux neurones ?	79

### **MATERIEL ET METHODES** \_\_\_\_\_ **82**

#### **Contribution à l'étude** \_\_\_\_\_ **84**

##### **1. La polysomnographie** \_\_\_\_\_ **85**

1.1 Principe de la polysomnographie	85
1.2 Mise en œuvre	85

1.3 Protocole expérimental détaillé _____	86
1.3.1 Chirurgie _____	86
1.3.2 Récupération post-opératoire _____	88
1.3.3 Enregistrement des états de vigilance _____	88
<b>2. Privation et rebond de Sommeil Paradoxal par la technique de la piscine _____</b>	<b>89</b>
2.1 Principe _____	89
2.2 Protocole expérimental détaillé _____	90
2.3 Analyses statistiques _____	91
<b>3. Protocole de nouvel environnement _____</b>	<b>91</b>
<b>4. Analyse du transcriptome par la modulation des quantités de sommeil paradoxal _____</b>	<b>92</b>
4.1 Protocole d'analyse des ARNm par la technique des puces à ADN Affymetrix _____	92
4.1.1 Préparation des échantillons, extraction des ARN totaux _____	92
4.1.2 Analyse des concentrations en corticostérone _____	93
4.1.3 Quantification des ARNm par les puces à ADN _____	93
4.2 Vérification des résultats des puces par la technique de PCR en temps réel _____	97
4.2.1 Transcription inverse des ARNm _____	97
4.2.2 PCR en temps réel (Q-PCR) _____	97
4.2.2.1 Choix des amorces _____	97
4.2.2.2 PCR quantitative en temps réel _____	98
4.3 Analyse statistiques _____	99
<b>5. Ejection de traceur dans le gyrus dentelé, le cortex rétrosplénial et cingulé antérieur, supramillaire et le claustrum _____</b>	<b>99</b>
5.1 Principe des traceurs rétrogrades et antérogrades _____	99
5.2 La sous-unité B de la toxine cholérique _____	100
5.3 Le Fluorogold _____	101
5.4 La Iontophorèse _____	101
5.5 Ejection de traceur : protocole expérimental détaillé _____	102
<b>6. Lésion des noyaux supramillaires par éjection iontophorétique d'acide iboténique _____</b>	<b>105</b>
6.1 Principe de la lésion _____	105
6.2 L'acide iboténique _____	105
6.3 Protocole de lésion des noyaux supramillaire _____	106
6.4 Analyse des caractéristiques de l'EEG _____	107
6.4.1 Analyse spectrale _____	107
6.4.2 Analyse des états de vigilance _____	108
6.4.3 Analyse statistique _____	108
<b>7. Les neurones actifs du gyrus dentelé sont ils des nouveaux neurones ? _____</b>	<b>109</b>
7.1 Principe _____	109
7.2 Protocole d'injection de BrdU _____	110
<b>8. Perfusion et préparation histologique _____</b>	<b>110</b>
8.1 Perfusion intracardiaque de paraformaldéhyde _____	110
8.1.1 Principe _____	110
8.1.2 Protocole expérimental détaillé _____	110
8.2 Réalisation et conservation des coupes histologiques _____	111
8.2.1 Principe _____	111
8.2.2 Protocole expérimentale détaillé _____	111
1) Traitement des coupes pour immunohistochimie : _____	111

2) Traitement des coupes pour hybridation in situ :	111
8.3 Immunohistochimie des protéines FOS, ARC, COX2, SGK, BrdU, Double cortine, CTb, FG	112
8.3.1 Principe de l'utilisation de la protéine FOS comme marqueur fonctionnel	113
8.3.2 Principe de l'utilisation de la protéine ARC	114
8.3.3 Principe de l'utilisation de la protéine Cox2	116
8.4 Immunohistochimie	117
8.4.1 Principe de l'immunohistochimie	117
8.4.2 Protocoles détaillés d'Immunohistochimie	119
8.4.2.1 Préparation des coupes pour la détection du BrdU	119
8.4.2.2 Immunohistochimie HRP	119
8.4.2.3 Immunohistochimie en fluorescence du BrdU, Arc et Fos	121
<b>9. Hybridation <i>in situ</i> de la GAD65</b>	<b>121</b>
9.1 Principe de l'Hybridation in situ	121
9.2 Fabrication de la ribosonde GAD65	122
9.3 Protocole expérimental détaillé	123
9.4 Couplage de l'immunohistochimie de la protéine FOS à l'hybridation in situ de la GAD65	123
<b>10. Analyse des résultats histologiques</b>	<b>124</b>
10.1 Analyse des marquages immunohistochimiques à la HRP	124
10.2 Photographies d'illustration	125
1) Immunohistochimie classique et hybridation in situ	125
2) Immunohistochimie en fluorescence:	125
10.3 Analyse statistique	126
<b>RESULTATS</b>	<b>127</b>
<b>1. Puces à ADN et qPCR</b>	<b>129</b>
1.1 Données polysomnographiques	129
1.2 Niveaux de concentration en corticostérone plasmatique	129
1.3 Puces à ADN	130
1.3.1 Catégories des transcrits dans le néocortex et la formation hippocampique	130
1) Dans la formation hippocampique	131
2) Dans le néocortex	131
1.3.2 Gènes en commun entre les 2 structures	133
1.3.3 Liste de gènes dont l'expression est modulée par notre protocole de privation-récupération de sommeil paradoxal dans la formation hippocampique	135
1.3.4 Liste de gènes dont le niveau d'expression est modifié par notre protocole dans le néocortex	138
1.4 Les PCRq	140
1.4.1 Vérification statistique des profils obtenus avec les puces à ADN	140
1.4.2 Corrélations du niveau d'expression des gènes vs les quantités des états de vigilance et la concentration en corticostérone plasmatique	142
1.4.3 Corrélation des niveaux d'expression des gènes entre eux	145
<b>2. Immunohistochimie</b>	<b>147</b>
2.1 La formation hippocampique	147
2.1.1 Quantification des neurones Fos+	147
2.1.2 Quantification de ARC	149
2.1.3 Quantification de Cox2	150
2.1.4 Les protéines ARC, FOS et COX2 sont-elles co-exprimées dans les mêmes neurones ?	151
2.1.5 Quantification de SGK (Résultats préliminaires)	152
2.2 Le néocortex	153

2.2.3	Quantification des neurones Fos+	153
2.2.2	Quantification des neurones Arc+	161
<b>3.</b>	<b>Neuroanatomie</b>	<b>163</b>
3.1	Ejection de CTb dans le gyrus dentelé des rats PSR	163
3.2	Ejection de Fluorogold dans le cortex cingulé antérieur des rats PSR	166
3.3	Ejection de CTb dans le rétrosplénial des rats PSR	170
3.4	Ejection de CTb dans le Sum (résultats préliminaires)	175
3.5	Ejection de Fluorogold dans le Claustrum	177
3.6	Ejection de fluorogold dans le cortex visuel primaire	179
3.7	Quantification des neurones FOS+ dans les principales régions afférentes au cortex chez les rats PSR et EV	182
3.8	Nature des neurones FOS+ dans le Sum après hypersomnie de SP (résultats préliminaires)	186
<b>4.</b>	<b>Lésion du Sum</b>	<b>188</b>
4.1	Vérification et validation de la lésion du Supramamillaire	188
4.2	Effets de la lésion sur l'architecture des états de vigilance et les caractéristiques de l'EEG	189
4.2.1	Architecture des états de vigilance	189
4.2.2	Caractéristiques de l'EEG	189
1)	Condition basale	189
2)	Condition d'hypersomnie de SP	191
4.3	Quantification des IEGs dans la formation hippocampique	194
4.3.1	Quantification du Fos	195
4.3.2	Quantification de ARC	195
4.3.3	Quantification de COX2	196
4.4	Le néocortex	197
4.4.1	Quantification du FOS	197
4.4.2	Quantification de ARC	202
<b>5.</b>	<b>Les neurones FOS+, ARC+ et COX2+ sont ils des neurones néo-générés ? (résultats préliminaires)</b>	<b>205</b>
	<b>DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION</b>	<b>207</b>
<b>1.</b>	<b>Principaux résultats obtenus</b>	<b>209</b>
1.1	Objectifs	209
1.2	Résultats	209
<b>2.</b>	<b>Critique méthodologique</b>	<b>211</b>
2.1	Validation et limites de la technique des puces à ADN	211
2.1.1	Echantillons utilisés pour les puces	211
1)	Les pools d'ARNm intragroupes	211
2)	Tissus dont les ARNm sont extraits	212
2.1.2	Les comparaisons intergroupes	212
2.1.3	La durée de l'hypersomnie de sommeil paradoxal	213
2.2	Validation expérimentale et limites de la technique d'immunohistochimie	213
2.2.1	L'immunohistochimie	213
2.2.2	Utilisation de FOS comme marqueur d'activation cellulaire indirect	214
2.3	Validation du protocole de privation de sommeil paradoxal	216
2.3.1	Le stress	216
2.3.2	La privation de sommeil paradoxal	216
2.3.3	L'hypersomnie de SP	217

2.3.4 L'éveil en nouvel environnement _____	217
2.4 Validation de la lésion _____	218
<b>3. Interprétation des résultats _____</b>	<b>219</b>
3.1 Gènes modulés par le sommeil paradoxal dans le cortex _____	219
3.1.1 La formation hippocampique _____	220
1) Gènes impliqués dans la plasticité synaptique _____	220
2) Gènes impliqués dans le développement neuronal _____	221
3) Gènes impliqués négativement dans la croissance cellulaire et le métabolisme _____	221
3.1.2 Le néocortex _____	221
1) Gènes impliqués dans le stress _____	222
2) Les gènes impliqués dans le métabolisme et l'apoptose _____	222
3) Gènes impliqués dans la plasticité synaptique et le développement neuronal _____	222
3.2 Localisation des neurones immunoréactifs à Arc, c-Fos et Cox2 dans le néocortex et la formation hippocampique _____	224
3.2.1 La formation hippocampique _____	224
3.2.2 Les cortex sensoriels _____	228
3.2.3 Les cortex limbiques _____	229
3.3 Réseaux neuronaux impliqués dans l'activation corticale en sommeil paradoxal _____	231
3.3.1 Activité des régions sous corticales _____	231
3.3.2 Afférences excitatrices responsables de « l'activité » de certaines régions limbiques en sommeil paradoxal _____	233
3.4 Effet de la lésion du Sum sur l'activité corticale pendant le sommeil paradoxal _____	235
3.4.1 Effet sur l'expression des marqueurs d'activité et de plasticité _____	235
3.4.2 Effets sur les caractéristiques de l'EEG _____	238
<b>4. Conclusion et Perspectives _____</b>	<b>240</b>
4.1 Précision des résultats des puces à ADN _____	240
4.2 Localisation d'autres protéines ou ARNm dans le cortex _____	240
4.3 Le réseau d'activation pendant le sommeil paradoxal _____	241
4.3.1 Le claustrum _____	241
4.3.2 Le noyau supramamillaire _____	241
4.4 Fonction de la voie Sum pendant le sommeil paradoxal _____	242
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES _____</b>	<b>245</b>
<b>ARTICLE _____</b>	<b>273</b>

# ABBREVIATIONS

---



## ABBREVIATIONS

AAA	Anterior amygdalar area
ACA	Anterior cingulate area
ACB	Nucleus accumbens
AD	anterodorsal nucleus of the thalamus
AI	Agranular insular area
AM	anteromedial nucleus of the thalamus
AUD	Auditory areas
AV	anteroventral nucleus of the thalamus
BF	Basal forebrain
BLA	Basolateral amygdalar nucleus
BMA	Basomedial amygdalar nucleus
BST	Bed nuclei of the stria terminalis
CA	Ammon's Horn
CA1	Field CA1
CA1d	Field CA1, dorsal part
CA1v	Field CA1, ventral part
CA1so	Field CA1, stratum oriens
CA1sp	Field CA1, pyramidal layer
CA1sr	Field CA1, stratum radiatum
CA2	Field CA2
CA2sp	Field CA2, pyramidal layer
CA3	Field CA3
CA3sp	Field CA3, pyramidal layer
cc	Corpus callosum
CEA	Central amygdalar nucleus
CL	central lateral nucleus of the thalamus
CLA	Clastrum
CLI	Central linear nucleus raphé
CM	central medial nucleus of the thalamus
COA	Cortical amygdaloid area
CP	Caudoputamen
CS	Superior central nucleus raphé
DG	Dentate gyrus
DGd	Dentate gyrus, dorsal part
DGv	Dentate gyrus, ventral part
DGmo	Dentate gyrus, molecular layer
DGpo	Dentate gyrus, polymorph layer
DGsg	Dentate gyrus, granule cell layer
DR	Dorsal raphé
ECT	Ectorhinal area
ENT	Entorhinal area
ENTI	Entorhinal area, lateral part
ENTm	Entorhinal area, medial part, dorsal zone
EP	Endopiriform nucleus
FS	Fundus of striatum
GU	Gustatory areas
GD	Gyrus dentelé
IA	Intercalated amygdalar nucleus
IAM	interanteromedial nucleus of the thalamus
IF	Interfascicular nucleus raphé
ILA	Infralimbic area
ILM	Intralaminar group of the dorsal thalamus
LA	Lateral amygdalar nucleus
LC	Locus coeruleus
LD	lateral dorsal nucleus of the thalamus
LDT	Laterodorsal tegmental nucleus
LH	lateral habenula
LHA	Lateral hypothalamic area
LM	Lateral mammillary nucleus



LP	lateral posterior nucleus of the thalamus
LPO	Lateral preoptic area
LS	Lateral septal nucleus
MA	Magnocellular nucleus
MD	mediodorsal nucleus of the thalamus
MEA	Medial amygdalar nucleus
MH	medial habenula
MM	Medial mammillary nucleus
MO	Somatomotor areas
MS	Medial septal nucleus
NDB	Diagonal band nucleus
NI	Nucleus incertus
ORB	Orbital area
OT	Olfactory tubercle
PA	Posterior amygdalar nucleus
PAG	Periaqueductal gray
PAR	Parasubiculum
PCN	paracentral nucleus of the thalamus
PERI	Perirhinal area
PH	Posterior hypothalamic nucleus
PIR	Piriform area
PL	Prelimbic area
POST	Postsubiculum
PR	perireuniens nucleus
PRE	Presubiculum
PSC	Groupe de rat contrôle de sommeil paradoxal
PSD	Groupe de rat privé de sommeil paradoxal
PSR	Groupe de rat en récupération de sommeil paradoxal
PT	paratenial nucleus
PTLp	Posterior parietal association areas
PVT	paraventricular thalamic nucleus
RE	nucleus reuniens
RH	rhomboid nucleus
RSP	Retrosplenial area
SI	Substantia innominata
SMT	submedial nucleus of the thalamus
SNc	Substantia nigra, compact part
SS	Somatosensory areas
SUB	Subiculum
SUBd	Subiculum, dorsal part
SUBv	Subiculum, ventral part
SUM	Supramammillary nucleus
SUMI	Supramammillary nucleus, lateral part
SUMm	Supramammillary nucleus, medial part
Tea	Temporal association areas
TH	Thalamus
TM	Tuberomammillary nucleus
TR	Postpiriform transition area
VAL	ventral anterior-lateral complex of the thalamus
VIS	Visual areas
VISC	Visceral area
VM	ventral medial nucleus of the thalamus
VP	ventral posterior complex of the thalamus
VPL	ventral posterolateral nucleus of the thalamus, principal part
VPM	ventral posteromedial nucleus of the thalamus, principal part
VTA	Ventral tegmental area
ZI	Zona incerta

# INTRODUCTION GENERALE

---



Nous passons environ un tiers de notre vie à dormir sans savoir pourquoi. En effet, la fonction du sommeil reste l'une des plus grandes énigmes de la biologie actuelle. Le sommeil et la plupart de ses caractéristiques (apparition circadienne, régulation homéostatique, seuil d'éveil élevé) sont apparus très tôt au cours de l'évolution et sont présents chez tous les animaux, des invertébrés les moins évolués aux mammifères les plus évolués.

Chez tous les animaux, un déficit de sommeil induit par une privation est suivi d'une hypersomnie. Le sommeil est donc un besoin fondamental pour l'organisme et sa première fonction semble être de récupérer des effets de l'éveil. Cependant, un éveil calme et inactif permet de reposer le corps autant que le sommeil mais ne satisfait pas pour autant le besoin de sommeil. Le sommeil serait donc plutôt un besoin du cerveau, afin qu'il récupère métaboliquement de l'intense dépense énergétique associée à l'éveil.

En 1954 et 1958, le développement de l'enregistrement de l'activité cérébrale électrique chez l'homme a permis à Nathaniel Kleitman, Eugen Aserinsky et William Dement de montrer que le sommeil n'est pas un état homogène. Cette notion a considérablement augmenté le nombre de ses fonctions potentielles. En effet, le sommeil est principalement associé à une activité électroencéphalographique (EEG) lente et ample qui lui vaut de nos jours le nom de sommeil lent (SL). Il est aussi composé d'un état qui survient de manière périodique, caractérisé par une activité EEG corticale rapide et de faible amplitude, paradoxalement proche de celle de l'éveil, mais accompagnée d'une atonie musculaire et de mouvements oculaires rapides. Ces caractéristiques sont à la base des deux appellations de cet état, le Rapid Eye Mouvement Sleep (REM sleep) de la part de l'équipe américaine précédemment citée ou le Sommeil Paradoxal (SP) suite à sa découverte chez le chat par Michel Jouvet en 1959.

L'étude des mécanismes responsables de la genèse et de la régulation du SP a débuté dès sa découverte. Les études de lésion et d'inhibition de diverses structures cérébrales ont alors montré que certains noyaux pontiques seraient responsables de sa genèse alors que certains noyaux hypothalamiques seraient responsables de son homéostasie. Contrairement au sommeil en général, les caractéristiques du SP ont été observées exclusivement chez les homéothermes (mammifères et oiseaux), animaux chez lesquels le cortex est le plus développé. Les rêves sont générés principalement pendant le SP, leurs fonctions sont aussi mystérieuses que celles du SP. Ils nécessitent cependant une activation corticale intense. De plus, la principale caractéristique qui distingue le SP du SL est l'activité enregistrée à la surface du cortex. Il est donc légitime de considérer que le SP serait plutôt un état nécessaire au cortex cérébral.

Les fonctions du sommeil dans son ensemble, incluant donc le SL et le SP, ont été étudiées au niveau moléculaire notamment à l'aide des puces à ADN. Celles-ci ont permis d'évaluer les modulations de l'expression génique induites, dans le cortex, par la privation de sommeil et l'hypersomnie. L'hypothèse de la fonction de récupération de l'éveil a pu être

confirmée au niveau moléculaire. Cependant, les modifications induites par le SP n'ont pu être distinguées de celles induites par le SL.

Les études électrophysiologiques chez l'animal conduisent à rapprocher le SP de l'éveil actif plutôt que du SL puisque l'enregistrement de l'activité électrique des neurones pyramidaux à la surface du cortex est similaire en éveil et en SP. Ainsi l'activité globale du cortex pendant le SP serait aussi élevée qu'en éveil. Cependant, les données de neuroimagerie indiquent que l'activité du cortex n'est pas la même pendant l'éveil et le SP. En effet, certaines aires corticales sont préférentiellement activées pendant le SP alors que d'autres aires sont moins activées que pendant l'éveil. Un réseau sous-cortical différent de l'éveil activerait ces structures corticales en SP.

C'est dans l'objectif d'une meilleure compréhension du fonctionnement cortical pendant le SP que s'inscrit ce travail de thèse. Dans ce but, nous avons utilisé plusieurs approches expérimentales chez le rat.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'activité corticale pendant le SP au niveau moléculaire. Ce travail a débuté par l'étude des modifications du transcriptome dans la formation hippocampique et le néocortex, induites par des modulations du SP.

Dans un deuxième temps, nous avons quantifié et localisé les neurones qui expriment certaines protéines dont les gènes ont une expression modifiée par des modulations de SP. L'utilisation du marqueur d'activation neuronale indirect FOS, nous a permis de visualiser les régions corticales sollicitées pendant le SP.

Dans un troisième temps, nous avons injecté un traceur rétrograde dans certaines régions corticales potentiellement "actives" pendant le SP, et couplé la détection immunohistochimique de ce traceur à celle du FOS chez des rats dont les quantités de SP étaient modulées. Ceci nous a permis de sélectionner une région sous-corticale, le noyau supramammillaire, qui enverrait des projections actives à de nombreuses subdivisions du cortex pendant le SP.

Enfin, nous avons lésé cette structure et confirmé son importance dans la genèse de certaines caractéristiques de l'activité corticale pendant le SP.

Notre manuscrit débute par une introduction au cours de laquelle nous résumons le contexte scientifique de notre étude. Nous exposons en particulier les hypothèses les plus courantes sur la fonction du SP. Les neuroscientifiques pensent que le SP agit surtout au niveau du cortex, nous parlerons donc des données sur l'activité corticale et ses mécanismes pendant le SP.

# RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

---



## **1. Les états de vigilance et leurs caractéristiques**

L'électroencéphalographie (EEG) et les travaux de Berger sur l'activité électrique du cerveau humain ont permis d'enregistrer les rythmes corticaux de sujets au cours de leur cycle veille-sommeil. Ce type d'enregistrement associé à l'analyse des mouvements musculaires (électromyogramme, EMG) et accessoirement oculaires (électrooculogramme, EOG) a permis de distinguer sans ambiguïté trois états de vigilance : l'éveil (Ev), le sommeil lent (SL) et le sommeil paradoxal (SP) ; d'abord chez l'homme et le chat (Dement et Kleitman, 1957a ; Juvet et Michel, 1959 ; Juvet *et al.*, 1959), puis chez la plupart des vertébrés homéothermes dont le rat.

### **1.1 L'éveil**

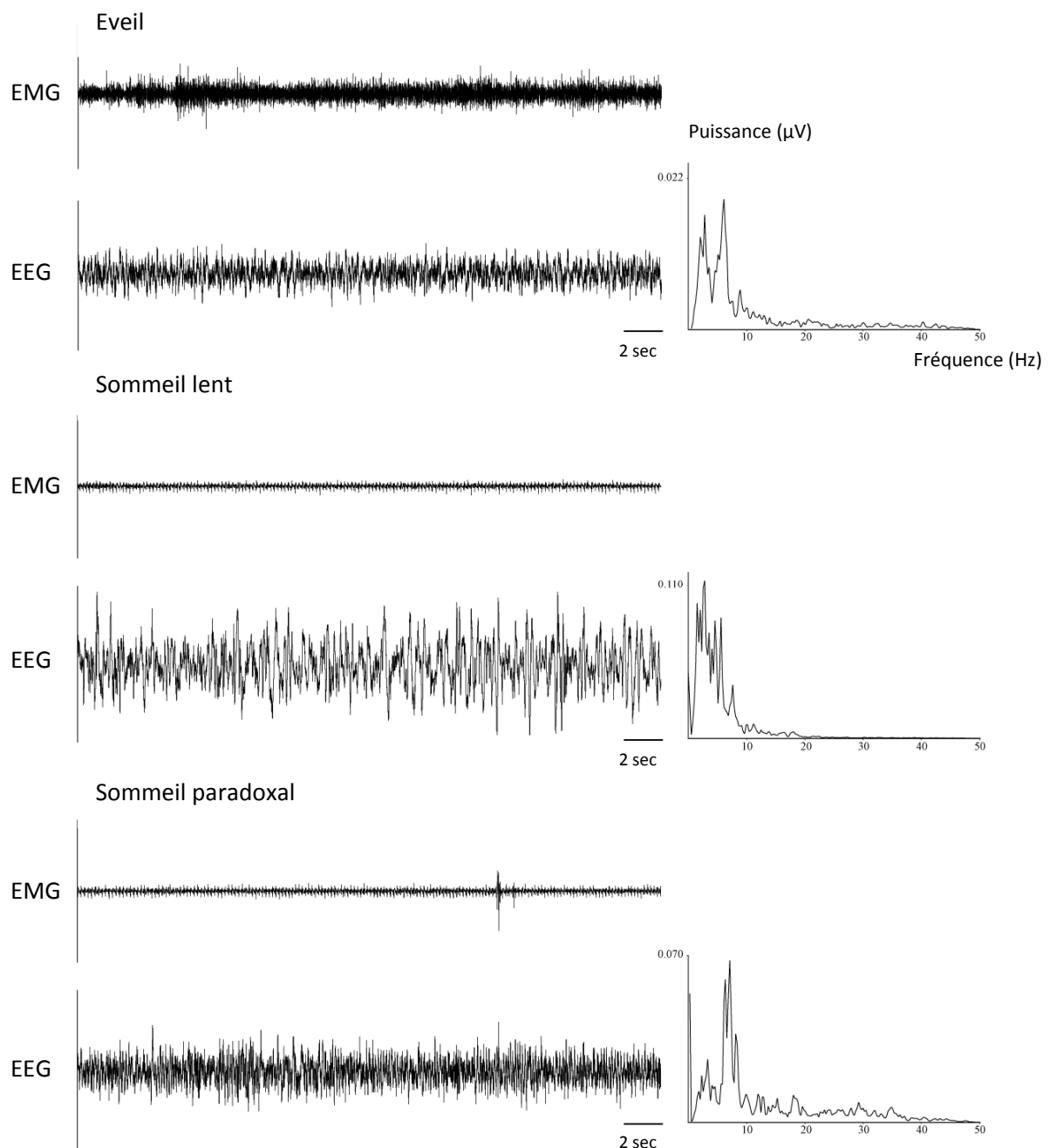
L'Ev est un état actif au cours duquel l'animal perçoit et intègre les entrées sensorielles du monde extérieur. Ce traitement de l'environnement génère des comportements adaptés et donc souvent moteurs ; l'EMG est donc caractérisé par un tonus musculaire soutenu et des bouffées phasiques associées à l'activité motrice. L'EOG révèle des mouvements oculaires fréquents. La respiration et le rythme cardiaque sont rapides et réguliers. Les informations du milieu extérieur sont traitées par le système nerveux central, ce qui se traduit au niveau de l'EEG par une activité électrique corticale rapide et désynchronisée, caractérisée par la prépondérance d'ondes de faible amplitude dans les gammes de fréquence bêta (15-30 Hz) et gamma (30-60 Hz) (Fig. 1). Selon l'activité comportementale de l'animal, des ondes thêta peuvent être enregistrées : elles sont plutôt présentes lors des phases d'Ev attentif ou exploratoire dit « actif » dans une gamme de fréquence de 7-8 Hz, mais aussi lors d'éveils calmes, de comportement de prise alimentaire et de toilettage avec un spectre de fréquence plus large, entre 5 et 10 Hz.

### **1.2 Le sommeil lent**

Pendant le SL, l'animal est inactif, peu réceptif aux stimuli de l'environnement et donc ses comportements sont quasiment absents. Le rat adopte une posture caractéristique « en boule », la tête repliée sous le corps. Le tonus musculaire diminue, la respiration et le rythme cardiaque sont ralentis et réguliers. L'activité corticale est dite synchronisée car l'EEG est de haut voltage et de basse fréquence avec des ondes lentes de grande amplitude (0,5-1 Hz) auxquelles se superposent des oscillations de type delta (1-4 Hz) (Fig. 1). D'autres rythmes peuvent être générés pendant le SL comme les fuseaux ("spindles") de courte durée



(1-3 sec) et de fréquence relativement élevée (10-14 Hz). Des événements transitoires complexes appelés "sharp wave-ripples" (SW-R) peuvent aussi apparaître dans l'hippocampe. Ils correspondent à des potentiels de champs transitoires de 40 à 120ms associés à des oscillations de haute fréquence (100-250 Hz).



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

### 1.3 Le sommeil paradoxal

Le SP apparaît toujours après une phase de SL chez l'animal sain. Le rat est réceptif aux entrées sensorielles mais celles-ci ne sont pas intégrées et n'entraînent pas ou peu de réponses comportementales. Le SP s'accompagne d'une disparition du tonus musculaire (atonie posturale) dans la musculature squelettique et d'une baisse des réflexes moteurs. Cette atonie musculaire est paradoxalement associée à un EEG "activé", très proche de celui de l'Ev, de bas voltage et de fréquence rapide avec des oscillations de type gamma (30-40 Hz) et thêta (6-9 Hz)(Fig. 1). Le rythme cardiaque et la respiration sont lents mais irréguliers. L'atonie et l'activation corticale sont des phénomènes toniques présents tout au long de l'épisode auxquels s'ajoutent parfois et de façon discontinue des phénomènes phasiques. Ceux-ci sont caractérisés par des "twitches", correspondant à de légers spasmes des muscles des extrémités des membres et de la face. Une activité oculomotrice rapide est enregistrée, d'où la dénomination de "Rapid-Eye-Movement sleep" ou REM sleep par l'école américaine. Il a été suggéré que ces saccades oculaires pourraient refléter les déplacements virtuels de l'animal dans la scène onirique. Enfin, le SP se caractérise par des érections pénienues (Schmidt *et al.*, 1994).

#### **1.4 L'organisation du cycle veille-sommeil chez le rat**

L'architecture globale du sommeil dépend du rythme circadien. Ainsi, chez le rat adulte enregistré en condition de laboratoire, la phase sombre (période active pour un animal nocturne) est composée d'environ 60% d'Ev, 35% de SL et 4% de SP. Ces stades occupent respectivement 30%, 60% et 10% de la période diurne (période de repos). A ce cycle circadien se greffe un cycle ultradien qui détermine la succession de chacun des trois états de vigilance. Chez le rat, pendant la phase diurne, un épisode de SP apparaît environ toutes les 10 minutes et dure en moyenne 2 minutes (Mayes, 1983).

## **2. Les fonctions du sommeil paradoxal**

Les fonctions du SP restent encore énigmatiques, même si de nombreuses hypothèses ont été émises. Dans les paragraphes qui suivent nous faisons une revue de ces hypothèses et de leurs arguments.

### **2.1 Le rêve**

La fonction du SP la plus communément admise est celle de la génération d'expériences inconscientes appelées rêves. Les sujets réveillés pendant certaines phases de sommeil, en particulier celles du SP, signalent avoir eu des rêves typiques, des expériences hallucinatoires sensorimotrices précises qui suivent une histoire (Hobson *et al.*, 1998 ; Hobson *et al.*, 2000). En effet, les récits de rêves obtenus après réveil pendant les différents états de sommeil ou à différents temps de la nuit indiquent que 74-80 % des éveils en SP entraînent des rappels précis du rêve comparé au 7-9% des éveils en SL (Aserinsky et Kleitman, 1953 ; Dement et Kleitman, 1957b). Les modalités perceptuelles du rêve qui dominent en Ev sont hautement représentées : les rêves sont visuels et colorés, riches en formes et en mouvements et incorporent des catégories typiques de l'Ev tel que des personnes, des visages, des endroits, des conversations et plus rarement des perceptions tactiles, des odeurs, certains goûts, du plaisir et de la douleur (Hobson, 2009).

Ces similarités phénoménologiques entre l'Ev et le SP sont reflétées par des similarités neurophysiologiques, notamment celles de l'activité du cerveau en neuroimagerie (IRMf et TEP) et en EEG lors de l'Ev calme et lors du SP (Maquet *et al.*, 1996 ; Hobson *et al.*, 2000 ; Maquet *et al.*, 2000). Les patients avec des lésions cérébrales responsables de déficits cognitifs pendant l'Ev présentent ces mêmes déficits pendant le rêve (Domhoff, 2003). Par exemple, les patients dont une région cérébrale nécessaire à la reconnaissance des visages est lésée, ne rêvent pas de visages (Nir et Tononi, 2010).

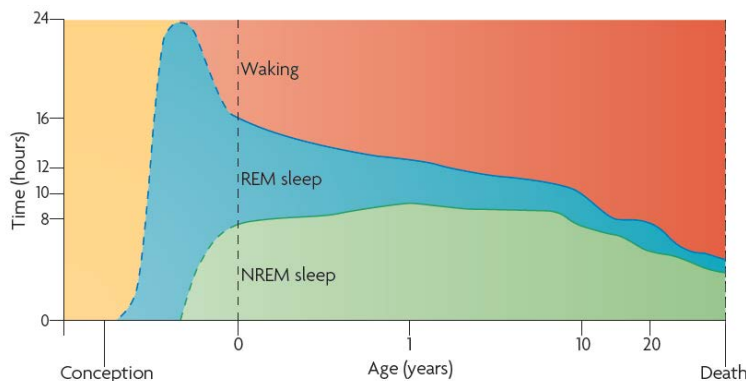
Les lésions du télencéphale basal suppriment les rêves sans abolir le SP, alors que des lésions du tronc cérébral peuvent éliminer les caractéristiques du SP sans abolir les rêves (Solms, 2000). Ainsi, le SP et le rêve seraient des entités séparées puisque les mécanismes contrôlant le SP sont localisés dans le tronc cérébral et le mésencéphale alors que les bases neuroanatomiques du rêve se situent à des niveaux plus élevés (Solms, 1995).

Des activités phasiques transitoires qui ont lieu pendant le SP (mouvement des yeux) peuvent être reliées aux rêves. Le nombre de récits de rêves est corrélé avec les mouvements oculaires (Roffwarg et al., 1962).

Chez le chat et chez l'homme, seule la suppression de l'atonie musculaire pendant le rêve permet d'observer des comportements liés aux rêves. La lésion des régions du subcoeruleus dans le pont (Sastre et Jouvett, 1979a) chez le chat abolit l'atonie musculaire liée au SP ; les chats présentent alors des comportements stéréotypés pendant le SP en absence de stimulus externe. En SP sans atonie, les yeux sont partiellement ouverts, les pupilles sont en myosis et la membrane nictitante relâchée. L'animal regarde, soulève la tête, atteint, saisit et traque une proie imaginaire. Le toilettage peut avoir lieu alors que des activités sexuelles et d'alimentation n'ont jamais été observées (Jouvett, 1979). Ce comportement caractéristique du SP ne réveille pas le chat. La pathologie correspondant à ce modèle animal est nommée troubles du comportement en SP ou RBD (pour REM-sleep behavior disorder) chez l'homme (Schenck et al., 1996). Ces sujets effectuent occasionnellement du SP sans atonie et leurs rêves pendant cet état sont en général assez violents. L'atonie serait donc un dispositif de protection de l'organisme afin d'éviter l'expression de réponses motrices non désirées (Morrison et al., 1999).

## 2.2 L'ontogénèse du sommeil paradoxal et la maturation cérébrale

Les enfants présentent des quantités de SP beaucoup plus élevées qu'à l'âge adulte. En effet le SP est très présent après la naissance et représente 50 à 60% de la vie d'un nouveau né (Fig. 2).



**Figure 2 : sommeil chez l'homme en fonction de l'âge.** Il y a une augmentation marquée des quantités de SP dans le dernier trimestre de grossesse et une diminution progressive des quantités de SP pendant la première année après la naissance en parallèle à l'augmentation des quantités d'éveil. Les quantités de SL augmentent aussi après la naissance. La partie en jaune est un état de vigilance primitif qui correspondrait au SP. D'après (Hobson, 2009).

Chez les oiseaux et les mammifères, le SP apparaît tôt et précède le SL dans l'ontogénèse. En effet, les centres du SL (rostraux, thalamiques et corticaux) ne sont pas encore développés alors que les mécanismes du tronc cérébral générant le SP sont déjà présents à la naissance (Frank et Heller, 2003 ; Karlsson *et al.*, 2005). Le SP est donc un état primitif et le premier état par défaut. Les quantités du SP sont très élevées chez le fœtus ou l'animal immature lorsque les entrées sensorielles sont limitées. Le SP serait un état généré intérieurement afin de stimuler le cerveau sans entrées sensorielles (Roffwarg *et al.*, 1966 ;

Jouvet-Mounier, 1968 ; Jouvet, 1980). Cet état occupe la majorité du cycle veille sommeil pendant le développement fœtal.

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. Cet état prédomine donc lors de la mise en place des processus les plus complexes du développement du système nerveux dont l'établissement de connexions et de circuits fonctionnels.

Ainsi, le SP est concomitant du développement du système nerveux des mammifères, ce qui est un premier argument pour son implication dans les phénomènes de plasticité corticale (Maquet et Franck, 1997 ; Hobson et Pace-Schott, 2002). Cependant, cette stimulation encore nécessaire chez l'adulte remplirait d'autres fonctions. En effet, les jeunes mammifères pendant leur 1<sup>ère</sup> année de vie montrent une considérable diminution du SP alors que l'apprentissage est très important (Roffwarg *et al.*, 1966 ; Baker *et al.*, 2005).

### **2.3 La phylogenèse du sommeil paradoxal**

Inversement à l'ontogenèse, le SP apparaît relativement tard au cours de l'évolution phylogénétique puisqu'il est présent chez les oiseaux et les mammifères alors que les critères classiques du SP chez les poïkilothermes sont absents. Il semble ainsi que l'apparition de l'homéothermie et du SP soient concomitantes. De plus, chez l'Homme, la durée des épisodes de SP augmente progressivement pendant la nuit de sommeil et est maximale en fin de nuit. La température dans plusieurs régions cérébrales augmente pendant le SP (Wehr, 1992 ; Baker *et al.*, 2005) (Horne, 2000) et pourrait préparer le cerveau à l'Ev (Siegel, 2005). De plus, les neurones de l'hypothalamus, répondent à la chaleur pendant l'Ev et le SL mais ne répondent plus pendant le SP (Parmeggiani *et al.*, 1986 ; Horne, 2000) suggérant que le SP est un état primitif.

Le passage de la poïkilothermie à l'homéothermie s'est également accompagné d'une évolution du cerveau avec l'apparition de fonctions dites supérieures et des mécanismes de production d'énergie. L'apparition du SP pourrait alors trouver son origine dans l'apparition de ces nouvelles fonctions cérébrales et l'augmentation de la dépense d'énergie. Elle pourrait aussi avoir son origine dans le développement du tronc cérébral chez les homéothermes, ainsi que dans le développement du néocortex. La durée des périodes de SP est associée positivement au poids du cerveau mais indépendante de celles du corps et du métabolisme (Siegel, 2005) ; par exemple le rat présente 12 min de SP par jour, le chat 30min et l'éléphant 120 min.

Des différences quantitatives considérables existent cependant entre chaque espèce liées à des facteurs éco-éthologiques spécifiques, comme par exemple le fait que la plupart des gros dormeurs soient des espèces prédatrices carnivores capables de résoudre rapidement leurs problèmes énergétiques aux dépens de leurs proies herbivores. La fonction du sommeil chez les animaux est de conserver l'énergie, cependant il met l'animal dans un état vulnérable. Le SP élèverait la conscience à un niveau d'Ev qui permet une réponse

rapide face au danger avec des éveils momentanés permettant de fugaces aperçus du monde extérieur et aurait un rôle de sentinelle (Horne, 2000). Les animaux se réveillent le plus souvent en SP avec des fonctions sensori-motrices élevées en comparaison des animaux qui sont éveillés en SL (Horner et al., 1997). D'un côté, le SP serait un distracteur actif des systèmes sensoriels, et préparerait au traitement de l'action en Ev. De l'autre côté, le SP est particulièrement présent lorsque l'animal n'est pas en danger. Le SP préparerait l'organisme à l'Ev ou inhiberait l'Ev de l'animal quand il n'est pas en danger pour qu'il puisse dormir plus longtemps.

Une des théories visant à expliquer l'apparition du SP au cours de l'évolution est que cet état permettrait un arrêt des neurones monoaminergiques constamment actifs et stimulés au cours de l'Ev (Siegel, 1995). L'arrêt de la transmission monoaminergique permettrait ainsi d'établir des processus de récupération neuronale nécessaires à l'intégrité du système nerveux central et de moduler la sensibilité de ces systèmes de transmetteurs en augmentant les quantités et l'activité de leurs enzymes synthétiques, de leurs transporteurs et récepteurs (Siegel et Rogawski, 1988 ; Shaw *et al.*, 2000). Chez les poïkilothermes, ces récupérations neuronales peuvent se manifester par des périodes d'arrêt de vigilance et d'attention lors de l'Ev, rendant l'animal vulnérable vis-à-vis de son environnement. Ainsi chez les homéothermes, l'apparition de périodes de SP consacrées à l'arrêt de la transmission monoaminergique permet de maintenir un degré de vigilance élevé pendant toute la période d'Ev.

## **2.4 Le sommeil paradoxal et la neurogenèse**

Cette évolution vers l'homéothermie est aussi accompagnée de la quasi-disparition de la neurogenèse tout au long de la vie de l'animal adulte. En effet, chez les animaux poïkilothermes (poissons, amphibiens et reptiles), il existe une croissance continue du cerveau pendant toute la vie des individus, assurée par une neurogenèse constante. Les mammifères et les oiseaux ne conservent qu'en partie cette faculté, notamment au niveau de la couche sous-granulaire du gyrus dentelé (GD) de l'hippocampe et le bulbe olfactif (Gross, 2000). Les cellules progénitrices du GD ont le potentiel de proliférer et de se différencier en neurones ou en cellule gliales. Ces progéniteurs se différencient préférentiellement en cellules granulaires (Kuhn *et al.*, 1996 ; Lledo *et al.*, 2006). Ainsi, compte tenu de la coïncidence de la diminution de la neurogenèse chez l'adulte et de l'apparition du SP en terme d'évolution, une des fonctions du SP pourrait être d'optimiser la présence du peu de nouveaux neurones qui se constituent, en régulant leur prolifération, leur migration et leur différenciation. D'autre part, les espèces homéothermes qui présentent le plus de néo-neurogenèse sont aussi celles qui font le moins de SP, comme par exemple les oiseaux. Enfin, le passage de l'état proche du SP chez le fœtus au SP dont la durée quotidienne est moins importante marque la fin de la neurogenèse foetale.

Dans le gyrus dentelé chez le rat, une privation automatique sélective de SP de 4 jours entraîne une diminution de la prolifération cellulaire et du nombre de cellules exprimant le phénotype neuronal 3 semaines après le protocole (Guzman-Marin *et al.*, 2007 ; Guzman-Marin *et al.*, 2008). De plus, le nombre de nouvelles cellules est fortement corrélé avec les quantités de SP. Les résultats obtenus avec la privation totale de sommeil (Guzman-Marin *et al.*, 2005) et ceux obtenus avec la privation sélective de SP sont très proches (Guzman-Marin *et al.*, 2008), ainsi ce serait plutôt l'absence de SP qui aurait un impact sur la neurogenèse plutôt que l'absence de SL. La privation de SP n'interfère pas avec la migration des nouvelles cellules granulaires mais avec la maturation cellulaire. L'effet de la privation du SP sur la neurogenèse ne serait pas direct (Guzman-Marin *et al.*, 2007 ; Mueller *et al.*, 2008). En effet, la synthèse protéique cérébrale est augmentée pendant le sommeil (Ramm et Smith, 1990). Elle est nécessaire pour la prolifération cellulaire et la croissance puisque la génération de nouvelles cellules et des neurones est régulée par une variété de facteurs moléculaires incluant des facteurs trophiques, des cytokines, des hormones et une gamme de neuromodulateurs et de neurotransmetteurs (Abrous *et al.*, 2005 ; Hagg, 2005 ; Ming et Song, 2005). Plusieurs de ces facteurs sont affectés par la privation de sommeil. Par exemple, le BDNF facilite la prolifération cellulaire et la survie des cellules du GD (Lee *et al.*, 2002) et le niveau d'expression du BDNF dans l'hippocampe est corrélé négativement à la perte de SP (Guzman-Marin *et al.*, 2008).

## **2.5 Le sommeil paradoxal et la mémoire**

L'Ev permet le traitement des stimuli extérieurs, l'encodage de ces informations dans la mémoire et leur rappel. La perte de contrôle comportemental et de conscience liées au sommeil s'oppose au traitement des stimuli extérieurs, mais est propice à la consolidation mnésique. En effet, après l'encodage, les nouvelles traces mnésiques sont labiles et doivent être consolidées et renforcées pour devenir plus stables et s'intégrer dans le réseau préexistant des mémoires à long terme. Ces processus débutent dès les minutes où les heures qui suivent l'apprentissage et sont caractérisés aux niveaux moléculaire et cellulaire par des phénomènes de plasticité synaptique. Des systèmes de consolidation plus lents permettent ensuite une réorganisation de la trace mnésique à travers les différentes aires cérébrales. Le sommeil semble être impliqué dans plusieurs de ces mécanismes.

Ainsi, une période de sommeil post-apprentissage est bénéfique pour la rétention de l'information des différentes formes de mémoire (Plihal et Born, 1997 ; Stickgold *et al.*, 2000a ; Stickgold *et al.*, 2000b ; Gais *et al.*, 2002 ; Walker *et al.*, 2003 ; Rasch *et al.*, 2007). Le sommeil est aussi impliqué dans la mémoire émotionnelle (Wagner *et al.*, 2001 ; Payne *et al.*, 2008 ; Nishida *et al.*, 2009) et les bénéfices d'une période de 3 heures de sommeil post-apprentissage émotionnel sont même détectables 4 ans plus tard (Wagner *et al.*, 2006). Les différentes catégories de mémoire rivalisent et interfèrent réciproquement pendant l'Ev. Les différents stades de sommeil contribueraient séquentiellement à l'interaction et au

désengagement des différents types de consolidation afin de permettre la consolidation indépendante de ces mémoires (Robertson, 2009).

### **2.5.1 Influence des états de sommeil sur la consolidation**

Chez l'homme, certains apprentissages impliquant des formes de mémoires déclaratives dépendantes de l'hippocampe, comme c'est le cas lors de tâches de mémoire spatiale (Plihal et Born, 1999) ont révélé que la rétention est meilleure lorsque la première partie de nuit riche en SL est préservée. En revanche, les performances de mémoire non déclarative indépendantes de l'hippocampe telles que des tâches d'habileté motrice et de mémoires émotionnelles sont plus élevées si c'est la seconde partie de nuit riche en SP qui est préservée (Plihal et Born, 1997; 1999 ; Wagner *et al.*, 2001). En effet, chez le rat, les capacités d'apprentissage spatial procédural sont altérées après une privation de SP (Smith et Rose, 1996). Ces effets de la privation de SP sont d'autant plus importants que la tâche est difficile, et qu'elle nécessite un traitement cognitif complexe (Hennevin *et al.*, 1995 ; Smith, 1995).

Pendant, les bénéfices du sommeil sur la consolidation de la mémoire déclarative et non déclarative sont optimaux quand le SL et le SP se succèdent (Giuditta *et al.*, 1995 ; Gais *et al.*, 2000). Ainsi, les performances à une tâche de discrimination de texture visuelle sont corrélées aux quantités de SL dans le premier quart de la nuit et aux quantités de SP dans le dernier quart (Stickgold *et al.*, 2000a). De plus, la rétention d'une mémoire déclarative mais émotionnelle est altérée chez des sujets privés de seconde partie de nuit (Wagner *et al.*, 2001). Ainsi le traitement d'une mémoire déclarative, qui s'effectue normalement au cours du SL, peut également s'opérer durant le SP si elle est émotionnelle.

### **2.5.2 Influence de l'apprentissage sur les quantités et la qualité du sommeil**

Réciproquement, les quantités de SP augmentent après exposition à une variété de tâches d'apprentissage ou à un environnement enrichi chez le rat (Smith, 1995 ; Smith et Rose, 1997). Plus le degré de difficulté de l'apprentissage est élevé, plus les quantités de SP sont hautes et ne sont plus augmentées lorsque l'animal maîtrise la tâche (Hennevin *et al.*, 1995). Une augmentation de la durée ou du nombre d'épisodes de SP est observée après une variété d'apprentissage chez l'homme, comportant des tâches visuelles, des tâches motrices complexes ou des tâches verbales. Les performances de certains apprentissages peuvent aussi être associées aux caractéristiques du SP, tel que les mouvements des yeux ou le contenu onirique (Peigneux *et al.*, 2001a). Chez l'homme, l'activité thêta néocorticale est augmentée pendant le SP suivant un apprentissage de paires de mots (Fogel *et al.*, 2007).

En SL, chez les rats l'apprentissage d'associations d'odeurs et de récompense produit une augmentation du nombre de ripples pendant le SL post-apprentissage (Eschenko *et al.*, 2008). Les fuseaux et autres activités phasiques du SL permettraient le transfert de l'information de l'hippocampe au néocortex pendant la dépolarisation de l'oscillation lente



pour y induire un changement synaptique nécessaire au stockage de l'information à long terme (Dave et Margoliash, 2000 ; Molle *et al.*, 2002 ; Sirota *et al.*, 2003 ; Molle *et al.*, 2006 ; Steriade, 2006).

### **2.5.3 Réactivation des traces mnésiques pendant le sommeil**

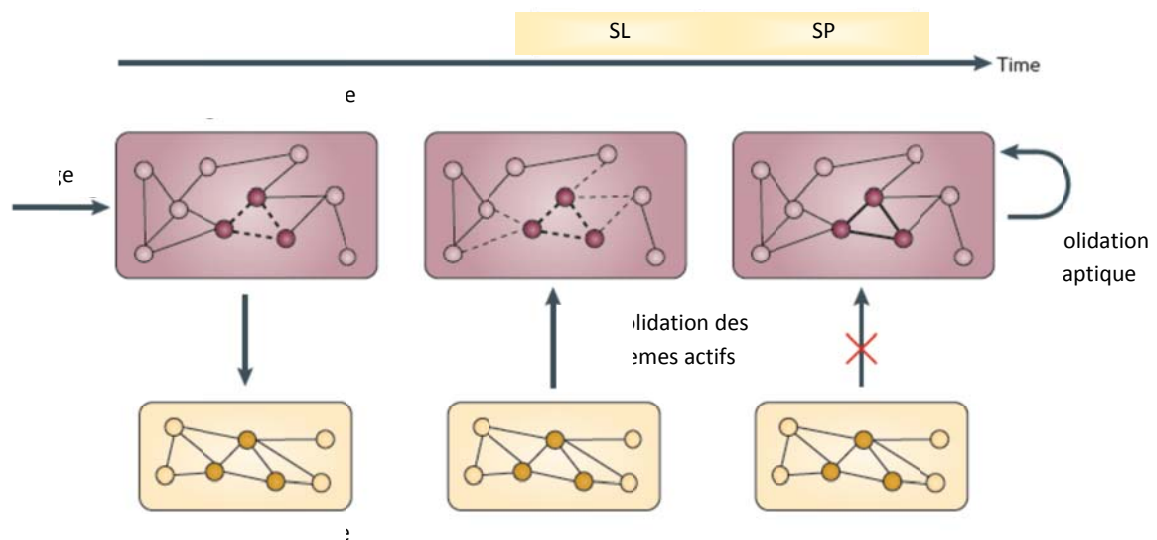
Au niveau systémique, certaines des aires cérébrales engagées dans une tâche mnésique implicite visuo-motrice sont sélectivement réactivées et la connectivité entre ces aires est augmentée durant le SP consécutif (Maquet *et al.*, 2000 ; Laureys *et al.*, 2001 ; Peigneux *et al.*, 2003). De plus, les aires hippocampiques et parahippocampiques actives pendant une tâche de mémoire spatiale sont réactivées pendant le SL post-apprentissage (Peigneux *et al.*, 2004) et leur activation est corrélée positivement avec l'amélioration de la navigation spatiale. Ensuite, la consolidation mnésique de tâches déclaratives peut être influencée par une activation exogène des traces mnésiques durant le SL. Par exemple, la présentation d'une odeur pendant un apprentissage visuo-spatial (Rasch *et al.*, 2007) et la réexposition à cette odeur pendant le SL post apprentissage améliore la rétention du test et induit une plus forte activation de l'hippocampe. En revanche, cet effet n'est pas observé lorsque l'odeur est présentée pendant le SP.

Au niveau cellulaire, les cellules de lieu de l'hippocampe du rat en comportement exploratoire déchargent de façon spatio-temporelle afin d'élaborer une représentation mnésique de l'environnement (Wilson et McNaughton, 1993), ce type d'activité est "rejouée" par les mêmes populations de neurones de CA1 au cours des phases de sommeil consécutives (Wilson et McNaughton, 1994 ; Louie et Wilson, 2001). Ces réactivations de séquences sont reproduites à un rythme accéléré et moins précises que pendant l'Ev et ont plutôt lieu pendant le SL (Nadasdy *et al.*, 1999 ; Foster et Wilson, 2006). Peu d'études ont caractérisé ces séquences ralenties ou accélérées au cours du SP (Poe *et al.*, 2000 ; Louie et Wilson, 2001 ; Ribeiro *et al.*, 2004). Cependant en SP, les cellules de lieu encodant une mémoire familière sont réactivées préférentiellement pendant la phase négative des oscillations thêta, alors que les cellules encodant les nouvelles mémoires déchargent pendant la phase positive de l'oscillation. Ainsi, le SP dépotentialiserait les circuits synaptiques qui encodent des événements familiers mais potentialiserait ceux qui encodent les nouveaux épisodes (Poe *et al.*, 2000). Ces réactivations neuronales se produisent de manière coordonnée entre neurones de l'hippocampe et du néocortex durant le SL post-apprentissage.

### **2.5.4 Homéostasie et consolidation synaptique**

La consolidation implique le renforcement des représentations mnésiques au niveau synaptique (consolidation synaptique)(Dudai, 2004 ; Frankland et Bontempi, 2005). La potentialisation à long terme (LTP), un mécanisme clé de la consolidation synaptique et de la plasticité, peut être induite dans l'hippocampe pendant le SP mais moins facilement pendant

le SL (Bramham et Srebro, 1989). Le maintien de la LTP dans l'hippocampe du rat, mais pas dans le cortex préfrontal médian est inhibé si l'induction est suivie par une privation de SP (Romcy-Pereira et Pavlides, 2004). De plus une privation de SP de 3 jours diminue la transmission synaptique et la LTP au niveau du CA1 dorsal et 150 minutes de récupération rétablissent ces paramètres. Associée à ces déficits la privation de SP induit une diminution des molécules nécessaires à la plasticité synaptique (Ravassard *et al.*, 2009). Ces mécanismes de plasticité aboutissent à un remodelage des réseaux neuronaux impliquant par exemple l'insertion de nouveaux récepteurs, la conversion de synapses silencieuses en synapses actives et la formation de nouvelles synapses (Jones *et al.*, 2001). Chez le singe, la durée du SL est corrélée positivement avec le niveau de synthèse protéique (Nakanishi *et al.*, 1997) et chez le chat l'anisomyine (inhibiteur de la synthèse protéique) administrée pendant le SP altère l'apprentissage (Smith *et al.*, 1991).



**Figure 3 : Contribution séquentielle du SL et du SP à la consolidation mnésique.** Pendant l'éveil, les traces mnésiques sont encodées pour le stockage temporaire de l'information. Pendant le SL consécutif, le système actif de consolidation implique des réactivations répétées des mémoires nouvellement encodées et stockées temporairement et des réactivations pour le stockage à long terme associées à des représentations similaires (lignes en pointillées). Ces processus favorisent la réorganisation et l'intégration des nouvelles mémoires dans le réseau des mémoires à long termes préexistantes. Pendant le SP consécutif, les aires cérébrales se désengagent, et le stockage temporaire est "déconnecté" du stockage à long terme, ce qui permet des processus locaux de consolidation synaptique qui renforcent les représentations mnésiques réactivées pendant le SL (lignes plus épaisses)(Diekelmann et Born, 2010).

Le SL supprimerait les signaux moléculaires liés à la LTP mais augmenterait ceux liés à la LTD (Cirelli et Tononi, 2000 ; Cirelli *et al.*, 2004 ; Vyazovskiy *et al.*, 2008 ; Dash *et al.*, 2009). Les amplitudes maximales des oscillations lentes au début du sommeil sont liées à une force synaptique élevée due à l'encodage d'informations pendant l'Ev et diminuent peu à peu au cours des cycles de SL entraînant une dépotentialisation graduelle des synapses précédemment saturées (Tononi et Cirelli, 2006). Le SL permettrait la réduction de cette

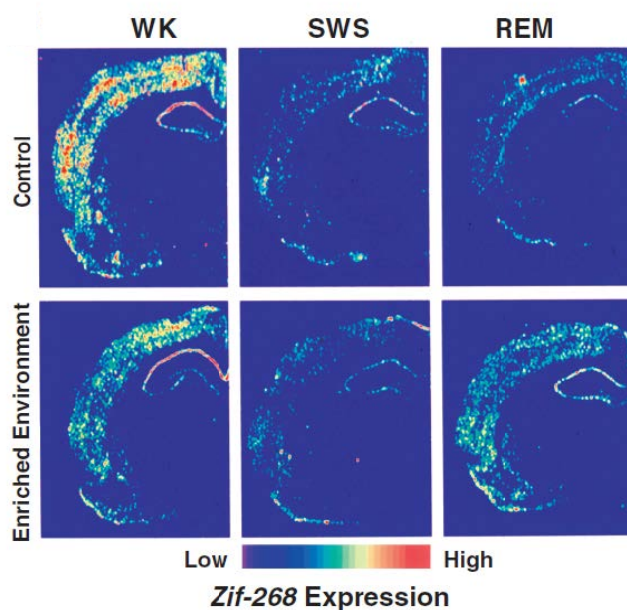
force synaptique à un niveau plus soutenable en terme d'énergie et la réutilisation des synapses pour un futur encodage (Vyazovskiy *et al.*, 2008 ; Dash *et al.*, 2009). Ainsi, le SL protègerait passivement ces mémoires des dommages et des interférences (stabilisation), alors que le SP consoliderait activement les nouvelles représentations mnésiques (renforcement)(Wixted, 2004 ; Ellenbogen *et al.*, 2006).

**La ré-activation des nouvelles mémoires (consolidation des systèmes) pendant le SL permettrait de solliciter le réseau cortical pertinent afin que la consolidation synaptique (expression des gènes d'activation précoces (IEGs) et modification du réseau neuronal) puisse avoir lieu pendant le SP (Fig. 3).**

### 2.5.5 Transfert de l'information

La mémoire nouvellement encodée pour le stockage à court terme de l'information mnésique dans l'hippocampe pendant l'Ev est transférée au néocortex pour le stockage de l'information à long terme (Takashima *et al.*, 2006 ; Gais *et al.*, 2007).

La mémoire déclarative est plutôt associée au système de consolidation du SL du fait de sa nature intégrative entre les différents systèmes de mémoire, alors que la mémoire procédurale est plus dépendante du SP du fait de sa spécificité à des circuits cérébraux localisés.



expérience sur cerveau états de non-trent '68 dans ez le rat. e zif-268 (SWS) et raux en ix de zif- SL mais fets sont le cortex o *et al.*,

L'expression du gène *Zif-268*, un marqueur indirect de plasticité, a permis de révéler la propagation de vagues d'activation neuronale corticale, son expression est induite dans l'hippocampe de rongeurs 30 minutes après une exposition à un environnement nouveau (Fig. 4)(Ribeiro *et al.*, 1999), ou après l'application d'une stimulation électrique de haute fréquence dans le gyrus dentelé (Ribeiro *et al.*, 2002). L'expression de *zif-268* se propage sélectivement dans le cortex entorhinal pour gagner ensuite d'autres aires néocorticales durant les phases de SP consécutives et seulement si les animaux effectuent du SP. Pendant

le SP, les gammes de fréquence du thêta ont une cohérence réduite entre les circuits limbiques hippocampiques et thalamo-corticaux par rapport au SL ou à l'Ev, indiquant une diminution de la communication entre ces structures (Cantero *et al.*, 2003 ; Axmacher *et al.*, 2008 ; Montgomery *et al.*, 2008). Le niveau d'activation cérébrale élevé pendant le SP pourrait agir non spécifiquement afin d'amplifier la plasticité synaptique locale (Robertson, 2009) dans un environnement qui n'est pas biaisé par les entrées des stimuli extérieurs.

Les mémoires initialement dépendantes de l'hippocampe sont graduellement transférées pendant le sommeil aux aires néocorticales et deviennent des mémoires à long terme plus stables et résistantes aux interférences (Ellenbogen *et al.*, 2006 ; Drosopoulos *et al.*, 2007 ; Korman *et al.*, 2007 ; Walker, 2009).

Les informations lors de l'Ev sont parallèlement encodées dans les réseaux néocorticaux et dans l'hippocampe alors que pendant le SL consécutif, la réactivation des traces mnésiques dans les circuits hippocampiques et celles des régions néocorticales permettrait un retour synchrone de l'information de ces structures au néocortex (Sirota et Buzsaki, 2005 ; Marshall et Born, 2007).

**Les mécanismes de plasticité incluraient donc la consolidation mnésique dans le néocortex en parallèle au désengagement de l'hippocampe pendant le sommeil (Ribeiro et Nicolelis, 2005).**

Cependant un nombre considérable de neurones immunoréactifs pour FOS sont présents dans certaines aires hippocampiques et certaines aires limbiques après hypersomnie en SP sans apprentissage particulier, ce qui suggère l'existence de changements à long terme indépendants de la mémoire (Sastre *et al.*, 2000). D'autres facteurs (BDNF, MAPK, ERK) voient aussi leur expression augmenter dans l'hippocampe après hypersomnie de SP (Kelly *et al.*, 2003). Le SP est aussi présent sans apprentissage préalable, il serait donc impliqué dans d'autres fonctions.

Le rôle du SP serait plutôt lié à son influence sur l'activité corticale. L'étude de l'activité corticale et des réseaux neuronaux qui en sont responsables pendant le SP sont donc une étape indispensable pour la compréhension des fonctions du SP. C'est pourquoi cette problématique est à la base de mes travaux de thèse. La suite de cette introduction traitera donc principalement des données de la littérature sur l'activation corticale pendant le SP et des mécanismes sous-jacents à son activation.

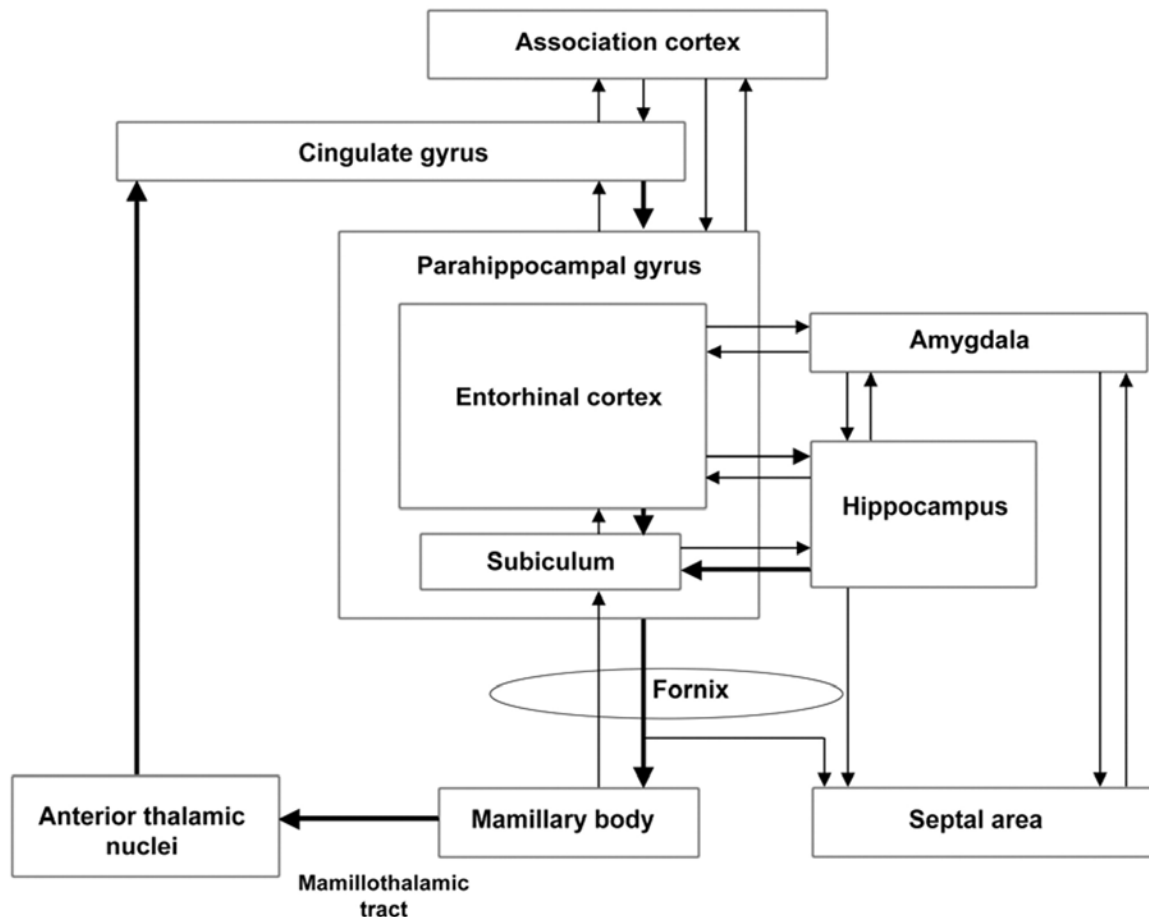
### **3. Activation corticale pendant le sommeil paradoxal**

#### **3.1 Anatomie du cortex**

Le cortex est composé du néocortex et de l'allocortex qui comprend :

- l'archicortex correspondant à la formation hippocampique (corne d'Amon et gyrus dentelé).
- le mésocortex correspondant aux régions parahippocampiques et aux gyrus cingulaire (rétrosplénial et cortex cingulaire antérieur). Il permet le transfert d'informations entre la formation hippocampique et le néocortex.
- le paléocortex composé du cortex entorhinal, du cortex pyriforme et du système olfactif.

Fonctionnellement, certains de ces cortex sont à la base du système limbique impliqué dans la mémoire et les émotions (Fig. 5). Ce système est important dans notre étude puisque plusieurs de ces régions limbiques sont sollicitées pendant le SP.



**Figure 5 : Les circuits neuronaux majeurs du système limbique.** Les lignes épaisses représentent le circuit de Papez. Le gyrus cingulaire projette au cortex entorhinal dans le gyrus parahippocampique. Les fibres efférentes majeures projetant aux corps mamillaires via le fornix sont originaires du subiculum. Les fibres efférentes des corps mamillaires projettent aux noyaux thalamiques antérieurs via le tractus mamillothalamique. Le noyau thalamique antérieur est connecté au gyrus cingulaire. La formation hippocampique et le cortex entorhinal forment un circuit intrinsèque. D'après (Oikawa *et al.*, 2001).

Le système limbique comprend des régions corticales telles que le cortex préfrontal, le cortex cingulaire antérieur et rétrosplénial, la formation hippocampique, les régions parahippocampiques, le cortex entorhinal et l'insula.

Il comprend aussi des régions sous-corticales dont l'amygdale, le septum, le système olfactif, le noyau accumbens, les noyaux thalamiques médians et antérieurs et l'hypothalamus postérieur dont principalement les noyaux supramamillaires et mamillaires.

D'après nos résultats et ceux de la littérature, les voies afférentes à la formation hippocampique et aux régions parahippocampiques sont anatomiquement séparées des voies afférentes aux néocortex. De plus, l'activité électrique enregistrée dans le néocortex et l'hippocampe pendant le SP n'est pas la même. Dans la suite de cette introduction, nous traiterons donc ces deux structures corticales séparément.

### 3.2 L'activation néocorticale pendant le sommeil paradoxal

### **3.2.1 Anatomie du néocortex**

Le néocortex est impliqué dans la perception sensorielle, les mouvements volontaires, la mémoire et la conscience. Il est composé de 6 couches corticales dont les connexions anatomiques diffèrent.

Le néocortex contient 2 groupes neuronaux majeurs, les neurones pyramidaux excitateurs à glutamate/aspartate et les interneurons inhibiteurs GABAergiques. Les neurones au sein de chacun de ces groupes sont très hétérogènes de par les structures sur lesquelles ils projettent, leur nature chimique, leurs caractéristiques électrophysiologiques et leur activité pendant les états de vigilance.

Brièvement, les axones des neurones pyramidaux localisés dans les couches corticales II-III se terminent sur les aires corticales ipsi et contralatérales ; les neurones de la couche V projettent sur les ganglions de la base, les noyaux thalamiques intralaminaires, le colliculus supérieur et la moelle épinière ; les neurones pyramidaux de la couche VI projettent sur les noyaux thalamiques spécifiques d'une fonction sensorielle et le claustrum. Le groupe des interneurons inhibiteurs représente 20 à 25% des neurones corticaux et ciblent les cellules pyramidales ou d'autres neurones inhibiteurs (Jones et al., 1975).

### **3.2.2 L'activation néocorticale pendant le sommeil paradoxal**

#### **3.2.2.1 L'activité néocorticale d'après l'EEG**

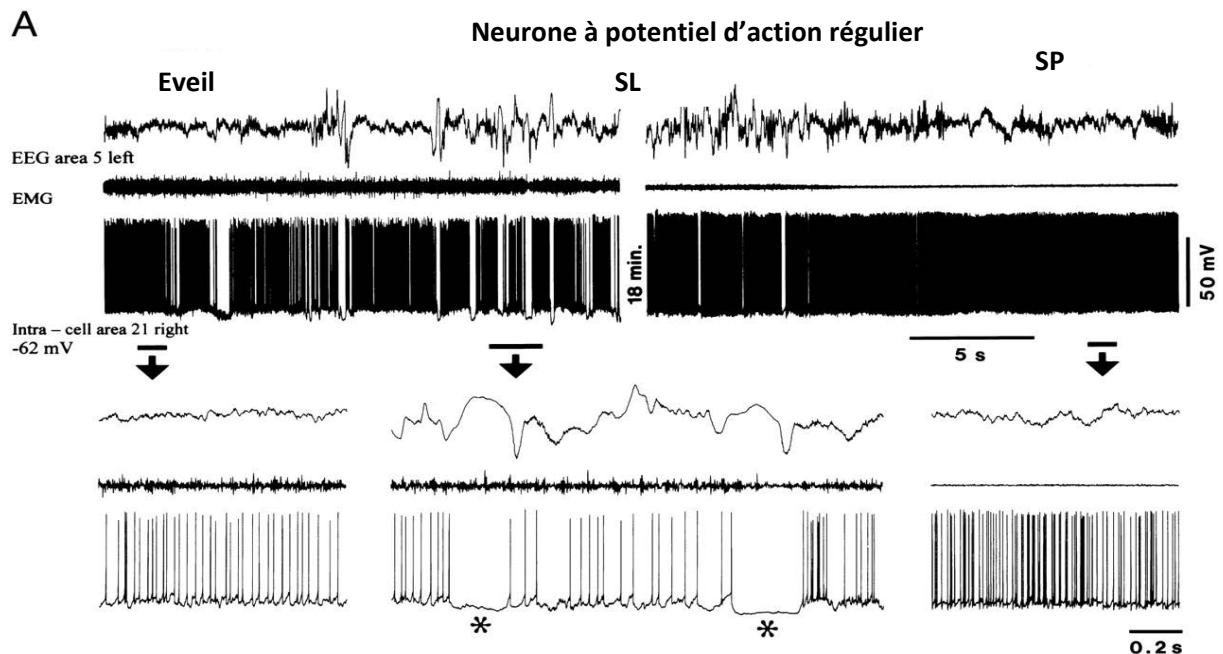
L'Ev et le SP se distinguent du SL par une activité EEG rapide de faible voltage qui est dite "désynchronisée". L'activité EEG enregistrée au cours du SL est dite "synchronisée" du fait d'une activité EEG lente de haut voltage.

Chez le rongeur, l'Ev et le SP sont plutôt caractérisés par une prédominance dans l'EEG d'ondes dans la gamme de fréquence thêta (5-10Hz), beta (15-30Hz) et gamma (30-60Hz). Le SL est quant à lui caractérisé par la présence d'ondes lentes dans les gammes de fréquence delta (1-4Hz) (Tableau 1) (Maloney *et al.*, 1997).

<b>Oscillation</b>	<b>Gamme de fréquence</b>	<b>Description</b>
<b>Delta</b>	0,5-4,5Hz	Source principale : déafférentation thalamo-corticale. Amplitude augmentée en SL.
<b>Thêta</b>	5-9Hz	Source principale : hippocampe. Grande amplitude en SP et en éveil particulièrement pendant les mouvements et pendant l'exploration
<b>Sigma</b>	10-14Hz	Amplitude augmentée pendant les fuseaux du SL léger et le stade intermédiaire
<b>Beta</b>	15-30Hz	Etat actif/d'alerte, anxiété et concentration active, amplitude élevée en SP.
<b>Gamma</b>	30-120Hz	Amplitude augmenté en SP et en éveil, est lié à la perception et à la cognition.

**Tableau 1 : Bandes de fréquence et amplitude de l'EEG lors des états comportementaux et des états de vigilance chez le rongeur.**

Chez l'homme, l'EEG pendant le SL permet de le diviser en 4 stades allant du SL léger (stade 1) au SL profond (stade 4). Contrairement aux données chez l'animal indiquant que l'EEG du SP est proche de celui de l'Ev, les données chez l'homme le comparent plutôt au SL lent léger. Ce stade 1 du SL présente en effet tout comme le SP des mouvements oculaires mais plus lents, ainsi que des ondes rapides et de faible amplitude. Les ondes bêta sont présentes lorsque les yeux sont ouverts en Ev, et apparaissent aussi pendant le SP chez l'homme. Le rythme alpha est présent lors de l'Ev calme lorsque les yeux sont fermés. Les ondes lentes pendant le SL proviennent des neurones corticaux qui présentent des oscillations très lentes (0,5-1Hz) sous tendant l'onde delta (1-4Hz) consistant en une dépolarisation prolongée et synchrone des neurones corticaux (liée à leur décharge répétitive rapide en "burst" (10-40Hz) (McCarley *et al.*, 1983) et de longues hyperpolarisations où les neurones sont silencieux. Plus le sommeil est profond, plus les ondes delta sont amples. Ces ondes lentes sont parfois entrecoupées d'évènements phasiques appelés fuseaux. Pendant l'Ev et le SP, les neurones corticaux présentent un mode de décharge tonique (potentiels d'action individuels) qui correspond aux oscillations rapides (Figure 6) (Steriade *et al.*, 1986).



**Figure 6 : Variation du potentiel de membrane et du motif de décharge d'un neurone cortical pendant les états d'Ev et de sommeil chez le chat chroniquement implanté.** L'enregistrement du neurone cortical pendant la transition de l'Ev au SL, et au SP indique qu'il présente un mode de décharge différent pendant ces 3 états de vigilance. Les périodes marquées par des barres horizontales sont agrandies en dessous (↓). Ce neurone cortical présente une décharge tonique pendant l'Ev et le SP et des hyperpolarisations cycliques associées à la phase positive du potentiel de champs de l'EEG pendant le SL. Les décharges toniques pendant l'Ev et le SP sont interrompues pendant le SL par de longues périodes d'hyperpolarisation correspondant à des ondes positives de



l'EEG et des fuseaux. Certaines hyperpolarisations prolongées pendant le SL sont indiquées par un \* (Steriade, 2001b).

L'oscillation thêta enregistrée principalement dans l'hippocampe et certains cortex limbiques, jouerait un rôle spécifique dans les fonctions cognitives et/ou émotionnelles et est présente pendant l'Ev actif et le SP (O'Keefe et Nadel, 1978 ; Gray, 1982 ; McNaughton et Gray, 2000). Chez l'homme, une activité thêta a aussi été enregistrée dans le lobe temporal basal et le cortex frontal mais seulement pendant les transitions du sommeil à l'Ev (Cantero *et al.*, 2003).

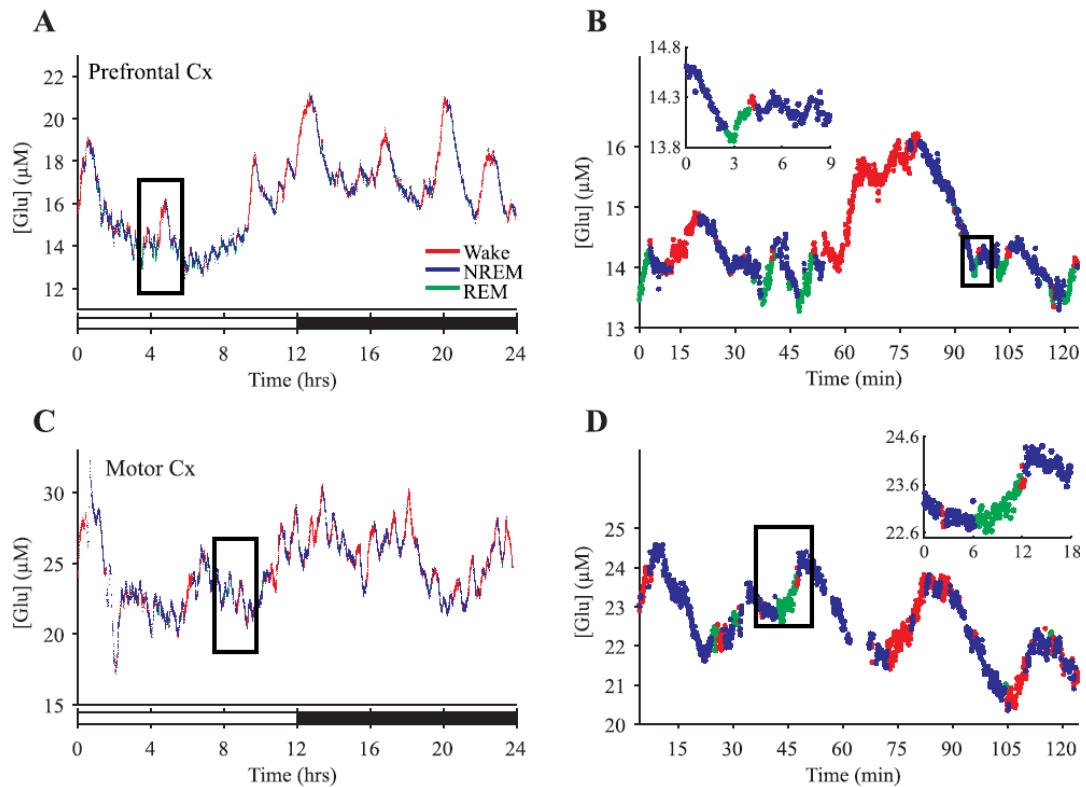
L'activité gamma (Tableau 1) enregistrée dans le néocortex est associée à l'attention, la perception sensorielle et le mouvement et est présente pendant l'Ev et le SP chez l'Homme comme chez l'animal (Bouyer *et al.*, 1981 ; Llinas et Ribary, 1993 ; Franken *et al.*, 1994 ; Maloney *et al.*, 1997). La synchronisation des neurones dans cette gamme de fréquence entre des aires corticales fonctionnellement reliées apporterait le lien nécessaire pour unifier les expériences cognitives en Ev et en SP (Llinas et Ribary, 1993).

Comme le SL, le SP n'est pas un état homogène. L'activité tonique du SP est entrecoupée de périodes d'événements phasiques correspondant à des secousses musculaires et des mouvements oculaires. La génération de ces événements reste énigmatique. D'autres activités phasiques comme les ondes ponto-géniculé-occipitales (PGO) enregistrées uniquement chez le chat, concernent un tiers de la durée totale d'un épisode de SP et sont dues à l'activité des neurones cholinergiques du pont, transmise au noyau géniculé latéral du thalamus et au cortex occipital (cortex entorhinal, cortex piriforme, amygdale, et hippocampe). Les ondes PGO pourraient être impliqués dans certaines fonctions cognitives (Hu *et al.*, 1988 ; Steriade *et al.*, 1990b). Chez le rat, ces ondes PGO n'ont pas été enregistrées. En revanche des ondes P sont présentes pendant le SP chez ces animaux ; ce sont des potentiels de champs phasiques générés par un groupe de cellules glutamatergiques du pont (au niveau du noyau sublatérodorsal) (Callaway *et al.*, 1987 ; Datta *et al.*, 1999) et transmises à de nombreuses parties du cerveau dont l'hippocampe et l'amygdale (Datta *et al.*, 1998).

**Ainsi, d'après l'analyse de l'EEG, le SP n'est pas différent de l'éveil actif. Cependant, l'utilisation d'autres techniques d'analyses expérimentales chez l'animal et chez l'homme permet de penser que le cortex fonctionne différemment pendant le SP et l'Ev. Nous exposons ci-dessous les arguments apportés par la mise en oeuvre de ces techniques.**

### **3.2.2.2 Concentrations en neurotransmetteurs dans le cortex**

D'après les études de microdialyse, les concentrations en Ach et en glutamate augmentent de façon similaire en Ev et en SP dans le cortex alors qu'elles diminuent en SL (Dash *et al.*, 2009).



**Figure 7 : Variations dynamiques de la concentration extracellulaire de glutamate pendant l'Ev, le SL et le SP. A** enregistrement de 24h dans le cortex préfrontal du rat. Chaque point correspond à une moyenne de concentration en glutamate pendant une fenêtre de 4 secondes d'Ev (rouge), de SL (bleu) ou de SP (vert). La fenêtre de 2h encadrée en **A** est agrandie à une résolution plus élevée en **B** avec l'encart présentant une transition entre le SL et le SP. **C** et **D** sont organisés comme **A** et **B** mais montrent un enregistrement de 24h dans le cortex moteur (Dash *et al.*, 2009).

Cependant, à l'exception de la dopamine, les concentrations en monoamines (sérotonine, noradrénaline et histamine) normalement élevées en Ev sont faibles en SP. Certains neurones corticaux présentent des décharges en bursts préférentiellement pendant le SL, et une activité tonique pendant l'Ev et le SP (Fig. 7) (McCormick, 1992). L'application d'ACh et d'un agoniste glutamatergique sur des neurones corticaux à activité phasique entraîne une dépolarisation et une suppression des décharges en bursts de ces neurones (Wang et McCormick, 1993).

**Malgré une activité EEG "désynchronisée" semblable pendant l'Ev et le SP, les concentrations en neurotransmetteurs ne sont pas les mêmes pendant ces 2 états de vigilance.** Il est donc peu probable que le cortex fonctionne de la même manière pendant l'Ev et le SP.

### 3.2.2.3 Traitement sensoriel pendant le sommeil paradoxal

Des modifications de traitement sensoriel sont observées au niveau du comportement mais aussi par l'enregistrement du potentiel de champ local (LFP) qui reflète

l'activité synaptique et unitaire (potentiel d'action). Le signal ainsi enregistré est la somme des courants locaux à la surface de l'électrode extracellulaire.

Les données sur le SL sont assez variables du fait de l'hétérogénéité de cet état, mais la plupart d'entre elles apportent des arguments en faveur d'une atténuation du traitement sensoriel. Par exemple, pendant le SL profond, les réponses évoquées par des stimuli auditifs sont altérées dans les neurones corticaux et du thalamus auditif par rapport à l'Ev. Cette inhibition du traitement sensoriel est encore plus forte pendant les fuseaux ou « spindles » (Elton *et al.*, 1997 ; Czisch *et al.*, 2002 ; Hennevin *et al.*, 2007 ; Czisch *et al.*, 2009).

Le SP reflète paradoxalement un état mental avec une activité cérébrale élevée mais accompagnée d'une forte atténuation du traitement sensoriel (Mouze-Amady *et al.*, 1986 ; Bastuji et Garcia-Larrea, 1999 ; Hobson et Pace-Schott, 2002). En effet, l'activation du cortex auditif après stimulation auditive est réduite pendant le SP tonique et absente lors des événements phasiques qui l'accompagnent (Sallinen *et al.*, 1996 ; Takahara *et al.*, 2002 ; Wehrle *et al.*, 2007). Néanmoins, l'enregistrement des neurones dans le thalamus auditif indique que ces neurones ont des réponses évoquées équivalentes pendant l'activité tonique du SP par rapport à l'Ev (Edeline *et al.*, 2000).

Les sujets peuvent se réveiller plus facilement pendant le SP lorsqu'ils sont sollicités par des stimuli pertinents que pendant le SL, par exemple, lorsqu'ils entendent leur propre prénom. En revanche en SP, le réveil par des stimuli non pertinents est plus difficile que pendant le SL (Rechtschaffen *et al.*, 1966). En général, la composante rapide des potentiels évoqués reflète plutôt les caractéristiques physiques d'un stimulus alors que la composante plus tardive est plutôt affectée par la signification du stimulus, le niveau d'attention du sujet, ou l'état de vigilance. Or, la composante tardive du potentiel évoqué suscitée par le prénom est présente en Ev et en SP, alors qu'en SL (stade 2) seule la composante rapide du potentiel évoqué est présente (Perrin *et al.*, 2000 ; Hennevin *et al.*, 2007). Chez les modèles dont l'atonie liée au SP est abolie, (Jouvet, 1965a) tel que le chat après lésion du SLD et les RBD chez l'homme (Schenck *et al.*, 1986), les réponses aux stimuli non pertinents sont aussi altérées alors que ceux tels que le cliquetis du bol de nourriture lors du SP sans atonie chez le chat le réveillent (Llinas et Pare, 1991). Ainsi, l'Ev difficile en SP ne serait pas lié à l'atonie musculaire mais à une modification de l'activité des réseaux neuronaux qui analysent les informations sensorielles d'une manière différente du SL et de l'Ev.

**Les stimuli seraient sélectionnés d'après leur pertinence pendant le sommeil et le réseau fonctionnel permettant cette sélection serait plus efficace pendant le SP (Steriade, 2003). L'activité intrinsèque (rêves, processus mnésique...) dominerait au dépend du traitement des stimuli extérieurs non pertinents pendant le SP.**

Ceci suggère donc que l'activité des régions corticales n'est pas la même en Ev et en SP. L'étude de l'activité des régions corticales à un niveau plus local était un des objectifs de ce travail, nous développerons donc ci dessous les données de la neuroimagerie sur ce sujet.

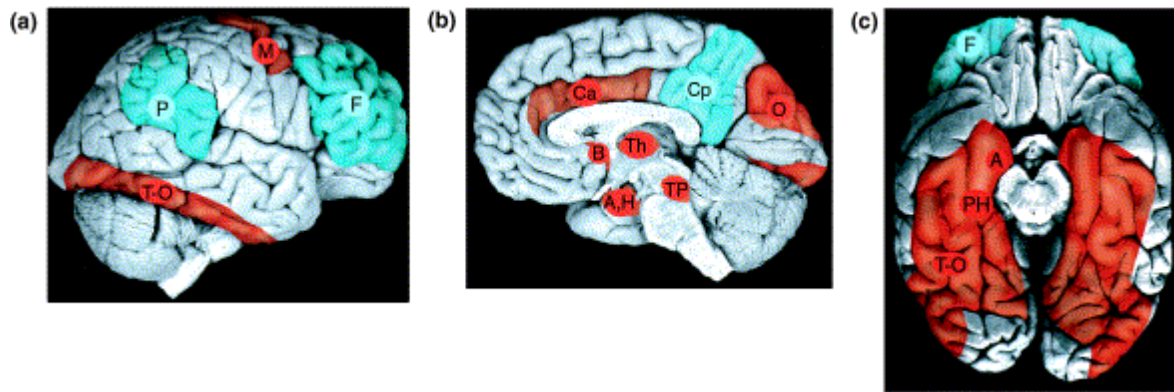
#### 3.2.2.4 Régions néocorticales activées en sommeil paradoxal

Les régions néocorticales actives pendant les états de vigilance ont principalement été étudiées chez l'homme par les techniques d'imagerie, tomographie à émission de positons (TEP), imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf) et magnétoencéphalographie (MEG).

La TEP permet de mesurer le produit de désintégration d'un produit radioactif et a une résolution temporelle de 1 minute et spatiale d'environ 7mm<sup>3</sup>. Elle ne peut donc pas capter les modifications de l'activité cérébrale d'événements courts. Elle quantifie le métabolisme du glucose ou le flux cérébral sanguin selon le produit radioactif injecté. L'IRMf mesure le niveau d'oxygène sanguin (signal BOLD). Elle permet des mesures quantitativement plus précises du métabolisme cérébral avec une résolution temporelle de 1 seconde et une résolution spatiale de 1mm<sup>3</sup>. La MEG mesure les champs magnétiques induits par l'activité électrique des neurones du cerveau, elle a donc une très bonne résolution temporelle et sa résolution spatiale est de quelques millimètres.

La TEP et l'IRMf indiquent une diminution d'environ 40% de l'activité cérébrale en SL par rapport à l'Ev. Les réductions de l'activité cérébrale sont localisées dans les régions sous-corticales telles que le tronc cérébral, le thalamus, le télencéphale basal, les ganglions de la base et les régions corticales impliquées dans l'attention et la conscience (Maquet, 2000), telles que le cortex préfrontal, le cortex cingulaire antérieur et le precuneus (Figure 8) (Braun *et al.*, 1997 ; Maquet *et al.*, 1997 ; Andersson *et al.*, 1998 ; Kajimura *et al.*, 1999). Cependant une augmentation de l'activité cérébrale, corrélée à l'activité des ondes lentes, a été observée avec l'IRMf dans le gyrus frontal inférieur et médian, le gyrus parahippocampique, le precuneus, le cortex cingulaire postérieur, le tegmentum ponto-mesencéphalique et le cervelet (Dang-Vu *et al.*, 2008).

Etudiée avec la TEP, l'activité cérébrale pendant le SP est très différente de celle du SL et a un niveau d'activation global similaire à celui de l'Ev, comme indiqué par l'enregistrement EEG (Maquet *et al.*, 1990). Cependant les études de TEP et de MEG suggèrent que durant le SP, plusieurs structures ont une activité supérieure à celle observée lors de l'Ev (couché les yeux fermés): le tegmentum pontique, le thalamus, le télencéphale basal, l'amygdale, l'hippocampe, le cortex préfrontal médian, le cingulé antérieur et les aires temporo-occipitales. D'autres sont hypoactivés en SP par rapport au SL, comme le cortex préfrontal dorsolatéral, le cingulé postérieur, le precuneus et le cortex pariétal inférieur (Hong *et al.*, 1995 ; Maquet *et al.*, 1996 ; Braun *et al.*, 1997 ; Nofzinger *et al.*, 1997 ; Maquet, 2000 ; Buchsbaum *et al.*, 2001 ; Peigneux *et al.*, 2001b ; Maquet *et al.*, 2005 ; Ioannides *et al.*, 2009). La figure 8 résume ces résultats.



**Figure 8 : Représentation schématique des augmentations et diminutions relatives de l'activité neuronale associée au SP.** Les régions colorées en rouge sont celles dont le flux cérébral sanguin (rCBF) augmente pendant le SP ; celles en bleus correspondent aux diminutions du rCBF. (a) vue latérale; (b) vue médiane; (c) vue ventrale. A, H, amygdale et hypothalamus; B, télencéphale basal; Ca, gyrus cingulé antérieur; Cp, gyrus cingulé postérieur and precuneus; F, cortex préfrontal; M, cortex moteur; P, cortex pariétal supramarginal; PH, gyrus parahippocampique; O, cortex occipital-latéral; Th, thalamus; T-O, cortex temporo-occipital extrastré ; TP, tegmentum pontin. (Schwartz et Maquet, 2002).

**D'après la neuroimagerie chez l'homme le métabolisme global du cerveau est aussi élevé en SP qu'en Ev. Cependant, les régions corticales actives pendant le SP et l'Ev ne sont pas les mêmes. Les systèmes limbiques et mnésiques sont plus actifs alors que les régions sensorielles sont hypoactivées en SP. Les mécanismes responsables de l'activation corticale pendant le SP doivent être distincts de ceux de l'Ev.**

### **3.2.3 Afférences corticales et leur implication dans l'activation néocorticale pendant le sommeil paradoxal**

Le cortex reçoit des afférences majeures directes en provenance du télencéphale basal, du thalamus et de l'hypothalamus. Du tronc cérébral il reçoit des afférences directes en provenance des neurones monoaminergiques du locus coeruleus (LC) et du noyau du raphé dorsal. De ce même tronc cérébral, il reçoit des afférences indirectes via le télencéphale basal et le thalamus. Dans le tronc cérébral, les noyaux monoaminergiques, mais aussi des neurones glutamatergiques de la formation réticulée et les neurones cholinergiques du tegmentum mésopontique, sont à l'origine de projections sur le télencéphale basal et le thalamus.

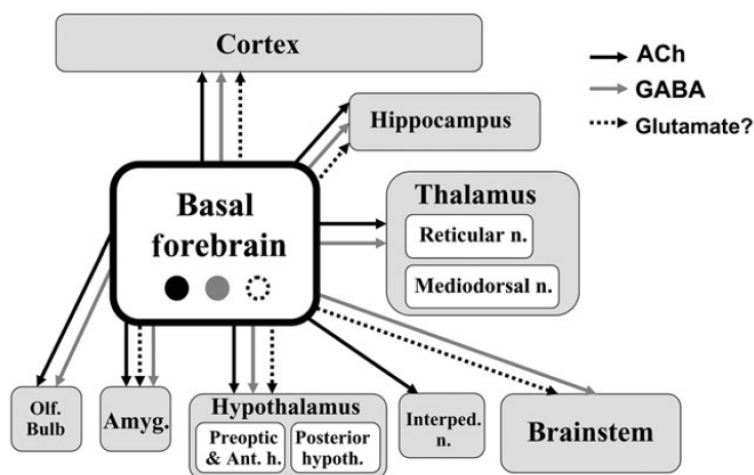
Nous détaillerons ci-dessous les structures afférentes au cortex et leur implication dans l'activation néocorticale pendant le SP.

#### **3.2.3.1 Le télencéphale basal**

Le télencéphale basal comprend des neurones cholinergiques et des neurones non cholinergiques distribués dans une vaste zone, incluant le septum médian et la bande diagonale de Broca (MS-DBB), le noyau préoptique magnocellulaire (MCPO), la substance

innommée (SI) et le noyau basal magnocellulaire (MBN). Le complexe du MS-DBB projette à l'hippocampe alors que le MCPO, le MBN et le SI projette au néocortex (Fig. 9).

La stimulation des neurones du télencéphale basal par des agonistes des neurotransmetteurs de l'Ev ou leur stimulation électrique s'accompagne d'une activité corticale rapide et une augmentation des activités hautes fréquences dans les cellules thalamiques (Curro Dossi *et al.*, 1991 ; Pinault et Deschenes, 1992 ; Steriade *et al.*, 1993a). De plus, leur inactivation à la lidocaïne entraîne une perte de l'activité corticale rapide avec la prédominance d'ondes lentes (McCormick, 1992 ; Jones, 2004). De même, la lésion de la totalité des neurones du télencéphale entraîne un état proche du coma marqué par un EEG monotone avec un haut voltage et des ondes lentes. Dans ces conditions il est alors difficile d'observer du SP (Fuller *et al.*, 2011).

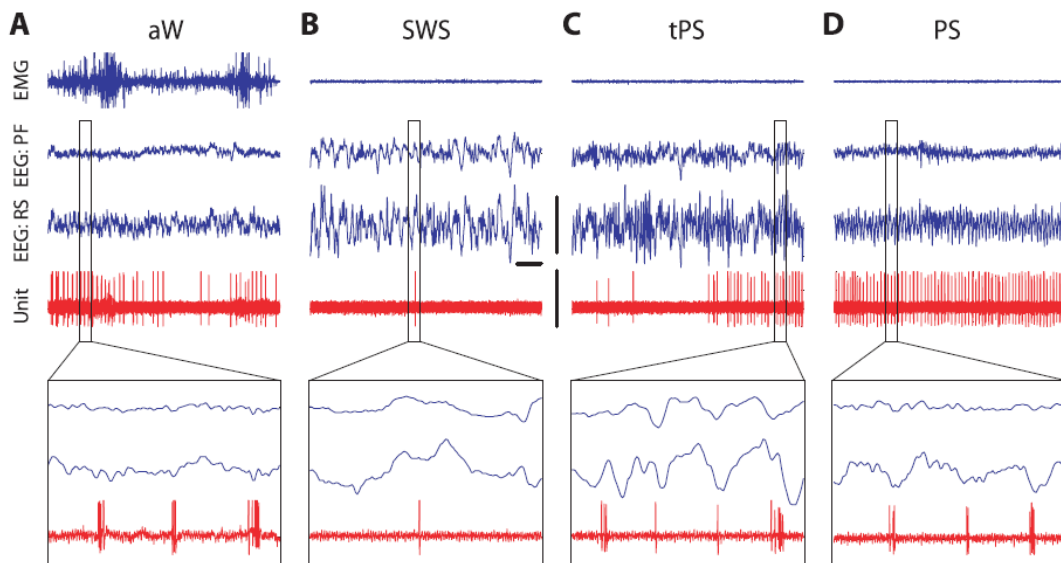


**Figure 9 : Efférences du télencéphale basal et leurs neurotransmetteurs.** Amyg, Amygdale; ant, antérieur; h ou hypoth., hypothalamus; Interped., noyau interpédonculaire; Olf, Olfactif.

### 1) Les neurones cholinergiques du noyau préoptique magnocellulaire, la substance inominé et le noyau basal magnocellulaire

Les neurones cholinergiques représentent seulement 5 % de la population totale des cellules du télencéphale basal (Gritti *et al.*, 2006) mais assurent 70% de l'innervation cholinergique du cortex. Comme le montre la figure 9, ils projettent aussi principalement sur le thalamus. Certains d'entre eux pourraient libérer du glutamate.

Du point de vue électrophysiologique, ces neurones cholinergiques sont actifs à la fois pendant l'Ev et pendant le SP (Lee *et al.*, 2005b)(Fig. 10 et Tableau 2). D'après leur mode de décharge rythmique lors de l'activation corticale, les neurones cholinergiques du MCPO-SI (Fig. 10) favoriseraient les activités thêta et gamma pendant l'Ev et le SP (Lee *et al.*, 2005a ; Simon *et al.*, 2006).



**Figure 10 : Décharge d'un neurone cholinergique (marqué à la neurobiotine) dans le MCPO chez le rat. A-D** enregistrement de la décharge unitaire avec l'EEG et l'EMG pendant des périodes de 10 secondes d'éveil (**A**), de SL (**B**), de tSP (**C**), et de SP (**D**). Ce neurone présente une décharge unitaire élevée en éveil, il cesse de décharger pendant le SL et recommence à décharger pendant le tSP et décharge de façon maximale pendant le SP. Le tracé d'une période de 0,5 seconde est agrandi dans le bas de la figure, la décharge unitaire en bursts de potentiels d'action avec l'activité EEG thêta qui est présente de façon intermittente pendant l'éveil, brièvement à la fin du tSP, et de façon continue pendant le SP. Calibration : 1s, 1 mV (EEG, EMG), 1,5mV (Unité) (Lee *et al.*, 2005a).

Les expériences pharmacologiques chez le rat libre de se mouvoir indiquent que ces neurones sont excités par les neurotransmetteurs de l'Ev dont le glutamate, l'acétylcholine, la noradrénaline, la sérotonine et l'histamine (Fort *et al.*, 1995 ; Eggermann *et al.*, 2001 ; Jones, 2004). L'application de ces neurotransmetteurs ou de leurs agonistes entraîne une augmentation de l'activité gamma et thêta, ainsi qu'une diminution de l'activité delta (Cape et Jones, 1998; 2000 ; Espana *et al.*, 2001).

Les lésions chimiques sélectives des neurones cholinergiques du télencéphale basal produisent une réduction de la puissance des rythmes thêta et gamma de l'EEG pendant tous les états de vigilance (Kapas *et al.*, 1996 ; Wenk, 1997 ; Berntson *et al.*, 2002). Cependant, les lésions sélectives des neurones cholinergiques dans le SI-MBN (Kalinchuk *et al.*, 2008 ; Kaur *et al.*, 2008) ont de faibles effets sur l'EEG cortical et les quantités d'Ev et de sommeil.

Ces neurones cholinergiques sont co-distribués avec des neurones contenant du glutamate ou du GABA.

## 2) Les neurones GABAergiques du télencéphale basal

Les neurones GABAergiques représentent 35% de la population totale des cellules du télencéphale basal (Gritti *et al.*, 2006). Ceux-ci projettent aussi au néocortex (Kiss *et al.*, 1990 ; Gritti *et al.*, 1997 ; Manns *et al.*, 2003) préférentiellement sur les interneurons GABAergiques (Freund et Gulyas, 1991). D'autres neurones GABAergiques envoient des

projections prédominantes aux systèmes d'Ev localisés dans l'hypothalamus et les noyaux du tronc cérébral.

Les neurones GABAergiques du MCPO et du SI ont des modes de décharge variés (Hassani *et al.*, 2009a):

-36% sont plus actifs pendant l'Ev et le SP. Leur activité est corrélée positivement avec l'activité gamma.

-36% déchargent spécifiquement pendant le SP.

Ces 2 types de neurones stimuleraient les cellules corticales pyramidales en inhibant les interneurons GABAergiques corticaux.

-28% sont plus actifs en SL avec un taux de décharge corrélé avec l'EEG cortical lent (delta). Ce groupe de neurones permettrait de modérer l'Ev cortical et de favoriser le SL (Hassani *et al.*, 2009a). Ces neurones seraient inhibés par la NA pendant l'Ev et sont désinhibés et actifs pendant le SL.

State dependency	EEG/EMG correlates	Transmitter phenotype			% total basal forebrain neurons
		Cholinergic	GABAergic	Glutamatergic?	
Wake/REM-active	EEG Gamma	100%	36%	46%	45%
NREM-active	EEG Delta		28%	17%	20%
REM-active	EMG (negative correlation)		36%	17%	23%
Wake-active	EMG (positive correlation)			14%	8%
State-equivalent				6%	4%

**Tableau 2 : Mode d'activité des neurones cholinergiques, GABAergiques et probablement glutamatergiques du télencéphale basal (MCPO et Si) et sa corrélation avec l'EEG (puissance gamme et delta) et l'EMG pendant les 3 états de vigilance.** Le pourcentage de neurones du télencéphale basal avec les 3 phénotypes de neurotransmetteurs montre leur dépendance aux états de vigilance et leur corrélat avec l'EEG/EMG Deurveilher 2011 d'après Hassani *et al.* 2009.

### 3) Les neurones glutamatergiques du télencéphale basal

Le plus large sous-groupe (60%) des neurones du TB est composé des neurones glutamatergiques (Hur et Zaborszky, 2005 ; Gritti *et al.*, 2006). En plus de leurs projections au cortex cérébral, ces neurones glutamatergiques projettent à l'hypothalamus latéral (Hur et Zaborszky, 2005 ; Henny et Jones, 2008) au niveau des neurones orexinergiques (Henny et Jones, 2006), impliqués dans la promotion et la stabilisation de l'Ev comportemental. Les neurones glutamatergiques dans le MCPO-SI ont des modes de décharge variés : 46% sont plus actifs pendant l'Ev et le SP, 17% pendant le SL, 17% pendant le SP et 14% pendant l'Ev (Tableau 2)(Hassani *et al.*, 2009a).

**Les neurones cholinergiques, GABAergiques, et glutamatergiques dans le MCPO-SI du télencéphale participent à l'activation du néocortex et stimulent les activités thêta et gamma pendant l'Ev et le SP. Ces neurones actifs en Ev et en SP sont activés par les neurones promoteurs de l'Ev et du SP se situant dans l'hypothalamus et le tronc cérébral. Les neurones GABAergiques et glutamatergiques du TB, actifs en SL, sont idéalement**



**positionnés pour favoriser l'oscillation delta et seraient inhibés par les neurotransmetteurs des systèmes d'Ev.**

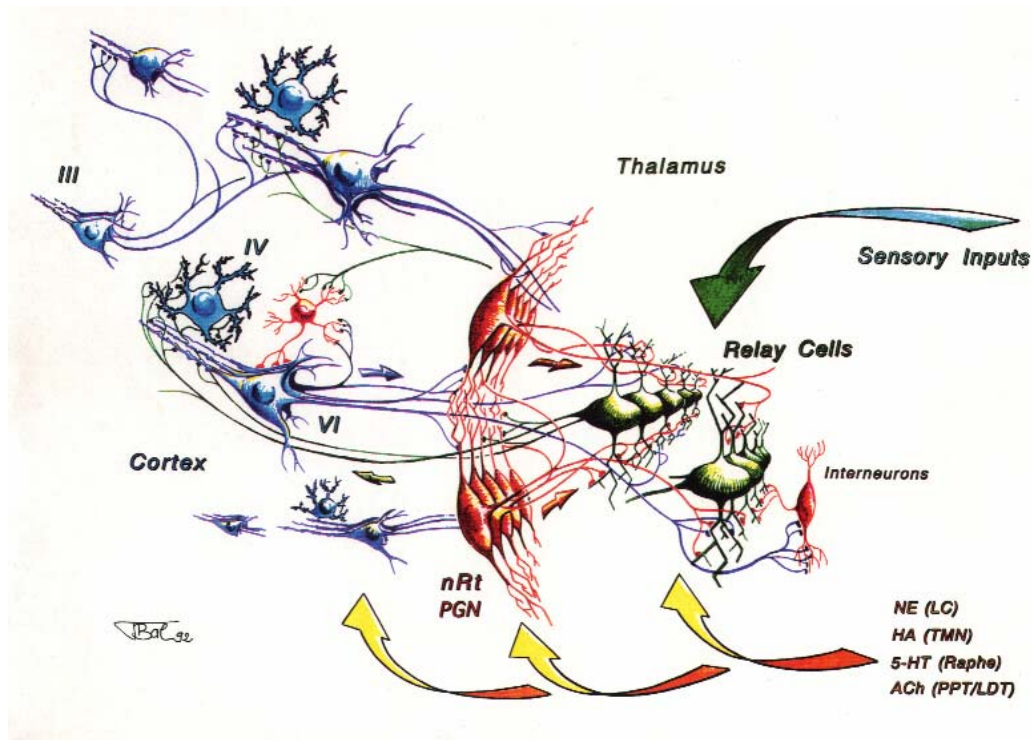
### **3.2.3.2 Le thalamus**

Le thalamus a pour fonction de relayer l'information aux structures corticales qui la traite. Les neurones thalamocorticaux dans les noyaux thalamiques spécifiques reçoivent des afférences des voies sensorielles (sauf olfactives) et motrices.

Les noyaux thalamiques contiennent 3 types de neurones (Figure 11) :

- Les neurones thalamiques avec des projections corticales glutamatergiques et donc excitateurs. Les plus gros neurones projettent aux couches corticales profondes et moyennes, alors que les plus petits projettent préférentiellement aux couches corticales superficielles (Fig. 11) (Steriade, 2001b; 2001a ; Steriade *et al.*, 2001).
- Les neurones réticulaires GABAergiques inhibiteurs : ils projettent aux neurones thalamocorticaux, mais ne projettent pas au cortex.
- Les interneurones GABAergiques : leurs axones et leurs somas restent dans les limites du noyau thalamique dorsal, ils sont interconnectés avec les neurones thalamocorticaux et les neurones réticulaires.

Les noyaux thalamiques, spécialement le noyau intralaminaire médian et centromédian, transmettent des rythmes rapides et stimulent de nombreuses aires cérébrales incluant le cortex limbique pendant l'Ev et le SP (Steriade *et al.*, 1993b ; Newman, 1995 ; Amzica et Steriade, 1996 ; Steriade, 2000 ; Hobson et Pace-Schott, 2002 ; Krout *et al.*, 2002). Les noyaux intralaminaires reçoivent des afférences de sources hétérogènes variées, incluant les systèmes du tronc cérébral tels que le LDT/PPT et le SLD, impliqués dans le contrôle des états de vigilance. Ces noyaux thalamiques envoient aussi des projections moins localisées au télencéphale basal. Le noyau intralaminaire antérieur projette aux couches superficielles et profondes des aires corticales qui peuvent être sensorielles, motrices ou associatives.

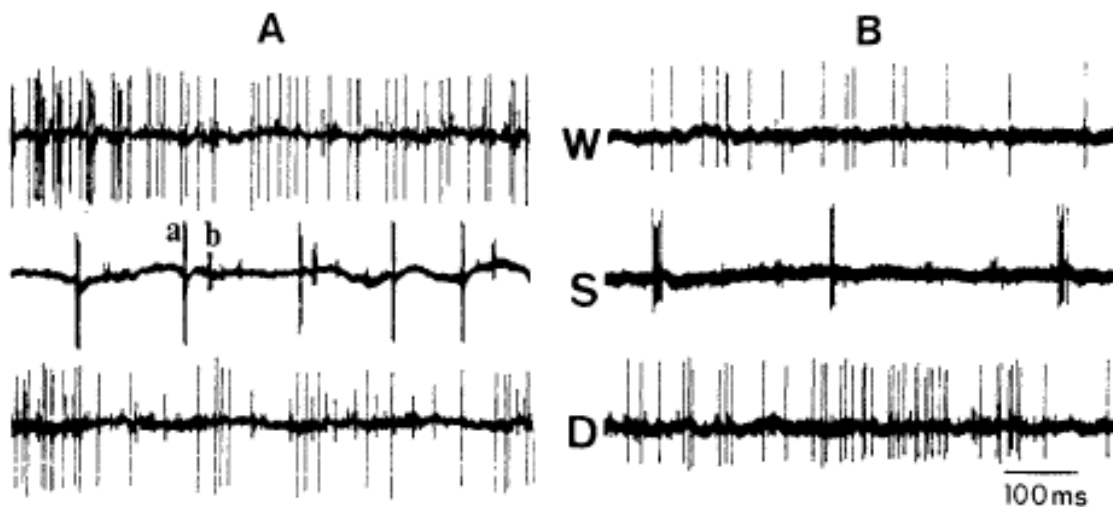


**Figure 11 Diagramme schématique de la connectivité thalamocorticale, d'après Thierry Bal.** Ce schéma présente les connexions majeures entre le thalamus et le cortex cérébral. Les neurones relais thalamiques sont densément innervés par des fibres préthalamiques, par exemple par la rétine dans le système visuel. Les cellules thalamocorticales (en vert) envoient leurs axones excitateurs au cortex cérébral et se terminent au niveau des éléments variés de la couche IV, incluant les dendrites apicaux des cellules pyramidales (en bleu). Les cellules pyramidales de la couche VI envoient en retour des projections excitatrices au thalamus, avec des collatérales au noyau réticulaire thalamique (nRT en rouge), et au noyau périgéniculé (PGN en rouge). Les neurones du nRT et du PGN sont GABAergiques et innervent densément les cellules thalamocorticales (en vert). Ainsi, les neurones nRT et PGN forment une voie d'information en retour pour l'inhibition de la communication du cortex cérébral au thalamus et une voie d'information en retour pour l'inhibition de la communication entre le thalamus et le cortex cérébral. Les neurotransmetteurs sont libérés au niveau de ces différents neurones et contrôlent le niveau d'activation de ces neurones.

Les interconnexions entre les neurones thalamiques et corticaux permettent de générer des oscillations lentes en SL. Ces oscillations lentes du SL ont une origine corticale puisqu'elles persistent dans le cortex après thalamectomie et qu'elles sont absentes dans le thalamus des animaux décortiqués (Timofeev et Steriade, 1996 ; Timofeev *et al.*, 2000). A l'inverse les fuseaux ont une origine thalamique puisqu'ils sont absents dans le cortex après thalamectomie et encore présents dans le thalamus des chats décortiqués. Pendant le SL les neurones corticothalamiques déchargent en bursts et ont une activité synchrone. Ils transmettent ce rythme aux neurones thalamiques GABAergiques et glutamatergiques.

La transition de l'EEG « synchronisé » du SL à l'état dit « désynchronisé » de l'EEG de l'Ev et du SP est liée à la dépolarisation progressive des cellules thalamocorticales et corticales par les différents neurotransmetteurs des systèmes activateurs sous-corticaux. Pendant le SP, ces systèmes concernent le système cholinergique ascendant en provenance du LDT/PPT et du télencéphale basal et glutamatergique en provenance de certains noyaux

pontiques. En plus de l'activation de ces systèmes en éveil, d'autres neurones afférents contenant de la noradrénaline, de la sérotonine, de l'histamine et l'hypocrétine sont actifs et dépolarisent ces neurones thalamiques. Pendant l'Ev et le SP, l'excitation corticale sur les cellules thalamocorticales peut surmonter l'inhibition exercée par les neurones thalamiques inhibiteurs. Cette dépolarisation des neurones entraîne une modification de leur mode de décharge via une modulation des courants voltages dépendants. Ces cellules thalamiques ne sont alors plus capables de générer des oscillations lentes et génèrent des potentiels d'actions à activité régulière et rapide (Fig. 12) (McCormick et Pape, 1990 ; McCormick et Wang, 1991 ; Soltesz *et al.*, 1991 ; McCormick et Huguenard, 1992 ; Bal et McCormick, 1993).



**Figure 12 : Mode de décharge tonique et en burst de 2 neurones thalamocorticaux pendant les états de vigilance chez le chat. A-B 2 neurones intralaminaires thalamiques rostraux dans les noyaux centrolatéral et paracentral. Les potentiels d'action sont générés de façon phasique à haute fréquence pendant l'EEG synchronisé du SL (S) dans ces 2 neurones corticaux. Lors de l'éveil (W) et du SP (D), ces neurones génèrent des potentiels d'actions plus nombreux et de façon irrégulière (Steriade *et al.*, 1982).**

### 3.2.3.3 Les afférences corticales spécifiques de l'éveil

Les neurones monoaminergiques impliqués uniquement dans l'Ev sont les neurones à histamine dans les noyaux tubéromammillaires de l'hypothalamus postérieur, les neurones noradrénergiques du locus coeruleus et les neurones sérotoninergique du noyau du raphé du tronc cérébral. Ils envoient des projections diffuses à l'ensemble du système nerveux central incluant donc le cortex (Brown *et al.*, 2001 ; Saper *et al.*, 2001 ; Jones, 2005). Ces neurones induisent l'activation corticale et l'Ev comportemental. Ils ont un taux de décharge augmenté pendant l'Ev, diminué pendant le SL et nul pendant le SP (McCarley et Hobson, 1975 ; Aston-Jones et Bloom, 1981 ; Sakai *et al.*, 1990 ; Jacobs et Fornal, 1991).

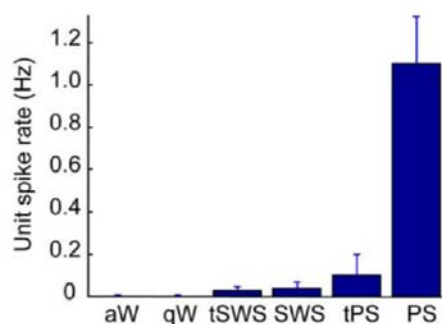
Les neurones à orexine sont uniquement localisés dans l'hypothalamus postérieur (Bayer *et al.*, 2005). Ils envoient des projections diffuses excitatrices au cortex et à plusieurs

systèmes impliqués dans l'activation corticale (Jones, 2005). Cependant, ces neurones sont actifs pendant l'Ev et inactifs pendant le SL et le SP (Jones, 2005 ; Lee *et al.*, 2005b ; Mileykovskiy *et al.*, 2005).

### 3.2.3.4 Les neurones MCHergiques de l'hypothalamus

L'hypothalamus serait plus impliqué dans l'homéostasie du SP que dans sa genèse puisque les structures impliquées dans la genèse et le maintien de cet état de vigilance sont localisées dans le tronc cérébral (Jouvet et Michel, 1959). Des neurones actifs spécifiquement en SP ont été enregistrés dans l'hypothalamus latéral et caudal (Steininger *et al.*, 1999 ; Alam *et al.*, 2002 ; Koyama *et al.*, 2003 ; Goutagny *et al.*, 2005).

Ces neurones actifs en SP sont localisés exclusivement dans la région périfornicale, l'hypothalamus latéral, le noyau hypothalamique dorso-médian, l'aire hypothalamique dorsale et la zona incerta et contiennent l'hormone de mélanocortine (MCH) (Fig. 13) (Bittencourt *et al.*, 1992). En effet, les neurones à MCH expriment le FOS après hypersomnie de SP et les quantités de SP sont augmentées après injection icv de MCH chez le rat (Verret *et al.*, 2003b). De plus, ces neurones déchargent quasiment uniquement lors du SP chez le rat vigile en contention (Hassani *et al.*, 2009b)(Fig. 13).

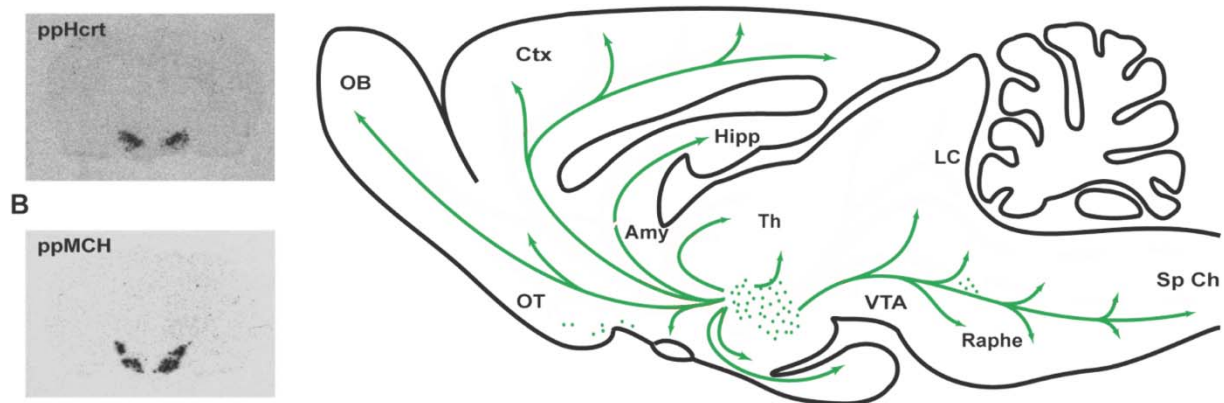


**Figure 13 : Fréquence de décharge moyenne (spikes/sec) des neurones à MCH chez le rat vigile en contention en fonction des états de vigilance.**

Les neurones à MCH sont silencieux lors de l'éveil actif (aW) et l'éveil calme (qW) et voient leur fréquence de décharge légèrement augmenter lors du sommeil lent (tSWS et SWS) pour atteindre une valeur maximale en sommeil paradoxal (PS) (Hassani *et al.*, 2009b).

Les neurones à MCH projettent aux structures d'éveil et les inhiberaient pendant le SP (LC, DRN, VTM, Hcrt) (Bittencourt *et al.*, 1992 ; Hervieu *et al.*, 2000 ; Saito *et al.*, 2001 ; Guan *et al.*, 2002 ; Adamantidis *et al.*, 2008). Les fibres MCHergiques sont également observées densément dans le cortex et plus particulièrement dans les régions limbiques, le noyau accumbens, le septum, la PAG et le PPT (Bittencourt *et al.*, 1992 ; Bittencourt, 2011)(Fig. 14). Le récepteur de la MCH est fortement présent dans les couches III et IV de l'isocortex (Hervieu *et al.*, 2000). L'activité de ces régions serait donc modulée par les neurones à MCH pendant le SP.

Ces neurones à MCH ne doivent pas être les seuls neurones de l'hypothalamus postérieur à être impliqués dans la régulation et dans l'activation corticale du SP. Les neurones hypothalamiques expriment des neuropeptides variés. Quelques-uns de ces neuropeptides ont un rôle dans l'activation corticale. Par exemple, la microinjection de ghréline dans l'hypothalamus augmente les puissances des bandes de fréquence de 1,5 à 4Hz en éveil et en SP (Szentirmai *et al.*, 2007).



**Figure 14 : Distribution neuronale du système MCHergique.** La photo de gauche montre la distribution de l'ARNm du précurseur de la MCH, par hybridation in situ, dans une coupe transversale d'hypothalamus de rat. Le schéma montre l'organisation anatomique des projections MCHergiques. Les points indiquent la localisation et l'abondance des cellules exprimant la MCH. Les flèches indiquent les terminaisons principales des fibres MCHergiques. Ce système projette aux principaux centres impliqués dans l'activation corticale dont le néocortex et l'hippocampe, le LC, les neurones à histamine de l'hypothalamus postérieur, les cellules cholinergiques du télencéphale basal, les neurones sérotoninergiques du raphé et les neurones dopaminergiques de la VTA. Amy, amygdale ; Ctx, cortex ; Hipp, hippocampe ; LC, locus coeruleus ; OB, bulbe olfactif ; OT, tubercule olfactif ; Sp Ch, corde spinale ; Th, thalamus ; VTA, aire tegmentaire ventrale (Adamantidis *et al.*, 2008).

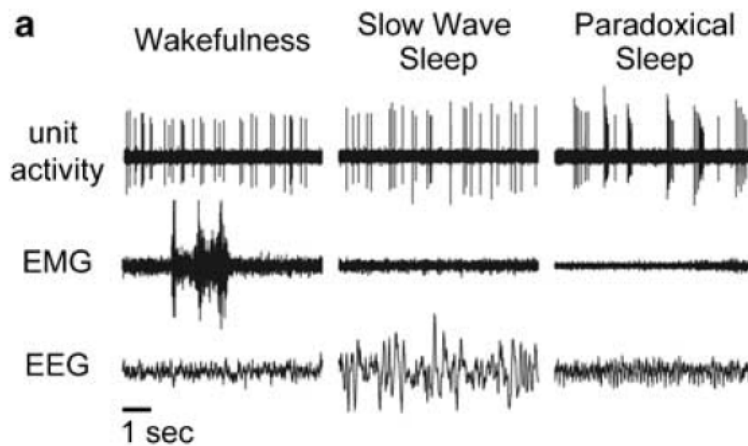
### 3.2.3.5 Les neurones dopaminergiques mésencéphaliques

Les neurones dopaminergiques sont présents dans la substance noire et l'aire tegmentaire ventrale. Contrairement aux autres noyaux monoaminergiques, ces neurones déchargent en bursts de potentiels d'action lors du SP et de façon plus tonique en l'éveil lors de récompense (Fig. 15) (Dahan *et al.*, 2007). De plus, l'hypersomnie de SP entraîne une augmentation de l'expression du FOS dans quelques neurones de l'aire tegmentaire ventrale (Maloney *et al.*, 2002).

Ces neurones projettent au cortex et au télencéphale basal et plus particulièrement au noyau accumbens, au cortex préfrontal, au cortex entorhinal, au septum, à l'amygdale et à l'hippocampe. De plus ils projettent aussi aux cortex d'associations polysensoriels, aux cortex sensoriels, moteurs et limbiques (Oades *et al.*, 1987). La dopamine (DA) inhibe les neurones corticaux (Krnjevic et Phillis, 1963). Elle favoriserait à la fois la libération de GABA au niveau des interneurons et inhiberait les neurones glutamatergiques du cortex via différents récepteurs (Pirot *et al.*, 1992).

Il est difficile d'évaluer les effets de la dopamine sur le sommeil puisque l'application d'agoniste à faible dose induit du SL par activation des autorécepteurs, alors qu'à forte dose les mêmes agonistes induisent de l'éveil (Gottesmann, 2002). L'administration de L-Dopa, en systémique, augmente significativement la fréquence et l'intensité des rêves sans affecter la fréquence des épisodes de SP. Inversement, cet effet est bloqué par les drogues antipsychotiques qui altèrent la transmission dopaminergique (Solms, 2000). La lésion des neurones dopaminergiques de la VTA, de la substance noire médiane et de la PAG entraîne une diminution de l'Ev et une augmentation des quantités de SP. Aucune modification dans

les caractéristiques de l'EEG n'a été rapportée dans ces études (Sakata *et al.*, 2002 ; Lu *et al.*, 2006).



**Figure 15 : Neurones à dopamine passant d'un mode de décharge de potentiel d'action en burst pendant le SP. Le nombre de ces potentiels d'action par burst est plus élevé pendant SP que pendant l'EV et le SL d'après Dahan *et al.* 2007.**

### 3.2.3.6 Les neurones glutamatergiques de la formation réticulée du tronc cérébral, en particulier ceux du noyau sublatérodorsal

Le terme de "système réticulé ascendant" (Moruzzi et Magoun, 1949), provient du fait que sa stimulation pendant le sommeil induit de l'Ev. Ce système est composé de la formation réticulée rhombencéphalique (mesencéphale + pont) et est crucial pour le maintien de l'activation corticale pendant l'Ev et le SP.

Les neurones de la formation réticulée du tronc cérébral envoient des fibres ascendantes glutamatergiques. Ces projections ont un rôle dans l'activation corticale via un relais dans le thalamus et un relais extra-thalamique dans l'hypothalamus et le télencéphale basal (Jones, 2005). En effet, la stimulation de cette formation réticulée produit une désynchronisation de l'EEG avec la suppression des ondes lentes, favorise l'activité gamma et induit de l'Ev. Au contraire, la lésion de ces neurones réticulaires diminue l'Ev et induit une activité EEG phasique synchronisée (Kitsikis et Steriade, 1981). Cependant la destruction de ces neurones modifie plutôt les caractéristiques de l'EEG désynchronisé de l'Ev et peu celles du SP (Denoyer *et al.*, 1991).

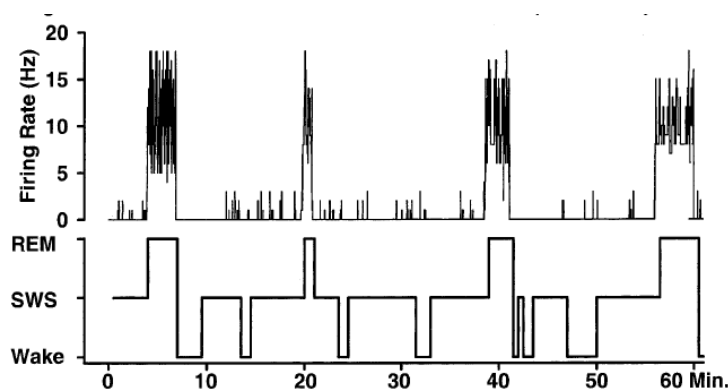
Les travaux du laboratoire montrent que l'activation de la partie dorsale de la formation réticulée pontique, correspondant au noyau sublatérodorsal (SLD) de Swanson (Swanson, 1998), est cruciale dans le déclenchement du SP et de l'atonie musculaire (Luppi *et al.*, 2006 ; Luppi *et al.*, 2011). Ce noyau contribuerait également à la désynchronisation corticale lors du SP via ses projections sur les neurones intralaminaires du thalamus (Boissard, 2002 ; Boissard *et al.*, 2002). Les neurones du SLD enregistrés chez le chat et le rat présentent une activité tonique spécifiquement pendant les phases de SP (Sakai, 1986 ; Boissard *et al.*, 2000).

Si sa lésion chez le chat supprime l'atonie musculaire et permet l'observation de comportements oniriques, ceci suppose que l'activation corticale liée aux rêves n'est pas supprimée pendant le SP. D'ailleurs aucune modification du spectre de l'EEG pendant le SP n'a été observée chez le chat et le rat dont le SLD est lésé (Sastre et Jouvet, 1979b ; Lu *et al.*,

2006). Les lésions plus importantes restreintes à la partie dorsale du noyau pontique oralis et caudalis suppriment le SP (Jouvet, 1965b ; Sastre *et al.*, 1981). En revanche, l'enregistrement de l'EEG de patients présentant des RBD, une pathologie qui présente les caractéristiques voisines du modèle animal de lésion du SLD, indique une modification de l'activation corticale pendant le SP avec une diminution de la puissance bêta dans les régions occipitales et un ralentissement de l'EEG (Fantini *et al.*, 2003).

### 3.2.3.7 Les neurones cholinergiques du tegmentum ponto-mesencéphalique

Une partie des neurones des noyaux tegmentaux latérodorsal (LDT) et pedonculo-pontin (PPT) sont cholinergiques (Steriade et McCarley, 1990 ; Maloney *et al.*, 1999 ; Verret *et al.*, 2005). Ils auraient un taux de décharge augmenté pendant l'Ev et le SP par rapport au SL (Fig. 16) (El Mansari *et al.*, 1989 ; Steriade *et al.*, 1990a ; Koyama *et al.*, 1998 ; Datta et Siwek, 2002). Fait intéressant, ils augmenteraient leur taux de décharge une minute avant le début des phases de SP. De plus, une augmentation du nombre de neurones FOS+ dans ces deux noyaux pontiques a été observée au laboratoire après récupération de SP par rapport à la condition de privation de SP. Ces neurones FOS+ peuvent être GABAergiques et ceux du LDT sont aussi glutamatergiques (Sapin *et al.*, 2009 ; Clement *et al.*, 2011)



**Figure 16 : Mode de décharge d'un neurone du PPT SP-On chez le rat libre de se mouvoir.**

Taux de décharge d'un neurone SP-On typique pendant le cycle veille-sommeil. Ce neurone présente un taux de décharge élevé pendant le SP et un taux de décharge quasi absent pendant l'EV et le SL. D'après (Datta et Siwek, 2002).

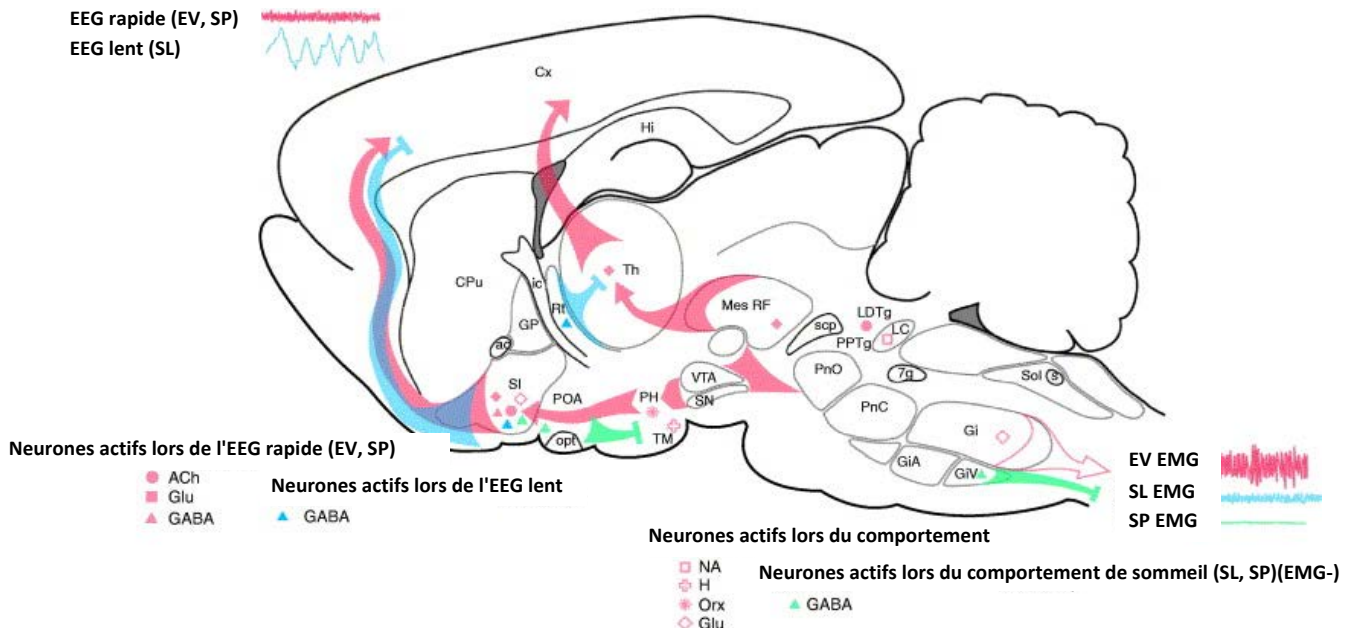
Ces neurones cholinergiques envoient des projections denses sur le thalamus, mais également sur l'hypothalamus postérieur, le télencéphale et la formation réticulée mésencéphalique. Ils envoient aussi des projections directes au néocortex et plus particulièrement au cortex préfrontal (Steriade *et al.*, 1990a ; Conde *et al.*, 1995).

L'ACh de ces neurones facilite l'activation corticale (Curro Dossi *et al.*, 1991 ; McCormick, 1992) en excitant les relais thalamiques, notamment les neurones du noyau réticulé thalamique (McCormick et Prince, 1986) et les neurones thalamo-corticaux des noyaux intra-laminaires (McCormick et Prince, 1987 ; Steriade *et al.*, 1990a ; Steriade *et al.*, 1991 ; McCormick, 1992).

Les lésions du PPT et du LDT entraînent des effets minimaux sur le cycle veille-sommeil et les caractéristiques de l'EEG (Lu *et al.*, 2006). La lésion du PPT seul diminue le nombre d'événements phasiques du SP, mais aucun autre effet n'a été observé sur l'activité EEG en SP après lésion de ces noyaux (Shouse et Siegel, 1992). La stimulation électrique du LDT, entraîne une augmentation des activités hautes fréquences dans les cellules thalamiques (Curro Dossi *et al.*, 1991 ; Kayama *et al.*, 1992 ; Pinault et Deschenes, 1992 ; Steriade *et al.*, 1993a).

### 3.2.3.8 Les neurones de la formation réticulée bulbaire

Les neurones des aires gigantocellulaire (Gc) et magnocellulaire (MC) de la formation réticulée bulbaire projettent aux structures rostrales dont la formation réticulée mésencéphalique et les noyaux intralaminaires. Des neurones à activité phasique ont été enregistrés dans ces structures lors des ondes PGO, des mouvements de la tête et des yeux chez le chat. La majorité des neurones à décharge tonique projettent à la formation réticulée et au noyau thalamique intralaminaire ventromédian. La moitié de ces neurones à décharge tonique ont une haute sélectivité de décharge pendant le SP à activité tonique. De plus, l'activité de ces neurones anticipe de 30 à 60 secondes les premiers signes de désynchronisation corticale et leur activité est fortement synchronisée pendant les ondes PGO. Ces neurones pourraient être une autre source de l'activation corticale pendant le SP (Sastre *et al.*, 1981 ; Steriade *et al.*, 1984).



**Figure 17 : Réseaux neuronaux et leurs neurotransmetteurs qui influencent l'activité corticale ou le comportement pendant le cycle veille sommeil (d'après Jones, 2005).** Les neurones qui sont actifs pendant l'EV et inactifs pendant le SP (les symboles rouges remplis de blanc) envoient des projections ascendantes au cortex, et stimulent l'activité corticale rapide. D'autres envoient des projections descendantes sur la moelle épinière et stimulent le tonus postural musculaire et le comportement d'EV. Ces derniers arrêtent de décharger avec l'atonie musculaire. Les neurones avec des projections ascendantes déchargent en association avec l'activité EEG rapide (gamma), arrêtent de décharger avec le delta et sont actifs pendant l'EV et le SP (symboles rouges pleins). Les neurones



qui sont actifs pendant le sommeil (symboles bleus et verts) incluent les cellules qui envoient des projections ascendantes aux cortex. Celles-ci déchargent en association avec l'activité lente de l'EEG pendant le SL (triangles bleus) et inhibent l'activité corticale rapide. Les neurones actifs pendant le sommeil incluent aussi ceux qui envoient des projections descendantes sur le tronc cérébral et la moelle épinière. Ils diminuent l'éveil comportemental et le tonus musculaire. Abréviations : 7g, nerf VII; ac, commissure antérieure ; ACh, neurones à l'acétylcholine; CPu, putamen caudé; Cx, cortex; Gi, gigantocellulaire RF; GiA, gigantocellulaire, partie  $\alpha$  RF; GiV, gigantocellulaire, partie ventrale RF; GABA, neurones GABAergiques; Glu, neurones au glutamate; GP, globus pallidus; H, neurones à histamine; Hi, hippocampe; ic, capsule interne; LDTg, noyau tegmental latérodorsal; Mes RF, RF mésencéphalique ; NA, neurones NAergiques; opt, tractus optique; Orx, neurones à oréxine; PH, hypothalamus postérieur ; PnC, pontine, partie caudale RF; PnO, pontine, partie orale RF; POA, aire préoptique ; PPTg, noyau tegmental pedonculopontin ; RF, formation réticulé; Rt, noyau réticulaire du thalamus ; s, tractus solitaire ; scp, pédoncule supérieur cérébelleux; SI, substance inominée; SN, substance noire; Sol, noyau du tractus solitaire; Th, thalamus; TM, noyau tubéromamillaire ; VTA, aire tegmentaire ventrale (Jones, 2005).

### **3.3 L'activation de la formation hippocampique et ses mécanismes pendant le sommeil paradoxal**

#### **3.3.1 Anatomie de la formation hippocampique**

La formation hippocampique comprend l'hippocampe et le subiculum.

**1) L'hippocampe** s'étend sur un axe septo-temporal : il débute au niveau septal, médian et dorsal dans chaque hémisphère, puis se courbe caudalement et latéralement en forme de C, et se termine à un niveau temporal, latéral et ventral (Fig. 18, 19). Il est composé du gyrus dentelé (GD) et de la Corne d'Amon (CA) qui est subdivisée en 3 sous parties, les aires CA1, CA2 et CA3 (Fig. 19) (Amaral et Witter, 1989). Ces régions hippocampiques communiquent entre elles principalement par des voies trisynaptiques. Ces voies sont caractérisées par i) les projections de la voie perforante du cortex entorhinal aux cellules granulaires du GD, ii) les projections des fibres moussues du gyrus dentelé aux neurones pyramidaux de l'aire CA3 et iii) les projections des collatérales de Schäffer de l'aire CA3 aux cellules pyramidales de l'aire CA1 (Yeckel et Berger, 1990).

Ces différentes régions hippocampiques contiennent des cellules principales, les cellules granulaires du GD et les cellules pyramidales de la CA qui sont glutamatergiques, mais aussi des interneurons inhibiteurs GABAergiques.

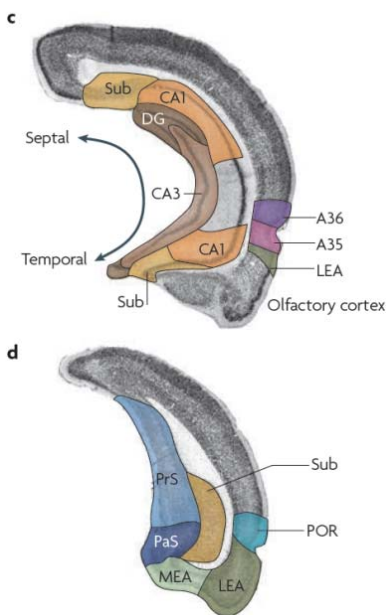
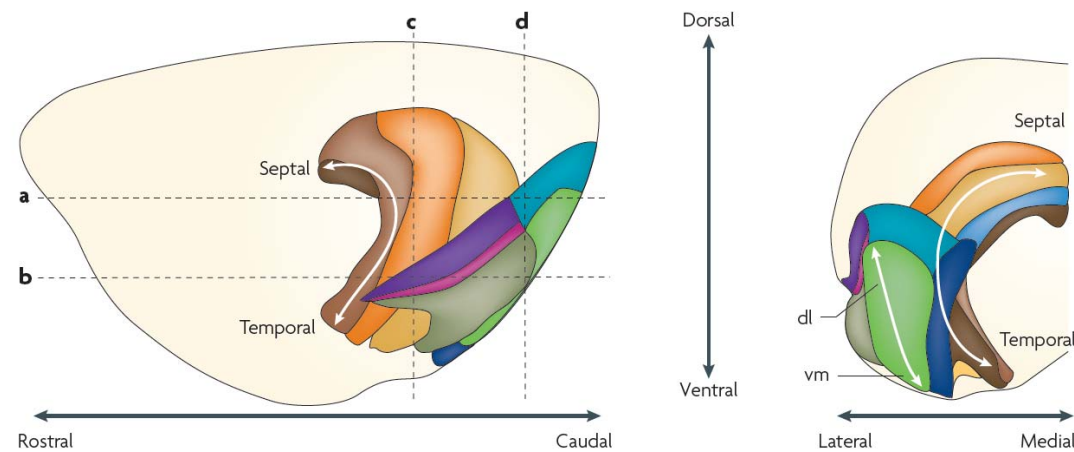
**2) Le subiculum** est la principale voie de sortie de CA1. Il joue un rôle dans le traitement de l'information cognitive et sensorielle et forme avec l'hippocampe la formation hippocampique. Il reçoit des afférences du cortex entorhinal et du thalamus. Il innerve CA1, le cortex entorhinal, les pré et parasubiculum (Figs. 18, 19) et via le fornix les corps mamillaires, les noyaux thalamiques, l'amygdale, le septum et le cortex préfrontal.

#### **3.3.2 Anatomie des régions parahippocampiques**

Les régions parahippocampiques comprennent le parasubiculum, le présubiculum, le postsubiculum, l'entorhinal, le perirhinal et le postrhinal (Fig. 18).

**1) Le parasubiculum et le présubiculum** sont interconnectés et auraient un rôle dans les fonctions sensorielles et mnésiques (Buzsaki, 2002). Ils reçoivent des projections majeures de CA1 et du septum médian et de plus faibles projections en provenance du subiculum, du thalamus antérieur et de l'amygdale basolatérale. Ils envoient des efférences majoritairement au cortex entorhinal (Caballero-Bleda et Witter, 1993) et plus faiblement au GD et au subiculum.

**2) Le cortex entorhinal** envoie des projections topographiquement organisées à l'axe septo-temporal de l'hippocampe (Fig.20). La partie dorsolatérale de l'entorhinal projette à la partie septale (ou dorsale) de l'hippocampe alors que la partie ventromédiane projette à la partie temporale (ou ventrale) de l'hippocampe. En plus des projections principales de la voie perforante au GD, le cortex entorhinal projette aussi à l'hippocampe au niveau des aires CA3, CA1 et au subiculum (Witter et Amaral, 1991). Les couches profondes du cortex entorhinal envoient des efférences et reçoivent des afférences du néocortex.



**Figure 18 : Représentation de la formation hippocampique et des régions parahippocampiques dans le cerveau du rat.** Les 2 figures du haut représentent des vues latérale (à gauche) et caudale (à droite). Ces 2 vues permettent de situer la formation hippocampique composée du gyrus dentelé (DG, en marron foncé), de CA3 (en beige), de CA2 (qui n'est pas indiqué), de CA1 (en orange) et du subiculum (Sub, en jaune).

L'axe septotemporal correspond aussi à l'axe dorso ventral. Les régions parahippocampiques sont composées du présubiculum (PrS, en bleu clair), du parasubiculum (PaS, en bleu foncé), du cortex entorhinal latéral (LEA, en vert foncé) et médian (MEA, vert clair), du cortex perirhinal (composé des aires A35 en rose, A36 en violet) et du cortex postrhinal (POR, en bleu vert). Les lignes en pointillés dans la figure en haut à gauche indiquent le niveau des 2 coupes transversales (c,d) présentées en dessous (van Strien *et al.*, 2009).

3) Le cortex périrhinal et le cortex postrhinal sont des cortex associatifs multimodaux, et sont la principale interface entre la formation hippocampique et le néocortex (Suzuki et Amaral, 1994) ainsi qu'entre les aires sensorielles associatives, certaines régions limbiques (rétrosplénial et cingulé antérieur), la formation hippocampique et l'amygdale.

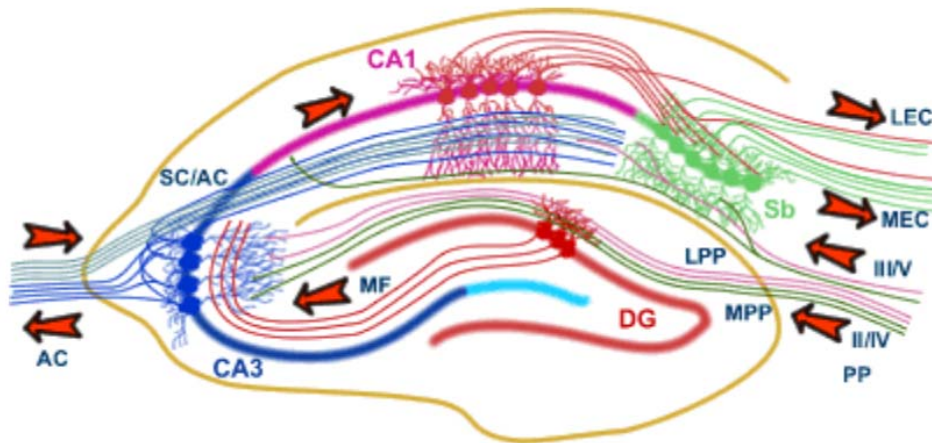


Figure 19 : Le réseau hippocampique : l'hippocampe forme un réseau principal unidirectionnel, avec des afférences du cortex entorhinal qui forment des connexions avec le GD et les cellules pyramidales de CA3 via la voie perforante (PP) médiane (MPP) et latérale (LPP). Les neurones de CA3 reçoivent aussi des afférences du GD via les fibres moussues (MF). Ils envoient leurs axones vers les cellules pyramidales de CA1 via les collatérales de (SC), et vers les neurones de CA1 dans l'hippocampe controlatéral via la voie commissurale (AC). Les neurones de CA1 reçoivent aussi des afférences directes de la voie perforante et envoient leurs axones vers le subiculum (Sb). En retour, les neurones du subiculum envoient la principale efférence hippocampique vers le cortex entorhinal médian (MEC) et latéral (LEC) formant ainsi une boucle d'activation (Sharma *et al.*, 2007).

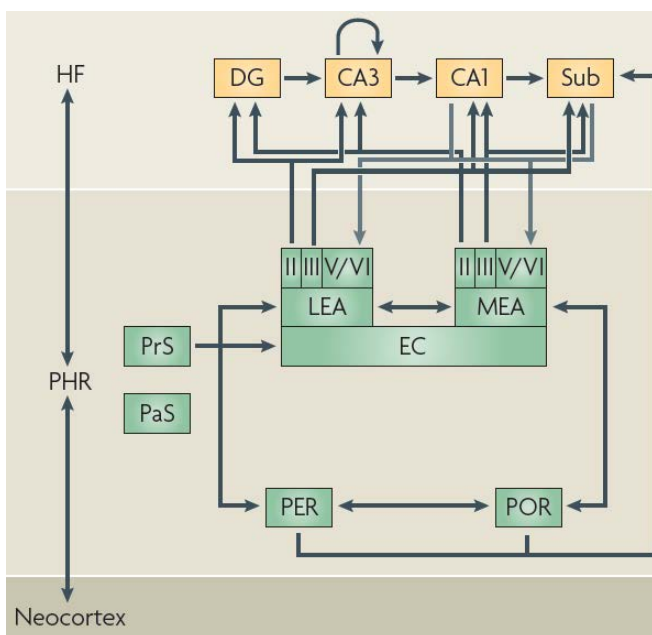


Figure 20 : Principales connexions parahippocampe-hippocampiques :

Le néocortex projette aux régions parahippocampiques (PHR), lesquelles fournissent la source principale d'entrée à la formation hippocampique (HF). Au niveau du PHR, 2 projections parallèles se distinguent : le cortex périrhinal (PER) et le cortex entorhinal latéral (LEA) sont connectés réciproquement, ainsi que le cortex postrhinal périrhinal (POR) et le cortex entorhinal médian (MEA). Le cortex entorhinal (EC) reçoit des entrées du présubiculum (PrS). La voie perforante du EC projette à toutes les régions de la formation hippocampique. La couche entorhinal II projette au gyrus dentelé (GD) et au CA3, alors que la couche III projette au CA1 et au subiculum (Sub). Les sorties de l'HF proviennent du CA1 et du Sub et projettent au PHR, en particulier aux couches profondes du EC (van Strien *et al.*, 2009).

### **3.3.3 Activité hippocampique pendant le sommeil paradoxal**

Du fait de l'implication de la formation hippocampique dans la mémoire, l'activité de cette région pendant le SP a surtout été étudiée après des comportements d'apprentissage. Cependant quelques études ont analysé son activité pendant le SP en condition basale.

L'enregistrement des régions hippocampiques indique qu'elles présentent une activité thêta prononcée. C'est une onde lente sinusoïdale d'amplitude moyenne dont la fréquence peut varier de 5 à 10Hz chez le rat selon les conditions comportementales (Buzsaki, 1996). Pendant l'Ev actif, la fréquence thêta est plus élevée alors qu'en Ev calme, le pic de fréquence diminue à un niveau intermédiaire entre les fréquences thêta et delta. Pendant le SP cette activité est présente de façon continue chez l'animal. Le cortex étant peu épais chez le rat, une électrode placée au dessus du cortex pariétal ou occipital permet l'enregistrement EEG du thêta hippocampique, ce qui n'est pas possible chez l'homme puisque l'épaisseur de néocortex masque le signal provenant de l'hippocampe. De façon surprenante, les enregistrements locaux de l'hippocampe chez les patients épileptiques indiquent la présence d'oscillations dans la gamme thêta de façon phasique lors du SP (1 seconde) ainsi que pendant de plus longues durées lors des transitions du sommeil à l'Ev (Cantero *et al.*, 2003).

Dans l'hippocampe, les interneurons inhibiteurs hippocampiques imposent des oscillations inhibitrices coordonnées aux populations de cellules principales (cellules granulaires et pyramidales). Les cellules pyramidales génèrent alors par intermittence des décharges rythmiques générant le rythme thêta. Les différentes régions hippocampiques peuvent elles mêmes générer des oscillations thêta indépendantes. Par exemple, l'enregistrement de l'hippocampe isolé *in vitro* indique que CA1 peut générer une activité thêta spontanée (Goutagny *et al.*, 2009). Il existe cependant de nombreux modulateurs de ce rythme. De plus, des oscillations gamma sont le plus souvent superposées aux oscillations thêta pendant les périodes d'exploration et de SP.

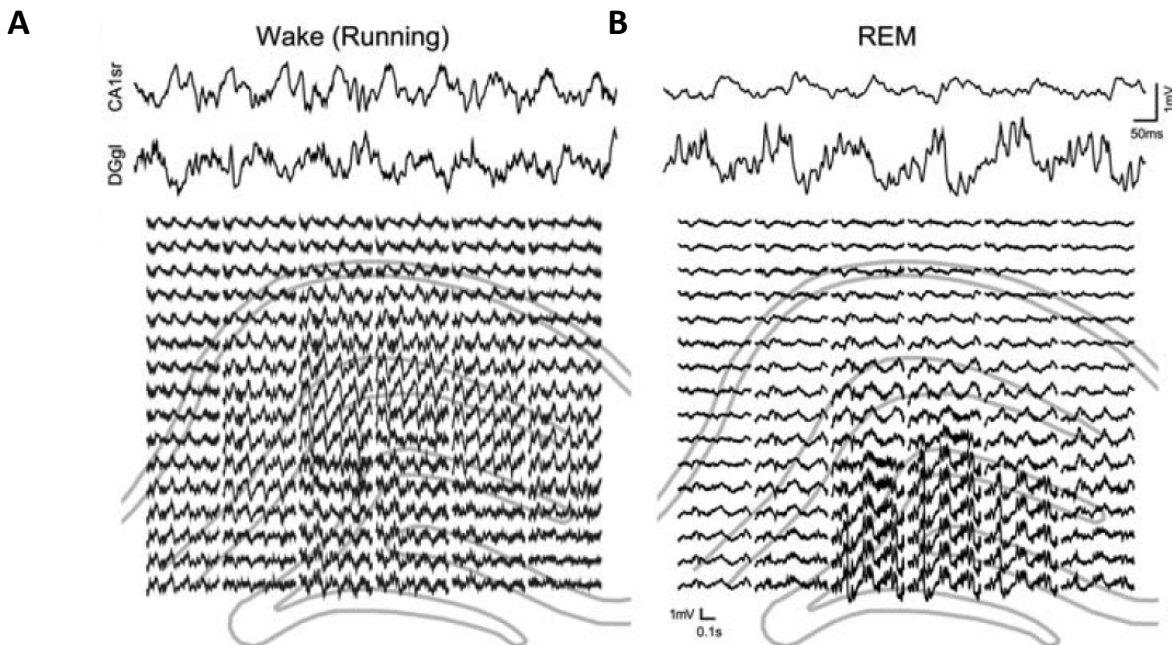
#### **3.3.3.1 Coordination des réseaux hippocampiques pendant l'éveil et le sommeil paradoxal**

Même si l'activité thêta enregistrée en EEG chez le rat est présente pendant l'Ev et le SP, les régions hippocampiques enregistrées individuellement présentent des activités de potentiel de champ et des activités neuronales unitaires différentes en SP par rapport à l'Ev (Fig. 21)(Montgomery *et al.*, 2008).

##### **Activité hippocampique durant le sommeil paradoxal par rapport à celle de l'éveil :**

L'amplitude des ondes thêta de 6 à 8 Hz et des oscillations gamma de haute fréquence est plus élevée dans le GD pendant le SP que pendant l'Ev actif (Fig. 22). L'Ev actif est accompagné par une diminution de l'amplitude du thêta dans la gamme de fréquence de 8 à 10Hz par rapport au SP. En revanche en SP, la puissance du gamma diminue dans l'aire

CA3 et CA1 alors que la puissance de l'oscillation thêta est augmentée dans CA3 mais diminuée dans CA1 par rapport à l'Ev. En SP, les régions du GD et CA3 ont une synchronie plus élevée qu'en Ev aux fréquences thêta et gamma (Fig. 22). La cohérence de l'oscillation gamma entre CA3 et CA1 est diminuée en SP alors que la cohérence de l'onde thêta entre le GD et le CA1 est augmentée par rapport à l'Ev.

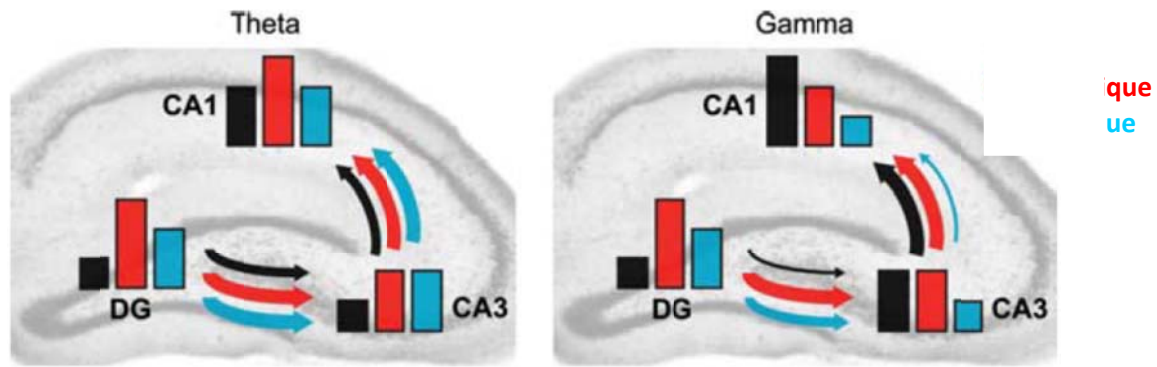


**Figure 21 : Activité de l'hippocampe pendant l'EV (Wake) (A) et le SP (REM) (B).** Potentiels de champs locaux enregistrés pendant l'Ev lorsque l'animal court dans un labyrinthe. Les tracés en haut montrent les enregistrements LFP dans le stratum radiatum de CA1 (CA1sr) et dans la couche granulaire du GD (DGgl). Activité LFP (de 0,5 secondes comme le tracé du dessus) est centrée sur la localisation anatomique dans laquelle l'activité électrique est enregistrée. L'amplitude des oscillations thêta et gamma est plus élevée dans le GD pendant le SP alors que l'activité gamma a une amplitude augmentée dans le CA1sr pendant l'Ev (Montgomery *et al.*, 2008).

**Ainsi la région de CA3 ne permettrait pas la coordination entre les différentes régions hippocampiques pendant le SP à activité tonique** (Bragin *et al.*, 1995a ; Fisahn *et al.*, 1998 ; Csicsvari *et al.*, 2003 ; Mann et Paulsen, 2005).

Les événements phasiques du SP sont caractérisés par de soudaines augmentations d'amplitude et de fréquence des oscillations thêta et du gamma dans toutes les régions de l'hippocampe et de façon plus prononcée au niveau du GD. La cohérence du thêta est alors plus élevée entre le GD et l'aire CA1 pendant ces périodes phasiques du SP. La cohérence du gamma augmente entre toutes les régions hippocampiques.

**Pendant le SP phasique, la coordination entre les réseaux du GD, de CA3 et de CA1 serait donc transitoirement augmentée.** La communication entre les régions hippocampiques pendant les événements phasiques du SP permettrait que l'information encodée dans le GD pendant le SP soit transmise au néocortex (Louie et Wilson, 2001).



**Figure 22 : Coordination du réseau hippocampique pendant l'éveil actif et le SP tonique et phasique (C).** Les barres verticales reflètent la synchronie au sein d'une région hippocampique. Elles correspondent à la puissance des oscillations thêta et gamma et à la cohérence entre les différentes couches cellulaires d'une même aire d'après l'activité LFP et unitaire. L'épaisseur des flèches reflète les changements de coordination entre les régions hippocampiques combinant la cohérence de l'activité unitaire et LFP entre les régions. Les principaux résultats sont une augmentation de la synchronie dans le DG pendant le SP par rapport à l'Ev. La coordination thêta et gamma entre le DG et CA3 est plus élevée pendant le SP tonique par rapport à l'éveil actif. La synchronie gamma dans le CA1 et la coordination gamma entre CA3 et CA1 est significativement plus faible pendant le SP tonique que pendant l'éveil actif. Le SP phasique est accompagné par de hautes synchronisations thêta et gamma à travers le circuit trisynaptique d'après Montgomery *et al.* 2008.

### 3.3.3.2 Activité de l'hippocampe d'après l'imagerie

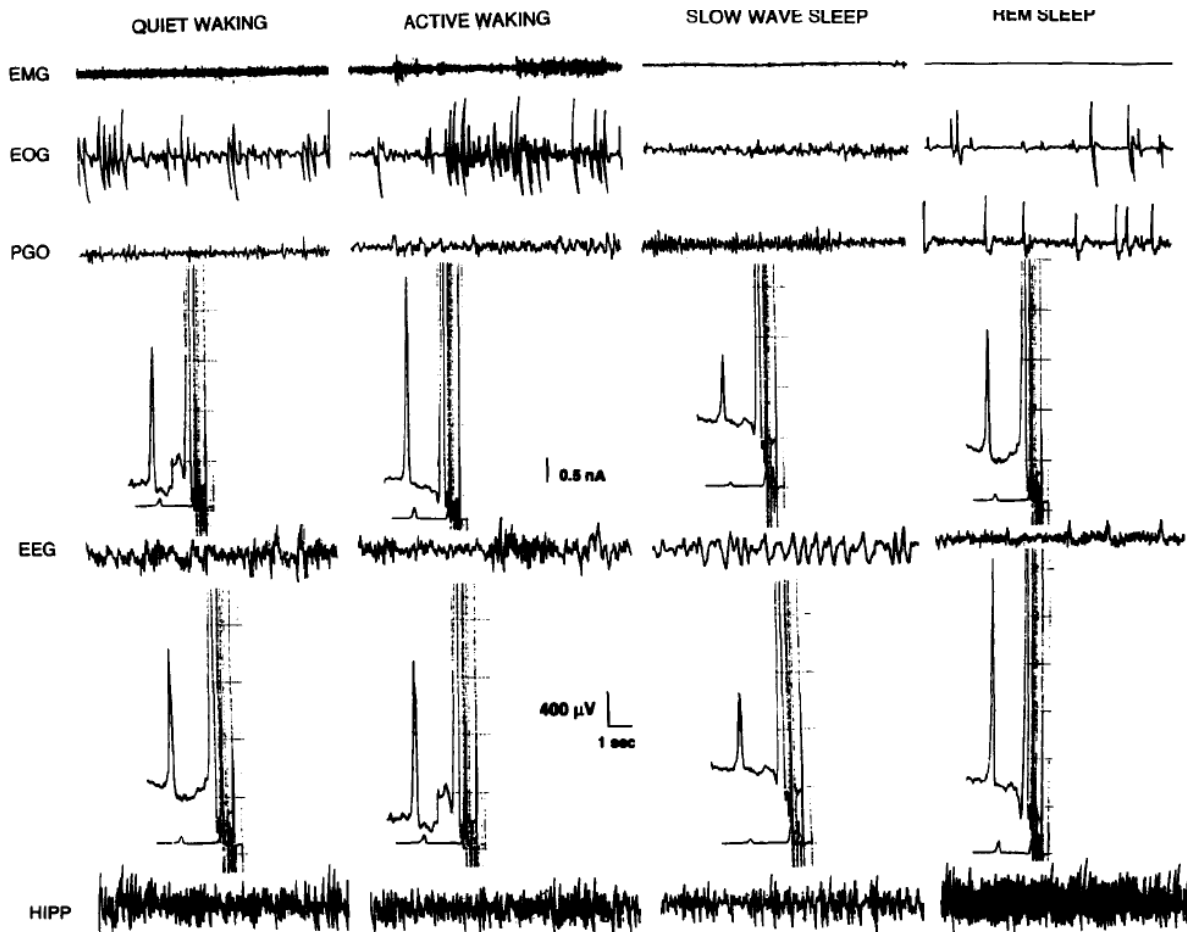
Les études de neuroimagerie chez l'homme confirment l'augmentation de l'activation hippocampique pendant le SP par rapport à l'Ev (Hong *et al.*, 1995 ; Maquet *et al.*, 1996 ; Braun *et al.*, 1997 ; Nofzinger *et al.*, 1997 ; Maquet, 2000 ; Buchsbaum *et al.*, 2001 ; Peigneux *et al.*, 2001b ; Maquet *et al.*, 2005 ; Ioannides *et al.*, 2009). De plus, l'utilisation de C<sup>14</sup> desoxyglucose, (Ramm et Frost, 1986) indique que l'hippocampe (plus particulièrement le CA3 et le DG) utilise 20% de glucose en plus en SP qu'en Ev (Lydic *et al.*, 1991). Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus chez le chat par la visualisation du marqueur d'activation FOS. En effet, chez des chats effectuant de grandes quantités de SP après injection de muscimol dans la PAG, de nombreux neurones expriment la protéine FOS dans le DG et les aires de la corne d'Amon et le subiculum, alors que de tels neurones sont peu nombreux en Ev (Sastre *et al.*, 2000).

### 3.3.3.3 Modulation de la transmission synaptique dans la formation hippocampique par les neurotransmetteurs

Les mécanismes d'activation des régions hippocampiques pendant le SP ont été étudiées par application de différentes concentrations de neurotransmetteurs dans les régions hippocampiques (Sil'kis, 2009).

Pendant le SP, la concentration en ACh mesurée par microdialyse dans le néocortex est comparable à celle observée en Ev calme (Marrosu *et al.*, 1995) alors que la concentration en ACh dans l'hippocampe est doublée par rapport à l'Ev (Fig. 23). En présence de fortes concentrations en ACh, l'efficacité de la transmission du signal entre les

aires CA3 et CA1, entre les aires CA1 et le cortex entorhinal et entre le subiculum et le cortex entorhinal serait réduite (Hasselmo et al., 1995). Cependant, ces fortes concentrations en ACh augmenteraient l'efficacité de la transmission entre le cortex entorhinal et les aires CA3 et CA1 par rapport à l'Ev.



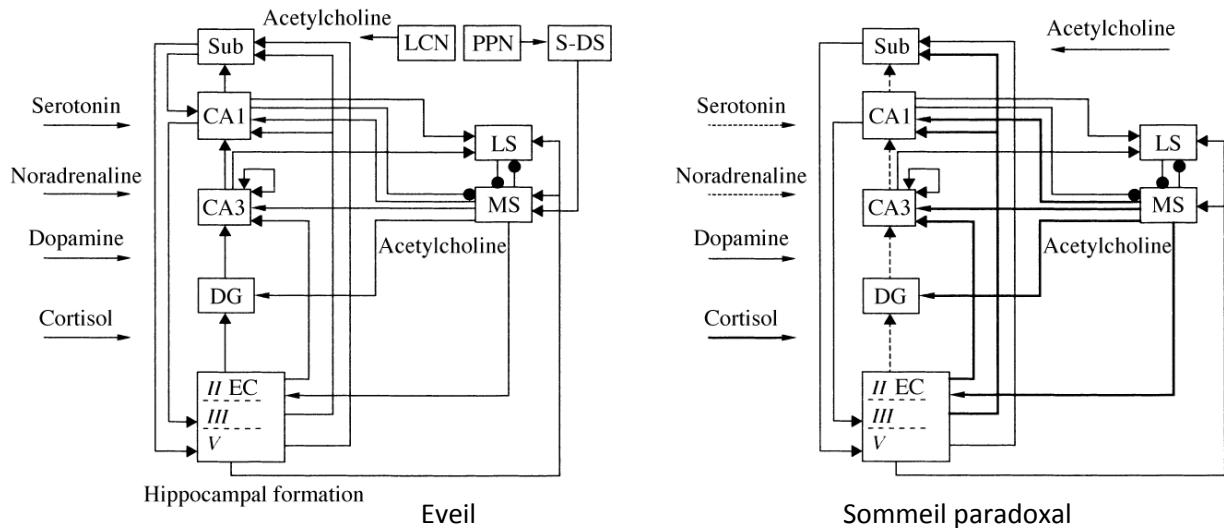
**Figure 23.** Exemple typique de corrélation entre les états de vigilance et la libération d'ACh dans le cortex (EEG) et dans l'hippocampe (HIPP) chez le chat libre de se mouvoir. La hauteur du pic de chacun des 8 graphes est proportionnelle à la quantité d'ACh détectée par microdialyse. Cette quantité est plus importante en EV actif et en SP dans le cortex et en SP dans l'hippocampe (Marrossu et al. 1995)

Comme nous l'avons décrit précédemment, les concentrations en noradréline, en histamine et en sérotonine sont faibles alors que les concentrations en dopamine et en cortisol sont élevées pendant le SP (Aston-Jones et Bloom, 1981 ; Park et al., 1999 ; Brown et al., 2001 ; Gottesmann, 2002 ; Born et Wagner, 2004). En absence de sérotonine et de noradréline, l'efficacité de la transmission entre les composants de la voie trisynaptique est diminuée par rapport à l'Ev (ENT-GD-CA3-CA1). Cependant, leur absence pendant le SP entrainerait également une augmentation de l'efficacité de la transmission de la voie perforante à l'aire CA1 (Fig. 24) (Otmakhova et al., 2005).

L'augmentation de la concentration en dopamine dans l'hippocampe en SP diminuerait l'efficacité des entrées excitatrices de CA3 à CA1 (Fig. 24) (Chen et al., 1996 ;

Hsu, 1996 ; Otmakhova et Lisman, 1998). Cependant, l'injection d'antagoniste dopaminergique ne modifie pas le spectre de fréquence de l'EEG dans l'hippocampe pendant les états de vigilance (Ongini *et al.*, 1992).

L'augmentation significative du cortisol en SP diminuerait l'efficacité de la transmission de la voie des collatérales de Schaffer au niveau de l'aire CA1 et celle de la voie perforante au GD (Born et Wagner, 2004).



**Figure 24 : Schéma montrant la transmission du signal dans les circuits de la formation hippocampique en EV et en SP.** DG, gyrus dentelé; CA1 et CA3, aires hippocampiques; Sub, subiculum; EC, le cortex entorhinal; LS et MS, partie latérale et médiale du septum, respectivement; PPN et LCN, le noyau pedonculopontin et le noyau localisé sous le locus coeruleus; et S-DS, des structures diencéphalique-pons. Les flèches continues montrent les entrées excitatrices; les flèches ouvertes montrent des entrées modulatrices; les lignes finissant avec un point noir montrent les connexions GABAergiques.

Les lignes en pointillés indiquent les voies synaptiques potentiellement déprimées et l'épaisseur des lignes continue indique les voies synaptiques potentiellement potentialisées (comparé avec l'éveil). Pour simplifier, le schéma des entrées excitatrices du MS à l'hippocampe n'est pas montré (Sil'kis, 2009).

**Ainsi d'après ce modèle, les concentrations en neurotransmetteurs pendant le SP dans l'hippocampe entraîneraient une diminution de l'efficacité de la transmission entre chaque composant de la voie trisynaptique de l'hippocampe. En présence de ce tonus en neurotransmetteur, l'efficacité de la transmission de la voie perforante aux régions de CA1 et CA3 serait au contraire augmentée par rapport à l'EV (Sil'kis, 2009).** Ces données n'expliquent cependant pas pourquoi le GD est activé pendant le SP (Montgomery *et al.*, 2008), sans doute parce que ce modèle n'inclut pas le glutamate et le GABA et omet certaines afférences hippocampiques.



### **3.3.4 Mécanismes de l'activation hippocampique pendant le sommeil**

#### **paradoxal**

Le rythme thêta a été enregistré dans de nombreuses autres structures incluant le cortex rétrosplénial, le périrhinal, le subiculum, le parasubiculum, le cortex cingulé antérieur et l'amygdale (Leung et Borst, 1987 ; McNaughton et Gray, 2000 ; Nishida *et al.*, 2004 ; Wang *et al.*, 2006 ; Glasgow et Chapman, 2007; 2008). Certaines de ces régions présentent aussi une activité thêta en SP. Cependant ces structures ne peuvent pas générer ce rythme indépendamment (Buzsaki, 2002). D'autres structures telles que le septum médian, le cortex entorhinal et le noyau supramammillaire (Petsche et Stumpf, 1962) sont capables de générer des oscillations thêta après déconnection de l'hippocampe (Kirk et McNaughton, 1991). Elles participeraient donc à la genèse de ce rythme.

L'activité gamma a été enregistrée dans de nombreuses aires cérébrales et est plus ou moins cohérente entre ces régions, lors de perception sensorielle, de résolution de problème, d'apprentissage et du rêve au cours du SP (Llinas et Pare, 1991 ; Singer, 1993). Il y aurait 2 générateurs indépendants des oscillations gamma dans l'hippocampe, le GD et les régions de CA3 et de CA1 (Bragin *et al.*, 1995b ; Buzsaki *et al.*, 2003 ; Csicsvari *et al.*, 2003). Cependant les oscillations de ces régions peuvent être transitoirement synchronisées.

Les activités thêta et gamma sont modulées différemment dans l'hippocampe pendant le SP et l'Ev. Les structures responsables de leur genèse ou de leur modulation seraient donc distinctes pendant ces deux états de vigilance.

#### **3.3.4.1 Le Septum et la bande diagonale de Broca**

Le complexe du septum médian (MS) et de la bande diagonale de Broca (DBB) est le plus connu et le plus étudié des générateurs du rythme thêta.

##### **1) Anatomie du complexe du septum médian et de la bande diagonale de Broca**

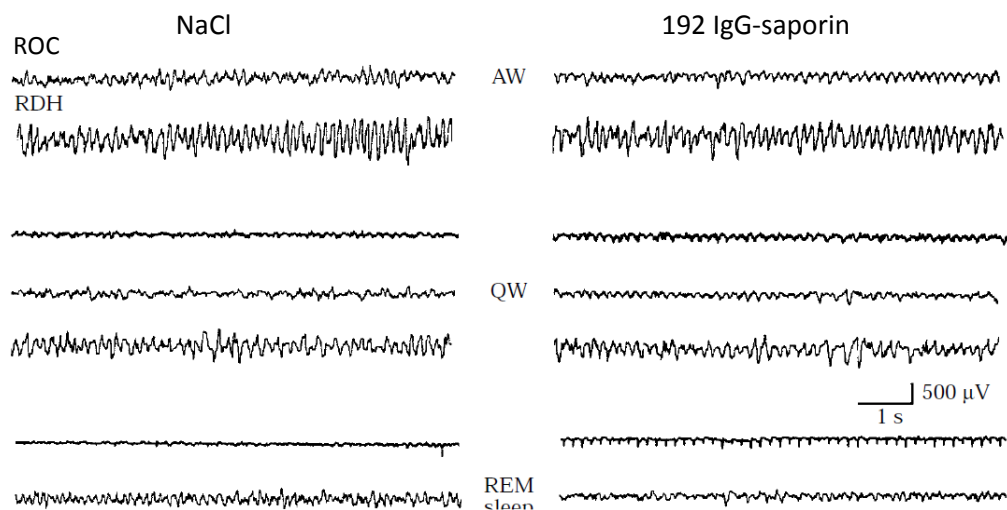
Le complexe du MS/DBB projette au GD, à l'aire CA3 et CA1, au subiculum et au cortex entorhinal (Swanson, 1977). Les projections cholinergiques du MS/DBB ont une influence excitatrice sur les neurones principaux et les interneurons hippocampiques. Les neurones GABAergiques du MS/DBB projettent exclusivement aux interneurons hippocampiques inhibiteurs (Smythe *et al.*, 1992). Les neurones glutamatergiques du MS/DBB projettent aux régions de CA1, CA3 et au GD mais les types neuronaux qu'ils ciblent au sein de ces régions sont inconnus.

Le septum médian reçoit aussi des afférences importantes d'aires limbiques et néocorticales et plus particulièrement du cortex frontal (Yoshihara et De France, 1976). Ces structures participent au contrôle de la génération des burst du MS-DBB en modulant leur fréquence (Brazhnik *et al.*, 1984).

## 2) Implication dans le sommeil paradoxal et dans la génération du rythme thêta

L'activité thêta enregistrée dans l'hippocampe et le cortex entorhinal est diminuée si le MS/SBB est stimulé à haute fréquence (70Hz) ou lésé (Ball et Gray, 1971 ; Gray, 1971 ; Andersen *et al.*, 1979 ; Mitchell et Ranck, 1980 ; Sainsbury et Bland, 1981). De plus, l'injection de procaine (un bloqueur des canaux sodiques) dans le septum médian réduit très fortement l'amplitude du thêta sans en affecter la fréquence (Kirk et McNaughton, 1993). Enfin, 70% des cellules du MS/DBB déchargent en bursts rythmiques avec l'activité thêta.

Les différents types neuronaux du MS/DBB joueraient un rôle différent dans la génération de ce rythme. Chez le rat, 40 à 78% des cellules du MS/DBB sont cholinergiques (Amaral et Kurz, 1985 ; Gritti *et al.*, 1993) et 30 à 50% sont GABAergiques (Kohler *et al.*, 1984 ; Kiss *et al.*, 1990). Des neurones glutamatergiques sont aussi présents. Les neurones cholinergiques ont un faible taux de décharge pendant l'activité thêta, autant pour celle de l'Ev que pour celle du SP (Simon *et al.*, 2006). Ils pourraient cependant être responsables de l'amplitude du thêta car leur lésion réduit l'amplitude de ce rythme sans en modifier la fréquence (Fig. 25) (Lee *et al.*, 1994 ; Bassant *et al.*, 1995). Des études récentes indiquent que seuls les neurones GABAergiques déchargent en bursts rythmiques avec l'activité thêta. Ils contrôleraient la fréquence du thêta. Enfin, les neurones glutamatergiques ne semblent pas impliqués dans la genèse de ce rythme.



**Figure 25 : Activité électrique enregistrée dans le cortex occipital droit (ROC) et dans l'hippocampe dorsal droit (RDH) d'un rat contrôle (à gauche) et d'un rat traité à l'IgG-saporin 192 8 jours après injection de la toxine qui détruit les neurones cholinergiques. Le thêta hippocampique est encore observé pendant l'ÉV actif et l'ÉV calme (AW et QW) et pendant le SP chez les rats lésés mais la diminution de l'amplitude de l'activité thêta est plus importante pendant le SP. D'après Bassant *et al.* 1995.**

### 3.3.4.2 Le cortex entorhinal

Le rythme thêta enregistré dans le cortex entorhinal est plus ample pendant le SP que pendant la locomotion (Mitchell et Ranck, 1980). L'activité thêta dans les couche IV et II du cortex entorhinal est en phase avec le rythme thêta enregistré dans CA1. L'activité thêta

des couches III de l'entorhinal médian est plutôt cohérente avec le rythme thêta du GD pendant les états de vigilance (Mitchell et Ranck, 1980). D'après Montgomery *et al.* 2008, l'activité thêta du GD et de l'aire CA1 est cohérente pendant le SP alors que l'activité thêta de l'aire CA3 ne l'est plus avec l'aire CA1 (Montgomery *et al.*, 2008). Ce maintien de la synchronie de l'activité thêta entre le GD et le CA1 pourrait refléter une augmentation de la cohérence des entrées des couches II et III du cortex entorhinal (Chrobak et Buzsaki, 1998).

Les lésions de l'entorhinal diminuent plutôt l'amplitude du thêta que sa fréquence mais ne suppriment pas cette activité (Heynen et Bilkey, 1994). En SP, des enregistrements locaux indiquent que la lésion du cortex entorhinal supprime le thêta dans CA1 (Buzsaki *et al.*, 1983 ; Hagan *et al.*, 1992) et réduisent l'amplitude du thêta dans le DG (Montoya et Sainsbury, 1985).

#### **3.3.4.3 Le thalamus**

Ce sont principalement les noyaux réunis du thalamus qui projettent au CA1 et au subiculum. Les neurones de la partie dorsale du noyau réunis projettent dans l'hippocampe dorsal et ceux situés dans la partie ventrale du noyau innervent l'hippocampe ventral (Dolleman-Van der Weel et Witter, 2000 ; Bokor *et al.*, 2002 ; Halasy *et al.*, 2004). Après hypersomnie de SP induite pharmacologiquement chez le chat, le nombre de neurones FOS+ dans certains noyaux thalamiques est augmenté (Sastre *et al.*, 2000). Des cellules à taux de décharge tonique augmenté pendant le thêta ont aussi été localisées dans le noyau central médian du thalamus et dans le noyau antéroventral (Colom et Bland, 1987 ; Tsanov *et al.*, 2011).

#### **3.3.4.4 L'amygdale**

L'amygdale partage des connexions réciproques avec l'hippocampe. Elle projette au cortex entorhinal, au cortex périrhinal, à la région de CA3 et au subiculum. Elle reçoit des afférences en provenance de CA1, du cortex entorhinal, du cortex périrhinal, du thalamus, du septum et du subiculum (Pitkanen *et al.*, 2000).

L'amygdale présente une activité thêta pendant le SP et cette activité est synchronisée avec les ondes thêta du CA1 (Karashima *et al.*, 2010). De plus elle envoie des projections actives au LDT/PPT et au noyau pontis oralis (RPO) pouvant être impliquées dans l'activité thêta en SP. Enfin, les quantités de neurones FOS+ sont corrélées positivement avec les quantités de SP dans le complexe amygdaloïde chez des chats présentant une hypersomnie de SP (Sastre *et al.*, 2000).

#### **3.3.4.5 Les neurones à MCH de l'hypothalamus latéral**

Il a été démontré que les régions de la formation hippocampique et du septum sont densément innervées par les fibres à MCH en particulier au niveau du CA3 (Bittencourt *et al.*, 1992). De plus les neurones à MCH projetant à ces systèmes sont actifs pendant une

hypersomnie de SP (Hanriot *et al.*, 2007). Le récepteur de la MCH est plus exprimé dans le CA1, le CA2 et le CA3 que dans le GD (Saito *et al.*, 1999). Il a été démontré au laboratoire que la MCH exerce un effet facilitateur sur la transmission glutamatergique de la voie perforante à CA1 (Pachoud *et al.*, 2010). Ainsi, la MCH pourrait être impliquée dans l'activation des régions hippocampiques pendant le SP.

### **3.3.4.6 Le noyau supramamillaire**

Nos travaux de thèse ont démontré l'implication d'une voie en provenance du noyau supramamillaire (Sum) dans l'activation néocorticale et hippocampique pendant le SP. Nous exposons ci-dessous les données de la littérature concernant ce noyau et ses relations fonctionnelles avec l'hippocampe

#### **1) L'anatomie du noyau supramamillaire**

Le Sum est relativement peu épais et composé de couches de cellules distinctes chimiquement. Il est situé dorsalement aux corps mamillaires et ventralement à l'hypothalamus postérieur et l'aire latérale de l'hypothalamus le limite dorsolatéralement. Le Sum contient des types cellulaires variés incluant des neurones à CCK, à calrétinine, dopaminergiques, aspartatergiques, glutamatergiques, à substance P et à VIP (Swanson, 1982 ; Gall et Selawski, 1984 ; Haglund *et al.*, 1984 ; Kiyama *et al.*, 1984 ; Ino *et al.*, 1988 ; Carnes *et al.*, 1990 ; Gonzalo-Ruiz *et al.*, 1992 ; Lantos *et al.*, 1995 ; Leranth et Kiss, 1996 ; Borhegyi et Leranth, 1997 ; Kocsis *et al.*, 2003). Ces types cellulaires ont permis de diviser le Sum en 2 parties, le Sum médian (SuM, subdivision g de la figure 26) et le Sum latéral (SumL, ensemble g+s de la figure 26). Le SumM n'a pas de contact avec le tractus mamillaire principal et contient de petites cellules en forte densité (Borhegyi et Leranth, 1997). Le SumL, localisé au-dessus et de chaque côté du tractus mamillaire, est composé de plus grosses cellules dispersées parmi de plus petites cellules moins densément regroupées (Swanson, 1982 ; Borhegyi et Leranth, 1997 ; Risold et Swanson, 1997).

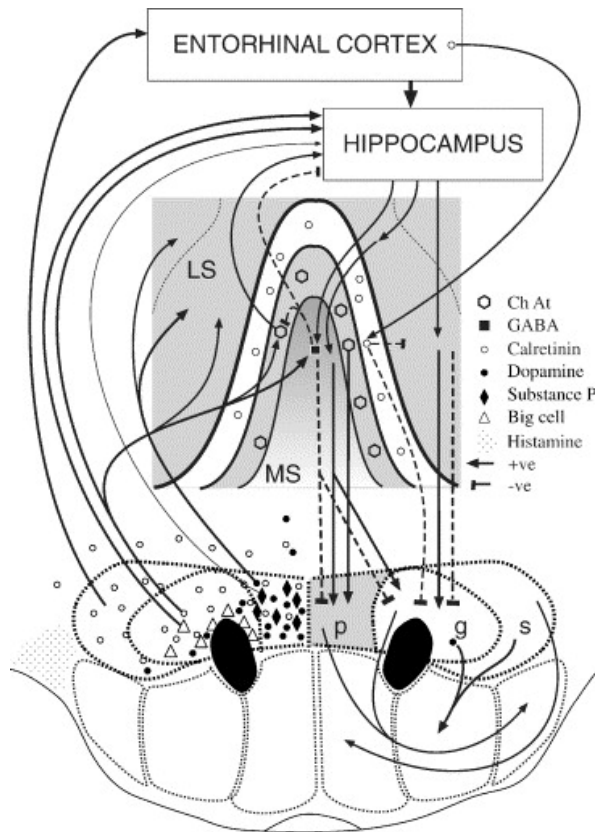
#### **2) Afférences du Sum**

Les afférences principales des régions caudales au Sum sont celles du LDT, du raphé et de la substance grise périaqueducule (Shibata, 1987 ; Hayakawa *et al.*, 1993 ; Gonzalo-Ruiz *et al.*, 1999 ; Vertes *et al.*, 1999). Les afférences principales des régions rostrales au Sum proviennent du cortex infralimbique, du pedunculaire dorsal, de la bande diagonale de Broca, du septum latéral et médial, de l'habenula latérale, de l'aire préoptique médiale et latérale (Figs.26, 27, tableau 3) (Vertes et Martin, 1988 ; Kiss *et al.*, 2002).

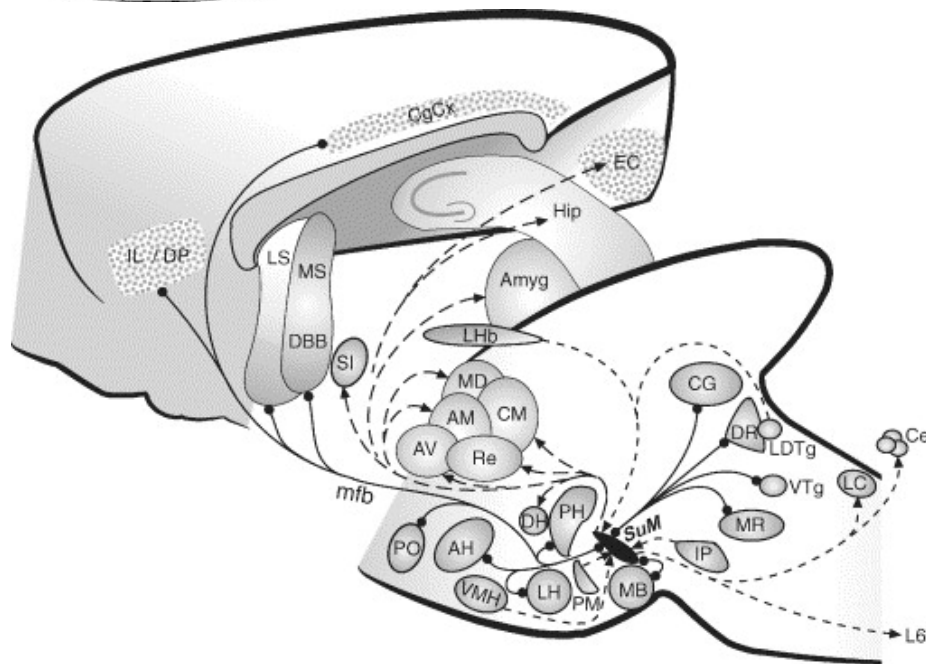
**Tableau 3 : Principales afférences du Sum et leurs neurotransmetteurs, Abréviation : Glu, glutamate ; ACh, acétylcholine, NT, neurotensine; Enk, enképhaline ; SP, substance P.**

Régions afférentes principales	Sum	Type de projection
Cortex cingulaire	+	
Cortex infralimbique	++	
Cortex pedunculaire dorsal	+++	
Subiculum	++	Glu
Bande diagonale de Broca	+++	GABA, ACh, Glu
Septum latéral	+	
Septum médian	+	GABA, ACh
Aire préoptique latérale et médiane	+++	NT, Somatostatine
Hypothalamus antérieur	+	
Hypothalamus latéral	++	
Prémamillaire ventral	+	
Habénula latérale	+	
Interpédunculaire	+	
Noyau centralis	+	
Noyau supérieur du sous noyau compact	++	NT, Enk
Aire tegmentale ventrale	+++	
LDT	+++	ACh, SP
Cuneiforme	++	
Raphé dorsal	++	5HT, NT, Glu
Noyau incertus	++	

Le Sum reçoit de nombreux retours d'information indirects des structures auxquelles il projette (Fig. 26). Par exemple, l'information provenant de l'aire CA3 est relayée au Sum via le septum latéral (Risold et Swanson, 1996). Les neurones GABAergiques localisés à la limite entre le septum latéral et le septum médian (Borhegyi et Freund, 1998 ; Leranth *et al.*, 1999) relayent l'information du cortex entorhinal aux cellules à calrétinine dans le Sum (Gonzalo-Ruiz *et al.*, 1999 ; Leranth *et al.*, 1999).



**Figure 26 : Types cellulaires du Sum et leurs connexions avec le cortex entorhinal, le septum et l'hippocampe.** Les caractéristiques histochimiques des différents types de neurones sont représentés par des symboles différents. La partie la plus médiane du Sum (p) contient de petites cellules dont des cellules à substance P et à dopamine. Autour du tractus mammillaire principal en noir la partie médiane du Sum latéral (g) se distingue par des cellules qui projettent au septum médian et à l'hippocampe. La partie latérale du Sum latéral (s) contient des cellules qui projettent préférentiellement au cortex entorhinal. Les interconnexions entre le Sum, le septum et l'hippocampe sont indiquées par des lignes solides avec des flèches et en pointillé lorsqu'elles sont inhibitrices. Le septum médian est divisé en 3 zones distinctes avec une zone intermédiaire caractérisée par des cellules cholinergiques et une zone extérieure caractérisée par des cellules contenant de la calrétilinine qui reçoivent des projections du cortex entorhinal (d'après McNaughton et al. 2004).



**Figure 27 : Connexions générales du Sum sans ses divisions internes.** Les lignes en pointillés avec des flèches indiquent les connexions unidirectionnelles, les lignes solides avec des ronds indiquent les connexions bidirectionnelles. Abréviations: AH, aire hypothalamique antérieure; AM, aire hypothalamique médiane; Amyg, amygdale; AV, noyau thalamique ventral; Ce, cervelet; CG, substance grise périaqueducale; CgCx cortex cingulaire; CM, noyau thalamique médian; DBB, bande diagonale de Broca; DH, aire hypothalamique dorsale; DP, cortex pédonculaire dorsal; DR, noyau raphé dorsal; EC, cortex entorhinal; Hip, hippocampe; IL, cortex infralimbique; IP, noyau interpédonculaire; L6, corde spinale, lamina 6; LC, locus coeruleus; LDTg, noyau tegmental latéro-dorsal; LH, hypothalamus latéral; LHb, habénula latérale; LS, noyau septal latéral; MB, corps mammillaire; MD, noyau thalamique médio-dorsal; MR, noyau du raphé médian; MS, septum médian; PH, hypothalamus postérieur; PM, noyau prémamillaire; PO, noyau préoptique; Re, noyau reuniens; SI, substance inominée; SuM, noyau supramamillaire; VMH, hypothalamus ventromédian; VTg, noyau tegmental ventral. D'après Pan et McNaughton 2002.

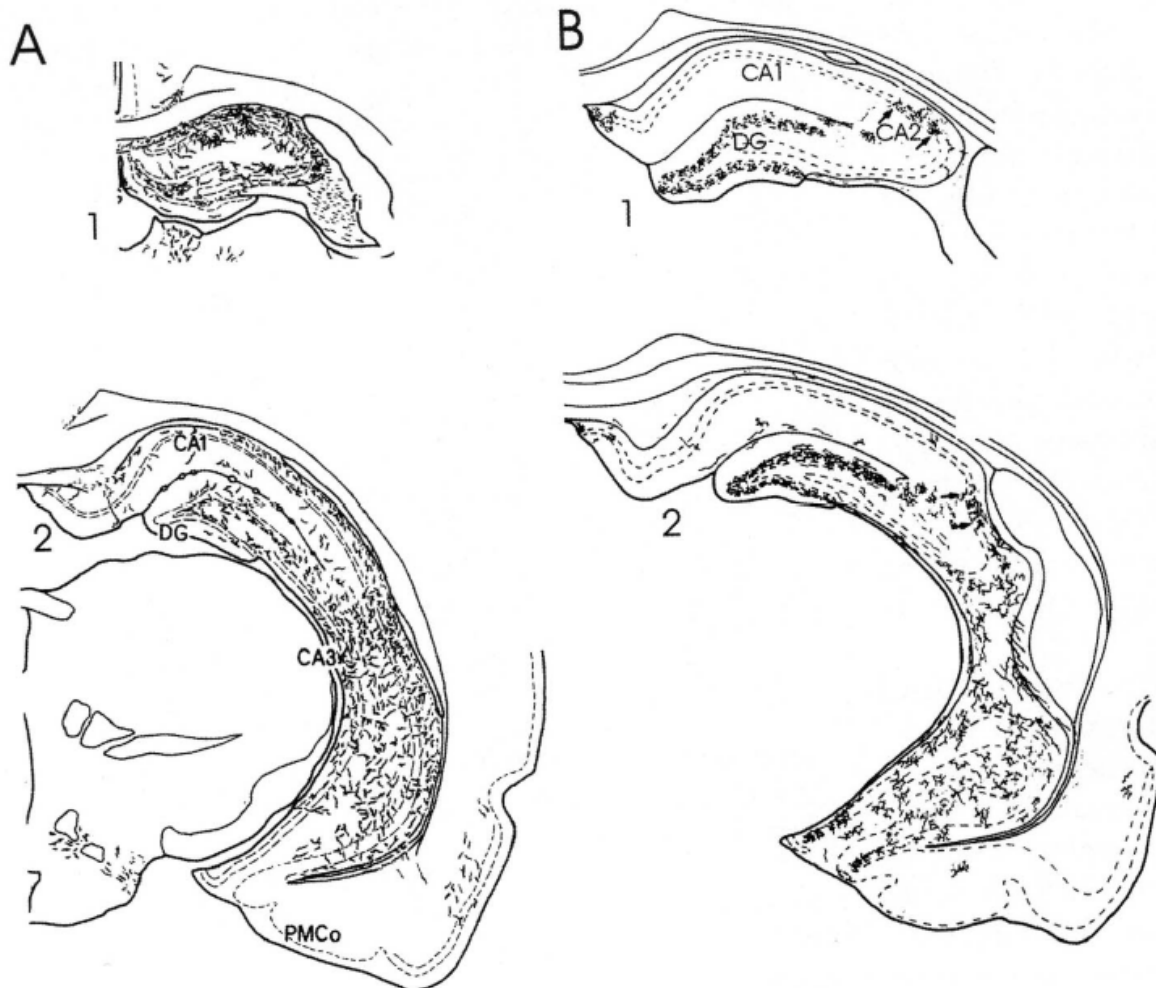
### 3) Efférences du Sum

Le Sum envoie de nombreuses projections rostrales dans le diencephale et le télencéphale (Swanson, 1976; 1982 ; Shibata, 1987 ; Vertes *et al.*, 1999) (Figs. 26, 27, 28, Tableau 4). Le Sum dans son ensemble projette au septum latéral, à l'aire préoptique, à de nombreux noyaux thalamiques médians, sous-thalamiques et à plusieurs parties de l'hypothalamus. Le SumL projette au septum médian, à la bande diagonale de Broca, à l'aire préoptique latérale, à l'hippocampe, au cortex entorhinal, au cortex cingulaire, au cortex frontal et à l'amygdale. Les efférences caudales du Sum (essentiellement du SumL) vont principalement à la substance grise périaqueducale, au raphé médian et dorsal et au LC (Vertes, 1988 ; Kiss *et al.*, 2000). Les neurones contiennent de nombreux peptides et certains d'entre eux projettent préférentiellement à certaines régions cérébrales (Tableau 4).

**Tableau 4 : Principales efférences du noyau supramammillaire (Vertes, 1992 ; Pan et McNaughton, 2004 ; Soussi *et al.*, 2010):** les noyaux thalamiques et hypothalamique n'ont pas été détaillés puisque ce sont les régions télencéphaliques qui nous intéressent pour cette étude. +++Marquage dense, ++marquage modéré, +faible marquage, - absence de marquage. Abréviations : SP, Substance P ; CR, Calréтинine, DA, Dopamine; Glu, glutamate; CCK, Cholécystokinine; VIP, peptide intestinal vasoactif

Projections principales	SumM	Peptide	SumL	Peptide
<b>Télencéphale</b>				
Amygdale	+		+++	
Noyau de la strie terminale	++		+++	
Clastrum	-		+++	
Cortex cingulaire	-		++	
Cortex entorhinal	-		++	CR-VIP-CCK
Cortex frontal	+		+++	
Cortex infralimbique	-		+	
Bande diagonale de Broca	++		+++	
Cortex endopiriforme	+		+++	
CA3	+		+	
CA2	+	SP	++	CR-VIP-CCK-
GD	++		+++	CR-VIP-CCK-Glu-GABA
Septum latéral	+++	DA	+++	CR-Glu
Septum médian	++		+++	CR-Glu
Aire préoptique latérale et médiane	+++	Glu	+++	Glu
Substance inominée	++		++	
<b>Diencephale</b>				
Thalamus	+++		+++	CCK
Hypothalamus	+++		+++	
Corps mamillaires	+	DA		
Zona incerta	++		+++	
<b>Mésencéphale</b>				
Substance grise périaqueducale	++		+++	
Raphé dorsal	+		+++	

Nous nous intéresserons ici plus particulièrement aux efférences du Sum sur l'hippocampe. Les neurones contenant de la calrétinine sont dispersés principalement dans le SumL (Borhegyi et Leranth, 1997). Certains d'entre eux sont glutamatergiques et donc excitateurs et projettent à l'hippocampe.



**Figure 28 : Efférences des noyaux supramamillaires et septaux dans la formation hippocampique. A** distribution des fibres marquées à la PHA-L dans la formation hippocampique résultant d'une injection dans la partie médiane du septum médian. **B** Distribution des fibres à PHA-L après injection de PHA-L dans le noyau supramamillaire. Un plexus très dense de fibres est localisé superficiellement à la couche granulaire du GD et dans la région de CA2 (Haglund *et al.*, 1984 ; Gaykema *et al.*, 1990).

Les projections des neurones du Sum (Fig. 28) se terminent principalement au niveau des dendrites proximaux et du soma des cellules principales de l'hippocampe (Magloczky *et al.*, 1994). Cependant certaines populations d'interneurones GABAergiques sont aussi innervées par les fibres du Sum (Nitsch et Leranth, 1996).

Le SumL projette préférentiellement au niveau supragranulaire de la partie dorsale du GD (Fig. 28). Il projette moins densément aux régions dorsales de CA2 et CA3 et à la partie ventrale du GD (Vertes, 1992). Les terminaisons axonales des neurones du SumL dans le GD contiennent une des enzymes de synthèse du GABA (la glutamate décarboxylase 65),



le transporteur vésiculaire au GABA, ainsi que le transporteur vésiculaire 2 au glutamate. Les terminaisons axonales du SumL dans le GD dorsal sont donc potentiellement excitatrices et/ou inhibitrices. Une seconde voie originaire des neurones de la partie plus postérieure du SumM innerve le GD ventral et la couche des cellules pyramidale de CA2 et CA3. Les axones terminaux de cette voie contiennent uniquement le transporteur vésiculaire 2 au glutamate et seraient donc excitateurs (Boulland *et al.*, 2009 ; Soussi *et al.*, 2010).

#### **4) La voie supramamillaire-formation hippocampe**

Deux effets majeurs ont été observés après stimulation du Sum. Le premier est un effet potentiellement inhibiteur de courte latence (reflétant une connexion monosynaptique) sur au moins 50% des neurones du GD. Le second effet correspond à une facilitation des entrées de la voie perforante avec une augmentation du nombre de potentiels d'action dans le GD (Mizumori *et al.*, 1989 ; Kirk et McNaughton, 1991 ; Nakanishi *et al.*, 2001). Les lésions du septum n'empêchent pas cette stimulation de l'hippocampe par le Sum (Mizumori *et al.*, 1989). Cette potentialisation induite par des stimulations du Sum et de la voie perforante est abolie par les lésions du fornix-fimbria, une voie majeure empruntée par les efférences du Sum ou lorsque la transmission GABAergique est bloquée par de la picrotoxine (Nakanishi *et al.*, 2001). L'activité du Sum serait donc transférée directement à l'hippocampe sans relation avec la voie indirecte qui passe par le septum médian. La stimulation du Sum pourrait agir via une neurotransmission excitatrice glutamatergique directe sur le GD (Magloczky *et al.*, 1994) ou via une inhibition des interneurons inhibiteurs (Mizumori *et al.*, 1989). La coexistence de glutamate et de GABA dans les terminaisons du Sum permettrait simultanément de dépolariser les dendrites et d'hyperpolariser le soma des cellules granulaires du GD. Cette voie permettrait aux cellules granulaires du GD de décharger avec une haute précision temporelle quand la voie perforante et le Sum déchargent en même temps (Pan et McNaughton, 2002). Le SumL modulerait aussi l'excitation du septum médian sur les cellules pyramidales de CA1. En effet, l'injection de carbachol, un agoniste des récepteurs cholinergiques muscariniques, dans le Sum diminue le nombre de potentiels d'action dans les cellules de CA1 et l'injection de procaine dans le septum médian atténue cet effet (Jiang et Khanna, 2006).

#### **5) Rôle du Sum dans les mécanismes de génération du rythme thêta hippocampique**

D'après les travaux chez l'animal anesthésié, certaines cellules du Sum déchargent rythmiquement et sont en phase avec l'activité hippocampique thêta. De plus, lorsque le thêta hippocampique est supprimé par les lésions du septum, le rythme thêta enregistré dans les cellules du Sum n'est que très légèrement modulé (Kirk et McNaughton, 1991 ; Kirk *et al.*, 1996). Ainsi, les cellules du Sum peuvent générer ce rythme indépendamment des cellules de l'hippocampe et de celles du septum.

Les études de lésion et d'inhibition indiquent que le SumM serait plutôt responsable des modulations de la fréquence du thêta. Le SumL serait à la fois responsable des changements de fréquence et d'amplitude du thêta. En effet, chez les rats anesthésiés, les injections de procaine dans le Sum diminuent la fréquence et l'amplitude du thêta.

Cependant si le thêta est sous un fort contrôle du Sum chez le rat anesthésié, ce n'est pas le cas chez le rat libre de se mouvoir. En effet, les lésions du Sum n'affectent pas le rythme thêta accompagnant les mouvements spontanés (Thinschmidt *et al.*, 1995). Les infusions de benzodiazépine dans le Sum ou la lésion chimique du Sum produisent de petites diminutions de la fréquence thêta (d'environ 0,4Hz) lors de certaines tâches comportementales. Ainsi, le Sum contrôlerait la fréquence du thêta seulement dans certaines conditions comportementales et en coopération avec d'autres structures. Cependant, le rôle du Sum dans l'activité thêta pendant le SP n'a jamais été étudié. Une étude au laboratoire indique que le nombre de neurones FOS+ augmente après une hypersomnie de SP de 3h chez le rat (Sapin *et al.*, 2010). De plus, le nombre de neurones FOS+ dans le Sum est corrélé positivement avec les quantités de SP chez le chat dont les quantités de vigilance sont modulées pharmacologiquement (Sastre *et al.*, 2000). Son implication dans l'activité thêta et l'activation de l'hippocampe pendant le SP n'a jamais été étudiée.

**Le Sum contient des cellules qui projettent directement au GD (Kirk et McNaughton, 1991; 1993 ; Kirk, 1997; 1998). Les parties médiane et latérale du Sum contiennent des neurones qui contrôlent le rythme thêta dans l'hippocampe via un relais dans le septum médian (Vertes, 1992 ; Vertes et Kocsis, 1997 ; Vertes et McKenna, 2000). Le septum médian et la bande diagonale de Broca seraient le dernier relais des entrées ascendantes synchronisantes et transmettraient le rythme thêta à la formation hippocampique.**

## **6) Implications fonctionnelles du noyau supramammillaire**

Du fait de ses projections directes à l'hippocampe et de son implication dans l'activité thêta, les études sur le rôle du supramammillaire se sont principalement focalisées sur des fonctions émotionnelles et mnésiques dépendantes de l'hippocampe.

Le nombre de cellules immunoréactives au Fos dans le Sum augmente de façon plus marquée lors d'un changement de température, pendant le stress de nage et d'exploration (Kiyohara *et al.*, 1995 ; Miyata *et al.*, 1995 ; Cullinan *et al.*, 1996 ; Wirtshafter *et al.*, 1998 ; Ito *et al.*, 2009). La lésion du Sum augmente le comportement exploratoire mais ne réduit pas la fréquence thêta pendant la tâche d'open field (Thinschmidt *et al.*, 1995 ; Pan et McNaughton, 2002).

Le test d'évitement passif est un test d'anxiété mais aussi d'inhibition comportementale dépendant de l'hippocampe. La rétention mais pas l'acquisition immédiate de ce test est altérée par l'inactivation du Sum (Shahidi *et al.*, 2004a). Le Sum est donc impliqué dans la consolidation de l'information acquise plutôt que dans l'apprentissage

de ce test. La lésion ou l'inhibition du SumM pendant cette tâche s'accompagne d'une diminution de la fréquence du thêta d'environ 0,4Hz (Pan et McNaughton, 2002 ; Woodnorth et McNaughton, 2002). Le nombre de neurones Fos+ dans le Sum augmente également après stimulation électrique ou pharmacologique de l'hypothalamus médian ou de la substance noire périaqueducale, deux aires impliquées dans le système de défense (Sandner *et al.*, 1992 ; Silveira *et al.*, 1995). **Le Sum jouerait donc un rôle dans le comportement défensif.** Les lésions du SumM altèrent le conditionnement de peur contextuelle sans affecter le conditionnement de peur au stimulus discret (Pan et McNaughton, 2002). La mémoire émotionnelle implique plus particulièrement l'hippocampe ventral qui reçoit des projections majeures du SumM. **Les effets des lésions du Sum semblent donc très proches de ceux obtenus avec les lésions hippocampiques pour la plupart des tests impliquant les émotions (Phillips et LeDoux, 1992; 1994).**

Le "water maze" permet de tester la mémoire spatiale, test qui dépend principalement de l'hippocampe (Morris *et al.*, 1982). Le nombre de neurones exprimant le FOS dans le Sum est augmenté lors de test d'apprentissage en water maze et plus fortement lors des tests de mémoire de travail que lors des tests de mémoire de référence (Santin *et al.*, 2003). Cependant, les lésions du SumM diminuent faiblement la fréquence du thêta sur de courtes périodes (environ 0,4Hz) et altèrent très faiblement les performances mnésiques spatiales de référence et de travail ou la vitesse de nage (Pan et McNaughton, 2002 ; Shahidi *et al.*, 2004b). Plus récemment l'utilisation de tâches spatiales plus complexes a cependant permis d'observer un effet sur l'apprentissage spatial. En effet, l'inactivation ou la lésion du Sum altère la capacité des rats à résoudre une tâche de mémoire de travail spatiale ou à retenir l'information spatiale dans une tâche de mémoire de référence. Cependant, ces tâches ne sont pas seulement un test de mémoire spatial puisqu'elles impliquent aussi le système de récompense (Aranda *et al.*, 2006 ; Aranda *et al.*, 2008). **Ainsi, le Sum ne jouerait pas un rôle aussi important que celui de l'hippocampe dans la mémoire spatiale.**

**Le Sum serait aussi impliqué dans le système de récompense.** Les rats apprennent à appuyer sur un levier afin d'infuser des substances excitatrices dans le Sum (Ikemoto *et al.*, 1997 ; Ikemoto *et al.*, 2004). La stimulation pharmacologique dans le Sum entraîne une augmentation du nombre de neurones FOS+ dans les régions impliquées dans le système de récompense (Shin et Ikemoto, 2010). **Le Sum est donc impliqué dans les émotions et la cognition lors de l'éveil. Ces fonctions sont aussi présentes pendant le SP et le Sum pourrait jouer un rôle pendant cet état.**

### **3.3.4.7 Les systèmes afférents au Sum et au MS/DBB impliqués dans l'activité hippocampique pendant le sommeil paradoxal**

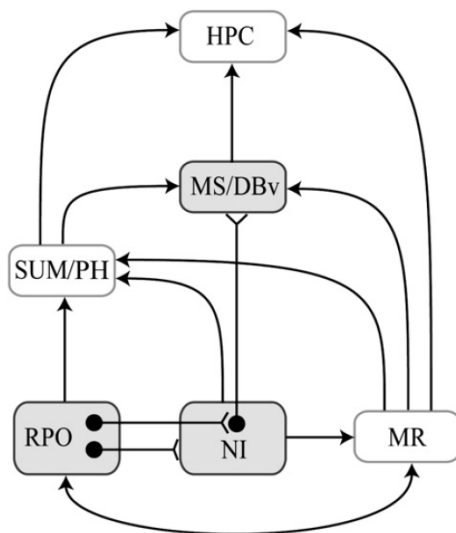
#### **1) Le precoeruleus**

La région du precoeruleus envoie des efférences glutamatergiques au septum médian. Après 3h d'augmentation des quantités de SP, 50% de ces neurones expriment la

protéine FOS. De plus, la lésion du precoeruleus à l'acide iboténique abolit l'activité thêta pendant le SP mais pas l'EEG désynchronisé (Lu *et al.*, 2006).

## 2) L'hypothalamus postérieur

Une population de cellules dans l'hypothalamus postérieur décharge toniquement, avec une fréquence élevée et spécifiquement pendant l'activité thêta hippocampique (Bland *et al.*, 1995). Cependant, l'hypothalamus postérieur ne projette pas directement à l'hippocampe mais à des structures qui y projettent telles que le Sum, le MS/DBB, certains noyaux thalamiques et le cortex perirhinal (Vertes *et al.*, 1995). De plus, l'hypothalamus postérieur relayerait l'activité du noyau pontis oralis (RPO) au MS/DBB pour la modulation de l'activité thêta (Fig. 29).



**Figure 29** Schéma présentant l'intégration du noyau incertus (NI) dans le circuit ponto-septal impliqué dans le contrôle de l'activation des oscillations thêta hippocampique. RPO, noyau pontis oralis ; MR, raphé médian ; NI, noyau incertus ; Sum, supramammillaire ; PH, hypothalamus postérieur ; HPC, formation hippocampique ; MS/DBv, complexe du septum médian et de la bande diagonale de Broca. D'après (Teruel-Martí *et al.*, 2008).

## 3) Le noyau pontis oralis

La stimulation du noyau pontis oralis (RPO) entraîne une augmentation linéaire de la fréquence du rythme thêta hippocampique (Klemm, 1972 ; McNaughton et Sedgwick, 1978 ; Brazhnik *et al.*, 1985 ; McNaughton *et al.*, 1986). Les cellules du RPO déchargent toniquement pendant le SP et pendant l'Ev exploratoire (60–100 potentiel d'action/s) (Vertes, 1977 ; 1979). Les injections de procaine dans la formation réticulée, notamment dans le RPO, diminuent la fréquence du thêta. Les injections de carbachol dans le RPO augmentent l'amplitude et la fréquence du thêta chez les rats anesthésiés (Vertes *et al.*, 1993). Le RPO reçoit des projections massives du PPT. De plus, le thêta est induit après injection de carbachol dans le PPT (Mesulam *et al.*, 1983 ; Jones et Beaudet, 1987 ; Vertes *et al.*, 1993). Ainsi pendant le SP, le PPT pourrait activer le RPO et induire l'activité thêta. Cependant, le RPO ne projette pas directement au MS/DBB, il projette en revanche au noyau incertus (Fig. 29). Celui-ci projette au MS/DBB et au Sum et relayerait l'information en provenance du RPO. De plus, la stimulation du noyau incertus augmente la rythmicité de la

fréquence thêta dans l'hippocampe (Kirk et McNaughton, 1993 ; Bland et Oddie, 1998 ; Nunez *et al.*, 2006).

#### **4) Modèle de génération du thêta par la voie du Sum**

Quelques auteurs ont émis l'hypothèse que le Sum serait une structure très impliquée dans l'activité thêta et l'activation corticale pendant le SP (Vertes et Kocsis, 1997 ; Sastre *et al.*, 2000). En effet, les voies qui contrôlent la fréquence thêta originaires de la formation réticulée pontique (Vertes, 1981; 1982 ; Vertes *et al.*, 1986 ; Vertes et Kocsis, 1997) projettent directement au Sum. Dans l'hypothèse d'un rôle du Sum, les afférences directes proviendraient du LDT et du noyau incertus. Ce dernier relayerait l'activité provenant du RPO (Hanada *et al.*, 1999 ; Teruel-Marti *et al.*, 2008)(Tuerel-Marti 2008). L'activité transmise par ces régions serait intégrée dans le Sum en activité phasique. Ce rythme de sortie serait alors transmis aux cellules cholinergiques et GABAergiques du MS/DBB et imposé à l'hippocampe (Kirk et McNaughton, 1991; 1993 ; McNaughton *et al.*, 1995 ; Kirk *et al.*, 1996 ; Kocsis et Vertes, 1997 ; Vertes et Kocsis, 1997 ; Borhegyi et Freund, 1998).

Aucune étude n'a cependant démontré l'importance de la voie en provenance des noyaux supramammillaires pendant le SP. Une partie de notre travail a été d'examiner cette voie et son éventuelle activation pendant le SP.

## **4.Objectifs de l'étude**

La fonction du SP et les mécanismes responsables de l'activité corticale pendant le SP restent donc énigmatiques. Cependant, le criblage d'expression génique à grande échelle sur puces à ADN a permis d'identifier des centaines de transcrits dans différents tissus, chez différentes espèces et a apporté des informations pertinentes sur les fonctions du sommeil (Terao *et al.*, 2003 ; Cirelli *et al.*, 2004). Au niveau moléculaire, les concentrations de certaines molécules ont été mesurées chez des rats privés de SP afin de répondre à des hypothèses bien précises. Finalement très peu d'études sur la fonction du SP ont utilisé cette approche objective des puces à ADN afin de mesurer les modulations du transcriptome associées au SP. La seule étude dans laquelle les puces à ADN ont été utilisées a été consacrée à l'analyse du transcriptome dans la totalité du cortex (comprenant le néocortex et la formation hippocampique), et a seulement analysé les effets de la privation de SP (Guindalini *et al.*, 2009). Nous avons vu dans le chapitre sur l'activation corticale que le cortex cérébral contient deux structures dont l'activité est modulée différemment par le SP, l'hippocampe et le néocortex. Dans ce travail, nous avons analysé, séparément dans ces deux structures, les modifications du transcriptome induites par différentes quantités de SP. Nous avons voulu également observer les effets d'une hypersomnie de SP.

### **4.1 Quels sont les corrélats moléculaires associés aux quantités de sommeil paradoxal dans le cortex ?**

Les phases de SP sont très courtes et peu nombreuses chez le rat (10% du temps total), rendant difficile l'étude des modifications moléculaires spécifiques au SP dans un cycle de sommeil naturel. Aussi, pour obtenir des quantités de SP plus importantes, un protocole de privation/rebond (piscine multi-plots) est classiquement utilisé au laboratoire. Les animaux sont placés sur 3 plate-formes de 6 cm de diamètre entourées d'eau. Dans ces conditions, ils sont privés totalement de SP, afin de ne pas chuter dans l'eau à cause de l'atonie musculaire accompagnant ce stade. Dans notre travail, nous avons analysé l'expression génique dans l'hippocampe et du néocortex de 3 groupes de rats : des rats témoins ayant un cycle veille-sommeil normal (PSC), des rats privés sélectivement de SP pendant 78h (PSD) et des rats ayant subi 72h de privation puis une phase de récupération de 6 heures, au cours de laquelle s'effectue un remboursement de la dette de SP (PSR). Le niveau d'expression de certains gènes a ensuite été vérifié à l'aide de PCR quantitatives. Le protocole de privation de SP entraîne des effets non spécifiques liés au stress. Nous avons donc mesuré les concentrations de corticostérone dans nos 3 groupes de rats, afin de vérifier que l'expression de certains gènes est corrélée aux quantités de SP et non aux concentrations de corticostérone.

Cette étude nous a permis de déterminer que les gènes d'expression précoce tels que *Fos*, *Arc*, et *Cox2* ont une expression modulée par notre protocole, dans l'hippocampe et le néocortex. Ces gènes ont un niveau d'expression augmenté pendant l'hypersomnie de SP dans la formation hippocampique et diminué à la fin de la privation de SP dans le néocortex sauf pour *Cox2*. Il nous est donc apparu nécessaire de localiser plus précisément les neurones exprimant ces gènes d'expression précoce. Le marqueur d'activation indirect FOS a largement été utilisé dans notre laboratoire pour l'étude des réseaux neuronaux responsables de la genèse et du maintien du SP. La suite naturelle de l'étude des puces à ADN a donc été de préciser la localisation des protéines FOS, ARC et COX2 au sein du cortex chez des rats présentant différentes quantités de SP afin de répondre à la question suivante.

#### **4.2 Quelles régions corticales sont actives, et plastiques pendant le sommeil paradoxal et l'éveil ?**

Nous avons analysé la distribution des neurones exprimant les protéines FOS, COX2 et ARC dans les différentes régions corticales chez des rats PSC, PSD et PSR. Nous avons ajouté un quatrième groupe de rats, nommé groupe EV. Dans ce groupe, les animaux sont placés pendant 3h dans une cage avec des objets, afin qu'ils explorent leur environnement et restent éveillés de façon naturelle. Ce groupe permet de rajouter un groupe dit "éveil actif" pendant lequel l'activité de l'EEG est comparable à celle du SP, alors que le comportement des 2 groupes est opposé (actif-inactif).

Nos résultats indiquent que le nombre de neurones exprimant la protéine Fos est très différent d'une région corticale à l'autre dans chacun de nos groupes de rats. De plus, certaines régions telles que le gyrus dentelé (GD), le cortex rétrosplénial et le cortex cingulé antérieur sont très actives pendant le SP chez les rats PSR par rapport aux groupes PSC et PSD et plus ou moins par rapport au groupe EV.

Le réseau neuronal responsable du cycle veille-sommeil a largement été étudié au laboratoire. De nombreuses informations ont été apportées par le couplage de la détection du marqueur d'activation Fos avec celle de traceurs rétrogrades et antérogrades éjectés dans des régions d'intérêts, chez des rats dont les quantités des états de vigilance sont modulées. Ce type d'approche est manquant pour le réseau responsable de l'activation corticale pendant le SP, réseau qui a été étudié principalement à l'aide des techniques d'électrophysiologie. Ainsi, nous avons mis à profit l'éjection de traceur rétrograde dans certaines régions corticales limbiques et son couplage avec la détection de Fos chez des rats PSR, afin de répondre à la question suivante.

### **4.3 Quelles régions activent le gyrus dentelé, le cortex rétrosplénial et le cingulé antérieur pendant le sommeil paradoxal ?**

Nous avons cherché à circonscrire les régions cérébrales projetant au GD, au cortex rétrosplénial (RSP) et au cingulé antérieur (ACA), et potentiellement responsables de leur activation pendant le SP. Pour cela, un traceur rétrograde, la sous-unité b de la toxine cholérique (CTb), a été éjecté dans le GD, le RSP ou le ACA chez des rats soumis ensuite au protocole de privation/récupération de SP. Le double marquage FOS/CTb après hypersomnie de SP nous a indiqué quelles régions projettent au GD, au RSP et au ACA et sont actives pendant le SP. Le noyau supramamillaire (Sum) et le claustrum contiennent des neurones marqués à la CTb qui expriment aussi la protéine FOS. Ils seraient donc actifs pendant le SP et innerveraient ces trois régions corticales.

Le Sum a été bien décrit pour son implication dans la genèse du rythme thêta et dans la mémoire pendant l'Ev mais presque aucune donnée n'existe sur son implication dans ces deux phénomènes pendant le SP. Or, nos résultats précédents laissent penser que le Sum aurait un rôle à jouer dans l'activation corticale pendant le SP. L'étude du rôle de cette région pendant le SP paraît donc cruciale pour la compréhension de cette activation corticale. Ceci nous amène à une dernière question.

### **4.4 Quelle est l'implication du Sum dans l'activation corticale liée au sommeil paradoxal ?**

L'étude des régions cérébrales impliquées dans les rythmes corticaux ou dans la régulation et le déclenchement des états de vigilance a souvent débuté par une approche lésionnelle de ces régions. Aussi avons-nous lésé bilatéralement le Sum par éjection iontophorétique d'acide iboténique. Nous avons ensuite comparé les caractéristiques de l'EEG chez les animaux témoins et les animaux lésés. Nous avons aussi comparé l'effet de la lésion sur l'activation corticale visualisée à l'aide de la quantification du FOS et de ARC pendant une hypersomnie de SP.

### **4.5 Résultats préliminaires : quelles régions activent le supramamillaire, le claustrum, le cortex visuel ? Les neurones "actifs" du gyrus dentelé pendant le SP sont-ils des nouveaux neurones ?**

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes aussi intéressés aux neurones ARC+, FOS+ et COX2+ (marqueurs indirects de plasticité et d'activation neuronale) observés après hypersomnie de SP dans le GD, afin de savoir s'ils pouvaient être des neurones néogénérés. Pour cela nous avons injecté du BrdU 3, 6 et 12 semaines avant le protocole de privation-rebond de SP. Notre hypothèse étant que les neurones néogénérés dans le GD seraient plus actifs et plastiques pendant le SP.



De plus, nous avons poursuivi l'étude de neuroanatomie par l'injection de traceurs rétrogrades dans les régions actives pendant le SP, le claustrum et le Sum chez des rats qui effectuent une hypersomnie de SP. En outre nous avons pratiqué la même injection dans le cortex visuel primaire afin de contrôler quelles voies réguleraient les afférences sensorielles pendant le SP.

Enfin, nous avons commencé à caractériser le type de neurones FOS+ après hypersomnie de SP dans le Sum afin de savoir si ces neurones expriment la calrétinine ou la GAD65, ceci afin de définir la nature excitatrice ou inhibitrice de cette voie pendant le SP.



# MATERIEL ET METHODES

---



## **Contribution à l'étude**

L'étude des puces à ADN a débuté en 2005 avec Yazid Lakhdarchaouche, Mouaadh Abdelkarim (Master 2), Patrice Fort et Pierre Hervé Luppi qui ont écrit le projet de financement. Yazid Lakhdarchaouche, Mouaadh Abdelkarim ont implanté le premier groupe de rats (n=18) comportant des rats contrôles de SP (PSC), privés pendant 78h de SP (PSD) et privés de SP pendant 72h et placés en hypersomnie de SP pendant de 6h (PSR). Les tissus du pont, de l'hypothalamus et du bulbe ont été extraits chez les 3 groupes de rats et envoyés à Strasbourg pour l'hybridation sur puce à ADN (données non présentées).

Nutabi Camargo (Master2) a continué l'analyse du transcriptome dans la formation hippocampique sur les mêmes groupes d'animaux. Elle a commencé le groupe de rats pour l'immunohistochimie avec Patrice Fort et Rouguy Touré comportant les groupes PSC, PSD et PSR (n=3) que j'ai complétés par la suite. A mon arrivée au laboratoire, Keiko Ogawa et moi-même avons implanté un 2<sup>ème</sup> groupe de rats (n=18) comportant les rats PSC, PSD et PSR afin de vérifier les résultats des puces pour la formation hippocampique. Keiko Ogawa a analysé les quantités des états de vigilance et j'ai analysé le transcriptome dans le néocortex et la formation hippocampique chez les deux groupes de rats (n=36) avec l'aide de Pierre Hervé Luppi.

L'étude sur la neurogenèse a été réalisée avec Patrice Fort et Denise Salvart.

Les extractions d'ARN et les PCR quantitatives pour la vérification du niveau d'expression de certains gènes d'intérêt ont été réalisées surtout par les techniciennes Nadine Gay et Céline Scoté mais aussi par Mouaadh Abdelkarim, Nutabi Camargo. J'ai aussi effectué certaines PCR quantitatives pour les gènes d'intérêts dans les échantillons de la formation hippocampique et du néocortex. Nous avons prélevé les corticostéroïdes chez nos rats, puis la mesure de leur concentration a ensuite été réalisée par Bruno Claustrat. Lucienne Léger a effectué le comportement, la perfusion et l'immunohistochimie du groupe de rats en éveil exploratoire (n=4) pour lesquels j'ai analysé la répartition des neurones FOS+.

Nous avons mis au point la technique de lésion dans les noyaux supramammillaires avec Keiko Ogawa. J'ai réalisé le reste de l'étude.

Notre recherche a nécessité l'utilisation de techniques telles que la polysomnographie, la modulation des états de vigilance, les puces à ADN, la PCRq, l'immunohistochimie, l'hybridation in situ, le traçage de voies nerveuses et l'éjection de neurotoxine.

## **1. La polysomnographie**

### **1.1 Principe de la polysomnographie**

Le principe de la polysomnographie est de capter les paramètres nécessaires pour déterminer les états de vigilance ; ceux que nous utilisons ici sont l'activité électrique corticale (EEG) et musculaire (EMG).

Le signal électrique à la base de l'EEG résulte d'une sommation des potentiels d'action post-synaptique synchrones issus de nombreux neurones corticaux proches des électrodes. Ces phénomènes de synchronisation déterminent l'amplitude de l'EEG et le rythme de l'EEG, ils dépendent de certaines populations de neurones présentant une similitude architectonique et fonctionnelle. L'amplitude et la fréquence de l'EEG ont des caractéristiques propres à chacun des états de vigilance de l'animal. L'EEG enregistré au laboratoire est différentiel unipolaire, c'est-à-dire qu'il provient de la différence de potentiel entre une électrode corticale et une électrode de référence placée au niveau du cervelet.

L'EMG permet de mesurer l'activité musculaire tonique et les événements phasiques (secousses). Les électrodes musculaires sont classiquement placées au niveau des muscles posturaux de la nuque.

### **1.2 Mise en œuvre**

Les rats sont implantés à l'aide d'électrodes EEG et EMG reliées à un micro-connecteur positionné sur la tête de l'animal. Ce micro-connecteur est relié au dispositif d'enregistrement par un câble. Un connecteur tournant, placé à l'autre extrémité du câble, permet au rat de se mouvoir, sans perturbation des signaux électriques (Figure 1). L'acquisition des données polysomnographiques est entièrement informatisée. Les signaux EEG et EMG sont amplifiés (Reega Minihuit Tr, Alvar Electronic, Montreuil, France), numérisés par un convertisseur CED 1401 (Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK) et enregistrés avec le logiciel Spike 2 (Cambridge Electronic Design). Les enregistrements sont soumis à une analyse visuelle semi-automatique et séquentielle du tracé (par plages d'analyse de 5 secondes) à l'aide d'un script développé au laboratoire sous Spike 2. L'hypnogramme représentant l'enchaînement des différents états de vigilance en fonction

du temps est construit en attribuant un des états de vigilance (éveil, SL et SP) à chaque plage d'analyse en fonction des critères décrits dans la première page de l'introduction et brièvement résumés ci-après.

L'éveil se caractérise par un EEG de faible amplitude et désynchronisé. Des activités de haute fréquence (40Hz) sont observées ainsi que des ondes thêta (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.

Lors du SL, l'EEG est de plus haut voltage et présente des oscillations très lentes (ondes delta : 0,5-4Hz et fuseaux : 10-14Hz). Il est dit « synchronisé ». L'activité musculaire est faible.

L'EEG observé pendant le SP est similaire à celui de l'éveil, désynchronisé, rapide et de faible amplitude. Il présente toutefois une périodicité plus marquée autour de 5-9Hz (rythme thêta généré par l'hippocampe). L'EMG montre l'absence de tonus musculaire (atonie).

L'analyse informatique de l'hypnogramme ainsi obtenu permet ensuite de calculer automatiquement la durée totale de chacun des 3 états de vigilance, leurs proportions relatives ainsi que le nombre et la durée moyenne des épisodes. Il permet également de sélectionner des épisodes des 3 états de vigilance sans artéfacts afin d'évaluer les différences dans les spectres de fréquence.

### **1.3 Protocole expérimental détaillé**

#### **1.3.1 Chirurgie**

Le protocole expérimental suivant a été approuvé par le comité d'éthique de l'Université Claude Bernard Lyon 1 (protocole BH2006-10). Les expériences ont été menées sur 36 rats mâles adultes (260-280 g environ) de souche Sprague Dawley (Charles River Laboratories, l'Arbresle, France).

A leur arrivée, les animaux pèsent entre 220 et 240 g et sont placés en groupe dans de grandes cages (les groupes formés par le fournisseur pour le transport sont conservés). Durant 4 jours, les animaux sont habitués aux nouvelles conditions d'hébergement et à l'expérimentateur (15min environ de manipulation par animal et par jour).

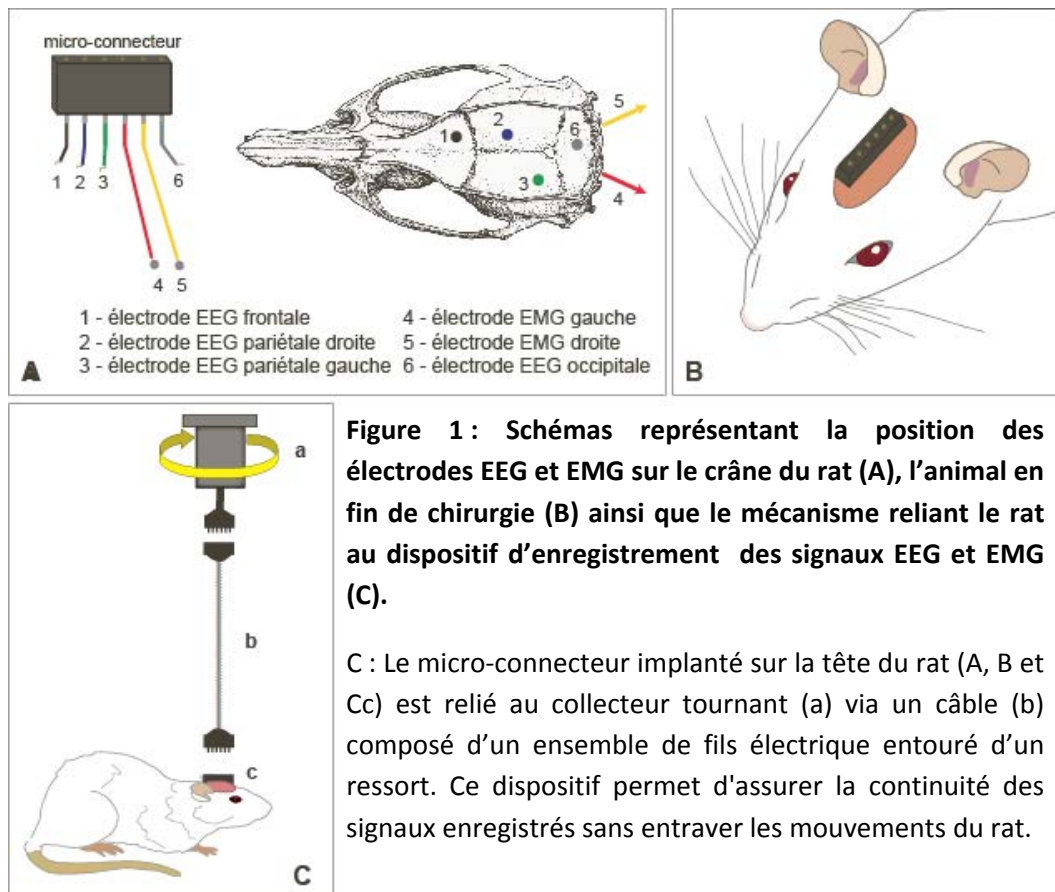
Lors de la chirurgie, l'animal est anesthésié par une injection intrapéritonéale de 1ml pour 100 g d'hydrate de chloral à 40 mg/ml initialement puis 1ml de cette solution toutes les heures environ (Acros Organics, Halluin, France). Une infiltration de xylocaïne (Xylovet, AstraZeneca, Monts, France) est réalisée sur la zone d'incision, son effet analgésique dure environ 2h. Une injection intramusculaire de Rimadyl (5-10 mg/kg, Pfizer, Paris, France) est également réalisée. Son effet analgésique dure 24h. Afin d'éviter les arrêts cardiorespiratoires et les accumulations de mucus bronchique et de salive, de l'Atropine (0,04 mg/kg, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), un antagoniste cholinergique muscarinique,

est injectée en intramusculaire. Tout au long de la chirurgie, la profondeur de l'anesthésie est surveillée en vérifiant l'abolition des réflexes pupillaires et du retrait au pincement de la patte.

L'animal est placé dans un appareil de contention stéréotaxique (David Kopf Instruments, CA, USA) : la tête est maintenue fixe à l'aide de barres d'oreilles et d'une pièce de maintien des incisives. Durant l'implantation, la température corporelle est maintenue à 37°C à l'aide d'une couverture chauffante et d'une sonde thermique rectale.

Le dessus du crâne de l'animal est rasé et nettoyé avec une solution iodée et de l'alcool à 70°. A ce stade, une application de pommade ophtalmique est effectuée pour prévenir le dessèchement des yeux. La peau du crâne est incisée sur toute la longueur du crâne à l'aide d'un scalpel, réclinée et maintenue sur les bords latéraux par des pinces hémostatiques. L'os du crâne est décapé à l'aide d'une rugine. Les électrodes d'EEG (1 électrode frontale, 2 pariétales et 1 occipitale) sont préalablement soudées à un micro-connecteur (Figure 1). Elles sont constituées de fils d'acier dénudés sur une longueur équivalente à l'épaisseur du crâne (Figure 1) et sont insérées dans de petits orifices percés dans le crâne de l'animal et solidarisées par de la résine dentaire (Super-Bond c&B, Sun Medical co. Ltd, Moriyama, Japon). Les deux électrodes d'EMG sont constituées d'un fil d'acier terminé par une boule d'étain (Figure 1). Elles sont glissées entre deux plans musculaires de part et d'autre de la nuque. L'ensemble est fixé au crâne du rat par du ciment dentaire (Paladur, Heraeus Kuzler, Wehrheim, Allemagne). Après une infiltration sous-cutanée de xylocaïne (analgésie), la plaie est suturée à l'avant et à l'arrière de la prothèse. Une solution iodée est appliquée sur le pourtour de la prothèse afin de désinfecter la plaie.





Au terme de l'implantation (d'une durée approximative d'1h30), l'animal porte une prothèse de faible masse (environ 2 grammes) (Figure 1).

### **1.3.2 Récupération post-opératoire**

Immédiatement après l'implantation, les animaux sont placés dans un baril en plexiglas translucide individuel (diamètre : 30 cm, hauteur : 40 cm) où ils ont libre accès à l'eau et à la nourriture. La récupération post-opératoire est rapide (moins de 48h). En règle générale les animaux se réveillent 1 h après la chirurgie et au bout de quelques heures, ils présentent des comportements normaux d'exploration, de toilette et de prise alimentaire.

Au terme de la récupération post-opératoire (5 jours), les animaux sont placés pendant 4 jours dans un caisson d'enregistrement afin de s'habituer aux conditions d'enregistrement. Le caisson d'enregistrement est ventilé, isolé phoniquement et électriquement. Il est éclairé selon un cycle de 12 heures (de 7h à 19h) et la température y est régulée ( $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), en phase avec les conditions de stabulation. Les animaux sont habitués au port du câble qui les relie au dispositif d'enregistrement. Ce câble relie le micro-connecteur implanté sur la tête de l'animal à un collecteur tournant, ce qui permet d'assurer la continuité des signaux enregistrés sans entraver les mouvements du rat (Figure 1). A l'issue de cette habitude, les enregistrements contrôlés débutent, pour une durée de 48h.

### **1.3.3 Enregistrement des états de vigilance**

A cet effet, le micro-connecteur implanté sur l'animal est relié au dispositif d'enregistrement par un câble électrique suspendu (Figure 1). Un connecteur tournant, placé à l'autre extrémité du câble, permet au rat de se mouvoir sans entrave tout en assurant l'acquisition des signaux électriques. La chaîne d'acquisition consiste d'abord à amplifier les signaux EEG et EMG (MCP+, Alpha Omega), à les numériser via un convertisseur CED 1401 (Fréquence d'échantillonnage : 500Hz ; Cambridge Electronic Design) pour les enregistrer en continu sur disque dur sous le logiciel *Spike2* (CED). Le MCP+, alpha oméga est un appareil qui permet d'enregistrer en parallèle 8 animaux. Les canaux EEG sont mesurés en unipolaire, c'est-à-dire par un différentiel de chaque électrodes EEG par rapport à l'électrode de référence au dessus du cervelet. Le signal EMG est calculé en mesurant le différentiel aux bornes de deux électrodes EMG (signaux bipolaires). Pour l'EEG, le meilleur signal entre 2 des 4 électrodes est sélectionné pour la durée de l'enregistrement (préférentiellement une dérivation pariéto-frontale). Les enregistrements EEG/EMG, filtrés et centrés (filtre à 50 Hz, composante continue supprimée), sont analysés *a posteriori* sous *Spike2* par une lecture séquentielle du tracé, en attribuant à chaque plage d'analyse de secondes l'un des trois états principaux de vigilance (éveil, SL et SP).

## **2. Privation et rebond de Sommeil Paradoxal par la technique de la piscine**

### **2.1 Principe**

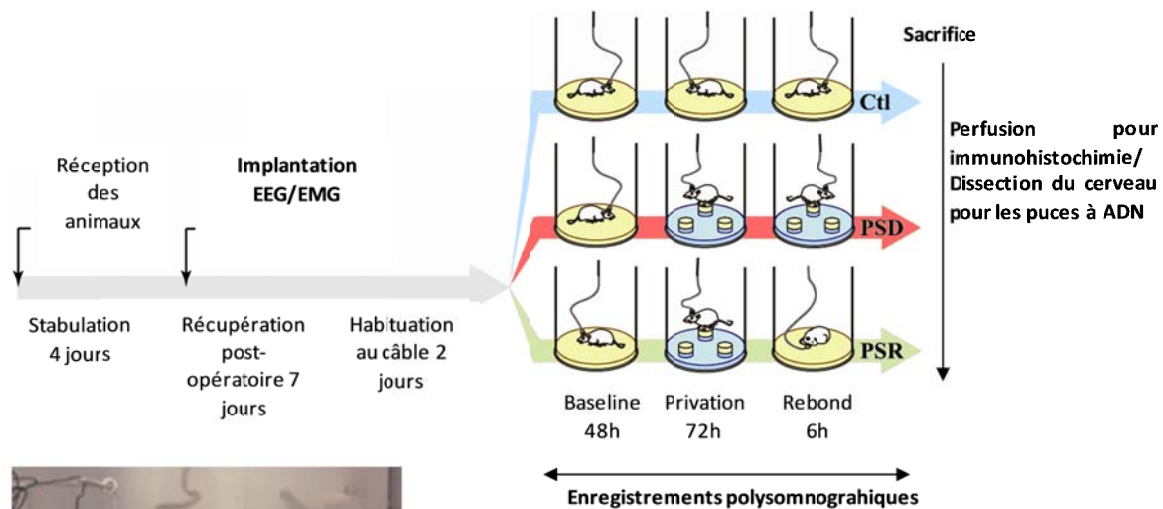
Les quantités quotidiennes assez faibles (environ 2 h/24 h) et très fractionnées (81 phases de SP/24 heures en moyenne) ainsi que la durée extrêmement courte des épisodes de SP (83 secondes en moyenne) chez le rat, ne permettent pas d'induire une expression du c-Fos et des autres protéines codant les IEGs spécifiques de cet état de vigilance et détectable par immunohistochimie. Ce problème est contourné par l'induction expérimentale d'hypersomnies de SP (Maloney *et al.*, 1999; 2000 ; Verret *et al.*, 2003a ; Verret *et al.*, 2005 ; Verret *et al.*, 2006). Le SP possède des propriétés homéostatiques induisant une phase de récupération après toute privation spécifique de SP, la dette est ainsi partiellement remboursée. Ce rebond de SP est proportionnel à la durée de la privation et se traduit principalement par une augmentation de la durée des phases de SP (Jouvet *et al.*, 1964). La méthode de privation la plus utilisée est celle de la piscine car elle est spécifique du SP et autorise les privations de plusieurs jours sans stress massif (Cohen et Dement, 1965 ; Mendelson *et al.*, 1974 ; D'Almeida *et al.*, 1997). C'est celle que nous avons utilisée lors de cette étude. Cette technique, également appelée « technique du pot de fleur » peut

être utilisée chez le chat (Jouvet *et al.*, 1964) comme chez le rat (Hicks *et al.*, 1977). Elle repose sur l'introduction de 3 plateformes entourées d'eau dans le milieu de vie de l'animal, la présence de ces 3 plateformes permet de limiter le stress lié à l'immobilisation normalement présent dans les protocoles qui incluent une seule plateforme. La taille de ces plateformes doit être adaptée à celle de l'animal pour lui permettre d'effectuer du SL mais pas de SP. En effet, l'atonie musculaire survenant lors du SP entraînerait la chute de l'animal dans l'eau. L'animal « apprend » de ce fait très rapidement à se réveiller avant l'entrée en SP.

## 2.2 Protocole expérimental détaillé

Le protocole expérimental suivant a été approuvé par le comité d'éthique de l'Université Claude Bernard Lyon 1 (protocole BH2006-09). Au terme de la période d'enregistrement en conditions basales, la phase privation-rebond de SP débute. Durant tout le protocole, les animaux disposent d'eau et de nourriture *ad libitum*.

Les rats du groupe témoin (n=4) restent dans des conditions d'hébergement standard (baril en plexiglas) durant tout le protocole. Les rats des groupes « privation » (n=4) et « rebond » (n=4) sont placés dans des barils en plexiglas dans lesquels trois plateformes de 6,5cm de diamètre a été ajoutée (Figure 2). De l'eau à température ambiante est versée dans les barils (2 cm de hauteur). Cette eau est changée tous les jours à heure fixe et les rats sont alors placés pendant une heure, sous surveillance, dans un baril en plexiglas contenant de la sciure, pour leur permettre de se dégourdir et se toiletter. Au terme de 72 h de privation, le groupe de rats « récupération de SP » est replacé dans un baril standard alors que la privation de SP continue pour les animaux du groupe privation (Figure 2). Après une phase d'exploration, de toilettage et de prise de nourriture d'environ 40 min, les rats en récupération de SP présentent une succession de phases de SP entrecoupées de micro-éveils et de courts épisodes de SL. Ce groupe de rats est euthanasié 6 heures après qu'ils aient été placés dans un baril standard, afin d'obtenir une expression optimale de la protéine c-Fos spécifique de cet état et des IEGs et autres gènes à expression plus tardives. Pour le protocole d'immunohistochimie, les rats témoins et privés sont alors sacrifiés à leur tour (Figure 2) et perfusés avec un liquide de fixation selon le protocole décrit en amont. Il est à noter que tous les animaux sont euthanasiés à la même heure (16h ± 30 min). Les cerveaux sont ensuite sectionnés en coupes frontales de 25 µm d'épaisseur. Les rats sacrifiés pour l'étude des puces à ADN sont décapités après anesthésie et la formation hippocampique et le néocortex sont disséqués.



irimental  
ocole de  
que de la

ement de  
on de SP  
ent une  
e un rat

### 2.3 Analyses statistiques

Afin de comparer les quantités des états de vigilance pour les 3 conditions expérimentales (groupe témoin, groupe privation et groupe rebond), les valeurs obtenues suite à la réalisation de l'hypnogramme sont soumises à une analyse statistique de type Kruskal-Wallis (test post-hoc : Mann-Whitney) à l'aide du logiciel StatView 5.

## 3. Protocole de nouvel environnement

Le protocole du nouvel environnement a été utilisé pour induire une période d'éveil continu pendant 3 heures dans le cadre de l'étude de la localisation des protéines codant pour FOS en immunohistochimie. Ce groupe de rat permet de comparer 2 états (l'éveil et le SP) présentant une forte activité thêta et d'évaluer les différences de distribution des neurones FOS+ corticaux. Les animaux éveils (EV) sont placés deux par deux pendant 3 heures (de 13h à 16h) dans un « open field » rectangulaire opaque noir (1.5 m x 1.5 m x 0.5 m) avec de nombreux jouets en plastique. L'intensité de la lumière au dessus de l'« open field » est la même que dans les caissons d'enregistrement. L'animal a aussi un accès libre à la nourriture et à la boisson. L'expérimentateur observe s'ils ne s'endorment pas et si c'est le cas les jouets sont déplacés.

## **4. Analyse du transcriptome par la modulation des quantités de sommeil paradoxal**

### **4.1 Protocole d'analyse des ARNm par la technique des puces à ADN Affymetrix**

#### **4.1.1 Préparation des échantillons, extraction des ARN totaux**

L'environnement et le matériel utilisés sont traités par la RNase away (Invitrogen). Au terme du protocole de privation-rebond de SP, les rats des trois groupes expérimentaux (PSC, PSD et PSR ; n=6 par groupe pour la première (n=18) et la deuxième expérience (n=18)) sont anesthésiés au pentobarbital monosodique (150mg/kg, ip) puis décapités. Après rapide extraction, le cerveau est prélevé et déposé sur un papier filtre imbibé de Ringer stérile froid afin d'être macrodisséqué. La partie du cerveau rostrale au chiasma optique (+1mm du Bregma) est éliminée, le néocortex droit est ensuite prélevé et les 2 hémisphères sont séparés sagittalement par dissection manuelle, puis l'hippocampe droit est récupéré dans sa totalité ; les plexus choroïdes enveloppant certaines parties de ces structures sont aussi enlevés. Toutes les structures sont pesées puis stockées à -80°C dans des tubes Eppendorf.

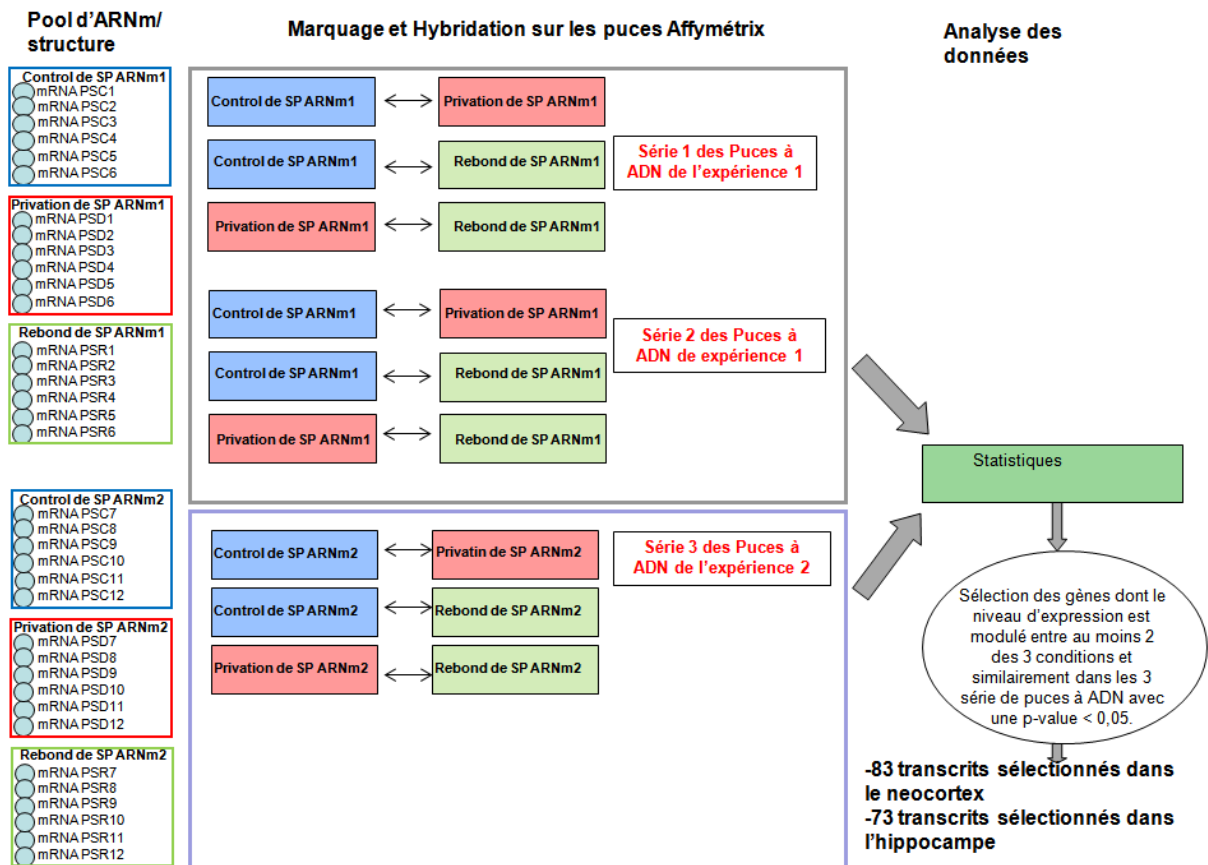
Les ARN totaux de l'hippocampe droit et du néocortex sont extraits avec le Kit RNeasy Lipid Tissue miniprep (Quiagen) et le RNase-free DNase set (Quiagen) pour éliminer la contamination de l'ADN suivant le protocole du fabricant. Brièvement, les tissus sont homogénéisés individuellement avec un broyeur IKA T8 (puissance 4 pendant 40 secs), les homogénats sont déposés sur des colonnes d'adsorption qui retiennent les ARNs (100 mg de tissu maximum). Deux lavages et un traitement à la Dnase sont ensuite effectués (Rnase Free Dnase Set, Quiagen) et les ARNs sont élués dans 50 µL d'eau Rnase Free (dépourvue de Rnase). Les concentrations finales en ARN sont déterminées spectrophotométriquement et un microdosage capillaire est effectué afin de déterminer la qualité et la quantité des ARNs totaux (Agilent 2100 bioanalyseur, plateau technique Neurobiotec, IFNL).

#### **4.1.2 Analyse des concentrations en corticostérone**

Après anesthésie létale juste avant la décapitation, le sang est ponctionné à l'aide d'une seringue directement dans le cœur des rats de la deuxième expérience (n=18) puis mis dans un tube contenant 100µl d'héparine. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 3000 tours par minute pendant 5 minutes à 4°C et le plasma surnageant est isolé et stocké à -80°C. Les échantillons sont analysés en aveugle par radioimmunoassay au Centre de Médecine Nucléaire (HCL, Lyon) dirigé par Pr. Bruno Claustrat.

#### **4.1.3 Quantification des ARNm par les puces à ADN**

Nos échantillons d'extraits d'ARNs totaux ont été traités sur la plateforme Affymetrix de Strasbourg (IGBMC, Dr Kastner). Les puces à ADN utilisées sont des Gene Chip Rat Genome 230. 2.0 Array (Affymetrix) qui permettent l'analyse d'environ 30 000 transcrits chez le rat.



**Figure 3 : Schéma présentant le design de l'étude des puces à ADN :** Cette étude comporte 2 expériences comprenant 18 animaux chacune dont les ARNm du néocortex et de l'hippocampe ont été extraits puis poolés pour 6 animaux par groupe et par structure. Les pools de l'expérience 1 ont été hybridés sur 2 séries de puces (n=12) alors que les pools de l'expérience 2 ont été hybridés sur 1 série de puces (n=6). Le niveau d'hybridation aux sondes des 31099 gènes est ensuite comparé entre les 3 conditions expérimentales d'une même structure et d'une même série de puces et les gènes sélectionnés sont ceux dont l'expression varie significativement avec une p-value < 0,05 entre au moins 2 des 3 conditions expérimentales. Les gènes sont sélectionnés lorsque les profils d'expression d'un gène sont similaires entre les dupliquas expérimentaux et techniques.

Une quantité égale d'ARN totaux du néocortex et de l'hippocampe droit de 6 animaux par groupe a été poolée (36µg/pool). Chacun des 6 pools obtenus de l'expérience 1 a été hybridé sur 2 puces à ADN afin d'obtenir un dupliqua technique de l'hybridation. Chacun des 6 pools d'ARN totaux des rats de la deuxième expérience ont été hybridés sur 1 puce à ADN afin d'obtenir un dupliqua expérimental. Ainsi, le projet a nécessité l'utilisation de 18 puces à ADN (Fig. 3).

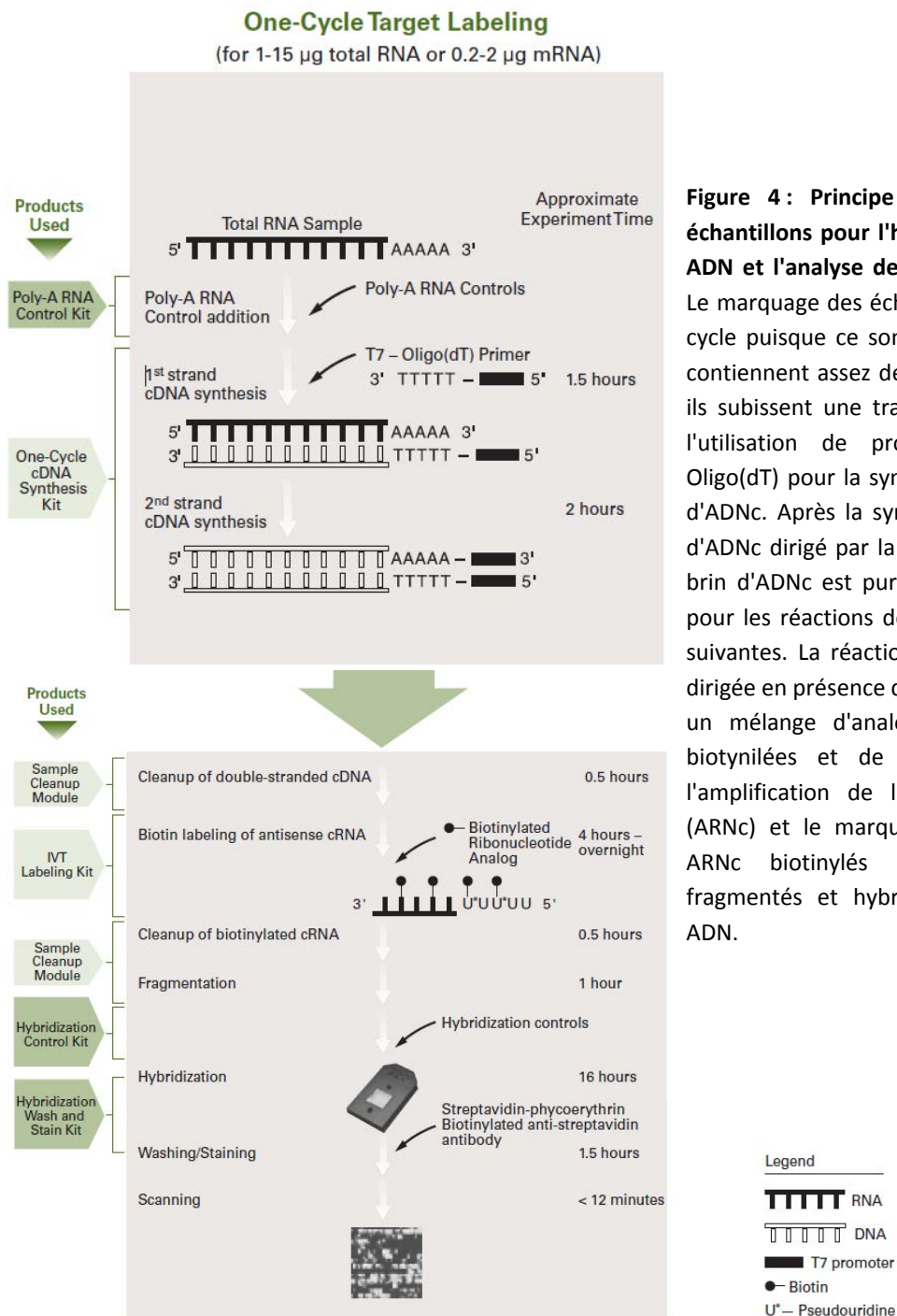
Les étapes suivantes visant à préparer les échantillons ne sont pas effectuées par nos soins (Expression 10 Analysis Technical Manual, ref701021 rev.5, Affymetrix) et sont décrites dans la figure 4 ; les ARN totaux (3µg d'ARN total prélevé par pool) subissent une première étape de transcription inverse afin d'obtenir l'ADNc, après ajout d'oligo(dt) couplés au promoteur T7 de l'ARN (Figure 4). Grâce à ce promoteur puissant, une transcription in vitro de l'ADNc en ARNc biotinylé est possible en présence de dCTP et de dUTP couplés à la biotine et de T7 polymérase. L'ARNc biotinylé (10µg d'ARNc) est fragmenté puis hybridé à la

puce « GeneChip rat 230 2.0 » pendant 16h à 45°C. Ensuite, après lavage et marquage dans la « GeneChip Fluidics Station 450 » par le couple streptavidine-phycoérythrine qui permet la révélation par ajout d'anticorps anti-streptavidine couplés à la biotine. La puce est scannée par un appareil « GeneChip Scanner 3000 » utilisant une longueur d'onde de 488 nm. Les images obtenues sont analysées avec le logiciel « Affymetrix GenChip Operating software (GCOS) version 1.2 » en utilisant des paramètres d'analyse par défaut et une mise à l'échelle globale comme méthode de normalisation. L'intensité cible de la moyenne tronquée de chaque puce a été fixée arbitrairement à 100.

Le service commun de l'IGBMC nous a fourni des fichiers Excel contenant les données brutes résultant de nos expériences. Il serait trop long de détailler les analyses que nous avons réalisées à partir de ces fichiers. Nous avons donc choisi de ne présenter que les critères principaux utilisés pour sélectionner les gènes et les EST modifiés par notre protocole. La première mesure importante fournie par Affymetrix est une valeur quantitative (appelée signal) reflétant le niveau d'hybridation spécifique de nos ARNc aux sondes des 31099 gènes ou EST représentés sur la puce Affymetrix. Le fichier contient également pour chaque transcrit une valeur statistique issue d'un algorithme de détection développé par Affymetrix permettant de déterminer si les ARNm correspondants sont présents ou absents dans les échantillons.

En utilisant ce critère, nous avons dans un premier temps éliminé de notre analyse les gènes et EST absents dans nos échantillons. Nous avons ensuite utilisé une analyse de comparaison d'expression entre deux puces à ADN. Dans cette analyse, deux échantillons (par exemple PSC *versus* PSD pour une même structure cérébrale) hybridés sur deux puces à ADN sont comparés pour détecter et quantifier les changements d'expression génique. Une puce est définie comme le niveau de base et l'autre comme l'expérience. L'analyse compare les niveaux d'hybridation, sonde par sonde pour les deux puces. Deux types d'algorithmes différents sont utilisés pour déterminer 1) s'il y a une modification du niveau d'expression du gène ou de l'EST et 2) une estimation quantitative de ce changement (log ratio). Un gène ou un EST est sélectionné quand les comparaisons entre chaque condition d'une série de puces à ADN indiquent que son niveau d'expression est modifié entre au moins 2 des 3 conditions expérimentales. Ce résultat doit être reproduit, le profil d'expression d'un gène doit être similaire entre les 3 séries de puces à ADN (les dupliquas techniques et le dupliqua expérimental).





**Figure 4 : Principe de préparation des échantillons pour l'hybridation sur puce à ADN et l'analyse de l'expression génique.** Le marquage des échantillons se fait en un cycle puisque ce sont des échantillons qui contiennent assez de quantité d'ARN total, ils subissent une transcription inverse par l'utilisation de promoteur primer T7-Oligo(dT) pour la synthèse du premier brin d'ADNc. Après la synthèse du second brin d'ADNc dirigé par la RNase H. Le double brin d'ADNc est purifié et sert de modèle pour les réactions de transcription in vitro suivantes. La réaction de transcription est dirigée en présence d'ARN t7 polymérase et un mélange d'analogues aux nucléotides biotinylés et de ribonucléotides pour l'amplification de l'ARN complémentaire (ARNc) et le marquage à la biotine. Les ARNc biotinylés sont ensuite lavés, fragmentés et hybridés sur les puces à ADN.

Afin de simplifier nos résultats, nous avons choisi de regrouper les différents profils d'expression des gènes en 4 groupes, ceux dont le niveau d'expression augmente (I-PSD) ou diminue (D-PSD) pendant la privation de SP en comparaison du groupe PSC ; ceux dont le niveau d'expression augmente (I-PSR) ou diminue (D-PSR) pendant la récupération de SP en comparaison des groupes PSD et PSC lorsque qu'aucune modulation significative de leur niveau d'expression n'a été observée entre les groupes PSD et PSC.

## **4.2 Vérification des résultats des puces par la technique de PCR en temps réel**

La quantification relative des ARNm des échantillons déposés sur les puces Affymetrix (pool des ARNm des PSC, PSD et PSR), ainsi que des ARNm de chacun des six rats constituant chaque pool a été réalisée pour un nombre total de 10 gènes Q-PCR (par la technique de réaction de polymérisation en chaîne)(Light Cycler de Roche, plateau technique Neurobiotec, IFNL). Les gènes sont *Zif-268*, *c-Fos*, *Homer1a*, *Arc*, *BDNF*, *MBP*, *Mobp*, *Cox2*, *Sgk* et *TSH*. Chaque échantillon est soumis à une transcription inverse (RT-PCR) à partir d'1 µg de tissu au moyen d'un Light Cycler (Light Cycler Faststart DNA master SYBR Green1 kit, Roche). Le niveau d'expression de chaque gène a été normalisé par rapport au gène de ménage, la *beta-actin*. La PCR en temps réel consiste à mesurer l'intensité de la fluorescence émise par le CYBRgreen intercalé à chaque cycle entre les doubles brins d'ADNc. Les données illustrées ont été quantifiées au moyen du logiciel *RealQuant* par rapport à l'expression d'un gène de ménage ( $\beta$ -Actine), puis les valeurs des niveaux d'expression des gènes sont exprimées en valeur relative par rapport à la moyenne des rats CSP.

### **4.2.1 Transcription inverse des ARNm**

Une étape préliminaire de transcription inverse (RT) est nécessaire pour l'obtention de l'ADN complémentaire des ARNm extraits dans les échantillons. Elle concerne les 6 échantillons individuels et le pool de chaque groupe de l'expérience 1 ou 2. Donc 7 transcriptions inverses par groupe expérimental (PSC, PSD et PSR) ont été réalisées.

La RT est réalisée avec 2 mélanges :

- Mélange 1 : 1 µg d'ARN total, 1 µL d'oligo dT16 (0,5 µg/µL), 1 µL de dNTPmix (10mM de chaque dNTP), de l'H<sub>2</sub>O PCRgrade qsp 12 µL.

Les tubes sont incubés à 65°C pendant 5 min, ils sont ensuite refroidis dans de la glace pendant 5 min.

- Mélange 2: 4 µL de Tampon M-MLV, 2 µL de DTT 0.1M, 1 µL de RNase out 40 U/µL et 1 µL de M-MLV Reverse Transcriptase 200 U/µL.

Un volume de 8 µL du mélange 2 est ajouté au mélange 1. Les tubes sont immédiatement incubés à 37°C pendant 50 min. La réaction est arrêtée par incubation à 70°C pendant 15 min.

### **4.2.2 PCR en temps réel (Q-PCR)**

#### **4.2.2.1 Choix des amorces**

La séquence des ARNm des gènes choisis est obtenue par internet dans le site officiel [www.affimetrix.com](http://www.affimetrix.com), pour être sûre qu'elles correspondent bien aux séquences reconnues par les puces à ADN utilisées. Cette séquence est convertie en format FASTA afin d'être introduite dans le site de PRIMER3. A partir des amorces proposées, un ajustement est

nécessaire pour obtenir des amorces optimales pour la PCR en temps réel suivant ces critères : elles doivent être composées d'une vingtaine de paires de bases avec un rapport de GC/AT de 1/2 avec un minimum de 2 bases pyrimidiques dans l'extrémité 5' de l'amorce. La taille de l'amplicon doit comporter entre 100 et 200 pb.

Annealing gene	Primer sequence
<i>βAct</i>	F : GCATTGCTGACAGGATGCAG R : CATCGTACTCCTGCTTGCTG
<i>Zif-268</i>	F : ACAGTGGCAACACTTTGTGG R : ATGTCAGTGTTGGGAGTAGG
<i>Nptx2</i>	F : GCGTCTCCTGGACTTGTAGC R : CAGGAAGTGGCTCAGGACTC
<i>Fos</i>	F : TTGTAGTGACACCTGAGAGC R : TCCAGCACAGGTTAATTCC
<i>Sqk</i>	F : AGTGAGAAGGAAGATGCAGG R : CTGCACACATGGGAAATACG
<i>Cox2</i>	F : CCACTTCCAACCTCAAGTTCG R : GTTTGAAAGTGTACTCCTGG
<i>Scq2</i>	F : AGAGCAGGGAAGGGAACATC R : AGAGAAAGGGAGGGGATTCA
<i>Gpd1</i>	F : AGAGCAGGGAAGGGAACATC R : AGAGAAAGGGAGGGGATTCA
<i>Sult1a1</i>	F : TACACAACCATCCCCACTGA R : GTTTGCCTTGGTTCCCAGTA
<i>Pcdh8</i>	F : AAGGGCCATTCAATCAACAC R : TGGCCTAGGATCTTGCACTC
<i>Mt1a</i>	F : CCCACTGCTCCTGCTCCAC R : GTCACTTCAGGCACAGCAGC
<i>Bdnf</i>	F : GTGACAGTATTAGCGAGTGG R : TTCCTTCGTGTAACCCATGG
<i>Arc</i>	F : TCCTGCAGATTGGTAAGTGC R : CTTGATGGACTTCTCCAGC
<i>Homer1</i>	F : ACCTATCTTCAGCACTCGAG R : GCCGTCTACACTGATTATCC
<i>Nr4a3</i>	F : TGTCACTTCCCACGCAGTTA R : GTCTTAGCAAAAACGGCCAAA
<i>Sncq</i>	F : GTCAGCAGCGTCAACACAGT R : CAGAGAGGTGTCCCTTGAGC
<i>Sc5d</i>	F : GCAGCAATGAATGGATAATGC R : GAGAGGAGATGGGAGATGAGG

**Tableau 1 : Amorces utilisées pour les PCRq**

#### 4.2.2.2 PCR quantitative en temps réel

La Q-PCR est réalisée avec le kit Roche (Light Cycler Faststart DNA Master SYBR Green 1, Roche Diagnostic). Chaque réaction contient les amorces spécifiques sens et anti-sens encadrant la séquence d'ARN choisie (concentration finale 0.4 μM) qui sont mélangées à 1,5 μL du mélange enzymatique du kit. L'utilisation de ce mélange implique la mise au point préalable d'une concentration optimale de MgCl<sub>2</sub>, spécifique de chaque paire d'amorce. Le volume ajouté de MgCl<sub>2</sub> est fonction de cette mise au point, la concentration finale fluctuant entre 3mM et 5 mM. Enfin, de l'H<sub>2</sub>O est ajoutée pour ajuster le volume final à 20 μL. Ce mélange est préparé pour l'ensemble des réactions contenues dans un run (32 capillaires de réaction maximum). Les échantillons sont ensuite répartis dans les capillaires

(5 µL d'ADNc produits par la transcription inverse). Le thermocycler Light Cycler est programmé selon le protocole suivant :

- Dénaturation 10 min à 94 °C.
- Amplification: 45 cycles alternant entre 94°C pendant 15 secondes et des pas de 5 secondes entre 68°C et 60°C.
- Courbe de fusion: augmentation jusqu'à 95°C, suivie d'une diminution à 68°C maintenue pendant 30 sec et une augmentation progressive à raison de 0,1 °C/seconde jusqu'à 98°C.

Une courbe d'efficacité sur une série de dilutions (1:5, 1:25, 1:50, 1:500, 1:2500 et 1:5000) est réalisée pour chaque paire d'amorces, avec un mélange d'un ADN calibrateur des deux structures.

Puisqu'il s'agit d'une confirmation, chaque PCR est réalisé une seule fois, uniquement dans le tissu où les puces ont montré un changement d'expression significatif.

### **4.3 Analyse statistiques**

Afin de comparer les niveaux d'expression des gènes et les niveaux de concentration en corticostéroïdes pour les 3 conditions expérimentales (groupe témoin, groupe privation et groupe rebond), les valeurs obtenues sont soumises à une analyse statistique de type Kruskal-Wallis (test post-hoc : Mann-Whitney). Le test de Spearman a été utilisé pour identifier des corrélations significatives entre les quantités des états de vigilance, les niveaux d'expression des gènes et les concentrations en corticostéroïdes. Ces analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel StatView 5.

## **5. Ejection de traceur dans le gyrus dentelé, le cortex rétrosplénial et cingulé antérieur, supramammillaire et le claustrum**

### **5.1 Principe des traceurs rétrogrades et antérogrades**

Le traçage rétrograde permet de visualiser les corps cellulaires des neurones envoyant des projections axonales vers la région cérébrale où le traceur a été injecté. Il repose sur la capacité des neurones à capter certaines molécules par leurs terminaisons axonales, puis à les transporter rétrogradement jusqu'à leur corps cellulaire, où elles s'accumulent. Ce transport rétrograde est assuré par une protéine motrice, la Dynéine, qui fixe la molécule à transporter (ici le traceur) et se déplace le long des microtubules axonaux en utilisant l'ATP. La Dynéine est une ATPase capable de transformer l'énergie chimique de l'ATP en énergie mécanique.

Le traçage rétrograde repose sur la capacité des neurones à capter par leurs terminaisons certaines molécules, puis à les transporter rétrogradement jusqu'à leur corps

cellulaire où elles s'accumulent (voir (Luppi *et al.*, 1990) pour revue). 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 être injecté avec des sites d'injection de taille restreinte sans pour autant avoir de perte de traçage et également sans lésion du tissu.

Pour nos études neuroanatomiques, nous avons choisi d'utiliser la sous-unité B de la toxine cholérique, ou CTb. En effet, ce traceur est très utilisé au laboratoire, dont les techniques d'éjection et des révélations 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. De plus, afin d'optimiser le nombre de rats utilisés dans nos études nous avons également utilisé le Fluorogold, traceur s'éjectant facilement par iontophorèse et ayant la particularité d'être naturellement fluorescent. Ainsi un même rat peut être éjecté avec ces 2 traceurs dans 2 régions différentes.

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 de vésicules. Ainsi, un transport axonal rapide peut atteindre une vitesse d'environ 2cm/jour (voir (Kobbert *et al.*, 2000) pour revue). Après un temps de survie nécessaire à ce transport, la présence du traceur est révélée par immunohistochimie. La plupart des traceurs rétrogrades sont aussi antérogrades. Nous considérons le traçage effectif après 10 jours de survie. Les rats peuvent donc être sacrifiés pour une révélation immuno-histochimique ultérieure.

## **5.2 La sous-unité B de la toxine cholérique**

La CTb est une protéine de 11.5 KDa qui se fixe spécifiquement sur des 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 du traceur est captée au niveau du site. Une fois fixée, la CTb est internalisée dans les vésicules, puis transportée rétrogradement et antérogradement à l'intérieur du neurone afférent (Stoekel *et al.*, 1977 ; Trojanowski, 1983).

La CTb est un traceur non trans-synaptique dont la grande sensibilité comme traceur rétrograde a été démontrée à maintes reprises, mettant dans de nombreux cas en évidence des afférences nouvelles pour des structures déjà étudiées (Luppi *et al.*, 1995). Notre laboratoire a d'ailleurs publié plusieurs articles avec cette technique que nous utilisons pour nos études neuroanatomiques.

La CTb présente également l'avantage de ne pas être captée par les fibres de passage non lésées. Enfin, la CTb présente également l'avantage de pouvoir être éjectée par iontophorèse à l'aide d'une pipette de verre très fine. Ceci permet l'obtention de sites de petite taille en comparaison avec une injection par pression. Enfin, l'utilisation de pipettes de verre et de la technique d'iontophorèse permet de limiter au maximum la lésion chimique ou mécanique au niveau des sites d'injection.

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 protéine nucléaire comme le Fos (Morales *et al.*, 1999).

La CTb a été préparée selon le protocole suivant :

La CTb (CTb ; List Biological Lab.) lyophilisée (500µg) est reconstituée dans 100µL de tampon phosphate (PB) 0,1M ph 6. Cette préparation donne une solution où la CTb à 0,5% est chargée positivement, pouvant ainsi être injectée par iontophorèse.

### **5.3 Le Fluorogold**

Le Fluorogold (FG) a été introduit par Schmued et Fallon en 1986 (Schmued et Fallon, 1986). Ce traceur rétrograde, directement fluorescent, n'est pas trans-synaptique et n'est pas capté par les fibres de passages. A l'instar de la CTb, il est possible d'éjecter le FG par iontophorèse, et ainsi d'obtenir des sites restreints. De plus, il a été montré qu'après une période de survie de 15 jours, des neurones rétrogradement marqués étaient visibles dans l'ensemble du névraxe (Schmued et Fallon, 1986). Enfin, il est également possible de coupler le marquage obtenu avec le fluorogold avec l'immunohistochimie de différents neurotransmetteurs et de protéines nucléaires.

Le Fluorogold a été préparé selon le protocole suivant :

Le Fg (FG ;Fluoprobe) lyophilisé est reconstitué dans de l'eau distillée à 8mmol/L et pH6. Cette préparation donne une solution où le Fg est chargé positivement, pouvant ainsi être injecté par iontophorèse.

### **5.4 La Iontophorèse**

La technique de iontophorèse consiste à faire passer un courant électrique constant de l'ordre de quelques dizaines de nano-ampères à travers les canaux d'une micro-pipette de verre contenant des substances ionisées (Bloom, 1974 ; Stone, 1985). La quantité de charges alors éjectée de la micro-pipette obéit à la loi de Faraday :  $Q=n*(I*t)/(Z*F)$

Q correspond à la quantité de charges 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. 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 éjectée ne peut être connue exactement. Selon la loi énoncée précédemment, elle est néanmoins proportionnelle à l'intensité et à la durée d'éjection :  $Q=n \cdot I \cdot t$

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.

### **5.5 Ejection de traceur : protocole expérimental détaillé**

Le protocole expérimental suivant a été approuvé par le comité d'éthique de l'Université Claude Bernard Lyon 1 (protocole BH 2007-19). Les expériences ont été menées sur des rats mâles adultes (280g environ) de souche Sprague Dawley (Charles River, France).

A leur arrivée, les animaux pèsent entre 240 et 260 g et sont placés en groupe dans des cages (les groupes formés par le fournisseur pour le transport sont conservés). Durant 4 jours, les animaux sont habitués aux nouvelles conditions d'hébergement et à l'expérimentateur (15min environ de manipulation par animal et par jour). L'animal est anesthésié et est placé dans l'appareil de contention stéréotaxique selon le protocole décrit précédemment.

Le dessus du crâne de l'animal est rasé et nettoyé avec une solution iodée et de l'alcool à 70°. A ce stade, une application de pommade ophtalmique est effectuée pour prévenir le dessèchement des yeux. La peau du crâne est incisée longitudinalement au scalpel, réclinée et maintenue sur les bords latéraux à l'aide de pinces hémostatiques. Une trépanation d'environ 3mm de diamètre est réalisée grâce à une fraise dentaire au niveau des coordonnées théoriques de la structure cible provenant de l'Atlas The Rat Brain (Paxinos et Watson, 1997). Après une application locale de xylocaïne, la dure-mère (membrane qui recouvre le cerveau) est réséquée à l'endroit de la trépanation. Une fois la dure-mère retirée, la micropipette, un tube capillaire (1,5mm O.D. ; Clock Electromedical Instrument, UK) en verre étiré dont la pointe est cassée à un diamètre externe de 5  $\mu$ m, rempli d'une des solutions de traceur par capillarité est introduit dans le cerveau et positionnée par un micro-descendeur jusqu'à la zone cible (coordonnées stéréotaxiques et paramètres d'éjection dans le Tableau 2). Après 5 minutes d'attente afin que la pipette soit bien positionnée, celle-ci est connectée à un générateur de courant (Bionic Instrument) à l'aide d'un fil d'argent immergé dans la solution de traceur. Une électrode de référence est placée sous la nuque de l'animal.

	Gyrus dentelé	Cortex Rétrosplénial	Cortex Cingulaire antérieur	Supramamillaire	Clastrum	Cortex Visuel primaire
<b>Coordonnées</b>						
Antéropostérieures**	-3,3mm	-7mm	+1mm	-4,5mm	+1,7mm	-6mm
Médiolatérales**	-0,8mm	+1mm	-0,8mm	+0,6mm	-4mm	+4mm
Dorsoventrales***	-3,5mm	-1,4mm	-2,2mm	-8,3mm	-5mm	-1,4mm
<b>Paramètres d'éjection</b>						
Traceur	CTb	CTb	FG	CTb	FG	FG
Durée d'éjection	15 min	10 min	10 min	10 min	10 min	10 min
Nature du courant	+2 $\mu$ A alternati f *	+4 $\mu$ A continu	+4 $\mu$ A continu	+3 $\mu$ A continu	+3 $\mu$ A continu	+5 $\mu$ A continu
<b>Nb de site correct</b>	N=4	N=4	N=4	N=4	N=2	N=2

**Tableau 2 : Paramètres des éjections de traceurs.**

\*crénaux de courant positifs et alternatifs (7sec on/7sec off)

\*\* coordonnées par rapport au Bregma

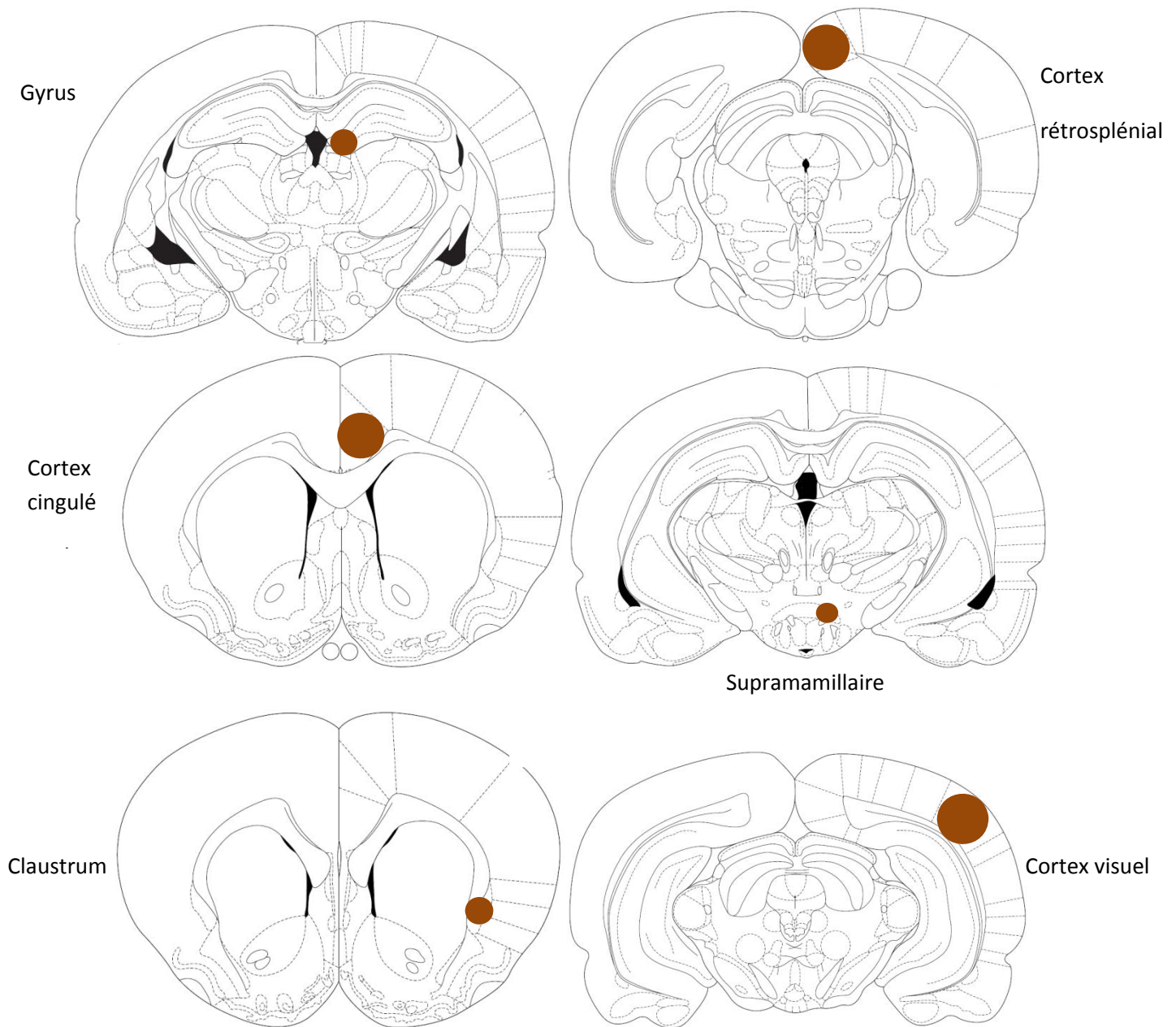
\*\*\*coordonnées par rapport à la surface du cerveau

Les paramètres d'éjection sont décrits dans le tableau 2. Afin de prévenir une remontée du liquide le long de la descente de la pipette, la micropipette est retirée du cerveau 10 min après éjection, puis les électrodes pour l'EEG et l'EMG sont implantées comme décrit précédemment. Une éponge hémostatique est alors positionnée à l'endroit de la trépanation. Enfin, la plaie est suturée après une infiltration sous-cutanée de xylocaïne. En fin de chirurgie, la plaie est désinfectée à l'aide d'une solution iodée.

Tout signe d'infection ou de douleur est surveillé au cours des jours suivants. Les animaux sont observés et pesés quotidiennement. Immédiatement après la chirurgie, les animaux sont placés dans un baril en plexiglas translucide individuel (diamètre : 30 cm, hauteur : 40 cm) où ils ont libre accès à l'eau et à la nourriture. Par rapport aux cages standards, la hauteur des barils évite à l'animal de se blesser au niveau de la plaie. La présence de la plaie impose une séparation de l'animal de ses congénères. Mais cet isolement est partiel puisque les animaux se trouvent dans la même pièce et les barils sont ouverts sur le dessus ; les communications vocale et olfactive sont donc conservées. La récupération post-opératoire est rapide (moins de 48 h). En règle générale les animaux se réveillent 1 à 2h après la chirurgie et au bout de 24 h, ils présentent des comportements normaux d'exploration, de toilettage et de prise alimentaire. Les animaux sont sacrifiés 15



jours après la chirurgie et perfusés avec un liquide de fixation selon le protocole décrit ci-dessous. Les cerveaux sont ensuite sectionnés en coupes frontales de 25  $\mu\text{m}$  d'épaisseur.



**Figure 5 : Cartographie présentant la localisation et la taille théorique des sites d'éjection.**

## **6. Lésion des noyaux supramamillaires par éjection iontophorétique d'acide iboténique**

### **6.1 Principe de la lésion**

Notre objectif est d'identifier les réseaux neuronaux impliqués dans l'activation corticale pendant le SP. Pour cela, nous utilisons la technique de lésion de structure cérébrale couplée à l'enregistrement des états de vigilance et à la technique de privation-rebond. Il s'agit d'une méthode de neuroanatomie utilisant une molécule neurotoxique (acide iboténique, acide kainique, 6-hydroxydopamine...), cette molécule est souvent spécifique d'un type de neurone et doit donc être choisie en fonction de la nature des neurones présents dans la région à léser. Nous utilisons notamment l'acide iboténique, un agoniste NMDA non sélectif (MacDonald et Nistri, 1977) qui après avoir été captée par les neurones locaux, entraîne des lésions excitotoxiques. L'éjection de cette molécule dans une région cérébrale d'intérêt (site d'éjection) via une micropipette par iontophorèse permet de léser la région de façon précise et reproductible en minimisant la lésion des régions voisines (Schmidt *et al.*, 2000) ; contrairement aux lésions électriques ou les techniques d'aspiration, les neurotoxines ne lèsent normalement ni les fibres de passage, ni les cellules voisines aux neurones telles que les astrocytes.

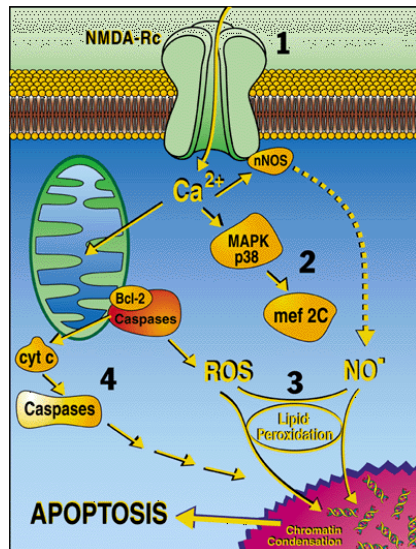
Suivant le rôle de la région lésée dans le cycle veille-sommeil, les quantités de chaque état de vigilance et leur architecture peuvent être comparées précisément pour chacun des rats après lésion avec des rats contrôles qui ont subi une injection de NaCl (rats Shams). De plus l'effet de l'hypersomnie de SP sur l'expression des marqueurs indirects de plasticité et d'activité peut aussi être comparé chez ces rats lésés ou non par immunohistochimie. Cette approche permet de déterminer si les structures activées pendant les différents états de vigilance dépendent de l'activation de la région d'intérêt ceci en comparant l'expression de Fos chez les animaux lésés et nos témoins. Dans notre étude nous avons utilisé 4 rats pour lesquels le supramamillaire est lésé bilatéralement, et 4 rats Shams qui ont subi une éjection de NaCl .

### **6.2 L'acide iboténique**

L'acide iboténique après injection dans le Sum détruit le Sum et les neurones adjacents (Pan et McNaughton, 2002; 2004). L'acide iboténique ( $\alpha$ -Amino-(3-hydroxy-5-isoxazolyl) acetic acid PM = 158.11g/mol, *Tocris*) est un composé organique qui est présent naturellement dans les champignons. C'est un puissant excitotoxique spécifique des neurones via son action sur les récepteurs NMDA (Fig. 6), le Ca<sup>2+</sup> entre en masse dans la cellule et déclenche les cascades moléculaires de l'apoptose.

L'acide iboténique a été préparé selon le protocole suivant :

5mg d'acide iboténique (Tocris) est dilué dans 1,25 ml d'eau distillée ajusté à pH8 avec 35µl de NaOH à 1N pour obtenir une concentration finale de 25mmol/L.



**Figure 6 : Illustration schématique des voies de signalisation de l'apoptose neuronale.** Les neurotoxines agonistes NMDA tel que l'acide iboténique agissent en se liant aux récepteurs NMDA (1), et en entraînant une entrée de Ca<sup>2+</sup> très importante, qui active la voie de la p38 mitogen activated kinase (MAPK)-MEF2C (facteur de transcription) (2), entraîne des réactions toxiques, des radicaux libres tel que le NO<sup>-</sup> et les espèces de réactifs oxygénés (ROS) (3) et active les enzymes inductibles de l'apoptose incluant les caspases (4).

### 6.3 Protocole de lésion des noyaux supramamillaire

Le protocole de la lésion à l'acide iboténique (Tocris, bioscience) est très proche de celui de l'éjection de traceur. Brièvement, les animaux sont anesthésiés et placés dans l'appareil de contention stéréotaxique comme décrit précédemment. Durant la chirurgie, la température corporelle est maintenue à 37-38°C grâce à une couverture chauffante et une sonde thermique rectale. Une trépanation d'environ 2mm de diamètre est réalisée grâce à une fraise dentaire au niveau du puits d'accès. La position de la zone à injecter est déterminée par des coordonnées théoriques provenant de l'Atlas Swanson. Nous effectuons une lésion bilatérale des noyaux supramamillaires aux coordonnées à -4,5mm du Bregma en antéropostérieur, + et - 0,8mm du Bregma en médiolatéral. La dure-mère est ainsi mise à nue. Celle-ci est réséquée à l'endroit de la trépanation (résection de dure-mère). Cette membrane étant innervée, une application de Xylocaïne est alors préalablement effectuée. Une fois la dure-mère retirée, la micropipette contenant le neurotoxique est introduite dans le cerveau et positionnée par un micro-descendeur jusqu'à la zone cible à -8,3mm de la surface du cerveau pour les 2 sites d'injection. Après une attente de 5 minutes, le neurotoxique est éjecté par microiontophorèse pendant 10 min via un courant continu de -10µA pour les 2 sites. Après l'injection du neurotoxique, la micropipette est retirée du cerveau. Une éponge hémostatique imbibée d'antibiotique (Néomycine, Sigma) est alors positionnée à l'endroit de la trépanation. Le puits d'accès est comblé à l'aide de ciment dentaire. Les rats sont implantés pour l'enregistrement de l'EEG comme indiqué par le protocole.

### Suivi clinique post-lésionnel :

Tous les animaux lésés font l'objet d'une surveillance quotidienne (plusieurs fois par jour jusqu'au sacrifice de l'animal) de leur état général. Les paramètres suivants sont observés : allure générale, mobilité, aspect du pelage, toilettage, comportement exploratoire, prise de poids, d'eau et de nourriture et leur température. La douleur et/ou le stress pouvant être induit(s) par la lésion dépend de la fonction de la région lésée. Aussi, le site d'éjection du neurotoxique ne doit pas être impliqué dans une fonction vitale (respiration, prise de nourriture et de boisson...). Pour notre étude, le supramamillaire n'est pas une région impliquée dans une fonction vitale. Il existe plusieurs études sur le rôle du Sum dans l'apprentissage qui ont utilisé la technique de lésion sans qu'il n'y ait de conséquences néfastes du point de vue du bien-être de l'animal. D'après notre étude, nous avons observé un effet de la lésion pendant les deux heures suivant l'éjection du neurotoxique, le tonus musculaire de l'animal est augmenté et les rats mettent beaucoup plus de temps à se réveiller de l'anesthésie. En revanche, après 24h leur comportement post opératoire est similaire aux rats shams et mis à part un effet sur la locomotion (les rats sont légèrement plus actifs), aucun effet de la lésion n'a été observé.

## **6.4 Analyse des caractéristiques de l'EEG**

### **6.4.1 Analyse spectrale**

Afin de déterminer les caractéristiques spectrales de l'EEG durant l'EV et le SP, nous avons utilisé un protocole permettant une analyse fine du signal (Parmentier *et al.*, 2002 ; Beuckmann *et al.*, 2003).

Cette étude du signal EEG utilise une transformée rapide de Fourier (méthode mathématique fondée sur la démonstration émise par le mathématicien français Joseph Fourier, selon laquelle un son complexe peut se « réduire » à une somme de composantes sinusoïdales). Cette technique permet ainsi de décomposer une fonction du temps en un spectre de fréquence (de 0,8 à 120Hz, avec une résolution de 0,24Hz) pour chacun de nos rats.

Afin de déterminer le pic de fréquence des oscillations delta, thêta, sigma, bêta1, gamma1 et gamma2 (TPF pour theta pic frequency), nous avons considéré la bande spectrale comprise entre 0,5 et 4,5Hz pour le delta ; entre 5 et 9Hz pour le thêta ; entre 10 et 14Hz pour le sigma ; entre 15 et 30Hz pour le bêta ; entre 40 et 48Hz pour le gamma1 ; entre 51 et 120Hz pour le gamma2 comme une distribution statistique suivant une loi gaussienne. Puis, la distribution gaussienne la plus proche a été calculée en utilisant la méthode dite

«des carrés moyens», la moyenne de la distribution gaussienne correspondant à la valeur du TPF.

Enfin, nous avons également calculé la somme des amplitudes pour chaque bande de fréquence comprise entre les bornes de fréquence des oscillations delta, thêta, sigma, beta, gamma1 et gamma2.

Afin d'obtenir des données comparables, l'amplitude de chaque bande de fréquence et chaque fréquence ont été normalisées en divisant ces valeurs par l'amplitude totale du spectre pour chaque animal (puissance spectrale relative). Ces formules mathématiques sont à la base des scripts que nous utilisons sous spike 2 en routine au laboratoire.

#### **6.4.2 Analyse des états de vigilance**

Les épisodes de chaque état de vigilance ont été scorés pendant les 6 dernières heures avant perfusion chez les animaux PSR-Sham et PSR-Lésions ; de plus, les états de vigilance d'un enregistrement témoin en conditions basales (le rat est simplement placé dans sa cage) pendant une période diurne de 12h ont aussi été scorés en utilisant une fenêtre de temps de 5 secondes. Les hypnogrammes ont été tracés à l'aide d'un script sous le logiciel spike 2 (CED). Les moyennes des quantités de chaque état de vigilance ont été calculées pour chaque condition. En outre, les spectres de fréquence de l'EEG normalisés ont été calculés avec un script sous spike 2 qui réalise une transformation rapide de Fourier sur des époques de 5 secondes (sans artéfacts avec une résolution de 0,24Hz) pendant l'enregistrement témoin et pendant la récupération de SP chez chacun des rats. La moyenne $\pm$ SEM de la puissance et du pic de fréquence pour chaque bande de l'EEG a ensuite été calculée (les gammes de fréquences (en Hz) : Delta [0,5-4,5]; Theta [5 -9]; Sigma [10-14]; Beta1 [15-22,5]; Beta2 [22,5-30]; Gamma [30-48]).

#### **6.4.3 Analyse statistique**

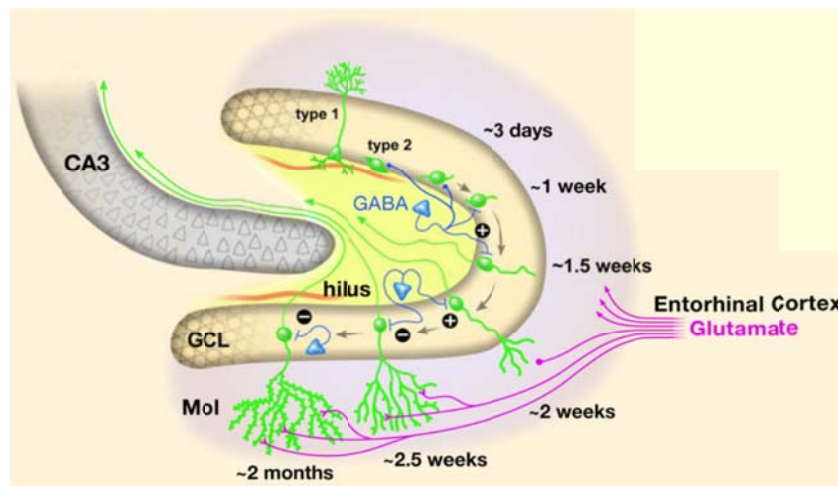
Les variations intra groupe (test de Kruskal-Wallis) ont été analysées pour les quantités de chaque état de vigilance, pour chaque valeur moyenne (des épisodes de 5 secondes d'un état de vigilance) de l'amplitude des fréquences (toutes les 0.24Hz), de la puissance et la fréquence des pics d'amplitude des bandes de fréquence de chaque état de vigilance (PSR-Sham ou PSR-Lésion). Les tests de Mann-Whitney ont été utilisés pour identifier les différences significatives entre les deux groupes d'animaux (PSR-Sham vs PSR-Lesion). Ces tests statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel Statview 5.

## 7. Les neurones actifs du gyrus dentelé sont ils des nouveaux neurones ?

### 7.1 Principe

La neurogenèse dans le cerveau des mammifères adultes a été démontrée dans deux régions chez l'adulte : la zone sous ventriculaire des ventricules latéraux et la zone sous granulaire au niveau du gyrus dentelé de l'hippocampe qui est une des structures corticales sollicitées en SP. Les neurones nés dans la zone sous granulaire migrent dans la couche granulaire du gyrus dentelé et deviennent des cellules granulaires. Ces nouveaux neurones s'intègrent dans les circuits préexistants et reçoivent des entrées fonctionnelles.

Afin de définir si nos neurones ARC+, FOS+ et COX2+ sont de jeunes neurones, nous avons injecté le 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU), un analogue et substitut de la thymidine, chez nos rats. Le BrdU permet de marquer les cellules en division en s'intercalant dans les chaînes d'ADN par remplacement des bases de thymidines pendant la phase de synthèse du cycle cellulaire. Le délai du sacrifice de l'animal post injection permet d'observer des cellules à l'âge voulu. Pour cette étude nous avons injecté du BrdU 3, 6 et 12 semaines avant le protocole de privation récupération. Les neurones à 2-3 semaines sont capables d'exprimer la plupart des IEGs.



La zone sous granulaire est la zone où se produisent les divisions des cellules souches. Les nouveaux neurones migrent de la zone sous granulaire vers la couche granulaire du gyrus dentelé et s'intègrent dans les circuits préexistants.

La double-cortine (DCX) est une MAP (Microtubule Associated Protein), elle est exprimée dans les neurones âgés de 3 semaines. Elle est exprimée dans les neurones post mitotiques en migration et post-migratoires immatures mais pas dans les neurones matures. La DCX est impliquée dans la régulation de la dynamique des microtubules, dans le trafic des vésicules intracellulaires, dans l'adhésion cellulaire et dans les interactions microtubules actines. Afin de vérifier une partie de nos résultats nous avons aussi utilisé la DCX.

## **7.2 Protocole d'injection de BrdU**

Le BrdU (Sigma) est mis en solution dans du NaCl à une concentration de 20 mg/ml, et est injecté à 0,75ml pour 100g de rat en intra- péritonéal matin (9h) et soir (19h) pendant 3 jours afin d'obtenir une fenêtre temporelle assez large. Un premier groupe de rat composé de 2 animaux rebond de SP, un animal privé de SP et un animal contrôle subissent le protocole de privation rebond 3 semaines après le début de la première injection de BrdU au terme duquel ils sont sacrifiés.

Un second groupe de rats composé de 6 animaux rebonds de SP, 4 animaux privés de SP et 2 animaux contrôles de SP, subissent le protocole de privation rebond 6 semaines après la première injection de BrdU.

Enfin, un troisième et dernier groupe subit ce protocole de privation rebond 12 semaines après la première injection de BrdU.

# **8. Perfusion et préparation histologique**

## **8.1 Perfusion intracardiaque de paraformaldéhyde**

### **8.1.1 Principe**

Il s'agit ici de conserver, par fixation chimique, le tissu à étudier dans un état aussi proche que possible de l'état vivant, tout en le rendant imputrescible. Le paraformaldéhyde est un fixateur réticulant, il entraîne la formation de ponts méthylène (CH<sub>2</sub>) entre les protéines, et permet ainsi de préserver la structure du tissu, les protéines et les ARN.

La perfusion du fixateur se fait par le réseau vasculaire, ce qui permet une bonne diffusion du fixateur dans le tissu d'intérêt. Avant la perfusion du fixateur il est possible de faire circuler une solution physiologique dans le système vasculaire afin de nettoyer les tissus et d'éliminer les peroxydases endogènes contenues dans les globules rouges (important si la révélation se fait avec des peroxydases). La surfixation du tissu par immersion de celui-ci dans le fixateur est réalisée afin qu'il ne reste pas de tissu non fixé.

### **8.1.2 Protocole expérimental détaillé**

Une anesthésie profonde est induite par injection i.p de pentobarbital sodique (150mg/kg). Après ouverture du thorax pour accéder au cœur, une aiguille de perfusion est introduite dans le ventricule gauche tandis que l'oreillette droite est incisée pour laisser s'écouler le sang. L'animal est perfusé successivement avec 150 ml de Ringer-Lactate hépariné frais pour chasser le sang, puis avec 400ml d'une solution de fixation froide préparée extemporanément et composée de paraformaldéhyde (PFA) à 4% dans 0,1M de tampon phosphate (PB) à pH 7,4. Le cerveau est prélevé puis plongé dans la solution de PFA pour une surfixation de ~24h à 4°C.

## **8.2 Réalisation et conservation des coupes histologiques**

### **8.2.1 Principe**

La congélation du tissu permet de donner à celui-ci une consistance compatible avec la confection de coupes minces et transparentes, observables au microscope. Cependant, la congélation entraîne la formation de cristaux de glace responsables de l'éclatement des cellules. La saturation préalable du tissu par un cryoprotecteur est donc indispensable. En raison de sa neutralité chimique, le saccharose est le cryoprotecteur le plus utilisé.

### **8.2.2 Protocole expérimentale détaillé**

#### **1) Traitement des coupes pour immunohistochimie :**

Le liquide de fixation est ensuite remplacé par une solution de PB 0.1M contenant 30% de Sucrose et 1g/l d'azide en guise de cryoprotecteur lors de l'étape de congélation du tissu. La méthode la plus fiable consiste à congeler rapidement le cerveau sous un flux de neige carbonique, mais il est également possible de le congeler en le plongeant dans un récipient d'isopentane à environ -50°C placé dans de la carboglace. Les sections histologiques sont obtenues en débitant le cerveau maintenu à -20°C à l'aide d'un cryostat (HM 550, Microm, France) en coupes frontales sériées de 25µm d'épaisseur, depuis le cortex frontal jusqu'à l'extrémité du cervelet. Les sections flottantes sont recueillies dans une solution de tampon phosphate 0.1M composée de NaCl 9‰ et de triton X-100 3‰ (PBST). Avant d'être stockée à 4°C, on procède à un lavage des coupes dans une solution de PBST contenant 1% d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durant 15min afin d'éliminer la peroxydase endogène contenue dans les hématies résiduelles, puis à deux rinçages dans du PBST. Les sections sont enfin conservées dans une solution de PBST-Az contenant de l'azide de sodium à 1‰ pour éviter la pousse bactérienne.

#### **2) Traitement des coupes pour hybridation in situ :**

A la suite de la surfixation, trois bains d'environ 16 h à 4°C dans une solution de PB autoclavée 0,1 M pH 7,4 contenant 30% de saccharose sont nécessaires pour protéger le cerveau lors de sa congélation à la carboglace. Une fois le cerveau congelé, il est sectionné



au cryostat (HM 550, Microm, Francheville, France) à -20°C, en coupes frontales sériées de 20 à 30 µm d'épaisseur, du TB basal jusqu'au bulbe rachidien caudal. Les coupes flottantes sont recueillies dans des puits de boîtes de culture remplis d'une solution cryoprotectrice dépourvue de RNase (DEPC 0,05%, Glycérol 20%, Ethylène Glycol 30% dans du tampon K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM pH 7,4). Les coupes peuvent alors être conservées à -20°C durant plusieurs années.

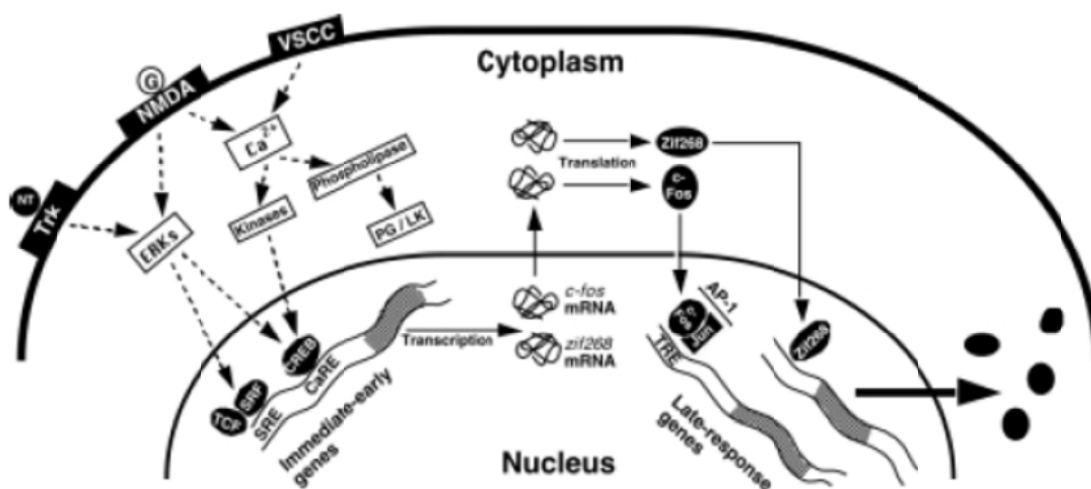
### **8.3 Immunohistochimie des protéines FOS, ARC, COX2, SGK, BrdU, Double cortine, CTb, FG**

Les réponses du neurone aux diverses stimulations sont réparties en deux classes : les réponses précoces et les réponses tardives (revue dans (Hughes et Dragunow, 1995)). La réponse précoce survient de quelques millisecondes à quelques minutes après la stimulation. Elle résulte de l'interaction entre des premiers messagers extracellulaires (neurotransmetteurs ou facteurs de croissance) avec des récepteurs de surface, interaction dont la résultante est l'activation de seconds messagers intracellulaires. Ce mécanisme passe soit par l'activation de récepteurs ionotropiques, soit par l'activation de récepteurs métabotropiques, entraînant une augmentation de la concentration intracellulaire en ions calcium qui peuvent alors agir sur des protéines kinases. Ces protéines kinases vont alors activer des protéines spécifiques par phosphorylation. La durée de la réponse neuronale dépend alors de la persistance de cette phosphorylation (généralement courte du fait d'une régulation par des phosphatases). La réponse tardive survient dans une fenêtre de quelques heures à quelques jours et, dans certaines circonstances, cette réponse peut devenir permanente comme c'est le cas dans les mécanismes d'apprentissage ou de mémoire. Des modifications de l'expression génomiques 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 qui se lient à l'ADN (Facteur de transcription) et favorise la production d'un ARNm spécifique et de la protéine associée qui va alors modifier le phénotype de la cellule.

Des études qui exploitent l'expression rapide des IEG tel que Arc, Fos, zif268 et homer1a pour cartographier les populations neuronales et les circuits engagés dans les formes distinctes de l'apprentissage (Guzowski *et al.*, 1999). Au cours de ce travail, nous avons été amenés à procéder à l'immunohistochimie des protéines FOS (marqueur d'activation neuronale), ARC et COX2 afin de cartographier les neurones exprimant ces marqueurs indirects de plasticité et d'activité. De plus, l'utilisation du FOS couplée à l'utilisation de traceur et de la technique de privation-rebond indique quelles régions efférentes et afférentes d'une structure donnée sont actives pendant le SP.

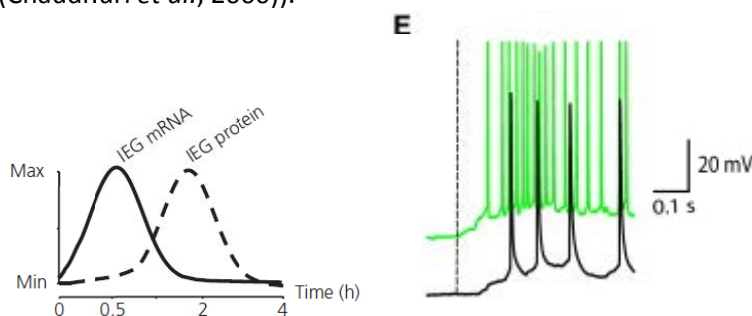
### 8.3.1 Principe de l'utilisation de la protéine FOS comme marqueur fonctionnel

L'expression de la protéine c-Fos reflète les variations importantes de l'activité des neurones en réponse à une stimulation physiologique donnée (Sagar *et al.*, 1988). Elle est associée à une décharge neuronale et à l'entrée d'ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule (Morgan et Curran, 1986 ; Dragunow et Faull, 1989)(Fig. 8). Sa détection immunohistochimique présente l'avantage de permettre une localisation à l'échelle cellulaire des neurones activés. Plusieurs travaux, dont ceux du laboratoire (Maloney *et al.*, 1999; 2000 ; Verret *et al.*, 2003a ; Verret *et al.*, 2005 ; Verret *et al.*, 2006) valident l'utilisation de la protéine c-Fos comme marqueur des neurones activés pendant le SP.



**Figure 8 : Processus cellulaires impliqués dans l'induction de deux facteurs de transcription inductibles – Fos et Zif268 – dans les neurones.**

La stimulation de la cellule entraîne l'activation de la voie des MAP kinases (dont ERK) ou l'entrée d'ions calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) conduisant à la transcription des gènes précoces (IEGs pour Immediate-early genes) dont Fos. L'ARNm est traduit en protéine FOS dans le cytoplasme et retourne dans le noyau où elle induit, sous la forme d'un hétérodimère (Fos-Jun), la transcription de nombreux autres gènes portant les promoteurs cibles des complexes AP1, complexes auxquels le FOS peut se lier (D'après (Chaudhuri *et al.*, 2000)).



**Figure 9 : graphique de l'expression de l'ARNm et la protéine de l'IEG.** 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 (Figure 9)(Dragunow et Faull 1989). **Enregistrement des neurones corticaux in vivo chez les souris qui expriment la GFP, une protéine fluorescente, couplée à l'expression du FOS.** Le nombre de potentiel d'action est plus élevé dans les cellules FOSGFP+ en vert (lignes en pointillé) comparé aux cellules FOSGFP- en noir simultanément enregistrées. (Yassin *et al.*, 2010).

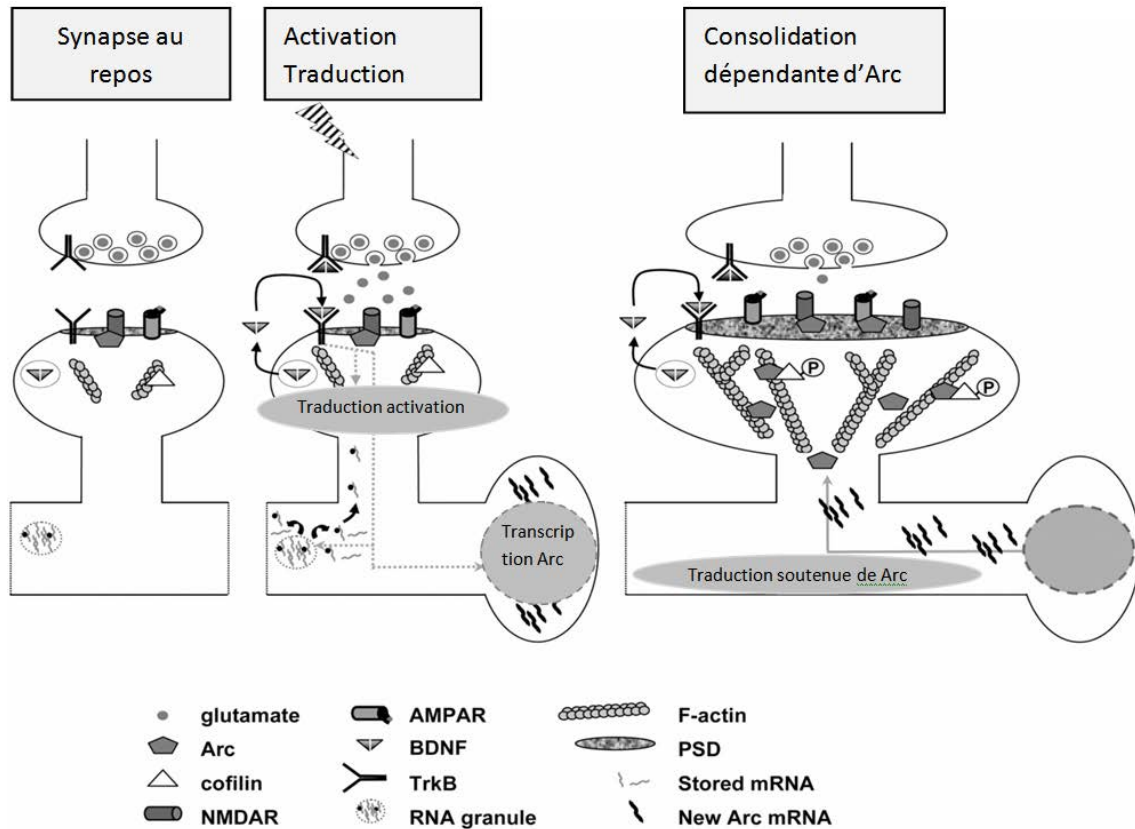
Une étude récente a utilisé des souris transgéniques FOSGFP et enregistré l'activité de ces neurones in vitro et in vivo dans les couches pyramidales 2/3 du néocortex (Yassin *et al.*, 2010). Le GFP est une séquence génique insérée en amont du promoteur du gène FOS dont la protéine code pour une molécule fluorescente. Cette technique permet donc d'enregistrer les neurones FOSGFP+ in vitro et in vitro, ceux-ci déchargent à des taux plus élevés que les neurones FOSGFP- (Fig. 9), Les enregistrements simultanés de ces neurones FOSGFP+ indiquent aussi qu'ils ont une plus grande chance d'être interconnectés que les neurones FOSGFP-.

### **8.3.2 Principe de l'utilisation de la protéine ARC**

L'ARNm de *Arc* est rapidement exprimé dans les neurones principaux du télencéphale après des expériences d'apprentissage, induction de LTP par stimulation haute fréquence (HFS) (Lyford *et al.*, 1995 ; Bramham *et al.*, 2010). *Arc* est aussi induit pharmacologiquement dans les neurones hippocampiques par application de BDNF, d'agoniste glutamatergiques, l'élévation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire, l'activation des récepteurs NMDA et de nombreuses molécules de signallement intracellulaire impliquées dans la plasticité synaptique (Steward et Worley, 2001). L'ARNm de *Arc* ainsi que la machinerie nécessaire à son transport et à sa traduction sont contenus dans des particules ou granules le long des microtubules dans les dendrites sous des conditions non stimulantes dans le DG (Fig.10). Au niveau des dendrites, *Arc* s'accumule dans des régions où les synapses ont été récemment activées (Steward et Worley, 2001). La traduction de ARC dépend de la polymérisation locale de l'actine (Huang *et al.*, 2007) et réciproquement ARC permet la stabilisation des filaments d'actine dans les synapses actives (Messaoudi *et al.*, 2007).

La demi-vie de l'ARNm de *Arc* est de 47 min dans les neurones hippocampiques et sa protéine est rapidement dégradée (Rao *et al.*, 2006). Dans le GD, la consolidation de la LTP nécessite une période soutenue de traduction d'ARC qui commence 10min après stimulation haute fréquence (HFS) et peut être maintenue jusqu'à 2 à 4h après (Messaoudi *et al.*, 2007) alors que la synthèse de l'ARNm de *Arc* persiste 30 min après HFS. Les infusions intrahippocampique d'antisens d'*Arc* dans le GD in vivo altèrent la maintenance mais pas l'induction de la LTP. ARC serait plutôt impliquée dans la mémoire spatiale à long terme mais pas dans l'acquisition et les performances mnésiques à court terme (Guzowski *et al.*, 2000 ; Messaoudi *et al.*, 2007). De plus, chez les souris KO pour *Arc*, la phase précoce de la LTP est augmentée alors que la phase tardive est bloquée dans le GD et le CA1 (Plath *et al.*, 2006). La

formation de la phase tardive de la LTP implique des modifications dendritiques incluant l'expansion de la densité postsynaptique et le grossissement des épines dendritiques postsynaptiques. Arc favoriserait la consolidation de la LTP via la régulation de la dynamique des filaments d'actines (Bramham *et al.*, 2008). Après induction de la LTP, ARC s'accumule dans l'arbre dendritique des cellules principales de l'hippocampe au niveau des zones terminales des fibres activées (Rodriguez *et al.*, 2005). ARC s'accumule aussi dans le noyau mais sa fonction reste inconnue.



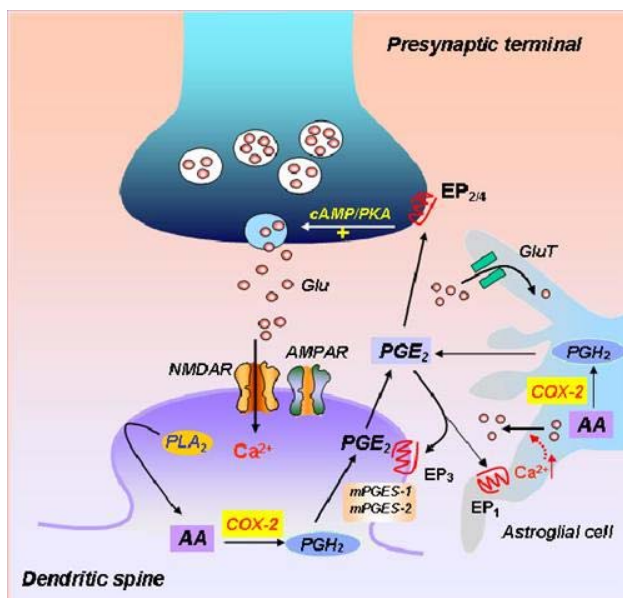
**Figure 10 : Mécanismes de consolidation synaptique dépendante de BDNF et Arc.** Les mécanismes de la formation d'une LTP stable au niveau des synapses glutamatergiques sont présentés en 2 étapes : l'activation de la traduction et la consolidation dépendante de *Arc*. Dans l'étape d'activation de la traduction, la stimulation haute fréquence entraîne une libération post-synaptique soutenue de BDNF et l'activation des récepteurs TrkB pré et post-synaptiquement. Cette activation post-synaptique conduit à une activation rapide de la traduction dans les épines dendritiques et la transcription de *Arc* dans les corps cellulaires neuronaux. L'activation de la traduction est dirigée par phosphorylation de la protéine cap-bindinif eIF4E. Les épines activées par cette voie captureraient et traduiraient les pools d'ARNm. Dans ce modèle, les transcrits libérés des granules de stockage d'ARN locaux sont tout d'abord transportés dans les dendrites, suivis par une étape de traduction soutenue des ARNm de *Arc* dans les épines dendritiques activées. Pendant la consolidation dépendante de *Arc*, la traduction soutenue de *Arc* est nécessaire pour la phosphorylation de la cofilin, l'expansion locale des filaments d'actine et la formation d'une LTP stable et soutenue. Modèle proposé par (Soule *et al.*, 2006).

Des études plus récentes ont découvert qu'*Arc* aurait un rôle dans la LTD. En effet, l'activation des récepteurs glutamates de type AMPA sous régule l'expression du gène de *Arc* dans les neurones hippocampiques (Rao *et al.*, 2006 ; Park *et al.*, 2008). En retour *ARC* interagirait avec les composants de la machinerie endocytaire entraînant une internalisation des récepteurs de surface de type AMPA (Waung *et al.*, 2008).

*Arc* peut être exprimé à partir d'un jour après la naissance dans les jeunes neurones, avec une expression fortement associée avec la survie à long terme et la différenciation neuronale de ces nouvelles cellules. Cette expression précoce précède la formation des synapses glutamatergiques des nouveaux neurones alors que les autres IEGs sont exprimés généralement lorsque les synapses sont formées environ 2 semaines après la naissance des neurones (Bramham *et al.*, 2010). Ces résultats suggèrent une nouvelle fonction pour *Arc* indépendante de la LTP et de la LTD et de la plasticité homéosynaptique.

### **8.3.3 Principe de l'utilisation de la protéine Cox2**

La Cyclooxygénase 2 (COX-2) catalyse la première étape de la synthèse des prostaglandines. Le substrat de COX2, l'acide arachidonique est généré dans le striatum en réponse à l'activation des récepteurs NMDA (Dumuis *et al.*, 1988) et dans l'hippocampe après LTP. L'augmentation de l'activité synaptique ne surrégule pas seulement l'ARNm *Cox2*, mais augmente aussi la disponibilité du substrat de cette enzyme. Les prostaglandines H2 (PGH2), produit de la catalyse de COX2 et l'acide arachidonique (AA), sont des précurseurs pour la synthèse de plusieurs prostaglandines. Ils sont nécessaires à la production d'autres molécules diffusibles qui peuvent traverser la membrane plasmique, répandre un signal local et influencer les cellules voisines (Fig. 11)(Malhotra *et al.*, 2004). COX-2 est particulièrement présente dans les épines dendritiques (Kaufmann *et al.*, 1996), suggérant que cette enzyme peut produire des molécules de signalisation diffusibles qui agissent localement au niveau de la synapse.



**Figure 11 : Schéma illustrant la synthèse des prostaglandines E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) catalysé par Cox2 comme un message rétrograde du signalisation synaptique.**

## 8.4 Immunohistochimie

### 8.4.1 Principe de l'immunohistochimie

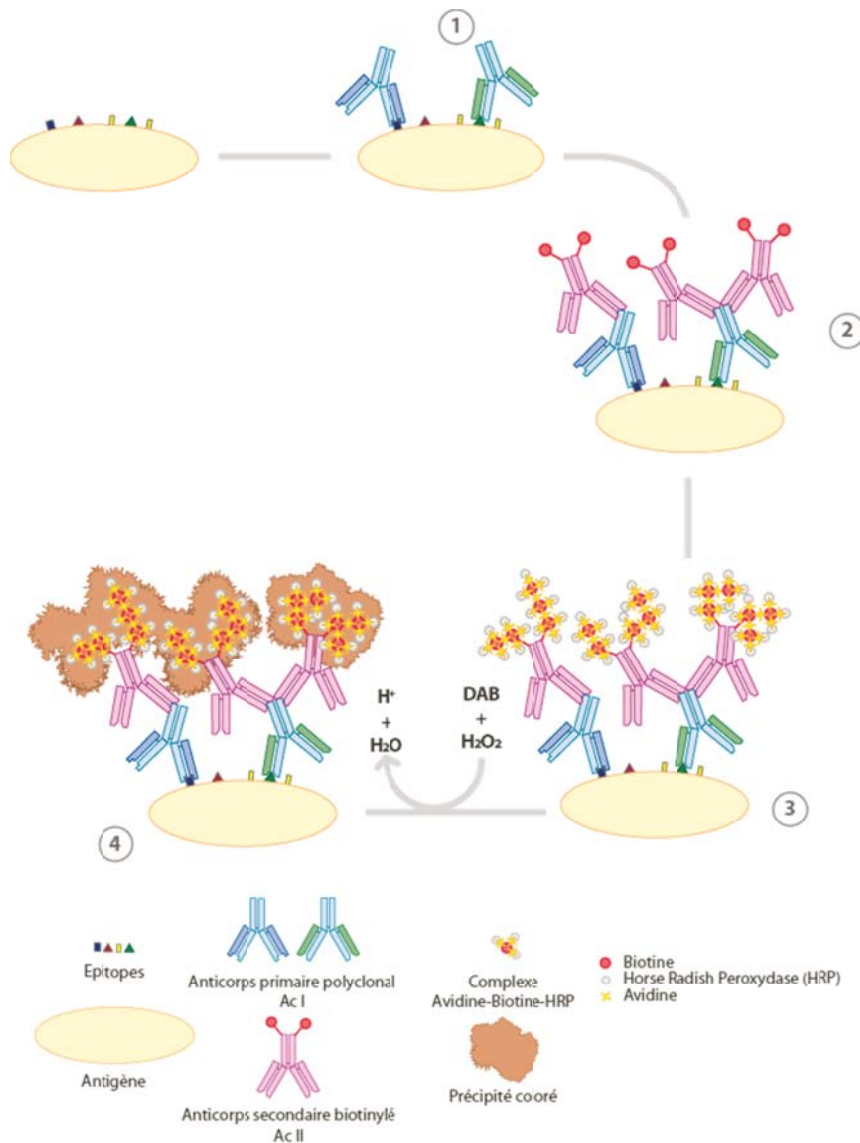
L'immunohistochimie est une technique qui permet de localiser *in situ* un antigène cible. Cet antigène peut être une molécule endogène (neurotransmetteur, récepteur, facteur de transcription, enzyme de synthèse...) ou exogène (neurobiotine, traceurs anatomiques). Celui-ci est reconnu par l'utilisation d'immunoglobulines G spécifiquement dirigées contre lui, produits en induisant une réaction immunitaire par injection de la molécule d'intérêt chez un animal d'une espèce différente de celle du tissu cible.

Le principe de l'immunohistochimie consiste donc à incuber le tissu cible en présence d'un anticorps primaire (monoclonal, dirigé contre un seul épitope de l'antigène ou polyclonal, reconnaissant plusieurs épitopes de l'antigène) qui va se fixer spécifiquement sur l'antigène d'intérêt puis, à révéler la présence de cet anticorps par un système de marquage utilisant des composés (fluorochromes, éléments radioactifs ou enzymes) détectables en microscopie (optique ou électronique).

Dans le cadre de cette étude, nous avons utilisé une réaction enzymatique d'oxydo-réduction qui induit la formation d'un précipité coloré repérable en microscopie optique. L'immunohistochimie est dite "directe" si le marqueur est directement fixé sur l'anticorps primaire. Nous avons cependant utilisé une technique "indirecte", plus perfectionnée, qui met en jeu un anticorps secondaire biotinylé et une réaction d'affinité entre deux composés protéiques, l'avidine et la biotine (Fig. 12).

Cette technique permet d'amplifier l'intensité du signal immunologique puisque plusieurs anticorps secondaires peuvent se fixer sur les anticorps primaires contre lesquels ils sont dirigés, et que la réaction d'affinité aboutit à la formation d'un complexe enzymatique (ABC) qui s'agglomère autour de l'échafaudage d'anticorps. C'est ce dernier qui est révélé en réalisant une réaction d'oxydo-réduction entre la peroxydase de raifort (HRP, "Horse Radish Peroxydase") contenue dans le complexe ABC et son substrat, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ajouté au moment de la réaction en présence de 3,3' diaminobenzidine tétrahydrochloride (DAB). Elle transforme son substrat (l'eau oxygénée) en eau (H<sub>2</sub>O) et en protons (H<sup>+</sup>) qui vont alors oxyder la molécule de révélation, la 3,3' diaminobenzidine tétrahydrochloride (DAB), et la transformer en un précipité marron insoluble autour de l'échafaudage immunoprotéique. Il

est possible d'ajouter du sulfate de Nickel lors de la révélation, le précipité coloré formé est alors noir (technique DAB-Ni). Des doubles marquages immunohistochimiques sont ainsi possibles.



**Figure 12: Principe de la détection immunohistochimique d'un antigène.**

Les anticorps primaires (Immunoglobulines G, IgG, faits chez l'espèce x) reconnaissent et fixent l'antigène (1). Ils sont reconnus par les anticorps secondaires biotinylés (faits chez l'espèce y et dirigés contre les IgG de l'espèce x) (2). Le complexe ABC (avidine/biotine/HRP) se lie aux molécules de biotine des anticorps secondaires (3). Au contact du peroxyde d'hydrogène, la peroxydase induit la formation d'un précipité de DAB (4).

Nous avons également utilisé l'immunohistochimie en fluorescence. Cette technique sensible permet d'obtenir un contraste très élevé, sans étape d'amplification. Le marqueur est alors un fluorophore au sein duquel un photon « excitateur », provenant d'une source lumineuse (laser par exemple), provoque le passage d'un électron d'une orbite stable à une orbite instable. Pendant cet état instable, l'électron perd de l'énergie par interaction avec l'environnement. Il retourne à son orbite stable en émettant un photon de fluorescence.

On observe cette lumière émise à travers un système de filtres et un microscope à fluorescence ou confocal. Les fluorochromes émettent dans différentes longueurs d'onde : dans le vert, dans le rouge, dans le bleu, et même dans l'infrarouge. L'inconvénient de cette

technique est le fading, c'est à dire la destruction de la molécule fluorescente sous forte illumination. Dans notre cas, l'immunohistochimie en fluorescence est indirecte.

## **8.4.2 Protocoles détaillés d'Immunohistochimie**

### **8.4.2.1 Préparation des coupes pour la détection du BrdU**

Principe : le BrdU est situé dans le noyau au niveau de l'ADN, du PBS plus concentré en triton est utilisé afin de perforer les membranes, il est aussi nécessaire de dénaturer l'ADN à l'aide d'une solution d'HCl afin que le BrdU soit accessible pour son antigène et de stopper cette réaction à l'aide d'acide borique. Toutes ces étapes se font sous agitation.

- Les coupes flottantes sont rincées pendant 1h dans du PBS 1x (100ml de PBS 10x GibCo dans 900ml d'eau distillée).
- Elles sont ensuite traitées 2 fois 30 minutes dans du PBS avec 0,25% de triton.
- Puis placées 40min dans du PBST 0,25% contenant de l'HCl à une concentration de 2N, les coupes se replient légèrement sur elles mêmes.
- La réaction est stoppée lorsque les coupes sont placées 3minutes dans une solution de borate 0,1M (6,2g de borate dans 1 litre d'eau distillée) puis rincées à nouveau 15min dans cette solution jusqu'à ce que les coupes s'aplanissent complètement.
- Après 2 rinçages de 15 minutes au PBST (0,25%), l'anticorps primaire OBT0030 est incubé à 1/800ème dans du PBST (0,25%) à température ambiante sous agitation.

### **8.4.2.2 Immunohistochimie HRP**

L'épaisseur des coupes est de 25µm ou 50 µm. Les différents marquages effectués sont répertoriés dans le tableau 3. Les coupes flottantes pour l'hybridation in situ sont sorties du milieu de cryoprotection et rincées 3 fois 10 minutes dans du PB 10 mM pH 7,4 additionné de NaCl à 0,9% et de Triton 100X à 0,3% (PBST), alors que les coupes qui sont soumises uniquement à l'immunohistochimie ne subissent pas de traitement particulier avant ce protocole. Les sections histologiques sont soumises à un traitement séquentiel consistant en des bains d'incubation successifs sous agitation contenant les réactifs précédemment décrits :

- Elles sont incubées à 4°C pendant 1 nuit à température ambiante ou 3 nuits à 4°C dans une solution d'anticorps primaire dans du PBST (Tableau 3).
- Après 2 rinçages de 30 minutes dans du PBST, elles sont incubées 2 h à température ambiante dans une solution d'anticorps secondaire biotinylé anti-IgG de l'espèce source de l'anticorps primaire, à 1 : 1000 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) dans du PBST azide (Tableau 3).
- Les coupes sont alors rincées 2 fois dans du PBST pendant 30 minutes afin d'éliminer les anticorps non fixés et sont incubées 90 minutes à température ambiante dans



une solution contenant le complexe Avidine-Biotine-Horse Radish Peroxydase (1:1000; Elite kit, Vector Laboratories) à 1 : 1000 dans du PBST.

- Après 2 rinçages de 30 minutes dans du PBST pour éliminer l'ABC en excès, les coupes sont incubées dans une solution de Tris-HCl 0,05 M à pH 7,6 contenant 0,025% de 3,3'-diaminobenzidine tétrahydrochloride (DAB, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) et 0,003% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La réaction est contrôlée en permanence sous le microscope et stoppée lorsque le rapport marquage spécifique et bruit de fond ou marquage non spécifique est optimal (10-40min).

- Pour stopper la réaction, les coupes sont lavées sous agitation 2 fois 30 minutes dans du PBST azide puis montées sur des lames histologiques de verre gélatinées (1% de gélatine et 0,1% d'alun de chrome dans de l'eau distillée chauffée). Après séchage, elles sont directement montées sous lamelles avec de la colle Depex (VWR, Fontenay sous bois, France).

Pour effectuer un double marquage, le protocole ci-dessus est effectué une première fois en ajoutant 0,6% de sulfate de Nickel au tampon de révélation afin d'obtenir un précipité noir puis renouvelé une seconde fois, cette fois-ci sans Nickel pour l'obtention d'un précipité marron.

<b>Anticorps primaires monoclonaux</b>	<b>dilution</b>	<b>révélation</b>	<b>Anticorps secondaires</b>
Anti-c-Fos (Ab5 calbiochem)	1:10000	DAB+Nickel(Ni)	Anti lapin Alexa fluo 488 (1/400) ou Anti lapin 546 (1/1000) (Molecular Probe) ou Anti lapin biotynilé (1/1000) (Vector Labs);
Anti-Arc (Synaptic systems)	1:10000	DAB+Ni, DAB ou fluorescence vert	Anti lapin Alexa fluo 488 (1/400) (Molecular Probe) ou Anti lapin biotynilé (1/1000) (Vector Labs)
Anti-Cox2 (Upstate)	1:1000	DAB	Anti chèvre biotynilé (1/1000) (Vector Labs)
Anti-Sgk (Santa Cruz)	1:500	DAB+Ni	Anti chèvre biotynilé (1/1000) (Vector Labs)
Anti-DCX (Santa Cruz)	1:500	DAB	Anti chèvre biotynilé (1/1000) (Vector Labs)
Anti-BrdU (Sigma)	1:500	DAB+Ni ou fluorescence rouge	Anti chèvre biotynilé (Vector) puis Streptavidine TIRTC 1:400 ou Cy3 (Abcam)
Anti-CTb (Calbiochem)	1:100000	DAB	Anti chèvre (1/1000) (Vector Labs)
Anti-Fluorogold (US Biological)	1:20000	DAB	Anti lapin (1/1000) (Vector Labs)
Anti-NeuN (Chemicon)	1:20000	Fluorescence verte ou	Antimouse 488 1:1000 (Molecular Probe) Anti souris biotynilé (1/1000) (Vector Labs)

		DAB+Ni	
Anti-calretinin (Abcam)	1:10000	DAB+Ni	Anti lapin ? (1/1000) (Vector)

**Tableau 3 : Tableau récapitulatif des immunohistochimies (simples ou doubles) réalisées au cours de ce travail de thèse.**

#### 8.4.2.3 Immunohistochimie en fluorescence du BrdU, Arc et Fos

L'épaisseur des coupes est cette fois de 50µm.

Les coupes des trois rats ont été traitées selon le protocole suivant :

- Après incubation pendant la nuit des 2 anticorps dirigés contre le BrdU et Arc ou le BrdU et Fos, les coupes sont rincées 2 fois 30 minutes.
- L'anticorps secondaire biotinylé contre le rat est incubé à température ambiante pendant 1h30.
- Les coupes subissent à nouveaux 2 rinçages de 30min au PBST.
- Puis, elles sont incubées à la fois dans une solution de streptavidine (rouge) et une solution d'anti lapin fluo alexa 488 pendant 2 heures et protégées de la lumière.
- Après 2 rinçages de 30 minutes, les coupes sont montées sur lame, séchées puis collées avec de la colle Depex. Elles sont observées au microscope et photographiées le jour même.

## **9. Hybridation *in situ* de la GAD65**

### **9.1 Principe de l'Hybridation *in situ***

Le principe de l'hybridation *in situ* consiste en l'hybridation, sur une coupe de tissu, de deux séquences d'acides nucléiques complémentaires : une séquence d'acide nucléique marqué (sonde) à une séquence d'acide nucléique (ARN endogène) que l'on veut localiser, ceci pour réaliser une molécule double brin stable.

Les sondes utilisées sont le plus souvent de l'ADN (double brin ou plus rarement monobrin), de l'ARNm (ribosonde) ou des oligonucléotides synthétiques (de 20 à 50 nucléotides).

Les ribosondes ont pour avantage de pouvoir être marquées en cours de synthèse et d'avoir une activité spécifique élevée et une forte stabilité. En revanche, leur préparation, leur utilisation et leur stockage sont délicats car il faut toujours respecter des conditions RNase-free. Pour pouvoir être visualisées, les sondes doivent être préalablement marquées. Le marquage des sondes peut être réalisé par des isotopes radio-actifs ("sondes chaudes" : tritium <sup>3</sup>H, phosphore <sup>32</sup>P ou <sup>33</sup>P, soufre <sup>35</sup>S) ou par des produits non radio-actifs (sondes dites "froides"), fluorescents ou non, tels que la biotine ("sondes biotinylées"), la digoxigénine (DIG) (Figure 13) ou des enzymes (phosphatase alcaline par exemple). Le mode

de révélation varie en fonction de la nature du marquage : autoradiographie (permet une étude quantitative) ou colorimétrie. Dans notre cas, la ribosonde est marquée à l'aide de DIG, molécule reconnue par un anticorps anti-DIG porteur de la phosphatase alcaline (Figure 35). Cette enzyme réagit au contact d'un substrat, du nitroblue tetrazolium (NBT) associé à du 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP), pour former un précipité coloré bleu foncé (Figure 13). Le BCIP est déphosphorylé par la phosphatase alcaline puis, oxydé par le NBT, il forme un précipité bleu. Le NBT réduit forme également un précipité bleu (Figure 13).

Cet outil d'une grande spécificité est incomparable pour localiser les cellules exprimant le gène d'intérêt.

## 9.2 Fabrication de la ribosonde GAD65

La sonde de la GAD65 a été synthétisée par Céline Scote et Oliver Clément. Brièvement l'ARN a été extrait du cortex de rat, après obtention d'ADNc à l'aide d'une RT, 2 amorces en amont et en aval d'une séquence choisie de 64 pb de la GAD65 ont permis d'amplifier la séquence voulue par PCR. L'ADNc est ensuite transcrit à l'aide du kit DIG RNA labeling kit (Roche) suivant les recommandations du fabricant afin d'obtenir la sonde ARN pour l'hybridation *in situ*.

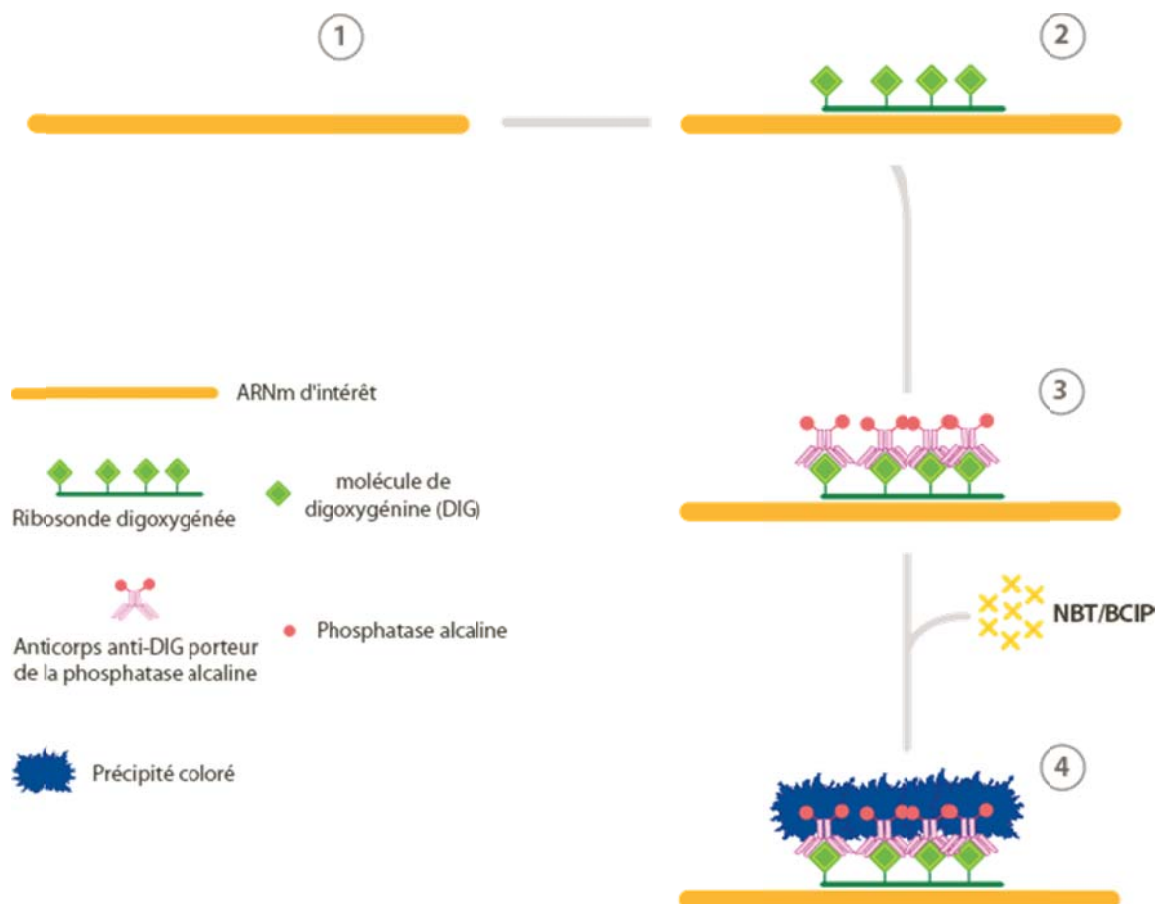


Figure 13 : Principe de l'hybridation *in situ*, telle que nous l'avons utilisée

L'ARN messager d'intérêt (1) est reconnu et hybridé par la ribosonde marquée à la digoxygénine (DIG) (2). Cette dernière est ensuite reconnue par l'anticorps anti-DIG porteur de la phosphatase alcaline (3) qui réagit avec les substrats NBT/BCIP pour donner un précipité bleu foncé (4).

### 9.3 Protocole expérimental détaillé

Les coupes histologiques sont rincées 2 fois 10 min dans une solution de citrate de sodium (SSC 2X) puis incubées la nuit à 65°C dans le tampon d'hybridation (NaCl 150mM, Tris-HCl 8mM, Tris-Base 1mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6mM, Na<sub>2</sub>HPO 5mM, EDTA 5mM, formamide deionisé 50%, dextran sulfate 10%, yeast tRNA 1mg/ml (Sigma type III, 1mg/ml, Sigma-Aldrich), ficoll 0,02%, polyvinylpyrrolidone 0,02%) contenant la ribosonde anti-sens marquée à la DIG (0,5 µg/ml).

- Les coupes sont ensuite rincées 2 fois 20 minutes, à 55°C, dans une solution de SSC 1X, formamide 50%, Tween-20 0,1%. Puis, elles sont incubées 15 minutes à 37°C dans une solution de Tris 10mM (pH 8.0) contenant 1mM d'EDTA et 500mM de NaCl ainsi que 10 µg/ml de RNase A (USB, Cleveland, OH, USA) afin d'éliminer les sondes simple brin, donc non hybridées à l'ARNm de la GAD65 et ainsi réduire le bruit de fond.

- Les coupes sont ensuite rincées 3 fois 10 minutes dans du tampon PBST stérile et incubées la nuit, à température ambiante, avec l'anticorps anti-DIG couplé à la phosphatase alcaline dilué au 1 : 2000 dans du PBST contenant 0,2% d'agent bloquant (blocking agent; Roche, Meylan, France).

- Les coupes sont rincées 3 fois 10 minutes dans du PBST et incubées 10 minutes dans du tampon de révélation (Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 150mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM et Tween-20 0,1%). Puis les coupes sont incubées à l'abri de la lumière dans le même tampon de révélation contenant du nitrobleu tétrazolium (NBT) et du 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP) dilué à 1/50 (stock solution NBT/BCIP ; Roche), jusqu'à ce que le marquage soit suffisamment intense, avec un bruit de fond acceptable (entre 2 et 3h). Le NBT/BCIP étant photosensible, il est important de ne pas exposer les coupes à la lumière durant le temps de révélation.

### 9.4 Couplage de l'immunohistochimie de la protéine FOS à l'hybridation in situ de la GAD65

Afin de conserver l'intégrité des protéines, le marquage immunohistochimique est effectué avant l'hybridation *in situ*. Tous les tampons d'immunohistochimie utilisés sont autoclavés et contiennent 0,2% d'inhibiteur de RNase (solution Protect RNA RNase inhibitor ; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

A la fin du protocole d'immunohistochimie HRP, les coupes sont placées dans un tampon PBST dépourvu d'inhibiteur de RNase contenant du dithio-threitol (10mM DTT, Sigma-Aldrich). Cette étape est nécessaire pour réduire les groupements des bases de l'ARNm qui ont été oxydés par la peroxydase lors du protocole d'immunohistochimie. L'hybridation *in situ* est réalisée à la suite de ce rinçage, selon le protocole précédemment décrit, et débute par les 2 rinçages dans le tampon SSC 2x contenant 0,2% d'inhibiteur de RNase.

A la fin du double marquage, pour stopper la réaction, les coupes sont lavées sous agitation 2 fois 10 minutes dans du PBST puis montées sur des lames histologiques de verre gélatinées (1% de gélatine et 0,1% d'alun de chrome dans de l'eau distillée chauffée). Après séchage, elles sont directement montées sous lamelles avec du Vectamount (Vector Laboratories), colle ayant la propriété de diminuer la formation de cristaux bleus.

## **10. Analyse des résultats histologiques**

### **10.1 Analyse des marquages immunohistochimiques à la HRP**

Les coupes sélectionnées sont ensuite analysées à l'aide d'un microscope Axioscope (Zeiss, Germany) équipé d'une plateforme motorisée pour les axes X-Y et une caméra vidéo connectée à un système d'analyse d'image (Mercator; ExploraNova, La Rochelle, France). Les contours des coupes et des structures sont dessinés à faible grossissement (x2,5). Puis, les neurones immunoréactifs et les neurones doublement marqués sont pointés à plus fort grossissement (X10 ou x20). Le logiciel permet un comptage semi-automatique des neurones marqués lorsque la protéine révélée est nucléaire. Ceci permet une analyse objective des coupes puisque le seuil de détection, la taille et la forme des neurones est fixe durant toute l'exploration d'une coupe par le programme et entre les différents animaux. Les artéfacts sont ensuite éliminés manuellement. Seuls les neurones FOS+ ont été quantifiés dans le cortex en comptage semi-automatique chez les animaux (4 PSC, 4 PSD, 4 PSR, 4EV, 4 PSR-Sham, 4 PSR-Lésion).

Les cellules immunoréactives à FOS ont été quantifiées chez 4 animaux par conditions (PSC, PSD, PSR, PSR-Sham, PSR-Lésion) sur le cerveau droit de coupes à +0,7mm; -1,7mm; -3,8mm; -5,8mm et à -7,3mm du bregma.

Les cellules marquées pour FOS/CTb+, simplement marquées pour la CTb+ ou FOS/FG+ et simplement marquées pour le FG sont quantifiées pour 4 animaux par site injecté au niveau de coupes prises tous les 600µm bilatéralement (soit environ 25 coupes par animal). Les cartographies des coupes contenant les neurones doublement et simplement marquées extraites d'ExploraNova sont mises en forme sous illustrator.

Le nombre de neurones FOS+ a aussi été quantifié chez les rats PSR et EV dans le supramamillaire au niveau de coupes à -4,5mm du Bregma, dans le télencéphale basal au

niveau de coupes à +0,45mm du Bregma et dans les noyaux thalamiques au niveau de coupes à -3,5mm du Bregma (unilatéralement).

Le nombre de neurones FOS+, ARC+, CTb+, CTb+/FOS+, FG+et FG+/FOS+ quantifié par structure est exporté en utilisant Mercator (ExploraNova). Quand une structure est présente sur plusieurs coupes, les neurones comptés sont additionnés.

L'intensité du marquage immunohistochimique de la protéine COX2 et ARC a aussi été quantifiée par densité optique (D.O) dans différentes régions de la formation hippocampique pour les conditions PSC, PSD, PSR, PSR-Sham et PSR-Lésion. L'immunohistochimie a été effectuée simultanément pour les coupes cérébrales dont le marquage est comparé entre les animaux d'un même groupe et les rats des autres groupes.

Pour chaque condition, les photomicrographies de la formation hippocampique (prises à l'objectif x0,25) à -3,5mm du Bregma sont analysées à l'aide du logiciel ImageJ. La D.O. de la zone à analyser a été normalisée par rapport à la D.O de la substance blanche chez chaque animal. La D.O. est ensuite mesurée pour chaque structure dans 20 carrés de taille égale placés au hasard dans les régions des cellules principales ou dans les zones dendrites des aires hippocampiques.

Le nombre de neurones pointés et la densité optique dans chaque région cérébrale sont automatiquement calculés par le logiciel et présentés pour chaque coupe sous un format de fichier exploitable par Microsoft Excel.

## **10.2 Photographies d'illustration**

**1) Immunohistochimie classique et hybridation in situ:** Les photographies sont réalisées à l'aide du système d'analyse d'image MorphoLite (Explora Nova, La Rochelle, France) connecté à un microscope optique Zeiss puis travaillées sous Adobe-Photoshop pour ajuster le contraste et la luminosité. Lorsque les coupes sont comparées entre différents groupes d'animaux, elles subissent exactement le même traitement d'image, ces photos sont prises avec la même intensité lumineuse et les mêmes réglages du logiciel.

**2) Immunohistochimie en fluorescence:** Les coupes sélectionnées sont photographiées au grossissement x10 à l'aide du système de MorphoLite (Explora Nova, La Rochelle, France) connecté au microscope optique Zeiss. Chaque coupe est photographiée une première fois avec un filtre permettant de visualiser le premier fluorochrome (immunohistochimie BrdU ou ARC ou BrdU ou FOS), puis une seconde fois avec un filtre différent permettant de visualiser le second fluorochrome. Les clichés sont travaillés sous Adobe-Photoshop afin d'augmenter le contraste entre le fond et le signal réel puis importés sous le logiciel Adobe-Illustrator. Les clichés sont superposés afin de détecter des cellules doublement marquées.

Comme ce sont des résultats préliminaires, les résultats présentés seront seulement qualitatifs.

### **10.3 Analyse statistique**

Les variations intra groupe (test de Kruskal-Wallis) du nombre de neurones marqués et de la mesure de la densité optique ont été analysées pour chaque condition expérimentale (PSC, PSD, PSR, W, PSR-Sham ou PSR-Lésion) et chaque structure. Les tests de Mann-Whitney ont été utilisés pour identifier les différences significatives entre 2 groupes d'animaux (PSR or PSD or EVvs PSC; PSR or EVvs PSD; PSR vs W; PSR-Sham vs PSR-Lesion).

# RESULTATS

---

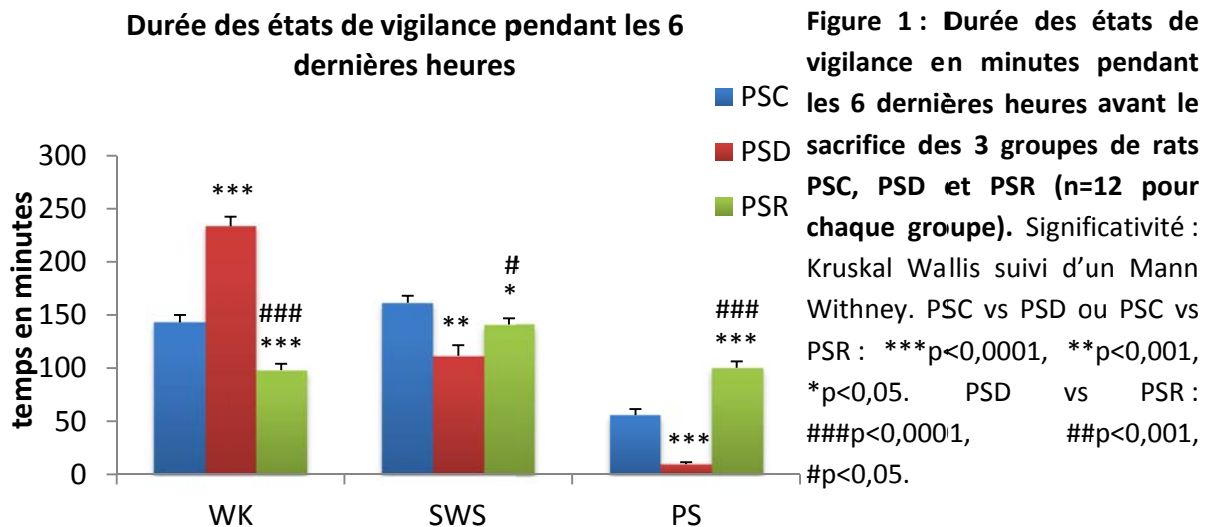




# 1. Puces à ADN et qPCR

## 1.1 Données polysomnographiques

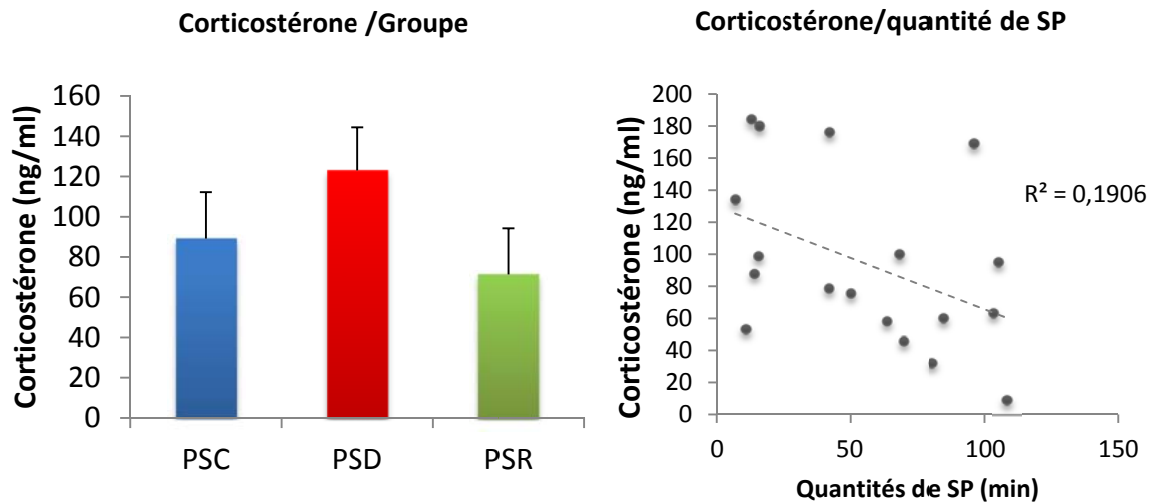
L'analyse des enregistrements polysomnographiques des 6 heures (Fig. 1) précédant le sacrifice des rats PSC révèle une proportion des états de vigilance en accord avec les données de la littérature : 40% d'éveil (EV), 45% de SL et 15% de SP. Les rats PSD présentent une diminution très significative ( $p < 0,0001$ ) de la quantité de SP (3%) au profit de l'EV (66%). Les quantités de SL sont légèrement diminuées chez les rats PSD (32%), et les rats PSR (42%) ( $p < 0,05$ ). La privation de SP est suivie chez les animaux PSR d'une augmentation très significative de SP (32%) au détriment de l'EV (29 %) ( $p < 0,001$ ). La privation/récupération de SP module donc spécifiquement les quantités de SP et d'EV et de façon minimale les quantités de SL.



## 1.2 Niveaux de concentration en corticostérone plasmatique

Le niveau de corticostérone a tendance à augmenter chez les PSD et à diminuer chez les PSR par rapport au groupe PSC (Fig. 2), mais les concentrations en corticostérone sont trop variables au sein d'un même groupe pour que les différences entre les trois groupes de rats soient significatives (PSC  $89 \pm 23$  ng/ml ; PSD  $123 \pm 21$  ng/ml ; PSR  $71 \pm 23$  ng/ml). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par McDermott (McDermott *et al.*, 2003) et ceux obtenus au laboratoire (Ravassard *et al.* 2009) avec une récupération de SP de trois heures. Il n'y avait pas de différences significatives entre les groupes PSC et PSD (75h de privation de

SP), mais une diminution significative des concentrations en corticostéroïde chez les rats PSR (3h). Les concentrations en corticostéroïde ne sont d'ailleurs pas corrélées avec chacun des états de vigilance (fig. 3). La privation de SP avec les multiplateformes ne semble donc pas entraîner un stress important.



**Figure 2 : Niveau de concentration en corticostéroïde dans le sang chez les rat PSC, PSD et PSR à la fin du protocole.** Significativité : Kruskal Wallis suivi d'un Mann Withney. Il n'y a aucune différence significative entre les niveaux de concentration en corticostéroïde chez nos 3 groupes de rats (n=6 pour chaque groupe).

**Figure 3 : Les quantités de SP ne sont pas corrélées à la concentration de corticostéroïde plasmatique.** Significativité : Test de Spearman (n=18).

### 1.3 Puces à ADN

#### 1.3.1 Catégories des transcrits dans le néocortex et la formation hippocampique

Dans la formation hippocampique, l'analyse des puces à ADN indique que le niveau d'expression de 85 transcrits (48 gènes et 37 ESTs) a été modifié par notre protocole (Fig. 4):

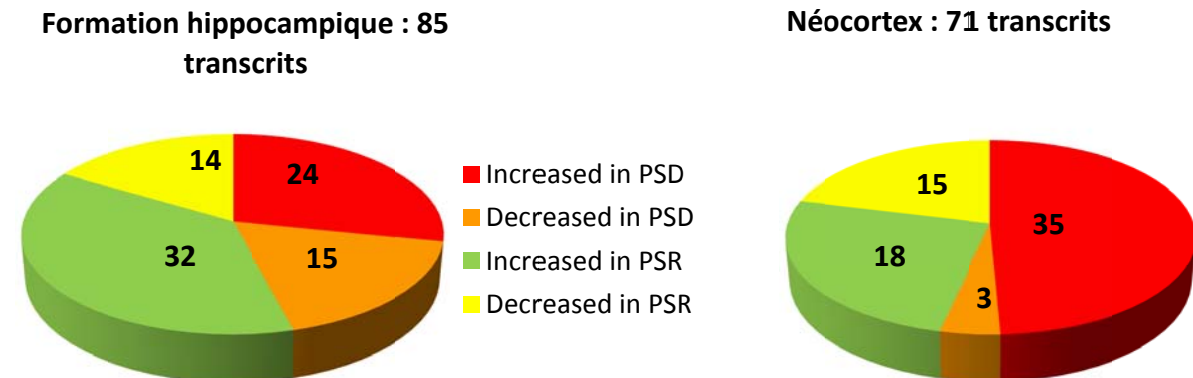
- 47 transcrits (55% du nombre total) ont un niveau d'expression associé positivement au SP : 38 ont un niveau d'expression augmenté après récupération de SP et 15 ont un niveau d'expression diminué après privation de SP.

- 37 transcrits (45% du nombre total) ont un profil d'expression associés négativement au SP, 24 ont un niveau d'expression augmenté après privation de SP et 14 ont un niveau d'expression diminué après hypersomnie de SP.

Dans le néocortex, Le niveau d'expression de 71 transcrits (47 gènes et 24 EST) a été modifié :

- Seulement 21 transcrits (30% du nombre total) ont un niveau d'expression associé positivement au SP : 18 ont un niveau d'expression augmenté après récupération de SP et 3 ont un niveau d'expression diminué après privation de SP.

- 50 transcrits (70% du nombre total) seraient associés négativement au SP : 35 ont un niveau d'expression augmenté après privation de SP et 15 ont un niveau d'expression diminué après récupération de SP.



**Figure 4 : Nombre de gènes ayant un niveau d'expression modifié entre au moins 2 des 3 conditions expérimentales.** En rouge, transcrits avec un niveau d'expression augmenté entre PSD vs PSC. En orange, transcrits avec un niveau d'expression diminué entre PSD vs PSC. En vert, transcrits avec un niveau d'expression augmenté entre PSR vs PSC ou/et PSD. En jaune, transcrits avec un niveau d'expression diminué entre PSR vs PSC ou/et PSD.

Les fonctions des gènes dont l'expression est significativement modulée par le SP ont été identifiées à l'aide de la banque de données « Gene Ontology » (<http://www.geneontology.org/>) et d'une recherche bibliographique (Tableau 1).

### 1) Dans la formation hippocampique :

16 gènes connus pour leur implication dans la plasticité synaptique et le développement neuronal ont un niveau d'expression augmenté après récupération de SP par rapport aux PSC ou au PSD ou diminué après privation de SP par rapport au PSC. Ces gènes sont des gènes impliqués dans la plasticité synaptique dont la plupart sont des gènes d'activation précoces (IEGs) et correspondent aux gènes *Fos*, *Egr2*, *Klf10 (Tieg)*, *Nr4a3*, *Nr4a1*, *Egr1 (zif-268)*, *Rbm3*, *Homer1*, *Ptgs2 (Cox2)*, *Nptx2*, *Arc*, *Pcdh8*, *Sncg*, *Bdnf*, *Mas1*, *Rgs2*.

Les gènes avec un niveau d'expression augmenté après privation de SP ou diminué après récupération de SP, sont pour la plupart impliqués dans diverses voies métaboliques (7), le stress (2) et les processus apoptotiques (5).

### 2) Dans le néocortex :

Parmi les gènes qui ont un niveau d'expression augmenté après privation de SP ou moins souvent diminué après récupération de SP, 5 sont impliqués dans diverses voies métaboliques, 6 dans la réponse au stress, 6 dans les processus apoptotiques, mais aussi 4 d'entre eux sont des IEGs impliqués dans la plasticité synaptique (*Homer1, Arc, Fos, Nr4a1*).

6 gènes ont un niveau d'expression augmenté après récupération de SP ou diminué après privation de SP, ils sont impliqués principalement dans le développement neuronal (*Bdnf, Ntrk2, Mas1, Nptx2, Scg2, Syne1 (CPG2)*).

	Hippocampal Formation		Neocortex	
	PS+	PS-	PS+	PS-
<b>Nervous system development ; apoptosis</b>	<b>5</b> <i>Sncg, Bdnf, Slc5a3, Mas1, S100a4</i>	<b>5</b> <i>Faim2, Clip1, Htra1, Sgk, Gjb6</i>	<b>5</b> <i>Bdnf, Ntrk2, Mas1, Scg2, Syne1 (CPG2)</i>	<b>6</b> <i>Slc5a3, Htra1, Sgk, Egfr1, Itga1, Cryab</i>
<b>Signal transduction</b>	<b>4</b> <i>Pdpk1, Mt1a, Rgs2, Gnb1</i>	<b>0</b>	<b>1</b> <i>Avp</i>	<b>6</b> <i>Col3a1, Ddit4, Dusp1, Cort, Dusp6, Alb</i>
<b>Transcription, regulation</b>	<b>7</b> <i>Fos, Egr2, Klf10 (Tieg), Nr4a3, Nr4a1, Egr1 (zif-268), Rbm3</i>	<b>1</b> <i>Khsrp</i>	<b>1</b> <i>Rbm3</i>	<b>5</b> <i>Fos, Nr4a1, Etv5_predicted, Dbp, Klf9</i>
<b>Synaptic transmission</b>	<b>5</b> <i>Homer1, Ptgs2 (Cox2), Nptx2, Arc, Pcdh8</i>	<b>0</b>	<b>1</b> <i>Nptx2</i>	<b>4</b> <i>Homer1, Arc, Alb, Vgf</i>
<b>Ion transport</b>	<b>0</b>	<b>2</b> <i>Fxyd6, Camk2d</i>	<b>0</b>	<b>1</b> <i>Camk2n1</i>
<b>Inflammatory response</b>	<b>1</b> <i>C3</i>	<b>0</b>	<b>1</b> <i>C3</i>	<b>0</b>
<b>Metabolism</b>	<b>0</b>	<b>7</b> <i>Bcat1, Itih3, Lrg1, Ldb2_predicted, Prkaa2, Sc5d, Gpd1</i>	<b>1</b> <i>Apoc1</i>	<b>5</b> <i>Bcat1, Sc5d, Gpd1, Sult1a1, Alas2</i>
<b>Response to stress</b>	<b>0</b>	<b>2</b> <i>Sgk, Prkaa2</i>	<b>1</b> <i>Avp</i>	<b>6</b> <i>Sult1a1, Cort, Oxt, Egfr, Sgk, Cryab</i>

**Tableau 1 : Classification fonctionnelle des gènes dont le niveau d'expression est corrélé au SP.** Lignes : Rôles fonctionnels d'après la banque de données GO et issus de notre recherche bibliographique. Colonnes : association positive (SP+) ou négative (SP-) par le SP de l'expression génique selon la structure cérébrale considérée. Abréviations : *Alas 2*, aminolevulinic acid synthase 2 ; *Alb*, albumin ; *Apoc1*, apolipoprotein C-1 ; *Arc*, Activity-regulated cytoskeletal-associated protein ; *Avp*, arginine vasopressin ; *Bcat1*, branched chain aminotransferase 1, cytosolic ; *BDNF*, Brain-derived nerve factor ; *C3*, complement component 3 ; *Camk2d*, calcium/calmodulin-dependent protein kinase II ; *Camk2n1*, calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1 ; *Col3a1*, procollagen, type III, alpha 1 ; *Cort*, corticosterone ; *CPG2*, CPG2 protein ; *Cryab*, crystallin, alpha B ; *Dbp*, D site albumin promoter binding protein ; *Ddit4*, DNA-damage-inducible transcript 4 ; *Dusp1/6*, dual specificity phosphatase 1/6 ; *Egfr*, epidermal growth factor receptor ; *Egr 1(ou Zif-268)/2*, Early growth

response 1/2 ; *Faim2*, fas apoptotic inhibitory molecule 2 ; *Fos*, FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog ; *Fxyd6*, FXDY domain-containing ion transport regulator 6 ; *Gjb6 (cx-30)* gap junction membrane channel protein beta 6 ; *Gnb1*, Guanine nucleotide binding protein alpha q polypeptide/ beta 1 ; *Gpd1*, Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 ; *Homer1*, homer homolog 1 (Drosophila) ; *Htra1*, HtrA serine peptidase 1 ; *Itga1*, integrin alpha 1 ; *Itih3*, inter-alpha trypsin inhibitor, heavy chain 3 ; *Khsrp*, KH-type splicing regulatory protein ; *Klf9/10*, Kruppel-like factor 9/10 ; *Ldb2\_predicted*, LIM domain binding 2 (predicted) ; *Lrg1*, leucine-rich alpha-2-glycoprotein1 ; *Mas1*, MAS1 oncogene ; *Mt1a*, Methallothionein ; *Nptx2*, neuronal pentraxin II ; *Nr4a1/3*, Nuclear receptor subfamily 4 group A member 1/3 ; *Ntrk2*, neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2 ; *Oxt*, oxytocin ; *Pcdh8*, Protocadherin 8 ; *Pdpk1*, 3-phosphoinositide dependent protein kinase-1 ; *Pex11b*, peroxisomal biogenesis factor 11b ; *Prkaa2*, Protein kinase AMP-activated alpha 2 catalytic subunit. ; *Ptgs2 (Cox2)*, Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 ; *Rbm3*, RNA binding motif protein 3 ; *Rgs2*, regulator of G-protein signaling 2 ; *Rsn*, restin (Reed-Steinberg cell-expressed intermediate filament-associated protein) ; *S100a4*, S100 calcium-binding protein A4 ; *Sc5d*, sterol-C5-desaturase (fungal ERG3, delta-5-desaturase) homolog (S. cerevisiae) ; *Scg2*, secretogranin 2 ; *Sgk*, Serum/glucocorticoid-regulated kinase 1 ; *Slc5a3*, Solute carrier family 5 member 3 ; *Sncg*, synuclein, gamma ; *Sult1a1*, Sulfotransferase family 1A phenol-preferring member 1 ; *Vgf*, VGF nerve growth factor inducible.

### **1.3.2 Gènes en commun entre les 2 structures**

Parmi ces gènes, 11 ont des profils d'expression similaires (Fig. 5) :

- Les gènes qui ont un niveau d'expression augmenté après récupération de SP dont *Mas1*, *Bdnf* et *Nptx2* sont impliqués dans le développement du système nerveux ou le développement synaptique.
- Les gènes qui ont un niveau d'expression augmenté après privation de SP dont *Gpd1*, *Sgk*, *Sc5d* sont impliqués dans diverses voies métaboliques. *Htra1* qui effectue une régulation négative de la croissance cellulaire.
- Seulement 1 gène a un niveau d'expression diminué après la privation de SP, c'est le *C3*, activateur du complément, un facteur d'inflammation.

D'autres gènes ont des profils d'expression très différents dans les 2 structures :

- 5 gènes ont un niveau d'expression augmenté en récupération de SP dans la formation hippocampique alors que leur niveau d'expression est diminué après privation de SP dans le néocortex. Ce sont principalement des IEGs tel que *Fos*, *Arc*, *Homer1*, *Nr4a1* et *Slc5a3* (gènes d'activation précoces) impliqués dans les mécanismes de plasticité synaptique.
- *Rbm3* a un niveau d'expression diminué après privation de SP dans le néocortex alors qu'il a un niveau d'expression augmenté après récupération de SP dans la formation hippocampique. Il est impliqué dans la production de miRNA en se liant aux ribosomes.
- *Bcat1* a aussi un niveau d'expression augmenté dans la formation hippocampique après la récupération de SP alors que son niveau d'expression diminue après cette récupération de SP dans le néocortex. Ce gène code pour une enzyme impliquée dans la synthèse des acides aminés.

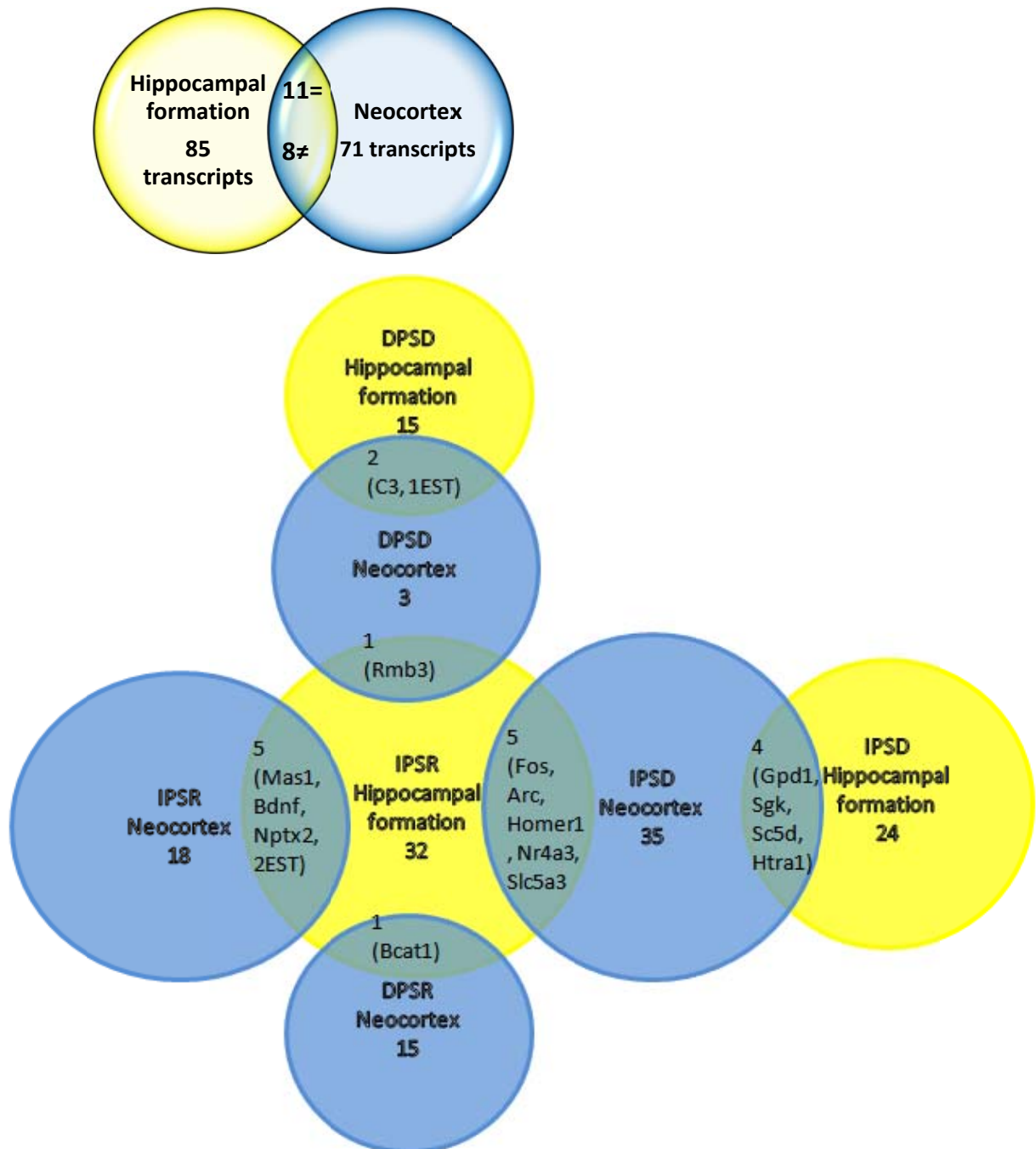


Figure 5: Nombre de gènes ayant un niveau d'expression modifié entre au moins 2 des 3 conditions expérimentales et qui sont communs aux 2 structures (les cercles en jaune concernent la formation hippocampique alors que les cercles en bleu concernent le néocortex). Les différents cercles correspondent au nombre de transcrits d'une structure et d'une catégorie (IPSD, DPSD, IPSR, DPSR). Leur chevauchement entre les 2 structures indique le nombre de gène en commun entre 2 catégories de gènes.

**1.3.3 Liste de gènes dont l'expression est modulée par notre protocole de privation-récupération de sommeil paradoxal dans la formation hippocampique**

<b>IPSR</b>	<b>ratio P/T</b>	<b>ratio R/P</b>	<b>ratio R/T</b>	<b>Gene Symbol</b>	<b>Gene Title</b>
1370454_at	0,4	1,1	1,5	Homer1	homer homolog 1 (Drosophila)
1370997_at	0,4	0,9	1,4	Homer1	homer homolog 1 (Drosophila)
1392108_at	0,3	1,2	1,2	---	RM2 mRNA, partial sequence
1375043_at	0,4	0,7	1,0	Fos	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
1387306_a_at	-0,2	1,2	1,0	Egr2	early growth response 2
1398245_at	0,2	0,9	1,0	Sncg	synuclein, gamma
1383486_at	0,2	0,7	1,0	---	Transcribed locus
1368527_at	-0,1	0,8	0,8	Ptgs2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2
1391305_at	-0,2	1,0	0,7	---	---
1393119_at	0,1	0,7	0,7	---	Transcribed locus
1368677_at	-0,1	0,7	0,7	Bdnf	brain derived neurotrophic factor
1374429_at	0,3	0,5	0,7	---	Transcribed locus
1392791_at	-0,1	0,6	0,6	---	Transcribed locus
1370052_at	0,4	0,5	0,6	Pdpk1	3-phosphoinositide dependent protein kinase-1
1368650_at	-0,1	0,7	0,6	Klf10	Kruppel-like factor 10
1382561_at	0,1	0,7	0,6	---	---
1369067_at	0,1	0,4	0,6	Nr4a3	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3
1371237_a_at	0,2	0,6	0,5	Mt1a	metallothionein 1a
1373559_at	-0,1	0,5	0,5	Nptx2	neuronal pentraxin II
1387068_at	-0,2	0,6	0,5	Arc	activity regulated cytoskeletal-associated protein
1386935_at	-0,1	0,6	0,5	Nr4a1	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1
1392349_at	0,6	0,3	0,5	Slc5a3	solute carrier family 5 (inositol transporters), member 3
1368321_at	-0,1	0,6	0,4	Egr1	early growth response 1
1370092_at	0,2	0,2	0,4	Mas1	MAS1 oncogene
1392044_at	0,2	0,2	0,4	---	Transcribed locus
1393029_at	0,1	0,3	0,4	---	Transcribed locus
1392785_at	0,1	0,3	0,4	---	Transcribed locus
1393389_at	-0,1	0,5	0,4	Nr4a3	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3
1368144_at	-0,1	0,4	0,3	Rgs2	regulator of G-protein signaling 2
1391013_at	-0,1	0,3	0,3	Pcdh8	Protocadherin 8
1367732_at	-0,2	0,4	0,2	Gnb1 /// Gnb4	guanine nucleotide binding protein, beta 1 /// guanine nucleotide binding protein beta 4 subunit
1371583_at	-0,5	0,4	0,1	Rbm3	RNA binding motif protein 3
<b>DPSD</b>	<b>ratio P/T</b>	<b>ratio R/P</b>	<b>ratio R/T</b>	<b>Gene Symbol</b>	<b>Gene Title</b>
1378052_at	-1,2	0,8	-0,4	---	---
1368000_at	-0,7	0,1	-0,7	C3	complement component 3
1375519_at	-0,7	-0,9	-1,5	LOC287167	globin, alpha
1371245_a_at	-0,6	-0,9	-1,6	LOC689064	beta-globin
1388608_x_at	-0,6	-0,7	-1,3	Hba-a1 /// LOC360504	hemoglobin alpha, adult chain 1 /// hemoglobin alpha 2 chain
1367846_at	-0,6	-0,8	-0,3	S100a4	S100 calcium-binding protein A4



1371102_x_at	<b>-0,5</b>	<b>-0,8</b>	<b>-1,3</b>	<b>MGC72973</b>	beta-glo
1376780_at	<b>-0,5</b>	0,2	-0,3	<b>RGD1310022</b>	similar to RIKEN cDNA 2610204K14
1389006_at	<b>-0,5</b>	0,7	<b>-0,5</b>	---	Transcribed locus
1380552_at	<b>-0,5</b>	<b>0,7</b>	-0,2	---	Transcribed locus
1367553_x_at	<b>-0,5</b>	-0,8	<b>-1,3</b>	<b>Hbb</b>	hemoglobin beta chain complex
1370240_x_at	<b>-0,5</b>	-0,6	<b>-1,1</b>	<b>Hba-a1 /// LOC360504</b>	hemoglobin alpha, adult chain 1 /// hemoglobin alpha 2 chain
1370239_at	<b>-0,5</b>	-0,6	<b>-1,1</b>	<b>Hba-a1 /// LOC360504</b>	hemoglobin alpha, adult chain 1 /// hemoglobin alpha 2 chain

<b>IPSD</b>	<b>ratio P/T</b>	<b>ratio R/P</b>	<b>ratio R/T</b>	<b>Gene Symbol</b>	<b>Gene Title</b>
1382188_at	<b>2,0</b>	-0,4	1,6	<b>RGD1311086</b>	similar to RIKEN cDNA 2610029K21
1394241_at	<b>1,7</b>	-0,5	1,8	<b>Rsn</b>	restin (Reed-Steinberg cell-expressed intermediate filament-associated protein)
1380948_at	<b>0,9</b>	-0,2	<b>0,9</b>	---	Transcribed locus
1396769_at	<b>0,8</b>	-0,4	0,3	---	---
1378960_at	<b>0,7</b>	-0,6	0,3	---	Transcribed locus
1384136_at	<b>0,7</b>	-0,2	<b>0,9</b>	<b>RGD1564287_predicted</b>	similar to mKIAA0704 protein (predicted)
1371363_at	<b>0,7</b>	-0,3	0,4	<b>Gpd1</b>	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble)
1395772_at	<b>0,7</b>	-0,2	0,6	---	---
1377516_at	<b>0,7</b>	-0,1	0,7	---	Transcribed locus
1390777_at	<b>0,7</b>	-0,5	0,4	<b>Sc5d</b>	sterol-C5-desaturase (fungal ERG3, delta-5-desaturase) homolog (S. cerevisiae)
1367802_at	<b>0,7</b>	-0,3	0,3	<b>Sgk</b>	serum/glucocorticoid regulated kinase
1380763_at	<b>0,6</b>	-0,3	0,4	---	Transcribed locus, strongly similar to XP_001084509.1 similar to spermatid perinuclear RNA-binding protein isoform 4 [Macaca mulatta]
1389937_at	<b>0,6</b>	-0,7	0,3	---	Transcribed locus
1377762_at	<b>0,6</b>	-0,4	0,1	---	Transcribed locus
1387926_at	<b>0,6</b>	-0,3	0,3	<b>Sc5d</b>	sterol-C5-desaturase (fungal ERG3, delta-5-desaturase) homolog (S. cerevisiae)
1369654_at	<b>0,5</b>	-0,3	0,3	<b>Prkaa2</b>	protein kinase, AMP-activated, alpha 2 catalytic subunit
1389986_at	<b>0,4</b>	-0,3	0,2	---	CDNA clone IMAGE:7321089
1392823_at	<b>0,4</b>	-0,3	0,2	<b>RGD1563912_predicted</b>	RGD1563912 (predicted)
1368577_at	<b>0,4</b>	-0,2	0,1	<b>Gjb6</b>	gap junction membrane channel protein beta 6
1392717_at	<b>0,4</b>	-0,1	0,3	---	Transcribed locus
1391935_at	<b>0,4</b>	-0,3	0,2	<b>LOC297481</b>	similar to eukaryotic translation initiation factor 4E member 3
1388271_at	<b>0,4</b>	0,1	<b>0,4</b>	<b>LOC682651 /// LOC689415</b>	similar to Metallothionein-2 (MT-2) (Metallothionein-II) (MT-II)
1391743_at	<b>0,3</b>	-0,2	0,2	<b>Elav1_predicted</b>	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 1 (Hu antigen R) (predicted)
1386884_at	<b>0,3</b>	-0,1	0,2	<b>Htra1</b>	HtrA serine peptidase 1
<b>DSPR</b>	<b>ratio P/T</b>	<b>ratio R/P</b>	<b>ratio R/T</b>	<b>Gene Symbol</b>	<b>Gene Title</b>
1373062_at	0,6	<b>-1,1</b>	-0,6	<b>LOC498922</b>	similar to cerebellin 1 precursor protein
1376873_at	-0,2	-0,3	<b>-0,6</b>	---	Transcribed locus
1370248_at	-0,1	-0,3	<b>-0,5</b>	<b>Fxyd6</b>	FXD domain-containing ion transport

					<b>regulator 6</b>
1383824_at	-0,2	-0,4	<b>-0,5</b>	<b>Lrg1</b>	<b>leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1</b>
1374626_at	-0,2	<b>-0,6</b>	-0,5	---	<b>Transcribed locus</b>
1370625_at	-0,3	-0,1	<b>-0,4</b>	<b>Faim2</b>	<b>Fas apoptotic inhibitory molecule 2</b>
1369520_a_a t	-0,2	-0,3	<b>-0,4</b>	<b>Bcat1</b>	<b>branched chain aminotransferase 1, cytosolic</b>
1376911_at	0,0	<b>-0,5</b>	-0,4	<b>Itih3</b>	<b>inter-alpha trypsin inhibitor, heavy chain 3</b>
1368834_at	-0,1	-0,4	<b>-0,4</b>	<b>Camk2d</b>	<b>calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, delta</b>
1390167_at	-0,1	-0,3	<b>-0,4</b>	<b>Khsrp</b>	<b>KH-type splicing regulatory protein</b>
1372345_at	-0,1	-0,2	<b>-0,3</b>	---	---
1392360_at	0,8	<b>-1,0</b>	-0,3	---	<b>Transcribed locus</b>
1375426_a_a t	0,1	<b>-0,4</b>	-0,2	<b>Ldb2_predicted</b>	<b>LIM domain binding 2 (predicted)</b>
1387291_at	0,2	<b>-0,3</b>	0,0	<b>RGD1306256_predicted</b>	<b>similar to hypothetical protein FLJ30373 (predicted)</b>

**Tableau 1: Liste complète des gènes et ESTs dans la formation hippocampique qui ont un niveau d'expression modifié par notre protocole.** Pour chaque comparaison intergroupe (PSC vs PSD, PSC vs PSR, PSD vs PSR), les modulations d'expression significatives sont déterminées par des tests non paramétriques appariés (Microarray Suite 5.0, Affymetrix). Les niveaux d'expressions des transcrits sont considérés comme modifiés dans la formation hippocampique entre 2 conditions expérimentales quand les 3 comparaisons entre les puces des différentes conditions du groupe 1 et celles du groupe 2 ainsi que celles du répliqua technique les désignent comme augmentés ou diminués. Les 4 tableaux représentent les 4 groupes de transcrits identifiés : ceux dont le niveau d'expression augmente (I-PSR) ou diminue (D-PSR) pendant la récupération de SP en comparaison des groupes PSD et PSC ; ceux dont le niveau d'expression augmente (I-PSD) ou diminue (D-PSD) pendant la privation de SP en comparaison du groupe PSC. La première colonne montre l'identifiant de la sonde affymetrix, les 3 suivantes le log ratio moyen entre 2 conditions expérimentales (le nombre est en gras lorsque la différence est significative p value <0,05), la 4ème colonne le symbole du gène et la dernière le titre du gène.

**1.3.4 Liste de gènes dont le niveau d'expression est modifié par notre protocole dans le néocortex**

<b>IPSD</b>	<b>ratio P/T</b>	<b>ratio R/P</b>	<b>ratio R/T</b>	<b>Gene Symbol</b>	<b>Gene Title</b>
1368312_at	4,4	-0,7	4,2	Oxt	oxytocin
1369560_at	1,2	-1,2	0,3	Gpd1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble)
1393455_at	1,0	-0,2	0,8	---	Basophil leukemia expressed sequence Bles05 mRNA, partial sequence
1371363_at	0,9	-0,5	0,4	Gpd1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble)
1370830_at	0,9	-0,5	0,4	Egfr	epidermal growth factor receptor
1375043_at	0,9	-0,5	0,4	Fos	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
1387068_at	0,9	-0,8	0,1	Arc	activity regulated cytoskeletal-associated protein
1390777_at	0,8	-0,3	0,5	Sc5d	sterol-C5-desaturase (fungal ERG3, delta-5-desaturase) homolog (S. cerevisiae)
1383510_at	0,8	-0,4	0,6	---	Transcribed locus
1387144_at	0,8	-0,4	0,5	Itga1	integrin alpha 1
1370019_at	0,8	-0,1	0,7	Sult1a1	sulfotransferase family 1A, phenol-preferring, member 1
1367802_at	0,7	-0,6	0,1	Sgk	serum/glucocorticoid regulated kinase
1370997_at	0,7	-0,3	0,4	Homer1	homer homolog 1 (Drosophila)
1372923_at	0,7	-0,3	0,4	Pex11b	peroxisomal biogenesis factor 11b
1387926_at	0,6	-0,4	0,2	Sc5d	sterol-C5-desaturase (fungal ERG3, delta-5-desaturase) homolog (S. cerevisiae)
1392349_at	0,6	-0,2	0,4	Slc5a3	solute carrier family 5 (inositol transporters), member 3
1386935_at	0,5	-0,2	0,4	Nr4a1	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1
1391418_at	0,5	-0,4	0,9	---	---
1367555_at	0,5	-0,1	0,4	Alb	albumin
1369520_a_at	0,5	-0,3	0,1	Bcat1	branched chain aminotransferase 1, cytosolic
1391523_at	0,5	-0,3	0,2	---	Transcribed locus
1392598_at	0,5	-0,2	0,3	---	Transcribed locus
1377629_at	0,5	-0,2	0,2	---	Transcribed locus
1379148_at	0,5	-0,7	-0,2	---	Transcribed locus
1368146_at	0,4	-0,5	0,0	Dusp1	dual specificity phosphatase 1
1383447_at	0,4	-0,1	0,4	Etv5_predicted	ets variant gene 5 (ets-related molecule) (predicted)
1389876_at	0,4	-0,2	0,4	Camk2n1	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1
1393252_at	0,4	-0,2	0,4	---	Transcribed locus
1370026_at	0,4	-0,2	0,2	Cryab	crystallin, alpha B
1387337_at	0,4	-0,1	0,4	Cort	cortistatin
1376463_at	0,4	-0,5	-0,3	---	Transcribed locus
1383162_at	0,4	-0,4	0,5	---	---
1386884_at	0,4	-0,1	0,2	Htra1	HtrA serine peptidase 1
1387024_at	0,4	-0,2	0,1	Dusp6	dual specificity phosphatase 6
<b>IPSR</b>	<b>Ratio P/T</b>	<b>Ratio R/P</b>	<b>Ratio R/T</b>	<b>Gene Symbol</b>	<b>Gene Title</b>
1387317_at	-3,1	1,0	4,1	Avp	arginine vasopressin

1397185_at	-0,4	0,6	<b>1,2</b>	---	Transcribed locus
1368677_at	-0,3	0,6	<b>0,8</b>	<b>Bdnf</b>	brain derived neurotrophic factor
1370092_at	-0,1	<b>0,5</b>	0,7	<b>Mas1</b>	MAS1 oncogene
1373559_at	-0,2	0,4	<b>0,6</b>	<b>Nptx2</b>	neuronal pentraxin II
1393119_at	-0,3	0,2	<b>0,6</b>	---	Transcribed locus
1390958_at	0,1	<b>0,5</b>	<b>0,6</b>	---	Transcribed locus
1373035_at	-0,1	0,4	<b>0,6</b>	---	---
1394477_at	-0,5	0,1	<b>0,5</b>	<b>LOC682058</b>	similar to nucleolar protein with MIF4G domain 1
1392108_at	-0,5	0,1	<b>0,5</b>	---	RM2 mRNA, partial sequence
1397225_at	-0,3	0,2	<b>0,5</b>	---	Transcribed locus
1368044_at	-0,1	<b>0,4</b>	<b>0,4</b>	<b>Scg2</b>	secretogranin 2
1368587_at	-0,2	0,2	<b>0,4</b>	<b>Apoc1</b>	apolipoprotein C-I
1375532_at	-0,1	0,3	<b>0,4</b>	---	Transcribed locus
1391256_at	-0,2	0,3	<b>0,4</b>	---	Transcribed locus
1397246_at	-0,2	0,2	<b>0,4</b>	<b>Ntrk2</b>	Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2
1398263_at	-0,1	0,2	<b>0,3</b>	<b>CPG2</b>	CPG2 protein
1383205_at	0,3	<b>0,3</b>	0,0	<b>Dact2_predicted</b>	dapper homolog 2, antagonist of beta-catenin (xenopus) (predicted)
DPSR	Ratio P/T	Ratio R/P	Ratio R/T	Gene Symbol	Gene Title
1367985_at	-0,5	-0,8	<b>-1,4</b>	<b>Alas2</b>	aminolevulinic acid synthase 2
1371102_x_at	-0,3	<b>-1,0</b>	<b>-1,2</b>	<b>MGC72973</b>	beta-glo
1371245_a_at	-0,4	<b>-0,8</b>	<b>-1,2</b>	<b>LOC689064</b>	beta-globin
1367553_x_at	-0,3	<b>-0,9</b>	<b>-1,2</b>	<b>Hbb</b>	hemoglobin beta chain complex
1388608_x_at	-0,2	<b>-0,9</b>	<b>-1,-1</b>	<b>Hba-a1 /// LOC360504</b>	hemoglobin alpha, adult chain 1 /// hemoglobin alpha 2 chain
1375519_at	-0,3	-0,7	<b>-1,0</b>	<b>LOC287167</b>	globin, alpha
1370240_x_at	-0,2	<b>-0,7</b>	<b>-1,0</b>	<b>Hba-a1 /// LOC360504</b>	hemoglobin alpha, adult chain 1 /// hemoglobin alpha 2 chain
1370239_at	-0,2	<b>-0,7</b>	<b>-0,9</b>	<b>Hba-a1 /// LOC360504</b>	hemoglobin alpha, adult chain 1 /// hemoglobin alpha 2 chain
1370959_at	-0,3	-0,4	<b>-0,5</b>	<b>Col3a1</b>	procollagen, type III, alpha 1
1376928_at	0,2	<b>-0,7</b>	-0,4	---	Transcribed locus
1387874_at	-0,2	-0,1	<b>-0,4</b>	<b>Dbp</b>	D site albumin promoter binding protein
1368025_at	0,3	<b>-0,5</b>	-0,3	<b>Ddit4</b>	DNA-damage-inducible transcript 4
1378960_at	0,6	<b>-0,8</b>	-0,2	---	Transcribed locus
1377133_at	0,7	<b>-0,7</b>	-0,2	<b>LOC680687</b>	Hypothetical protein LOC680687
1387882_at	0,4	<b>-0,4</b>	-0,1	<b>Klf9</b>	Kruppel-like factor 9
DPSD	Ratio P/T	Ratio R/P	Ratio R/T	Gene Symbol	Gene Title
1376780_at	<b>-0,7</b>	0,6	-0,2	<b>RGD1310022</b>	similar to RIKEN cDNA 2610204K14
1368000_at	<b>-0,4</b>	-0,7	<b>-1,1</b>	<b>C3</b>	complement component 3
1371583_at	<b>-0,4</b>	0,3	-0,1	<b>Rbm3</b>	RNA binding motif protein 3

**Tableau 2: Liste complète des gènes et ESTs dans le néocortex qui ont un niveau d'expression modifié par notre protocole.**

Pour chaque comparaison intergroupe (PSC vs PSD, PSC vs PSR, PSD vs PSR), les modulations d'expression significatives sont déterminées par des tests non paramétriques appariés (Microarray Suite 5.0, Affymetrix). Les niveaux d'expressions des transcrits sont considérés comme modifiés dans le néocortex entre 2 conditions expérimentales quand les 3 comparaisons entre les puces des différentes conditions du groupe 1 et celles du groupe 2 ainsi que celles du réplica technique les désignent comme augmentés ou diminués. Les 4 tableaux représentent les 4 groupes de transcrits identifiés : ceux dont le niveau d'expression augmente (I-PSR) ou diminue (D-PSR) pendant la récupération de SP en comparaison des groupes PSD et PSC ; ceux dont le niveau d'expression augmente (I-PSD) ou diminue (D-PSD) pendant la privation de SP en comparaison du groupe PSC. La première colonne montre l'identifiant du transcrit Affymetrix, les 3 suivantes le log ratio moyen entre 2 conditions expérimentales (le nombre est en gras lorsque la différence est significative p value <0,05), la 4ème colonne le symbole du gène et la dernière le titre du gène.

## 1.4 Les PCRq

### 1.4.1 Vérification statistique des profils obtenus avec les puces à ADN

Les qPCR nous ont permis de vérifier les profils d'expression de 25 transcrits isolés à l'aide des puces à ADN dans les 2 structures (Fig. 6). Apart *Sc5d*, les profils d'expression des gènes ont pu être reproduits avec les qPCR dans les 2 structures. Ainsi, nous avons validé statistiquement 16 profils d'expression ; en revanche, 8 ont un profil d'expression proche de celui obtenu avec les puces à ADN mais dont les différences de niveau d'expression entre nos trois groupes de rats ne sont pas significatives. Plusieurs raisons peuvent expliquer cette absence de différence significative :

- Les puces à ADN ont été réalisées pour le groupe 1 et le groupe 2 (n=36 pour les 2 groupes) alors que les PCRq sur le groupe 1 ou 2 (n=18). La moyenne des niveaux d'expression des gènes obtenue à l'aide des qPCR concerne donc un des deux groupes de rats alors que celle obtenue à l'aide des puces à ADN concerne les deux groupes.
- La plupart de ces gènes ont un niveau d'expression faiblement modifié entre les 3 conditions (faible log ratio) d'après les résultats des puces à ADN comme pour *Nr4a3*, *Mt1a* et *Pcdh8* dans la formation hippocampique et *Scg2* et *Homer1* dans le Néocortex.
- Les variations d'expression d'un transcrit au sein d'un même groupe sont trop élevées pour être significatives comme c'est le cas pour *Sgk* dans la formation hippocampique, *Homer1* et *Bdnf* dans le néocortex.

Comme l'indiquaient les puces à ADN, les IEGs ont un niveau d'expression très augmenté après le rebond de SP dans la formation hippocampique (*Arc*, *Fos*, *zif-268*, *Homer1*) alors que dans le néocortex, ces gènes ont un niveau d'expression augmenté pendant la privation de SP et diminué non significativement pendant la récupération de SP. Seul *Bdnf* a un niveau d'expression augmenté significativement dans la formation hippocampique et non significativement dans le néocortex après récupération de SP. *Sult1a1*, *Sgk*, et *Gpd1* ont un niveau d'expression significativement augmenté après privation de SP dans les 2 structures d'après les qPCR mais les modifications d'expression de *Sult1a1* ne sont pas détectées par les puces à ADN dans le néocortex.

*Nptx2* et *Scg2* ont un niveau d'expression augmenté après récupération de SP d'après les puces à ADN dans le néocortex mais seul *Nptx2* a une expression modulé significativement d'après les PCRq. *Sncg*, *Nr4a3*, *Mt1a* et *Pcdh8* ont une expression

augmentée après récupération de SP dans la formation hippocampique d'après les puces à ADN mais seule l'expression de *Sncg* est modifiée significativement d'après les PCRq.

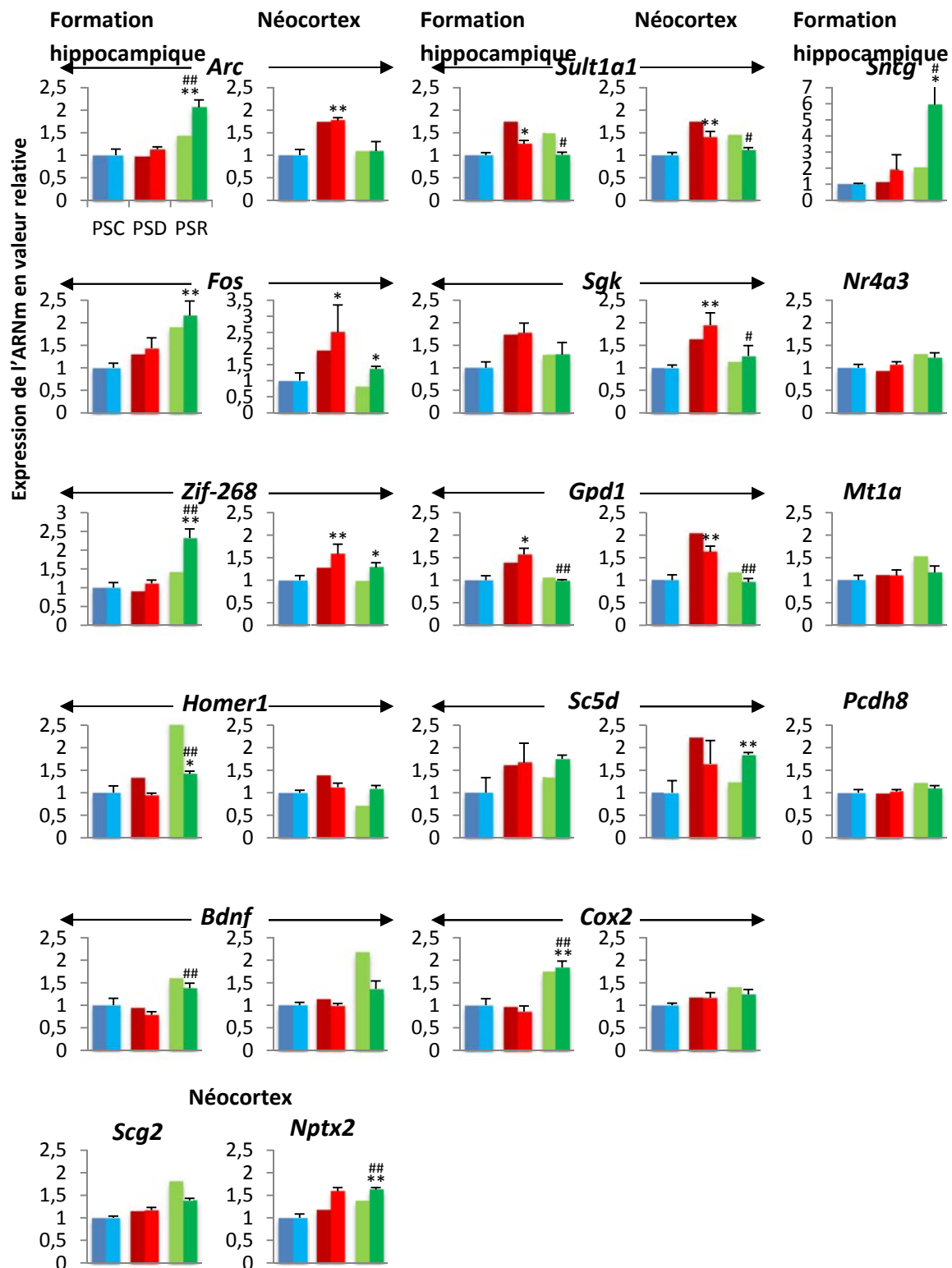


Figure 6 : Histogrammes représentant le niveau d'expression des gènes dans la formation hippocampique et le néocortex de rats PSC (en bleu), PSD (en rouge) et PSR (en vert). La barre à gauche de chaque groupe correspond à la moyenne des 3 puces à ADN en valeur relative par rapport au groupe PSC. La barre à droite de chaque groupe correspond à la moyenne des qPCR réalisées chez 6 animaux par groupe en valeur relative par rapport à la moyenne du groupe PSC. Significativité : Kruskal Wallis suivi d'un Mann Whitney. PSD vs PSC ou PSR vs PSC : \*\*p<0.01, #p<0.05. PSD vs PSR ## p<0.01, #p<0.05.

#### **1.4.2 Corrélations du niveau d'expression des gènes vs les quantités des états de vigilance et la concentration en corticostérone plasmatique**

Un nombre plus important de gènes ont un niveau d'expression corrélé avec les quantités de SP par rapport au nombre de gènes dont le niveau d'expression est corrélé avec les quantités de SL, d'EV ou les concentrations de corticostérone plasmatique (Figure 7) :

- *Bdnf* a une expression corrélée positivement avec les quantités de SP dans les 2 structures. Les expressions de *Arc*, *zif-268* et *Cox2* sont corrélées positivement avec les quantités de SP dans la formation hippocampique. Certains gènes impliqués dans la plasticité synaptique ont un niveau d'expression corrélé positivement avec les quantités de SP dans la formation hippocampique. Ce résultat n'a pas été retrouvé dans le néocortex. En effet, seule l'expression de *Arc* est corrélée avec les quantités de SP mais de façon négative. L'expression de *Gpd1* est corrélée négativement avec les quantités de SP dans les 2 structures.
- Les coefficients de corrélation positifs des niveaux d'expression de *Gpd1* et *Arc* avec les quantités d'EV sont plus élevés que ceux négatifs obtenus avec les quantités de SP ; la modulation de ces gènes serait donc plutôt liée aux quantités d'éveil qu'aux quantités de SP. Les gènes qui ont un niveau d'expression corrélé négativement avec les quantités d'EV tel que *Bdnf* et *Cox2* ont des coefficients de corrélation moins élevés que ceux obtenus avec les quantités de SP. Donc ce serait plutôt des gènes dont l'expression est liée aux quantités de SP.
- Seul *Gpd1* a un niveau d'expression corrélé négativement avec les quantités de SL dans les deux structures mais avec un coefficient de corrélation moins élevé que celui obtenu pour la corrélation avec les quantités d'EV.
- Seulement trois gènes ont un niveau d'expression corrélé positivement avec les niveaux de concentrations en corticostérone ; ce sont les gènes *Gpd1* dans les 2 structures, *Sult1a1* dans l'hippocampe et *Arc* dans le Néocortex. cependant les coefficients de corrélation sont inférieurs à ceux obtenus avec les quantités d'éveil ou faible dans le cas de *Sult1a1*.

En conclusion, ces modulations d'expression sont plutôt liées aux modifications des quantités de SP qu'aux modifications des autres états de vigilance ou du niveau de stress.

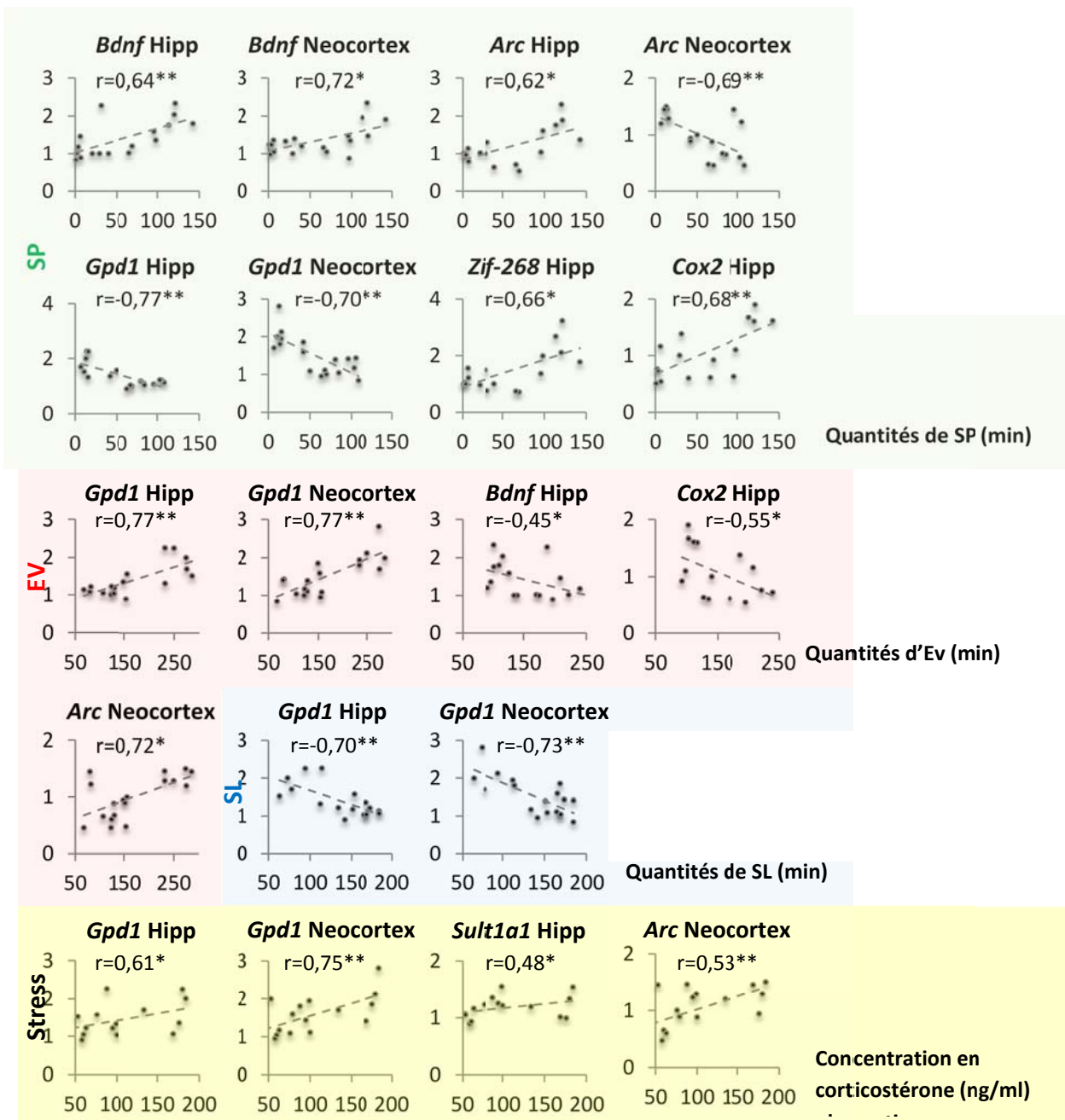


Figure 7 : Graphiques représentant les corrélations significatives entre les quantités des états de vigilance (min), SP (encadré vert), EV (encadré rouge), SL (encadré bleu), le niveau de concentration de la corticostérone plasmatique (ng/ml) Stress (encadré jaune) et le niveau d'expression des gènes mesuré par les PCRq (n=18). Significativité test de Spearman, \*\* p<0,01, \*p<0,05.



	Correlation Matrix	Etats de vigilance			Formation hippocampique								Néocortex					
		SP Gr1	SL Gr1	EV Gr1	Fos	Arc	Homer1a	Zif-268	Bdnf	Cox2	Sgk	Zif-268	Fos	Homer1	Bdnf	Sgk	Cox2	
Etats de vigilance	SP groupe 1	1,00	-0,11	-0,86	0,41	0,62	0,48	0,66	0,64	0,68	-0,37	-0,20	-0,29	0,00	0,72	-0,33	0,23	
	SL groupe 1	-0,11	1,00	-0,43	-0,32	-0,35	-0,27	-0,12	-0,24	-0,13	-0,28	-0,06	-0,08	-0,16	-0,43	-0,33	-0,30	
	EV groupe 1	-0,86	-0,43	1,00	-0,21	-0,39	-0,29	-0,54	-0,45	-0,55	0,48	0,21	0,31	0,08	-0,43	0,47	-0,05	
Formation hippocampique	Fos	0,41	-0,32	-0,21	1,00	0,65	0,36	0,76	0,58	0,69	-0,23	0,37	0,38	0,02	0,50	-0,25	0,20	
	Arc	0,62	-0,35	-0,39	0,65	1,00	0,81	0,81	0,76	0,82	-0,01	0,13	0,00	0,21	0,82	-0,14	0,36	
	Homer1	0,48	-0,27	-0,29	0,36	0,81	1,00	0,61	0,75	0,80	0,06	-0,14	-0,22	0,25	0,67	-0,17	0,19	
	Zif-268	0,66	-0,12	-0,54	0,76	0,81	0,61	1,00	0,60	0,78	-0,21	0,19	0,09	0,09	0,59	-0,23	0,14	
	Bdnf	0,64	-0,24	-0,45	0,58	0,76	0,75	0,60	1,00	0,87	-0,27	-0,14	-0,06	-0,04	0,69	-0,48	0,19	
	Cox2	0,68	-0,13	-0,55	0,69	0,82	0,80	0,78	0,87	1,00	-0,26	0,02	-0,02	0,07	0,71	-0,42	0,21	
	Sgk	-0,37	-0,28	0,48	-0,23	-0,01	0,06	-0,21	-0,27	-0,26	1,00	-0,07	-0,17	0,16	0,25	0,88	-0,04	
Néocortex	Zif-268	-0,20	-0,06	0,21	0,37	0,13	-0,14	0,19	-0,14	0,02	-0,07	1,00	0,85	0,54	0,19	0,15	0,64	
	Fos	-0,29	-0,08	0,31	0,38	0,00	-0,22	0,09	-0,06	-0,02	-0,17	0,85	1,00	0,18	-0,03	-0,01	0,36	
	Homer1	0,00	-0,16	0,08	0,02	0,21	0,25	0,09	-0,04	0,07	0,16	0,54	0,18	1,00	0,39	0,30	0,81	
	Bdnf	0,72	-0,43	-0,43	0,50	0,82	0,67	0,59	0,69	0,71	-0,25	0,19	-0,03	0,39	1,00	-0,23	0,63	
	Sgk	-0,33	-0,33	0,47	-0,25	-0,14	-0,17	-0,23	-0,48	-0,42	0,88	0,15	-0,01	0,30	-0,23	1,00	0,14	
	Cox2	0,23	-0,30	-0,05	0,20	0,36	0,19	0,14	0,19	0,21	-0,04	0,64	0,36	0,81	0,63	0,14	1,00	
		SP Gr2	SL Gr2	EV Gr2	Gpd1	Sult1a1	Sncg	Mt1a	Pcdh8	Nr4a3	Sc5d	Arc	Gpd1	Sult1a1	Sc5d	Nptx2	Scg2	
Etats de vigilance	SP groupe2	1,00	0,81	-0,94	-0,77	-0,40	0,79	0,00	0,58	0,70	-0,16	-0,69	-0,74	-0,45	-0,16	-0,15	0,36	
	SL groupe2	0,81	1,00	-0,96	-0,70	-0,49	0,42	0,07	0,43	0,40	-0,27	-0,68	-0,73	-0,68	-0,31	-0,27	0,14	
	EV group2	-0,94	-0,96	1,00	0,77	0,47	-0,62	-0,04	-0,52	-0,57	0,23	0,72	0,77	0,60	0,25	0,23	-0,25	
Formation hippocampique	Gpd1	-0,77	-0,70	0,77	1,00	0,75	-0,35	0,41	-0,43	-0,30	0,48	0,81	0,81	0,62	0,52	0,49	0,00	
	Sult1a1	-0,40	-0,49	0,47	0,75	1,00	-0,08	0,35	-0,20	-0,09	0,33	0,74	0,71	0,76	0,45	0,37	-0,09	
	Sncg	0,79	0,42	-0,62	-0,35	-0,08	1,00	0,19	0,45	0,86	0,15	-0,23	-0,37	-0,07	0,16	0,32	0,61	
	Mt1a	0,00	0,07	-0,04	0,41	0,35	0,19	1,00	0,08	0,12	0,34	0,31	0,14	-0,02	0,15	0,29	0,32	
	Pcdh8	0,58	0,43	-0,52	-0,43	-0,20	0,45	0,08	1,00	0,58	-0,25	-0,58	-0,42	-0,20	-0,29	-0,01	0,30	
	Nr4a3	0,70	0,40	-0,57	-0,30	-0,09	0,86	0,12	0,58	1,00	0,02	-0,29	-0,42	-0,07	0,02	0,46	0,73	
	Sc5d	-0,16	-0,27	0,23	0,48	0,33	0,15	0,34	-0,25	0,02	1,00	0,38	0,57	0,42	0,95	0,04	0,22	
Néocortex	Arc	-0,69	-0,68	0,72	0,81	0,74	-0,23	0,31	-0,58	-0,29	0,38	1,00	0,85	0,64	0,41	0,50	-0,03	
	Gpd1	-0,74	-0,73	0,77	0,81	0,71	-0,37	0,14	-0,42	-0,42	0,57	0,85	1,00	0,80	0,62	0,19	-0,26	
	Sult1a1	-0,45	-0,68	0,60	0,62	0,76	-0,07	-0,02	-0,20	-0,07	0,42	0,64	0,80	1,00	0,54	0,17	-0,27	
	Sc5d	-0,16	-0,31	0,25	0,52	0,45	0,16	0,15	-0,29	0,02	0,95	0,41	0,62	0,54	1,00	0,10	0,15	
	Nptx2	-0,15	-0,27	0,23	0,49	0,37	0,32	0,29	-0,01	0,46	0,04	0,50	0,19	0,17	0,10	1,00	0,68	
	Scg2	0,36	0,14	-0,25	0,00	-0,09	0,61	0,32	0,30	0,73	0,22	-0,03	-0,26	-0,27	0,15	0,68	1,00	
	Corticostérone	-0,51	-0,31	0,42	0,61	0,58	-0,33	0,12	-0,31	-0,50	0,43	0,53	0,75	0,48	0,53	-0,02	-0,42	

Tableau 4 : tableau croisé des coefficients de corrélation entre les niveaux d'expression des différents gènes vérifiés en qPCR, des quantités des états de vigilance et des concentrations en corticostérone. Les cellules grisées représentent des corrélations significatives d'après le test de Spearman avec une p-value au moins inférieure à 0,05.

### **1.4.3 Corrélation des niveaux d'expression des gènes entre eux**

Le coefficient de corrélation entre les niveaux d'expression de deux gènes (Tableau 4) est un indicateur d'un possible lien entre leur expression. Ainsi le tableau croisé des coefficients de corrélation nous indique que :

- Dans la formation hippocampique : les IEGs *Fos*, *Arc*, *Homer1*, *zif-268*, *Bdnf* et *Cox2* ont un niveau d'expression très fortement corrélé entre eux à l'exception des corrélations entre les niveaux d'expression d'*Homer1* et *Fos*, de *Bdnf* et *Fos* et de *Bdnf* et *zif-268*. L'expression de *Nr4a3* est corrélée avec celle de *Pcdh8* et *Sncg*. L'expression de *Gpd1* est corrélée avec celle de *Sult1a1*.
- Dans le néocortex : l'expression de *Zif-268* est corrélée avec celle de *Fos* et *Homer1* ; l'expression de *Cox2* est corrélée avec celle d'*Homer1*. L'expression d'*Arc* est corrélée avec celle de *Gpd1* et *Sult1a1* ; l'expression de *Sult1a1* est corrélée avec celle de *Gpd1*.
- Corrélation inter structures : *Sgk*, *Sult1a1* et *Sc5d* dans la formation hippocampique ont des niveaux d'expression corrélés entre l'expression de leur homologue dans le néocortex. Dans le Néocortex l'expression de *Bdnf* est corrélée avec celle d'*Arc*, *Homer1*, *zif-268*, *Bdnf* et *Cox2* dans la formation hippocampique. L'expression de *Gpd1* dans la formation hippocampique est corrélée avec celle de *Arc*, *Gpd1* et *Sult1a1* dans le néocortex. L'expression de *Sncg* dans la formation hippocampique est corrélée avec celle de *Scg2* dans le néocortex.

En conclusion, il est donc possible que certains gènes puissent avoir une expression qui dépendante de celle d'autres gènes. Cette dépendance a surtout été observée entre les gènes impliqués dans la plasticité synaptique.

La modulation des quantités de SP induit une modification de l'expression de transcrits très différente dans la formation hippocampique et dans le néocortex. Nous avons constaté que l'expression de gènes avec un rôle crucial dans la plasticité synaptique et l'apprentissage est modulée de façon opposée par les quantités de SP dans le néocortex et l'hippocampe.

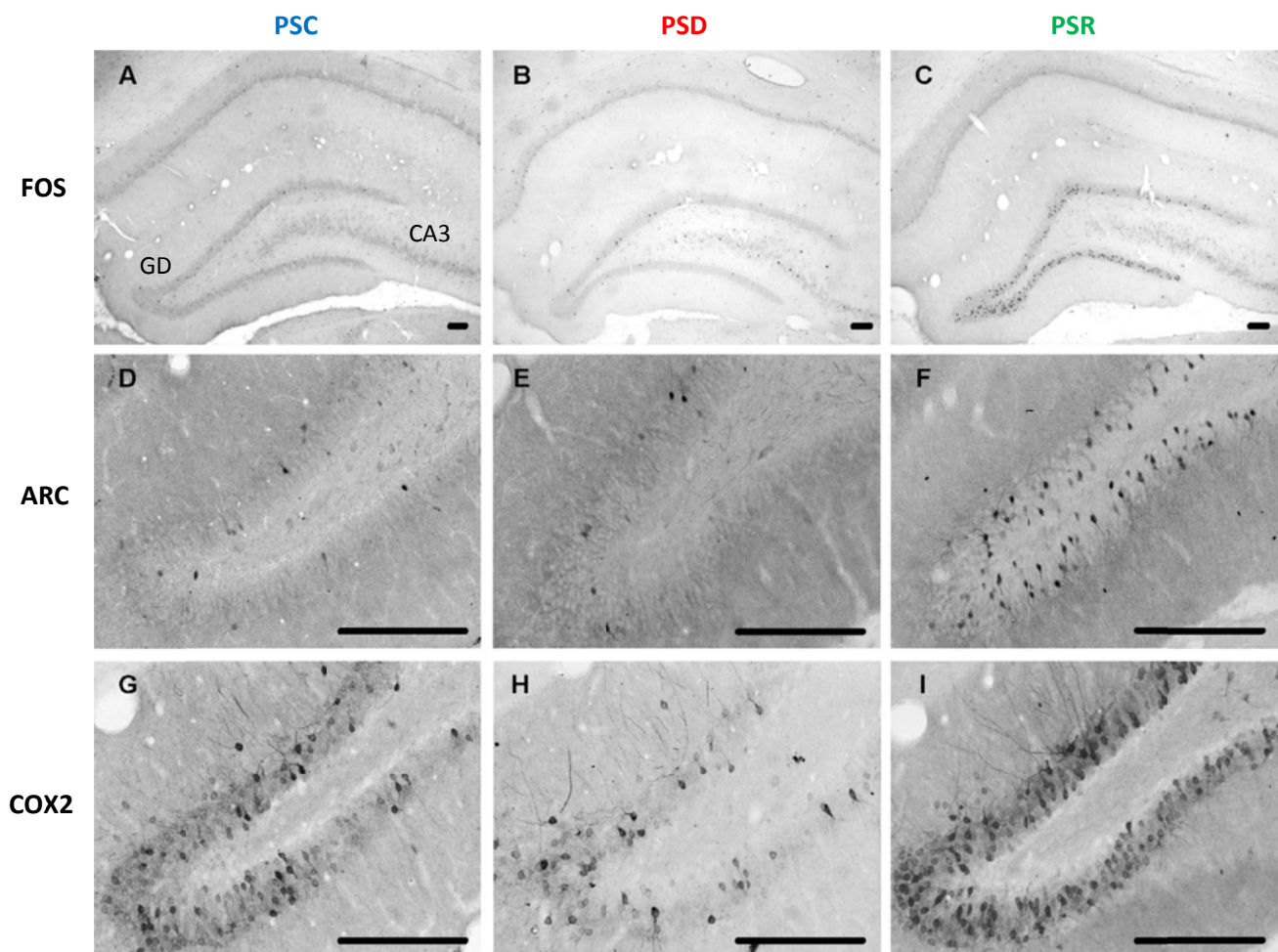
L'expression de *Arc*, *Fos* et *Cox2* est augmentée dans la formation hippocampique des animaux PSR par rapport aux deux autres groupes d'animaux et augmentée dans le néocortex après privation de SP par rapport aux deux autres groupes (excepté pour *Cox2*).

Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux protéines FOS, ARC et COX2. Ainsi, nous avons quantifié le nombre de neurones qui les expriment et leur localisation dans le cortex chez nos 3 groupes de rats.

## 2. Immunohistochimie

Nous avons quantifié les neurones exprimant les protéines FOS, ARC et COX2 chez les rats PSC, PSD et PSR. Nous avons ajouté un 4ème groupe expérimental afin de comparer la distribution de ces neurones après un éveil permanent (rat en open field pendant 3h=EV) par rapport à celle après une hypersomnie de SP.

### 2.1 La formation hippocampique

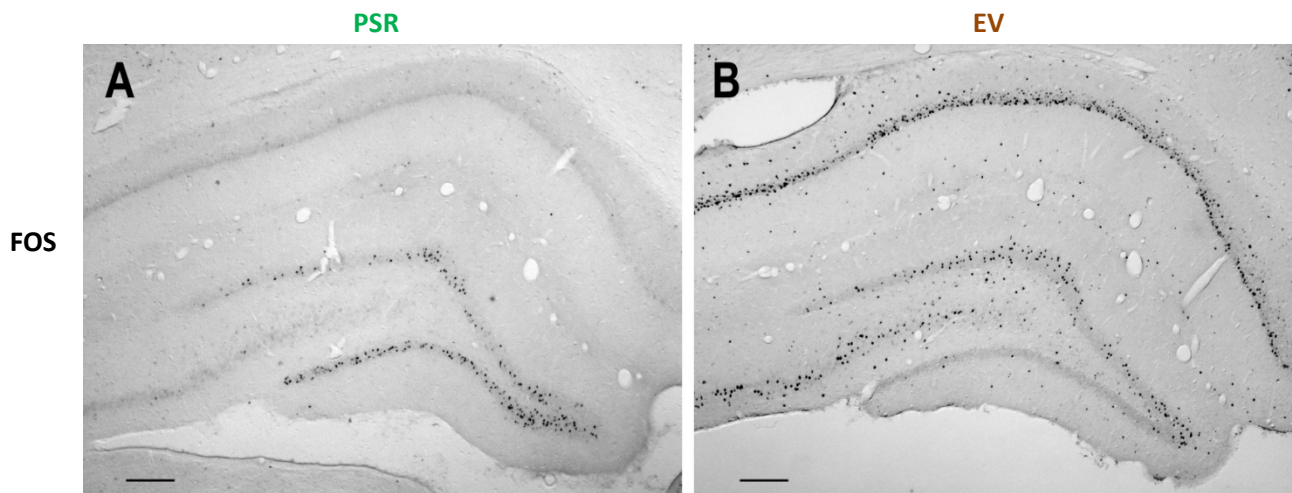


**Figure 8 : (A—I) Photomicrographies des coupes coronales immunomarquées pour FOS (A—C), ARC (D—F) et COX2 (G—I) au niveau du gyrus dentelé d'un animal témoin (A, D et G), privé de SP (B,E et H) et en hypersomnie de SP (C,F et I). Échelles (A—I) 100µm. Le nombre de neurones exprimant les marqueurs d'activation et de plasticité FOS, ARC et COX2 augmente au niveau du GD après rebond de SP par rapport aux deux autres conditions.**

#### 2.1.1 Quantification des neurones FOS+

Les neurones immunomarqués pour FOS (FOS+) sont peu nombreux en condition contrôle et après privation de SP dans l'hippocampe.

L'hypersomnie en SP entraîne une augmentation significative au moins 10 fois supérieure par rapport aux deux autres groupes (PSC et PSD) uniquement dans le gyrus dentelé (GD) de l'hippocampe (au niveau dorsal et ventral)(Fig. 8 ; Tableau 5). La condition Ev entraîne aussi une augmentation significative du nombre de neurones FOS dans le GD, plus spécifiquement dans la lame dorsale (Fig. 9 ; Tableau 5), par rapport aux groupes PSC et PSD. En revanche, le nombre de neurones FOS+ dans le GD du groupe PSR est deux fois supérieur à celui du groupe EV.



**Figure 9: Photomicrographies de coupes coronales au niveau de la formation hippocampique de deux rats représentatifs PSR (A) et EV (B) immunomarqués pour la protéine FOS.** Fos s'exprime dans le noyau des cellules de la couche granulaire du gyrus denté des rats PSR et est absente dans les autres structures. La distribution du FOS chez les rats EV est très différente : les cellules immunoréactives pour cette protéine sont présentes en grand nombre dans l'aire CA1, CA2 et CA3 et dans le gyrus denté (la lame inférieure a tendance à contenir peu de cellules immunoréactives au Fos contrairement à la lame supérieure). Echelles : A et B : 200µm.

Chez les rats EV mis à part le GD, toutes les autres régions de l'hippocampe (CA1, CA2, CA3) contiennent un nombre de neurones FOS+ significativement plus élevé par rapport aux 3 autres groupes de rats.

Il existe un gradient septo-temporal dans la distribution des neurones FOS+ chez les PSR. En effet, les parties temporales du GD et de CA1 contiennent plus de neurones FOS+ que leurs parties dorsales. Ce gradient n'existe pas chez les 3 autres groupes. Ainsi, le CA1 ventral contient significativement plus de neurones FOS+ chez les PSR par rapport aux conditions PSC et PSD mais pas par rapport à la condition EV.

Regions (number of section)	PSC	PSD	PSR	EV
<b>Hippocampal region</b>				
Dorsal CA1 (n=1)	1 ± 0,4	4,8 ± 2,8	1,8 ± 0,9	149,3 ± 43,4 ****++
Intermediate CA1 (n=1)	0,5 ± 0,5	16 ± 5,8 *	4,6 ± 2,1	177,5 ± 67,4 ****++
Ventral CA1 (n=1)	8 ± 1,9	17 ± 6,9	49,8 ± 1,9 ***	157,5 ± 20,1 ****++
CA2 (n=2)	0 ± 0,0	1,5 ± 0,9	1,8 ± 1,4	15,8 ± 8,2 *
CA3 (n=2)	7,3 ± 1,9	17 ± 9,0	4,0 ± 2,3	154,3 ± 59,3 ****++
Dorsal dentate gyrus (n=2)	28 ± 4,7	30 ± 4,2	205,8 ± 25,9 ***	86,8 ± 9,3 ****++
Ventral dentate gyrus (n=1)	8,8 ± 1,5	26 ± 9,0	220,0 ± 33,4 ***	104,3 ± 13,0 ****++

**Tableau 5 : Nombre moyen (±SEM) de cellules immunoréactives à la protéine FOS pour chacune des 4 conditions (PSC, PSD, PSR et EV) et pour chaque région hippocampique** (4 animaux/condition, n=nombre de sections quantifiées : niveaux quantifiés à -3,70mm ; -5,65mm du bregma). Significativité Kruskal Wallis suivi d'un Mann Whitney ; PSC vs PSD ou PSC vs PSR : \*\*p<0,01. PSD vs PSR : ##p<0,01.

### **2.1.2 Quantification de ARC**

Les neurones ARC+ sont peu nombreux chez les animaux PSC. La privation de SP n'induit pas d'augmentation du nombre de ces neurones. En revanche chez les animaux PSR, ce nombre augmente d'un facteur supérieur à 10 au niveau du gyrus dentelé (Figure 8 (D-F) ; Tableau 6). Ceci est concordant avec les résultats des qPCR qui indiquent que le niveau d'expression de *Arc* est corrélé aux quantités de SP dans la formation hippocampique (Tableau 6). La protéine ARC est localisée dans le cytoplasme et le noyau des neurones, mais seulement au niveau du GD dorsal et ventral. Dans les autres régions de la corne d'Amon, ARC ne s'exprime qu'au niveau dendritique.

Arc+ cells	PSC	PSD	PSR
dorsal dentate gyrus (n=2)	14,5 ± 5,3	24,8 ± 8,4	244,8 ± 67,2 ***
ventral dentate gyrus (n=1)	4,0 ± 2,1	4,5 ± 1,7	146,0 ± 40,8 ***

**Tableau 6 : Nombre moyen (±SEM) de cellules immunoréactives à la protéine Arc pour chacune des 3 conditions (PSC, PSD, PSR) et pour chaque structure corticale** (4 animaux par conditions, n=nombre de section quantifié : niveaux quantifiés à -3,70 et -5,65 du bregma). Significativité Kruskal Wallis suivi d'un Mann Whitney ; PSC vs PSD ou PSC vs PSR : \*\*p<0,01. PSD vs PSR : ##p<0,01.

Nous avons donc mesuré la densité optique dans les régions dendritiques de CA1, CA3 et du GD. Dans la condition PSR, le marquage dendritique de la protéine ARC est deux fois supérieur dans les régions dendritiques de CA1, CA3 et du DG (au niveau de lame inférieure et supérieure) par rapport aux conditions PSC et PSD (Tableau 7).

DO Arc	PSC	PSD	PSR	
CA1	34,51 ± 5,08	37,20 ± 2,31	62,03 ± 9,01	*#
CA3	16,24 ± 7,73	23,23 ± 3,65	63,42 ± 9,25	*#
Dorsal dentate gyrus upper blade	29,08 ± 13,00	31,63 ± 8,61	75,78 ± 13,66	*#
Dorsal dentate gyrus lower blade	20,67 ± 14,67	17,38 ± 10,75	73,19 ± 9,33	*#

**Tableau 7 : Moyenne de la densité optique (±SEM) mesurée au niveau de coupes immunomarquées pour la protéine ARC dans les régions dendritiques de l'hippocampe pour chacune des 3 conditions (PSC, PSD, PSR) et pour chaque structure hippocampique** (4 animaux par condition, niveau quantifié à -3,70mm du bregma). Significativité Kruskal Wallis suivi d'un Mann Whitney ; PSC vs PSD ou PSC vs PSR : \*p<0,05. PSD vs PSR : #p<0,05.

### **2.1.3 Quantification de COX2**

COX2 s'exprime de manière constitutive dans le cytoplasme et les dendrites des neurones au niveau du GD et de CA3 (Figure 8 (G-I)). Ce nombre de neurones COX2+ diminue légèrement pendant la privation de SP et est au moins trois fois supérieur dans le GD chez les animaux PSR par rapport aux groupes PSC et PSD (Tableau 9). Ces résultats sont confirmés par la mesure de la densité optique de COX2 dans le GD.

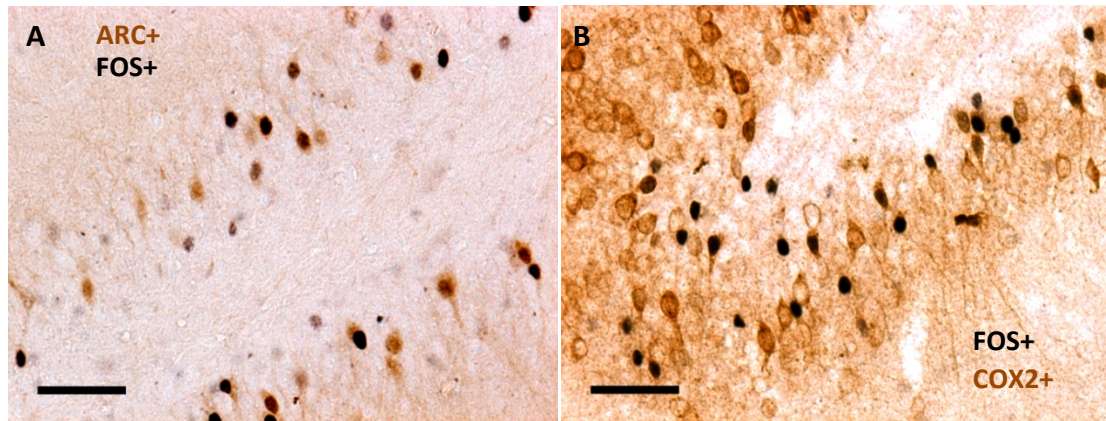
La mesure de la densité optique de COX2 dans la région des cellules pyramidales de CA3 (Tableau 8) indique également une augmentation significative de l'intensité du marquage chez les rats PSR par rapport aux groupes PSD et au PSC.

Ceci est concordant avec les résultats des qPCRs indiquent que le niveau d'expression de *Cox2* est corrélé aux quantités de SP dans la formation hippocampique.

DO Cox2	PSC	PSD	PSR	
CA3	48,9 ± 12,9	50,2 ± 7,0	96,8 ± 10,6	***##
Dorsal dentate gyrus upper blade	35,9 ± 2,5	36,7 ± 4,5	77,8 ± 7,8	***##
Dorsal dentate gyrus lower blade	8,9 ± 0,8	2,0 ± 2,3	36,0 ± 3,5	***##

**Tableau 8 : Moyenne de la DO (±SEM) pour la protéine Cox2 pour chacune des 3 conditions (PSC, PSD, PSR) et pour chaque structure hippocampique** (niveau quantifié à -3,70 mm du bregma). Significativité Kruskal Wallis suivi d'un Mann Whitney ; PSC vs PSD ou PSC vs PSR : \*\*p<0,01. PSD vs PSR : ##p<0,01.

### 2.1.4 Les protéines ARC, FOS et COX2 sont-elles co-exprimées dans les mêmes neurones ?



**Figure 10 : Photomicrographies de coupes coronales au niveau du gyrus dentelé de deux rats PSR représentatifs immunomarqué pour la protéine Fos (en noir) et Arc (en marron)(A) et Cox2 (en marron)(B). Les neurones Fos+ peuvent exprimer seulement cette protéine ou coexprimer Arc ou Cox2. Les neurones Arc+ ou Cox2 peuvent aussi exprimer seulement ces protéines. Echelles : A et B : 50μm.**

L'expression des gènes *Fos*, *Cox2* et *Arc* étant corrélées, nous avons voulu déterminer le niveau de co-expression de leurs protéines au sein de l'hippocampe :

- 41% des neurones FOS+ coexpriment COX2 (tableau 9 ; Figure 10 (B)). En revanche, le nombre de neurones COX2+ est trois fois plus élevé que le nombre de neurones FOS+. De nombreux neurones n'expriment que la protéine COX2.
- Une partie des neurones FOS+ coexpriment aussi ARC. Cependant ce résultat n'est que qualitatif (Fig. 11 (A)). Le double marquage est difficile à quantifier. En effet, ARC et FOS s'expriment simultanément dans le noyau.

Ainsi, les neurones du GD peuvent coexprimer plusieurs protéines de plasticité.

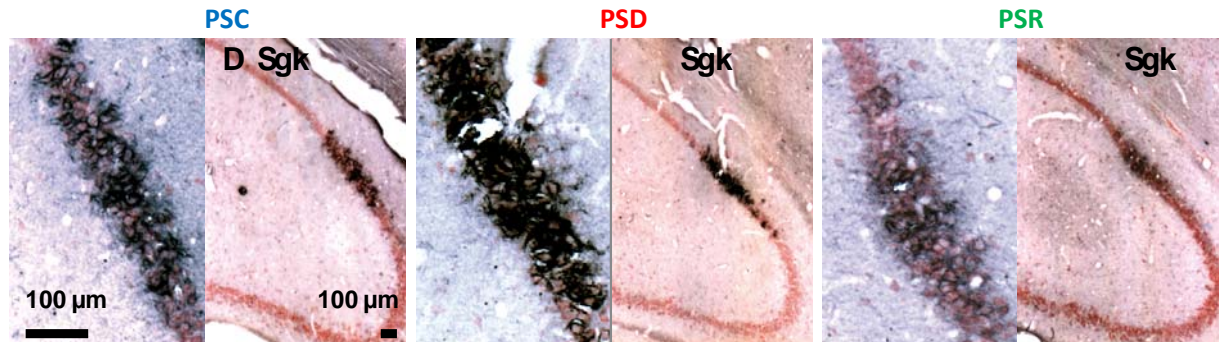
Dentate gyrus	PSC	PSD	PSR	
Cox2+	110 ± 20,8	99,75 ± 5,3	327,2 ± 49,4	**###
c-Fos+	10,3 ± 2,4	7 ± 2,2	61,8 ± 16,4	**###
c-Fos/Cox2+	5,7 ± 1,1	6,2 ± 0,9	43,3 ± 6,8	**###

**Tableau 9 : Nombre moyen (±SEM) de cellules immunoréactives pour la protéine Fos ou Cox2 ou Fos+/Cox2+ pour chacune des 3 conditions (PSC, PSD, PSR) au niveau du gyrus dentelé dorsal (4 animaux par groupe, niveau quantifié à -3,70 mm du bregma). Significativité Kruskal Wallis suivi d'un Mann Whitney ; PSC vs PSD ou PSC vs PSR : \*\*p<0,01. PSD vs PSR : ##p<0,01.**



### **2.1.5 Quantification de SGK (Résultats préliminaires)**

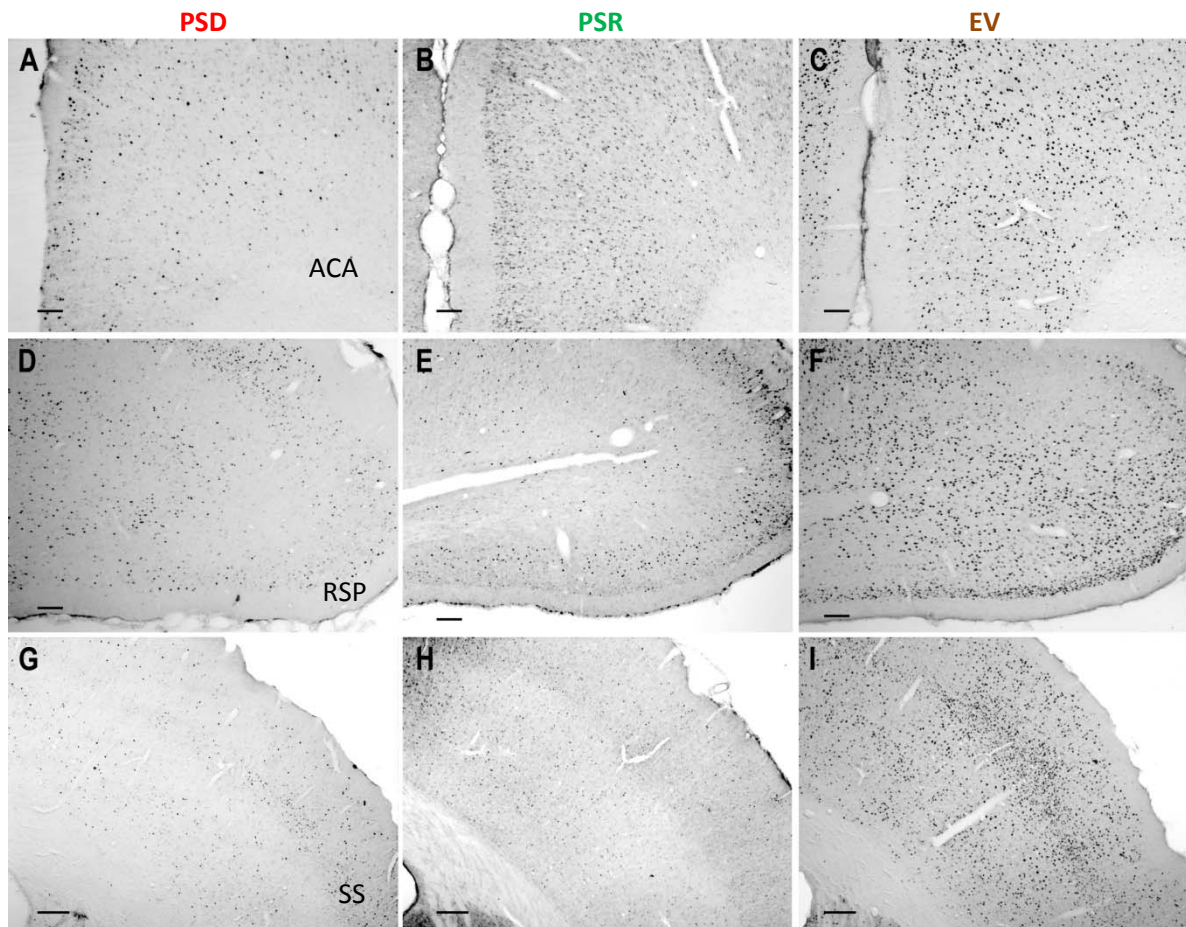
*Sgk* a un niveau d'expression augmenté après privation de SP dans la formation hippocampique. Le marquage immunohistochimique de la protéine SGK est concordant avec le résultat des puces à ADN, puisque il est plus fort chez le groupe PSD que chez les groupes PSC et PSR. Ce marquage est particulièrement spécifique de la région de CA2 (Figure 11).



**Figure 11 : Photomicrographies de coupes coronales au niveau de CA2 chez des rats PSC, PSD et PSR représentatifs immunomarqués pour la protéine SGK (en noir) et colorées au rouge neutre. Les neurones SGK+ sont restreints à la région de CA2, et le marquage de CA2 est augmenté après privation de SP et diminué après récupération de SP.**

## 2.2 Le néocortex

### 2.2.1 Quantification des neurones Fos+



**Figure 12 (A—I)** Photomicrographies de coupes coronales immunomarquées pour Fos (A—I), au niveau du cortex cingulé antérieur (A-C), du cortex rétrospécial (D-F), et du cortex somatosensoriel (G-I) d'un animal privé de SP (A, D et G), en récupération de SP (B,E et H) et en éveil (C,F et I). Le nombre de neurones exprimant le marqueur d'activation et de plasticité FOS n'est pas significativement modifié entre les conditions PSD et PSR au niveau des cortex cingulé antérieur et rétrospécial mais ce nombre diminue dans le cortex somatosensoriel des animaux PSR par rapport aux animaux PSD. Les rats EV contiennent beaucoup plus de neurones Fos+ dans ces 3 cortex par rapport aux 2 autres conditions. Échelles (A—I) 100µm.

La quantification des neurones FOS+ (Figure 12 ; Tableau 10 ; Figs. 13-17) nous indique que :

- Les cortex cingulé antérieur et rétrospécial (Figure 12 (A-F)) et le subiculum ventral chez les rats PSD et PSR contiennent significativement plus de neurones FOS+ par rapport aux rats PSC. Cependant, la différence entre les conditions PSD et PSR n'est pas significative.
- Le nombre de neurones FOS+ est significativement augmenté chez les rats PSR par rapport aux rats PSC et PSD dans l'entorhinal médian, le parasubicum, le claustrum et le cortex amygdalien.

- Les cortex sensoriels et moteurs contiennent moins de neurones FOS+ chez les PSR par rapport aux groupes PSD et PSC. En effet dans les cortex sensori-moteurs tels que les cortex auditifs, moteurs, d'association postero-parietal, somatosensoriels (Figure 12 (G-I)), d'association temporal, visuel et piriforme, les animaux privés de SP ont un nombre de neurones FOS+ significativement supérieur par rapport au groupe RSP et aussi parfois par rapport au groupe PSC.
- Le groupe EV contient significativement plus de neurones FOS+ par rapport aux 3 autres conditions dans la grande majorité des régions corticales. Il n'existe pas de différences significatives entre le nombre de neurones FOS+ chez les groupes PSR et les groupes EV au niveau du cortex entorhinal médian, le post et pre subiculum, le cortex gustatif, le cortex amygdalien et le claustrum.

L'analyse présentée ici est assez globale puisque nous n'avons pas différencié les couches corticales. Cependant, d'après les cartographies (Figures 13-17), la distribution des neurones FOS+ chez ces 4 conditions n'est pas la même au sein des régions corticales.

Les couches profondes des cortex moteurs et sensoriels semblent contenir plus de neurones FOS+ que les couches superficielles chez les animaux PSR.

Inversement, chez les conditions PSD et PSC, les couches superficielles contiennent plus de neurones FOS+ en comparaison des couches profondes.

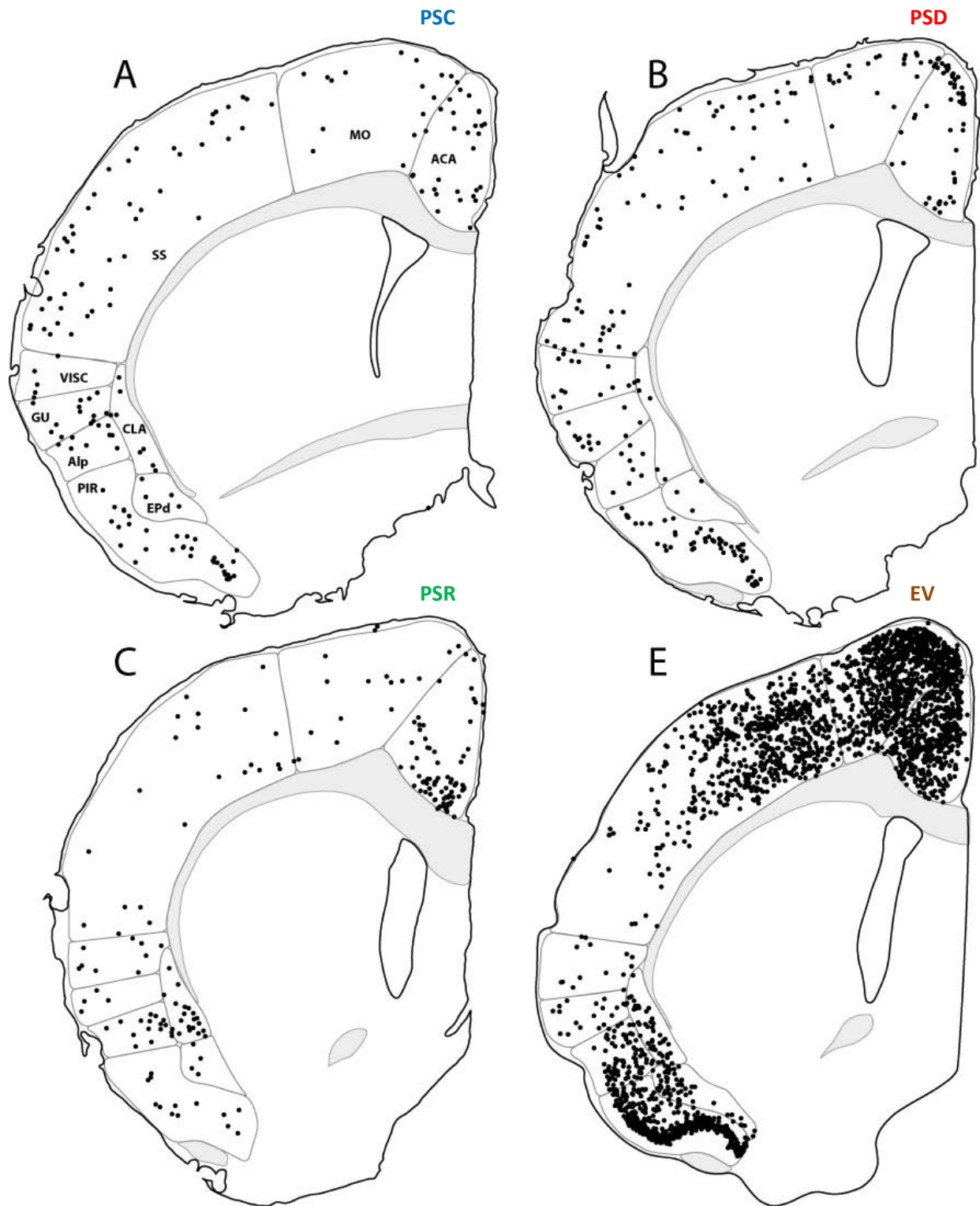
Au niveau des aires corticales limbiques (le rétrosplénial, le cingulé antérieur et le cortex entorhinal). La topographie de la distribution des neurones FOS+ est plus difficile à différencier entre les 4 conditions. Chez les rats PSR, les couches corticales contenant des neurones FOS+ ne semblent pas être néanmoins les mêmes que celles des 3 autres conditions.

La condition EV entraîne une augmentation du nombre de neurone FOS+ importante dans la plupart des régions corticales par rapport aux trois autres groupes de rats.

Parahippocampal regions	PSC	PSD	PSR	EV
Ectorhinal (n=3)	83 ± 14,6	93 ± 5,9	71,5 ± 7,1 #	727,8 ± 51,8 ***##++
Lateral entorhinal (n=2)	67 ± 29,8	142 ± 20,2	118,5 ± 20,2	670,0 ± 70,7 ***##++
Medial entorhinal (n=2)	7,8 ± 2,8	35 ± 5,7 **	146,5 ± 14,6 ***##	144,2 ± 23,7 ***##

Parasubiculum (n=1)	5 ± 1,6	15 ± 5,4		51,0 ± 10,4	***##	190,5 ± 122,0	**
Postsubiculum (n=1)	16 ± 4,9	78 ± 47,0		38,3 ± 17,3		295,5 ± 129,6	**+
Presubiculum (n=1)	7,8 ± 3,6	33 ± 14,2		48,5 ± 15,9		152,3 ± 103,2	*
Retrosplenial (n=4)	44 ± 4,2	220 ± 71,2	**	333,3 ± 28,0	**	3218,8 ± 342,1	***###+
Dorsal subiculum (n=1)	1,3 ± 0,9	2 ± 0,7		0,5 ± 0,3		112,5 ± 28,8	***##+
Ventral subiculum (n=1)	5 ± 3,9	18 ± 5,1	*	32,8 ± 9,8	**	106,5 ± 24,8	***##+
<b>Neocorticales regions</b>							
Anterior cingulate cortex (n=1)	12 ± 5,9	58 ± 12,6	**	59,8 ± 6,3	**	670,3 ± 141,0	***###+
Agranular insular cortex (n=2)	7,3 ± 2,5	8,5 ± 1,6		14,8 ± 3,7		103,8 ± 19,8	***###+
Clastrum (n=2)	8,8 ± 2,1	18 ± 3,3	*	48,3 ± 6,3	***##	109,8 ± 29,8	***##
Cortical amygdaloïd nucleus (n=2)	16 ± 4,9	41 ± 11,8		135,3 ± 18,3	***##	144,8 ± 17,1	***##
Auditory cortex (n=2)	67 ± 26,1	117 ± 13,9		29,5 ± 12,0	##	2300,5 ± 282,8	***###+
Gustatory cortex (n=1)	8 ± 3,2	11 ± 4,3		17,0 ± 8,4		56,3 ± 20,9	***##
Motor cortex (n=3)	45 ± 6,2	147 ± 27,0	**	62,5 ± 6,8	##	1426,3 ± 127,3	***###+
Posterior parietal association cortex (n=1)	15 ± 12,2	40 ± 14,1		3,8 ± 2,1	##	2084,0 ± 490,4	***###+
Somatosensory cortex (n=3)	172 ± 68,5	448 ± 52,8	*	138,8 ± 39,8	##	3659,8 ± 846,0	***###+
Temporal association cortex (n=2)	102 ± 42,4	145 ± 17,4		56,5 ± 3,2	##	2133,8 ± 148,0	***###+
Visceral cortex (n=2)	20 ± 5,4	57 ± 11,3	*	27,8 ± 7,0		165,0 ± 42,0	**#++
Visual cortex (n=2)	215 ± 63,6	511 ± 64,2	*	73,5 ± 29,5	##	4752,3 ± 421,8	***###+
Endopiriform cortex (n=2)	10 ± 3,9	27 ± 5,4		19,3 ± 5,3		76,8 ± 17,3	***###+
Piriform cortex (n=3)	122 ± 18,1	241 ± 84,5		115,3 ± 13,3	##	1313,8 ± 277,8	***###+

**Tableau 10 : Nombre moyen (±SEM) de cellules immunoréactives pour la protéine FOS pour chacune des 4 conditions (PSC, PSD, PSR et EV) et pour chaque structure néocorticale (4 animaux par condition, n=nombre de section quantifié : niveaux quantifiés à +0,45 ; -1,7 ; -3,70 ; -5,65 ; -7,10 du bregma). Significativité Kruskal Wallis suivi d'un Mann Whitney ; PSC vs PSD ou PSC vs PSR ou PSC vs EV : \*\*p<0,01, \*p<0,05. PSD vs PSR ou PSD vs EV : ##p<0,01, #p<0,05. PSR vs EV : ++p<0,01, +p<0,05.**



**Figure 13 : Schémas de coupes frontales (A-E) montrant la localisation des cellules FOS+ (points noirs) chez des rats PSC (A), PSD (B), PSR (C) et EV (D) à + 0,45 mm du Bregma. Voir la liste des abréviations.**

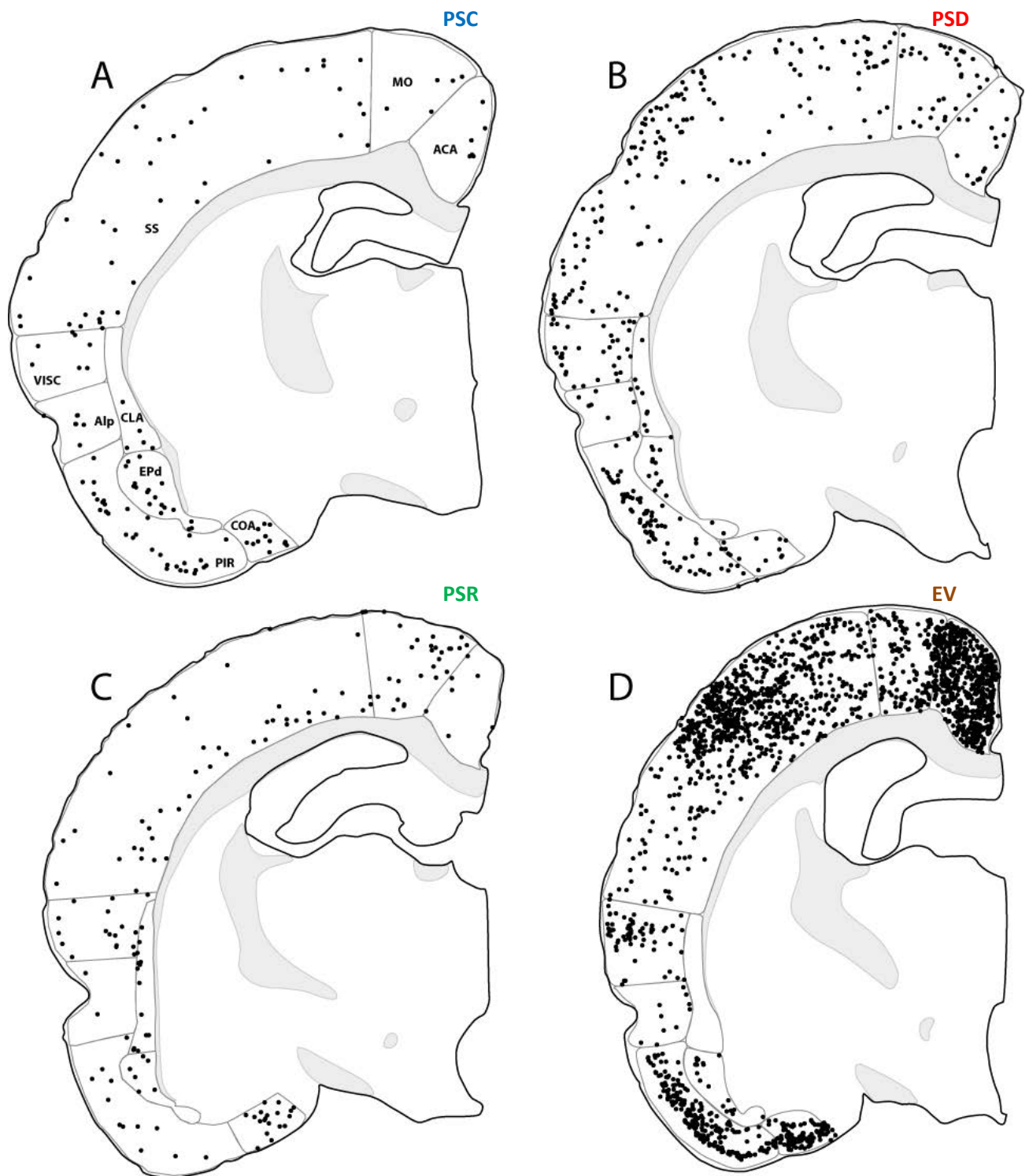


Figure 14 : Schémas de coupes frontales (A-E) montrant la localisation des cellules FOS+ (points noirs) chez des rats PSC (A), PSD (B), PSR (C) et EV (D) à -1,5 mm du Bregma. Voir la liste des abréviations.

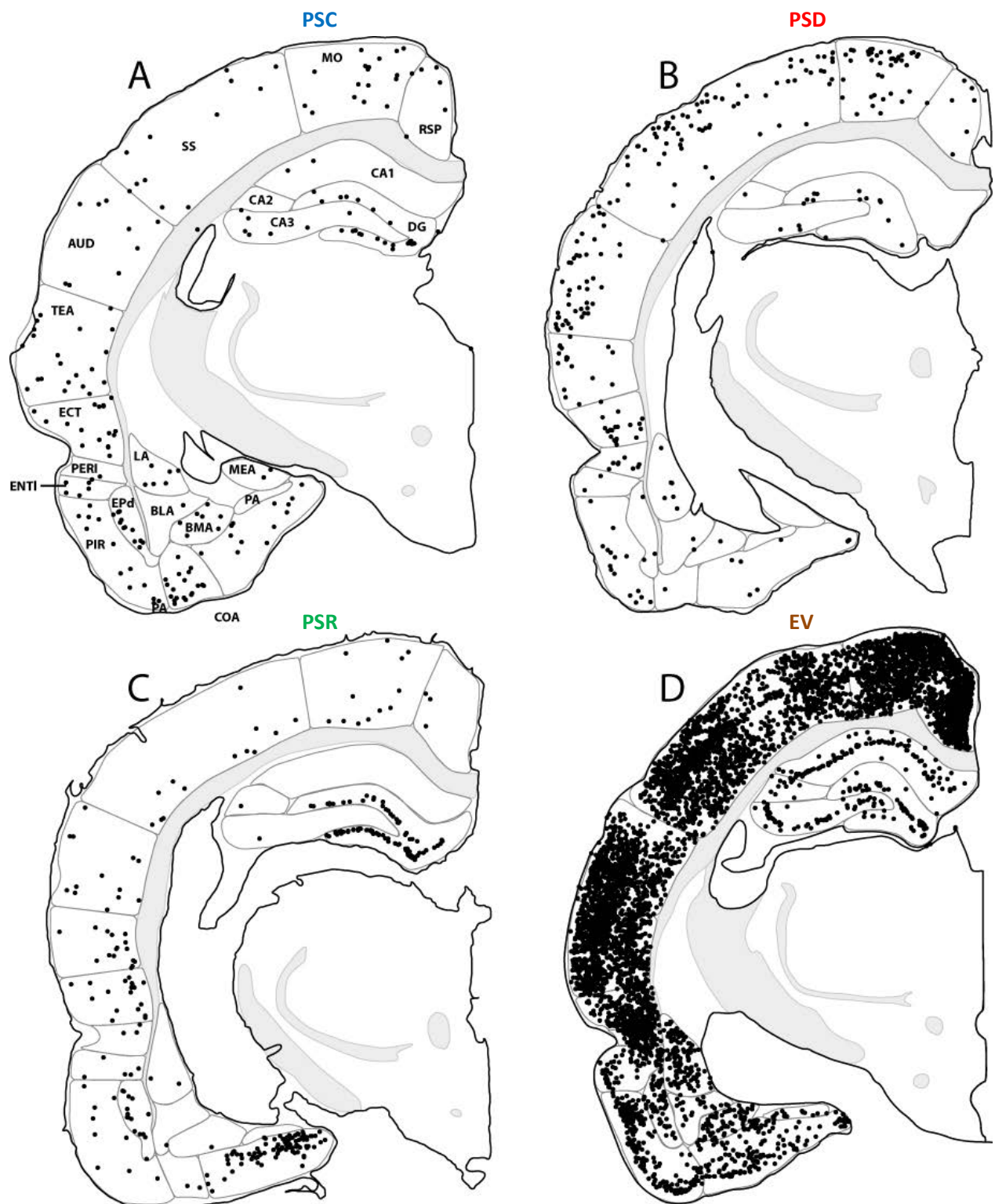
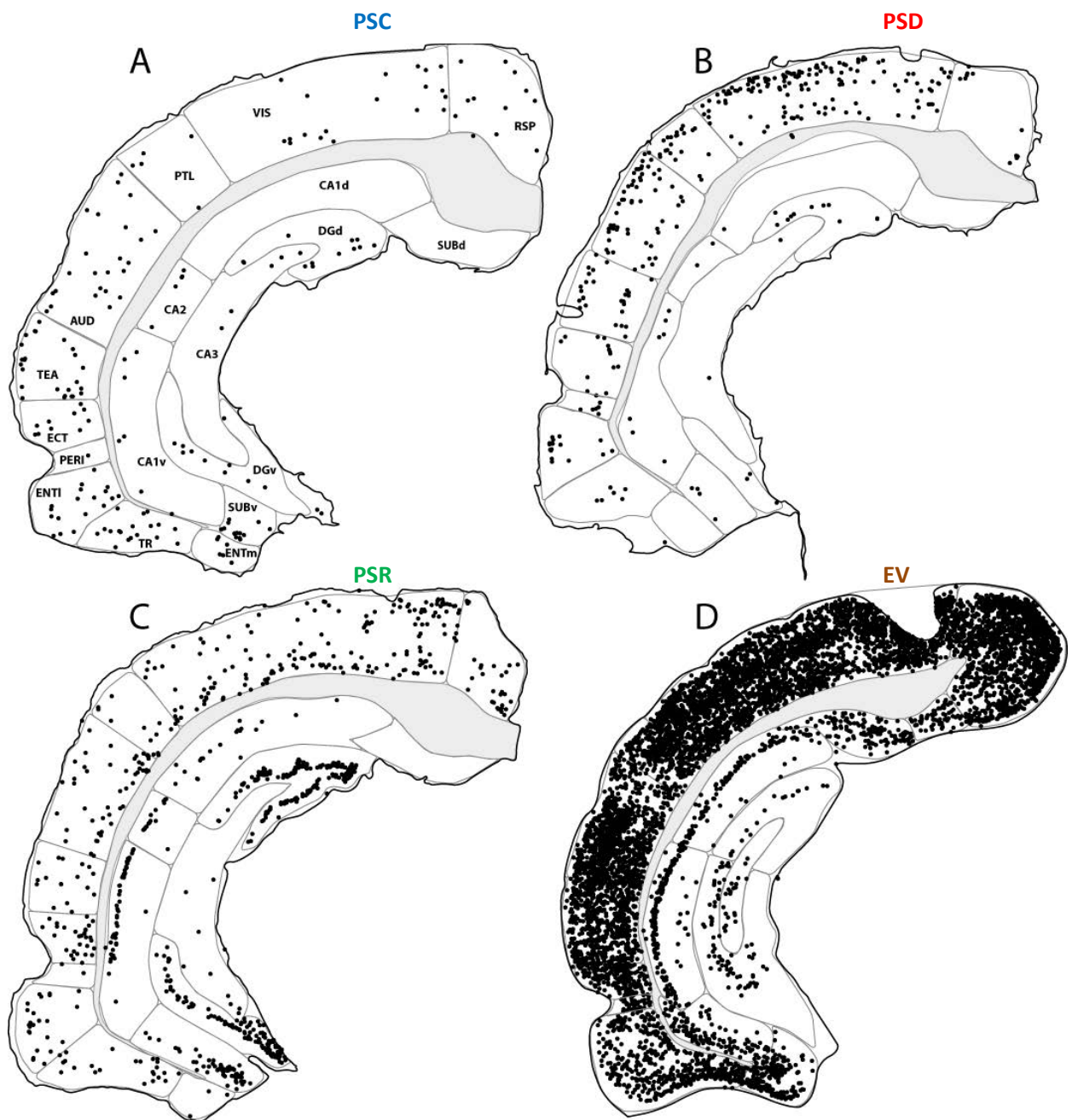


Figure 15 : Schémas de coupes frontales (A-E) montrant la localisation des cellules FOS+ (points noirs) chez des rats PSC (A), PSD (B), PSR (C) et EV (D) à -3,7 mm du Bregma. Voir la liste des abréviations.



**Figure 16 : Schémas de coupes frontales (A-E) montrant la localisation des cellules FOS+ (points noirs) chez des rats PSC (A), PSD (B), PSR (C) et EV (D) à -5,65 mm du Bregma. Voir la liste des abréviations.**



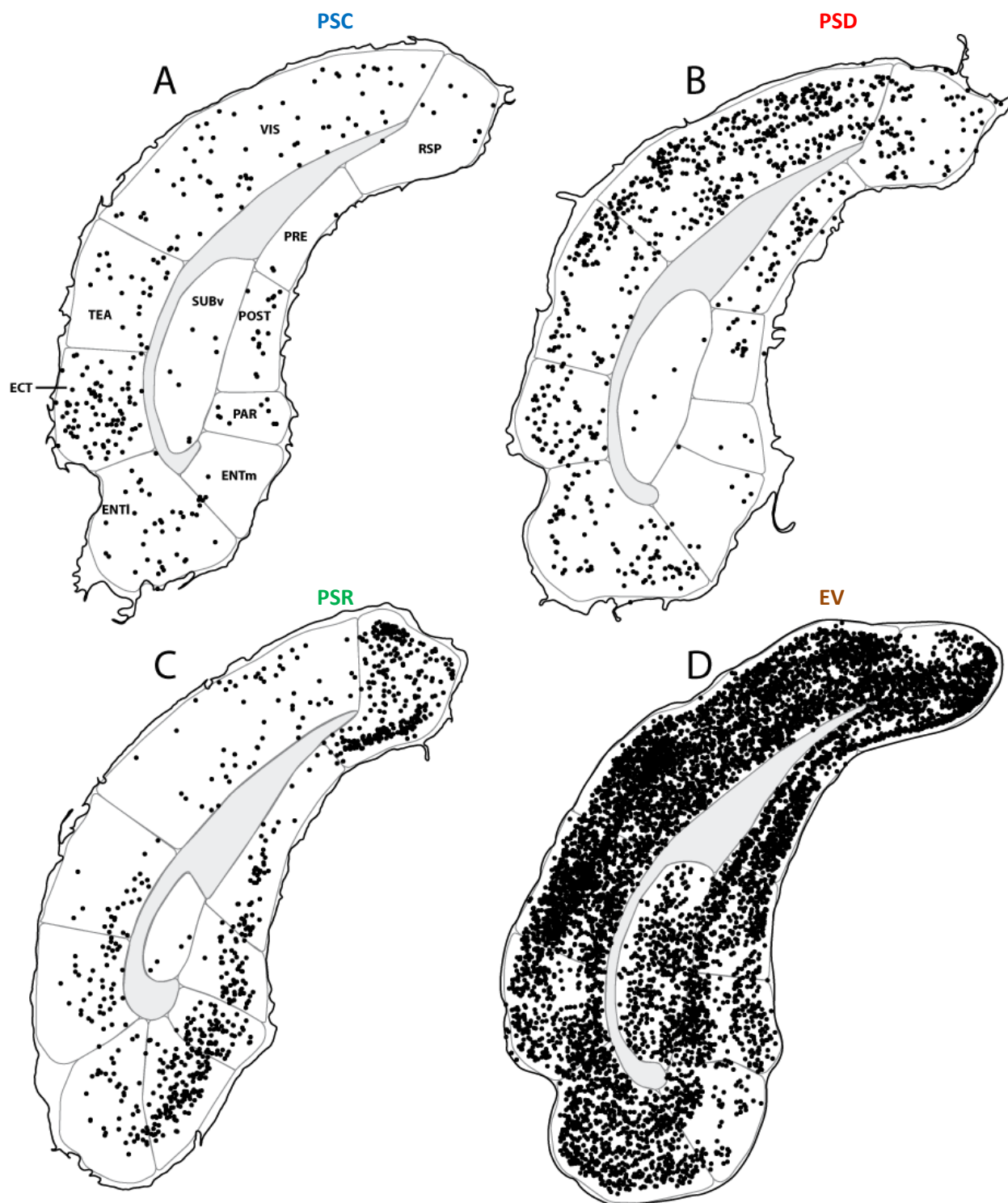


Figure 17 : Schémas de coupes frontales (A-E) montrant la localisation des cellules FOS+ (points noirs) chez des rats PSC (A), PSD (B), PSR (C) et EV (D) à -7,10 mm du Bregma. Voir la liste des abréviations.

### 2.2.2 Quantification des neurones ARC+

Les corps cellulaire ARC+ sont présent seulement dans 2 régions corticales (Tableau 11) : le claustrum et le cortex amygdalien, et seulement chez les rats PSR. Le nombre de neurones ARC+ dans les deux régions est de ce fait significativement supérieur par rapport aux deux autres groupes (PSC et PSD). Ce résultat ne concorde pas avec les résultats des qPCRs, le niveau d'expression d'*Arc* est corrélé négativement aux quantités de SP dans le néocortex. Cette différence s'explique par le fait que nous n'avons quantifié que les corps cellulaires immunoréactifs à la protéine ARC. Or, la protéine semble majoritairement se localiser dans les dendrites des neurones corticaux et ce marquage est plus difficilement quantifiable. La mesure de la densité optique permet d'observer des différences entre nos groupes de rats. La quantification de l'ARNm de *Arc* par l'hybridation in situ pourrait aussi permettre de quantifier les neurones exprimant ce transcrit.

ARC+ cells	PSC	PSD	PSR	
claustrum (n=1)	3,0 ± 3,0	2,0 ± 0,9	23,8 ± 3,6	**##
cortical amygdaloïd nucleus (n=1)	2,3 ± 11,5	1,3 ± 1,3	53,3 ± 10,3	**##

**Tableau 11 : Nombre moyen ( $\pm$ SEM) de cellules immunoréactives pour la protéine ARC pour chacune des 3 conditions (PSC, PSD, PSR) et pour chaque structure corticale (4 animaux par conditions, n=nombre de section quantifié : niveau quantifié à +0,45 du bregma). Significativité Kruskal Wallis suivi d'un Mann Whitney ; PSC vs PSD ou PSC vs PSR : \*\*p<0,01. PSD vs PSR : ##p<0,01.**

Le nombre de neurones immunoréactifs pour les protéines FOS, ARC et COX2 augmente dans le GD chez les animaux hypersomniaques en SP par rapport aux animaux éveillés, privés de SP ou contrôles. Ces protéines sont coexprimées dans un même neurone ou s'exprimer de façon indépendante.

La condition PSR entraîne une augmentation du nombre de neurones FOS+ dans certaines régions limbiques dont le claustrum, le cortex rétrosplénial et le cingulé antérieur par rapport aux groupes PSC et/ou PSD.

La récupération de SP entraîne une augmentation significative du nombre de neurones FOS+ dans plusieurs régions sensorielles (comme dans le cortex visuel) par rapport au groupe PSD.

Chez les rats en éveil exploratoire (EV), toutes les régions corticales contiennent des neurones FOS+ en nombre largement supérieur en comparaison des 3 autres groupes, à l'exception du gyrus dentelé chez les rats PSR.

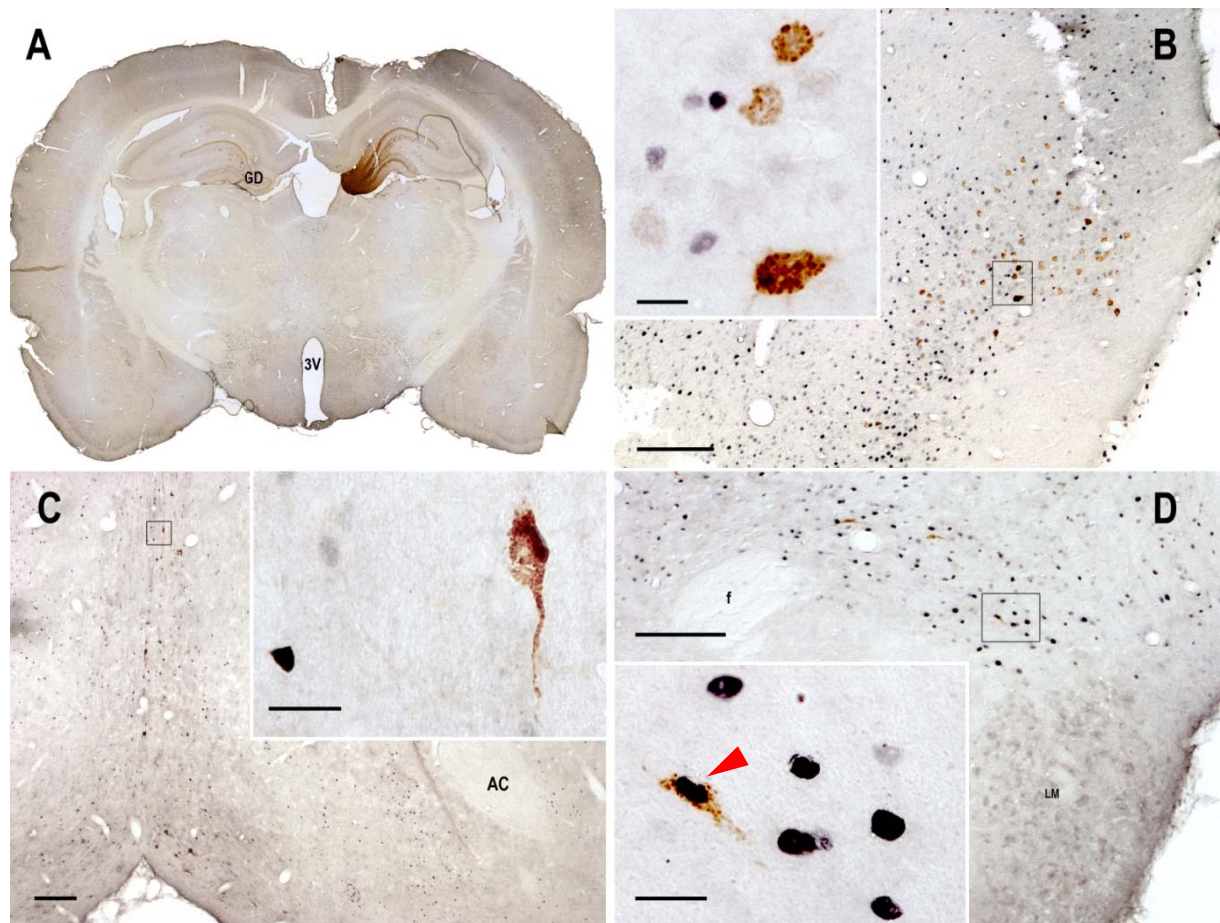
Ainsi, l'activation corticale en éveil exploratoire est très différente de celle en SP.

Nous nous sommes intéressés aux projections potentiellement responsables de l'activation de ces régions corticales au cours du SP. Pour cela, Nous avons couplé l'immunohistochimie du FOS à l'éjection de traceur rétrograde dans le gyrus dentelé, les cortex cingulé et rétrosplénial, le noyau supramamillaire, le claustrum et le cortex visuel chez des rats PSR.

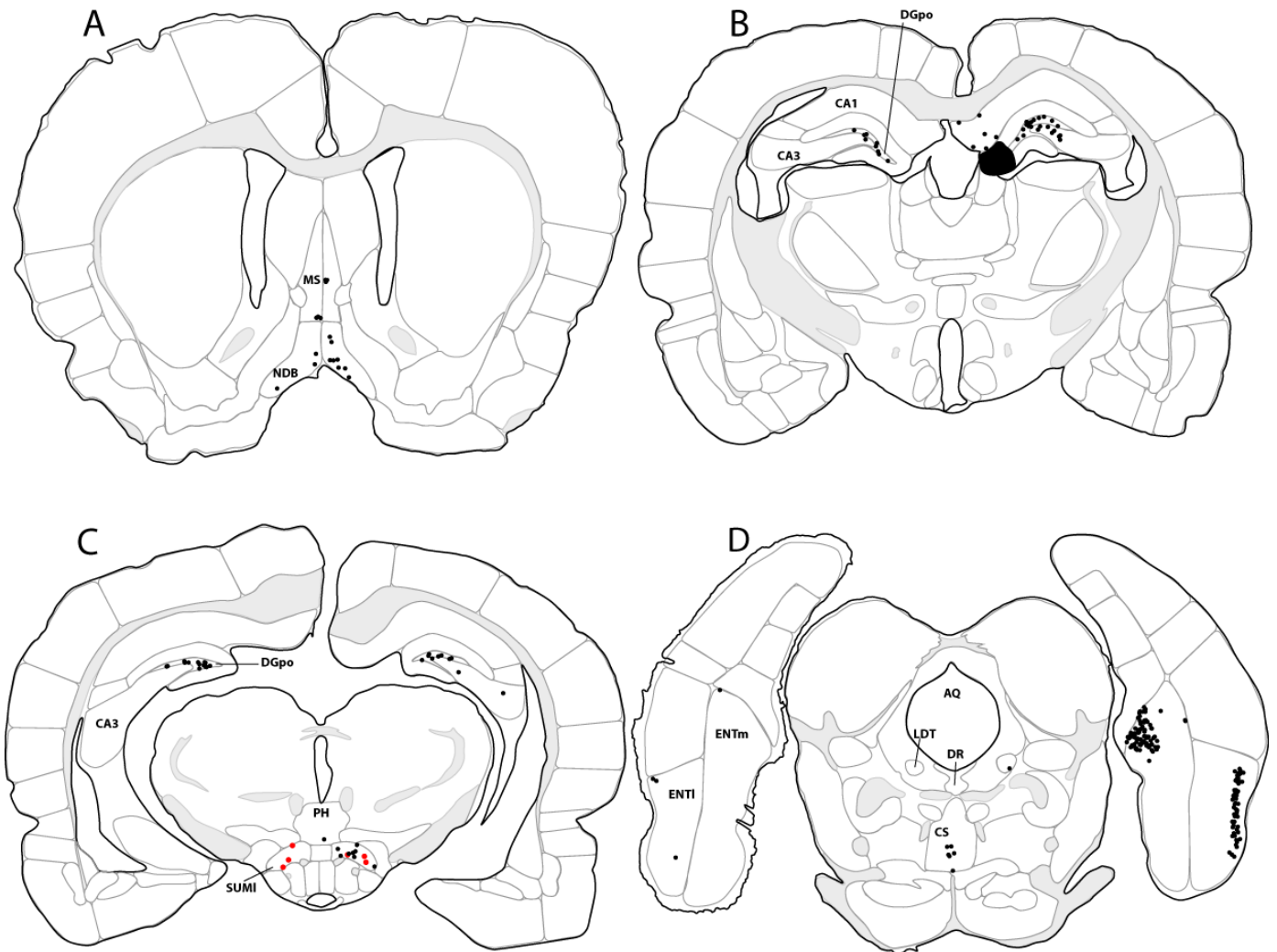
### **3. Réseau neuronal responsable de l'activation corticale pendant le SP**

#### **3.1 Ejection de CTb dans le gyrus dentelé des rats PSR**

Après éjection de CTb dans le gyrus dentelé (GD) dorsal (à -3,3 mm du bregma) (Figure 18 (A)) chez des rats PSR, assez peu de régions cérébrales contiennent des neurones rétrogradement marqués (CTb+). Il s'agit du septum médian (Figure 18 (C)), de la bande diagonale de Broca, de la partie médiane du noyau central supérieur du raphé, du cortex entorhinal médian à un niveau très caudal (Figure 18 (B)), des noyaux supramamillaires (Fig. 18 (D)) et du noyau raphé dorsal (Figures 18 et 19 et tableau 2).



**Figure 18 : Photomicrographies de coupes coronales de rats PSR avec une éjection de CTb dans le gyrus dentelé (A) immunomarcquées pour la protéine FOS (en noir) et CTb (en marron). Les régions afférentes au gyrus dentelé telles que le cortex entorhinal médian (B) et le septum médian (C) contiennent des cellules FOS+ et des cellules CTb+ mais ces cellules ne sont pas doublement marquées pour les 2 protéines (grossissement dans les encadrés de chaque photo). Seul le noyau supramamillaire contient des neurones FOS/CTb+ (indiqué par la flèche rouge). Echelles : Photos B, C et D :200 μm ; agrandissement en encadré B,C et D : 25μm.**



**Figure 19 : Schémas de coupes frontales (A-D) rostro-caudalement distribuées montrant la localisation des cellules CTb+ et CTb/FOS+ chez des rats PSR après injection de CTb (B) dans le gyrus dentelé dorsal. Point noir = cellule CTb+, point rouge = cellule CTb/FOS+. Voir la liste des abréviations. A: +0,45mm; B: -3,5mm ; C: -4,5mm ; D: -8,3mm du bregma.**

Parmi les régions afférentes au GD (figures 18 et 19 ; et tableau 12), seule la partie latérale des noyaux supramamillaires (SumL) contient des neurones doublement marqués FOS et CTb (CTb/FOS+) après hypersomnie de SP. Environ 41% des neurones du SumL projetant au gyrus denté présentent le marqueur d'activation FOS. Le FOS n'est pas exprimé dans toutes les cellules granulaires du GD ce qui expliquerait la présence de cellules exprimant uniquement la CTb dans le Sum (Tableau 12).

Regions (nombre de coupes)	CTb/FOS+		CTb+	
	ipsilatéral	controlatéral	ipsilatéral	controlatéral
<b>Cortex</b>				
Entorhinal area lateral part (n=2)	0	0	19,3 ± 4,5	0
Entorhinal area medial part (n=1)	0	0	59,0 ± 29,0	0
Dentate gyrus polymorph layer (n=1)	0	0	20,8 ± 2,7	9 ± 0
CA3 (n=1)	0	0	18,0 ± 6,1	2 ± 1
CA1, stratum oriens (n=1)	0	0	1,5 ± 0,3	0 ± 0
CA1, stratum radiatum (n=1)	0	0	3,75 ± 0,63	0 ± 0
<b>Basal forebrain</b>				
Medial septal nucleus (n=3)	0	0,3 ± 0,3	12,0 ± 3,0	4,5 ± 1,3
Diagonal band nucleus (n=3)	0	0	13,0 ± 1,1	3,3 ± 0,8
<b>Hypothalamus</b>				
Lateral hypothalamic area (n=3)	0,3 ± 0,3	0	1,5 ± 0,5	0
Posterior hypothalamic nucleus (n=2)	0	0	0,8 ± 0,5	0
Supramammillary nucleus, lateral part (n=3)	10,6 ± 4,0	10,3 ± 4,0	27,3 ± 14,7	21,7 ± 7,3
Supramammillary nucleus, medial part (n=3)	0,3 ± 0,3	0	0,8 ± 0,8	0
<b>Brainstem</b>				
Superior central nucleus raphe, medial part (n=2)	0,8 ± 0,3	0	27,0 ± 1,6	0
Dorsal nucleus raphe (n=3)	0	0	1,8 ± 1,2	0
Locus coeruleus (n=1)	0	0	2,3 ± 1,9	0

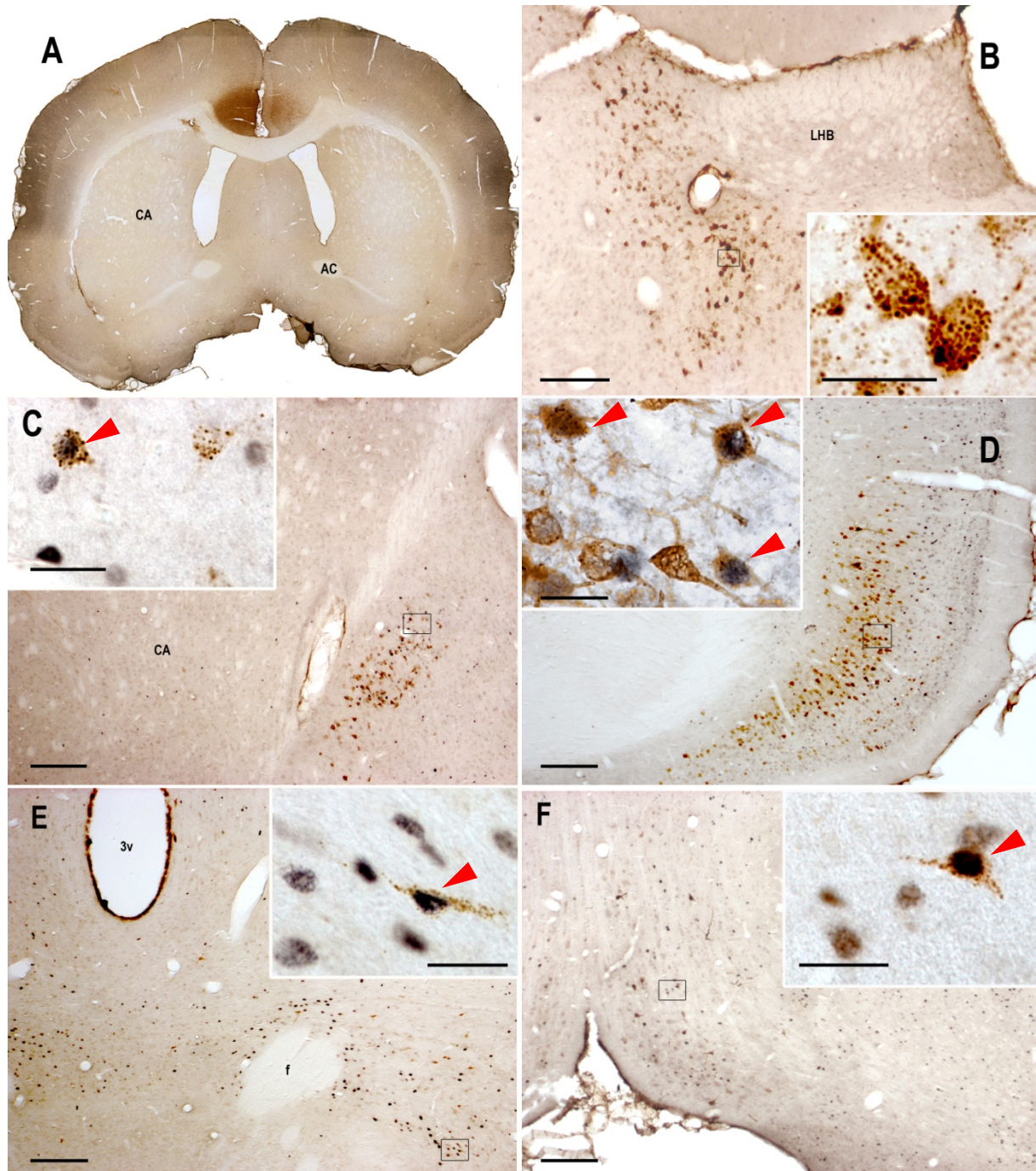
**Tableau 12 : Nombre moyen (±SEM) de cellules doublement immunoréactives CTb/FOS+ ou CTb+ des rats PSR avec une injection de CTb dans le gyrus dentelé dorsal (moyenne de 4 animaux, n=nombre de coupes quantifié dans la structure qui présente des cellules immunomarquées à la CTb). Les coupes sont quantifiées tous les 600µm.**

Les projections du SumL controlatérales au GD sont nombreuses.

**Nos résultats indiquent que le noyau supramamillaire latéral envoie des projections au GD qui sont spécifiquement actives pendant l'hypersomnie de SP.**

Cette voie Sum-GD serait donc cruciale dans les mécanismes d'activation du GD pendant le SP.

### 3.2 Ejection de Fluorogold dans le cortex cingulé antérieur des rats PSR



**Figure 20 : Photomicrographies de coupes coronales d'un rat PSR avec une éjection de FG dans le cortex cingulé antérieur (A) immunomarcuées pour la protéine FOS (en noir) et FG (en marron). Le noyau thalamique centro-latéral (B) contient des neurones rétrogradement marqués FG+ mais aucun n'est FOS+ (agrandissement dans l'encadré de chaque photo). Le claustrum (C), le cortex rétrosplénial (D), le noyau supramamillaire (E) contiennent des cellules FOS+/FG+ (flèches rouges). La bande diagonale de Broca (F) contient quelques rares neurones doublement marqués. Echelles : photos B, C et D :200 µm ; encadrés B,C et D : 25µm.**

La partie postérieure du cingulé antérieur a été préférentiellement ciblée pour l'éjection de fluorogold (FG) car elle contient significativement plus de neurones FOS+ en hypersomnie de SP (Figs. 20 (A) et 21, tableau 13). En comparaison à l'étude du GD, le nombre de neurones afférents à cette région est beaucoup plus important et concerne aussi un nombre de régions plus conséquent :

- De nombreuses afférences proviennent du claustrum (Fig. 20 (C)), des cortex somatomoteurs, prélimbique, orbital, rétrosplénial (Fig. 20 (D)), visuel et pariétal.
- Au niveau du thalamus, des neurones FG+ sont présents dans les noyaux thalamiques, antéromédial, centrolatéral (Fig. 20 (B)), médiodorsal, rhomboïd et latérodorsal.
- Au niveau du télencéphale basal, des neurones afférents sont présents en faible quantité dans la bande diagonale de Broca (Fig. 20 (F)) et le noyau préoptique magnocellulaire.
- D'autres neurones afférents sont présents au niveau de l'hypothalamus latéral, du noyau du raphé dorsal, de la substance noire et du SumL (Fig. 20 (E)).

Bien que la plupart de ces régions contiennent des neurones FOS+ après PSR, peu de régions contiennent des cellules doublement marquées FG/FOS+ chez nos rats PSR (Figs. 20 et 21 et tableau 13) :

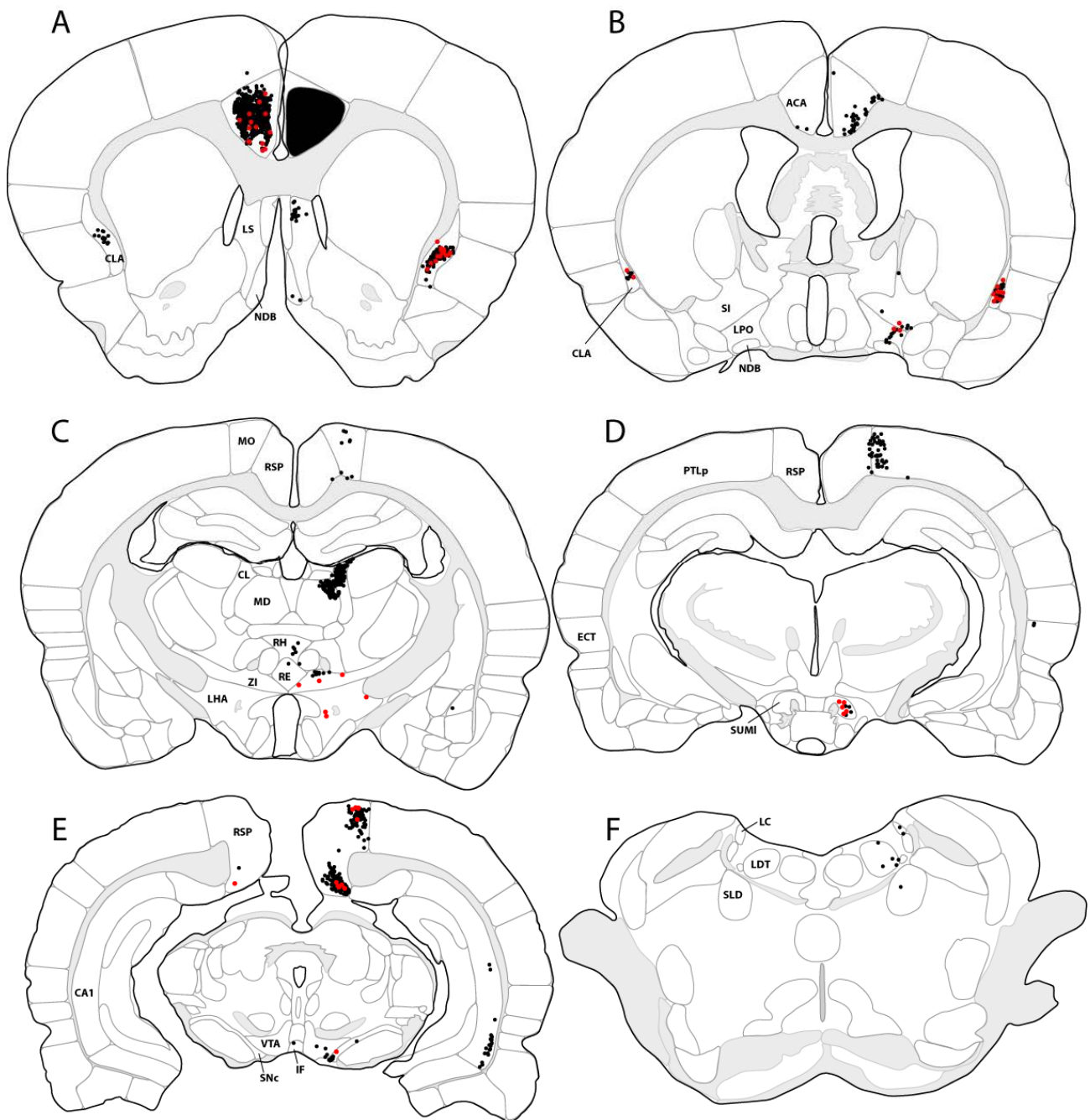
- Sur la totalité des cellules FG+ dans le cortex somatomoteur, le cortex prélimbique et le cortex visuel, le nombre de neurones FG/FOS+ est inférieur à 7 %. Les noyaux thalamiques ne contiennent pas de neurones FG+/FOS+ chez nos animaux.

- L'hypothalamus latéral contient très peu de neurones afférents au cortex cingulé antérieur mais 32% sont FOS+.

- En revanche le claustrum contient de nombreux neurones FG+ et 10% d'entre eux sont FOS+. Dans le cortex rétrosplénial, 11% des neurones FG+ sont FOS+. Le SumL contient moins de neurones FG+ mais 30% d'entre eux sont FOS+.

**D'après nos résultats, le claustrum, le cortex rétrosplénial et le SumL contiennent des neurones actifs pendant le SP qui se projettent vers le cortex cingulé antérieur et pourraient contribuer à son activation au cours du SP.**



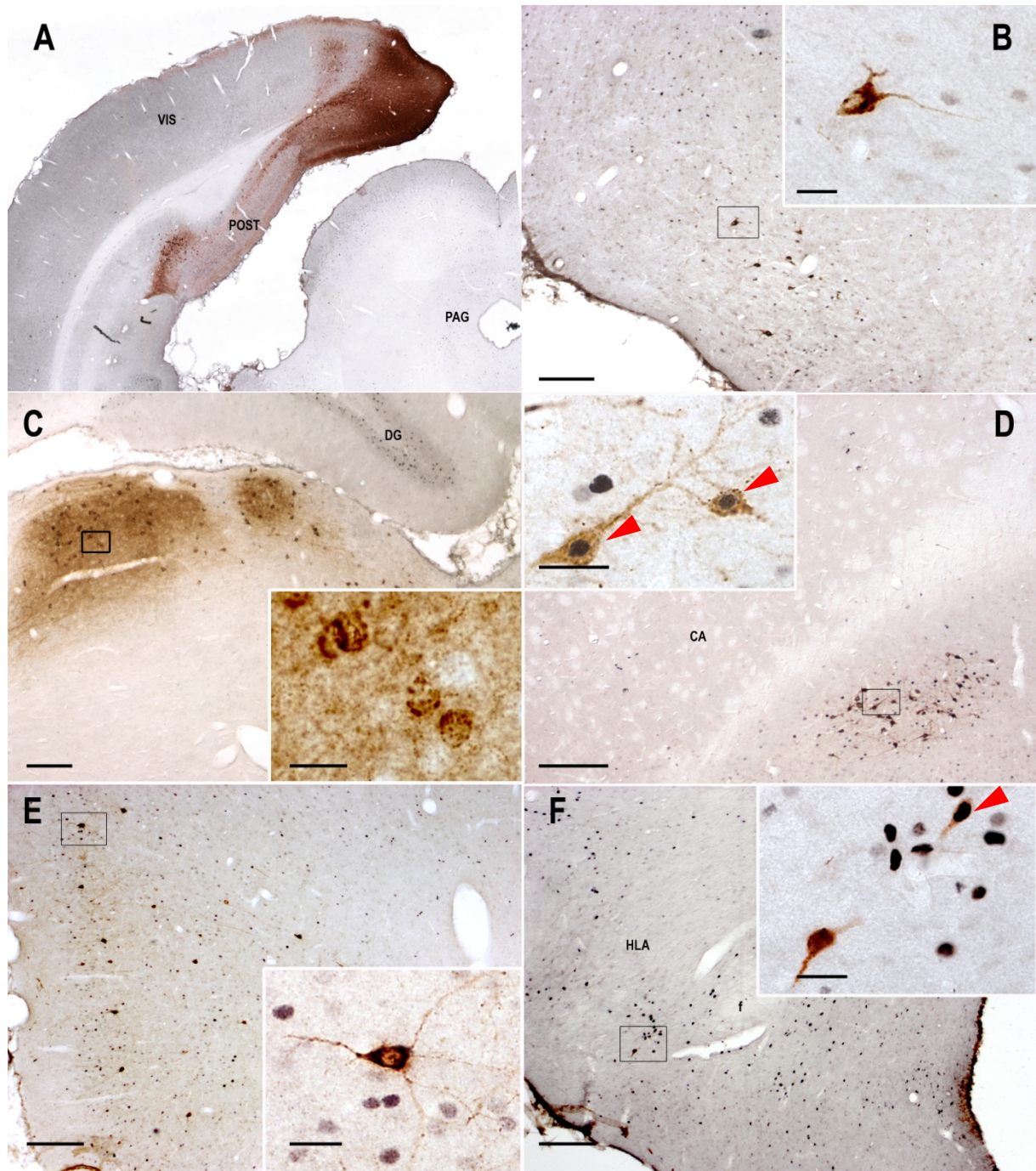


**Figure 21 : Schémas de coupes transversales (A-F) rostro-caudalement alignées montrant la localisation des cellules FG+ et FG/FOS+ chez des rats PSR après injection de FG (A) dans le cortex cingulaire antérieur. Point noir = cellule FG+, point rouge = cellule FG /FOS+. Voir la liste des abréviations. A: +1,7mm ; B: -0,5mm ; C: -2,85mm; D: -4,2mm ; E: -5,6mm ; F: -9,25mm du bregma.**

regions (nombre de coupes)	Fos/FG+		FG+	
	ipsilateral	controlateral	ipsilateral	controlateral
<b>Cerebral cortex</b>				
Anterior cingulate area (n=7)	0	51,0 ± 27,6	0	1581,3 ± 162,6
ventral CA1 (n=4)	2,8 ± 1,3	0	78,0 ± 25,0	0
Clastrum (n=8)	71,0 ± 23,5	7,8 ± 4,5	735,8 ± 171,7	69,3 ± 18,2
Ectorhinal area (n=5)	1,3 ± 1,3	0	15,3 ± 8,1	0
Entorhinal area lateral part (n=4)	0	0	5,0 ± 3,1	0
Infralimbic area (n=3)	3,8 ± 1,5	0	88,0 ± 6,0	0
Somatomotor area (n=5)	13,7 ± 12,7	5,8 ± 3,6	226,7 ± 164,7	327,0 ± 261,4
Orbital area (n=2)	5,5 ± 5,2	1,5 ± 1,2	238,3 ± 50,3	39,8 ± 31,5
Prelimbic area (n=5)	11,5 ± 6,3	4,2 ± 2,9	506,5 ± 211,7	181,5 ± 136,5
Parietal region (n=5)	9,8 ± 7,9	0	128,8 ± 90,7	0
Retrosplenial area (n=8)	49,8 ± 34,4	2,3 ± 1,9	455,5 ± 169,1	10,8 ± 6,8
Temporal association areas (n=5)	0	0	6,0 ± 2,3	0
Tenial tectal (n=3)	3,8 ± 3,8	0,5 ± 0,3	26,0 ± 24,7	9,8 ± 5,9
Visual areas (n=4)	27,0 ± 23,0	0	405,3 ± 222,5	0
<b>Thalamus</b>				
Anterodorsal nucleus (n=1)	0	0	6,5 ± 1,3	0
Anteromedial nucleus (n=1)	2,8 ± 2,4	0	65,5 ± 34,6	0
Anteroventral nucleus (n=1)	0,8 ± 0,8	0	9,3 ± 8,9	0
Central lateral nucleus (n=2)	3,0 ± 2,7	0	206,8 ± 25,9	0
Lateral dorsal nucleus (n=2)	0	0	89,8 ± 18,8	0
Mediodorsal nucleus (n=3)	3,0 ± 3,0	0	145,5 ± 22,6	0
Perireuniens nucleus (n=1)	0,8 ± 0,5	0	17,8 ± 1,7	0
Paraventricular nucleus (n=4)	0,5 ± 0,5	0	11,8 ± 5,6	0
Nucleus reuniens (n=3)	2,5 ± 1,3	0	36,3 ± 6,0	0
Rhomboid nucleus (n=1)	4,5 ± 3,9	0	95,0 ± 33,4	0
Ventral anterior-lateral complex (n=1)	0,3 ± 0,3	0	25,5 ± 7,9	0
Ventral medial nucleus (n=1)	0,3 ± 0,3	0	31,3 ± 11,6	0
Zona incerta (n=1)	2,3 ± 0,3	0	9,5 ± 3,4	0
<b>Striatum, Pallidum</b>				
Central amygdalar nucleus (n=2)	0,3 ± 0,3	0	9,8 ± 3,5	0
Diagonal band nucleus of Broca (n=4)	3,3 ± 1,7	0	34,5 ± 4,0	0,5 ± 0,3
Magnocellular nucleus (n=2)	1,0 ± 0,7	0	14,3 ± 3,0	0
Lateral septal nucleus (n=1)	0	0	5,5 ± 3,6	0
<b>Hypothalamus</b>				
Lateral hypothalamic area (n=4)	4,0 ± 0,8	0,3 ± 0,3	12,5 ± 2,2	0,5 ± 0,5
Supramammillary nucleus (n=2)	7,6 ± 1,9	0	27,3 ± 6,6	0
<b>Brain stem</b>				
Central linear nucleus raphe (n=1)	0	0	2,8 ± 1,5	0
Dorsal nucleus raphe (n=3)	0	0	11,8 ± 2,5	0
Locus coeruleus (n=2)	0,3 ± 0,3	0	14,8 ± 5,2	0
Laterodorsal tegmental nucleus (n=1)	0	0	2,8 ± 0,5	0
Nucleus incertus (n=1)	0,3 ± 0,3	0,3 ± 0,3	6,5 ± 2,1	0,5 ± 0,3
Periaqueductal gray (n=2)	0	0	2,3 ± 1,4	0
Posterior hypothalamic nucleus (n=2)	0,5 ± 0,3	0	6,5 ± 2,6	0
Substantia innominata (n=2)	0,3 ± 0,3	0	6,3 ± 0,8	0
Substantia nigra, compact part (n=3)	0,3 ± 0,3	0	39,8 ± 11,8	1,3 ± 0,6
Ventral tegmental area (n=1)	0	0	3,0 ± 0,4	0

**Tableau 13 : Nombre moyen (±SEM) de cellules FOS/FG+ ou FG+ seule une injection de FG dans le cortex cingulé antérieur** (moyenne sur 4 animaux, n=nombre de sections quantifiées pour les structures qui présentent des cellules immunomarquées au FG). Les coupes sont quantifiées tous les 600µm.

### 3.3 Ejection de CTb dans le rétrospécial des rats PSR



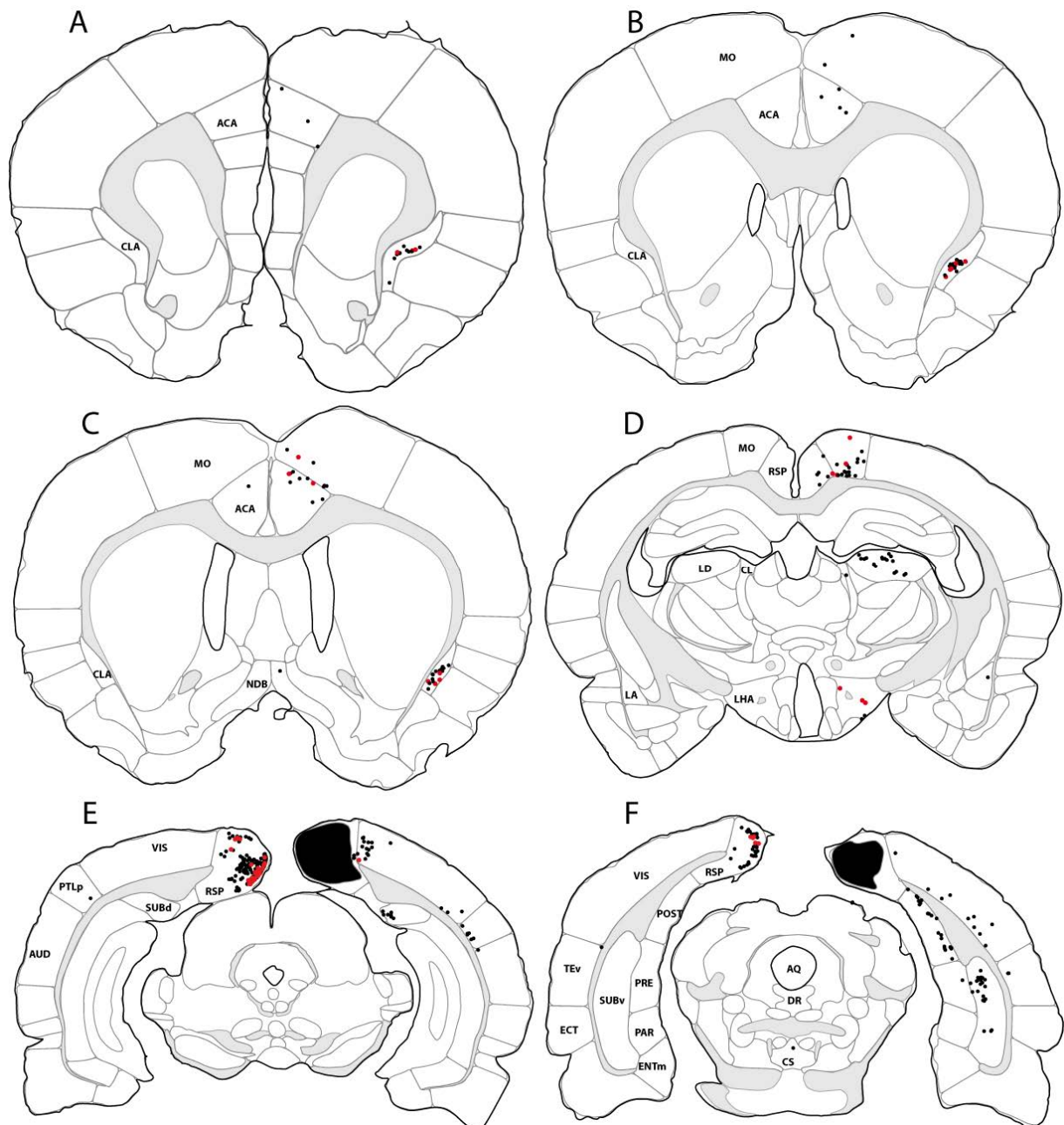
**Figure 22 : Photomicrographies de coupes coronales de rats PSR avec une éjection de CTb dans le cortex rétrospécial (A) immunomarquées pour FOS (en noir) et CTb (en marron). La bande diagonale de Broca (B), le noyau thalamique dorso-latéral (C) et le cortex cingulé antérieur contiennent des neurones CTb+ mais aucun n'est FOS+ (agrandissement dans l'encadré de chaque photo). Le claustrum (D) contient de nombreux neurones doublement marqués CTb/FOS+ (flèches rouges). L'hypothalamus latéral (F) contient de rares neurones doublement marqués. Echelles : photos B, C et D : 200  $\mu$ m ; agrandissements en encadré B, C et D : 25  $\mu$ m.**

L'éjection de CTb s'étend plutôt dans la partie caudale du rétrosplénial (Figs. 22 (A) et 23 (E-F)). Les neurones FOS+ sont plus nombreux dans la partie caudale par rapport à la partie rostrale de ce cortex. Bien que l'éjection soit assez importante chez nos rats PSR, le nombre de neurones rétrogradement marqués et de neurones FOS+ est faible.

Les neurones CTb+ (Figs. 22 et 23 ; Tableau 14) sont présents dans : le cortex cingulé antérieur (Fig. 22 (E)), le claustrum (Fig. 22 (D)), les cortex moteur et visuel, le subiculum dorsal, le post subiculum, les noyaux thalamiques antérodorsal, antéroventral, laterodorsal (Fig. 22 (C)) ainsi qu'en faible nombre au niveau de la bande diagonale de Broca (Fig. 22 (B)).

Seul le claustrum contient des neurones CTb+ exprimant la protéine FOS+ soit environ 22% des neurones CTb+ (Figs. 22 (E) et 23, tableau 14). Le cortex cingulé antérieur contient en revanche peu de neurones doublement marqués puisque seulement 5% des neurones CTb sont FOS+. Le cortex rétrosplénial et cingulé antérieur sont donc interconnectés, mais leurs projections ne sont pas réciproquement actives. Le nombre de neurones CTb+ et CTb+/Fos+ dans l'hypothalamus latéral est très faible (Figure 22 (F)).

**D'après nos résultats, le claustrum serait la seule voie afférente qui activerait le cortex rétrosplénial en SP.**



**Figure 23 : Schémas de coupes transversales (A-F) rostro-caudalement alignées montrant la localisation des cellules CTb+ et CTb/FOS+ chez des rats PSR après injection de CTb (E-F) dans le cortex rétrosplénial. Point noir = cellule CTb+, point rouge = cellule CTb/FOS+. Voir la liste des abréviations. A: +1,7mm ; B: +1,45mm ; C: +0,45mm ; D: -2,85mm ; E: -6,04mm ; F: -7,6mm du bregma.**

Regions (number of sections)	CTb/FOS+		CTb+	
	ipsilateral	controlateral	ipsilateral	controlateral
<b>Cerebral cortex</b>				
Retrosplenial (n=6)		25,8 ± 5,4		235,3 ± 66,1
Anterior cingulate (n=6)	3,3 ± 1,4	2,8 ± 2,4	89,3 ± 29,8	29,5 ± 25,5
Clastrum (n=5)	18,5 ± 4,1	0,3 ± 0,3	84,0 ± 11,5	3,8 ± 1,1
Infralimbic area (n=2)	0	0	2,0 ± 0,4	0
Motor cortex (n=10)	0,5 ± 0,5	0	21,3 ± 8,2	1,0 ± 0,7
Parietal region (n=2)	0,3 ± 0,3	0	7,3 ± 1,6	1,0 ± 0,6
Visual cortex (n=3)	2,0 ± 2,0	0	53,8 ± 20,4	0,5 ± 0,5
Auditory cortex (n=3)	0	0	6,0 ± 2,1	0
Dorsal subiculum (n=3)	0	0	63,0 ± 17,9	1,3 ± 1,3
Temporal association cortex (n=3)	0	0	5,3 ± 3,0	1,3 ± 0,9
Ectorhinal (n=3)	0,3 ± 0,3	0	2,3 ± 1,9	0
Postsubiculum (n=1)	1,0 ± 1,0	0	26,8 ± 17,6	0,3 ± 0,3
<b>Thalamus</b>				
Anterodorsal nucleus (n=1)	0,8 ± 0,5	0	114,8 ± 86,8	0
Anteroventral nucleus (n=1)	0,3 ± 0,3	0	60,0 ± 48,8	0
Lateral dorsal nucleus (n=2)	0,3 ± 0,3	0	110,0 ± 29,4	0
Nucleus reuniens (n=2)	0	0	0,5 ± 0,3	0
Central lateral nucleus (n=1)	0	0	7,8 ± 6,1	0
Anteromedial nucleus (n=1)	0	0	0,8 ± 0,5	0
<b>Hypothalamus</b>				
Lateral hypothalamic area (n=2)	1,3 ± 0,9	0	4,5 ± 1,2	0
Supramammillary nucleus (n=2)	0,3 ± 0,3	0	1,0 ± 0,7	0
<b>Striatum, pallidum</b>				
Diagonal band nucleus (n=3)	2,0 ± 0,7	0	17,5 ± 4,4	0,5 ± 0,3
Superior central nucleus raphe (n=2)	0	0	2,3 ± 0,8	0

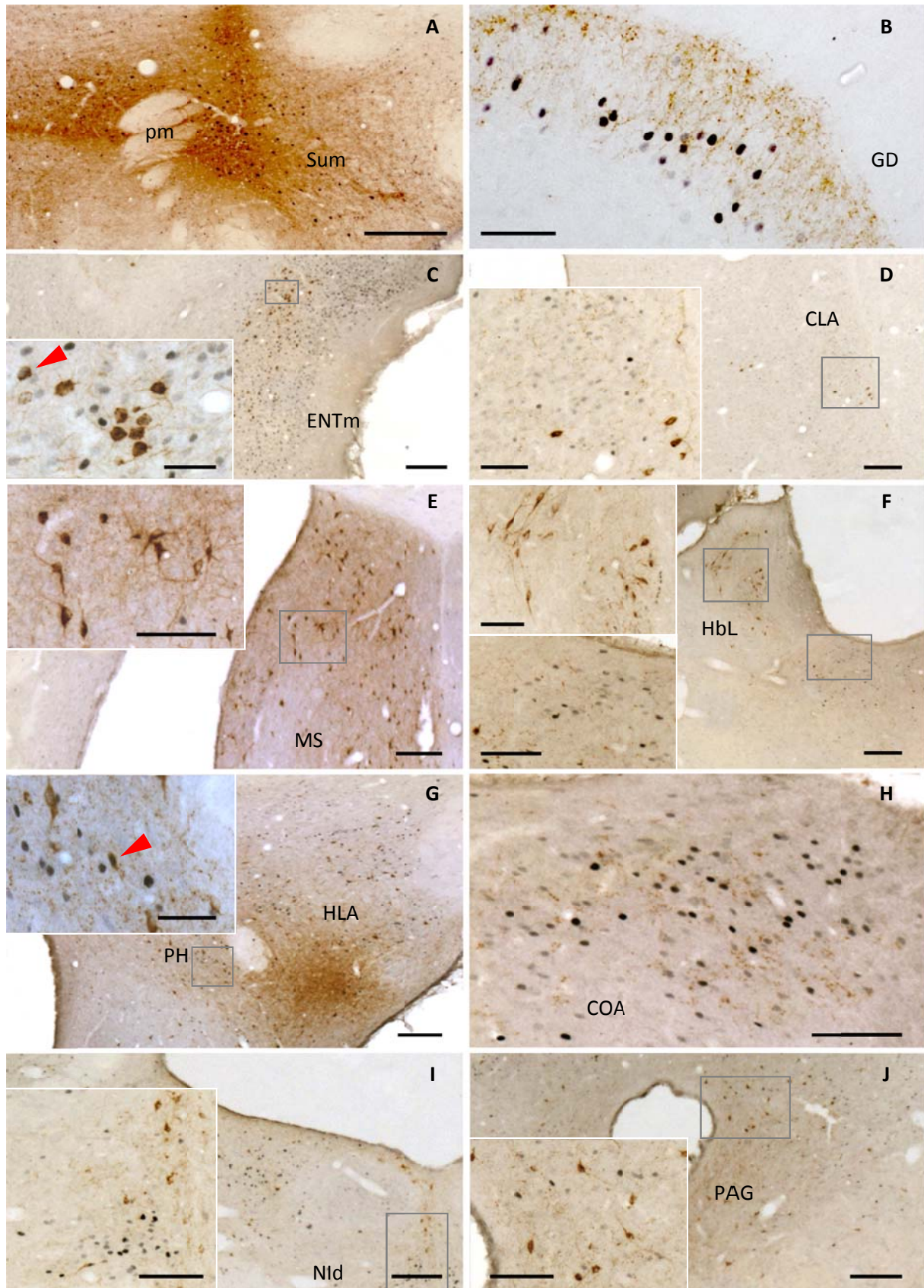
**Tableau 14 : Nombre moyen (±SEM) de cellules immunoréactives pour la protéine FOS et CTb ou CTb simple chez les animaux PSR qui ont reçu une éjection de CTb dans le cortex rétrosplénial (4 animaux par condition, n=nombre de sections quantifiées pour les structures qui présentent des cellules immunomarquées à la CTb). Les coupes sont quantifiées tous les 600µm.**

Nos résultats indiquent que :

- Le SumL envoie des projections efférentes actives pendant le SP sur le gyrus dentelé et au cortex cingulé antérieur.
- Le claustrum envoie des projections efférentes actives pendant le SP au cingulé antérieur et au cortex rétrospénial.
- Le rétrospénial envoie des projections efférentes actives pendant le SP au cortex cingulé antérieur.
- Les noyaux thalamiques, le télencéphale basal et l'hypothalamus latéral ne contiennent pas de projections actives au cours du SP aux régions du gyrus dentelé, du cortex cingulé antérieur et du cortex rétrospénial.

**En conclusion, le claustrum et/ou le noyau supramamillaire envoient des projections actives pendant le SP au cortex cingulé antérieur et rétrospénial et au gyrus dentelé.**

### 3.4 Ejection de CTb dans le Sum (résultats préliminaires)



**Figure 24 :** Photomicrographies de coupes coronales de rats PSR avec une éjection de CTb dans le noyau supramamillaire (A) immunomarquées pour FOS (en noir) et CTb (en marron). Le gyrus dentelé (B), le cortex amygdalien (H), le noyau paraventriculaire et l’habenula latérale (F),



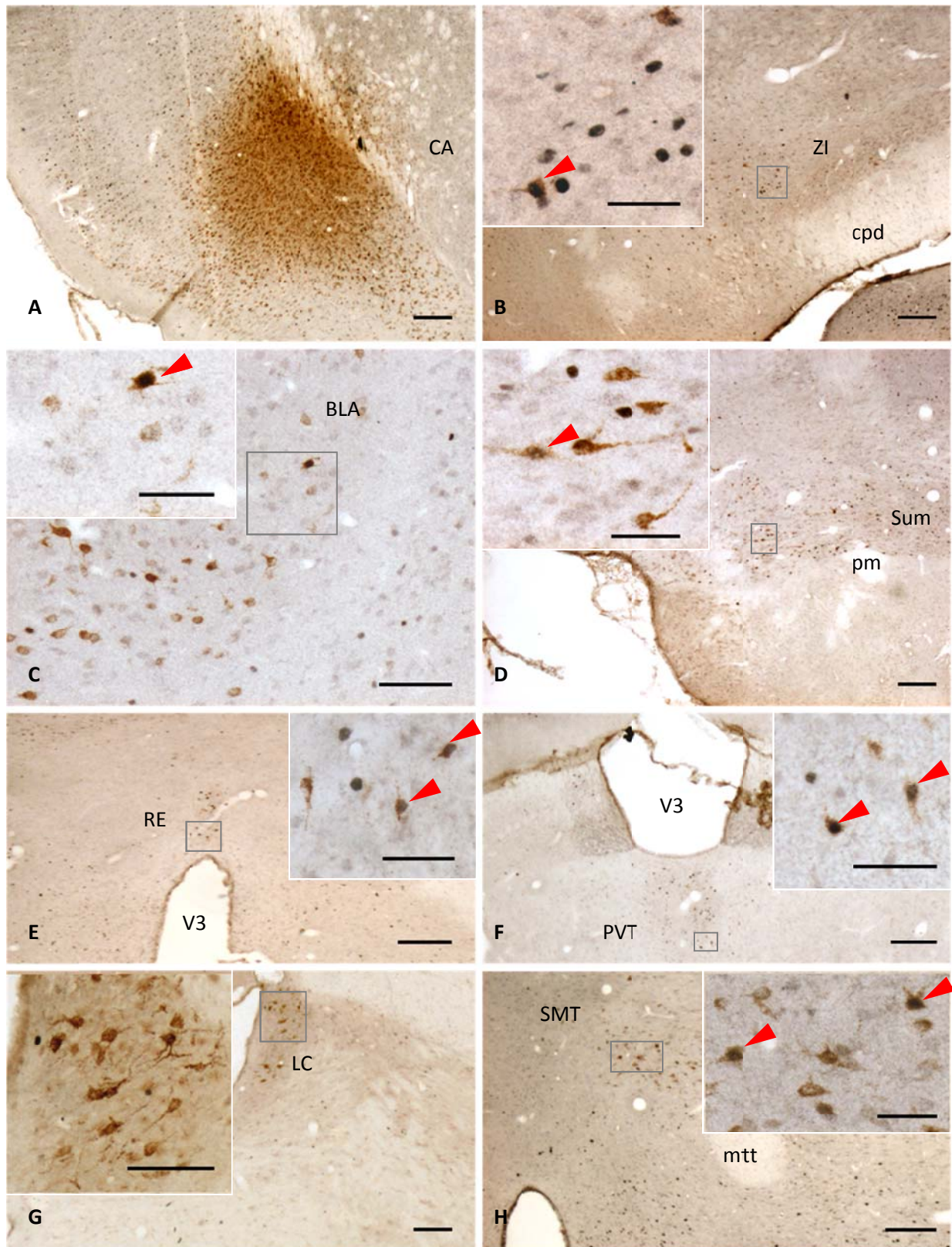
l'hypothalamus latéral et postérieur (G) et le claustrum (D) contiennent de nombreuses fibres antérogradement marquées. Le septum médian (E), le noyau incertus (I), la substance grise périaqueducale (J) et l'habénula latérale (F) contiennent des neurones rétrogradement marqués à la CTb mais aucun neurone doublement marqué (agrandissement dans l'encadré de chaque photo). Des neurones FOS/CTb+ (indiqués par les flèches rouges) sont présent uniquement dans l'hypothalamus latéral (G) et dans le cortex entorhinal (C). Echelles : photos A-G et I-J : 200  $\mu\text{m}$  ; photo H : 100 $\mu\text{m}$  ; agrandissements en encadré B,C, et G : 50  $\mu\text{m}$  ; D, E, F, I et J : 100 $\mu\text{m}$ .

Concernant cette étude, nos résultats sont encore préliminaires (Figures 24 et 25). Nos éjections de CTb sont assez restreintes au Sum et plus particulièrement au SumL.

Suite à ces éjections, les neurones CTb+ sont présents en grand nombre dans le cortex entorhinal médian, le septum médian, l'hypothalamus latéral et postérieur, le noyau incertus, le subiculum ventral et la substance grise périaqueducale. Ils sont en plus faible nombre dans le claustrum, le noyau paraventriculaire et l'habénula latérale.

Ainsi après hypersomnie de SP, les neurones doublement marqués FOS+/CTb+ ont été observés exclusivement dans l'hypothalamus latéral et le cortex entorhinal médian.

### 3.5 Ejection de Fluorogold dans le Claustrum (Résultats Préliminaires)



**Figure 25 :** Photomicrographies de coupes coronales de rats PSR avec une éjection de FG dans le claustrum (A) immunomarquées pour FOS (en noir) et FG (en marron). Les neurones FG+ sont présents dans la zona incerta (B), l'amygdale basolatérale (C), le noyau supra-mammillaire (D), le noyau reuniens (E), le noyau thalamique intraventriculaire (F), le locus coeruleus (G), le noyau thalamique sous-médian (H). Les neurones doublement marqués FOS/FG+ (flèches en rouges) sont présents dans

la zona incerta (B), l'amygdale basolatérale (C), le noyau supramammillaire (D), le noyau reuniens (E), le noyau paraventriculaire (F) et sous médian du thalamus (F). Echelles : Photo A et C : 100µm ; Photo B et D à H : 200µm. Grossissement en encadré B-H : 50µm.

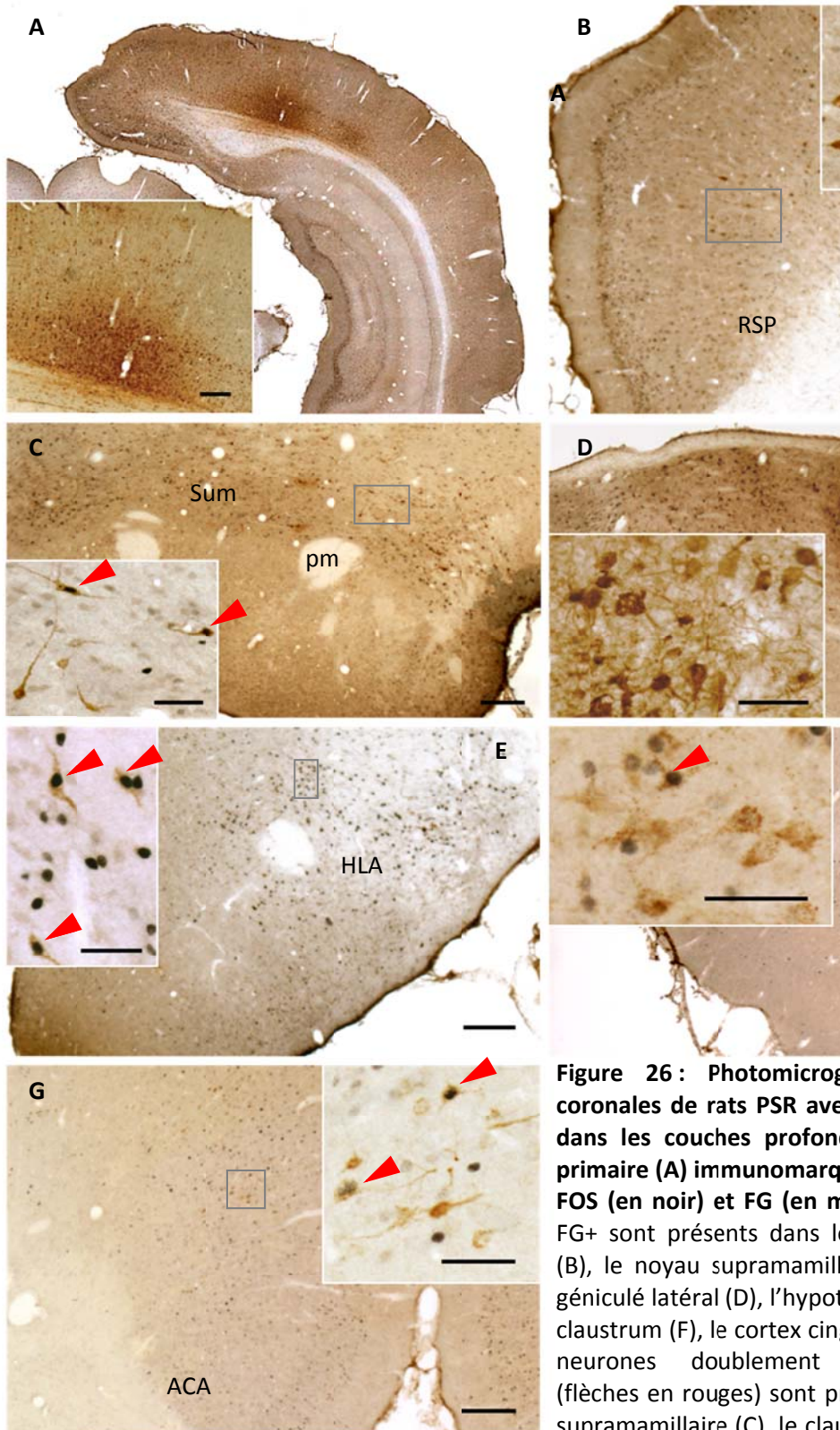
Le claustrum est un noyau qui a une large étendue rostro-caudale mais une très faible étendue médio-latérale ; de ce fait il est possible que l'éjection de traceur chez certains de nos rats ait aussi touché les couches profondes des cortex voisins au claustrum (Fig.25 (A)).

Après éjection de FG dans le claustrum des rats PSR, des neurones FG+ simples sont présents en grand nombre dans le locus coeruleus (Fig. 25).

Contrairement aux études précédentes (voir ci-dessus), des neurones FG/FOS+ ont été observés dans de nombreuses aires cérébrales, comme la zona incerta, l'amygdale basolatérale, et les noyaux thalamiques mais aussi dans le Sum.

**Ainsi le claustrum reçoit des projections actives pendant le SP de nombreuses régions sous corticales dont le Sum.**

### 3.6 Ejection de fluorogold dans le cortex visuel principal (Préliminaires)



**Figure 26 :** Photomicrog coronales de rats PSR avec dans les couches profond primaire (A) immunomark FOS (en noir) et FG (en m FG+ sont présents dans le (B), le noyau supramamilla géniculé latéral (D), l'hypoclaustrum (F), le cortex cing neurones doublement (flèches en rouges) sont pr supramamillaire (C), le clau cingulé antérieur (G). Ech 200µm. Grossissement en et C à G : 50µm.

L'éjection de FG dans les couches profondes du cortex visuel primaire chez un rat PSR montre que ce cortex reçoit des projections (neurones FG+) massives du noyau thalamique géniculé (fig. 26 (D)). Des neurones FG+ simples sont présents dans le cortex rétrosplénial, le thalamus et l'aire hypothalamique latérale.

Des neurones FG+/FOS+ sont présents en grand nombre dans l'aire hypothalamique latérale (fig. 26 (E)), le claustrum (fig. 26 (F)), le noyau supramammillaire (fig. 26 (C)) et le cortex cingulé antérieur (fig. 26 (G)). Le cortex visuel primaire est une région qui contient peu de neurone FOS+ chez les rats PSR par rapport aux groupes PSD et EV.

**Le cortex visuel primaire recevrait des projections actives du noyau supramammillaire, du claustrum, du cortex cingulé antérieur et de l'aire hypothalamique latérale en hypersomnie de SP.**

Le noyau supramamillaire reçoit des projections qui l'activeraient potentiellement en SP de l'hypothalamus postérieur et de l'entorhinal médian.

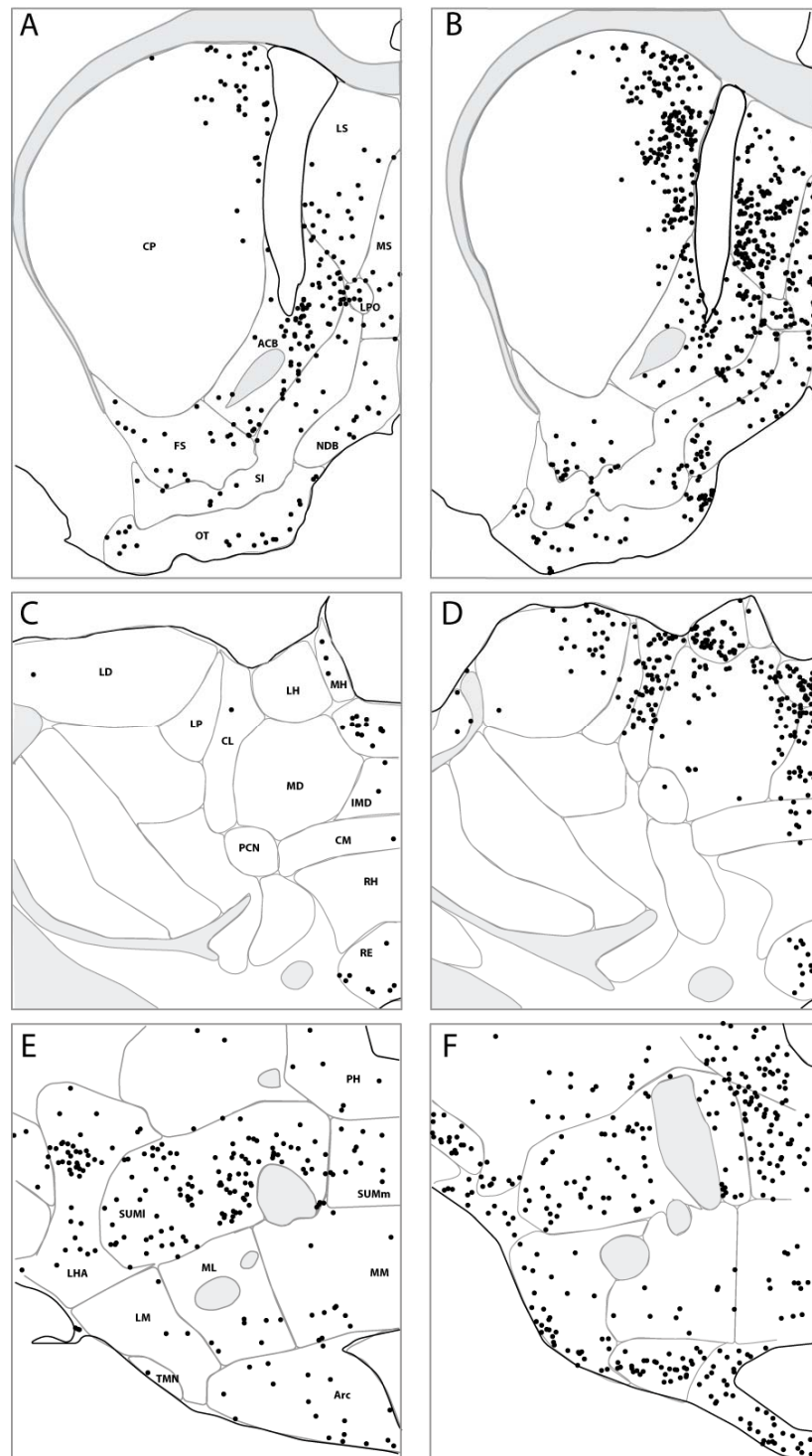
Ces résultats préliminaires indiquent à l'image du cortex cingulé antérieur et du claustrum, que le cortex visuel primaire recevrait des projections actives des noyaux supramamillaires latéraux pendant l'hypersomnie de SP. Il recevrait aussi des projections actives du claustrum et de l'aire hypothalamique latérale pendant le SP.

Les neurones projetant au claustrum et actifs au cours de l'hypersomnie de SP seraient localisés dans certains noyaux thalamiques, l'amygdale basolatérale, de la zona incerta et des noyaux supramamillaires latéraux.

Ainsi, le noyau supramamillaire et le claustrum seraient impliqués dans l'activation pendant le SP de nombreuses régions. Ces noyaux seraient eux-mêmes activés par des projections de l'hypothalamus latéral.

Nous avons comparé le nombre de neurones FOS+ dans le télencéphale basal, le thalamus et le noyau supramamillaire de rat en hypersomnie de SP et en éveil exploratoire. Ceci afin de comparer le niveau d'activation des régions afférentes au cortex pendant ces 2 états.

### 3.7 Quantification des neurones FOS+ dans les régions afférentes au cortex chez les rats PSR et EV



**Figure 27 : Schéma de coupes transversales (A-F) représentant la distribution des neurones FOS+ (points noirs) dans les régions connues pour leurs projections au cortex chez les animaux PSR (A, C, E) et EV (B, D, F). A-B : +0,45mm du Bregma (Agrandissement du télencéphale basal) ; C-D : -3,25mm du Bregma (Agrandissement au niveau du thalamus) ; E-F : -4,5mm du Bregma (Agrandissement au niveau du Supramamillaire).**

Chez les rats PSR, peu de neurones FOS+ sont observés dans le télencéphale basal et les noyaux thalamiques. A l'inverse, chez les rats EV, le nombre de neurones FOS+ est très élevé dans ces mêmes structures (Fig. 27 et tableau 15).

Le nombre de neurones FOS+ est plus élevé dans presque tous les noyaux du télencéphale basal chez les rats EV par rapport aux rats PSR. Le nombre de neurones dans le septum médian, le septum latéral, la bande diagonale de Broca, le noyau magnocellulaire préoptique, dans le caudoputamen et la substance inominée est significativement plus élevé chez les rats EV par rapport aux rats PSR.

Le nombre de neurones FOS+ est plus élevé dans presque tous les noyaux thalamiques chez les rats EV par rapport aux rats PSR. Les noyaux intralaminaires contiennent peu de neurones FOS+ chez nos 2 conditions, seul le noyau centrolatéral contient un nombre de neurones élevés chez les rats EV.

Les noyaux supramamillaires contiennent un nombre de neurones FOS+ élevé chez les rats PSR et EV. Ce nombre est significativement au moins 2 fois plus élevé chez les rats PSR au niveau de la partie latérale du Sum par rapport aux rats EV. Le nombre de neurones Fos+ au niveau de la partie médiane du Sum n'est pas significativement différent entre nos 2 groupes de rats.



Regions (section n=1)	PSR	EV	
<b>Basal Forebrain</b>			
<b>Pallidum</b>			
Medial septal nucleus	8,8 ± 0,8	45,0 ± 4,1	***
Diagonal band nucleus	13,3 ± 2,4	54,5 ± 12,1	***
Substantia innominata	20,8 ± 2,2	56,0 ± 8,5	***
Magnocellular nucleus	6,5 ± 0,3	51,3 ± 8,8	***
<b>Striatum</b>			
Nucleus accumbens	55,5 ± 6,5	119,8 ± 31,9	
Caudoputamen	24,5 ± 3,9	249,0 ± 55,4	***
Striatal fundus	9,5 ± 2,6	17,8 ± 5,9	
Lateral preoptic area	8,8 ± 1,7	22,8 ± 4,0	
lateral septal nucleus	29,8 ± 6,0	184,8 ± 14,0	***
Olfactory tubercle	19,5 ± 4,1	64,0 ± 9,7	***
<b>Supramammillary nucleus</b>			
Supramammillary nucleus, Medial part	89,8 ± 47,2	118,8 ± 16,5	
Supramammillary nucleus, Lateral part	221,0 ± 42,9	102,0 ± 17,3	*
<b>Thalamus</b>			
<b>Intralaminar group of the dorsal thalamus</b>			
Centrolateral thalamic nucleus	1,5 ± 0,5	48,5 ± 6,5	***
Central medial thalamic nucleus	0,5 ± 0,3	11,3 ± 7,0	
Paracentral nucleus thalamus	0,0 ± 0,0	1,3 ± 0,9	***
Rhomboid thalamic nucleus	1,0 ± 0,4	2,8 ± 2,4	
<b>Others groups of the dorsal thalamus</b>			
Intermediodorsal thalamic nucleus	1,8 ± 0,5	18,5 ± 8,3	
Laterodorsal thalamic nucleus	0,8 ± 0,5	42,5 ± 13,5	***
Lateral habenular nucleus	1,5 ± 0,5	40,5 ± 9,4	***
Mediodorsal thalamic nucleus	1,0 ± 0,7	30,5 ± 8,6	***
Medial habenular nucleus	2,8 ± 0,9	0,0 ± 0,0	***
Paraventricular thalamic nucleus, anterior part	10,0 ± 2,6	38,5 ± 7,4	***
Reuniens thalamic nucleus	5,5 ± 1,3	20,3 ± 9,6	***

**Tableau 15 : Nombre moyen (±SEM) de cellules immunoréactives pour la protéine FOS chez les animaux PSR et EV dans les différentes régions du télencéphal basal, des noyaux supramammillaires, et des noyaux thalamiques (4 animaux par condition, un niveau quantifié pour chaque région, à +0,45mm, -3,25mm et -4,5mm du bregma). Significativité Kruskal Wallis suivi d'un Mann Whitney ; PSR vs EV : \*\*p<0,01, \*p<0,05.**

Le télencéphale basal et le thalamus classiquement impliqués dans l'activation corticale, contiennent significativement plus de neurones FOS+ chez les rats EV que les rats PSR. Seule la partie latérale des noyaux supramamillaires contient significativement plus de neurones FOS+ chez les rats PSR que les rats EV. Le nombre de neurones FOS+ dans la partie médiane du Sum n'est pas significativement modifié entre nos deux conditions.

**Le Sum serait donc beaucoup plus actif pendant le SP par rapport à l'EV, au contraire des autres régions afférentes au cortex.**

### 3.8 Nature neurochimique des neurones FOS+ dans le Sum après hypersomnie de SP (résultats préliminaires)

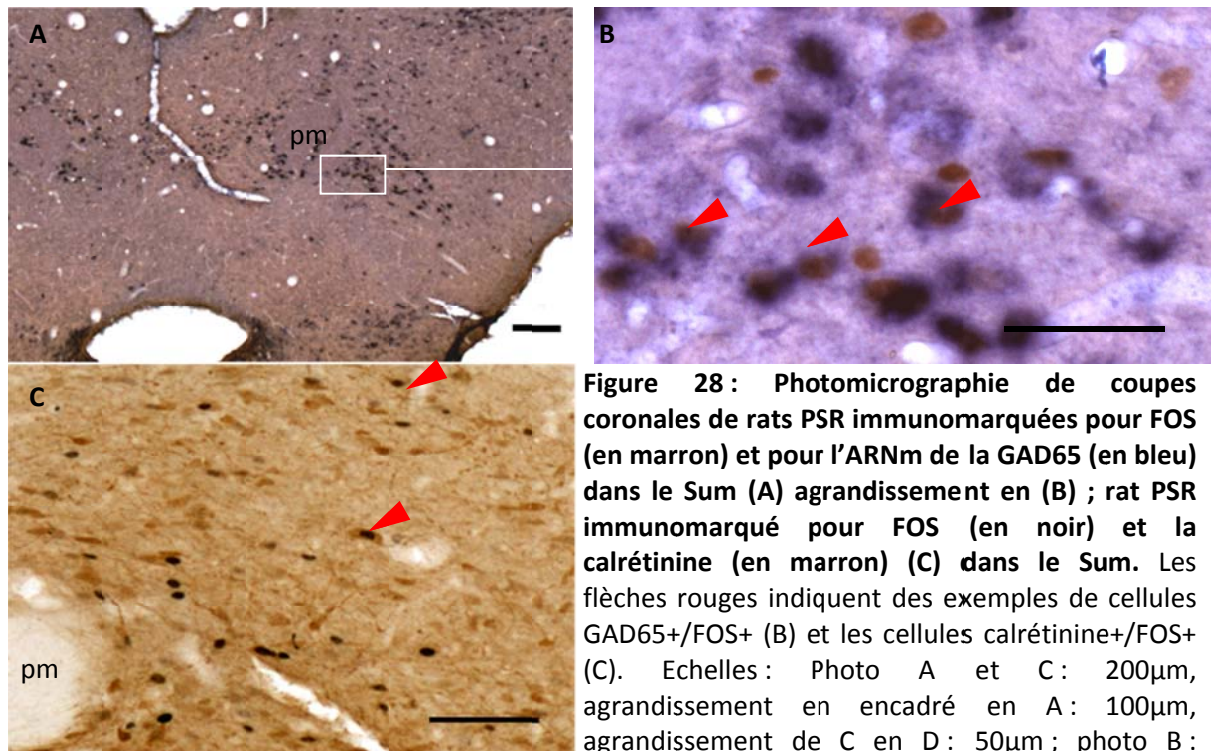


Figure 28 : Photomicrographie de coupes coronales de rats PSR immunomarquées pour FOS (en marron) et pour l'ARNm de la GAD65 (en bleu) dans le Sum (A) agrandissement en (B) ; rat PSR immunomarcué pour FOS (en noir) et la calrétinine (en marron) (C) dans le Sum. Les flèches rouges indiquent des exemples de cellules GAD65+/FOS+ (B) et les cellules calrétinine+/FOS+ (C). Echelles : Photo A et C : 200µm, agrandissement en encadré en A : 100µm, agrandissement de C en D : 50µm ; photo B : 100µm.

L'hybridation in situ de l'ARNm de la GAD 65 et l'immunomarcage de FOS chez deux rats PSR indique que de nombreux neurone GAD65+ sont présents dans le SumL et que plus de la moitié des neurones FOS+ serait GAD65+ (fig. 28). Des données au laboratoire indiquent aussi que plus de la moitié des neurones FOS+ dans le Sum sont VGLUT2 3 h d'hypersomnie de SP (communication personnelle Olivier Clement).

**Ainsi, le noyau supramamillaire latéral projette au GD, au claustrum, au cortex amygdalien et au cortex cingulé antérieur. En retour, il reçoit des projections qui l'activeraient potentiellement en hypersomnie de SP de l'hypothalamus latéral et de l'entorhinal. Enfin, les neurones du Sum qui sont spécifiquement activés pendant le SP seraient de nature glutamatergique (excitatrice) ou GABAergiques (inhibitrices).**

Il reste à déterminer la nature neurochimique des neurones du Sum actifs pendant le SP et projetant à l'hippocampe.

D'après nos résultats le SumL serait une région cruciale dans l'activation corticale au cours du sommeil paradoxal puisqu'elle contient à la fois un nombre de neurones FOS+ important après hypersomnie de SP et projetant aux régions corticales actives en hypersomnie de SP. Pour tester le rôle de ces neurones, nous avons lésé le Sum et analysé les caractéristiques de l'activation corticale observée après hypersomnie de SP :

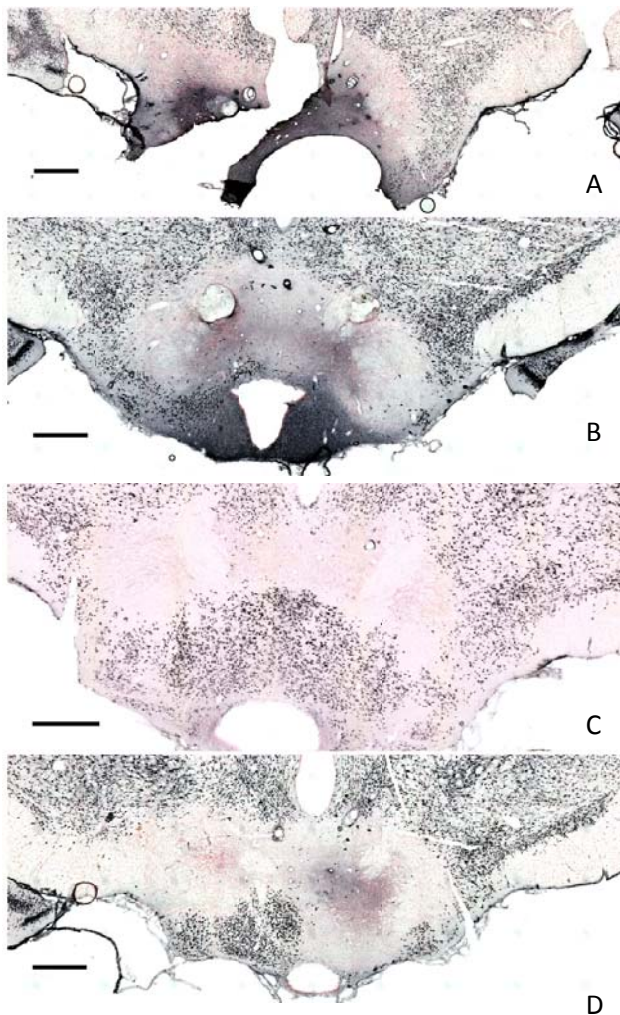
- La distribution des neurones exprimant le marqueur d'activation indirect FOS dans les régions corticales pendant le SP.
- Les caractéristiques de l'EEG (notamment l'amplitude et la fréquence des différentes ondes en particulier le thêta pendant le SP).

Notre hypothèse est que ces 2 paramètres devraient être sévèrement altérés par la lésion du Sum.

## **4. Lésion du Sum**

### **4.1 Vérification et validation de la lésion du Supramamillaire**

L'immunohistochimie de NeuN et la contre coloration au rouge neutre au niveau du supramamillaire, nous indiquent que l'éjection d'acide iboténique a supprimé tous les neurones du noyau supramamillaire, sans lésion des fibres de passage puisque le tractus mamillaire est préservé chez nos quatre rats lésés (Figure 29). La lésion s'étend à la totalité des noyaux supramamillaires incluant parfois des régions voisines, notamment les corps mammillaires. La lésion est bilatérale, les lésions sont en général de taille équivalente des deux côtés (Fig. 29).

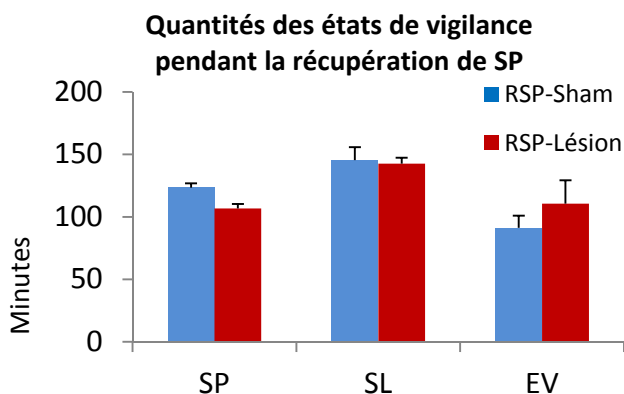


**Figure 29** Photomicrographies de coupes coronales immunomarquées au NeuN (en noir) et contre colorés au rouge neutre (4 rats lésés) au niveau des noyaux supramamillaires chez des rats qui ont subi une lésion par éjection iontophorétique d'acide iboténique. Les neurones ont été marqués à l'aide du marqueur neuronal NeuN, ce marquage montre une absence de neurone dans la région du supramamillaire alors que les cellules gliales colorées par le rouge neutre subsistent dans cette région. Echelles A, B, C et D : 500µm

## 4.2 Effets de la lésion sur l'architecture des états de vigilance et les caractéristiques de l'EEG

### 4.2.1 Architecture des états de vigilance

Plus de 7 jours après la lésion, les quantités des états de vigilance ne sont pas significativement différentes entre les rats lésés et non lésés en condition basale et en récupération de SP (Fig. 30). Le SP occupe 30% des 6 dernières heures de la récupération de SP chez les rats lésés, contre 35% chez les témoins ; le sommeil lent occupe 40% des 6 dernières heures chez les rats lésés et les témoins. Le Sum n'est donc impliqué ni dans la genèse, ni dans l'homéostasie des états de vigilance.



**Figure 30 : Quantités des 3 états de vigilance chez les animaux PSR-Sham et PSR-Lésion (n=4 par groupe) pendant les 6 dernières heures avant le sacrifice.** Significativité : Kruskal Wallis suivi d'un Mann Withney. Pas de différence significative entre les 2 groupes.

### 4.2.2 Caractéristiques de l'EEG

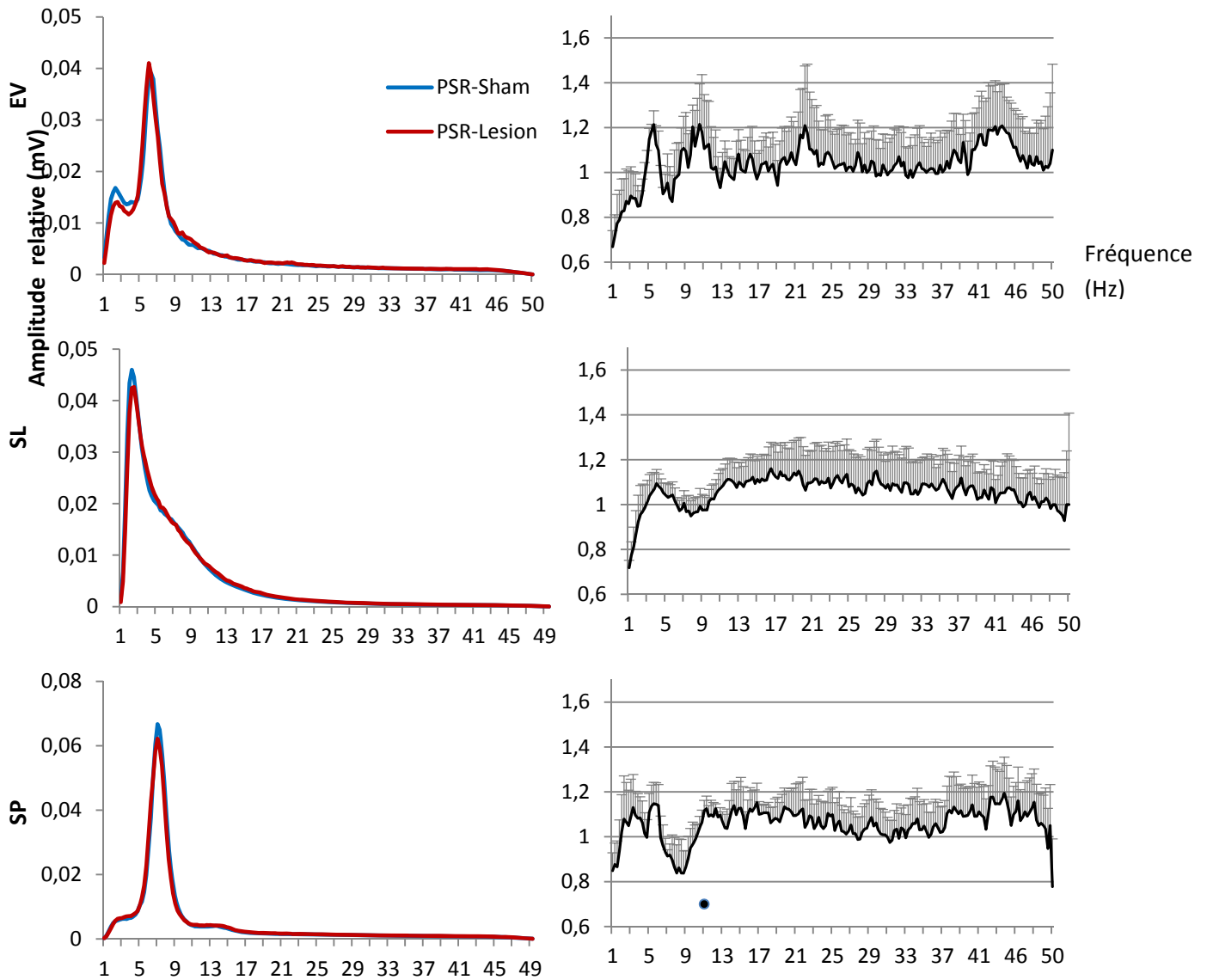
L'analyse des enregistrements EEG indique que la lésion du Sum entraîne une modification de l'EEG au cours des 3 états de vigilance, en conditions basales et pendant la récupération de SP.

#### 1) Condition basale

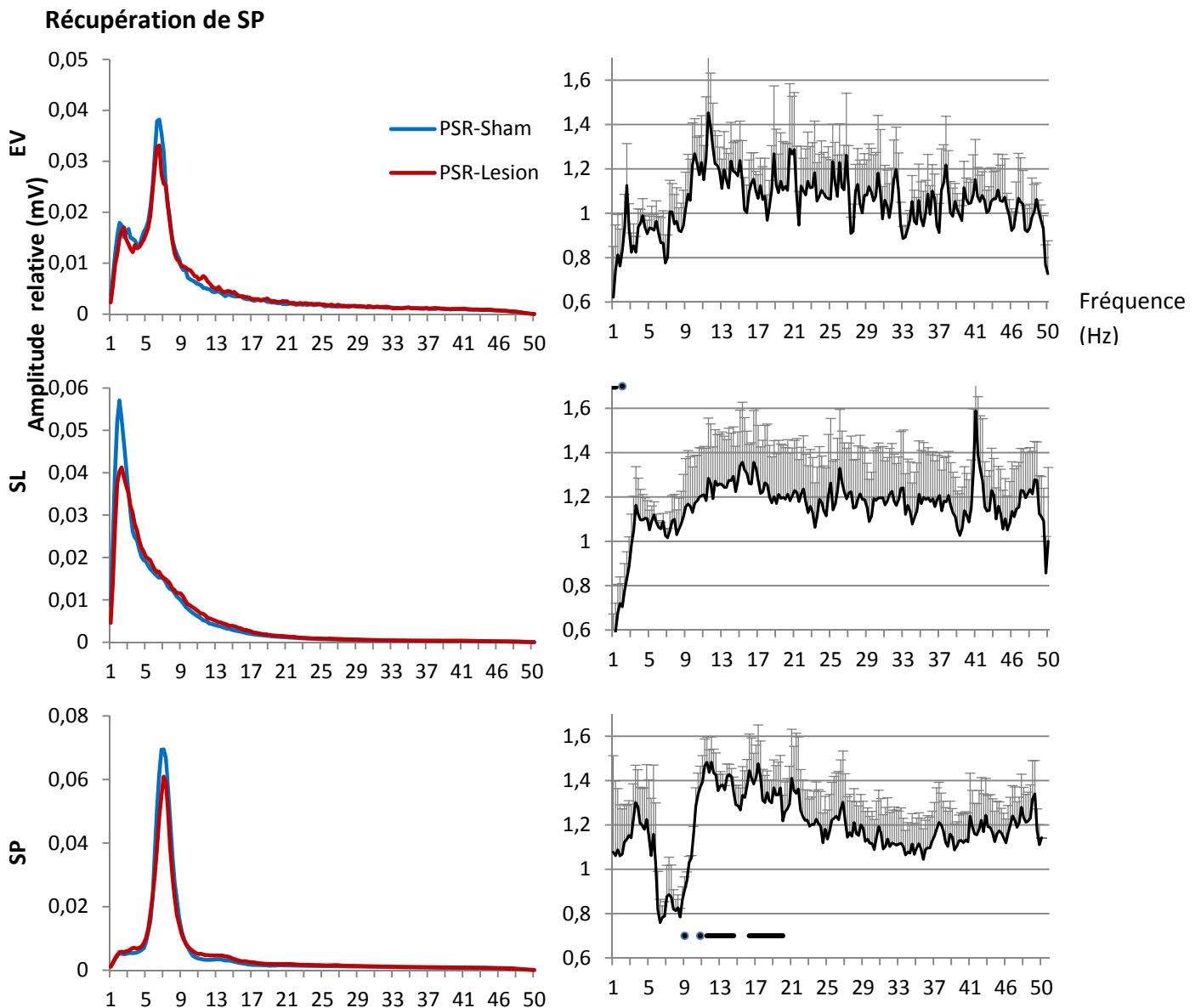
Les spectres de fréquence des différents états de vigilance sont similaires entre nos 2 groupes de rats pendant la condition basale (Figure 31) :

- Seule l'amplitude à la fréquence de 10,94Hz lors des phases de SP est significativement augmentée chez le groupe de rats lésés (Figure 31). Cependant, nous observons une tendance non significative à la diminution de l'amplitude dans la gamme thêta chez nos rats lésés.
- La fréquence du pic d'amplitude dans des gammes de fréquence delta, thêta, sigma, beta, gamma1 et gamma2 n'est pas modifiée entre nos 2 groupes de rats (Tableau 16).
- De plus l'amplitude cumulée des fréquences aux oscillations delta, thêta, sigma, beta, gamma1 et gamma 2 n'est pas significativement différente entre nos 2 groupes de rats pour chacun des états de vigilance (Figure 33).

### Enregistrement contrôle de 12h de 7h à 19h



**Figure 31: Spectre de fréquences moyen sur 12h pendant l'EV, le SL et le SP chez les animaux PSR-Sham (n=4) et PSR-Lésion (n=4) dans les conditions basales.** Pour chaque animal et chaque état de vigilance, le spectre de fréquences (graphique à droite) est une moyenne des spectres de fréquences de 5 secondes. Les graphiques de gauche montrent l'amplitude moyenne des fréquences des PSR-Lésions en valeur relative par rapport aux PSR-Sham ; les barres grises indiquent les SEMs des PSR-Lésions. Le point sous le graphique indique les différences significatives entre les PSR-Sham et les PSR-Lésions. La lésion du Sum n'induit pas d'autre modification significative du spectre de fréquence sur 12h d'enregistrement contrôle. Significativité : Kruskal Wallis suivi d'un Mann Whitney.



**Figure 32: Spectre de fréquences moyen sur les 6h d'hypersomnie de SP pendant l'EV, le SL et le SP chez les animaux PSR-Sham (n=4) et PSR-Lésion (n=4) dans les conditions basales.** Pour chaque animal et chaque état de vigilance, le spectre de fréquences (graphiques à droite) est une moyenne d'environ 200 spectres de fréquence de 5 secondes. Les graphiques de gauche montrent l'amplitude moyenne des fréquences des PSR-Lésions en valeur relative par rapport aux PSR-Shams, les barres grises indiquent les SEM du groupe PSR-Lésion. Les points horizontaux sur ou sous le graphique indiquent les différences significatives entre les PSR-Sham et les PSR-Lésions. Significativité : Kruskal Wallis suivi d'un Mann Whitney. La lésion du Sum induit des modifications significatives du spectre de fréquence sur 6h d'enregistrement d'hypersomnie de SP spécifiquement pendant le SP.

## 2) Condition d'hypersomnie de SP

Les spectres de fréquence des différents états de vigilance sont proches entre nos 2 groupes de rats pendant l'hypersomnie de SP (Fig. 32). Il existe cependant quelques différences :



-En SL, l'amplitude des fréquences à 0,75Hz, 1,02Hz et 1,78Hz est significativement inférieure chez le groupe de rats lésés par rapport au groupe de rats témoins (Fig. 32).

-En SP, l'amplitude de la fréquence à 8,8Hz est inférieure chez nos rats lésés par rapport aux rats Sham. L'amplitude à 10,68Hz, 11,19Hz, entre 11,44Hz et 14,5Hz et entre 16,02Hz et 19,84Hz est supérieure chez nos rats lésés par rapport aux rats Shams (Fig. 32).

-Aucune différence n'a été observée entre les fréquences des pics d'amplitudes aux gammes de fréquence étudiées entre nos 2 conditions pour chacun des états de vigilance (Tableau 17).

-En SP, la puissance cumulée des fréquences aux oscillations thêta est significativement inférieure alors que celle aux oscillations sigma est supérieure chez nos rats lésés par rapport aux rats Shams (Fig. 33).

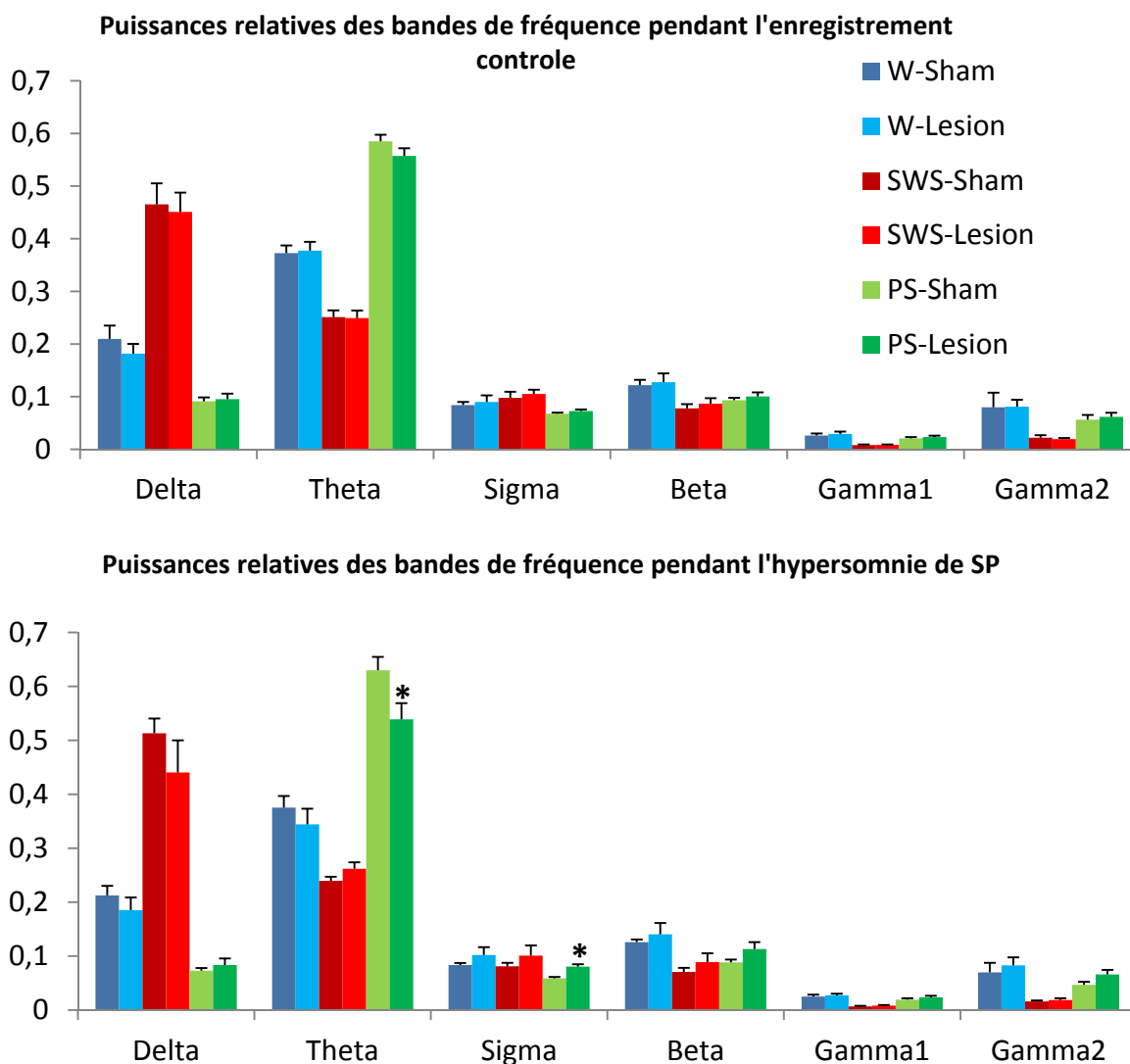
#### Enregistrement de 12h en condition basale

	Eveil		Sommeil lent		Sommeil paradoxal	
	Sham	Lésion	Sham	Lésion	Sham	Lésion
<b>Delta</b>	<b>3,12 ± 0,04</b>	<b>3,34 ± 0,05</b>	<b>2,69 ± 0,02</b>	<b>2,85 ± 0,02</b>	<b>3,53 ± 0,03</b>	<b>3,60 ± 0,04</b>
<b>Thêta</b>	<b>6,63 ± 0,03</b>	<b>6,50 ± 0,04</b>	<b>6,81 ± 0,02</b>	<b>6,78 ± 0,03</b>	<b>7,01 ± 0,02</b>	<b>6,90 ± 0,03</b>
<b>Sigma</b>	<b>11,83 ± 0,05</b>	<b>11,72 ± 0,05</b>	<b>11,54 ± 0,02</b>	<b>11,57 ± 0,03</b>	<b>12,12 ± 0,04</b>	<b>12,17 ± 0,05</b>
<b>Beta</b>	<b>19,67 ± 0,16</b>	<b>19,67 ± 0,17</b>	<b>17,46 ± 0,04</b>	<b>17,47 ± 0,06</b>	<b>19,73 ± 0,13</b>	<b>19,35 ± 0,16</b>
<b>Gamma1</b>	<b>43,26 ± 0,09</b>	<b>43,25 ± 0,09</b>	<b>43,03 ± 0,04</b>	<b>43,02 ± 0,05</b>	<b>43,19 ± 0,06</b>	<b>43,19 ± 0,08</b>
<b>Gamma2</b>	<b>62,70 ± 0,36</b>	<b>63,55 ± 0,56</b>	<b>62,38 ± 0,13</b>	<b>61,98 ± 0,17</b>	<b>60,95 ± 0,18</b>	<b>61,32 ± 0,26</b>

#### Enregistrement de 6h en hypersomnie de SP

	Eveil		Sommeil lent		Sommeil paradoxal	
	Sham	Lésion	Sham	Lésion	Sham	Lésion
<b>Delta</b>	<b>3,10 ± 0,07</b>	<b>3,18 ± 0,08</b>	<b>2,51 ± 0,03</b>	<b>2,88 ± 0,03</b>	<b>3,25 ± 0,04</b>	<b>3,39 ± 0,03</b>
<b>Thêta</b>	<b>6,71 ± 0,07</b>	<b>6,73 ± 0,08</b>	<b>6,62 ± 0,04</b>	<b>6,69 ± 0,05</b>	<b>7,18 ± 0,03</b>	<b>7,19 ± 0,03</b>
<b>Sigma</b>	<b>11,83 ± 0,09</b>	<b>11,88 ± 0,11</b>	<b>11,68 ± 0,04</b>	<b>11,71 ± 0,04</b>	<b>12,10 ± 0,05</b>	<b>12,10 ± 0,05</b>
<b>Beta</b>	<b>19,27 ± 0,30</b>	<b>19,15 ± 0,33</b>	<b>17,44 ± 0,07</b>	<b>17,36 ± 0,09</b>	<b>19,97 ± 0,17</b>	<b>19,37 ± 0,14</b>
<b>Gamma1</b>	<b>43,01 ± 0,16</b>	<b>43,20 ± 0,19</b>	<b>43,03 ± 0,07</b>	<b>43,26 ± 0,08</b>	<b>43,23 ± 0,08</b>	<b>43,52 ± 0,08</b>
<b>Gamma2</b>	<b>61,43 ± 0,53</b>	<b>64,14 ± 0,84</b>	<b>62,14 ± 0,23</b>	<b>62,64 ± 0,26</b>	<b>60,62 ± 0,21</b>	<b>61,92 ± 0,22</b>

Tableau 16 et 17 : moyenne des fréquences (en Hz) des pics d'amplitude dans les gammes Delta [0.5-4.5]; Theta [5-9]; Sigma [10-14]; Beta [15-30]; Gamma 1 [40-48] ; Gamma 2 [51-120] chez les animaux Sham et lésés sur des époques de 5 secondes moyennées sur 12h d'enregistrement (7h-19h) en conditions basales (Tableau 16) et moyennées sur 6h d'enregistrement en condition d'hypersomnie de SP (Tableau 17). Aucune différence des fréquences des pics d'amplitude dans les gammes de fréquence n'a été observée entre les animaux témoins et lésés, entre les différents états de vigilance, en condition basale et d'hypersomnie de SP. Significativité : Kruskal Wallis suivi d'un Mann Whitney; PSR-Sham vs PSR-Lésion.



**Figure 33: Moyenne de l'amplitude cumulée de chaque bande de fréquence de l'EEG pendant les 3 états de vigilance chez les rats PSR-Sham et PSR-Lésion (n=4 par condition) pendant la condition basale et pendant la récupération de SP.** Pour chaque animal, les valeurs données pour chaque bande de fréquence : Delta [0.5-4.5]; Theta [5-9]; Sigma [10-14]; Beta [15-30]; Gamma 1 [40-48] ; Gamma 2 [51-120] sont une moyenne des valeurs extraites pour chaque stade de 200 époques de 5s. La lésion entraîne une petite diminution significative de l'amplitude de la fréquence thêta pendant le SP et une petite augmentation significative de l'amplitude des fréquences sigma chez les animaux PSR-Lésion par rapport au PSR-Sham pendant le SP. Significativité : Kruskal Wallis suivi d'un Mann Whitney; PSR-Sham vs PSR-Lésion ; \*p<0,05.

Nous n'avons donc pas observé d'effet significatif de la lésion du Sum sur les caractéristiques de l'EEG pendant la condition basale.

En condition d'hypersomnie de SP en revanche, le spectre de fréquence de l'EEG pendant le SP est modifié avec une diminution de l'amplitude de l'oscillation thêta et une augmentation de l'amplitude de l'oscillation sigma.

### 4.3 Quantification des IEGs dans la formation hippocampique

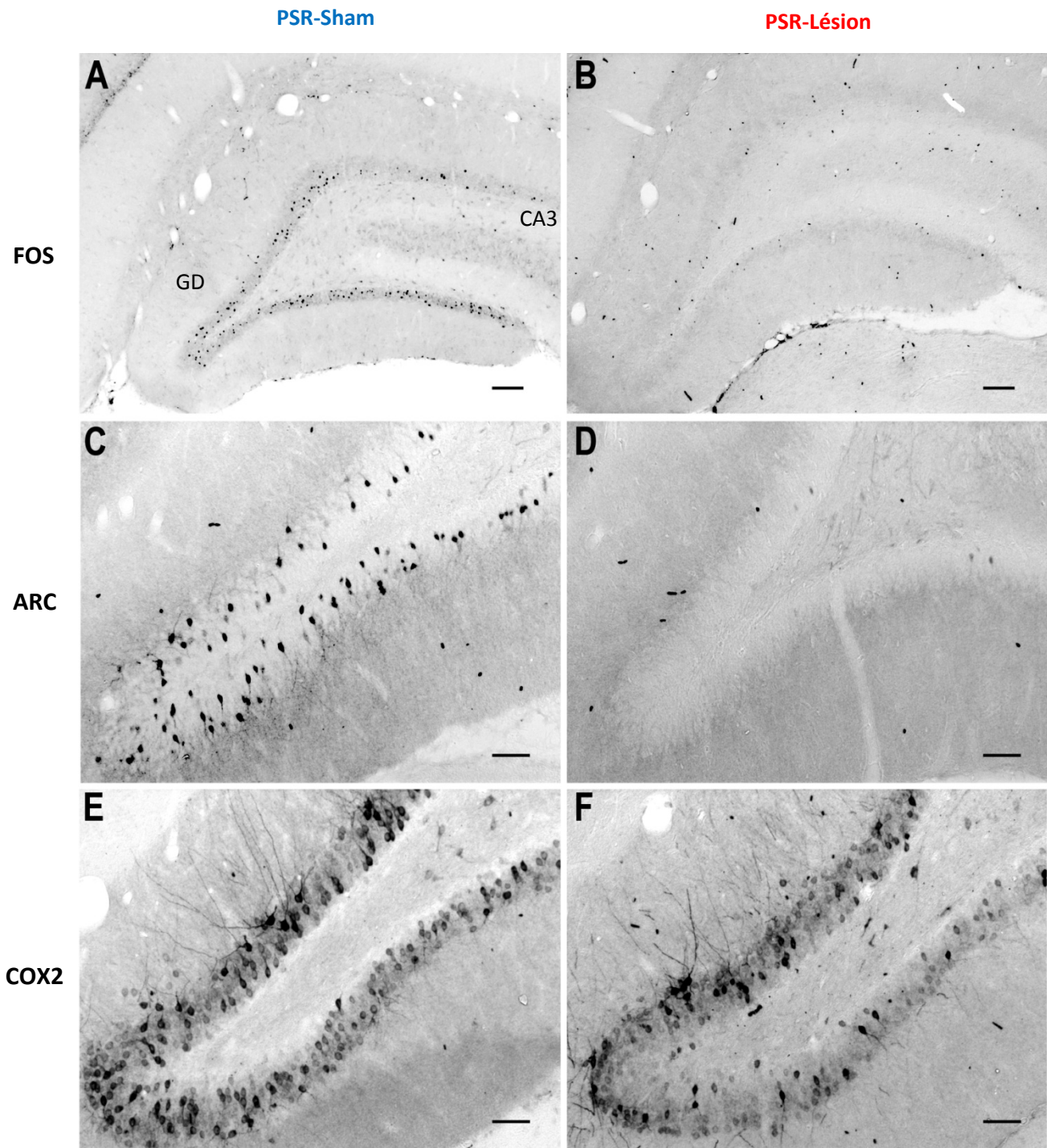


Figure 34 : Photomicrographies de coupes coronales au niveau du gyrus dentelé de rats PSR-Sham (A, C, E) et PSR-Lésion (B, D, F) immunomarquées pour FOS (A et B), ARC (C et D) et COX2 (E et F). Les neurones FOS+ et ARC+ normalement présents après hypersomnie de SP (A-C) sont absents quand le Sum est lésé (B-D). Le nombre de neurones COX2+ est aussi fortement diminué chez les rats PSR-Lésion (F) par rapport aux rats PSR-Sham (E). Echelles A, B, C et D : 100 $\mu$ m.

#### **4.3.1 Quantification des neurones Fos+**

La lésion du sum entraîne chez nos animaux PSR une diminution significative du nombre de neurones FOS+ dans les régions hippocampiques qui contiennent normalement des neurones FOS+ en grand nombre après cette hypersomnie de SP (PSR-Sham) (Tableau 18).

<b>Regions (number of section)</b>	<b>PSR-Sham</b>	<b>PSR-Lesion</b>
<b>Hippocampal formation</b>		
Dorsal CA1 (n=1)	4,8 ± 0,9	0,5 ± 0,5
Intermediate CA1 (n=1)	12,8 ± 4,4	4,3 ± 1,7
Ventral CA1 (n=1)	36,8 ± 10,6	4,8 ± 1,9 **
CA2 (n=2)	0,8 ± 0,5	0,0 ± 0,0
CA3 (n=2)	14,0 ± 3,7	5,5 ± 1,6
Dorsal dentate gyrus (n=2)	171,0 ± 9,8	32,0 ± 6,4 **
Ventral dentate gyrus (n=1)	151,8 ± 9,1	112,3 ± 15,5 *

**Tableau 18 : Nombre moyen (±SEM) de cellules immunoréactives pour la protéine FOS pour chacune des 2 conditions (PSR-Sham et PSR-Lésion) et pour chaque région hippocampique** (n=nombre de section quantifié : niveaux quantifiés à -3,70 et -7,10 du bregma). Significativité Kruskal Wallis suivi d'un Mann Whitney ; PSR-Sham vs PSR-Lésion : \*\*p<0,01, \*p<0.05.

Ainsi chez les PSR-Lesion, le nombre de neurones FOS+ est significativement diminué dans le CA1 ventral, le gyrus dentelé dorsal (Fig. 34 (A-B)) et le gyrus dentelé ventral par rapport aux PSR-Sham.

Cette diminution est très importante puisque le nombre de neurones FOS+ est au moins 5 fois inférieur au niveau du gyrus dentelé et 7 fois inférieur au niveau du CA1 ventral chez les PSR-Lésion par rapport aux PSR-Sham.

En revanche au niveau du gyrus dentelé ventral, la diminution du nombre de neurones FOS+ chez les PSR-Lésion est beaucoup moins importante puisqu'elle est seulement 1,3 fois inférieure à celles des PSR-Sham.

#### **4.3.2 Quantification de ARC**

L'effet de la lésion sur le nombre de neurones ARC+ dans le gyrus dentelé (seule région hippocampique qui en contient après récupération de SP) est encore plus important que celui obtenu avec FOS. En effet, nous obtenons une diminution du nombre de neurone ARC+ 10 fois inférieure au niveau du gyrus dentelé dorsal (Fig. 34 (C-D)) et au moins 3 fois inférieure au niveau du gyrus dentelé ventral chez les PSR-Lesion par rapport aux PSR-Sham (Tableau 19). L'expression de la protéine ARC semble être plus sensible à la lésion du Sum que celle du FOS au niveau du gyrus dentelé ventral.

Arc+ cells	PSR-Sham	PSR-Lésion	
dorsal dentate gyrus (n=2)	236,0 ± 22,6	20,0 ± 3,3	**
ventral dentate gyrus (n=1)	126,8 ± 7,8	37,3 ± 14,4	**

**Tableau 19 : Nombre moyen (±SEM) de cellules immunoréactives pour la protéine ARC pour chacune des 2 conditions (PSR-Sham et PSR-Lésion) et pour chaque région hippocampique** (n=nombre de sections quantifiées : niveaux quantifiés à -3,70 et -7,10 du bregma). Significativité Kruskal Wallis suivi d'un Mann Whitney ; PSR-Sham vs PSR-Lésion : \*\*p<0,01.

La mesure de la densité optique (DO) au niveau des zones dendritiques de l'aire CA1 indique que le marquage de ARC est significativement moins intense chez les rats lésés après hypersomnie de SP (Tableau 20). La densité optique au niveau des zones dendritiques de l'aire CA3 est significativement diminuée chez les rats PSR-Lésions par rapport aux rats PSR-Sham. En revanche, nous n'observons pas de diminution significative au niveau du gyrus dentelé.

DO Arc	PSR	PSR-lésé	
CA1	72,34 ± 8,14	38,40 ± 7,67	*
CA3	79,46 ± 11,20	54,20 ± 8,50	**
dentate gyrus lame supérieure	62,89 ± 8,41	47,27 ± 9,07	
dentate gyrus lame inférieure	59,08 ± 9,96	55,56 ± 8,67	

**Tableau 20 : Moyenne de la DO (±SEM) pour la protéine ARC dans les régions dendritiques de l'hippocampe pour chacune des 2 conditions (PSR-Sham et PSR-Lésion) et pour chaque structure hippocampique** (n=nombre de sections quantifiées : niveaux quantifiés à -3,70 du bregma). Significativité Kruskal Wallis suivi d'un Mann Whitney ; PSR-Sham vs PSR-Lésion : \*\*p<0,01, \*p<0,05.

#### **4.3.3 Quantification de COX2**

La mesure de la densité optique dans les zones des cellules principales des régions de CA3 et des zones dendritiques du gyrus dentelé (Fig. 34 (E-F)), nous indique que la protéine COX2 est significativement moins exprimée après lésion au niveau de CA3, et environ 2 fois moins exprimée au niveau du gyrus dentelé chez les rats lésés par rapport aux shams après hypersomnie de SP (Tableau 21).

DO Cox2	PSR	PSR-lésé	
CA3	147,45 ± 7,70	103,38 ± 15,78	*
dentate gyrus upper blade	130,23 ± 7,61	67,91 ± 15,37	**
dentate gyrus lower blade	119,19 ± 3,11	55,57 ± 14,90	**

**Tableau 21 : Moyenne de la DO (±SEM) pour la protéine COX2 dans les régions dendritiques de l'hippocampe pour chacune des 2 conditions (PSR-Sham et PSR-Lésion) et pour chaque structure hippocampique** (n=nombre de sections quantifiées : niveaux quantifiés à -3,70 du bregma). Significativité Kruskal Wallis suivi d'un Mann Whitney ; PSR-Sham vs PSR-Lésion : \*\*p<0,01, \*p<0,01.

## 4.4 Le néocortex

### 4.4.1 Quantification des neurones FOS+

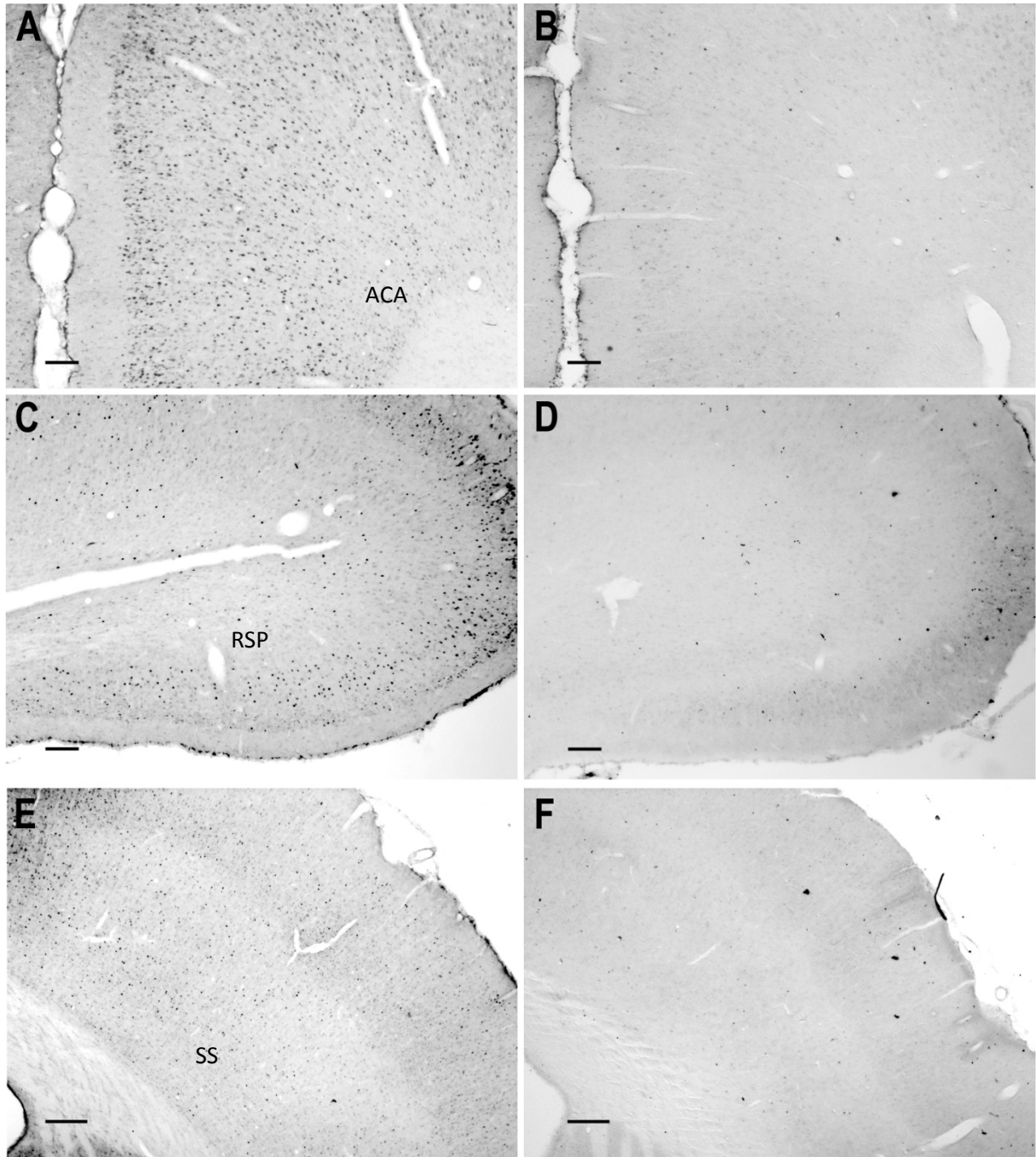
De façon assez générale, nous obtenons une tendance à la diminution du nombre de neurones FOS+ après lésion par rapport aux animaux shams après hypersomnie de SP (Figure 36-38 ; tableau 22).

Le nombre de neurone FOS+ diminue significativement après lésion du Sum chez les PSR dans plusieurs cortex limbiques et certains cortex sensoriels (Tableau 22) :

- Le nombre de neurones FOS+ dans le cortex cingulaire antérieur (Figure 35 (A-B)), le claustrum (Figure 39 (A-B)), le cortex amygdalien (Figure 40 (A-B)), l'entorhinal latéral et l'entorhinal est significativement (au moins 2 fois) plus faible chez les rats lésés par rapport aux animaux shams après hypersomnie de SP.
- Le nombre de neurones FOS+ dans le rétrosplénial est au moins 4 fois plus faible chez les rats lésés par rapport aux animaux shams après hypersomnie de SP (Fig. 35 (C-D)).
- Nous obtenons aussi une diminution significative du nombre de neurones FOS+ dans certains cortex sensoriels dont le cortex auditif, le cortex somatosensoriel (Fig. 35 (E-F)) et le cortex temporal d'association.

PSR-Sham

PSR-Lésion

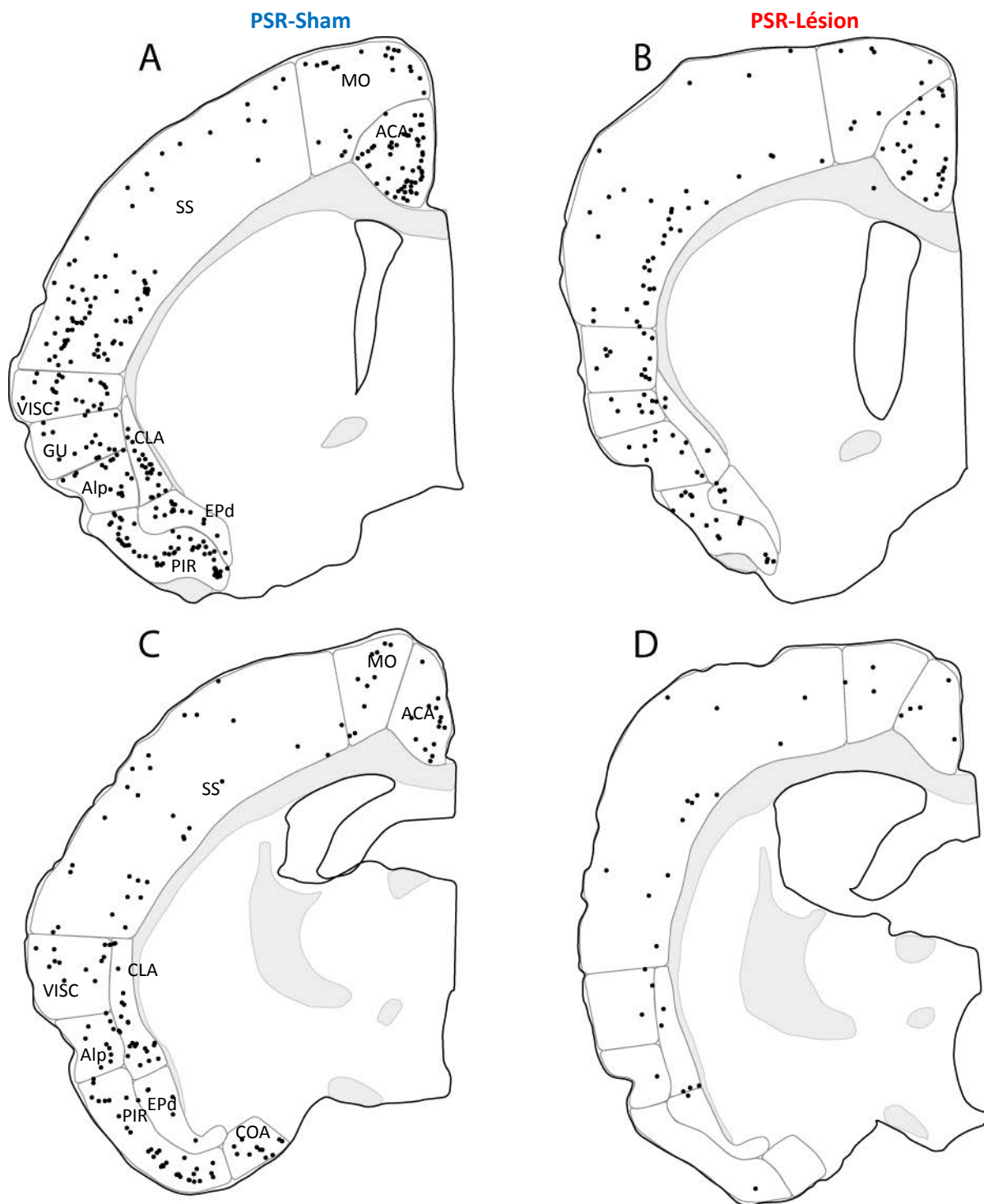


**Figure 35 : (A—F) Photomicrographies des coupes coronales immunomarquées pour Fos (A—F), au niveau du cortex cingulé antérieur (A-B), du cortex rétrospécial (C-D), et du cortex somatosensoriel (E-F) d'un animal PSR-Sham (A, C et E), d'un animal PSR-Lésion (B, D et F). Le nombre de neurones FOS+ normalement élevé après hypersomnie de SP (A et C) dans les cortex cingulé antérieur et rétrospécial est fortement diminué lorsque le Sum est lésé dans cette même condition (B et D). Le nombre de neurone FOS+ est aussi réduit dans le cortex somatosensoriel (F) chez les PSR-Lésions par rapport aux rats PSR-Shams (E). Échelles (A—I) 100µm.**

	PSR-Sham	PSR-Lésion	
<b>Parahippocampal regions</b>			
Ectorhinal (n=3)	109,3 ± 5,3	45,5 ± 3,1	**
Lateral entorhinal (n=2)	167,3 ± 38,5	74,0 ± 7,3	**
Medial entorhinal (n=2)	151,8 ± 19,8	105,3 ± 24,8	
Parasubiculum (n=1)	45,8 ± 11,9	32,5 ± 12,0	
Postsubiculum (n=1)	50,8 ± 5,7	19,3 ± 6,3	
Presubiculum (n=1)	61,5 ± 7,1	48,5 ± 18,0	
Retrosplénial (n=4)	312,8 ± 21,4	82,5 ± 25,1	**
Dorsal subiculum (n=1)	4,3 ± 0,8	1,3 ± 0,6	
Ventral subiculum (n=1)	23,8 ± 3,6	8,8 ± 5,9	
<b>Neocorticales regions</b>			
Anterior cingulate cortex (n=1)	54,5 ± 3,6	20,0 ± 3,7	**
Agranular insular cortex (n=2)	11,3 ± 3,5	16,5 ± 2,8	
Clastrum (n=2)	54,0 ± 7,2	19,8 ± 4,5	**
Cortical amygdaloïd nucleus (n=2)	111,0 ± 18,0	43,5 ± 13,5	*
Auditory cortex (n=2)	52,3 ± 2,9	24,5 ± 1,8	**
Gustatory cortex (n=1)	12,5 ± 3,6	7,8 ± 2,1	
Motor cortex (n=3)	69,5 ± 18,3	47,3 ± 17,6	
Posterior parietal association cortex (n=1)	± 13,5 3,1	± 7,5 0,3	
Somatosensory cortex (n=3)	132,0 ± 15,9	80,8 ± 4	**
Temporal association cortex (n=2)	113,0 ± 10,8	47,3 ± 7,5	**
Visceral cortex (n=2)	25,3 ± 4,7	15,3 ± 6,5	
Visual cortex (n=2)	99,5 ± 12,6	83,0 ± 7,3	
Endopiriform cortex (n=2)	22,5 ± 4,3	10,5 ± 3,8	
Piriform cortex (n=3)	108,3 ± 32,4	36,0 ± 2,1	

**Tableau 22 : Nombre moyen (±SEM) de cellules immunoréactives pour la protéine Fos pour chacune des 2 conditions (PSR-Sham et PSR-Lésion) et pour chaque région néocorticale (n=nombre de sections quantifiées : niveaux quantifiés à -3,70 et -7,10 du bregma). Significativité Kruskal Wallis suivi d'un Mann Whitney ; PSR-Sham vs PSR-Lésion : \*\*p<0,01, \*p<0.05.**





**Figure 36 : Schémas de coupes frontales (A-D) montrant la localisation des cellules FOS+ (points noirs) chez des rats PSR-Sham (A-C) et PSR-Lésion (B-D) à +0,45 mm (A-B) et à -1,5 mm (C-D) du Bregma. Voir la liste des abréviations.**

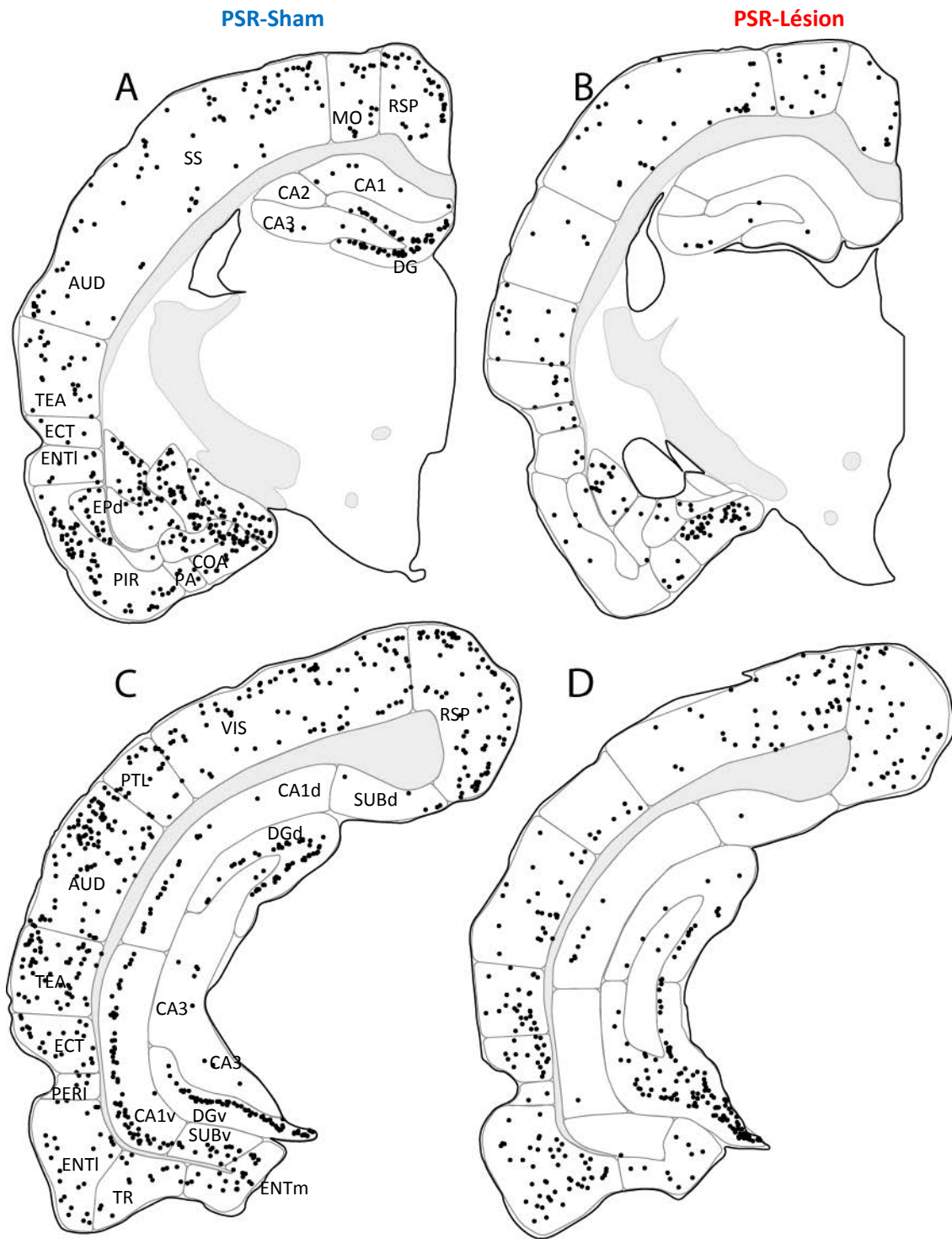


Figure 37 : Schémas de coupes frontales (A-D) montrant la localisation des cellules FOS+ (points noirs) chez des rats PSR-Sham (A-C) et PSR-Lésion (B-D) à -3,7 mm (A-B) et à -5,65 mm (C-D) du Bregma. Voir la liste des abréviations.

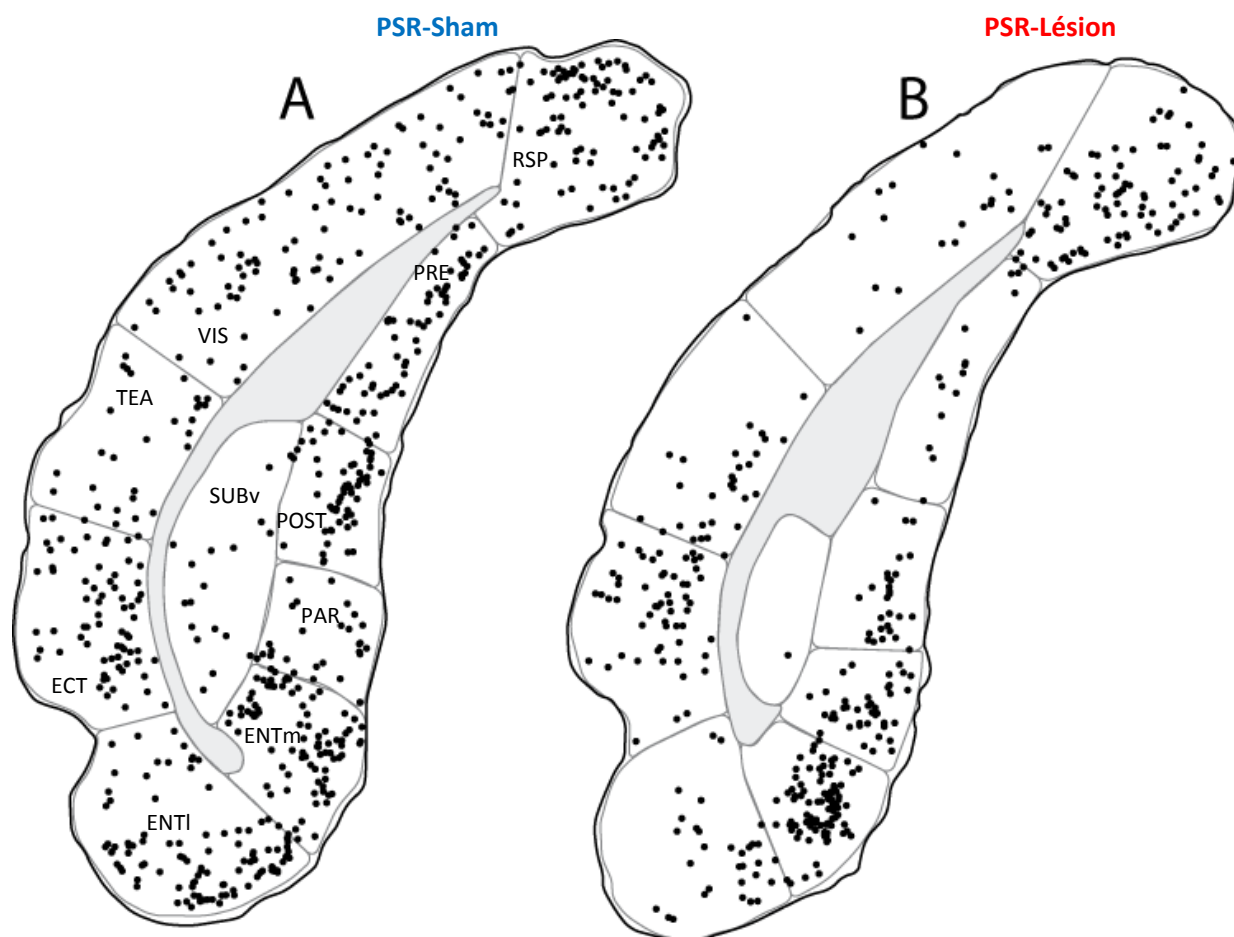


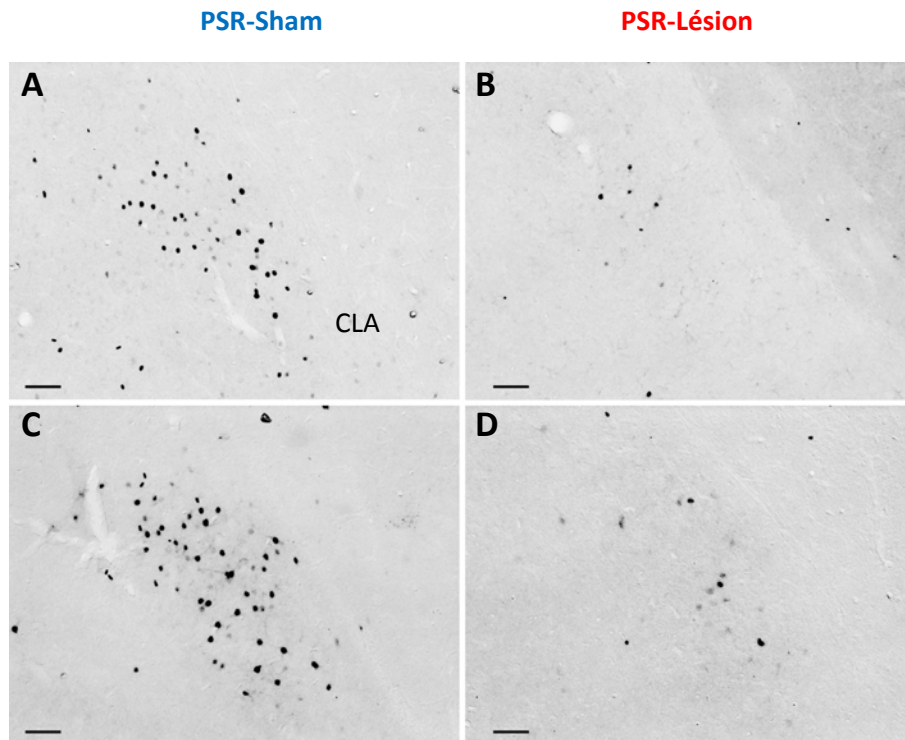
Figure 38 : Schémas de coupes frontales (A-D) montrant la localisation des cellules FOS+ (points noirs) chez des rats PSR-Sham (A-C) et PSR-Lésion (B-D) à -7,10 mm du Bregma. Voir la liste des abréviations.

#### 4.4.2 Quantification de ARC

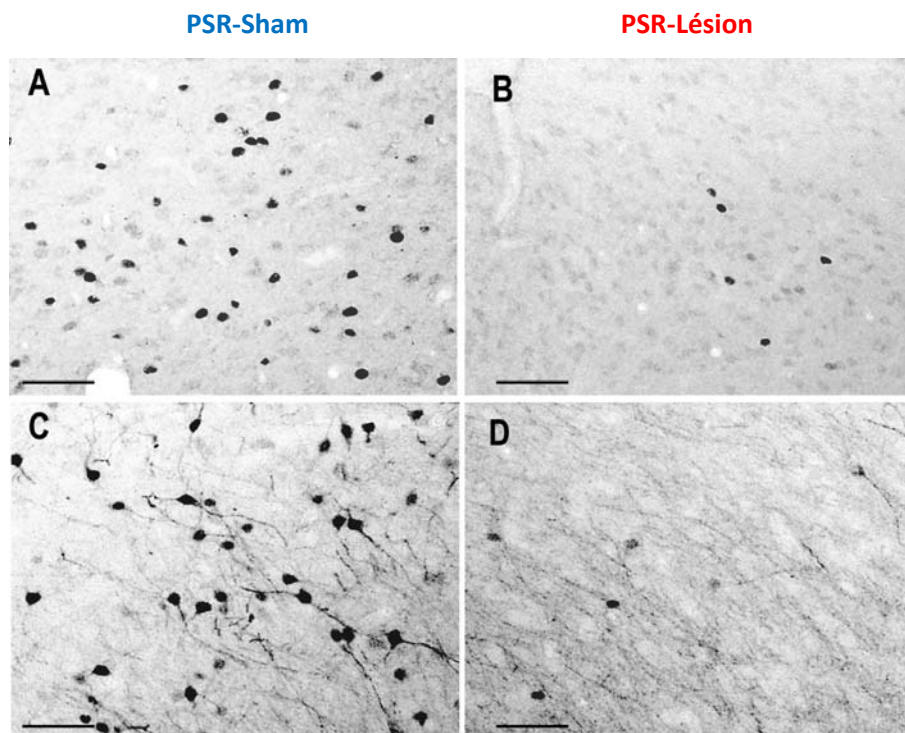
Le nombre de neurones ARC+, pourtant normalement augmenté dans le claustrum (Fig. 40 (C-D)) et le cortex amygdalien (Figure 39 (C-D)) après hypersomnie de SP par rapport aux groupes de rat PSC et PSD, est drastiquement diminué chez les rats lésés par rapport aux animaux shams après hypersomnie de SP (Tableau 23).

ARC+ cells	PSR-Sham	PSR-Lésion
claustrum (n=1)	25,3 ± 6,5	2,5 ± 1,3 **
cortical amygdaloïd nucleus (n=1)	94,0 ± 28,5	3,5 ± 3,5 **

Tableau 23 : Nombre moyen (±SEM) de cellules immunoréactives pour la protéine ARC pour chacune des 2 conditions (PSR-Sham et PSR-Lésion) et pour chaque structure corticale (n=nombre de sections quantifiées : niveaux quantifiés à -3,70 et -7,10 du bregma). Significativité Kruskal Wallis suivi d'un Mann Whitney ; PSR-Sham vs PSR-Lésion : \*\*p<0,01.



**Figure 39 : Photomicrographies de coupes coronales au niveau du claustrum de rats représentatifs des groupes PSR-Sham (A et C) et PSR-Lésion (B et D) immunomarkés pour FOS (A et B) et pour ARC (C et D). Les neurones immunoréactifs pour FOS et ARC sont présents en grand nombre chez les rats PSR-Sham alors que ce nombre diminue drastiquement après lésion du Sum en hypersomnie de SP. Echelles A, B, C et D : 50µm.**



**Figure 40 : Photomicrographies de coupes coronales au niveau du cortex amygdalien de rats représentatifs des groupes PSR-Sham (A et C) et PSR-Lésion (B et D) immunomarkés pour FOS (A et B) et pour ARC (C et D). Les neurones immunoréactifs pour FOS et ARC sont présents en grand nombre chez les PSR-Sham alors que ce nombre diminue drastiquement après lésion du Sum en hypersomnie de SP. Echelles A, B, C et D : 50µm.**

La lésion du Sum inhibe fortement l'expression de FOS, ARC et COX2 normalement induite après hypersomnie de SP dans les neurones de certaines régions limbiques.

Ces régions limbiques dont l'activité en SP dépendrait majoritairement du Sum concernent le gyrus dentelé, l'ectorhinal, le cortex entorhinal latéral, le rétrosplénial, le cortex cingulé antérieur, le claustrum et le cortex amygdalien.

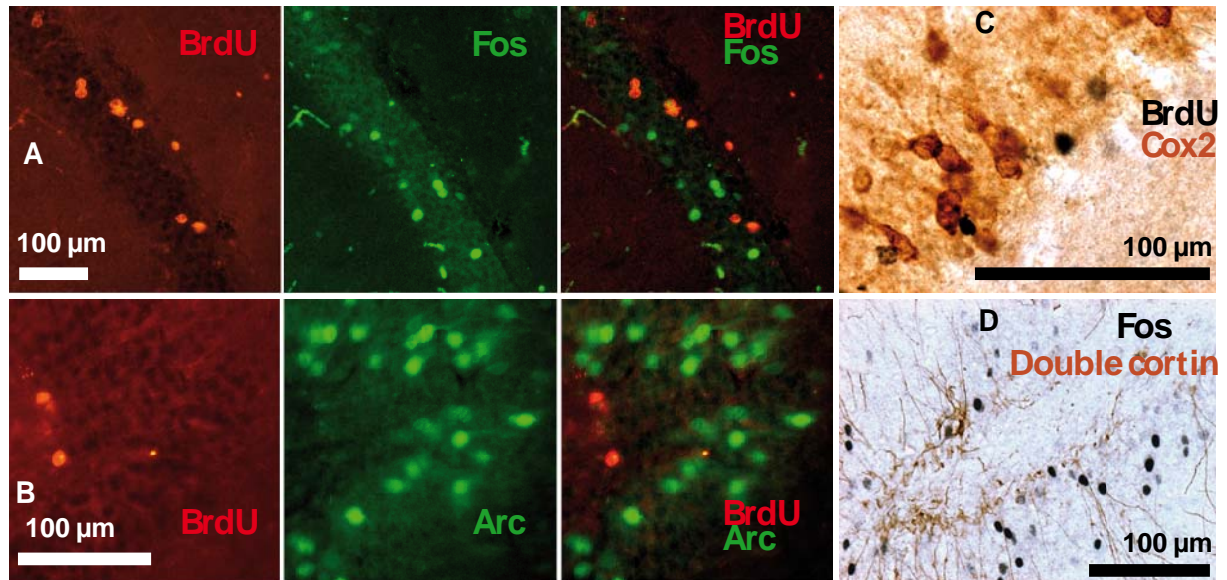
Cependant cette observation ne concerne pas tous ces cortex limbiques puisque dans les cortex entorhinal médian, le parasubiculum et le subiculum ventral le nombre de neurone FOS+ n'est pas diminué significativement après lésion et hypersomnie de SP.

De plus, certains cortex sensoriels ont un nombre de neurone FOS+ diminué par la lésion du Sum.

Enfin l'expression de ARC et COX2 après hypersomnie de SP est drastiquement altérée par la lésion du Sum dans l'hippocampe, et pour ARC dans le cortex amygdalien et le claustrum.

**En conclusion, le Sum activerait la plupart des régions limbiques pendant le SP.**

## **5. Les neurones FOS+, ARC+ et COX2+ sont ils des neurones néo-générés ? (résultats préliminaires)**



**Figure 41: Photomicrographies de sections frontales montrant les immunomarquages du BrdU, Fos, Arc, Cox2 et de la double cortine dans le gyrus dentelé d'un rat PSR (traité au BrdU 6 semaines avant la privation de SP).** A-B. Double marquages immunofluorescents pour le BrdU (noyau rouge, Cy3) et pour Fos (A) ou Arc (B, cytoplasme vert, Alexa488). Aucune cellule granulaire n'est doublement marquée. C-D. Double marquage pour BrdU (noyau noir) et Cox2 (C) ou pour la double cortine (D, cytoplasme brun). Dans les 2 cas, aucun double marquage n'a été observé.

Nous n'avons observé aucun double marquage BrdU/Arc+, BrdU/FOS+, BrdU/Cox2 ou Fos/Double cortine+ chez nos rats injectés au BrdU 3, 6, 12 semaines avant d'être soumis au protocole de privation-rebond de SP (Fig. 41). Ce résultat est qualitatif puisque nous n'avons pas pour l'heure fait d'analyse quantitative. Cependant, l'absence de neurones doublement marqués chez tous nos rats PSR indique que les neurones dits « actifs » ou « plastique » pendant l'hypersomnie de SP ne seraient pas de « jeunes » neurones âgés de 3, 6 ou 12 semaines. Enfin, les neurones FOS+, ARC+, COX2+ semblent être répartis de façon homogène au sein de la couche granulaire et donc pas préférentiellement répartis dans les couches plus proches de la zone sous granulaire du GD où les neurones les plus jeunes sont généralement présents.

**Ainsi, les neurones FOS+, ARC+ et COX2+ en SP ne seraient pas de jeunes neurones. Les nouveaux neurones ne sont pas préférentiellement recrutés pendant le SP et le SP n'aurait pas un rôle majeur dans leur maturation et adressage.**









## **1. Principaux résultats obtenus**

Le cortex cérébral est une structure hautement cognitive, son activité est modulée et rythmée par l'alternance des états de vigilance. L'activité et les fonctions des régions corticales ont été plutôt étudiées pendant l'éveil ou pendant le SP après apprentissage. Notre étude présente donc des données inédites sur l'activité corticale et ses mécanismes pendant le SP aussi bien au niveau moléculaire que systémique. Une meilleure compréhension de l'activité corticale du SP est une nécessité pour le futur de la recherche sur les fonctions du sommeil paradoxal.

### **1.1 Objectifs**

- Etudier les modifications du transcriptome induites dans le néocortex et la formation hippocampique par des modulations des quantités de SP.
- Localiser précisément les régions corticales dans lesquelles les protéines codées par les IEGs seraient induites par le SP, notamment le marqueur d'activité indirecte FOS.
- Etudier les réseaux neuronaux responsables de l'activité de certaines régions corticales pendant le SP.

### **1.2 Résultats**

1) 83 et 71 gènes ont un niveau d'expression modulé par notre protocole respectivement dans la formation hippocampique et le néocortex. Seulement 11 gènes ont un niveau d'expression modulé dans le même sens par les quantités de SP dans les deux structures. Certains gènes impliqués dans le développement neuronal (Bdnf, Ntpx2...) ont un niveau d'expression plutôt augmenté après hypersomnie de SP dans les deux structures corticales. D'autres impliqués dans diverses voies métaboliques, ont tendance à avoir un niveau d'expression augmenté après privation de SP dans les deux structures. En revanche, **Les IEGs impliqués dans la plasticité neuronale ont un niveau d'expression augmenté après une hypersomnie de 6h de SP dans la formation hippocampique, alors qu'ils ont un niveau d'expression augmenté après privation de 72h de SP dans le néocortex. Les modulations du transcriptome après modification des quantités de SP ne sont donc pas les mêmes dans ces deux structures.** Nous nous sommes focalisés sur ces IEGs pour la suite de l'étude, en localisant les neurones exprimant des protéines codées pour FOS, ARC et COX2.

2) Le nombre de neurones immunoréactifs au FOS est plus élevé dans certaines régions limbiques (le gyrus dentelé, les cortex amygdalien, entorhinal, cingulé antérieur et

rétrosplénial, le claustrum, le CA1 ventral et le parasubiculum) et plus faible dans les régions sensorielles chez les rats en hypersomnie de SP par rapport aux rats contrôles et privés de SP. Le nombre de neurones ARC+ et COX2+ dans le gyrus dentelé ainsi que le nombre de neurones ARC+ dans le claustrum et le cortex amygdalien augmente aussi chez les rats en hypersomnie de SP par rapport aux deux autres groupes.

Les rats EV présentent un nombre plus élevé de neurones FOS+ dans à peu près toutes les régions corticales par rapport aux trois autres groupes de rats. Seul le gyrus dentelé contient plus de neurones FOS+ après hypersomnie de SP par rapport aux rats EV. **En éveil actif, toutes les régions corticales seraient "actives". En revanche pendant le SP, les régions corticales "actives" concernent seulement certaines régions limbiques, les régions sensorielles étant "hypoactivées". D'après ces résultats l'activité corticale liée au SP est donc très différente de l'éveil.** Nous nous sommes focalisés sur certaines de ces régions limbiques pour la suite de l'étude afin d'analyser quelle structure pouvait être responsable de leur activation pendant le SP.

3) L'injection de traceur rétrograde dans le gyrus dentelé, le cortex cingulaire, le cortex rétrosplénial, le claustrum, le cortex visuel et le noyau supramamillaire couplé au marquage FOS chez des rats en hypersomnie de SP, indique que pendant le SP :

-Des neurones SP-On des noyaux supramamillaires latéraux enverraient des projections au gyrus dentelé, au cingulaire antérieur et au claustrum.

-Les neurones SP-On du claustrum projetteraient aux neurones localisés dans les cortex cingulaire antérieur, rétrosplénial et visuel.

-L'hypothalamus postérieur activerait les neurones des noyaux supramamillaires latéraux pendant le SP.

**Ainsi les noyaux supramamillaires latéraux semblent être impliqués dans l'activation de nombreuses régions corticales pendant le SP.** Nous avons donc voulu évaluer les effets de la lésion du Sum sur l'activité corticale pendant le SP

4) La lésion des noyaux supramamillaires entraîne une diminution du nombre de neurones FOS+, ARC+ et COX2+ dans le gyrus dentelé chez les rats après hypersomnie de SP par rapport au rat Sham-PSR. De plus le nombre de neurones FOS+ et ARC+ diminue aussi dans le cortex amygdalien et le claustrum après hypersomnie de SP chez nos rats lésés par rapport aux Shams. Le nombre de neurones FOS+ est aussi diminué dans d'autres régions limbiques telles que le cortex rétrosplénial, cingulaire antérieur et entorhinal latéral, le CA1 ventral, le cortex entorhinal et quelques aires sensorielles telles que le cortex somatosensoriel, d'association temporal et auditif. Les caractéristiques de l'EEG pendant l'hypersomnie de SP sont légèrement modifiées, avec une diminution de la puissance de l'onde thêta et une augmentation de la puissance de l'oscillation sigma. **Ainsi, d'après la localisation des neurones exprimant le marqueur d'activité FOS, la plupart des régions dites "actives" en SP seraient désactivées en SP après lésion du Sum.**

Nous réalisons ci-dessous une critique des méthodes utilisées, nous interprétons nos résultats et les confrontons à ceux de la littérature avant de conclure sur les perspectives qu'ils ouvrent.

## **2. Critique méthodologique**

### **2.1 Validation et limites de la technique des puces à ADN**

#### **2.1.1 Echantillons utilisés pour les puces**

##### **1) Les pools d'ARNm intragroupes :**

La technologie des puces à ADN est une technique objective puisque la totalité du transcriptome des rats de cette étude est analysée sans a priori sur la fonction du SP. Cependant, cette technique qui a une dizaine d'années est coûteuse, nécessite d'être utilisée avec prudence, en conjonction avec d'autres approches. Afin d'économiser le nombre de puce à ADN et d'éliminer les problèmes de variabilité inter-individuelle, nous avons poolé les ARNm de six animaux par groupe expérimental. Nous avons réalisé deux groupes expérimentaux (n=18) et deux séries de puces à ADN sur le même groupe expérimental afin d'éliminer les faux positifs. Au total, nous avons utilisé trois puces par groupe d'animaux et par structure.

Cependant, le fait de pooler les ARNm des animaux d'un même groupe entraîne deux inconvénients majeurs : nous ne pouvons ni valider statistiquement les résultats, ni corrélérer les niveaux d'expression des gènes avec les états de vigilance et les niveaux de corticostérone.

Afin de valider l'approche des puces à ADN et de pallier à ces deux inconvénients, nous avons confirmé par PCR quantitative les résultats des puces à ADN pour 16/25 transcrits dont le niveau d'expression était modifié entre au moins deux de nos trois conditions expérimentales dans le néocortex et/ou l'hippocampe. La plupart des profils d'expression des gènes vérifiés par les PCRq rejoignent ceux obtenus par les puces à ADN et les différences d'expression intergroupe sont significatives et parfois corrélées avec les quantités de SP. Cependant, il faut garder à l'esprit que les puces à ADN décrivent les modifications d'expression d'un ARNm donné qui ne se traduisent pas forcément en changement d'expression de la protéine codée. Les résultats obtenus sont donc générateurs d'hypothèses qu'il faut confirmer par d'autres techniques.

Cependant, ces puces à ADN sont une approche idéale pour déterminer les changements de transcription du génome en réponse ou en conséquence des variations des états de sommeil et d'éveil. Ces 10 dernières années, de nombreuses études ont utilisé et

valider cette technique afin d'approfondir les connaissances sur les fonctions du sommeil. Ces études se sont principalement focalisées sur le cerveau (Cirelli *et al.*, 2004 ; Cirelli et Tononi, 2004 ; Cirelli *et al.*, 2005 ; Zimmerman *et al.*, 2006 ; Mackiewicz *et al.*, 2007 ; Maret *et al.*, 2007 ; Jones *et al.*, 2008).

## **2) Tissus dont les ARNm sont extraits :**

D'après notre analyse, le nombre de gènes dont le niveau d'expression est modulé par notre protocole est comparable dans la formation hippocampique et le néocortex. Le néocortex et la formation hippocampique sont des structures très hétérogènes puisqu'ils comprennent des neurones de nature différente avec des neurotransmetteurs et des profils électrophysiologiques variés. Notre étude permet de mettre en évidence des modifications d'expression génique massives au sein de la formation hippocampique et du néocortex mais pas des changements restreints à de petits groupes de neurones. Il est donc probable que nous sous-estimons les variations d'expression génique dans ces deux structures. Les modifications d'expression génique même conséquentes au sein d'une seule région corticale sont sans doute minimisées puisque leur niveau d'expression est ajouté à celui des ARNm de toutes les régions corticales.

De plus, la modulation d'expression de gènes ayant un niveau d'expression très faible ne peut pas être détectée facilement, comme ce qui est le cas, par exemple, des gènes codant pour des récepteurs aux neurotransmetteurs.

### **2.1.2 Les comparaisons intergroupes**

Les gènes sélectionnés sont ceux qui ont un niveau d'expression différent entre au moins deux des trois conditions expérimentales. La répartition de ces gènes au sein de nos différentes catégories a été choisie par nos soins. Nous avons tout d'abord choisi de regrouper les 10 profils d'expression génique possibles en 4 catégories : ceux qui augmentent et ceux qui diminuent pendant la privation par rapport au groupe contrôle (IPSD et DPSD). Ceux qui n'appartiennent pas à ces catégories sont ceux qui augmentent en rebond par rapport à la privation et/ou par rapport au témoin, ainsi que ceux qui diminuent en rebond par rapport à la privation et/ou par rapport au témoin (IPSR et DPSR). Nous avons ensuite regroupé ces 4 groupes en deux groupes (PS- et PS+) : ceux qui augmentent en privation ou diminuent en rebond seraient liés négativement au SP alors que ceux qui diminuent en privation ou augmentent en rebond seraient liés positivement au SP. Ce choix comporte quelques inconvénients :

- Les modifications d'expression du groupe RSP ne sont pas prises en compte dans les groupes IPSD et DPSD.
- Le fait de simplifier les catégories de gènes en PS+ et PS- est un raccourci puisque nous ne savons pas si les niveaux d'expression de ces gènes sont corrélés positivement ou négativement avec les quantités de SP. C'est en fait plutôt une possibilité

de par leur profil. De plus, certains gènes de ces deux catégories ont des profils d'expression qui ne semblent pas liés directement aux quantités de SP, puisque par exemple, certains ne diminuent pas en privation de SP mais augmente en hypersomnie de SP.

- Ces deux catégories de gènes ne permettent pas de considérer le fait que la privation de SP entraîne une augmentation des quantités d'éveil. Les gènes des groupes IPSP et DPSP seraient des gènes dont l'expression peut être régulée par les quantités d'éveil ou l'absence de SP. L'analyse des modulations du transcriptome induit par des privations/récupération de sommeil total indique d'ailleurs qu'une partie des gènes dont le niveau d'expression est modulé par la privation de SP a un niveau d'expression modulé par l'éveil prolongé.

### **2.1.3 La durée de l'hypersomnie de sommeil paradoxal**

Le fait d'utiliser une hypersomnie de SP de 6h est un choix; nous n'avons pas voulu nous restreindre à l'analyse seule des IEGs. Une récupération plus longue aurait peut être permis de détecter plus de gènes à expression tardive. Cependant, au delà de 6h de récupération de SP, les quantités de SP diminuent rapidement. L'objectif de notre protocole est d'obtenir des quantités de SP élevées pour induire une modulation de l'expression des gènes liée aux quantités de SP et non pas d'évaluer la récupération physiologique après la privation de SP.

Les cinétiques d'expression sont complexes, variables et spécifiques de chaque gène. Dans cette étude, nous corrélons les quantités des états de vigilance au cours des 6 dernières heures d'enregistrement avec les niveaux d'expression génique. Or l'expression de certains gènes mesurés dans notre étude pourrait être modulée par des intervalles de temps précis pendant l'hypersomnie de SP. Par exemple, la plupart des IEGs présente un pic d'expression entre 30min et 90min après un stimulus. Cependant, les cinétiques d'expression de la totalité des gènes de notre étude sont complexes et variés. Nous avons donc préféré considérer la totalité de la période de l'hypersomnie de SP puisque notre stimulus, l'augmentation des quantités de SP, concerne la totalité des 6 dernières heures.

Dans notre protocole, le rat placé dans le baril de privation pendant 72h est ensuite remplacé 6h en condition standard. Les rats effectuent alors 45 minutes d'exploration avant de s'endormir. 6 heures d'hypersomnie de SP permettent de nous éloigner temporellement afin que les niveaux d'expression génique ne soient pas modulés par cet éveil exploratoire.

## **2.2 Validation expérimentale et limites de la technique d'immunohistochimie**

### **2.2.1 L'immunohistochimie**

Bien que la technique des puces à ADN soit objective, le choix d'analyser certaines protéines codées par les gènes d'intérêt l'est beaucoup moins puisque ce choix est limité par

les anticorps disponibles. Aussi, la localisation de certaines protéines, pourtant très intéressantes, n'a pas pu être étudiée, comme pour BDNF.

L'immunohistochimie indirecte est une technique fiable qui présente l'intérêt d'être à la fois spécifique et très sensible. Elle n'est toutefois pas idéale pour réaliser des analyses quantitatives. En effet, l'intensité du marquage immunohistochimique varie légèrement chez les animaux d'un même groupe expérimental sous l'influence d'un grand nombre de facteurs comme la qualité de la perfusion ou la congélation des cerveaux. Nous avons pu mettre en place une analyse de quantification des neurones FOS+, ARC+ et COX2+ semi-automatique, qui détecte la même intensité de marquage pour toutes les coupes analysées. Nos résultats indiquent que cette méthode est suffisamment reproductible pour une analyse quantitative. En effet, en déterminant le nombre de neurones FOS+, ARC+ et COX2+ ou la densité optique du marquage dendritique de ARC et COX2 sur 4 animaux par groupe, nous avons obtenu des différences significatives dans le nombre de neurones ou l'intensité de marquage dans plusieurs structures hippocampiques et néocorticales. Cependant, l'augmentation du nombre de rats par groupe pourrait permettre de valider statistiquement certaines tendances non significatives.

Les profils d'expression de *Fos*, *Arc* et *Cox2* sont reproduits au niveau de l'expression de leur protéine. La modulation du nombre de neurones exprimant ces protéines suit les profils d'expression de leur gène au niveau des deux structures corticales sauf pour ARC. En effet, le nombre de neurones ARC+ dans le néocortex est augmenté après hypersomnie de SP par rapport aux deux autres conditions, alors que l'expression du gène *Arc* est augmentée après privation de SP. Comme expliqué dans la partie matériel et méthodes, ARC peut s'exprimer au niveau du noyau mais est principalement exprimée au niveau des dendrites. Nous avons quantifié les neurones qui expriment la protéine ARC au niveau de leur noyau, ce nombre est restreint à quelques régions corticales (le GD, le cortex amygdalien et le claustrum). La quantification de l'intensité de l'expression de ARC dans les dendrites pourraient être évaluée par densité optique. Nous avons effectué cette mesure dans l'hippocampe mais pas dans le néocortex du fait de la taille de cette structure. Notre hypothèse est que l'intensité de l'immunomarquage de ARC dans le cortex serait plus forte après privation de SP par rapport aux deux autres conditions.

### **2.2.2 Utilisation de FOS comme marqueur d'activation cellulaire indirect**

Nous nous sommes focalisés sur la localisation des neurones exprimant le FOS en partant du principe que c'est un marqueur d'activation cellulaire indirect. Il est important d'expliquer les limites de ce postulat.

Une des limites majeures est que l'expression de FOS peut ne pas être induite alors que l'activité électrique du neurone est élevée (Dragunow et Faull, 1989 ; Herdegen et Leah, 1998). Par exemple, le cortex visuel, dont les neurones sont hautement actifs sous stimulation lumineuse, exprime très faiblement le FOS alors qu'en condition d'éveil exploratoire, les neurones FOS+ sont présents en plus grand nombre.

Dans les cellules ganglionnaires, plus les intervalles entre les activités phasiques sont longs, plus l'expression du FOS est minimale. L'activation des IEGs est inversement corrélée avec la durée des intervalles de décharge des potentiels d'action (Fields *et al.*, 1997). Ainsi l'expression soutenue du FOS concernerait plutôt les neurones à décharge tonique. Ceci pourrait expliquer pourquoi l'expression de FOS dans les neurones corticaux et thalamiques, qui présentent ce type d'activité en "burst", est faible en SL. Nous pouvons étendre notre hypothèse aux neurones qui déchargent en "burst" rythmique avec l'activité thêta dans le septum médian. Ceci expliquerait pourquoi les neurones dit "SP-on" dans le télencéphale basal n'expriment pas le FOS après hypersomnie de SP.

Le FOS peut être induit plus facilement dans certaines régions. Ainsi la LTP induite dans le GD par stimulation haute fréquence de la voie perforante entraîne une augmentation de l'expression de FOS dans les cellules granulaires du DG *in vivo* (Demmer *et al.*, 1993). La LTP induite dans le CA1 par stimulation haute fréquence des collatérales de Schäffer induit une augmentation des neurones ZIF-268+, mais pas des neurones FOS+ (Roberts *et al.*, 1996).

Inversement l'expression de FOS peut augmenter dans les neurones sans être liée à l'activité électrique, par exemple pendant une hypoxie (Roberts *et al.*, 1996). Le FOS n'est pas seulement un marqueur neuronal puisqu'il s'exprime aussi dans les cellules gliales lorsqu'elles sont stimulées électriquement, lors de traumatisme cérébral, d'ischémie, de crises d'épilepsie et de mort cellulaire (Kovacs, 1998).

L'induction de l'activité neuronale et donc de l'expression du FOS est réalisée via l'activation de récepteurs mais leur effet sur son expression n'est pas toujours le même. Par exemple l'induction de FOS est moins fréquente après activation des récepteurs AMPA ou kaïnate par rapport à celle observable après activation des récepteurs NMDA. FOS peut aussi être induit par certaines hormones et certaines neurotrophines (Herdegen *et al.*, 1998).

Le FOS est aussi régulé par le rythme circadien avec des niveaux généralement plus élevés pendant la phase obscure lorsque l'animal est le plus actif (Grassi-Zucconi *et al.*, 1993). Le fait de sacrifier tous nos animaux à la même heure exclut potentiellement les effets circadiens.

Cependant, malgré ses limites, cette technique a fait ses preuves. Le marquage FOS a souvent été utilisé afin de définir quelles régions sont impliquées dans un comportement, notamment dans les apprentissages mnésiques. De nombreuses études ont validé l'utilisation de ce marqueur fonctionnel pour mettre en évidence les neurones impliqués dans la régulation des états de vigilance (Sherin *et al.*, 1996 ; Maloney *et al.*, 1999 ; 2000 ; Verret *et al.*, 2003a ; Verret *et al.*, 2005 ; Verret *et al.*, 2006). L'utilisation de FOS reste dans notre cas une technique adéquate pour localiser, dans tout le cerveau, les neurones activés spécifiquement pendant le SP (Kovacs, 2008). Notre étude est une étape nécessaire et préalable à l'exploration électrophysiologique de ces populations de neurones.



## **2.3 Validation du protocole de privation de sommeil paradoxal**

### **2.3.1 Le stress**

L'analyse des enregistrements polysomnographiques indique que la méthode de privation de SP par la piscine est efficace et sélective puisqu'elle n'a que peu d'effets sur le SL. Ce protocole est cependant connu pour entraîner des effets aspécifiques comme un stress chronique, l'exposition à un nouvel environnement, des désordres métaboliques (augmentation de la prise alimentaire), une fragmentation du SL, l'exposition de l'animal à un environnement aversif, des modifications dans la thermorégulation, dans la prise alimentaire, et une dépression immunitaire. Néanmoins, la plupart de ces effets sont plutôt associés à une privation de très longue durée (plusieurs semaines) (Bergmann *et al.*, 1989 ; Kushida *et al.*, 1989). Dans nos conditions, la privation se limite à 78h.

Plusieurs arguments dans notre étude indiquent que les changements d'expression génique observés sont étroitement liés au SP plutôt qu'au stress. Tout d'abord, les plateformes multiples ont été utilisées pour minimiser le stress lié à l'immobilisation (McDermott *et al.*, 2003). Ainsi, le niveau de corticostérone plasmatique ne varie pas significativement entre nos trois groupes de rats.

De plus, des résultats du laboratoire indiquent que l'altération de l'amplitude de la LTP est obtenue après 75h de privation de SP ainsi qu'après 4h de privation de manuelle de SP (le rat est réveillé par l'expérimentateur dès qu'il effectue du SP)(Ravassard *et al.*, 2009). Ainsi, il est peu probable que les résultats obtenus dans l'hippocampe soient dépendants du stress. De plus, le nombre de neurones FOS dans l'amygdale n'est pas modifié entre nos trois groupes de rats (données non présentées). Enfin, parmi les gènes dont le niveau d'expression est modulé par notre protocole, très peu d'entre eux sont impliqués dans des processus liés au stress. Seuls trois gènes ont un niveau d'expression corrélé avec les concentrations en corticostérone parmi ceux testés en PCRq.

### **2.3.2 La privation de sommeil paradoxal**

Nous avons choisi d'utiliser la détection de la protéine FOS pour localiser les neurones dont l'activation est induite par des modulations des quantités de SP par la technique de la piscine. L'animal dans cette condition s'auto-privé de SP pour ne pas tomber dans l'eau. Une partie des neurones FOS+ pourraient avoir pour rôle d'inhiber des structures exécutives du SP (les neurones SP-off dans le tronc cérébral). Au terme des 78h de privation de SP, il est possible que ces neurones SP-off soient suffisamment activés et donc visibles par l'immunohistochimie de la protéine FOS. Ces neurones FOS+ pourraient aussi compenser l'absence de SP.

L'état de privation est composé d'éveil (environ 60%) et de SL (environ 40%). Il est donc possible que certains neurones FOS+ chez ces rats correspondent plutôt à des neurones actifs durant l'éveil. D'après nos résultats, les régions sensorielles contiennent un

nombre de neurones FOS+ très important par rapport aux 2 autres conditions (PSC et PSR). En effet, les animaux de ce groupe sont plus éveillés et perçoivent un nouvel environnement. Cependant au niveau sous cortical, les neurones FOS+ observés après privation de SP ne correspondraient pas aux neurones impliqués dans la genèse et le maintien de l'éveil puisque par exemple, les neurones du LC et du TMN ainsi que les neurones à Hcrt ne sont pas immunoréactifs à la protéine FOS (Verret *et al.*, 2003a).

Le problème de cette technique de privation ne réside pas seulement dans ses effets aspécifiques. Il concerne la possibilité que l'expression des gènes et des protéines de plasticité déclenchée par la privation ne reflète pas ce qui survient naturellement dans les réseaux neuronaux au cours du cycle veille-sommeil. Une approche alternative serait d'étudier l'expression génique chez des animaux en condition standart. Ainsi, les corrélats moléculaires de la LTP sont augmentés dans le néocortex et l'hippocampe de rongeurs présentant des quantités d'EV importantes (période de nuit) par rapport à des animaux ayant des quantités de sommeil importantes (période de jour) (Vyazovskiy *et al.*, 2008). Cependant, cette approche n'est pas possible dans notre étude car les quantités de SP ne sont pas assez élevées par rapport aux autres états de vigilance.

### **2.3.3 L'hypersomnie de SP**

L'ensemble des données de la littérature et nos résultats suggèrent que les neurones immunoréactifs au FOS après hypersomnie de SP sont actifs au cours du SP (neurones SP-on). Les résultats au laboratoire mettent en évidence des structures contenant une augmentation du nombre de neurones FOS+ après hypersomnie de SP déjà connues pour leur rôle dans la genèse du SP et/ou contenant des neurones dont l'activité électrophysiologique est spécifique du SP (Goutagny *et al.*, 2008 ; Hassani *et al.*, 2009b). Les neurones SP-on observés après hypersomnie de SP sont des neurones dont l'activation en SP permet soit d'inhiber les structures impliquées dans la genèse et le maintien de l'éveil et/ou du SL, soit d'induire des caractéristiques du SP, telles que l'activation corticale ou l'atonie musculaire.

Notre étude concerne principalement les structures corticales qui ne sont pas connues pour leur implication dans la genèse ou le maintien de cet état. Il est donc probable que les neurones FOS+ corticaux mis en évidence soient impliqués dans les fonctions du SP.

### **2.3.4 L'éveil en nouvel environnement**

Ce groupe d'animaux Ev permet de comparer l'activité corticale et hippocampique de l'éveil dit « actif » et du SP. L'environnement enrichi entraîne un comportement exploratoire, un stress chez nos rats et 100% d'éveil sur 3 heures. Des données indiquent que ces rats ont des quantités de neurones FOS+ augmentées dans les cortex visuels d'association, temporaux, perirhinal, entorhinal et cingulaire lorsqu'ils sont placés 10 minutes dans un nouvel environnement par rapport à un environnement familial (Papa *et al.*, 1993). Ce serait donc un paramètre qui n'apparaît pas dans les autres groupes, puisque

les rats PSC et PSD restent dans leur environnement et que le groupe PSR est placé dans un baril qui lui est familier.

Enfin, nous comparons une condition dans laquelle les rats en éveil exploratoire effectuent 100% d'éveil pendant 3h alors que les rats en hypersomnie de SP n'effectuent que 35% de SP pendant 6h. Ceci expliquerait le fait que le nombre de neurones FOS+ corticaux totaux soit beaucoup plus élevé chez le groupe EV par rapport au groupe PSR. Ces quantités d'éveil ou de SP sont obtenues à l'aide de protocoles comportementaux. Physiologiquement il n'est pas possible d'obtenir plus de quantités de SP. De plus, par rapport à la proportion des ces états de vigilance sur 12 heures de phase lumineuse l'augmentation induite par notre protocole est proportionnelle entre ces 2 états de vigilance (le SP occupe 10% du temps et l'Ev environ 30% chez nos animaux témoins, la durée de ces états de vigilance est donc augmentée d'un facteur 3 dans nos deux conditions).

## **2.4 Validation de la lésion**

Nous avons utilisé le principe de lésion neurochimique afin d'étudier l'implication du Sum dans l'activation corticale pendant le SP ; les lésions sont des techniques couramment utilisées, de ce fait il est aisé de comparer nos résultats avec ceux de la littérature. Les lésions électrolytiques ou par aspiration non sélective des neurones ont été remplacées par l'injection de substances neurotoxiques qui ne lèsent pas les fibres de passage et les cellules gliales. Bien que cette technique ait évolué, elle comporte encore de nombreux inconvénients, notamment la non spécificité de la lésion. L'acide iboténique cible tous les neurones du Sum et donc aussi ceux qui ne sont pas "SP-on". Le SumM dont l'activité et la connectivité semblent moins impliquées dans le réseau de l'activation corticale en SP est lésé dans sa totalité. Le Sum étant peu connu pour son implication dans l'activation corticale pendant le SP, aucune donnée n'est disponible sur les types de neurotransmetteurs exprimés par ces neurones FOS+ en SP. Déterminer les caractéristiques de ces neurones aurait pu nous permettre de les léser spécifiquement.

Il a été démontré que le Sum est impliqué dans plusieurs fonctions cognitives en éveil, et il est possible que leur altération ait un impact sur le fonctionnement des régions corticales pendant l'hypersomnie de SP. Nous n'avons cependant pas observé de comportements anormaux chez nos rats en éveil. De plus, l'architecture des états de vigilance ne semble pas modifiée bien que les régions hypothalamiques voisines au Sum contiennent des neurones impliqués dans l'homéostasie du sommeil.

Comme pour toutes les techniques dont l'effet est irréversible, il existe des mécanismes compensatoires après lésion. Pendant le temps de récupération post-lésionnel, l'activité des réseaux neuronaux peut être modifiée afin de « remplacer » l'activité de la région cérébrale lésée. Cependant, d'après la répartition du FOS nous avons observé uniquement des diminutions du nombre de neurones FOS+ chez nos rats lésés dans les régions corticales. Il est donc peu probable qu'il y ait une compensation dans ces régions.

Nous n'avons cependant pas quantifié le nombre de neurones FOS+ dans les régions sous corticales afférentes à l'hippocampe et au néocortex chez nos rats lésés. Elles pourraient moduler leur activité afin de compenser l'absence du Sum pendant le SP. L'injection pharmacologique de muscimol, un agoniste GABAergique dont l'effet peut durer jusqu'à 8h permettrait d'évaluer l'implication du Sum dans l'activité corticale pendant le SP sans effet compensatoire. Après injection de muscimol dans le Sum avant l'hypersomnie de SP (données préliminaires non présentées), une diminution du nombre de neurones exprimant les IEGs FOS, ARC et COX2 dans le gyrus dentelé et certaines régions limbiques est observée. Cependant, elle n'est pas accompagnée de modifications évidentes sur l'EEG (amplitude et pic de fréquence des rythmes EEG) et rejoint donc les résultats obtenus avec la lésion du Sum en condition basale. En revanche, la lésion du Sum induit des différences dans le spectre de fréquence du SP pendant l'hypersomnie de SP. L'amplitude de l'oscillation thêta est diminuée alors que l'amplitude de l'oscillation sigma est augmentée. Ainsi en hypersomnie de SP, le Sum serait sollicité de façon plus importante qu'en condition basale. Les études comportementales après lésion du Sum indiquent que des effets sur le comportement sont parfois accompagnés de petits effets sur l'EEG alors qu'en condition basale aucune modification n'est observée (Pan et McNaughton, 2004). Ceci correspond à nos données puisque seule l'hypersomnie de SP est accompagnée de modifications dans le spectre de fréquence du SP.

Une étude avec une approche similaire analysant la répartition du FOS après 3h de privation manuelle de sommeil chez des rats dont le locus coeruleus (LC) est lésé indique que le nombre de neurones FOS est diminué dans les aires corticales. L'absence de neurones FOS+ est d'ailleurs observée dans les régions auxquelles projette le LC. Cependant, aucun effet n'a été observé sur l'EEG (Cirelli *et al.*, 1996). Cette étude nous indique donc qu'il peut y avoir une dissociation entre le rôle d'une structure dans l'activation de l'EEG et dans l'expression des IEGs dans les neurones corticaux pendant un état de vigilance. En éveil, d'autres neurotransmetteurs entrent en jeu et suffiraient à maintenir un EEG normal. Il est possible que dans notre étude ce soit aussi le cas pendant le SP.

Enfin, l'augmentation du nombre de neurones FOS+ en hypersomnie de SP a lieu dans quelques régions corticales contrairement à l'augmentation induite par l'éveil qui concerne un plus grand nombre de régions corticales. La modulation de l'activité de ces régions corticales « actives » en SP ne suffirait pas à modifier l'activité EEG qui est une mesure de l'activité globale du cortex.

### **3. Interprétation des résultats**

#### **3.1 Gènes modulés par le sommeil paradoxal dans le cortex**

Seulement 12% des gènes dont l'expression est modifiée par notre protocole ont un profil d'expression comparable dans la formation hippocampique et le néocortex.

Globalement, ces deux structures subissent donc des modifications moléculaires et cellulaires très différentes pendant le SP. Nous discuterons de la nature des gènes dont le niveau d'expression est modulé par notre protocole dans la formation hippocampique et dans le néocortex.

### **3.1.1 La formation hippocampique**

#### **1) Gènes impliqués dans la plasticité synaptique**

Nos résultats montrent que de nombreux gènes impliqués dans la plasticité synaptique comme *Homer1a*, *zif-268* (*Egr-1*), *Egr-2*, *BDNF*, *Arc*, *c-fos*, *Klf10* (*Tieg*), *Nr4a1* (*Nur77*), *Rgs2*, *Nptx2*, *Ptgs2* (*Cox2*) et la protocadherine 8 augmentent leur niveau d'expression dans l'hippocampe après hypersomnie en SP. *Bdnf*, *Arc*, *Zif-268* et *Cox2* ont un niveau d'expression corrélé avec les quantités de SP d'après les PCRq. Les niveaux d'expression de la majorité des gènes impliqués dans la plasticité synaptique qui n'ont pas été vérifiés par les PCRq ont un profil d'expression qui pourrait être corrélé aux quantités de SP (leur niveau d'expression augmente en hypersomnie et diminue en privation de SP par rapport à la condition contrôle). Une partie de ces IEGs codent pour des facteurs de transcription tels que *Fos*, *Zif-268*, *Tieg*, *Nr4a1* impliqués dans diverses cascades de signalisation moléculaire. Leur expression augmente après LTP.

Il a été précédemment montré que *Cox2* se localise dans les épines dendritiques des cellules de l'hippocampe comme plusieurs autres gènes surexprimés après rebond de SP (*Bdnf*, *Arc*, *Homer1a*, *Pcdh8*). *Homer1a* régule l'insertion des récepteurs au glutamate dans la membrane postsynaptique et renforce ainsi la transmission synaptique. *Pcdh8* est surexprimé dans l'hippocampe après stimulation téτανique de la voie perforante (Yamagata *et al.*, 1999) et peut réguler le nombre d'épines dendritiques en induisant l'endocytose de l'appareil synaptique (Yasuda *et al.*, 2007). *Rgs2* augmente les concentrations intracellulaires en  $Ca^{2+}$  et aurait un rôle dans la plasticité synaptique à court terme (Ingi *et al.*, 1998). Ainsi, la plupart de ces gènes impliqués dans la plasticité synaptique régulerait l'insertion membranaire des récepteurs glutamatergiques et la production des épines dendritiques.

L'application de *Bdnf* provoque l'accumulation d'*Homer1a* dans les épines dendritiques (Kato *et al.*, 2003). Chez des rats dont la LTP a été induite par injection de BDNF dans l'hippocampe, les gènes *Arc*, *Narp*, *Tieg* ont un niveau d'expression augmenté dans le GD (Wibrand *et al.*, 2006). Ainsi, le fait que les niveaux d'expression entre les gènes *Bdnf*, *Arc*, *Homer1* et *Cox2* soient corrélés positivement dans notre étude correspond aux données de la littérature. Des processus de plasticité synaptique seraient augmentés après hypersomnie de SP dans la formation hippocampique.

Par ailleurs, il a été montré que la LTP est fortement diminuée après privation de SP de 72h par le même protocole (McDermott *et al.*, 2003). Ces résultats ont été reproduits

dans le laboratoire en montrant que la LTP est restaurée après 3h de rebond de SP (Ravassard *et al.*, 2009). Nos données de génomique apportent un support moléculaire aux résultats d'électrophysiologie : ils indiquent que le SP induit une importante plasticité synaptique spécifiquement dans l'hippocampe.

## **2) Gènes impliqués dans le développement neuronal**

Certains gènes impliqués dans la plasticité synaptique sont aussi impliqués dans le développement neuronal. Ils ont un niveau d'expression augmenté après hypersomnie de SP dans la formation hippocampique. *Mas1* code pour une protéine à activité de protéine G qui régule positivement la prolifération cellulaire et la réplication de l'ADN. Le BDNF agit avec d'autres neurotrophines pour favoriser la survie neuronale et le développement du système nerveux (Snider, 1994). *Nptx2 (Narp)* est un membre de la famille des pentraxines. *Narp* favoriserait la croissance des neurites et est directement couplé à l'activité synaptique. La surexpression de *Narp* dans les neurones entraîne une augmentation du nombre de synapses excitatrices mais pas inhibitrices (Sia *et al.*, 2007).

## **3) Gènes impliqués négativement dans la croissance cellulaire et le métabolisme**

Certains gènes ont un niveau d'expression augmenté après privation de SP dans l'hippocampe et sont plutôt impliqués dans diverses voies métaboliques importantes pour le fonctionnement cellulaire et les processus apoptotiques. Par exemple, *Faim 2* a un rôle dans la maintenance et le développement du système nerveux et est fortement impliqué dans la résistance à l'apoptose. *Bcat1* est une enzyme connue pour son rôle dans la réponse aux lésions neuronales. *Fxyd6* régule l'activité de la pompe de la Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase et est important pour la maintenance de l'homéostasie cellulaire. *Itih3* est impliqué dans la stabilisation de la matrice extracellulaire et est critique pour la morphogenèse, la différenciation d'un tissu. *Lrg1* est un gène essentiel pour l'expansion apicale, et le fonctionnement du cytosquelette. *Clip* est associé à la croissance des microtubules. Il avait déjà été démontré que la privation de SP et le stress entraînent une augmentation du neuropeptide CLIP dans l'hypothalamus (Rampin *et al.*, 1991).

Ainsi, la plupart de ces gènes auraient un rôle dans la résistance des effets liés à la privation de SP. Il a été démontré que la privation de SP a des effets sur l'efficacité de la réponse neuronale (Mallick *et al.*, 1990) et l'excitabilité cérébrale (Cohen *et al.*, 1970 ; Mallick *et al.*, 2000) qui seraient altérées par la modulation de plusieurs facteurs tels que la Na<sup>+</sup>/ K<sup>+</sup> ATPase (Gulyani et Mallick, 1993) et la fluidité de la membrane (Mallick *et al.*, 1995). Ces effets auraient un impact sur la survie et l'intégrité structurale des neurones.

### **3.1.2 Le néocortex**

### **1) Gènes impliqués dans le stress**

Dans le néocortex, seulement trois gènes impliqués dans la réponse au stress (*Sgk*, *Cort*, *Egfr*) augmentent leur niveau d'expression chez les animaux PSD par rapport aux animaux PSC. *Sgk* a un niveau d'expression augmenté après privation dans la formation hippocampique. L'expression de *Sgk*, positivement régulée par les corticoïdes, augmente également dans l'hippocampe, le pont, l'hypothalamus et le néocortex de rats totalement privés de sommeil (Cirelli *et al.*, 2004). L'expression de *Cort* est aussi négativement corrélée aux quantités de SL (Bourgin *et al.*, 2007). De plus, *Sgk* et *Egfr* ont un niveau d'expression augmenté après une inflammation, hypoxie, ischémie ou excitotoxicité (Turnbull *et al.*, 1996). D'autres gènes impliqués dans ces manifestations, comme ceux codant pour les activateurs de complément (C3), les protéines présentatrices d'antigènes et les composants des immunoglobulines, ont un niveau d'expression diminué après récupération de SP. Nos résultats sont en accord avec certaines études démontrant que le SP aurait un rôle dans les régulations immunitaires (Everson, 2005).

### **2) Les gènes impliqués dans le métabolisme et l'apoptose**

Certains gènes dont le niveau d'expression augmente après privation de SP sont impliqués dans l'apoptose ou dans la maintenance du fonctionnement cellulaire. Dans le néocortex, les gènes tels que *Bcat1*, *Sgk* ont un profil d'expression similaire à celui obtenu dans la formation hippocampique. D'autres gènes comme *Ddit4*, *Gjb6* et *Cryab* sont impliqués dans les processus apoptotiques. *Ddit4* est ainsi connu pour son rôle dans l'apoptose induite par une hypoxie (Shoshani *et al.*, 2002). Le SP pourrait donc avoir également un rôle de neuroprotection. D'autant plus qu'il a été montré que l'apoptose augmente après privation de SP (Biswas *et al.*, 2006). *Gpd1* a un niveau d'expression corrélé négativement avec le SP dans les deux structures, c'est une enzyme impliquée dans la glucogenèse, il pourrait être important pour la production des composants membranaires. Très peu de gènes liés au rythme circadien ont un niveau d'expression modulé par notre protocole comme c'était le cas pour les privations de sommeil total. Ces gènes seraient surexprimés après privation de SP afin de maintenir le fonctionnement tissulaire dans la formation hippocampique et le néocortex après un éveil soutenu (Cirelli, 2002 ; Cirelli *et al.*, 2004).

### **3) Gènes impliqués dans la plasticité synaptique et le développement neuronal**

Nos résultats indiquent que certains gènes jouant un rôle clef dans la plasticité synaptique tel que *Fos*, *Nr4a1*, *Homer1* et *Arc* ont un niveau d'expression augmentée dans le néocortex après privation de SP au contraire de ce qui est obtenu dans la formation hippocampique. En effet, leur niveau d'expression augmente après hypersomnie de SP dans la formation hippocampique.

Il a été montré que l'expression de *Nr4a1*, *Egr1*, *Egr2*, *Fos* ; *RGS2*, *Homer1*, *Nptx2*, *Dusp1*, *Sgk*, *Arc*, *CPG2*, *Gjb6*, *Cox2*, *Ntrk2* et *Nptx2* est augmentée dans le cortex après une privation de sommeil (SL+SP) de 8h (Cirelli *et al.*, 2004). *Gpd1*, *Sgk* et *Cryab* (dont le niveau d'expression augmente après privation de SP dans le néocortex) ont un niveau d'expression augmenté après privation de sommeil total (Cirelli, 2002).

Ainsi, certains des résultats obtenus avec les privations de sommeil total sont reproduits dans notre étude dans le néocortex mais pas dans l'hippocampe. En revanche, aucun gène lié au sommeil dans l'étude de Cirelli n'apparaît dans la liste des gènes que nous avons sélectionnée. Ainsi, une partie des gènes dont le niveau d'expression est augmenté après privation de SP dans le néocortex seraient similaires aux gènes dont le niveau d'expression est augmenté dans le cortex par des privations de sommeil total. Seuls 5 gènes plutôt impliqués dans le développement neuronal tel que *BDNF*, *Nptx2* et *Mas1* montrent une augmentation de leur niveau d'expression dans le néocortex et l'hippocampe après hypersomnie de SP. D'autres gènes impliqués dans le développement neuronal ont un niveau d'expression augmenté après hypersomnie de SP dans le néocortex tel que *Ntrk2* et *CPG2*. *CPG2* permettrait l'endocytose des récepteurs au glutamate et régulerait la taille des épines. *Ntrk2* est le récepteur au *Bdnf* et son niveau d'expression est augmenté spécifiquement dans le néocortex après hypersomnie de SP.

Le fait que *Bdnf* ne suive pas les niveaux d'expression d'*Arc* ou d'*Homer1* est surprenant. Nous avons vu plus haut que le niveau d'expression de *Bdnf* pouvait être corrélé à l'expression de ces gènes. *Bdnf* dans le néocortex pourrait être présent plutôt pour son implication dans le développement neuronal que celui dans la plasticité synaptique.

Par rapport aux résultats de l'étude des modulations du transcriptome dans le cortex chez des rats en privation de SP de 4 jours et récupération de 24h nous obtenons des résultats similaires pour la plupart des gènes en commun entre nos 2 études. Ainsi, les gènes dont le niveau d'expression augmente après privation de SP dans le néocortex tel que *Sult1a1*, *Cryab*, *Gpd1* et *Vgf* ont un niveau d'expression augmenté après privation de 4 jours dans le cortex. Ceux dont le niveau d'expression augmente après privation de SP dans la formation hippocampique tel que *Htra1*, *Gjb6* ont également un niveau d'expression augmenté après 4 jours de privation de SP dans le cortex. En revanche *Cox2*, *Bdnf*, *Mt1a*, *Scg2* et *CPG2* ont un niveau d'expression augmenté dans le cortex après privation de SP de 4 jours (Guindalini *et al.*, 2009). Au contraire, dans notre étude, *Bdnf*, *Scg2* et *CPG2* ont un niveau d'expression augmenté après hypersomnie de SP dans le néocortex. De plus, *Cox2*, *Bdnf* et *Mt1a* ont un niveau d'expression augmenté après hypersomnie de SP dans la formation hippocampique. Ces différences d'expression pourraient provenir des différences entre notre étude et celle de Guindalini et al. 2009 telles que les structures cérébrale analysées, la durée de la privation, le protocole de privation de SP.

Nos résultats sont assez cohérents au niveau de la formation hippocampique. Ils suggèrent en effet que l'expression des gènes jouant un rôle clef dans la plasticité



synaptique, l'apprentissage et la mémoire y est induite par le SP, supportant le rôle crucial de ce stade de sommeil dans les mécanismes hippocampiques de consolidation mnésique. Les modulations du transcriptome induites dans le cortex avec les privations de sommeil total et les privations de SP de 4 jours sont très différentes de celles induites par notre protocole dans l'hippocampe. En effet, dans ces études et la notre les IEGs sont surexprimés après privation de SP ou de sommeil total dans le cortex alors que dans notre étude les IEGs sont au contraire surexprimés après hypersomnie de SP dans l'hippocampe.

Nos données sur le néocortex sont en revanche beaucoup plus difficiles à interpréter. Quelques gènes d'intérêt dont l'expression est modulée par la privation de SP dans notre étude correspondraient en partie à ceux obtenus après privation de sommeil total et seraient plutôt liés à l'augmentation des quantités d'Ev. D'autres gènes pourraient avoir un niveau d'expression modulé par l'absence de SP. Le SP aurait un rôle dans l'homéostasie cellulaire au niveau du néocortex. Comme nous allons le voir ci-dessous, cette complexité reflète vraisemblablement un effet différentiel du SP sur l'expression génique au sein des différentes aires corticales.

## **3.2 Localisation des neurones immunoréactifs à Arc, c-Fos et Cox2 dans le néocortex et la formation hippocampique**

### **3.2.1 La formation hippocampique**

Les cellules FOS+, COX2+ et ARC+ sont présentes en grand nombre dans le gyrus dentelé de l'hippocampe après hypersomnie de SP (Fig.1). La plupart des gènes de plasticité ont un niveau d'expression corrélé entre eux dans la formation hippocampique. Nous avons également déterminé qu'une partie des cellules FOS+ sont COX2+. Nos résultats préliminaires de double marquage FOS/ARC indiquent que ces deux marqueurs coexistent en partie. Ainsi, il est probable que les gènes de plasticité révélés par les puces soient exprimés préférentiellement par les neurones granulaires du GD en hypersomnie de SP. Les données du laboratoire indiquent que ces neurones FOS+ après hypersomnie de SP n'expriment pas la GAD65 ou la GAD67 et ne sont donc pas des interneurons (données non présentées ; et communication personnelle Olivier Clement). Il est possible que l'activation et l'induction d'une plasticité dans les neurones du GD au cours du SP soit due à une activation de ces neurones par une de leurs afférences qui serait spécifiquement active au cours de ce stade.

Après éveil exploratoire le nombre de neurones FOS+ dans le DG est plus élevé que chez les groupes PSC et PSD mais plus faible que chez le groupe PSR. Nos données sont assez cohérentes avec les résultats de l'équipe de Buzsaki. En effet dans cette étude, l'amplitude de l'activité thêta et gamma dans le gyrus dentelé est augmentée en SP par rapport à l'éveil actif. Les neurones granulaires ont une activité très synchrone pendant le SP ce qui pourrait favoriser l'expression des IEGs. Par exemple si la fréquence de décharge du thêta des cellules

entorhinales est en phase avec la phase excitatrice de l'oscillation de leurs cellules cibles dans le gyrus dentelé, la décharge de ces cellules est favorisée et permet le renforcement des synapses et donc l'expression des IEGs (Buzsaki, 1996). Cette activité synchrone en SP dans le GD permettrait l'expression des protéines de plasticité observées dans notre étude (Montgomery *et al.*, 2008) et une structure afférente au GD en serait responsable.

En revanche, l'aire CA1 et l'aire CA3 présentent une diminution de l'amplitude de l'activité gamma pendant le SP par rapport à l'éveil actif. Or, nous n'observons pas de neurones FOS+ dans les aires CA3 et CA1 après hypersomnie de SP contrairement à l'éveil exploratoire, celui-ci induit une augmentation du nombre de neurones FOS+ dans les aires CA3 et CA1. Ainsi l'augmentation de l'amplitude de l'activité gamma dans le GD pendant le SP correspondrait à l'augmentation du nombre de neurones FOS+ après hypersomnie de SP dans notre étude. L'hypothèse de Montgomery est que pendant le SP la transmission entre les voies trisynaptiques est altérée par rapport à l'éveil. L'activité du GD pourtant élevée en SP ne serait pas transmise par le CA3 au CA1 (Montgomery *et al.*, 2008), régions qui ne contiennent pas de neurones FOS+ après hypersomnie de SP. En revanche, la transmission trisynaptique possible chez nos rats Ev entraînerait une augmentation de neurones FOS+ dans les aires CA3 et CA1 mais avec un nombre de neurones FOS+ plus faible dans le GD par rapport au groupe PSR.

Cependant, d'après l'étude de Montgomery, l'amplitude du thêta augmente dans l'aire CA3 pendant le SP par rapport à l'éveil. De plus, l'activité unitaire des cellules de CA1 n'est pas différente de celle de l'éveil actif. Dans notre étude bien que les neurones FOS+ ne soient pas présents dans les aires CA3 et CA1, l'intensité du marquage de ARC et COX2 augmente dans l'aire CA3 après hypersomnie de SP. De plus, l'immunomarquage de ARC est aussi plus fort dans les dendrites de l'aire CA1 après hypersomnie de SP par rapport aux groupes PSC et PSD. Ainsi, des mécanismes de plasticité synaptique auraient lieu au niveau de CA3 et CA1 pendant le SP.

Des voies potentiellement responsables de l'activité du GD ont été suggérées. L'efficacité de la transmission synaptique de la voie perforante au DG serait réduite pendant le SP. L'activité de l'aire CA3 serait augmentée en présence des hautes concentrations en ACh (Maeda *et al.*, 1993). Il a été suggéré que la diminution de l'efficacité de la voie perforante au niveau du GD serait compensée par une augmentation des connections associatives entre les neurones pyramidaux de CA3. Dans notre étude aucun neurone FOS+ n'est présent dans le CA3 après hypersomnie de SP, il est donc peu probable que ce soit cette aire qui active le GD en SP (Sil'kis, 2009).

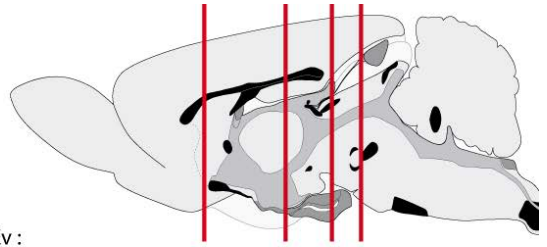
D'après l'étude de Sastre, contrairement à notre étude, l'hypersomnie de SP induite pharmacologiquement chez le chat provoque une augmentation du nombre de neurones FOS+ toutes les régions de la formation hippocampique (Sastre *et al.*, 2000). Nous expliquons cette contradiction par les différences entre notre protocole d'hypersomnie de SP et celui de cette étude. En effet, cette étude est moins physiologique que la notre puisque l'hypersomnie de SP est induite par des injections de muscimol dans la PAG. Un

mécanisme non spécifique au SP pourrait être induit par l'altération du fonctionnement de ce réseau cérébral.

Peu d'études ont évalué le rôle de l'hippocampe ventral pendant le SP. Notre travail indique pourtant que le nombre de cellules FOS+ induit par l'hypersomnie de SP dans le GD ventral est plus élevé dans le GD dorsal. De plus, alors qu'ils ne contenaient pas de neurones FOS+ dans leur partie dorsale, le subiculum ventral et le CA1 ventral contiennent un nombre élevé de neurones FOS+ après hypersomnie de SP. Ainsi, l'hippocampe ventral serait plus sollicité que l'hippocampe dorsal pendant le SP. L'hippocampe ventral est plutôt impliqué dans les émotions alors que l'hippocampe dorsal l'est plutôt dans la mémoire. Le SP pourrait donc contribuer à ces 2 processus cognitifs.

D'un point de vue fonctionnel, cette activité du GD pourrait être impliquée dans plusieurs processus. Il est possible que ces neurones aient présenté une augmentation de leur activité au cours de la privation et qu'ils se réactivent au cours du SP ainsi que l'ont décrit Louie *et al.* (2001). Il a été démontré que le DG est impliqué dans le "pattern séparation", ce processus permet de distinguer des épisodes mnésiques similaires. Ainsi pendant le SP, l'activité élevée du GD pourrait permettre de trier et de stocker dans la mémoire les différents événements vécus pendant l'éveil (McHugh *et al.*, 2007).

Nous avons également fait l'hypothèse que les neurones exprimant FOS, ARC et/ou COX2 après rebond de SP sont de « jeunes » neurones. En effet, la neurogenèse n'est pas altérée après privation de SP de 3 jours mais l'est après 4 jours (Guzman-Marin *et al.*, 2008). Les neurones néoformés activés pendant l'éveil pourraient être réactivés en SP afin de s'intégrer dans le réseau de neurones préexistant. Cependant, nos résultats préliminaires indiquent que les neurones FOS+, ARC+ et/ou COX2+ sont dispersés dans l'épaisseur de la couche granulaire et ne co-expriment pas la double-cortine, un marqueur de nouveaux neurones. De plus, les nouveaux neurones de 3, 6 et 12 semaines ne sont pas activés pendant le SP car ils sont ARC-, FOS- et COX2-. Enfin, les projections du Sum se terminent dans la zone supragranulaire du GD alors que les "jeunes" neurones sont localisés dans la zone sous granulaire. Les cellules FOS+, ARC+ et COX2+ correspondraient donc à des neurones matures déjà intégrés dans les réseaux neuronaux du GD. Le Sum ne stimulerait donc pas les neurones néoformés pendant le SP. Cette étude est préliminaire et nécessite de tester différentes fenêtres temporelles de datation des neurones au BrdU. De plus, comme nos rats n'expérimentent pas d'apprentissage en éveil, il est possible que ces nouveaux neurones ne soient pas réactivés en SP.



Le nombre de neurones FOS+ chez les PSR par rapport aux PSC, PSD et Ev :

- Diminue significativement par rapport au PSD, tendance à diminuer par rapport au PSC
- Diminue significativement par rapport au PSD, tendance à augmenter par rapport au PSC
- Augmente par rapport au PSC (tendance non significative)
- Augmente significativement par rapport au PSC
- Augmente significativement par rapport au PSC et au PSD et n'est pas significativement inférieur au groupe EV

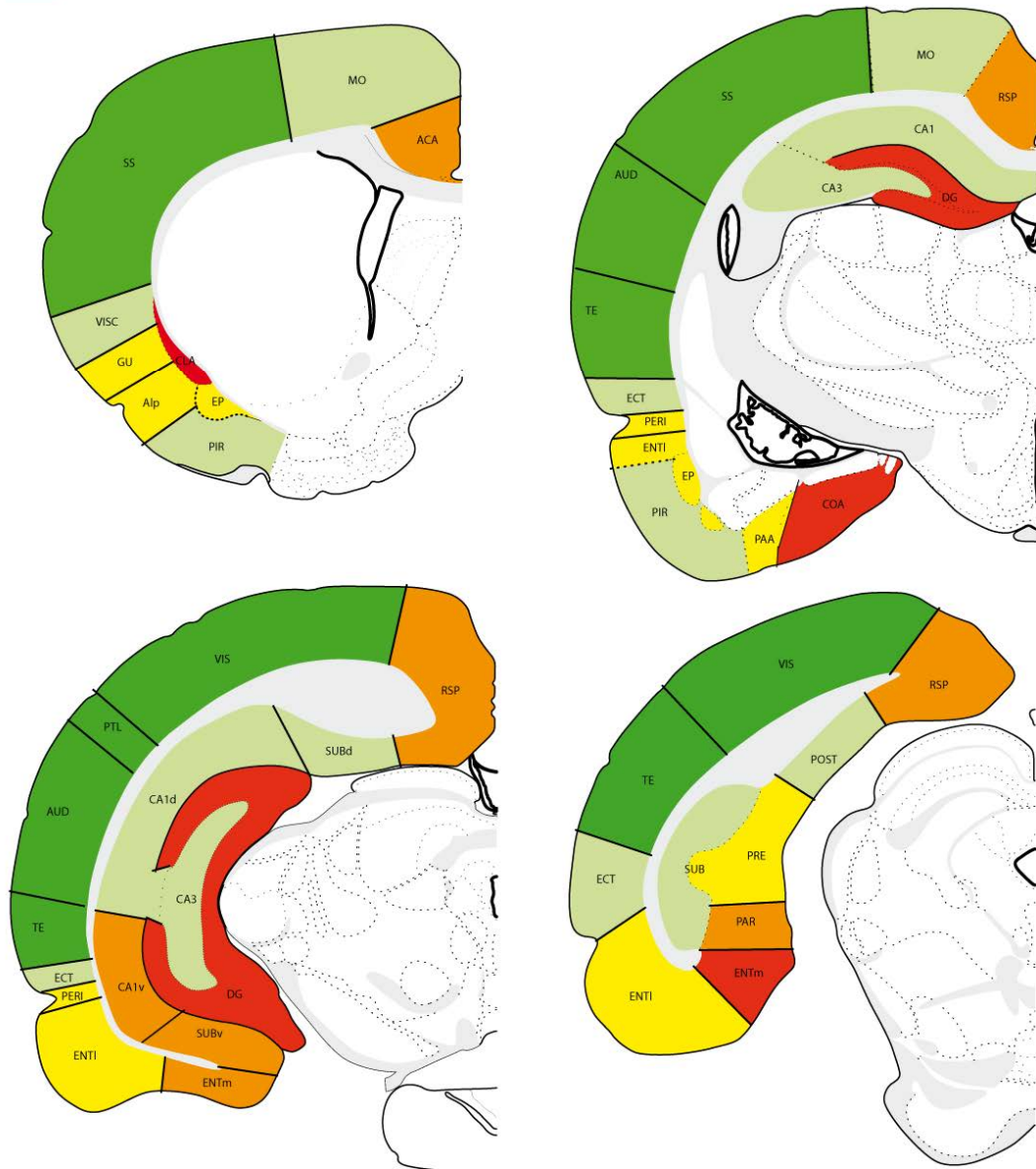


Figure 1 : activité des régions corticales pendant le SP d'après la distribution du FOS chez les rats PSC, PSD, PSR et EV à +0,45mm, -3,7mm, -5,65mm et -7,10mm du Bregma.

### **3.2.2 Les cortex sensoriels**

Les cortex sensoriels et moteurs contiennent un nombre de neurones FOS+ très élevé chez les animaux Ev et élevé chez les animaux PSD alors que ce nombre est beaucoup plus faible chez les animaux PSR (Fig.1). Ces résultats sont concordants avec ceux de l'étude de Sastre chez le chat (Sastre *et al.*, 2000). Les corrélats cellulaires de la LTP sont présents dans de nombreuses régions corticales sensorielles pendant l'éveil spontané, lorsque les animaux sont laissés dans leur cage et sont libres de leur activité. L'induction de l'expression des gènes liés à la LTP est augmentée lorsque l'environnement est plus stimulant, comme dans chez le groupe Ev de notre étude. Les circuits neuronaux impliqués dans la perception sensorielle, les activités motrices et cognitives seraient donc potentialisés pendant l'éveil (Tononi et Cirelli, 2001). Cette activité d'éveil est associée avec une augmentation des taux de décharge et des modifications plastiques dans les neurones corticaux impliqués dans l'analyse de l'environnement extérieur (Sjostrom *et al.*, 2001). Plus la potentialisation synaptique est élevée dans les circuits corticaux pendant l'éveil, plus l'activité des ondes lentes est augmentée pendant le sommeil consécutif. L'augmentation de l'activité de ces ondes lentes est accompagnée d'une redistribution des synapses des neurones corticaux, et d'une diminution du nombre de synapses et donc de l'activité de ces neurones lorsqu'ils ne sont pas impliqués dans un apprentissage (Borbely, 2001). Les neurones FOS+ sont très présents dans les cortex sensoriels pendant la privation de SP, l'hypersomnie consécutive aurait pu permettre d'observer un nombre de neurone FOS+ similaire dans les cortex sensoriels s'ils avaient été "réactivés" pendant le SL. Aucune étude n'a observé cette réactivation des neurones corticaux en SP (Ribeiro *et al.*, 2004), cependant une augmentation de l'expression des IEGs dans ces neurones est possible après exploration ou apprentissage (Ribeiro *et al.*, 1999). Dans notre étude les rats restent dans leur baril sans apprentissage, ces processus n'aurait donc pas lieu dans les cortex sensoriels. L'imagerie chez l'homme indique que pendant le rêve les cortex visuels occipitaux temporaux pendant le SP liés à l'imagerie des rêves seraient activés pendant le SP (Braun *et al.*, 1997 ; Nofzinger *et al.*, 1997). Or, nous n'observons pas une telle activité d'après la répartition des neurones FOS+ dans les cortex visuels de nos rats PSR.

D'après l'étude de la distribution du FOS, l'état d'activation du cortex pendant la privation de SP et celui de l'hypersomnie de SP sont assez opposés : les régions actives en privation de SP ont tendance à être inactivées en hypersomnie de SP et inversement. Bien que nous n'ayons pas analysé la distribution des neurones FOS dans les couches corticales, il semble que la répartition de ces neurones ne soit pas homogène. Les couches corticales profondes seraient plus activées que les couches corticales superficielles en hypersomnie de SP alors qu'en privation de SP ce serait plutôt les couches superficielles qui seraient activées. En éveil, le cortex reçoit des entrées sensorielles du thalamus, celui-ci projetterait et activerait les couches corticales superficielles. En SP, ce serait plutôt les cellules corticales des couches profondes (dont certains neurones projettent au thalamus) qui seraient activées par une voie inconnue.

Enfin, des données au laboratoire nous indiquent que les neurones corticaux FOS+ après hypersomnie de SP n'expriment pas les peptides normalement exprimés par les interneurons. Les neurones FOS+ en hypersomnie de SP seraient donc des neurones glutamatergiques (communication personnelle Patrice Fort).

Le SP favoriserait la potentialisation des synapses encore effectives après l'affaiblissement synaptique qui a lieu en SL, sans apprentissage les régions sensorielles ne seraient pas sollicitées en SP comme ce qui est le cas chez nos rats PSR (Tononi 2003). Il est donc probable que les régions sensorielles, hautement actives pendant la privation de SP d'après la distribution des neurones FOS+, présentent une diminution de leur activité pendant l'hypersomnie de SP.

### **3.2.3 Les cortex limbiques**

Au contraire des régions sensorielles, les régions limbiques contiennent un grand nombre de neurones FOS+, spécifiquement chez les animaux PSR par rapport aux groupes PSD et PSC (Fig.1).

En effet, le nombre de neurones FOS+ est augmenté dans le cortex cingulé antérieur, le parasubiculum, le cortex amygdalien, les cortex entorhinal et rétrospécial, le gyrus dentelé, la partie ventrale de CA1 et le claustrum de nos rats PSR. Chez les chats en hypersomnie de SP, le nombre de neurones FOS est supérieur dans le cortex cingulaire mais les régions corticales non pas été toutes quantifiées (Sastre *et al.*, 2000). Ces données correspondent aussi au fait que pendant le SL et l'éveil calme, l'expression du FOS est faible dans les systèmes limbiques (Pompeiano *et al.*, 1994).

De plus, nous avons observé un grand nombre de cellules ARC+ dans le cortex amygdalien et le claustrum après hypersomnie de SP. L'augmentation de l'expression de cet IEG dans les noyaux des neurones de ces trois régions mais pas dans les autres structures après hypersomnie de SP supporte l'hypothèse que les neurones FOS+ localisés dans ces trois structures présenteraient aussi une plasticité à long terme.

Le fait que les régions parahippocampiques comme le parasubiculum (PaS), le cortex entorhinal médian, le cortex rétrospécial et le subiculum ventral, soient "activées" est aussi cohérent avec le fait que l'activité thêta est prédominante dans ces régions durant le SP (Nishida *et al.*, 2004 ; Wang *et al.*, 2006 ; Glasgow et Chapman, 2007). Il est peu probable que les neurones responsables de l'activité thêta expriment le FOS comme nous l'avons vu dans la partie méthodologique. Cependant, des données indiquent que les informations entrantes doivent être présentées pendant la phase positive de l'oscillation thêta lorsque les cellules déchargent afin d'être renforcées et incorporées dans le réseau. Par exemple si la fréquence de décharge du thêta des cellules entorhinales est en phase avec la phase excitatrice de l'oscillation de leurs cellules cibles dans le gyrus dentelé, la décharge de ces cellules est favorisée et permet le renforcement de la synapse (Buzsaki, 1996). Ce renforcement synaptique pourrait être accompagné d'une augmentation de l'expression des protéines impliquées dans la plasticité synaptique.

Il a été également montré chez l'homme par tomographie par émission de positons (TEP) (Dang-Vu *et al.*, 2007) une activation de l'hippocampe, du cortex cingulaire antérieur, du gyrus parahippocampique et du cortex occipital latéral pendant le SP alors que des hypoactivations ont été observées dans le gyrus cingulaire postérieur, le cortex pariétal inférieur et le cortex préfrontal. Mis à part pour le gyrus cingulaire postérieur (qui correspond au rétrosplénial chez le rat), l'activité de ces régions limbiques pendant le SP serait aussi plus importante dans notre études. L'innervation cholinergique est plus forte dans les aires limbiques et paralimbiques que dans le cortex préfrontal dorsolatéral (Baxter et Chiba, 1999). Ceci correspondrait aux données de l'imagerie d'après lesquelles les régions limbiques sont très actives alors que le cortex préfrontal dorsolatéral est désactivé en SP.

Cependant dans notre étude, l'imagerie du FOS permet d'obtenir une précision spatiale plus élevée que les techniques d'imagerie chez l'homme et d'être plus précis sur la nature des régions corticales « actives » en SP. De plus dans ces études d'imagerie, le SP est toujours comparé à un éveil calme ce qui ne correspond pas à la condition de privation de SP et à la condition d'éveil exploratoire dans notre étude. D'après l'activité EEG, l'activité corticale pendant le SP est plutôt comparable à celle de l'éveil actif, nous avons préféré utiliser un groupe de rat en Ev exploratoire pour se rapprocher de cette condition.

Ces régions limbiques "actives" en SP sont impliquées dans de nombreuses fonctions cognitives et émotionnelles. Le cortex entorhinal contribue à l'attention et modulerait, le conditionnement et l'intégration de l'information spatiale et des événements qui ont lieu simultanément. Le cortex entorhinal traite et transmet les informations sensorielles aux aires hippocampiques. Ces informations sont transférées et traitées par l'hippocampe puis retransmises au cortex entorhinal (Coutureau et Di Scala, 2009).

Le cortex cingulé antérieur est impliqué dans la cognition et les émotions, il permettrait la détection et la correction des erreurs. Il serait impliqué dans l'attention, modulerait les réponses cognitives, motrices, émotionnelles, endocrines et viscérales et intégrerait les informations telles que la motivation et l'évaluation des erreurs. Le cortex cingulé antérieur serait également impliqué dans le système de récompense et dans les stades précoces de l'apprentissage (Bush *et al.*, 2000).

Les fonctions du cortex rétrosplénial sont plutôt évaluatives en contraste des fonctions plus exécutives du cortex cingulé antérieur. Le cortex rétrosplénial est impliqué dans le traitement des informations motrices primaires et sensorielles et permettrait l'interaction entre les émotions et la mémoire épisodique (Maddock, 1999). Le cortex rétrosplénial postérieur serait plutôt impliqué dans la mémoire (Shallice *et al.*, 1994), alors que les parties rostrales et moyennes de ce cortex seraient impliquées dans des fonctions proprioceptives et visuospatiales. Dans notre étude, le cortex rétrosplénial postérieur contient plus de neurones FOS+ chez les rats PSR que le cortex rétrosplénial rostral.

Le noyau cortical de l'amygdale dont les fonctions ont été moins étudiées occupe une position centrale dans traitement de l'information olfactive et émotionnelles chez les rats, ce noyau est aussi impliqué dans le comportement sexuel et maternel (Berka *et al.*, 1997).

Le claustrum est présent chez tous les mammifères qui ont été examinés (Kowianski *et al.*, 1999). Le claustrum aurait été développé en même temps que le cortex et pourrait avoir été ajouté dans l'évolution de façon concomitante avec l'apparition du SP. Il a un rôle dans la conscience, il permettrait de lier des événements disparates en une représentation d'un temps précis et aurait donc un rôle d'intégrateur des informations sensorielles et internes (Crick et Koch, 2005). Le claustrum est impliqué dans le traitement croisé de l'information en provenance des régions corticales.

Ainsi, la plupart des régions limbiques dites "actives" en SP d'après notre étude sont impliquées dans le traitement et l'intégration d'informations complexes sensorielles, mnésiques et émotionnelles. Ces régions corticales pourraient donc être impliquées dans ces mêmes fonctions pendant le SP.

L'éveil spontané dans un nouvel environnement entraîne une augmentation du nombre de neurones FOS+ très importante et homogène dans toutes les couches corticales et dans la plupart des structures corticales. L'éveil dans un nouvel environnement entraînant aussi une privation totale de sommeil impliquerait des réseaux sous corticaux plus nombreux qui stimuleraient toutes les régions corticales. En comparaison, l'augmentation du nombre de neurones FOS+ en hypersomnie de SP est beaucoup moins importante et concerne seulement certaines régions corticales limbiques impliquées dans la mémoire et les émotions. Ceci impliquerait que les réseaux responsables de l'activation corticale en SP activeraient spécifiquement certaines régions limbiques.

Ces résultats nous indiquent que les voies de l'activation corticale en éveil et en sommeil paradoxal sont très différentes. Les voies d'activation du GD en éveil actif sont assez connues, elles proviendraient principalement du septum médian, de la bande diagonale et du cortex entorhinal. Le réseau neuronal responsable de l'activation du GD en SP a été en revanche beaucoup moins étudié. En effet, les voies d'activation du cortex proviennent des différents systèmes d'éveil présentés en introduction, ceux impliqués pendant le SP ont été peu étudiés.

### **3.3 Réseaux neuronaux impliqués dans l'activation corticale en sommeil paradoxal**

#### **3.3.1 Activité des régions sous corticales**

L'hypothèse émise par Sastre *et al.* (2000) suggère que :  
« Pendant le SP, une voie en provenance du pont projette au Sum et au septum médian afin de stimuler l'hippocampe, l'amygdale, et le striatum.  
Le système d'activation corticale ascendant de l'éveil impliquerait les systèmes monoaminergiques, la formation réticulée, le thalamus et les voies extrathalamiques au cortex ».



Dans notre étude, les noyaux thalamiques comportent peu de neurones FOS+ après hypersomnie de SP et ce nombre est largement inférieur aux quantités de neurones FOS+ chez les rats EV. En effet, en l'absence de traitements sensoriels conscients, le thalamus ne serait pas assez actif pour induire l'expression du FOS. En SP, les concentrations pourtant élevées en acétylcholine et en glutamate dans le thalamus ne suffiraient pas à compenser l'absence du tonus monoaminergique et donc à induire l'expression du FOS dans les cellules thalamique.

Chez nos rats, le nombre de neurones FOS+ est faible dans le télencéphale basal, incluant le septum médian et la bande diagonale de Broca après hypersomnie de SP en comparaison du groupe en éveil exploratoire. Chez les chats en hypersomnie de SP, le septum médian et latéral, la bande diagonale de Broca et certains noyaux thalamiques contiennent un nombre de neurones FOS+ pourtant élevé (Sastre *et al.*, 2000). Ces différences pourraient provenir de la technique d'induction d'hypersomnie de SP qui n'est pas la même entre nos deux études.

Le thalamus et le télencéphale basal sont des structures connues pour leur implication dans l'activation corticale pendant l'éveil et le SP. Elles contiennent d'ailleurs des neurones actifs en SP d'après les enregistrements électrophysiologiques chez le rat en contention (Steriade et Glenn, 1982 ; Lee *et al.*, 2005a). Or, dans notre étude la quantification des neurones FOS+ dans le thalamus et le télencéphale basal indique que leur nombre est faible chez nos rats en hypersomnie de SP. De plus, presque aucun neurone afférent au gyrus dentelé, au cingulé antérieur, et au rétrosplénial n'est doublement marqué au FOS après hypersomnie de SP dans ces régions. Notre étude ne permet pas de vérifier que le thalamus et le télencéphale basal sont impliqués dans l'activité corticale pendant le SP. Comme nous l'avons expliqué dans la partie critique méthodologique, le FOS ne serait pas le reflet de toutes les activités neuronales. L'activité des neurones du thalamus et du télencéphale basal ne permettrait pas l'expression du FOS en hypersomnie de SP. Cela n'exclut cependant pas leur implication dans l'activation corticale en SP.

Sastres et col. observent une augmentation du nombre de neurones FOS dans les aires hypothalamiques latérales, le Sum et l'hypothalamus ventral chez les chats en hypersomnie de SP (Sastre *et al.*, 2000). Les données au laboratoire indiquent que dans l'hypothalamus latéral et postérieur et le Sum le nombre de neurones FOS+ augmente après hypersomnie de SP de 3h par rapport au groupe PSC et PSD (Sapin *et al.*, 2010). De plus, nos données indiquent que le SumL contient un nombre de neurones FOS+ plus important après hypersomnie de SP par rapport à la condition éveil exploratoire. Le SumM est autant activé en hypersomnie de SP qu'en éveil exploratoire. Ainsi les noyaux supramammillaires seraient très activés en SP.

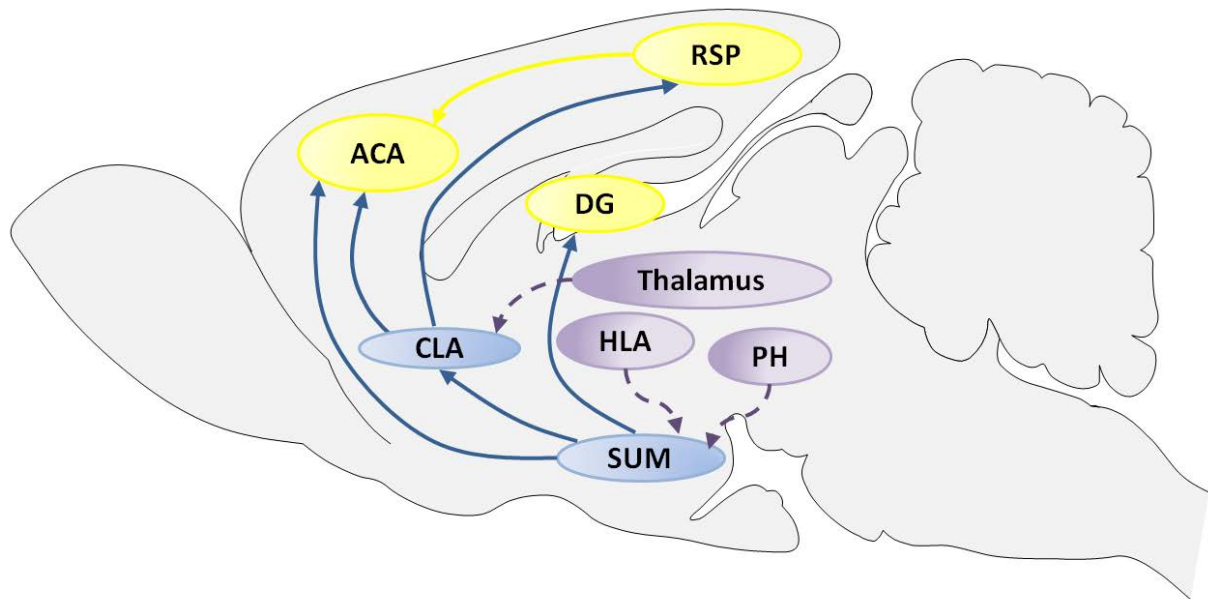
### **3.3.2 Afférences excitatrices responsables de « l'activité » de certaines régions limbiques en sommeil paradoxal**

D'après nos injections de traceurs couplés à l'immunohistochimie du FOS et à l'hypersomnie de SP, les régions responsables de l'activation des cortex limbiques impliquent assez peu de régions.

En effet, le claustrum enverrait des afférences actives au cortex cingulé antérieur, rétrospécial et visuel et le SumL enverrait des afférences actives au GD, au cortex cingulé antérieur, au claustrum et au cortex visuel pendant le SP (Fig.2).

Ainsi d'après notre étude, le noyau supramammillaire serait très impliqué dans l'activation corticale en SP. Après hypersomnie de SP, les neurones FOS+ dans le cortex entorhinal médian dans sa partie rostrale sont peu nombreux, ce sont eux qui projettent à l'hippocampe dorsal et aucun neurone FOS/CTb+ n'a été observé. En revanche, les neurones FOS+ simples et CTb+ simples sont présents en grand nombre dans la couche 2 et 3 de la partie caudale du cortex entorhinal médian (ces couches projettent au GD et au CA1), mais aucun neurone FOS+ n'est marqué à la CTb après éjection du traceur dans le GD. La voie perforante n'activerait donc pas le GD d'après notre étude. Nos résultats rejoignent ceux obtenus sur tranche d'hippocampe après application des neurotransmetteurs du SP (Sil'kis, 2009) d'après lesquels l'efficacité de la voie perforante sur le GD est altéré en SP. Cependant, nos résultats contredisent l'hypothèse selon laquelle la synchronie de l'activité thêta entre les neurones du GD et les neurones de CA1 proviendrait de l'activité des neurones de la couche II et III du cortex entorhinal (Montgomery *et al.*, 2008). Comme nous l'avons expliqué dans la critique méthodologique, il est probable que le FOS ne soit pas augmenté dans les cellules responsables de l'activité thêta. Il est donc possible que les neurones CTb+ du septum médian et du cortex entorhinal présentent une activité phasique en SP responsable de l'activité thêta dans le GD. Les neurones du SumL sont connectés réciproquement avec le septum et pourraient donc présenter une activité thêta synchrone, les projections excitatrices du SumL au GD pourrait potentialiser l'efficacité de la transmission synaptique de la voie perforante au niveau des neurones du GD.

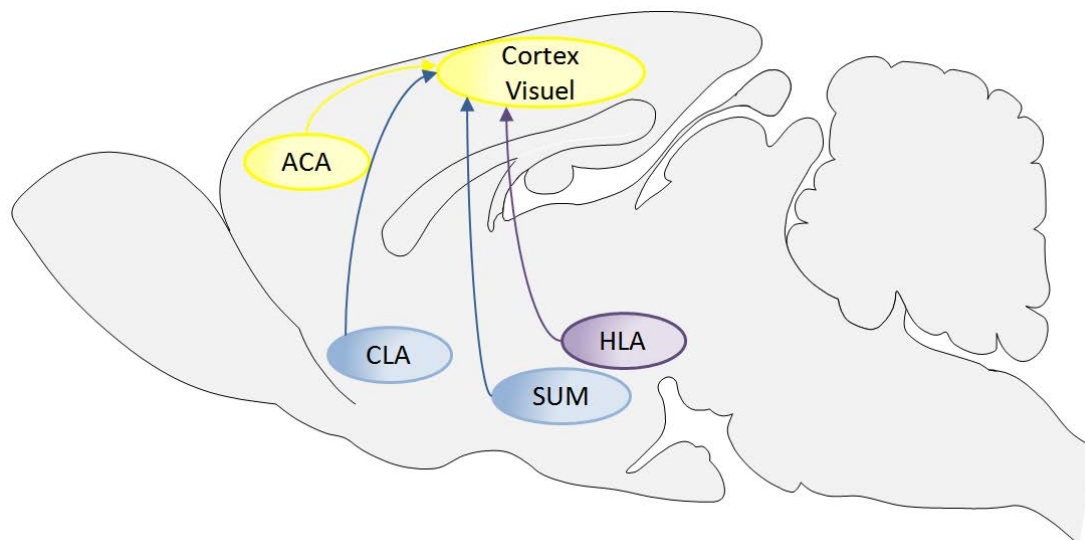
D'après nos résultats préliminaires, le noyau supramammillaire reçoit des afférences actives de l'hypothalamus latéral, de l'hypothalamus postérieur et de l'entorhinal médian. D'après les études sur la genèse du rythme thêta (Teruel-Marti *et al.*, 2008), l'activation du Sum proviendrait de l'hypothalamus postérieur et du noyau incertus. Or, les neurones CTb+ dans le noyau incertus n'expriment pas le FOS après hypersomnie de SP, contrairement à ceux de l'hypothalamus postérieur. Il est cependant possible que le noyau incertus projette à l'hypothalamus postérieur.



**Figure 2 : Réseau responsable de l'activation corticale pendant le SP. D'après nos marquages immunohistochimiques FOS couplés à l'injection de traceurs rétrograde et l'hypersomnie de SP. Les flèches en pointillés correspondent à des résultats préliminaires.**

Si on admet que le cortex visuel est une région "hypoactivée" en SP, la présence d'afférences actives en provenance du Sum, du claustrum est difficilement explicable. Le Sum et le claustrum pourraient stimuler le peu de neurones FOS+ des couches corticales profondes du cortex visuel. D'après nos résultats préliminaires, le Sum contient des neurones FOS+ GABAergiques et glutamatergiques après hypersomnie de SP (Fig. 3). Ainsi des efférences issues des neurones GABAergiques du Sum pourraient inhiber ce cortex sensoriel ou des neurones glutamatergiques pourraient exciter les interneurons corticaux.

Le claustrum est composé de cellules principales lesquelles reçoivent des projections du cortex auxquelles elles projettent en retour. D'autres types de cellules semblent être des interneurons et leur axone ne sort pas du claustrum (Crick et Koch, 2005). Nos données indiquent que des neurones FOS+ dans le claustrum envoient des projections à certaines aires corticales et ne seraient donc pas des interneurons. La plupart des régions du cortex envoient des projections au claustrum, et aucune étude n'a démontré qu'un cortex ne recevait pas de projection du claustrum. D'après nos résultats, le claustrum semble impliqué dans l'activation corticale en SP, et ses connexions avec le cortex renforcent cette hypothèse.



**Figure 3: Réseau responsable de l'activité du cortex visuel pendant le SP. D'après nos marquages immunohistochimiques FOS couplés à l'éjection de traceurs rétrograde et l'hypersomnie de SP.**

### **3.4 Effet de la lésion du Sum sur l'activité corticale pendant le sommeil paradoxal**

#### **3.4.1 Effet sur l'expression des marqueurs d'activité et de plasticité**

La destruction du Sum a des effets directs sur le niveau d'activation de certaines régions corticales vers lesquelles il projette.

Au niveau de la formation hippocampique, le nombre de neurones FOS+, ARC+ et COX2+ diminue fortement dans le GD dorsal et moins fortement dans le GD ventral après hypersomnie de SP chez nos rats lésés. Le nombre de neurone FOS+ dans le CA1 ventral diminue de manière drastique après hypersomnie de SP chez les rats lésés par rapport aux rats non lésés.

Les terminaisons originaires du SumM innervent principalement la couche moléculaire interne du GD ventral et sont uniquement glutamatergiques (Boulland *et al.*, 2009 ; Soussi *et al.*, 2010). Ces terminaisons exercent probablement des effets excitateurs sur les cellules granulaires du GD ventral puisque la lésion du Sum entraîne une diminution du nombre de neurones FOS+, ARC+ dans le GD ventral après hypersomnie de SP.

La majorité des neurones du SumL projetant à l'hippocampe contiennent à la fois du GABA et du glutamate et innervent principalement la couche supragranulaire du GD dorsal. Ces deux neurotransmetteurs seraient contenus dans des vésicules synaptiques distinctes mais dans les mêmes terminaisons au niveau du soma et des dendrites des cellules granulaires (Soussi *et al.*, 2010).

Comme nous l'avons vu en introduction, la stimulation du Sum entraîne un effet inhibiteur de courte latence sur les neurones du GD de l'hippocampe dorsal (Mizumori *et al.*, 1989). Cet effet pourrait provenir des terminaisons GABAergiques du SumL sur le soma et les dendrites proximales des neurones granulaires du GD dorsal. La stimulation du Sum entraîne

également une facilitation de la voie perforante entraînant une augmentation du nombre de potentiels d'actions dans le GD (Mizumori *et al.*, 1989 ; Kirk et McNaughton, 1991 ; Nakanishi *et al.*, 2001). Cette facilitation proviendrait des afférences GABAergiques du SumL dont l'activité inhiberait les interneurons GABAergiques du GD. La stimulation du Sum pourrait également augmenter le nombre de potentiels d'action du GD évoqué par la voie perforante par une neurotransmission synaptique glutamatergique directement excitatrice (Magloczky *et al.*, 1994 ; Boulland *et al.*, 2009). Ainsi, dans notre étude l'augmentation de "l'activité" des cellules du GD dorsal pourrait provenir de l'inhibition des interneurons GABAergique ou de l'excitation des cellules granulaires du GD par les neurones du SumL.

Cependant, les projections complexes du Sum sur le GD pourraient aussi permettre à la fois l'hyperpolarisation du soma et la dépolarisation des dendrites des cellules granulaires. Cette innervation leur permettrait de décharger avec une haute précision temporelle. Elle favoriserait la présence de hauts niveaux d'activité dans les neurones du GD lorsque les neurones projetant via la voie perforante et du Sum déchargent de façon synchrones (Pan et McNaughton, 2004). L'activité de cette voie pendant le SP permettrait des processus de plasticité synaptique et l'expression des protéines FOS, ARC et COX2 dans certaines cellules granulaires du GD lors de l'hypersomnie en SP.

La fonction de ces deux voies en provenance du SumL et du SumM contribuerait probablement aux fonctions cognitives dépendantes de l'hippocampe pendant le SP. Le SumL régulerait plutôt la fréquence thêta via le septum médian et influencerait les fonctions cognitives. Le SumM serait plutôt impliqué dans le contrôle des comportements émotionnels dépendant de l'hippocampe (Pan et McNaughton, 2004). Dans notre étude la voie du SumL semble plus fortement impliquée que celle du SumM dans l'activation corticale pendant le SP. En effet, la lésion du Sum dans sa totalité diminue plus fortement le nombre de neurones FOS+ dans le GD dorsal que dans le GD ventral après hypersomnie de SP.

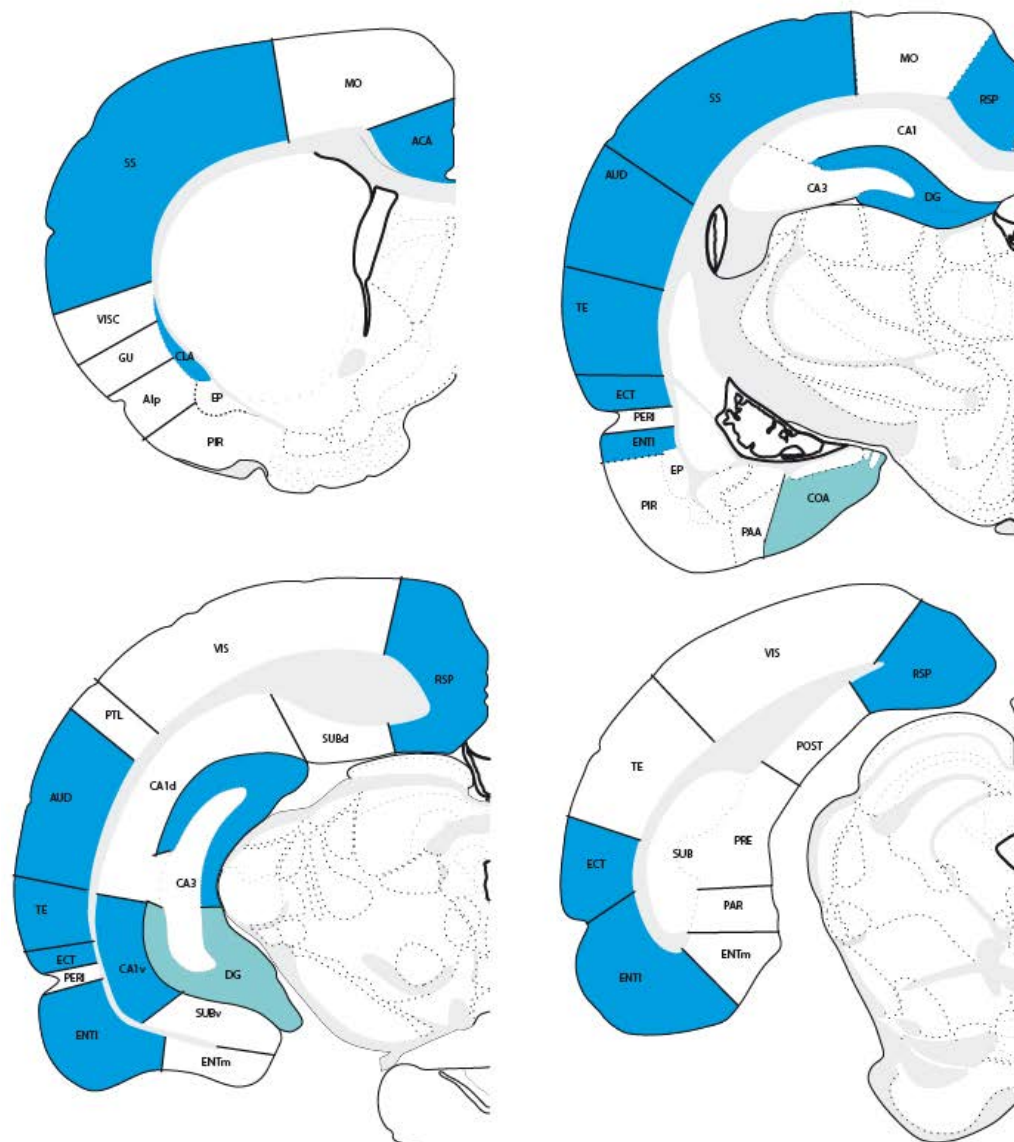
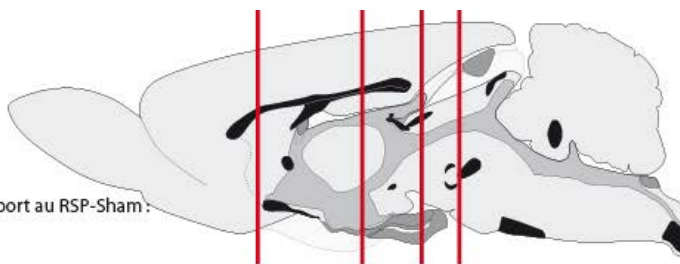
Ce résultat impliquerait donc que la voie d'activation du gyrus dentelé ventral pendant le SP proviendrait en partie du Sum mais aussi d'une autre région cérébrale. En revanche, le nombre de neurones ARC+ dans le gyrus dentelé est diminué de façon similaire dans la partie dorsale et ventrale du DG après lésion et hypersomnie de SP. Ainsi la protéine ARC serait plus sensible aux modifications d'activité corticale induites par la lésion que FOS.

La lésion du Sum après hypersomnie de SP entraîne une diminution de l'intensité de l'immunomarquage de COX2 dans les corps cellulaires de CA3 et du GD ; cette diminution pourrait être liée indirectement à l'altération du fonctionnement du GD pendant le SP.

Dans le néocortex, le nombre de neurones FOS+ est globalement diminué par la lésion après hypersomnie de SP par rapport aux rats non lésés (Fig. 3).

Nombre de neurones FOS+ chez les RSP-Lésion par rapport au RSP-Sham :

- Diminue significativement ( $p < 0,02$ )
- Diminue significativement ( $p < 0,05$ )



**Figure 4 : Régions dont l'activation en SP dépend du Sum d'après la distribution du FOS chez les rats PSR-Shams et PSR-Lésions aux niveaux quantifiés.**

Chez nos rats lésés, les diminutions significatives du nombre de neurones FOS+ après hypersomnie de SP concernent le cortex cingulé antérieur, le claustrum et le cortex

amygdalien, régions qui reçoivent des projections directes du Sum. Une diminution du nombre de neurones FOS+ est aussi observée dans les régions corticales ne recevant pas de projection du Sum dont l'ectorhinal, le cortex entorhinal latéral, le rétrosplénial, le cortex auditif, le cortex somatosensoriel et le cortex d'association temporale.

La diminution de "l'activité" dans ces régions après hypersomnie de SP serait indirectement liée à la lésion du Sum. La lésion du Sum entraînerait une diminution de l'activité du claustrum. D'après les projections étendues du claustrum sur les couches profondes du néocortex, l'altération de son activité en SP entraînerait alors une diminution du nombre de neurones FOS+ dans les régions sensorielles auxquelles il projette. L'analyse de la répartition des neurones FOS+ dans les couches corticales de ses régions sensorielles pourrait nous permettre d'évaluer si l'altération de la voie du Sum est indirectement responsable d'une diminution de l'expression du FOS dans ces couches corticales profondes.

La lésion du Sum altère aussi l'expression de la protéine ARC dans les régions du claustrum et du cortex amygdalien pendant l'hypersomnie de SP. Ces résultats confirment ceux obtenus avec le FOS. Le Sum projette densément au cortex amygdalien et au claustrum, il est possible que les projections du Sum sur le claustrum et le cortex amygdalien soient similaires à celles du gyrus dentelé. L'activité complexe de ces projections permettrait d'induire des processus de plasticité spécifiquement dans ces trois régions corticales. Cependant, le rôle de l'expression de ARC dans le noyau des neurones n'est pas connu.

Le Sum serait très impliqué dans l'activation ou l'induction de plasticité corticale pendant le SP. Cependant, le parasubiculum et l'entorhinal médian pourtant "actifs" après hypersomnie de SP ne contiennent pas un nombre de neurones FOS+ significativement diminué par la lésion en hypersomnie de SP. Nous n'excluons pas l'implication d'une autre voie dans l'activation de ces régions corticales en SP. L'injection de traceurs dans le CA1 ventral et dans l'entorhinal médian de rat en hypersomnie de SP permettrait de vérifier cette hypothèse.

D'après les résultats d'éjection de traceurs, le Sum envoie des efférences actives pendant le SP au cortex cingulé antérieur, au gyrus dentelé, au claustrum et au cortex amygdalien. Le claustrum quand à lui envoie des projections actives au cortex rétrosplénial et au cortex cingulé antérieur. Le cortex rétrosplénial envoie des projections actives au cortex cingulé antérieur. Le fait que ces régions voient leur nombre de neurones FOS+ diminuer après lésion et hypersomnie de SP est donc un résultat attendu et confirme l'implication du Sum dans l'activation de ces voies en SP.

### **3.4.2 Effets sur les caractéristiques de l'EEG**

Nous n'obtenons pas d'altération significative dans les spectres de fréquence de l'EEG en éveil, en SL et en SP en conditions basales après lésion du Sum. Cependant des tendances similaires aux différences significatives obtenues après hypersomnie de SP existent entre nos deux groupes de rats. L'augmentation du nombre d'animaux par groupe permettrait de confirmer ces résultats.

Les modifications des caractéristiques de l'EEG par la lésion en condition basale ne sont pas significatives dans notre étude. Cette absence d'effet rejoint les résultats d'autres études. Les études de lésion ou inhibition du Sum indiquent qu'aucune modification de l'EEG n'est observée en condition basal pendant l'Ev. La lésion du Sum a un effet sur l'activité EEG seulement lors de certains comportements cognitifs. Cet effet correspond généralement à une diminution d'environ 0,5 Hz dans la fréquence du pic d'amplitude de l'oscillation thêta (Pan et McNaughton, 2004). Cette diminution survient seulement pendant de courtes périodes du comportement. Contrairement à ces études, nous n'avons pas obtenu de modification significative de la fréquence du pic d'amplitude de l'onde thêta ; le Sum présenterait donc une activité différente pendant le SP par rapport à celle observée dans ces tâches cognitives en éveil. L'EEG reflète l'activité des neurones, cependant, les lésions du Sum qui ont un effet sur le comportement ne s'accompagnent pas nécessairement d'une modification de fréquence ou d'amplitude du thêta. De plus, une diminution du nombre de neurones FOS+ en éveil ne s'accompagne pas forcément d'une modification de l'activité EEG (Cirelli *et al.*, 1996). Il est donc possible le nombre de neurones FOS+ en hypersomnie de SP chez nos rats lésés soit indépendant de l'activité EEG.

En condition basale comme en Ev, plusieurs régions génératrices de l'oscillation thêta et de l'EEG dit "desynchronisé" fonctionneraient indépendamment du Sum et permettraient de maintenir ces deux activités robustes en SP. Ainsi la lésion du Sum ne serait pas suffisante pour altérer les paramètres de l'EEG au cours du SP. Cependant, l'effet de la lésion du Sum sur l'expression des IEG après hypersomnie de SP pourrait être dû par exemple à une modification de l'activité thêta propre au SP dans plusieurs régions corticales limbiques. L'enregistrement de l'activité LFP de ces régions limbiques ou génératrices du thêta permettrait de comparer leurs caractéristiques pendant le SP en absence du Sum.

Nos résultats indiquent aussi qu'il y a une diminution de l'amplitude des oscillations thêta et une augmentation de l'amplitude de la bande de fréquence sigma chez les animaux PSR-Lésion par rapport aux animaux PSR-Sham. Ainsi la légère modification d'amplitude de ces oscillations pourrait suffire à altérer l'expression des protéines de plasticité induite par l'hypersomnie de SP dans plusieurs régions limbiques.

Lorsque la rythmicité thêta s'accélère, les variations dans la fréquence de décharge d'une sous population de neurones du Sum prédisent les futures variations des potentiels de champs rythmiques de l'hippocampe. Au contraire lorsque le rythme thêta ralentit, l'activité des neurones du Sum anticipent l'activité des neurones hippocampique (Kocsis et Kaminski, 2006). De façon similaire, une population de cellules du Sum serait sous influence des cellules du MS qui régulerait la rythmicité de leur taux de décharge alors qu'une autre population de neurones dans le Sum contrôlerait la fréquence de la rythmicité thêta dans le MS (Kocsis, 2006). Pendant le SP l'activité thêta peut être caractérisée par des rythmes relativement lents et des bursts d'oscillations rapides soudaines : le Sum pourrait jouer un rôle dans l'alternance de ces rythmes. De plus, les oscillations sigma (10 à 14Hz) sont souvent présentes pendant le SP phasique et lors de mouvements en éveil (Maloney *et al.*,



1997). Or, la lésion du Sum entraîne une augmentation de l'amplitude de cette oscillation en SP. Ainsi, une hypothèse est que le Sum influe sur l'activité phasique pendant le SP.

## **4. Conclusion et Perspectives**

D'après nos données, les régions corticales activées en SP sont très différentes de celles pendant l'éveil. De même le réseau neuronal sous-jacent à l'activation corticale en SP est très différent de celui contrôlant l'éveil. D'après la distribution des neurones FOS+ dans le cortex après hypersomnie de SP, les voies afférentes au cortex en provenance du thalamus et du télencéphale basal ne seraient pas impliquées dans l'induction du FOS dans les neurones de ces régions limbiques pendant le SP. Le Sum et le claustrum seraient en grande partie responsables de l'activation corticale pendant le SP. Les fonctions du SP sont encore en partie énigmatiques, aussi comprendre le rôle du réseau révélé dans notre étude pourrait nous permettre de les éclairer.

### **4.1 Précision des résultats des puces à ADN**

Les puces à ADN apportent des quantités d'informations considérables mais il est difficile de les interpréter, notamment du fait de la grande hétérogénéité des régions dont nos ARNm sont extraits. Ainsi des microdissections de régions corticales permettraient d'étudier des gènes liés à l'activité d'une seule région corticale pendant le SP. Comparer le transcriptome de certains cortex sensoriels à celui du gyrus dentelé ou d'une autre région limbique chez les rats PSC, PSD et PSR permettrait de confirmer deux de nos hypothèses :

- Les neurones dans les régions sensorielles sollicitées pendant l'éveil "récupéreraient" de cette activité pendant le SP. Les gènes impliqués dans la survie neuronale auraient une expression augmentée après privation de SP dans ces régions.
- Le SP induit des phénomènes de plasticité synaptique dans certains cortex limbiques. Les gènes impliqués dans la plasticité synaptique auraient un niveau d'expression augmenté après hypersomnie de SP.

### **4.2 Localisation d'autres protéines ou ARNm dans le cortex**

La technique de l'immunohistochimie peut limiter le choix des anticorps : les anticorps ne sont pas disponibles pour toutes les protéines. La construction de sonde en hybridation *in situ* permet d'obtenir des sondes pour certains gènes dont les anticorps des protéines codées par ces gènes ne sont pas disponibles. Par exemple, nous avons vu que le niveau d'expression de *Bdnf* est corrélé positivement avec les quantités de SP dans le néocortex et la formation hippocampique. Les anticorps pour BDNF ne sont pas encore au point. Ainsi, l'hybridation *in situ* du *Bdnf* permettrait de localiser les modifications d'expression de ce gène après hypersomnie de SP. Contrairement aux autres IEGs *Bdnf* a un niveau d'expression augmenté après hypersomnie de SP dans le néocortex, ainsi il pourrait

aussi être exprimé dans les régions sensorielles puisque ces régions récupéreraient de la privation de SP. Cependant il est plus probable qu'il soit localisé et hautement exprimé dans les régions qui expriment les protéines ARC et FOS.

Il serait nécessaire de quantifier les neurones SGK+ dans le cortex de nos rats PSC, PSD et PSR afin de quantifier la protéine d'un gène dont l'expression augmente en privation de SP dans le cortex. Notre hypothèse est que ce gène s'exprimerait préférentiellement dans les cortex sensoriels après privation de SP.

### **4.3 Le réseau d'activation pendant le sommeil paradoxal**

Nous n'avons pas comparé les réseaux neuronaux responsables de l'activation corticale en éveil par rapport à ceux responsables de l'activation corticale en SP. L'éjection de traceurs dans les régions limbiques chez des rats en éveil exploratoire (en environnement familier après habituation à l'environnement enrichi) permettrait de comparer les différentes structures impliquées dans l'activation corticale pendant le SP et l'éveil.

Afin d'étudier la spécificité du Sum dans l'activité corticale en SP, il serait intéressant d'évaluer la répartition du FOS après privation de SP de trois heures chez des rats porteurs d'une lésion du Sum. Notre hypothèse est que le nombre de neurones FOS+ ne serait pas diminué dans les régions corticales en absence de SP.

#### **4.3.1 Le claustrum**

Le claustrum semble très impliqué dans l'activation corticale pendant le SP, cependant son activation ne doit pas être spécifique de cet état de vigilance, puisque les neurones FOS sont aussi présents dans cette région pendant l'éveil exploratoire. Cette région a des connexions bidirectionnelles avec les aires corticales. Pendant l'éveil, le claustrum pourrait être activé par des afférences en provenance des cortex sensoriels alors que pendant le SP, le claustrum serait activé par le Sum et enverrait des efférences actives sur les cortex sensoriels. Afin de tester cette hypothèse, il pourrait être intéressant d'injecter des traceurs dans le claustrum et les cortex sensoriels chez les rats après éveil exploratoire. L'éjection de traceurs rétrograde dans les cortex sensoriels et le marquage FOS chez ces rats nous permettrait de voir si des neurones FOS/CTb+ sont présents dans le claustrum pendant l'Ev. De plus, l'éjection de CTb dans le claustrum et le marquage FOS chez ces rats privés totalement de sommeil pendant 3h nous permettrait de savoir si les cortex sensoriels envoient des projections "actives" au claustrum. Nos données préliminaires nous indiquent, que les neurones FOS/FG+ sont absents dans les cortex sensoriels de nos rats en hypersomnie de SP après éjection de FG dans le claustrum et est en accord avec cette hypothèse.

#### **4.3.2 Le noyau supramillaire**

Nous avons émis l'hypothèse que le Sum pourrait avoir un rôle dans la génération de l'activité phasique du SP. Le SP à activité phasique est caractérisé par des mouvements oculaires qui sont absents en SP tonique, l'implantation d'EOG permettrait donc de quantifier ces événements et d'observer une modification de leurs caractéristiques après lésion. De plus, descendre des électrodes ou réaliser des enregistrements multiunitaires dans le GD, le CA1 et le CA3 chez des rats lésés ou après inhibition du Sum nous permettrait d'évaluer précisément l'activité hippocampique pendant le SP.

Le Sum reçoit des projections actives de l'hypothalamus latéral et de l'hypothalamus postérieur. Le triple marquage de la MCH, du FOS et de la CTb chez nos rats pourrait nous permettre de savoir si les neurones à MCH de la HLA sont impliqués dans l'activation du Sum en SP. Il peut être important de caractériser les peptides ou neurotransmetteurs qu'expriment les neurones FOS+ dans le Sum après hypersomnie de SP. Nos données indiquent qu'une partie d'entre eux est GAD65, VGLUT2 et calrétinergiques. Caractériser ces peptides, nous permettrait de sélectionner plus spécifiquement les neurones SP-on dans le Sum en vue de leur inhibition sélective à l'aide de l'optogénétique.

#### **4.4 Fonction de la voie Sum pendant le sommeil paradoxal**

Les études se sont focalisées plus particulièrement sur l'implication du Sum dans des tâches mnésiques spatiales, des modèles comportementaux d'anxiété ou le système de récompense. Cependant, ces études ont utilisé des lésions ou des inhibitions à court terme du Sum avant, pendant ou juste après l'apprentissage. De ce fait, un effet de l'inhibition du Sum sur le SP n'a jamais été évalué. Inhiber spécifiquement le Sum pendant le SP permettrait d'analyser spécifiquement son rôle pendant le SP.

L'optogénétique semble la technique idéale, la transfection de canaux à rhodopsine dans les neurones vGLUT2 ou GAD65+ du Sum et la descente d'une fibre optique permettrait d'envoyer un signal lumineux qui activeraient des canaux à rhodopsine excitateurs ou inhibiteurs spécifiquement dans les neurones transfectés. Notre laboratoire a développé une technique de détection automatique des états de vigilance. Cette inhibition du Sum pourrait donc dans ces conditions avoir lieu spécifiquement pendant le SP. Cet effet de l'inhibition spécifique du Sum pendant le SP pourrait être testé sur différents apprentissages et comportements.

L'approche de Ribeiro pourrait aussi être intéressante : la stimulation du GD ou le fait de placer les animaux en environnement enrichi pendant l'éveil permet d'observer des vagues d'expression du zif-268 qui se propagent du gyrus dentelé au néocortex au cours du temps seulement si les rats ne sont pas privé de SP (Ribeiro *et al.*, 1999 ; Ribeiro *et al.*, 2002). Effectuer ce protocole chez nos animaux lésés ou avec inhibition du Sum spécifiquement pendant le SP permettrait d'évaluer le rôle de cette voie du SP dans la transmission de la trace mnésique pendant le sommeil.

Le Sum pourrait être impliqué dans le rêve plutôt que dans les caractéristiques électrophysiologiques propres au SP ou dans la fonction de mémoire du SP. Afin d'évaluer cette hypothèse, il faudrait développer un modèle de RBD chez le rat (lésion du SLD) dont le Sum est lésé afin d'observer son comportement pendant qu'il effectue du SP sans atonie. Les mouvements des yeux ou l'amplitude du thêta sont corrélés avec les quantités de rêves chez l'homme. Quantifier ces phénomènes chez nos rats lésés pourrait apporter un premier argument en faveur de cette hypothèse.



## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

---



- Abrous, D. N., Koehl, M. et Le Moal, M. (2005).** Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol Rev* **85**(2): 523-69.
- Adamantidis, A., Salvert, D., Goutagny, R., Lakaye, B., Gervasoni, D., Grisar, T., Luppi, P. H. et Fort, P. (2008).** Sleep architecture of the melanin-concentrating hormone receptor 1-knockout mice. *Eur J Neurosci* **27**(7): 1793-800.
- Alam, M. N., Gong, H., Alam, T., Jaganath, R., McGinty, D. et Szymusiak, R. (2002).** Sleep-waking discharge patterns of neurons recorded in the rat perifornical lateral hypothalamic area. *J Physiol* **538**(Pt 2): 619-31.
- Amaral, D. G. et Kurz, J. (1985).** The time of origin of cells demonstrating glutamic acid decarboxylase-like immunoreactivity in the hippocampal formation of the rat. *Neurosci Lett* **59**(1): 33-9.
- Amaral, D. G. et Witter, M. P. (1989).** The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* **31**(3): 571-91.
- Amzica, F. et Steriade, M. (1996).** Progressive cortical synchronization of ponto-geniculo-occipital potentials during rapid eye movement sleep. *Neuroscience* **72**(2): 309-14.
- Andersen, P., Bland, H. B., Myhrer, T. et Schwartzkroin, P. A. (1979).** Septo-hippocampal pathway necessary for dentate theta production. *Brain Res* **165**(1): 13-22.
- Andersson, J. L., Onoe, H., Hetta, J., Lidstrom, K., Valind, S., Lilja, A., Sundin, A., Fasth, K. J., Westerberg, G., Broman, J. E., Watanabe, Y. et Langstrom, B. (1998).** Brain networks affected by synchronized sleep visualized by positron emission tomography. *J Cereb Blood Flow Metab* **18**(7): 701-15.
- Aranda, L., Begega, A., Sanchez-Lopez, J., Aguirre, J. A., Arias, J. L. et Santin, L. J. (2008).** Temporary inactivation of the supramammillary area impairs spatial working memory and spatial reference memory retrieval. *Physiol Behav* **94**(3): 322-30.
- Aranda, L., Santin, L. J., Begega, A., Aguirre, J. A. et Arias, J. L. (2006).** Supramammillary and adjacent nuclei lesions impair spatial working memory and induce anxiolytic-like behavior. *Behav Brain Res* **167**(1): 156-64.
- Aserinsky, E. et Kleitman, N. (1953).** Regularly occurring periods of eye motility and concomitant phenomena during sleep. *Science* **118**: 273-274.
- Aston-Jones, G. et Bloom, F. E. (1981).** Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep-waking cycle. *J Neurosci* **1**(8): 876-86.
- Axmacher, N., Helmstaedter, C., Elger, C. E. et Fell, J. (2008).** Enhancement of neocortical-medial temporal EEG correlations during non-REM sleep. *Neural Plast* **2008**: 563028.
- Baker, F. C., Angara, C., Szymusiak, R. et McGinty, D. (2005).** Persistence of sleep-temperature coupling after suprachiasmatic nuclei lesions in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **289**(3): R827-38.
- Bal, T. et McCormick, D. A. (1993).** Mechanisms of oscillatory activity in guinea-pig nucleus reticularis thalami in vitro: a mammalian pacemaker. *J Physiol* **468**: 669-91.
- Ball, G. G. et Gray, J. A. (1971).** Septal self-stimulation and hippocampal activity. *Physiol Behav* **6**(5): 547-9.
- Bassant, M. H., Apartis, E., Jazat-Poindessous, F. R., Wiley, R. G. et Lamour, Y. A. (1995).** Selective immunolesion of the basal forebrain cholinergic neurons: effects on hippocampal activity during sleep and wakefulness in the rat. *Neurodegeneration* **4**(1): 61-70.
- Bastuji, H. et Garcia-Larrea, L. (1999).** Evoked potentials as a tool for the investigation of human sleep. *Sleep Med Rev* **3**(1): 23-45.
- Baxter, M. G. et Chiba, A. A. (1999).** Cognitive functions of the basal forebrain. *Curr Opin Neurobiol* **9**(2): 178-83.



- Bayer, L., Eggermann, E., Serafin, M., Grivel, J., Machard, D., Muhlethaler, M. et Jones, B. E. (2005).** Opposite effects of noradrenaline and acetylcholine upon hypocretin/orexin versus melanin concentrating hormone neurons in rat hypothalamic slices. *Neuroscience* **130**(4): 807-11.
- Bergmann, B. M., Everson, C. A., Kushida, C. A., Fang, V. S., Leitch, C. A., Schoeller, D. A., Refetoff, S. et Rechtschaffen, A. (1989).** Sleep deprivation in the rat: V. Energy use and mediation. *Sleep* **12**(1): 31-41.
- Berka, R. M., Schneider, P., Golightly, E. J., Brown, S. H., Madden, M., Brown, K. M., Halkier, T., Mondorf, K. et Xu, F. (1997).** Characterization of the gene encoding an extracellular laccase of *Myceliophthora thermophila* and analysis of the recombinant enzyme expressed in *Aspergillus oryzae*. *Appl Environ Microbiol* **63**(8): 3151-7.
- Berntson, G. G., Shafi, R. et Sarter, M. (2002).** Specific contributions of the basal forebrain corticopetal cholinergic system to electroencephalographic activity and sleep/waking behaviour. *Eur J Neurosci* **16**(12): 2453-61.
- Beuckmann, C. T., Sinton, C. M., Miyamoto, N., Ino, M. et Yanagisawa, M. (2003).** N-type calcium channel alpha1B subunit (Cav2.2) knock-out mice display hyperactivity and vigilance state differences. *J Neurosci* **23**(17): 6793-7.
- Biswas, S., Mishra, P. et Mallick, B. N. (2006).** Increased apoptosis in rat brain after rapid eye movement sleep loss. *Neuroscience* **142**(2): 315-31.
- Bittencourt, J. C. (2011).** Anatomical organization of the melanin-concentrating hormone peptide family in the mammalian brain. *Gen Comp Endocrinol* **172**(2): 185-97.
- Bittencourt, J. C., Presse, F., Arias, C., Peto, C., Vaughan, J., Nahon, J. L., Vale, W. et Sawchenko, P. E. (1992).** The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. *J Comp Neurol* **319**(2): 218-45.
- Bland, B. H., Konopacki, J., Kirk, I. J., Oddie, S. D. et Dickson, C. T. (1995).** Discharge patterns of hippocampal theta-related cells in the caudal diencephalon of the urethan-anesthetized rat. *J Neurophysiol* **74**(1): 322-33.
- Bland, B. H. et Oddie, S. D. (1998).** Anatomical, electrophysiological and pharmacological studies of ascending brainstem hippocampal synchronizing pathways. *Neurosci Biobehav Rev* **22**(2): 259-73.
- Bloom, F. E. (1974).** To pritz or not to pritz: the doubtful value of aimless iontophoresis. *Life Sciences* **14**: 1819-1834.
- Boissard, R. (2002).** *Etude des réseaux neuronaux responsables du sommeil paradoxal chez le rat: approches neuropharmacologiques, neuroanatomiques et électrophysiologiques.* Thèse de sciences, Claude Bernard Lyon 1. Lyon: 365.
- Boissard, R., Gervasoni, D., Fort, P., Henninot, V., Barbagli, B. et Luppi, P. H. (2000).** Neuronal networks responsible for paradoxical sleep onset and maintenance in rats: a new hypothesis. *Sleep* **23** Suppl: 107.
- Boissard, R., Gervasoni, D., Schmidt, M. H., Barbagli, B., Fort, P. et Luppi, P. H. (2002).** The rat ponto-medullary network responsible for paradoxical sleep onset and maintenance: a combined microinjection and functional neuroanatomical study. *Eur J Neurosci* **16**(10): 1959-73.
- Bokor, H., Csaki, A., Kocsis, K. et Kiss, J. (2002).** Cellular architecture of the nucleus reuniens thalami and its putative aspartatergic/glutamatergic projection to the hippocampus and medial septum in the rat. *Eur J Neurosci* **16**(7): 1227-39.
- Borbely, A. A. (2001).** From slow waves to sleep homeostasis: new perspectives. *Arch Ital Biol* **139**(1-2): 53-61.
- Borhegyi, Z. et Freund, T. F. (1998).** Dual projection from the medial septum to the supramammillary nucleus in the rat. *Brain Res Bull* **46**(5): 453-9.
- Borhegyi, Z. et Leranth, C. (1997).** Distinct substance P- and calretinin-containing projections from the supramammillary area to the hippocampus in rats; a species difference between rats and monkeys. *Exp Brain Res* **115**(2): 369-74.

- Born, J. et Wagner, U. (2004).** Memory consolidation during sleep: role of cortisol feedback. *Ann N Y Acad Sci* **1032**: 198-201.
- Boulland, J. L., Jenstad, M., Boekel, A. J., Wouterlood, F. G., Edwards, R. H., Storm-Mathisen, J. et Chaudhry, F. A. (2009).** Vesicular glutamate and GABA transporters sort to distinct sets of vesicles in a population of presynaptic terminals. *Cereb Cortex* **19**(1): 241-8.
- Bourgin, P., Fabre, V., Huitron-Resendiz, S., Henriksen, S. J., Prospero-Garcia, O., Criado, J. R. et de Lecea, L. (2007).** Cortistatin promotes and negatively correlates with slow-wave sleep. *Eur J Neurosci* **26**(3): 729-38.
- Bouyer, J. J., Montaron, M. F. et Rougeul, A. (1981).** Fast fronto-parietal rhythms during combined focused attentive behaviour and immobility in cat: cortical and thalamic localizations. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **51**(3): 244-52.
- Bragin, A., Jando, G., Nadasdy, Z., Hetke, J., Wise, K. et Buzsaki, G. (1995a).** Gamma (40-100 Hz) oscillation in the hippocampus of the behaving rat. *J Neurosci* **15**(1 Pt 1): 47-60.
- Bragin, A., Jando, G., Nadasdy, Z., van Landeghem, M. et Buzsaki, G. (1995b).** Dentate EEG spikes and associated interneuronal population bursts in the hippocampal hilar region of the rat. *J Neurophysiol* **73**(4): 1691-705.
- Bramham, C. R., Alme, M. N., Bittins, M., Kuipers, S. D., Nair, R. R., Pai, B., Panja, D., Schubert, M., Soule, J., Tiron, A. et Wibrand, K. (2010).** The Arc of synaptic memory. *Exp Brain Res* **200**(2): 125-40.
- Bramham, C. R. et Srebro, B. (1989).** Synaptic plasticity in the hippocampus is modulated by behavioral state. *Brain Res* **493**(1): 74-86.
- Bramham, C. R., Worley, P. F., Moore, M. J. et Guzowski, J. F. (2008).** The immediate early gene *arc/arg3.1*: regulation, mechanisms, and function. *J Neurosci* **28**(46): 11760-7.
- Braun, A. R., Balkin, T. J., Wesenten, N. J., Carson, R. E., Varga, M., Baldwin, P., Selbie, S., Belenky, G. et Herscovitch, P. (1997).** Regional cerebral blood flow throughout the sleep-wake cycle. An H<sub>2</sub>(15)O PET study. *Brain* **120** ( Pt 7): 1173-97.
- Brazhnik, E. S., Vinogradova, O. S. et Karanov, A. M. (1984).** [Regulation of the theta activity of septal neurons by cortical and brain stem structures]. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova* **34**(1): 71-80.
- Brazhnik, E. S., Vinogradova, O. S. et Karanov, A. M. (1985).** Frequency modulation of neuronal theta-bursts in rabbit's septum by low-frequency repetitive stimulation of the afferent pathways. *Neuroscience* **14**(2): 501-8.
- Brown, R. E., Sergeeva, O., Eriksson, K. S. et Haas, H. L. (2001).** Orexin A excites serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus of the rat. *Neuropharmacology* **40**(3): 457-9.
- Buchsbaum, M. S., Hazlett, E. A., Wu, J. et Bunney, W. E., Jr. (2001).** Positron emission tomography with deoxyglucose-F18 imaging of sleep. *Neuropsychopharmacology* **25**(5 Suppl): S50-6.
- Bush, G., Luu, P. et Posner, M. I. (2000).** Cognitive and emotional influences in anterior cingulate cortex. *Trends Cogn Sci* **4**(6): 215-222.
- Buzsaki, G. (1996).** The hippocampo-neocortical dialogue. *Cereb Cortex* **6**(2): 81-92.
- Buzsaki, G. (2002).** Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron* **33**(3): 325-40.
- Buzsaki, G., Buhl, D. L., Harris, K. D., Csicsvari, J., Czeh, B. et Morozov, A. (2003).** Hippocampal network patterns of activity in the mouse. *Neuroscience* **116**(1): 201-11.
- Buzsaki, G., Leung, L. W. et Vanderwolf, C. H. (1983).** Cellular bases of hippocampal EEG in the behaving rat. *Brain Res* **287**(2): 139-71.
- Caballero-Bleda, M. et Witter, M. P. (1993).** Regional and laminar organization of projections from the presubiculum and parasubiculum to the entorhinal cortex: an anterograde tracing study in the rat. *J Comp Neurol* **328**(1): 115-29.
- Callaway, C. W., Lydic, R., Baghdoyan, H. A. et Hobson, J. A. (1987).** Pontogeniculooccipital waves: spontaneous visual system activity during rapid eye movement sleep. *Cell Mol Neurobiol* **7**(2): 105-49.

- Cantero, J. L., Atienza, M., Stickgold, R., Kahana, M. J., Madsen, J. R. et Kocsis, B. (2003).** Sleep-dependent theta oscillations in the human hippocampus and neocortex. *J Neurosci* **23**(34): 10897-903.
- Cape, E. G. et Jones, B. E. (1998).** Differential modulation of high-frequency gamma-electroencephalogram activity and sleep-wake state by noradrenaline and serotonin microinjections into the region of cholinergic basal ganglia neurons. *J Neurosci* **18**(7): 2653-66.
- Cape, E. G. et Jones, B. E. (2000).** Effects of glutamate agonist versus procaine microinjections into the basal forebrain cholinergic cell area upon gamma and theta EEG activity and sleep-wake state. *Eur J Neurosci* **12**(6): 2166-84.
- Carnes, K. M., Fuller, T. A. et Price, J. L. (1990).** Sources of presumptive glutamatergic/aspartatergic afferents to the magnocellular basal forebrain in the rat. *J Comp Neurol* **302**(4): 824-52.
- Chaudhuri, A., Zangenehpour, S., Rahbar-Dehgan, F. et Ye, F. (2000).** Molecular maps of neural activity and quiescence. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* **60**(3): 403-10.
- Chen, Z., Ito, K., Fujii, S., Miura, M., Furuse, H., Sasaki, H., Kaneko, K., Kato, H. et Miyakawa, H. (1996).** Roles of dopamine receptors in long-term depression: enhancement via D1 receptors and inhibition via D2 receptors. *Receptors Channels* **4**(1): 1-8.
- Chrobak, J. J. et Buzsaki, G. (1998).** Operational dynamics in the hippocampal-entorhinal axis. *Neurosci Biobehav Rev* **22**(2): 303-10.
- Cirelli, C. (2002).** How sleep deprivation affects gene expression in the brain: a review of recent findings. *J Appl Physiol* **92**(1): 394-400.
- Cirelli, C., Gutierrez, C. M. et Tononi, G. (2004).** Extensive and divergent effects of sleep and wakefulness on brain gene expression. *Neuron* **41**(1): 35-43.
- Cirelli, C., LaVaute, T. M. et Tononi, G. (2005).** Sleep and wakefulness modulate gene expression in *Drosophila*. *J Neurochem* **94**(5): 1411-9.
- Cirelli, C., Pompeiano, M. et Tononi, G. (1996).** Neuronal gene expression in the waking state: a role for the locus coeruleus. *Science* **274**(5290): 1211-5.
- Cirelli, C. et Tononi, G. (2000).** On the functional significance of c-fos induction during the sleep-waking cycle. *Sleep* **23**(4): 453-69.
- Cirelli, C. et Tononi, G. (2004).** Locus ceruleus control of state-dependent gene expression. *J Neurosci* **24**(23): 5410-9.
- Clement, O., Sapin, E., Berod, A., Fort, P. et Luppi, P. H. (2011).** Evidence that Neurons of the Sublaterodorsal Tegmental Nucleus Triggering Paradoxical (REM) Sleep Are Glutamatergic. *Sleep* **34**(4): 419-423.
- Cohen, H., Thomas, J. et Dement, W. C. (1970).** Sleep stages, REM deprivation and electroconvulsive threshold in the cat. *Brain Res* **19**(2): 317-21.
- Cohen, H. B. et Dement, W. C. (1965).** Sleep: changes in threshold to electroconvulsive shock in rats after deprivation of "paradoxical" phase. *Science* **150**(701): 1318-9.
- Colom, L. V. et Bland, B. H. (1987).** State-dependent spike train dynamics of hippocampal formation neurons: evidence for theta-on and theta-off cells. *Brain Res* **422**(2): 277-86.
- Conde, F., Maire-Lepoivre, E., Audinat, E. et Crepel, F. (1995).** Afferent connections of the medial frontal cortex of the rat. II. Cortical and subcortical afferents. *J Comp Neurol* **352**(4): 567-93.
- Coutureau, E. et Di Scala, G. (2009).** Entorhinal cortex and cognition. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **33**(5): 753-61.
- Crick, F. C. et Koch, C. (2005).** What is the function of the claustrum? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **360**(1458): 1271-9.
- Csicsvari, J., Jamieson, B., Wise, K. D. et Buzsaki, G. (2003).** Mechanisms of gamma oscillations in the hippocampus of the behaving rat. *Neuron* **37**(2): 311-22.
- Cullinan, W. E., Helmreich, D. L. et Watson, S. J. (1996).** Fos expression in forebrain afferents to the hypothalamic paraventricular nucleus following swim stress. *J Comp Neurol* **368**(1): 88-99.
- Curro Dossi, R., Pare, D. et Steriade, M. (1991).** Short-lasting nicotinic and long-lasting muscarinic depolarizing responses of thalamocortical neurons to stimulation of mesopontine cholinergic nuclei. *J Neurophysiol* **65**(3): 393-406.

- Czisch, M., Wehrle, R., Stiegler, A., Peters, H., Andrade, K., Holsboer, F. et Samann, P. G. (2009).** Acoustic oddball during NREM sleep: a combined EEG/fMRI study. *PLoS One* **4**(8): e6749.
- Czisch, M., Wetter, T. C., Kaufmann, C., Pollmacher, T., Holsboer, F. et Auer, D. P. (2002).** Altered processing of acoustic stimuli during sleep: reduced auditory activation and visual deactivation detected by a combined fMRI/EEG study. *Neuroimage* **16**(1): 251-8.
- D'Almeida, V., Hipolide, D. C., Azzalis, L. A., Lobo, L. L., Junqueira, V. B. et Tufik, S. (1997).** Absence of oxidative stress following paradoxical sleep deprivation in rats. *Neurosci Lett* **235**(1-2): 25-8.
- Dahan, L., Astier, B., Vautrelle, N., Urbain, N., Kocsis, B. et Chouvet, G. (2007).** Prominent burst firing of dopaminergic neurons in the ventral tegmental area during paradoxical sleep. *Neuropsychopharmacology* **32**(6): 1232-41.
- Dang-Vu, T. T., Schabus, M., Desseilles, M., Albouy, G., Boly, M., Darsaud, A., Gais, S., Rauchs, G., Sterpenich, V., Vandewalle, G., Carrier, J., Moonen, G., Balteau, E., Degueldre, C., Luxen, A., Phillips, C. et Maquet, P. (2008).** Spontaneous neural activity during human slow wave sleep. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(39): 15160-5.
- Dang-Vu, T. T., Schabus, M., Desseilles, M., Sterpenich, V., Bonjean, M. et Maquet, P. (2007).** Functional neuroimaging insights into the physiology of human sleep. *Sleep* **33**(12): 1589-603.
- Dash, M. B., Douglas, C. L., Vyazovskiy, V. V., Cirelli, C. et Tononi, G. (2009).** Long-term homeostasis of extracellular glutamate in the rat cerebral cortex across sleep and waking states. *J Neurosci* **29**(3): 620-9.
- Datta, S., Patterson, E. H. et Siwek, D. F. (1999).** Brainstem afferents of the cholinceptive pontine wave generation sites in the rat. *Sleep Res Online* **2**(3): 79-82.
- Datta, S. et Siwek, D. F. (2002).** Single cell activity patterns of pedunclopontine tegmentum neurons across the sleep-wake cycle in the freely moving rats. *J Neurosci Res* **70**(4): 611-21.
- Datta, S., Siwek, D. F., Patterson, E. H. et Cipolloni, P. B. (1998).** Localization of pontine PGO wave generation sites and their anatomical projections in the rat. *Synapse* **30**(4): 409-23.
- Dave, A. S. et Margoliash, D. (2000).** Song replay during sleep and computational rules for sensorimotor vocal learning. *Science* **290**(5492): 812-6.
- Dement, W. et Kleitman, N. (1957a).** Cyclic variations in EEG during sleep and their relation to eye movements, body motility, and dreaming. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **9**(4): 673-90.
- Dement, W. et Kleitman, N. (1957b).** The relation of eye movements during sleep to dream activity: an objective method for the study of dreaming. *Journal of Experimental Psychology. Learning, Memory, and Cognition* **53**: 339-346.
- Demmer, J., Dragunow, M., Lawlor, P. A., Mason, S. E., Leah, J. D., Abraham, W. C. et Tate, W. P. (1993).** Differential expression of immediate early genes after hippocampal long-term potentiation in awake rats. *Brain Res Mol Brain Res* **17**(3-4): 279-86.
- Denoyer, M., Sallanon, M., Buda, C., Kitahama, K. et Jouvet, M. (1991).** Neurotoxic lesion of the mesencephalic reticular formation and/or the posterior hypothalamus does not alter waking in the cat. *Brain Res* **539**(2): 287-303.
- Diekelmann, S. et Born, J. (2010).** The memory function of sleep. *Nat Rev Neurosci* **11**(2): 114-26.
- Dolleman-Van der Weel, M. J. et Witter, M. P. (2000).** Nucleus reuniens thalami innervates gamma aminobutyric acid positive cells in hippocampal field CA1 of the rat. *Neurosci Lett* **278**(3): 145-8.
- Domhoff, G. W. (2003).** Dreaming - An introduction to the science of sleep. *Science* **299**(5615): 1987-1988.
- Dragunow, M. et Faull, R. (1989).** The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *J Neurosci Methods* **29**(3): 261-5.
- Drosopoulos, S., Windau, E., Wagner, U. et Born, J. (2007).** Sleep enforces the temporal order in memory. *PLoS One* **2**(4): e376.
- Dudai, Y. (2004).** The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu Rev Psychol* **55**: 51-86.

- Dumuis, A., Sebben, M., Haynes, L., Pin, J. P. et Bockaert, J. (1988).** NMDA receptors activate the arachidonic acid cascade system in striatal neurons. *Nature* **336**(6194): 68-70.
- Edeline, J. M., Manunta, Y. et Hennevin, E. (2000).** Auditory thalamus neurons during sleep: changes in frequency selectivity, threshold, and receptive field size. *J Neurophysiol* **84**(2): 934-52.
- Eggermann, E., Serafin, M., Bayer, L., Machard, D., Saint-Mleux, B., Jones, B. E. et Muhlethaler, M. (2001).** Orexins/hypocretins excite basal forebrain cholinergic neurones. *Neuroscience* **108**(2): 177-81.
- El Mansari, M., Sakai, K. et Jouvet, M. (1989).** Unitary characteristics of presumptive cholinergic tegmental neurons during the sleep-waking cycle in freely moving cats. *Exp Brain Res* **76**(3): 519-29.
- Ellenbogen, J. M., Hulbert, J. C., Stickgold, R., Dinges, D. F. et Thompson-Schill, S. L. (2006).** Interfering with theories of sleep and memory: sleep, declarative memory, and associative interference. *Curr Biol* **16**(13): 1290-4.
- Elton, M., Winter, O., Heslenfeld, D., Loewy, D., Campbell, K. et Kok, A. (1997).** Event-related potentials to tones in the absence and presence of sleep spindles. *J Sleep Res* **6**(2): 78-83.
- Eschenko, O., Ramadan, W., Molle, M., Born, J. et Sara, S. J. (2008).** Sustained increase in hippocampal sharp-wave ripple activity during slow-wave sleep after learning. *Learn Mem* **15**(4): 222-8.
- Espana, R. A., Baldo, B. A., Kelley, A. E. et Berridge, C. W. (2001).** Wake-promoting and sleep-suppressing actions of hypocretin (orexin): basal forebrain sites of action. *Neuroscience* **106**(4): 699-715.
- Everson, C. A. (2005).** Clinical assessment of blood leukocytes, serum cytokines, and serum immunoglobulins as responses to sleep deprivation in laboratory rats. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **289**(4): R1054-R1063.
- Fantini, M. L., Gagnon, J. F., Petit, D., Rompre, S., Decary, A., Carrier, J. et Montplaisir, J. (2003).** Slowing of electroencephalogram in rapid eye movement sleep behavior disorder. *Ann Neurol* **53**(6): 774-80.
- Fields, R. D., Eshete, F., Stevens, B. et Itoh, K. (1997).** Action potential-dependent regulation of gene expression: temporal specificity in  $ca^{2+}$ , cAMP-responsive element binding proteins, and mitogen-activated protein kinase signaling. *J Neurosci* **17**(19): 7252-66.
- Fisahn, A., Pike, F. G., Buhl, E. H. et Paulsen, O. (1998).** Cholinergic induction of network oscillations at 40 Hz in the hippocampus in vitro. *Nature* **394**(6689): 186-9.
- Fogel, S. M., Smith, C. T. et Cote, K. A. (2007).** Dissociable learning-dependent changes in REM and non-REM sleep in declarative and procedural memory systems. *Behav Brain Res* **180**(1): 48-61.
- Fort, P., Khateb, A., Pegna, A., Muhlethaler, M. et Jones, B. E. (1995).** Noradrenergic modulation of cholinergic nucleus basalis neurons demonstrated by in vitro pharmacological and immunohistochemical evidence in the guinea-pig brain. *Eur J Neurosci* **7**(7): 1502-11.
- Foster, D. J. et Wilson, M. A. (2006).** Reverse replay of behavioural sequences in hippocampal place cells during the awake state. *Nature* **440**(7084): 680-683.
- Frank, M. G. et Heller, H. C. (2003).** The ontogeny of mammalian sleep: a reappraisal of alternative hypotheses. *J Sleep Res* **12**(1): 25-34.
- Franken, P., Dijk, D. J., Tobler, I. et Borbely, A. A. (1994).** High-frequency components of the rat electrocorticogram are modulated by the vigilance states. *Neurosci Lett* **167**(1-2): 89-92.
- Frankland, P. W. et Bontempi, B. (2005).** The organization of recent and remote memories. *Nat Rev Neurosci* **6**(2): 119-30.
- Freund, T. F. et Gulyas, A. I. (1991).** GABAergic interneurons containing calbindin D28K or somatostatin are major targets of GABAergic basal forebrain afferents in the rat neocortex. *J Comp Neurol* **314**(1): 187-99.
- Fuller, P., Sherman, D., Pedersen, N. P., Saper, C. B. et Lu, J. (2011).** Reassessment of the structural basis of the ascending arousal system. *J Comp Neurol* **519**(5): 933-56.

- Gais, S., Albouy, G., Boly, M., Dang-Vu, T. T., Darsaud, A., Desseilles, M., Rauchs, G., Schabus, M., Sterpenich, V., Vandewalle, G., Maquet, P. et Peigneux, P. (2007).** Sleep transforms the cerebral trace of declarative memories. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(47): 18778-83.
- Gais, S., Molle, M., Helms, K. et Born, J. (2002).** Learning-dependent increases in sleep spindle density. *J Neurosci* **22**(15): 6830-4.
- Gais, S., Plihal, W., Wagner, U. et Born, J. (2000).** Early sleep triggers memory for early visual discrimination skills. *Nat Neurosci* **3**(12): 1335-9.
- Gall, C. et Selawski, L. (1984).** Supramammillary afferents to guinea pig hippocampus contain substance P-like immunoreactivity. *Neurosci Lett* **51**(2): 171-6.
- Gaykema, R. P., Luiten, P. G., Nyakas, C. et Traber, J. (1990).** Cortical projection patterns of the medial septum-diagonal band complex. *J Comp Neurol* **293**(1): 103-24.
- Giuditta, A., Ambrosini, M. V., Montagnese, P., Mandile, P., Cotugno, M., Grassi Zucconi, G. et Vescia, S. (1995).** The sequential hypothesis of the function of sleep. *Behav Brain Res* **69**(1-2): 157-66.
- Glasgow, S. D. et Chapman, C. A. (2007).** Local generation of theta-frequency EEG activity in the parasubiculum. *J Neurophysiol* **97**(6): 3868-79.
- Glasgow, S. D. et Chapman, C. A. (2008).** Conductances mediating intrinsic theta-frequency membrane potential oscillations in layer II parasubicular neurons. *J Neurophysiol* **100**(5): 2746-56.
- Gonzalo-Ruiz, A., Alonso, A., Sanz, J. M. et Llinas, R. R. (1992).** A dopaminergic projection to the rat mammillary nuclei demonstrated by retrograde transport of wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase and tyrosine hydroxylase immunohistochemistry. *J Comp Neurol* **321**(2): 300-11.
- Gonzalo-Ruiz, A., Morte, L., Flecha, J. M. et Sanz, J. M. (1999).** Neurotransmitter characteristics of neurons projecting to the supramammillary nucleus of the rat. *Anat Embryol (Berl)* **200**(4): 377-92.
- Gottesmann, C. (2002).** The neurochemistry of waking and sleeping mental activity: the disinhibition-dopamine hypothesis. *Psychiatry Clin Neurosci* **56**(4): 345-54.
- Goutagny, R., Jackson, J. et Williams, S. (2009).** Self-generated theta oscillations in the hippocampus. *Nat Neurosci* **12**(12): 1491-3.
- Goutagny, R., Luppi, P. H., Salvert, D., Gervasoni, D. et Fort, P. (2005).** GABAergic control of hypothalamic melanin-concentrating hormone-containing neurons across the sleep-waking cycle. *Neuroreport* **16**(10): 1069-73.
- Goutagny, R., Luppi, P. H., Salvert, D., Lapray, D., Gervasoni, D. et Fort, P. (2008).** Role of the dorsal paragigantocellular reticular nucleus in paradoxical (rapid eye movement) sleep generation: a combined electrophysiological and anatomical study in the rat. *Neuroscience* **152**(3): 849-57.
- Grassi-Zucconi, G., Menegazzi, M., De Prati, A. C., Bassetti, A., Montagnese, P., Mandile, P., Cosi, C. et Bentivoglio, M. (1993).** c-fos mRNA is spontaneously induced in the rat brain during the activity period of the circadian cycle. *Eur J Neurosci* **5**(8): 1071-8.
- Gray, J. A. (1971).** Medial septal lesions, hippocampal theta rhythm and the control of vibrissal movement in the freely moving rat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **30**(3): 189-97.
- Gray, J. A. (1982).** *The neuropsychology of anxiety : an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system*. Clarendon Press ; Oxford University Press, Oxford New York. [4], 548 p.
- Gritti, I., Henny, P., Galloni, F., Mainville, L., Mariotti, M. et Jones, B. E. (2006).** Stereological estimates of the basal forebrain cell population in the rat, including neurons containing choline acetyltransferase, glutamic acid decarboxylase or phosphate-activated glutaminase and colocalizing vesicular glutamate transporters. *Neuroscience* **143**(4): 1051-64.
- Gritti, I., Mainville, L. et Jones, B. E. (1993).** Codistribution of GABA- with acetylcholine-synthesizing neurons in the basal forebrain of the rat. *J Comp Neurol* **329**(4): 438-57.

- Gritti, I., Mainville, L., Mancia, M. et Jones, B. E. (1997).** GABAergic and other noncholinergic basal forebrain neurons, together with cholinergic neurons, project to the mesocortex and isocortex in the rat. *J Comp Neurol* **383**(2): 163-77.
- Gross, C. G. (2000).** Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nat Rev Neurosci* **1**(1): 67-73.
- Guan, J. L., Uehara, K., Lu, S., Wang, Q. P., Funahashi, H., Sakurai, T., Yanagizawa, M. et Shioda, S. (2002).** Reciprocal synaptic relationships between orexin- and melanin-concentrating hormone-containing neurons in the rat lateral hypothalamus: a novel circuit implicated in feeding regulation. *Int J Obes Relat Metab Disord* **26**(12): 1523-32.
- Guindalini, C., Andersen, M. L., Alvarenga, T., Lee, K. et Tufik, S. (2009).** To what extent is sleep rebound effective in reversing the effects of paradoxical sleep deprivation on gene expression in the brain? *Behav Brain Res* **201**(1): 53-8.
- Gulyani, S. et Mallick, B. N. (1993).** Effect of rapid eye movement sleep deprivation on rat brain Na-K ATPase activity. *J Sleep Res* **2**(1): 45-50.
- Guzman-Marin, R., Bashir, T., Suntsova, N., Szymusiak, R. et McGinty, D. (2007).** Hippocampal neurogenesis is reduced by sleep fragmentation in the adult rat. *Neuroscience* **148**(1): 325-33.
- Guzman-Marin, R., Suntsova, N., Bashir, T., Nienhuis, R., Szymusiak, R. et McGinty, D. (2008).** Rapid eye movement sleep deprivation contributes to reduction of neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus of the adult rat. *Sleep* **31**(2): 167-75.
- Guzman-Marin, R., Suntsova, N., Methippara, M., Greiffenstein, R., Szymusiak, R. et McGinty, D. (2005).** Sleep deprivation suppresses neurogenesis in the adult hippocampus of rats. *Eur J Neurosci* **22**(8): 2111-6.
- Guzowski, J. F., Lyford, G. L., Stevenson, G. D., Houston, F. P., McGaugh, J. L., Worley, P. F. et Barnes, C. A. (2000).** Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. *J Neurosci* **20**(11): 3993-4001.
- Guzowski, J. F., McNaughton, B. L., Barnes, C. A. et Worley, P. F. (1999).** Environment-specific expression of the immediate-early gene Arc in hippocampal neuronal ensembles. *Nat Neurosci* **2**(12): 1120-4.
- Hagan, J. J., Verheijck, E. E., Spigt, M. H. et Ruigt, G. S. (1992).** Behavioural and electrophysiological studies of entorhinal cortex lesions in the rat. *Physiol Behav* **51**(2): 255-66.
- Hagg, T. (2005).** Molecular regulation of adult CNS neurogenesis: an integrated view. *Trends Neurosci* **28**(11): 589-95.
- Haglund, L., Swanson, L. W. et Kohler, C. (1984).** The projection of the supramammillary nucleus to the hippocampal formation: an immunohistochemical and anterograde transport study with the lectin PHA-L in the rat. *J Comp Neurol* **229**(2): 171-85.
- Halasy, K., Hajszan, T., Kovacs, E. G., Lam, T. T. et Leranth, C. (2004).** Distribution and origin of vesicular glutamate transporter 2-immunoreactive fibers in the rat hippocampus. *Hippocampus* **14**(7): 908-18.
- Hanada, Y., Hallworth, N. E., Szgatti, T. L., Scarlett, D. et Bland, B. H. (1999).** Distribution and analysis of hippocampal theta-related cells in the pontine region of the urethane-anesthetized rat. *Hippocampus* **9**(3): 288-302.
- Hanriot, L., Camargo, N., Courau, A. C., Leger, L., Luppi, P. H. et Peyron, C. (2007).** Characterization of the melanin-concentrating hormone neurons activated during paradoxical sleep hypersomnia in rats. *J Comp Neurol* **505**(2): 147-57.
- Hassani, O. K., Lee, M. G., Henny, P. et Jones, B. E. (2009a).** Discharge profiles of identified GABAergic in comparison to cholinergic and putative glutamatergic basal forebrain neurons across the sleep-wake cycle. *J Neurosci* **29**(38): 11828-40.
- Hassani, O. K., Lee, M. G. et Jones, B. E. (2009b).** 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**(7): 2418-22.

- Hasselmo, M. E., Schnell, E. et Barkai, E. (1995).** Dynamics of learning and recall at excitatory recurrent synapses and cholinergic modulation in rat hippocampal region CA3. *J Neurosci* **15**(7 Pt 2): 5249-62.
- Hayakawa, T., Ito, H. et Zyo, K. (1993).** Neuroanatomical study of afferent projections to the supramammillary nucleus of the rat. *Anat Embryol (Berl)* **188**(2): 139-48.
- Hennevin, E., Hars, B., Maho, C. et Bloch, V. (1995).** Processing of learned information in paradoxical sleep: relevance for memory. *Behav Brain Res* **69**(1-2): 125-35.
- Hennevin, E., Huetz, C. et Edeline, J. M. (2007).** Neural representations during sleep: from sensory processing to memory traces. *Neurobiol Learn Mem* **87**(3): 416-40.
- Henny, P. et Jones, B. E. (2006).** Vesicular glutamate (VGlut), GABA (VGAT), and acetylcholine (VACht) transporters in basal forebrain axon terminals innervating the lateral hypothalamus. *J Comp Neurol* **496**(4): 453-67.
- Henny, P. et Jones, B. E. (2008).** Projections from basal forebrain to prefrontal cortex comprise cholinergic, GABAergic and glutamatergic inputs to pyramidal cells or interneurons. *Eur J Neurosci* **27**(3): 654-70.
- Herdegen, T., Claret, F. X., Kallunki, T., Martin-Villalba, A., Winter, C., Hunter, T. et Karin, M. (1998).** Lasting N-terminal phosphorylation of c-Jun and activation of c-Jun N-terminal kinases after neuronal injury. *J Neurosci* **18**(14): 5124-35.
- Herdegen, T. et Leah, J. D. (1998).** Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res Brain Res Rev* **28**(3): 370-490.
- Hervieu, G. J., Cluderay, J. E., Harrison, D., Meakin, J., Maycox, P., Nasir, S. et Leslie, R. A. (2000).** The distribution of the mRNA and protein products of the melanin-concentrating hormone (MCH) receptor gene, slc-1, in the central nervous system of the rat. *Eur J Neurosci* **12**(4): 1194-216.
- Heynen, A. J. et Bilkey, D. K. (1994).** Effects of perforant path procaine on hippocampal type 2 rhythmical slow-wave activity (theta) in the urethane-anesthetized rat. *Hippocampus* **4**(6): 683-95.
- Hicks, R. A., Okuda, A. et Thomsen, D. (1977).** Depriving rats of REM sleep: the identification of a methodological problem. *Am J Psychol* **90**(1): 95-102.
- Hobson, J. A. (2009).** REM sleep and dreaming: towards a theory of protoconsciousness. *Nat Rev Neurosci* **10**(11): 803-13.
- Hobson, J. A. et Pace-Schott, E. F. (2002).** The cognitive neuroscience of sleep: neuronal systems, consciousness and learning. *Nat Rev Neurosci* **3**(9): 679-93.
- Hobson, J. A., Pace-Schott, E. F. et Stickgold, R. (2000).** Dreaming and the brain: toward a cognitive neuroscience of conscious states. *Behav Brain Sci* **23**(6): 793-842; discussion 904-1121.
- Hobson, J. A., Stickgold, R. et Pace-Schott, E. F. (1998).** The neuropsychology of REM sleep dreaming. *Neuroreport* **9**(3): R1-14.
- Hong, C. C., Gillin, J. C., Dow, B. M., Wu, J. et Buchsbaum, M. S. (1995).** Localized and lateralized cerebral glucose metabolism associated with eye movements during REM sleep and wakefulness: a positron emission tomography (PET) study. *Sleep* **18**(7): 570-80.
- Horne, J. A. (2000).** REM sleep - by default? *Neurosci Biobehav Rev* **24**(8): 777-97.
- Horner, R. L., Sanford, L. D., Pack, A. I. et Morrison, A. R. (1997).** Activation of a distinct arousal state immediately after spontaneous awakening from sleep. *Brain Res* **778**(1): 127-34.
- Hsu, K. S. (1996).** Characterization of dopamine receptors mediating inhibition of excitatory synaptic transmission in the rat hippocampal slice. *J Neurophysiol* **76**(3): 1887-95.
- Hu, B., Bouhassira, D., Steriade, M. et Deschenes, M. (1988).** The blockage of ponto-geniculo-occipital waves in the cat lateral geniculate nucleus by nicotinic antagonists. *Brain Res* **473**(2): 394-7.
- Huang, F., Chotiner, J. K. et Steward, O. (2007).** Actin polymerization and ERK phosphorylation are required for Arc/Arg3.1 mRNA targeting to activated synaptic sites on dendrites. *J Neurosci* **27**(34): 9054-67.



- Hughes, P. et Dragunow, M. (1995).** Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system. *Pharmacological Reviews* **47**: 133-178.
- Hur, E. E. et Zaborszky, L. (2005).** Vglut2 afferents to the medial prefrontal and primary somatosensory cortices: a combined retrograde tracing in situ hybridization study [corrected]. *J Comp Neurol* **483**(3): 351-73.
- Ikemoto, S., Murphy, J. M. et McBride, W. J. (1997).** Self-infusion of GABA(A) antagonists directly into the ventral tegmental area and adjacent regions. *Behav Neurosci* **111**(2): 369-80.
- Ikemoto, S., Witkin, B. M., Zangen, A. et Wise, R. A. (2004).** Rewarding effects of AMPA administration into the supramammillary or posterior hypothalamic nuclei but not the ventral tegmental area. *J Neurosci* **24**(25): 5758-65.
- Ingi, T., Krumins, A. M., Chidiac, P., Brothers, G. M., Chung, S., Snow, B. E., Barnes, C. A., Lanahan, A. A., Siderovski, D. P., Ross, E. M., Gilman, A. G. et Worley, P. F. (1998).** Dynamic regulation of RGS2 suggests a novel mechanism in G-protein signaling and neuronal plasticity. *J Neurosci* **18**(18): 7178-88.
- Ino, T., Itoh, K., Sugimoto, T., Kaneko, T., Kamiya, H. et Mizuno, N. (1988).** The supramammillary region of the cat sends substance P-like immunoreactive axons to the hippocampal formation and the entorhinal cortex. *Neurosci Lett* **90**(3): 259-64.
- Ioannides, A. A., Kostopoulos, G. K., Liu, L. et Fenwick, P. B. (2009).** MEG identifies dorsal medial brain activations during sleep. *Neuroimage* **44**(2): 455-68.
- Ito, M., Shirao, T., Doya, K. et Sekino, Y. (2009).** Three-dimensional distribution of Fos-positive neurons in the supramammillary nucleus of the rat exposed to novel environment. *Neurosci Res* **64**(4): 397-402.
- Jacobs, B. L. et Fornal, C. A. (1991).** Activity of brain serotonergic neurons in the behaving animal. *Pharmacol Rev* **43**(4): 563-78.
- Jiang, F. et Khanna, S. (2006).** Microinjection of carbachol in the supramammillary region suppresses CA1 pyramidal cell synaptic excitability. *Hippocampus* **16**(10): 891-905.
- Jones, B. E. (2004).** Activity, modulation and role of basal forebrain cholinergic neurons innervating the cerebral cortex. *Prog Brain Res* **145**: 157-69.
- Jones, B. E. (2005).** From waking to sleeping: neuronal and chemical substrates. *Trends Pharmacol Sci* **26**(11): 578-86.
- Jones, B. E. et Beaudet, A. (1987).** Retrograde labeling of neurones in the brain stem following injections of [<sup>3</sup>H]choline into the forebrain of the rat. *Exp Brain Res* **65**(2): 437-48.
- Jones, E. G., Burton, H. et Porter, R. (1975).** Commissural and cortico-cortical "columns" in the somatic sensory cortex of primates. *Science* **190**(4214): 572-4.
- Jones, M. W., Errington, M. L., French, P. J., Fine, A., Bliss, T. V., Garel, S., Charnay, P., Bozon, B., Laroche, S. et Davis, S. (2001).** A requirement for the immediate early gene Zif268 in the expression of late LTP and long-term memories. *Nat Neurosci* **4**(3): 289-96.
- Jones, S., Pfister-Genskow, M., Benca, R. M. et Cirelli, C. (2008).** Molecular correlates of sleep and wakefulness in the brain of the white-crowned sparrow. *J Neurochem* **105**(1): 46-62.
- Jouvet-Mounier, D. (1968).** *Ontogenèse des états de vigilance chez quelques mammifères*. Thèse de Médecine, Tixier et fils, Edit. Lyon: 231.
- Jouvet, D., Vimont, P. et Delorme, F. (1964).** [Study of Selective Deprivation of the Paradoxal Phase of Sleep in the Cat]. *J Physiol (Paris)* **56**: 381.
- Jouvet, M. (1965a).** [Electrophysiologic and neuropharmacologic study of the stages of sleep]. *Actual Pharmacol (Paris)* **18**: 109-73.
- Jouvet, M. (1965b).** [The paradoxical phase of sleep]. *Int J Neurol* **5**(2): 131-50.
- Jouvet, M. (1979).** Le comportement onirique. *Pour la science* **25**: 136-152.
- Jouvet, M. (1980).** Paradoxical sleep and the nature-nurture controversy. *Prog Brain Res* **53**: 331-46.
- Jouvet, M. et Michel, F. (1959).** Corrélations électromyographiques du sommeil chez le chat décortiqué et mésencéphalique chronique. *CR Soc. Biol.* **153**: 422-425.

- Jouvet, M., Michel, F. et Courjon, J. (1959).** Sur un stade d'activité électrique cérébrale rapide au cours du sommeil physiologique. *CR Seances Soc Biol* **153**: 1024-1028.
- Kajimura, N., Uchiyama, M., Takayama, Y., Uchida, S., Uema, T., Kato, M., Sekimoto, M., Watanabe, T., Nakajima, T., Horikoshi, S., Ogawa, K., Nishikawa, M., Hiroki, M., Kudo, Y., Matsuda, H., Okawa, M. et Takahashi, K. (1999).** Activity of midbrain reticular formation and neocortex during the progression of human non-rapid eye movement sleep. *J Neurosci* **19**(22): 10065-73.
- Kalinchuk, A. V., McCarley, R. W., Stenberg, D., Porkka-Heiskanen, T. et Basheer, R. (2008).** The role of cholinergic basal forebrain neurons in adenosine-mediated homeostatic control of sleep: lessons from 192 IgG-saporin lesions. *Neuroscience* **157**(1): 238-53.
- Kapas, L., Obal, F., Jr., Book, A. A., Schweitzer, J. B., Wiley, R. G. et Krueger, J. M. (1996).** The effects of immunolesions of nerve growth factor-receptive neurons by 192 IgG-saporin on sleep. *Brain Res* **712**(1): 53-9.
- Karashima, A., Katayama, N. et Nakao, M. (2010).** Enhancement of synchronization between hippocampal and amygdala theta waves associated with pontine wave density. *J Neurophysiol* **103**(5): 2318-25.
- Karlsson, K. A. E., Gall, A. J., Mohns, E. J., Seelke, A. M. H. et Blumberg, M. S. (2005).** The neural substrates of infant sleep in rats. *Plos Biology* **3**(5): 891-901.
- Kato, A., Fukazawa, Y., Ozawa, F., Inokuchi, K. et Sugiyama, H. (2003).** Activation of ERK cascade promotes accumulation of Ves1-S/Homer-1a immunoreactivity at synapses. *Brain Res Mol Brain Res* **118**(1-2): 33-44.
- Kaufmann, W. E., Worley, P. F., Pegg, J., Bremer, M. et Isakson, P. (1996).** COX-2, a synaptically induced enzyme, is expressed by excitatory neurons at postsynaptic sites in rat cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(6): 2317-21.
- Kaur, S., Junek, A., Black, M. A. et Semba, K. (2008).** Effects of ibotenate and 192IgG-saporin lesions of the nucleus basalis magnocellularis/substantia innominata on spontaneous sleep and wake states and on recovery sleep after sleep deprivation in rats. *J Neurosci* **28**(2): 491-504.
- Kayama, Y., Ohta, M. et Jodo, E. (1992).** Firing of 'possibly' cholinergic neurons in the rat laterodorsal tegmental nucleus during sleep and wakefulness. *Brain Res* **569**(2): 210-20.
- Kelly, A., Laroche, S. et Davis, S. (2003).** Activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in hippocampal circuitry is required for consolidation and reconsolidation of recognition memory. *J Neurosci* **23**(12): 5354-60.
- Kirk, I. J. (1997).** Supramammillary neural discharge patterns and hippocampal EEG. *Brain Res Bull* **42**(1): 23-6.
- Kirk, I. J. (1998).** Frequency modulation of hippocampal theta by the supramammillary nucleus, and other hypothalamo-hippocampal interactions: mechanisms and functional implications. *Neurosci Biobehav Rev* **22**(2): 291-302.
- Kirk, I. J. et McNaughton, N. (1991).** Supramammillary cell firing and hippocampal rhythmical slow activity. *Neuroreport* **2**(11): 723-5.
- Kirk, I. J. et McNaughton, N. (1993).** Mapping the differential effects of procaine on frequency and amplitude of reticularly elicited hippocampal rhythmical slow activity. *Hippocampus* **3**(4): 517-25.
- Kirk, I. J., Oddie, S. D., Konopacki, J. et Bland, B. H. (1996).** Evidence for differential control of posterior hypothalamic, supramammillary, and medial mammillary theta-related cellular discharge by ascending and descending pathways. *J Neurosci* **16**(17): 5547-54.
- Kiss, J., Csaki, A., Bokor, H., Kocsis, K. et Kocsis, B. (2002).** Possible glutamatergic/aspartatergic projections to the supramammillary nucleus and their origins in the rat studied by selective [(3)H]D-aspartate labelling and immunocytochemistry. *Neuroscience* **111**(3): 671-91.
- Kiss, J., Csaki, A., Bokor, H., Shanabrough, M. et Leranth, C. (2000).** The supramammillo-hippocampal and supramammillo-septal glutamatergic/aspartatergic projections in the rat: a combined [3H]D-aspartate autoradiographic and immunohistochemical study. *Neuroscience* **97**(4): 657-69.

- Kiss, J., Patel, A. J. et Freund, T. F. (1990).** Distribution of septohippocampal neurons containing parvalbumin or choline acetyltransferase in the rat brain. *J Comp Neurol* **298**(3): 362-72.
- Kitsikis, A. et Steriade, M. (1981).** Immediate behavioral effects of kainic acid injections into the midbrain reticular core. *Behav Brain Res* **3**(3): 361-80.
- Kiyama, H., Shiosaka, S., Takami, K., Tateishi, K., Hashimura, E., Hamaoka, T. et Tohyama, M. (1984).** CCK pathway from supramammillary region to the nucleus anterior ventralis thalami of the young rats. *Peptides* **5**(5): 889-93.
- Kiyohara, T., Miyata, S., Nakamura, T., Shido, O., Nakashima, T. et Shibata, M. (1995).** Differences in Fos expression in the rat brains between cold and warm ambient exposures. *Brain Res Bull* **38**(2): 193-201.
- Klemm, W. R. (1972).** Effects of electric stimulation of brain stem reticular formation on hippocampal theta rhythm and muscle activity in unanesthetized, cervical- and midbrain-transected rats. *Brain Res* **41**(2): 331-44.
- Kobbert, C., Apps, R., Bechmann, I., Lanciego, J. L., Mey, J. et Thanos, S. (2000).** Current concepts in neuroanatomical tracing. *Prog Neurobiol* **62**(4): 327-51.
- Kocsis, B. (2006).** The effect of descending theta rhythmic input from the septohippocampal system on firing in the supramammillary nucleus. *Brain Res* **1086**(1): 92-7.
- Kocsis, B. et Kaminski, M. (2006).** Dynamic changes in the direction of the theta rhythmic drive between supramammillary nucleus and the septohippocampal system. *Hippocampus* **16**(6): 531-40.
- Kocsis, B. et Vertes, R. P. (1997).** Phase relations of rhythmic neuronal firing in the supramammillary nucleus and mammillary body to the hippocampal theta activity in urethane anesthetized rats. *Hippocampus* **7**(2): 204-14.
- Kocsis, K., Kiss, J., Csaki, A. et Halasz, B. (2003).** Location of putative glutamatergic neurons projecting to the medial preoptic area of the rat hypothalamus. *Brain Res Bull* **61**(4): 459-68.
- Kohler, C., Chan-Palay, V. et Wu, J. Y. (1984).** Septal neurons containing glutamic acid decarboxylase immunoreactivity project to the hippocampal region in the rat brain. *Anat Embryol (Berl)* **169**(1): 41-4.
- Korman, M., Doyon, J., Doljansky, J., Carrier, J., Dagan, Y. et Karni, A. (2007).** Daytime sleep condenses the time course of motor memory consolidation. *Nat Neurosci* **10**(9): 1206-13.
- Kovacs, K. J. (1998).** c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. *Neurochem Int* **33**(4): 287-97.
- Kovacs, K. J. (2008).** Measurement of immediate-early gene activation- c-fos and beyond. *J Neuroendocrinol* **20**(6): 665-72.
- Kowianski, P., Dziewiatkowski, J., Kowianska, J. et Morys, J. (1999).** Comparative anatomy of the claustrum in selected species: A morphometric analysis. *Brain Behav Evol* **53**(1): 44-54.
- Koyama, Y., Honda, T., Kusakabe, M., Kayama, Y. et Sugiura, Y. (1998).** In vivo electrophysiological distinction of histochemically-identified cholinergic neurons using extracellular recording and labelling in rat laterodorsal tegmental nucleus. *Neuroscience* **83**(4): 1105-12.
- Koyama, Y., Takahashi, K., Kodama, T. et Kayama, Y. (2003).** State-dependent activity of neurons in the perifornical hypothalamic area during sleep and waking. *Neuroscience* **119**(4): 1209-19.
- Krnjevic, K. et Phillis, J. W. (1963).** Actions of certain amines on cerebral cortical neurones. *Br J Pharmacol Chemother* **20**: 471-90.
- Krout, K. E., Belzer, R. E. et Loewy, A. D. (2002).** Brainstem projections to midline and intralaminar thalamic nuclei of the rat. *J Comp Neurol* **448**(1): 53-101.
- Kuhn, H. G., Dickinson-Anson, H. et Gage, F. H. (1996).** Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* **16**(6): 2027-33.
- Kushida, C. A., Bergmann, B. M. et Rechtschaffen, A. (1989).** Sleep deprivation in the rat: IV. Paradoxical sleep deprivation. *Sleep* **12**(1): 22-30.
- Lantos, T. A., Gorcs, T. J. et Palkovits, M. (1995).** Immunohistochemical mapping of neuropeptides in the premammillary region of the hypothalamus in rats. *Brain Res Brain Res Rev* **20**(2): 209-49.

- Laureys, S., Peigneux, P., Phillips, C., Fuchs, S., Degueldre, C., Aerts, J., Del Fiore, G., Petiau, C., Luxen, A., van der Linden, M., Cleeremans, A., Smith, C. et Maquet, P. (2001). Experience-dependent changes in cerebral functional connectivity during human rapid eye movement sleep. *Neuroscience* **105**(3): 521-5.
- Lee, J., Duan, W. et Mattson, M. P. (2002). Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *J Neurochem* **82**(6): 1367-75.
- Lee, M. G., Chrobak, J. J., Sik, A., Wiley, R. G. et Buzsaki, G. (1994). Hippocampal theta activity following selective lesion of the septal cholinergic system. *Neuroscience* **62**(4): 1033-47.
- Lee, M. G., Hassani, O. K., Alonso, A. et Jones, B. E. (2005a). Cholinergic basal forebrain neurons burst with theta during waking and paradoxical sleep. *J Neurosci* **25**(17): 4365-9.
- Lee, M. G., Hassani, O. K. et Jones, B. E. (2005b). Discharge of identified orexin/hypocretin neurons across the sleep-waking cycle. *J Neurosci* **25**(28): 6716-20.
- Leranth, C., Carpi, D., Buzsaki, G. et Kiss, J. (1999). The entorhino-septo-supramammillary nucleus connection in the rat: morphological basis of a feedback mechanism regulating hippocampal theta rhythm. *Neuroscience* **88**(3): 701-18.
- Leranth, C. et Kiss, J. (1996). A population of supramammillary area calretinin neurons terminating on medial septal area cholinergic and lateral septal area calbindin-containing cells are aspartate/glutamatergic. *J Neurosci* **16**(23): 7699-710.
- Leung, L. W. et Borst, J. G. (1987). Electrical activity of the cingulate cortex. I. Generating mechanisms and relations to behavior. *Brain Res* **407**(1): 68-80.
- Lledo, P. M., Alonso, M. et Grubb, M. S. (2006). Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci* **7**(3): 179-93.
- Llinas, R. et Ribary, U. (1993). Coherent 40-Hz oscillation characterizes dream state in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(5): 2078-81.
- Llinas, R. R. et Pare, D. (1991). Of dreaming and wakefulness. *Neuroscience* **44**(3): 521-35.
- Louie, K. et Wilson, M. A. (2001). Temporally structured replay of awake hippocampal ensemble activity during rapid eye movement sleep. *Neuron* **29**(1): 145-56.
- Lu, J., Sherman, D., Devor, M. et Saper, C. B. (2006). A putative flip-flop switch for control of REM sleep. *Nature* **441**(7093): 589-94.
- Luppi, P. H., Aston-Jones, G., Akaoka, H., Chouvet, G. et Jouviet, M. (1995). Afferent projections to the rat locus coeruleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing with cholera-toxin B subunit and Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *Neuroscience* **65**(1): 119-60.
- Luppi, P. H., Clement, O., Sapin, E., Gervasoni, D., Peyron, C., Leger, L., Salvert, D. et Fort, P. (2011). The neuronal network responsible for paradoxical sleep and its dysfunctions causing narcolepsy and rapid eye movement (REM) behavior disorder. *Sleep Med Rev* **15**(3): 153-63.
- Luppi, P. H., Fort, P. et Jouviet, M. (1990). 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**(1-2): 209-24.
- Luppi, P. H., Gervasoni, D., Verret, L., Goutagny, R., Peyron, C., Salvert, D., Leger, L. et Fort, P. (2006). Paradoxical (REM) sleep genesis: the switch from an aminergic-cholinergic to a GABAergic-glutamatergic hypothesis. *J Physiol Paris* **100**(5-6): 271-83.
- Lydic, R., Baghdoyan, H. A., Hibbard, L., Bonyak, E. V., DeJoseph, M. R. et Hawkins, R. A. (1991). Regional brain glucose metabolism is altered during rapid eye movement sleep in the cat: a preliminary study. *J Comp Neurol* **304**(4): 517-29.
- Lyford, G. L., Yamagata, K., Kaufmann, W. E., Barnes, C. A., Sanders, L. K., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Lanahan, A. A. et Worley, P. F. (1995). Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron* **14**(2): 433-45.
- MacDonald, J. F. et Nistri, A. (1977). Actions of microiontophoretically applied ibotenate on cat spinal interneurons. *Can J Physiol Pharmacol* **55**(4): 965-7.

- Mackiewicz, M., Shockley, K. R., Romer, M. A., Galante, R. J., Zimmerman, J. E., Naidoo, N., Baldwin, D. A., Jensen, S. T., Churchill, G. A. et Pack, A. I. (2007).** Macromolecule biosynthesis: a key function of sleep. *Physiol Genomics* **31**(3): 441-57.
- Maddock, R. J. (1999).** The retrosplenial cortex and emotion: new insights from functional neuroimaging of the human brain. *Trends Neurosci* **22**(7): 310-6.
- Maeda, T., Kaneko, S. et Satoh, M. (1993).** Bidirectional modulation of long-term potentiation by carbachol via M1 and M2 muscarinic receptors in guinea pig hippocampal mossy fiber-CA3 synapses. *Brain Res* **619**(1-2): 324-30.
- Magloczky, Z., Acsady, L. et Freund, T. F. (1994).** Principal cells are the postsynaptic targets of supramammillary afferents in the hippocampus of the rat. *Hippocampus* **4**(3): 322-34.
- Malhotra, S., Shafiq, N. et Pandhi, P. (2004).** COX-2 inhibitors: a CLASS act or Just VIGORously promoted. *MedGenMed* **6**(1): 6.
- Mallick, B. N., Adya, H. V. et Faisal, M. (2000).** Norepinephrine-stimulated increase in Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in the rat brain is mediated through alpha1A-adrenoceptor possibly by dephosphorylation of the enzyme. *J Neurochem* **74**(4): 1574-8.
- Mallick, B. N., Siegel, J. M. et Fahringer, H. (1990).** Changes in pontine unit activity with REM sleep deprivation. *Brain Res* **515**(1-2): 94-8.
- Mallick, B. N., Thakkar, M. et Gangabhairathi, R. (1995).** Rapid eye movement sleep deprivation decreases membrane fluidity in the rat brain. *Neurosci Res* **22**(1): 117-22.
- Maloney, K. J., Cape, E. G., Gotman, J. et Jones, B. E. (1997).** High-frequency gamma electroencephalogram activity in association with sleep-wake states and spontaneous behaviors in the rat. *Neuroscience* **76**(2): 541-55.
- Maloney, K. J., Mainville, L. et Jones, B. E. (1999).** Differential c-Fos expression in cholinergic, monoaminergic, and GABAergic cell groups of the pontomesencephalic tegmentum after paradoxical sleep deprivation and recovery. *J Neurosci* **19**(8): 3057-72.
- Maloney, K. J., Mainville, L. et Jones, B. E. (2000).** c-Fos expression in GABAergic, serotonergic, and other neurons of the pontomedullary reticular formation and raphe after paradoxical sleep deprivation and recovery. *J Neurosci* **20**(12): 4669-79.
- Maloney, K. J., Mainville, L. et Jones, B. E. (2002).** c-Fos expression in dopaminergic and GABAergic neurons of the ventral mesencephalic tegmentum after paradoxical sleep deprivation and recovery. *Eur J Neurosci* **15**(4): 774-8.
- Mann, E. O. et Paulsen, O. (2005).** Mechanisms underlying gamma ('40 Hz') network oscillations in the hippocampus--a mini-review. *Prog Biophys Mol Biol* **87**(1): 67-76.
- Manns, I. D., Alonso, A. et Jones, B. E. (2003).** Rhythmically discharging basal forebrain units comprise cholinergic, GABAergic, and putative glutamatergic cells. *J Neurophysiol* **89**(2): 1057-66.
- Maquet, P. (2000).** Functional neuroimaging of normal human sleep by positron emission tomography. *J Sleep Res* **9**(3): 207-31.
- Maquet, P., Degueldre, C., Delfiore, G., Aerts, J., Peters, J. M., Luxen, A. et Franck, G. (1997).** Functional neuroanatomy of human slow wave sleep. *J Neurosci* **17**(8): 2807-12.
- Maquet, P., Dive, D., Salmon, E., Sadzot, B., Franco, G., Poirrier, R., von Frenckell, R. et Franck, G. (1990).** Cerebral glucose utilization during sleep-wake cycle in man determined by positron emission tomography and [18F]2-fluoro-2-deoxy-D-glucose method. *Brain Res* **513**(1): 136-43.
- Maquet, P. et Franck, G. (1997).** REM sleep and amygdala. *Mol Psychiatry* **2**(3): 195-6.
- Maquet, P., Laureys, S., Peigneux, P., Fuchs, S., Petiau, C., Phillips, C., Aerts, J., Del Fiore, G., Degueldre, C., Meulemans, T., Luxen, A., Franck, G., Van Der Linden, M., Smith, C. et Cleeremans, A. (2000).** Experience-dependent changes in cerebral activation during human REM sleep. *Nat Neurosci* **3**(8): 831-6.
- Maquet, P., Peters, J., Aerts, J., Delfiore, G., Degueldre, C., Luxen, A. et Franck, G. (1996).** Functional neuroanatomy of human rapid-eye-movement sleep and dreaming. *Nature* **383**(6596): 163-6.

- Maquet, P., Ruby, P., Maudoux, A., Albouy, G., Sterpenich, V., Dang-Vu, T., Desseilles, M., Boly, M., Perrin, F., Peigneux, P. et Laureys, S. (2005).** Human cognition during REM sleep and the activity profile within frontal and parietal cortices: a reappraisal of functional neuroimaging data. *Prog Brain Res* **150**: 219-27.
- Maret, S., Dorsaz, S., Gurcel, L., Pradervand, S., Petit, B., Pfister, C., Hagenbuchle, O., O'Hara, B. F., Franken, P. et Tafti, M. (2007).** Homer1a is a core brain molecular correlate of sleep loss. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(50): 20090-5.
- Marrosu, F., Portas, C., Mascia, M. S., Casu, M. A., Fa, M., Giagheddu, M., Imperato, A. et Gessa, G. L. (1995).** Microdialysis measurement of cortical and hippocampal acetylcholine release during sleep-wake cycle in freely moving cats. *Brain Res* **671**(2): 329-32.
- Marshall, L. et Born, J. (2007).** The contribution of sleep to hippocampus-dependent memory consolidation. *Trends Cogn Sci* **11**(10): 442-50.
- Mayes, A. (1983).** *Sleep in Animals and Human: an Evolutionary View.* Van Nostrand Reinhold, Workinghan
- McCarley, R. W., Benoit, O. et Barrionuevo, G. (1983).** Lateral geniculate nucleus unitary discharge in sleep and waking: state- and rate-specific aspects. *J Neurophysiol* **50**(4): 798-818.
- McCarley, R. W. et Hobson, J. A. (1975).** Neuronal excitability modulation over the sleep cycle: a structural and mathematical model. *Science* **189**(4196): 58-60.
- McCormick, D. A. (1992).** Neurotransmitter actions in the thalamus and cerebral cortex. *J Clin Neurophysiol* **9**(2): 212-23.
- McCormick, D. A. et Huguenard, J. R. (1992).** A model of the electrophysiological properties of thalamocortical relay neurons. *J Neurophysiol* **68**(4): 1384-400.
- McCormick, D. A. et Pape, H. C. (1990).** Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurones. *J Physiol* **431**: 291-318.
- McCormick, D. A. et Prince, D. A. (1986).** Mechanisms of ascending control of thalamic neuronal activities: acetylcholine and norepinephrine. *Soc Neurosci (Abstr.)* **12**: 903.
- McCormick, D. A. et Prince, D. A. (1987).** Actions of acetylcholine in the guinea-pig and cat medial and lateral geniculate nuclei, in vitro. *J Physiol* **392**: 147-65.
- McCormick, D. A. et Wang, Z. (1991).** Serotonin and noradrenaline excite GABAergic neurones of the guinea-pig and cat nucleus reticularis thalami. *J Physiol* **442**: 235-55.
- McDermott, C. M., LaHoste, G. J., Chen, C., Musto, A., Bazan, N. G. et Magee, J. C. (2003).** Sleep deprivation causes behavioral, synaptic, and membrane excitability alterations in hippocampal neurons. *J Neurosci* **23**(29): 9687-95.
- McHugh, T. J., Jones, M. W., Quinn, J. J., Balthasar, N., Coppari, R., Elmquist, J. K., Lowell, B. B., Fanselow, M. S., Wilson, M. A. et Tonegawa, S. (2007).** Dentate gyrus NMDA receptors mediate rapid pattern separation in the hippocampal network. *Science* **317**(5834): 94-9.
- McNaughton, N. et Gray, J. A. (2000).** Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. *J Affect Disord* **61**(3): 161-76.
- McNaughton, N., Logan, B., Panickar, K. S., Kirk, I. J., Pan, W. X., Brown, N. T. et Heenan, A. (1995).** Contribution of synapses in the medial supramammillary nucleus to the frequency of hippocampal theta rhythm in freely moving rats. *Hippocampus* **5**(6): 534-45.
- McNaughton, N., Richardson, J. et Gore, C. (1986).** Reticular elicitation of hippocampal slow waves: common effects of some anxiolytic drugs. *Neuroscience* **19**(3): 899-903.
- McNaughton, N. et Sedgwick, E. M. (1978).** Reticular stimulation and hippocampal theta rhythm in rats: effects of drugs. *Neuroscience* **3**(7): 629-32.
- Mendelson, W. B., Guthrie, R. D., Frederick, G. et Wyatt, R. J. (1974).** The flower pot technique of rapid eye movement (REM) sleep deprivation. *Pharmacol Biochem Behav* **2**(4): 553-6.
- Messaoudi, E., Kanhema, T., Soule, J., Tiron, A., Dagey, G., da Silva, B. et Bramham, C. R. (2007).** Sustained Arc/Arg3.1 synthesis controls long-term potentiation consolidation through regulation of local actin polymerization in the dentate gyrus in vivo. *J Neurosci* **27**(39): 10445-55.

- Mesulam, M. M., Mufson, E. J., Wainer, B. H. et Levey, A. I. (1983).** Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). *Neuroscience* **10**(4): 1185-201.
- Mileykovskiy, B. Y., Kiyashchenko, L. I. et Siegel, J. M. (2005).** Behavioral correlates of activity in identified hypocretin/orexin neurons. *Neuron* **46**(5): 787-98.
- Ming, G. L. et Song, H. (2005).** Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci* **28**: 223-50.
- Mitchell, S. J. et Ranck, J. B., Jr. (1980).** Generation of theta rhythm in medial entorhinal cortex of freely moving rats. *Brain Res* **189**(1): 49-66.
- Miyata, S., Ishiyama, M., Shido, O., Nakashima, T., Shibata, M. et Kiyohara, T. (1995).** Central mechanism of neural activation with cold acclimation of rats using Fos immunohistochemistry. *Neurosci Res* **22**(2): 209-18.
- Mizumori, S. J., McNaughton, B. L. et Barnes, C. A. (1989).** A comparison of supramammillary and medial septal influences on hippocampal field potentials and single-unit activity. *J Neurophysiol* **61**(1): 15-31.
- Molle, M., Marshall, L., Gais, S. et Born, J. (2002).** Grouping of spindle activity during slow oscillations in human non-rapid eye movement sleep. *J Neurosci* **22**(24): 10941-7.
- Molle, M., Yeshenko, O., Marshall, L., Sara, S. J. et Born, J. (2006).** Hippocampal sharp wave-ripples linked to slow oscillations in rat slow-wave sleep. *J Neurophysiol* **96**(1): 62-70.
- Montgomery, S. M., Sirota, A. et Buzsaki, G. (2008).** Theta and gamma coordination of hippocampal networks during waking and rapid eye movement sleep. *J Neurosci* **28**(26): 6731-41.
- Montoya, C. P. et Sainsbury, R. S. (1985).** The effects of entorhinal cortex lesions on type 1 and type 2 theta. *Physiol Behav* **35**(1): 121-6.
- Morales, F. R., Sampogna, S., Yamuy, J. et Chase, M. H. (1999).** c-fos expression in brainstem premotor interneurons during cholinergically induced active sleep in the cat. *J Neurosci* **19**(21): 9508-18.
- Morgan, J. I. et Curran, T. (1986).** Role of ion flux in the control of c-fos expression. *Nature* **322**: 552-555.
- Morris, R. G., Garrud, P., Rawlins, J. N. et O'Keefe, J. (1982).** Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* **297**(5868): 681-3.
- Morrison, A. R., Sanford, L. D. et Ross, R. J. (1999).** Initiation of rapid eye movement sleep: beyond the brainstem. in B. N. Mallick et S. Inoue, (Eds), *Rapid Eye Movement Sleep*. Narosa Publishing House, New Delhi: 51-68.
- Moruzzi, G. et Magoun, H. W. (1949).** Brain stem reticular formation and activation of the EEG. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **1**(4): 455-73.
- Mouze-Amady, M., Sockeel, P. et Leconte, P. (1986).** Modification of REM sleep behavior by REMs contingent auditory stimulation in man. *Physiol Behav* **37**(4): 543-8.
- Mueller, A. D., Pollock, M. S., Liebllich, S. E., Epp, J. R., Galea, L. A. et Mistlberger, R. E. (2008).** Sleep deprivation can inhibit adult hippocampal neurogenesis independent of adrenal stress hormones. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **294**(5): R1693-703.
- Nadasdy, Z., Hirase, H., Czurko, A., Csicsvari, J. et Buzsaki, G. (1999).** Replay and time compression of recurring spike sequences in the hippocampus. *Journal of Neuroscience* **19**(21): 9497-9507.
- Nakanishi, H., Sun, Y., Nakamura, R. K., Mori, K., Ito, M., Suda, S., Namba, H., Storch, F. I., Dang, T. P., Mendelson, W., Mishkin, M., Kennedy, C., Gillin, J. C., Smith, C. B. et Sokoloff, L. (1997).** Positive correlations between cerebral protein synthesis rates and deep sleep in Macaca mulatta. *Eur J Neurosci* **9**(2): 271-9.
- Nakanishi, K., Saito, H. et Abe, K. (2001).** The supramammillary nucleus contributes to associative EPSP-spike potentiation in the rat dentate gyrus in vivo. *Eur J Neurosci* **13**(4): 793-800.
- Newman, J. (1995).** Thalamic contributions to attention and consciousness. *Conscious Cogn* **4**(2): 172-93.
- Nir, Y. et Tononi, G. (2010).** Dreaming and the brain: from phenomenology to neurophysiology. *Trends in Cognitive Sciences* **14**(2): 88-100.

- Nishida, M., Hirai, N., Miwakeichi, F., Maehara, T., Kawai, K., Shimizu, H. et Uchida, S. (2004).** Theta oscillation in the human anterior cingulate cortex during all-night sleep: an electrocorticographic study. *Neurosci Res* **50**(3): 331-41.
- Nishida, M., Pearsall, J., Buckner, R. L. et Walker, M. P. (2009).** REM sleep, prefrontal theta, and the consolidation of human emotional memory. *Cereb Cortex* **19**(5): 1158-66.
- Nitsch, R. et Leranth, C. (1996).** GABAergic neurons in the rat dentate gyrus are innervated by subcortical calretinin-containing afferents. *J Comp Neurol* **364**(3): 425-38.
- Nofzinger, E. A., Mintun, M. A., Wiseman, M., Kupfer, D. J. et Moore, R. Y. (1997).** Forebrain activation in REM sleep: an FDG PET study. *Brain Res* **770**(1-2): 192-201.
- Nunez, A., Cervera-Ferri, A., Olucha-Bordonau, F., Ruiz-Torner, A. et Teruel, V. (2006).** Nucleus incertus contribution to hippocampal theta rhythm generation. *Eur J Neurosci* **23**(10): 2731-8.
- O'Keefe, J. et Nadel, L. (1978).** *The hippocampus as a cognitive map*. Clarendon Press, Oxford. xiv, 570 p., [2] p. of plates
- Oades, R. D., Rivet, J. M., Taghzouti, K., Kharouby, M., Simon, H. et Le Moal, M. (1987).** Catecholamines and conditioned blocking: effects of ventral tegmental, septal and frontal 6-hydroxydopamine lesions in rats. *Brain Res* **406**(1-2): 136-46.
- Oikawa, H., Sasaki, M., Tamakawa, Y. et Kamei, A. (2001).** The circuit of Papez in mesial temporal sclerosis: MRI. *Neuroradiology* **43**(3): 205-10.
- Ongini, E., Bo, P., Dionisotti, S., Trampus, M. et Savoldi, F. (1992).** Effects of remoxipride, a dopamine D-2 antagonist antipsychotic, on sleep-waking patterns and EEG activity in rats and rabbits. *Psychopharmacology (Berl)* **107**(2-3): 236-42.
- Otmakhova, N. A., Lewey, J., Asrican, B. et Lisman, J. E. (2005).** Inhibition of perforant path input to the CA1 region by serotonin and noradrenaline. *J Neurophysiol* **94**(2): 1413-22.
- Otmakhova, N. A. et Lisman, J. E. (1998).** D1/D5 dopamine receptors inhibit depotentiation at CA1 synapses via cAMP-dependent mechanism. *J Neurosci* **18**(4): 1270-9.
- Pachoud, B., Adamantidis, A., Ravassard, P., Luppi, P. H., Grisar, T., Lakaye, B. et Salin, P. A. (2010).** Major impairments of glutamatergic transmission and long-term synaptic plasticity in the hippocampus of mice lacking the melanin-concentrating hormone receptor-1. *J Neurophysiol* **104**(3): 1417-25.
- Pan, W. X. et McNaughton, N. (2002).** The role of the medial supramammillary nucleus in the control of hippocampal theta activity and behaviour in rats. *Eur J Neurosci* **16**(9): 1797-809.
- Pan, W. X. et McNaughton, N. (2004).** The supramammillary area: its organization, functions and relationship to the hippocampus. *Prog Neurobiol* **74**(3): 127-66.
- Papa, M., Pellicano, M. P., Welzl, H. et Sadile, A. G. (1993).** Distributed changes in c-Fos and c-Jun immunoreactivity in the rat brain associated with arousal and habituation to novelty. *Brain Res Bull* **32**(5): 509-15.
- Park, S., Park, J. M., Kim, S., Kim, J. A., Shepherd, J. D., Smith-Hicks, C. L., Chowdhury, S., Kaufmann, W., Kuhl, D., Ryazanov, A. G., Haganir, R. L., Linden, D. J. et Worley, P. F. (2008).** Elongation factor 2 and fragile X mental retardation protein control the dynamic translation of Arc/Arg3.1 essential for mGluR-LTD. *Neuron* **59**(1): 70-83.
- Park, S. P., Lopez-Rodriguez, F., Wilson, C. L., Maidment, N., Matsumoto, Y. et Engel, J., Jr. (1999).** In vivo microdialysis measures of extracellular serotonin in the rat hippocampus during sleep-wakefulness. *Brain Res* **833**(2): 291-6.
- Parmeggiani, P. L., Azzaroni, A., Cevolani, D. et Ferrari, G. (1986).** Polygraphic study of anterior hypothalamic-preoptic neuron thermosensitivity during sleep. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **63**(3): 289-95.
- Parmentier, R., Ohtsu, H., Djebbara-Hannas, Z., Valatx, J. L., Watanabe, T. et Lin, J. S. (2002).** Anatomical, physiological, and pharmacological characteristics of histidine decarboxylase knock-out mice: evidence for the role of brain histamine in behavioral and sleep-wake control. *J Neurosci* **22**(17): 7695-711.



- Paxinos, G. et Watson, C. (1997).** *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, Sydney ; Orlando. xxxiii, [78] of plates
- Payne, J. D., Stickgold, R., Swanberg, K. et Kensinger, E. A. (2008).** Sleep preferentially enhances memory for emotional components of scenes. *Psychol Sci* **19**(8): 781-8.
- Peigneux, P., Laureys, S., Delbeuck, X. et Maquet, P. (2001a).** Sleeping brain, learning brain. The role of sleep for memory systems. *Neuroreport* **12**(18): A111-24.
- Peigneux, P., Laureys, S., Fuchs, S., Collette, F., Perrin, F., Reggers, J., Phillips, C., Degueldre, C., Del Fiore, G., Aerts, J., Luxen, A. et Maquet, P. (2004).** Are spatial memories strengthened in the human hippocampus during slow wave sleep? *Neuron* **44**(3): 535-45.
- Peigneux, P., Laureys, S., Fuchs, S., Delbeuck, X., Degueldre, C., Aerts, J., Delfiore, G., Luxen, A. et Maquet, P. (2001b).** Generation of rapid eye movements during paradoxical sleep in humans. *Neuroimage* **14**(3): 701-8.
- Peigneux, P., Laureys, S., Fuchs, S., Destrebecqz, A., Collette, F., Delbeuck, X., Phillips, C., Aerts, J., Del Fiore, G., Degueldre, C., Luxen, A., Cleeremans, A. et Maquet, P. (2003).** Learned material content and acquisition level modulate cerebral reactivation during posttraining rapid-eye-movements sleep. *Neuroimage* **20**(1): 125-34.
- Perrin, F., Bastuji, H., Mauguire, F. et Garcia-Larrea, L. (2000).** Functional dissociation of the early and late portions of human K-complexes. *Neuroreport* **11**(8): 1637-40.
- Petsche, H. et Stumpf, C. (1962).** [The origin of theta-rhythm in the rabbit hippocampus]. *Wien Klin Wochenschr* **74**: 696-700.
- Phillips, R. G. et LeDoux, J. E. (1992).** Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* **106**(2): 274-85.
- Phillips, R. G. et LeDoux, J. E. (1994).** Lesions of the dorsal hippocampal formation interfere with background but not foreground contextual fear conditioning. *Learn Mem* **1**(1): 34-44.
- Pinault, D. et Deschenes, M. (1992).** Muscarinic inhibition of reticular thalamic cells by basal forebrain neurones. *Neuroreport* **3**(12): 1101-4.
- Pirot, S., Godbout, R., Mantz, J., Tassin, J. P., Glowinski, J. et Thierry, A. M. (1992).** Inhibitory effects of ventral tegmental area stimulation on the activity of prefrontal cortical neurons: evidence for the involvement of both dopaminergic and GABAergic components. *Neuroscience* **49**(4): 857-65.
- Pitkanen, A., Pikkarainen, M., Nurminen, N. et Ylinen, A. (2000).** Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat. A review. *Ann N Y Acad Sci* **911**: 369-91.
- Plath, N., Ohana, O., Dammermann, B., Errington, M. L., Schmitz, D., Gross, C., Mao, X., Engelsberg, A., Mahlke, C., Welzl, H., Kobalz, U., Stawrakakis, A., Fernandez, E., Waltereit, R., Bick-Sander, A., Therstappen, E., Cooke, S. F., Blanquet, V., Wurst, W., Salmen, B., Bosl, M. R., Lipp, H. P., Grant, S. G., Bliss, T. V., Wolfer, D. P. et Kuhl, D. (2006).** Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories. *Neuron* **52**(3): 437-44.
- Plihal, W. et Born, J. (1997).** Effects of early and late nocturnal sleep on declarative and procedural memory. *Journal of Cognitive Neuroscience* **9**(4): 534-547.
- Plihal, W. et Born, J. (1999).** Effects of early and late nocturnal sleep on priming and spatial memory. *Psychophysiology* **36**(5): 571-82.
- Poe, G. R., Nitz, D. A., McNaughton, B. L. et Barnes, C. A. (2000).** Experience-dependent phase-reversal of hippocampal neuron firing during REM sleep. *Brain Res* **855**(1): 176-80.
- Pompeiano, M., Cirelli, C. et Tononi, G. (1994).** Immediate-early genes in spontaneous wakefulness and sleep: expression of c-fos and NGFI-A mRNA and protein. *J Sleep Res* **3**(2): 80-96.
- Ramm, P. et Frost, B. J. (1986).** Cerebral and local cerebral metabolism in the cat during slow wave and REM sleep. *Brain Res* **365**(1): 112-24.
- Ramm, P. et Smith, C. T. (1990).** Rates of cerebral protein synthesis are linked to slow wave sleep in the rat. *Physiol Behav* **48**(5): 749-53.
- Rampin, C., Cespuoglio, R., Chastrette, N. et Jouvet, M. (1991).** Immobilisation stress induces a paradoxical sleep rebound in rat. *Neurosci Lett* **126**(2): 113-8.

- Rao, V. R., Pintchovski, S. A., Chin, J., Peebles, C. L., Mitra, S. et Finkbeiner, S. (2006). AMPA receptors regulate transcription of the plasticity-related immediate-early gene *Arc*. *Nat Neurosci* **9**(7): 887-95.
- Rasch, B., Buechel, C., Gais, S. et Born, J. (2007). Odor cues during slow-wave sleep prompt declarative memory consolidation. *Science* **315**(5817): 1426-1429.
- Ravassard, P., Pachoud, B., Comte, J. C., Mejia-Perez, C., Scote-Blachon, C., Gay, N., Claustrat, B., Touret, M., Luppi, P. H. et Salin, P. A. (2009). Paradoxical (REM) sleep deprivation causes a large and rapidly reversible decrease in long-term potentiation, synaptic transmission, glutamate receptor protein levels, and ERK/MAPK activation in the dorsal hippocampus. *Sleep* **32**(2): 227-40.
- Rechtschaffen, A., Hauri, P. et Zeitlin, M. (1966). Auditory awakening thresholds in REM and NREM sleep stages. *Percept Mot Skills* **22**(3): 927-42.
- Ribeiro, S., Gervasoni, D., Soares, E. S., Zhou, Y., Lin, S. C., Pantoja, J., Lavine, M. et Nicolelis, M. A. (2004). Long-lasting novelty-induced neuronal reverberation during slow-wave sleep in multiple forebrain areas. *PLoS Biol* **2**(1): E24.
- Ribeiro, S., Goyal, V., Mello, C. V. et Pavlides, C. (1999). Brain gene expression during REM sleep depends on prior waking experience. *Learn Mem* **6**(5): 500-8.
- Ribeiro, S., Mello, C. V., Velho, T., Gardner, T. J., Jarvis, E. D. et Pavlides, C. (2002). Induction of hippocampal long-term potentiation during waking leads to increased extrahippocampal zif-268 expression during ensuing rapid-eye-movement sleep. *J Neurosci* **22**(24): 10914-23.
- Ribeiro, S. et Nicolelis, M. A. L. (2005). Reverberation, storage, and postsynaptic propagation of memories during sleep (vol 11, pg 686, 2004). *Learning & Memory* **12**(1): 75-75.
- Risold, P. Y. et Swanson, L. W. (1996). Structural evidence for functional domains in the rat hippocampus. *Science* **272**(5267): 1484-6.
- Risold, P. Y. et Swanson, L. W. (1997). Connections of the rat lateral septal complex. *Brain Res Brain Res Rev* **24**(2-3): 115-95.
- Roberts, L. A., Higgins, M. J., O'Shaughnessy, C. T., Stone, T. W. et Morris, B. J. (1996). Changes in hippocampal gene expression associated with the induction of long-term potentiation. *Brain Res Mol Brain Res* **42**(1): 123-7.
- Robertson, E. M. (2009). From creation to consolidation: a novel framework for memory processing. *PLoS Biol* **7**(1): e19.
- Rodriguez, J. J., Davies, H. A., Silva, A. T., De Souza, I. E., Peddie, C. J., Colyer, F. M., Lancashire, C. L., Fine, A., Errington, M. L., Bliss, T. V. et Stewart, M. G. (2005). Long-term potentiation in the rat dentate gyrus is associated with enhanced *Arc/Arg3.1* protein expression in spines, dendrites and glia. *Eur J Neurosci* **21**(9): 2384-96.
- Roffwarg, H. P., Dement, W. C., Muzio, J. N. et Fisher, C. (1962). Dream imagery: relationship to rapid eye movements of sleep. *Arch Gen Psychiatry* **7**: 235-58.
- Roffwarg, H. P., Muzio, J. N. et Dement, W. C. (1966). Ontogenic development of the human sleep-dream cycle. *Science* **152**: 604-619.
- Romcy-Pereira, R. et Pavlides, C. (2004). Distinct modulatory effects of sleep on the maintenance of hippocampal and medial prefrontal cortex LTP. *Eur J Neurosci* **20**(12): 3453-62.
- Sagar, S. M., Sharp, F. R. et Curran, T. (1988). Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science* **240**(4857): 1328-31.
- Sainsbury, R. S. et Bland, B. H. (1981). The effects of selective septal lesions on theta production in CA1 and the dentate gyrus of the hippocampus. *Physiol Behav* **26**(6): 1097-101.
- Saito, Y., Cheng, M., Leslie, F. M. et Civelli, O. (2001). Expression of the melanin-concentrating hormone (MCH) receptor mRNA in the rat brain. *J Comp Neurol* **435**(1): 26-40.
- Saito, Y., Nothacker, H. P., Wang, Z., Lin, S. H., Leslie, F. et Civelli, O. (1999). Molecular characterization of the melanin-concentrating-hormone receptor. *Nature* **400**(6741): 265-9.
- Sakai, K. (1986). Central mechanisms of paradoxical sleep. *Brain Dev* **8**(4): 402-7.

- Sakai, K., el Mansari, M., Lin, J. S., Zhang, J. G. et Vanni-Mercier, G. (1990).** The posterior hypothalamus in the regulation of wakefulness and paradoxical sleep. *in* M. Mancina et G. Marini, (Eds), *The diencephalon and sleep*. Raven Press, New York.
- Sakata, M., Sei, H., Toida, K., Fujihara, H., Urushihara, R. et Morita, Y. (2002).** Mesolimbic dopaminergic system is involved in diurnal blood pressure regulation. *Brain Res* **928**(1-2): 194-201.
- Sallinen, M., Kaartinen, J. et Lyytinen, H. (1996).** Processing of auditory stimuli during tonic and phasic periods of REM sleep as revealed by event-related brain potentials. *J Sleep Res* **5**(4): 220-8.
- Sandner, G., Di Scala, G., Rocha, B. et Angst, M. J. (1992).** C-fos immunoreactivity in the brain following unilateral electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray in freely moving rats. *Brain Res* **573**(2): 276-83.
- Santin, L. J., Aguirre, J. A., Rubio, S., Begega, A., Miranda, R. et Arias, J. L. (2003).** c-Fos expression in supramammillary and medial mammillary nuclei following spatial reference and working memory tasks. *Physiol Behav* **78**(4-5): 733-9.
- Saper, C. B., Chou, T. C. et Scammell, T. E. (2001).** The sleep switch: hypothalamic control of sleep and wakefulness. *Trends Neurosci* **24**(12): 726-31.
- Sapin, E., Berod, A., Leger, L., Herman, P. A., Luppi, P. H. et Peyron, C. (2010).** A very large number of GABAergic neurons are activated in the tuberal hypothalamus during paradoxical (REM) sleep hypersomnia. *PLoS One* **5**(7): e11766.
- Sapin, E., Lapray, D., Berod, A., Goutagny, R., Leger, L., Ravassard, P., Clement, O., Hanriot, L., Fort, P. et Luppi, P. H. (2009).** Localization of the brainstem GABAergic neurons controlling paradoxical (REM) sleep. *PLoS One* **4**(1): e4272.
- Sastre, J. P., Buda, C., Lin, J. S. et Jouvet, M. (2000).** Differential c-fos expression in the rhinencephalon and striatum after enhanced sleep-wake states in the cat. *Eur J Neurosci* **12**(4): 1397-410.
- Sastre, J. P. et Jouvet, M. (1979a).** Le comportement onirique du chat [Oneiric behavior in cats]. *Physiol Behav* **22**(5): 979-89.
- Sastre, J. P. et Jouvet, M. (1979b).** [Oneiric behavior in cats]. *Physiol Behav* **22**(5): 979-89.
- Sastre, J. P., Sakai, K. et Jouvet, M. (1981).** Are the gigantocellular tegmental field neurons responsible for paradoxical sleep? *Brain Res* **229**(1): 147-61.
- Schenck, C. H., Bundlie, S. R., Ettinger, M. G. et Mahowald, M. W. (1986).** Chronic behavioral disorders of human REM sleep: a new category of parasomnia. *Sleep* **9**(2): 293-308.
- Schenck, C. H., Bundlie, S. R. et Mahowald, M. W. (1996).** Delayed emergence of a parkinsonian disorder in 38% of 29 older men initially diagnosed with idiopathic rapid eye movement sleep behaviour disorder. *Neurology* **46**(2): 388-93.
- Schmidt, M. H., Valatx, J. L., Sakai, K., Fort, P. et Jouvet, M. (2000).** Role of the lateral preoptic area in sleep-related erectile mechanisms and sleep generation in the rat. *J Neurosci* **20**(17): 6640-7.
- Schmidt, M. H., Valatx, J. L., Schmidt, H. S., Wauquier, A. et Jouvet, M. (1994).** Experimental evidence of penile erections during paradoxical sleep in the rat. *Neuroreport* **5**(5): 561-4.
- Schmued, L. C. et Fallon, J. H. (1986).** Fluoro-Gold: a new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties. *Brain Res* **377**(1): 147-54.
- Schwartz, S. et Maquet, P. (2002).** Sleep imaging and the neuro-psychological assessment of dreams. *Trends Cogn Sci* **6**(1): 23-30.
- Shahidi, S., Motamedi, F., Bakeshloo, S. A. et Taleghani, B. K. (2004a).** The effect of reversible inactivation of the supramammillary nucleus on passive avoidance learning in rats. *Behav Brain Res* **152**(1): 81-7.
- Shahidi, S., Motamedi, F. et Naghdi, N. (2004b).** Effect of reversible inactivation of the supramammillary nucleus on spatial learning and memory in rats. *Brain Res* **1026**(2): 267-74.

- Shallice, T., Fletcher, P., Frith, C. D., Grasby, P., Frackowiak, R. S. et Dolan, R. J. (1994).** Brain regions associated with acquisition and retrieval of verbal episodic memory. *Nature* **368**(6472): 633-5.
- Sharma, A. K., Reams, R. Y., Jordan, W. H., Miller, M. A., Thacker, H. L. et Snyder, P. W. (2007).** Mesial temporal lobe epilepsy: pathogenesis, induced rodent models and lesions. *Toxicol Pathol* **35**(7): 984-99.
- Shaw, P. J., Cirelli, C., Greenspan, R. J. et Tononi, G. (2000).** Correlates of sleep and waking in *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**(5459): 1834-7.
- Sherin, J. E., Shiromani, P. J., McCarley, R. W. et Saper, C. B. (1996).** Activation of ventrolateral preoptic neurons during sleep. *Science* **271**(5246): 216-9.
- Shibata, H. (1987).** Ascending projections to the mammillary nuclei in the rat: a study using retrograde and anterograde transport of wheat germ agglutinin conjugated to horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* **264**(2): 205-15.
- Shin, R. et Ikemoto, S. (2010).** Administration of the GABAA receptor antagonist picrotoxin into rat supramammillary nucleus induces c-Fos in reward-related brain structures. Supramammillary picrotoxin and c-Fos expression. *BMC Neurosci* **11**: 101.
- Shoshani, T., Faerman, A., Mett, I., Zelin, E., Tenne, T., Gorodin, S., Moshel, Y., Elbaz, S., Budanov, A., Chajut, A., Kalinski, H., Kamer, I., Rozen, A., Mor, O., Keshet, E., Leshkowitz, D., Einat, P., Skaliter, R. et Feinstein, E. (2002).** Identification of a novel hypoxia-inducible factor 1-responsive gene, RTP801, involved in apoptosis. *Mol Cell Biol* **22**(7): 2283-93.
- Shouse, M. N. et Siegel, J. M. (1992).** Pontine regulation of REM sleep components in cats: integrity of the pedunculopontine tegmentum (PPT) is important for phasic events but unnecessary for atonia during REM sleep. *Brain Res* **571**(1): 50-63.
- Sia, G. M., Beique, J. C., Rumbaugh, G., Cho, R., Worley, P. F. et Huganir, R. L. (2007).** Interaction of the N-terminal domain of the AMPA receptor GluR4 subunit with the neuronal pentraxin NP1 mediates GluR4 synaptic recruitment. *Neuron* **55**(1): 87-102.
- Siegel, J. M. (1995).** Phylogeny and the function of REM sleep. *Behav Brain Res* **69**(1-2): 29-34.
- Siegel, J. M. (2005).** Clues to the functions of mammalian sleep. *Nature* **437**(7063): 1264-71.
- Siegel, J. M. et Rogawski, M. A. (1988).** A function for REM sleep: regulation of noradrenergic receptor sensitivity. *Brain Res* **472**(3): 213-33.
- Sil'kis, I. G. (2009).** Characteristics of the functioning of the hippocampal formation in waking and paradoxical sleep. *Neurosci Behav Physiol* **39**(6): 523-34.
- Silveira, M. C., Sandner, G., Di Scala, G. et Graeff, F. G. (1995).** c-fos immunoreactivity in the brain following electrical or chemical stimulation of the medial hypothalamus of freely moving rats. *Brain Res* **674**(2): 265-74.
- Simon, A. P., Poindessous-Jazat, F., Dutar, P., Epelbaum, J. et Bassant, M. H. (2006).** Firing properties of anatomically identified neurons in the medial septum of anesthetized and unanesthetized restrained rats. *J Neurosci* **26**(35): 9038-46.
- Singer, W. (1993).** Synchronization of cortical activity and its putative role in information processing and learning. *Annu Rev Physiol* **55**: 349-74.
- Sirota, A. et Buzsaki, G. (2005).** Interaction between neocortical and hippocampal networks via slow oscillations. *Thalamus Relat Syst* **3**(4): 245-259.
- Sirota, A., Csicsvari, J., Buhl, D. et Buzsaki, G. (2003).** Communication between neocortex and hippocampus during sleep in rodents. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(4): 2065-9.
- Sjostrom, P. J., Turrigiano, G. G. et Nelson, S. B. (2001).** Rate, timing, and cooperativity jointly determine cortical synaptic plasticity. *Neuron* **32**(6): 1149-64.
- Smith, C. (1995).** Sleep states and memory processes. *Behav Brain Res* **69**(1-2): 137-45.
- Smith, C. et Rose, G. M. (1996).** Evidence for a paradoxical sleep window for place learning in the Morris water maze. *Physiol Behav* **59**(1): 93-7.
- Smith, C. et Rose, G. M. (1997).** Posttraining paradoxical sleep in rats is increased after spatial learning in the Morris water maze. *Behav Neurosci* **111**(6): 1197-204.

- Smith, C., Tenn, C. et Annett, R. (1991).** Some biochemical and behavioural aspects of the paradoxical sleep window. *Can J Psychol* **45**(2): 115-24.
- Smythe, J. W., Colom, L. V. et Bland, B. H. (1992).** The extrinsic modulation of hippocampal theta depends on the coactivation of cholinergic and GABA-ergic medial septal inputs. *Neurosci Biobehav Rev* **16**(3): 289-308.
- Snider, W. D. (1994).** Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. *Cell* **77**(5): 627-38.
- Solms, M. (1995).** New findings on the neurological organization of dreaming: implications for psychoanalysis. *Psychoanal Q* **64**(1): 43-67.
- Solms, M. (2000).** Dreaming and REM sleep are controlled by different brain mechanisms. *Behav Brain Sci* **23**(6): 843-50; discussion 904-1121.
- Soltesz, I., Lightowler, S., Leresche, N., Jassik-Gerschenfeld, D., Pollard, C. E. et Crunelli, V. (1991).** Two inward currents and the transformation of low-frequency oscillations of rat and cat thalamocortical cells. *J Physiol* **441**: 175-97.
- Soule, J., Messaoudi, E. et Bramham, C. R. (2006).** Brain-derived neurotrophic factor and control of synaptic consolidation in the adult brain. *Biochem Soc Trans* **34**(Pt 4): 600-4.
- Soussi, R., Zhang, N., Tahtakran, S., Houser, C. R. et Esclapez, M. (2010).** Heterogeneity of the supramammillary-hippocampal pathways: evidence for a unique GABAergic neurotransmitter phenotype and regional differences. *Eur J Neurosci* **32**(5): 771-85.
- Steininger, T. L., Alam, M. N., Gong, H., Szymusiak, R. et McGinty, D. (1999).** Sleep-waking discharge of neurons in the posterior lateral hypothalamus of the albino rat. *Brain Res* **840**(1-2): 138-47.
- Steriade, M. (2000).** Corticothalamic resonance, states of vigilance and mentation. *Neuroscience* **101**(2): 243-76.
- Steriade, M. (2001a).** Active neocortical processes during quiescent sleep. *Arch Ital Biol* **139**(1-2): 37-51.
- Steriade, M. (2001b).** Impact of network activities on neuronal properties in corticothalamic systems. *J Neurophysiol* **86**(1): 1-39.
- Steriade, M. (2003).** The corticothalamic system in sleep. *Front Biosci* **8**: d878-99.
- Steriade, M. (2006).** Grouping of brain rhythms in corticothalamic systems. *Neuroscience* **137**(4): 1087-106.
- Steriade, M., Amzica, F. et Nunez, A. (1993a).** Cholinergic and noradrenergic modulation of the slow (approximately 0.3 Hz) oscillation in neocortical cells. *J Neurophysiol* **70**(4): 1385-400.
- Steriade, M., Curro Dossi, R. et Contreras, D. (1993b).** Electrophysiological properties of intralaminar thalamocortical cells discharging rhythmic (approximately 40 Hz) spike-bursts at approximately 1000 Hz during waking and rapid eye movement sleep. *Neuroscience* **56**(1): 1-9.
- Steriade, M., Datta, S., Pare, D., Oakson, G. et Curro Dossi, R. C. (1990a).** Neuronal activities in brain-stem cholinergic nuclei related to tonic activation processes in thalamocortical systems. *J Neurosci* **10**(8): 2541-59.
- Steriade, M., Domich, L. et Oakson, G. (1986).** Reticularis thalami neurons revisited: activity changes during shifts in states of vigilance. *J Neurosci* **6**(1): 68-81.
- Steriade, M., Dossi, R. C., Pare, D. et Oakson, G. (1991).** Fast oscillations (20-40 Hz) in thalamocortical systems and their potentiation by mesopontine cholinergic nuclei in the cat. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(10): 4396-400.
- Steriade, M. et Glenn, L. L. (1982).** Neocortical and caudate projections of intralaminar thalamic neurons and their synaptic excitation from midbrain reticular core. *J Neurophysiol* **48**(2): 352-71.
- Steriade, M. et McCarley, R. W. (1990).** *Brainstem control of wakefulness and sleep*. Plenum Press, New York. xv, 499
- Steriade, M., Oakson, G. et Ropert, N. (1982).** Firing rates and patterns of midbrain reticular neurons during steady and transitional states of the sleep-waking cycle. *Exp Brain Res* **46**(1): 37-51.

- Steriade, M., Pare, D., Datta, S., Oakson, G. et Curro Dossi, R. (1990b).** Different cellular types in mesopontine cholinergic nuclei related to ponto-geniculo-occipital waves. *J Neurosci* **10**(8): 2560-79.
- Steriade, M., Sakai, K. et Jouvet, M. (1984).** Bulbo-thalamic neurons related to thalamocortical activation processes during paradoxical sleep. *Exp Brain Res* **54**(3): 463-75.
- Steriade, M., Timofeev, I. et Grenier, F. (2001).** Natural waking and sleep states: a view from inside neocortical neurons. *J Neurophysiol* **85**(5): 1969-85.
- Steward, O. et Worley, P. F. (2001).** Selective targeting of newly synthesized Arc mRNA to active synapses requires NMDA receptor activation. *Neuron* **30**(1): 227-40.
- Stickgold, R., James, L. et Hobson, J. A. (2000a).** Visual discrimination learning requires sleep after training. *Nat Neurosci* **3**(12): 1237-8.
- Stickgold, R., Whidbee, D., Schirmer, B., Patel, V. et Hobson, J. A. (2000b).** Visual discrimination task improvement: A multi-step process occurring during sleep. *J Cogn Neurosci* **12**(2): 246-54.
- Stoeckel, K., Schwab, M. et Thoenen, H. (1977).** Role of gangliosides in the uptake and retrograde axonal transport of cholera and tetanus toxin as compared to nerve growth factor and wheat germ agglutinin. *Brain Res* **132**(2): 273-85.
- Stone, T. W. (1985).** *Microiontophoresis and pressure ejection*. Wiley, Chichester ; New York. ix, 214
- Suzuki, W. A. et Amaral, D. G. (1994).** Perirhinal and parahippocampal cortices of the macaque monkey: cortical afferents. *J Comp Neurol* **350**(4): 497-533.
- Swanson, L. W. (1976).** An autoradiographic study of the efferent connections of the preoptic region in the rat. *J Comp Neurol* **167**(2): 227-56.
- Swanson, L. W. (1977).** The anatomical organization of septo-hippocampal projections. *Ciba Found Symp*(58): 25-48.
- Swanson, L. W. (1982).** The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Res Bull* **9**(1-6): 321-53.
- Swanson, L. W. (1998).** *Brain maps : structure of the rat brain : a laboratory guide with printed and electronic templates for data, models, and schematics*. Elsevier, New York. vii, 267
- Szentirmai, E., Kapas, L. et Krueger, J. M. (2007).** Ghrelin microinjection into forebrain sites induces wakefulness and feeding in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **292**(1): R575-85.
- Takahara, M., Nittono, H. et Hori, T. (2002).** Comparison of the event-related potentials between tonic and phasic periods of rapid eye movement sleep. *Psychiatry Clin Neurosci* **56**(3): 257-8.
- Takashima, A., Petersson, K. M., Rutters, F., Tendolkar, I., Jensen, O., Zwartz, M. J., McNaughton, B. L. et Fernandez, G. (2006).** Declarative memory consolidation in humans: a prospective functional magnetic resonance imaging study. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(3): 756-61.
- Terao, A., Steininger, T. L., Hyder, K., Apte-Deshpande, A., Ding, J., Rishipathak, D., Davis, R. W., Heller, H. C. et Kilduff, T. S. (2003).** Differential increase in the expression of heat shock protein family members during sleep deprivation and during sleep. *Neuroscience* **116**(1): 187-200.
- Teruel-Marti, V., Cervera-Ferri, A., Nunez, A., Valverde-Navarro, A. A., Olucha-Bordonau, F. E. et Ruiz-Torner, A. (2008).** Anatomical evidence for a ponto-septal pathway via the nucleus incertus in the rat. *Brain Res* **1218**: 87-96.
- Thinschmidt, J. S., Kinney, G. G. et Kocsis, B. (1995).** The supramammillary nucleus: is it necessary for the mediation of hippocampal theta rhythm? *Neuroscience* **67**(2): 301-12.
- Timofeev, I., Grenier, F. et Steriade, M. (2000).** Impact of intrinsic properties and synaptic factors on the activity of neocortical networks in vivo. *J Physiol Paris* **94**(5-6): 343-55.
- Timofeev, I. et Steriade, M. (1996).** Low-frequency rhythms in the thalamus of intact-cortex and decorticated cats. *J Neurophysiol* **76**(6): 4152-68.
- Tononi, G. et Cirelli, C. (2001).** Some considerations on sleep and neural plasticity. *Arch Ital Biol* **139**(3): 221-41.
- Tononi, G. et Cirelli, C. (2006).** Sleep function and synaptic homeostasis. *Sleep Med Rev* **10**(1): 49-62.

- Trojanowski, J. Q. (1983).** Native and derivatized lectins for in vivo studies of neuronal connectivity and neuronal cell biology. *J Neurosci Methods* **9**(3): 185-204.
- Tsanov, M., Chah, E., Wright, N., Vann, S. D., Reilly, R., Erichsen, J. T., Aggleton, J. P. et O'Mara, S. M. (2011).** Oscillatory entrainment of thalamic neurons by theta rhythm in freely moving rats. *J Neurophysiol* **105**(1): 4-17.
- Turnbull, A. V., Vale, W. et Rivier, C. (1996).** Urocortin, a corticotropin-releasing factor-related mammalian peptide, inhibits edema due to thermal injury in rats. *Eur J Pharmacol* **303**(3): 213-6.
- van Strien, N. M., Cappaert, N. L. et Witter, M. P. (2009).** The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nat Rev Neurosci* **10**(4): 272-82.
- Verret, L., Fort, P., Gervasoni, D., Leger, L. et Luppi, P. H. (2006).** Localization of the neurons active during paradoxical (REM) sleep and projecting to the locus coeruleus noradrenergic neurons in the rat. *J Comp Neurol* **495**(5): 573-86.
- Verret, L., Fort, P. et Luppi, P. H. (2003a).** Localization of the neurons responsible for the inhibition of locus coeruleus noradrenergic neurons during paradoxical sleep in the rat. *Sleep* **26**: 69.
- Verret, L., Goutagny, R., Fort, P., Cagnon, L., Salvert, D., Leger, L., Boissard, R., Salin, P., Peyron, C. et Luppi, P. H. (2003b).** A role of melanin-concentrating hormone producing neurons in the central regulation of paradoxical sleep. *BMC Neurosci* **4**(1): 19.
- Verret, L., Leger, L., Fort, P. et Luppi, P. H. (2005).** Cholinergic and noncholinergic brainstem neurons expressing Fos after paradoxical (REM) sleep deprivation and recovery. *Eur J Neurosci* **21**(9): 2488-504.
- Vertes, R. P. (1977).** Selective firing of rat pontine gigantocellular neurons during movement and REM sleep. *Brain Res* **128**(1): 146-52.
- Vertes, R. P. (1979).** Brain stem gigantocellular neurons: patterns of activity during behavior and sleep in the freely moving rat. *J Neurophysiol* **42**(1 Pt 1): 214-28.
- Vertes, R. P. (1981).** An analysis of ascending brain stem systems involved in hippocampal synchronization and desynchronization. *J Neurophysiol* **46**(5): 1140-59.
- Vertes, R. P. (1982).** Brain stem generation of the hippocampal EEG. *Prog Neurobiol* **19**(3): 159-86.
- Vertes, R. P. (1988).** Brainstem afferents to the basal forebrain in the rat. *Neuroscience* **24**(3): 907-35.
- Vertes, R. P. (1992).** PHA-L analysis of projections from the supramammillary nucleus in the rat. *J Comp Neurol* **326**(4): 595-622.
- Vertes, R. P., Colom, L. V., Fortin, W. J. et Bland, B. H. (1993).** Brainstem sites for the carbachol elicitation of the hippocampal theta rhythm in the rat. *Exp Brain Res* **96**(3): 419-29.
- Vertes, R. P., Crane, A. M., Colom, L. V. et Bland, B. H. (1995).** Ascending projections of the posterior nucleus of the hypothalamus: PHA-L analysis in the rat. *J Comp Neurol* **359**(1): 90-116.
- Vertes, R. P., Fortin, W. J. et Crane, A. M. (1999).** Projections of the median raphe nucleus in the rat. *J Comp Neurol* **407**(4): 555-82.
- Vertes, R. P. et Kocsis, B. (1997).** Brainstem-diencephalo-septohippocampal systems controlling the theta rhythm of the hippocampus. *Neuroscience* **81**(4): 893-926.
- Vertes, R. P. et Martin, G. F. (1988).** Autoradiographic analysis of ascending projections from the pontine and mesencephalic reticular formation and the median raphe nucleus in the rat. *J Comp Neurol* **275**(4): 511-41.
- Vertes, R. P., Martin, G. F. et Waltzer, R. (1986).** An autoradiographic analysis of ascending projections from the medullary reticular formation in the rat. *Neuroscience* **19**(3): 873-98.
- Vertes, R. P. et McKenna, J. T. (2000).** Collateral projections from the supramammillary nucleus to the medial septum and hippocampus. *Synapse* **38**(3): 281-93.
- Vyazovskiy, V. V., Cirelli, C., Pfister-Genskow, M., Faraguna, U. et Tononi, G. (2008).** Molecular and electrophysiological evidence for net synaptic potentiation in wake and depression in sleep. *Nat Neurosci* **11**(2): 200-8.
- Wagner, U., Gais, S. et Born, J. (2001).** Emotional memory formation is enhanced across sleep intervals with high amounts of rapid eye movement sleep. *Learn Mem* **8**(2): 112-9.

- Wagner, U., Hallschmid, M., Rasch, B. et Born, J. (2006).** Brief sleep after learning keeps emotional memories alive for years. *Biol Psychiatry* **60**(7): 788-90.
- Walker, M. P. (2009).** The role of sleep in cognition and emotion. *Ann N Y Acad Sci* **1156**: 168-97.
- Walker, M. P., Brakefield, T., Seidman, J., Morgan, A., Hobson, J. A. et Stickgold, R. (2003).** Sleep and the time course of motor skill learning. *Learn Mem* **10**(4): 275-84.
- Wang, W. T., Wan, Y. H., Zhu, J. L., Lei, G. S., Wang, Y. Y., Zhang, P. et Hu, S. J. (2006).** Theta-frequency membrane resonance and its ionic mechanisms in rat subicular pyramidal neurons. *Neuroscience* **140**(1): 45-55.
- Wang, Z. et McCormick, D. A. (1993).** Control of firing mode of corticotectal and corticopontine layer V burst-generating neurons by norepinephrine, acetylcholine, and 1S,3R-ACPD. *J Neurosci* **13**(5): 2199-216.
- Waung, M. W., Pfeiffer, B. E., Nosyreva, E. D., Ronesi, J. A. et Huber, K. M. (2008).** Rapid translation of Arc/Arg3.1 selectively mediates mGluR-dependent LTD through persistent increases in AMPAR endocytosis rate. *Neuron* **59**(1): 84-97.
- Wehr, T. A. (1992).** A brain-warming function for REM sleep. *Neurosci Biobehav Rev* **16**(3): 379-97.
- Wehrle, R., Kaufmann, C., Wetter, T. C., Holsboer, F., Auer, D. P., Pollmacher, T. et Czisch, M. (2007).** Functional microstates within human REM sleep: first evidence from fMRI of a thalamocortical network specific for phasic REM periods. *Eur J Neurosci* **25**(3): 863-71.
- Wenk, G. L. (1997).** The nucleus basalis magnocellularis cholinergic system: one hundred years of progress. *Neurobiol Learn Mem* **67**(2): 85-95.
- Wibrand, K., Messaoudi, E., Havik, B., Steenslid, V., Lovlie, R., Steen, V. M. et Bramham, C. R. (2006).** Identification of genes co-upregulated with Arc during BDNF-induced long-term potentiation in adult rat dentate gyrus in vivo. *Eur J Neurosci* **23**(6): 1501-11.
- Wilson, M. A. et McNaughton, B. L. (1993).** Dynamics of the hippocampal ensemble code for space. *Science* **261**(5124): 1055-8.
- Wilson, M. A. et McNaughton, B. L. (1994).** Reactivation of hippocampal ensemble memories during sleep. *Science* **265**(5172): 676-9.
- Wirtshafter, D., Stratford, T. R. et Shim, I. (1998).** Placement in a novel environment induces fos-like immunoreactivity in supramammillary cells projecting to the hippocampus and midbrain. *Brain Res* **789**(2): 331-4.
- Witter, M. P. et Amaral, D. G. (1991).** Entorhinal cortex of the monkey: V. Projections to the dentate gyrus, hippocampus, and subicular complex. *J Comp Neurol* **307**(3): 437-59.
- Wixted, J. T. (2004).** The psychology and neuroscience of forgetting. *Annu Rev Psychol* **55**: 235-69.
- Woodnorth, M. A. et McNaughton, N. (2002).** Similar effects of medial supramammillary or systemic injection of chlordiazepoxide on both theta frequency and fixed-interval responding. *Cogn Affect Behav Neurosci* **2**(1): 76-83.
- Yamagata, K., Andreasson, K. I., Sugiura, H., Maru, E., Dominique, M., Irie, Y., Miki, N., Hayashi, Y., Yoshioka, M., Kaneko, K., Kato, H. et Worley, P. F. (1999).** Arcadlin is a neural activity-regulated cadherin involved in long term potentiation. *J Biol Chem* **274**(27): 19473-1979.
- Yassin, L., Benedetti, B. L., Jouhanneau, J. S., Wen, J. A., Poulet, J. F. et Barth, A. L. (2010).** An embedded subnetwork of highly active neurons in the neocortex. *Neuron* **68**(6): 1043-50.
- Yasuda, S., Tanaka, H., Sugiura, H., Okamura, K., Sakaguchi, T., Tran, U., Takemiya, T., Mizoguchi, A., Yagita, Y., Sakurai, T., De Robertis, E. M. et Yamagata, K. (2007).** Activity-induced protocadherin arcadlin regulates dendritic spine number by triggering N-cadherin endocytosis via TAO2beta and p38 MAP kinases. *Neuron* **56**(3): 456-71.
- Yeckel, M. F. et Berger, T. W. (1990).** Feedforward excitation of the hippocampus by afferents from the entorhinal cortex: redefinition of the role of the trisynaptic pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(15): 5832-6.
- Yoshihara, H. et De France, J. F. (1976).** Deep temporal lobe projections to the nucleus of the diagonal band of Broca. *Experientia* **32**(1): 55-7.
- Zhao, C., Deng, W. et Gage, F. H. (2008).** Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* **132**(4): 645-60.



Zimmerman, J. E., Rizzo, W., Shockley, K. R., Raizen, D. M., Naidoo, N., Mackiewicz, M., Churchill, G. A. et Pack, A. I. (2006). Multiple mechanisms limit the duration of wakefulness in *Drosophila* brain. *Physiol Genomics* **27**(3): 337-50.

# ARTICLE

---

#  
#  
#  
#  
#  
#  
#  
#  
#  
#  
#  
#  
#  
#  
#  
#



#

#

## Supramammillary nucleus activates hippocampus and cortical structures during paradoxical sleep.

Leslie Renouard<sup>1</sup>, Patrice Fort<sup>1</sup>, Keiko Ogawa<sup>1</sup>, Nutabi Camargo<sup>1</sup>, Mouaadh Abdelkarim<sup>1</sup>, Damien Gervasoni<sup>1</sup>, Nadine Gay<sup>1</sup>, Celine Scoté<sup>1</sup>, Paul Antoine Libourel, Pascal Ravassard<sup>1</sup>, Denise Salvart<sup>1</sup>, Christelle Peyron<sup>1</sup>, Bruno Claustrat<sup>2</sup>, Lucienne Leger<sup>1</sup>, Paul Salin<sup>1</sup>, Gael Malleret<sup>1</sup> and Pierre-Hervé Luppi<sup>1</sup>†

<sup>1</sup>UMR 5292 CNRS/U1028 INSERM, Team "Physiopathologie des réseaux neuronaux responsables du cycle veille-sommeil", Université Claude Bernard Lyon I, Faculté de Médecine RTH Laennec, 7 Rue Guillaume Paradin, 69372 LYON Cedex 08, France, <sup>2</sup>Service de Radioanalyse, Centre de Médecine nucléaire, 59 Boulevard Pinel, 69677 Bron Cedex, France.

†To whom correspondence should be addressed E-mail: luppi@sommeil.univ-lyon1.fr

One sentence summary: cortical state during REM sleep

**Evidence in humans suggests that limbic cortical structures are more active during rapid eye movement sleep (also called paradoxical sleep, PS) than waking. However, the identity of activated cortical neurons and the pathways responsible of their activation remain unknown. We demonstrate here that, in contrast to waking, only a few interconnected cortical structures, including the dentate gyrus, the claustrum, the anterior cingulate, and retrosplenial cortices contain neurons activated during PS. We further show that this activation is controlled by the hypothalamic supramammillary nucleus. These findings indicate, at the cellular level, that in contrast to wakefulness, PS activates and induces plasticity only in a subset of limbic cortical structures suggesting a specific role in cognition.**

Rapid eye movement sleep ("REMS" called paradoxical sleep "PS" in animals) is believed to be accompanied by vivid dreaming and an active brain state similar to wakefulness (1, 2). The brain activity assessed by the electroencephalogram (EEG) and global brain metabolism is quite similar during wakefulness and REMS in humans, rats, and cats (3-5). Nevertheless, a significant increase in cerebral blood flow was found in specific brain areas including thalamic nuclei, limbic and paralimbic areas, and posterior cortices during REMS in humans compared to quiet waking (5). In contrast, the inferior and middle dorso-lateral prefrontal cortices were found deactivated (5). These observations suggest that cortical activation differs between wakefulness and REMS (3, 5). Also, several cortical areas activated during the execution of a learning task are significantly more active during REMS in subjects previously trained than in non-trained subjects (6). The PS amount increases in rats after learning or exposure to an enriched environment and post-learning PS deprivation impairs learning and memory consolidation (7). Obviously, and even if a high mental activity occurs

during REMS, information processing is substantially different from wakefulness, due to differential activity and interconnectivity. To further understand the function(s) of PS and its role in cognition, cortical activation needs evaluation at the cellular and molecular level, a task amenable in animal models only. Surprisingly, only very few studies addressed this question so far (1, 8, 9).

To assess the cortical activation during PS, we induced substantial differences in its amount in rats. Groups of rats were sacrificed after 72h of PS deprivation, 72h of PS deprivation followed by 6h of recovery sleep, or undisturbed (home cage controls) (n=12 in each). PS amounted to only  $2.7 \pm 2.6$  % in the last 6h in deprived,  $29.6 \pm 1.8$  % in recovery (PS hypersomnia), and  $15.5 \pm 2$  % in the control group ( $p < 0.0001$ ). There was also a significant difference in the time spent in waking in PS deprived ( $65.8 \pm 0.5$  %) compared to control ( $39.7 \pm 1.6$  %) and recovery ( $28.9 \pm 1.8$  %) conditions ( $p < 0.0001$ ). Non-REM (slow wave sleep, SWS) amounts were marginally modified ( $p < 0.05$ ; PS deprived:  $31.5 \pm 2.8$  %, recovery:  $41.6 \pm 1.7$  %, and control:  $44.8 \pm 1.8$  %).

Total RNA was isolated from the hippocampal formation and neocortex in these rats and mRNA levels processed by Affymetrix Gene Chips (Rat Genome 230 2.0)(10). Four groups of transcripts were identified (supplementary Tables 1-2). Transcripts found increased during PS deprivation and decreased during recovery were classified as negatively linked while those found decreased during PS deprivation and increased during recovery were considered as positively linked with PS (Table 1). This analysis revealed that the expression of only 137 transcripts was modified across the neocortex and hippocampal formation. Among the 31100 probes present on microarrays, 19196 were called “present” in the hippocampus ( $\approx 62\%$ ) but the expression of only 85 transcripts (48 identified genes and 37 expressed sequence tags (ESTs)) was modulated by PS manipulation ( $\approx 0.4$  %). In the neocortex, 19650 probes were called “present” ( $\approx 63\%$ ) but only 71 (47 genes and 24 ESTs) were modulated by PS manipulation ( $\approx 0.4\%$ ). Thus, only 19 of the 137 transcripts ( $\approx 14\%$ ) were found common between the two brain structures. To determine the functional role(s) of these genes the Gene Ontology database (11) was used in addition to an extensive literature search (Table 1). Again, the expression signature was different for the two structures (Table 1). These results indicate that the hippocampal formation and the neocortex react differently to PS deprivation and PS hypersomnia (recovery). Sleep deprivation techniques have been repeatedly reported to be stressful (12). However, changes in gene expression reported here are linked to PS rather than stress. First, the multiple platform method used minimizes immobilization stress (12). Accordingly, plasma corticosterone levels were not significantly different in PS deprived ( $123 \pm 21$  ng/ml) compared to control ( $89 \pm 23$  ng/ml) and recovery condition ( $71 \pm 23$  ng/ml). Also, only a few genes modified by our protocol were classified by gene ontology as involved in stress response (Table 1).

Activity-induced genes that play a well-known role in neuronal plasticity, such as *Fos*, *Homer1a*, *Arc*, *Bdnf*, *Egr-1* (*Zif-268*), protocadherin 8, and *Egr2* were among those with the largest increase in expression during PS recovery in the hippocampal formation (Table 1), a result in agreement with previous reports suggesting a leading role for both the hippocampus and PS in memory processes (6, 8, 12, 13). Increased *Zif-268* expression was previously

found after long-term potentiation (LTP) or exposure to a novel environment in the hippocampus during PS (8, 14). Also, prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (*Ptgs2* or *Cox-2*) recently involved in synaptic plasticity showed an increased expression during PS (15). Basal expression of *Cox-2* is regulated by synaptic activity and its expression is up-regulated by high frequency stimulation associated with the induction of LTP (15). These results confirm that hippocampal neurons are activated during PS and display synaptic plasticity.

Only 19 transcripts were modified both in the neocortex and the hippocampal formation. Of these, *Bdnf*, *Nptx2* and *Mas1* showed increased expression after PS recovery and *Gpdl*, *Sc5d*, *Sgk* and *Htra1* after PS deprivation in both structures. The other genes in common like *Fos*, *Arc*, *Homer1a*, *Slc5a3* and *Nr4a1* showed increased expression after PS deprivation in the neocortex but increased expression after PS hypersomnia in the hippocampal formation. The microarray results were globally confirmed by quantitative real-time PCR in hippocampal and/or neocortical RNA extracts of 6 animals per condition (n=18) (Figs 1A, Sup Fig. 1). Additionally, the hippocampal expression of *Arc*, *Bdnf*, *Zif-268*, and *Cox-2*, and neocortical expression of *Bdnf* were positively correlated with PS amounts (Figs 1A, Sup Fig. 2).

To identify hippocampal and neocortical neurons specifically activated during PS, immunohistochemistry of three proteins of which the genes showed a modification in expression was performed. A significant number of dentate gyrus granular cells showed an increase in COX-2, ARC and FOS protein expression after PS hypersomnia compared to PS deprivation and control conditions (Figs. 1-3, Sup Fig. 3). A significant increase in FOS-labeled (FOS+) neurons was also found in ventral CA1 field (Sup Table 3, Sup Fig 14 C, D). COX-2 protein level was also increased in CA3 pyramidal neurons during PS recovery compared to PS deprived and control animals (Fig. 1D-F; Sup Table 7). The number of FOS but not ARC labeled neurons significantly increased in the auditory and other sensory-motor cortices after PS deprivation compared to control condition, and returned to control levels after PS recovery (Fig. 2 E, F, Sup Figs. 6, 11-15, Table 3). These results are in agreement with qPCR data showing that *Fos* expression is negatively correlated with PS amounts in the neocortex (Sup Fig. 2). Nevertheless, our extensive mapping of FOS+ and ARC+ neurons revealed that a few cortical structures display significantly more labeled cells in PS hypersomniac (recovery) compared to PS deprived and control animals. In particular, the number of FOS+ and ARC+ neurons dramatically increased in PS recovery animals in the claustrum and the cortical amygdaloid nucleus (Fig. 1B, 2E, Sup Figs 7, 8, 11, 13, Sup Table 3, 5). The number of activated neurons was also strongly and significantly increased in PS recovery animals in the medial entorhinal cortex and the parasubiculum (Fig. 2B, Sup Figs 11-15, Sup Table 3). FOS labeled neurons were also strongly and significantly increased in PS recovery animals in the anterior cingulate and retrosplenial cortices and in the ventral subiculum (Fig. 2B, E; Sup Figs. 4, 5, 11, 15, Sup Table 3). Altogether, these results indicate that during PS, most cortices are deactivated except for a limited number of mainly limbic cortical structures. This finding contrasts with classical views that the activation of the cortex is overall in the same range during wakefulness and PS (1, 4). Therefore, to directly compare the cortical activation during these two states, we counted the number of FOS+ cells in the cortex after PS recovery with that obtained after 3h of wakefulness. In agreement with a

previous report (16), most neocortical and hippocampal structures contained a greater number of active neurons during wakefulness. Cell numbers were in most cases significantly above those after PS deprivation and recovery (Fig 2B-H, Sup Figs 4-6, 11-15, Sup Table 3). The dentate gyrus was the only structure containing significantly more labeled neurons after PS recovery than after wakefulness, in sharp contrast with CA1 and CA3 fields (Fig 2C,D, Sup Figs 13-14, Sup Table 3). In line with our results, dentate/CA3 theta and gamma synchrony was reported to be significantly higher during PS compared to wakefulness. In contrast, gamma power in CA1 and CA3-CA1 gamma coherence show significant decrease in PS (9). These and our data suggest enhanced activity and plasticity in a subset of dentate gyrus granular cells with limited CA3-CA1 coordination during PS.

The number of activated neurons was similar both after wakefulness and PS recovery in the medial entorhinal cortex, the parasubiculum, the claustrum, and the cortical amygdaloid nucleus (Fig. 2B, E, Sup Figs. 11-15, Sup Table 3), clearly indicating, for the first time, that cortical activation during PS is limited to a very few structures compared to wakefulness. In other words, cortical activation is higher during PS compared to wakefulness only in the dentate gyrus and similar in a very limited number of mostly limbic cortical structures. The discrepancy between our and previous studies in humans might be due to the fact that activation during REMS was compared with that occurring during quiet wakefulness in immobile supine subjects (3, 4) whereas our awake animals were freely moving.

To determine the neuroanatomical pathway(s) at the origin of the selective activation of a subset of cortical structures during PS, we injected retrograde tracers, fluorogold (FG) or the B subunit of cholera toxin (CTb), in three cortical areas (dorsal dentate gyrus, retrosplenial, and anterior cingulate cortices, n=4 for each) activated during PS recovery and subjected the animals to our protocol of PS deprivation and recovery. After injection of CTb in the dentate gyrus, a substantial number of double-labeled cells (CTb+/FOS+) were observed only in the supramammillary nucleus (Fig. 3E, Sup Table 9, Sup Figs 16-17). In contrast, after CTb injection in the retrosplenial cortex, a substantial number of double-labeled cells were observed only in the claustrum (Fig. 3E, Sup Table 11, Sup Figs 20-21). Finally, after FG injection in the anterior cingulate cortex, a large number of double-labeled cells were observed in the claustrum and a substantial number in the supramammillary nucleus (Fig. 3E, Sup Table 10, Sup Figs 18-19). In addition, a large number of double-labeled cells were observed in the retrosplenial cortex (Sup Fig. 18D) and to a lesser extent other cortical structures (Sup Table 10). Surprisingly, after all injections, no or only a few double or singly FOS+ cells were observed in the thalamic nuclei, the basal forebrain, the lateral hypothalamic area and the laterodorsal and pedunculopontine nuclei (Fig. 3E, Sup Figs 16-22, Sup Tables 9-12), structures previously thought to be responsible for cortical activation during PS (17). These findings suggest that the claustrum and the supramammillary nucleus play key roles in cortical activation during PS.

To delineate the role of the supramammillary nucleus in cortical activation, we first compared the number of FOS+ neurons in the supramammillary nucleus after PS recovery and wakefulness. We then determined which cortical regions activated during PS receive a projection from the supramammillary nucleus by combining anterograde tracing from the

supramammillary nucleus with FOS labeling during PS recovery. The lateral part of the supramammillary nucleus contained twice more FOS+ neurons after PS recovery than after wakefulness indicating that most neurons of this nucleus are specifically activated during PS (Sup Fig. 22, Sup Table 12). In agreement with a previous study (18), after CTb injection in the supramammillary nucleus, a large number of anterogradely labeled fibers was observed in the dentate gyrus and a substantial number in the claustrum, cortical amygdaloid nucleus, and anterior cingulate cortex in close vicinity of FOS+ neurons in PS recovery rats (Fig. 3H, Sup Fig. 23). It was previously shown that the projection from the supramammillary nucleus to the dentate gyrus is at least in part glutamatergic (19). Thus, we propose that excitatory, putatively glutamatergic, neurons localized in the supramammillary nucleus activate the dentate gyrus, the retrosplenial, and the anterior cingulate cortices during PS, either directly or indirectly via the claustrum.

To confirm the major role of the supramammillary nucleus, we lesioned it by means of bilateral iontophoretic injections of ibotenic acid and subjected the animals to PS deprivation and recovery. We compared the sleep-wake cycle, EEG power spectrum, and number of FOS+ and ARC+ neurons in cortical areas of rats with a lesion of the supramammillary nucleus to sham operated animals (n=4 for each). The quantities of wakefulness, SWS and PS were not significantly different (Sup Figs. 25). Importantly, power spectrum analysis revealed that theta activity occurring during PS was significantly decreased after the lesion. In addition, the number of FOS+ neurons was significantly and strongly decreased in the dorsal and ventral dentate gyrus, ventral CA1, the claustrum, the ectorhinal, lateral entorhinal, cortical amygdaloid nucleus, and anterior cingulate cortex but also in the auditory, somatosensory, and temporal association cortices of lesioned animals (Fig 3F, G, Sup Table 4, Sup Figs 3-8, 11-15). The number of ARC+ neurons localized in the claustrum, cortical amygdaloid nucleus, and dorsal and ventral dentate gyrus was greatly reduced in lesioned animals (Fig 3F, G, J-M, Sup Table 6, Sup Figs 8, 9). The COX2 protein level was also significantly lower in lesioned animals in the dentate gyrus and CA3 (Sup Table 8, Sup Fig. 10). These observations confirm that excitatory, putatively glutamatergic, neurons localized in the supramammillary activate subpopulations of cortical neurons directly and indirectly via the claustrum. Since *Fos*, *Arc* and other genes involved in synaptic plasticity like *Bdnf* show increased expression in these structures during PS recovery, it seems highly likely that PS induces activation and synaptic plasticity in the populations of cortical neurons identified here. Such activation could be at the origin of cognitive activity known to occur during PS as dreaming. The cortical areas containing activated neurons after PS recovery are involved in emotional and memory processes (20). It is therefore tempting to propose that excitatory stimulation of these structures during PS by the supramammillary projections reactivates memory traces. In line with this hypothesis, impairment of spatial memory and passive avoidance learning was observed after lesions or inactivation of the supramammillary nucleus (21, 22). In conclusion, our findings lay the groundwork for the identification of PS functions, in particular with regards to learning, memory, and dreaming.





## References and notes

1. M. Steriade, I. Timofeev, F. Grenier, *J Neurophysiol* **85**, 1969 (2001).
2. K. J. Maloney, E. G. Cape, J. Gotman, B. E. Jones, *Neuroscience* **76**, 541 (1997).
3. Y. Nir, G. Tononi, *Trends Cogn Sci* **14**, 88 (2010).
4. A. Destexhe, D. Contreras, M. Steriade, *J Neurosci* **19**, 4595 (1999).
5. P. Maquet *et al.*, *Nature* **383**, 163 (1996).
6. P. Maquet *et al.*, *Nat Neurosci* **3**, 831 (2000).
7. C. Smith, *Behav Brain Res* **78**, 49 (1996).
8. S. Ribeiro *et al.*, *J Neurosci* **22**, 10914 (2002).
9. S. M. Montgomery, A. Sirota, G. Buzsaki, *J Neurosci* **28**, 6731 (2008).
10. *Materials and methods are available as supporting material on Science online.*
11. M. Ashburner, S. Lewis, *Novartis Found Symp* **247**, 66 (2002).
12. C. M. McDermott *et al.*, *J Neurosci* **23**, 9687 (2003).
13. P. Ravassard *et al.*, *Sleep* **32**, 227 (2009).
14. S. Ribeiro, V. Goyal, C. V. Mello, C. Pavlides, *Learn Mem* **6**, 500 (1999).
15. C. Chen, N. G. Bazan, *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **77**, 65 (2005).
16. C. Cirelli, M. Pompeiano, G. Tononi, *Science* **274**, 1211 (1996).
17. P. H. Luppi *et al.*, *Sleep Med Rev*, (2010).
18. R. P. Vertes, *J Comp Neurol* **326**, 595 (1992).
19. J. Kiss, A. Csaki, H. Bokor, M. Shanabrough, C. Leranath, *Neuroscience* **97**, 657 (2000).
20. R. J. Maddock, *Trends Neurosci* **22**, 310 (1999).
21. S. Shahidi, F. Motamedi, S. A. Bakeshloo, B. K. Taleghani, *Behav Brain Res* **152**, 81 (2004).
22. L. Aranda *et al.*, *Physiol Behav* **94**, 322 (2008).

Acknowledgments: This work was supported by CNRS and Université Claude Bernard Lyon

## Supporting Online Material

**Supplementary Figures 1-27 and Tables S1-S12** accompanies the paper.

## Figure legends.

**Figure 1: Expression of plasticity-related genes is increased in a subset of dentate gyrus neurons during PS recovery.** (A, C, E) *Arc* and *Cox2* mRNA expression levels increased in the hippocampal formation after PS hypersomnia. Further, *Arc* and *Cox2* mRNA expression levels were positively correlated in this structure with PS amounts. In contrast, *Arc* mRNA expression level increased after PS deprivation and was negatively correlated with PS amounts in the neocortex (Spearman test, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ). (B) A significant number of ARC-immunoreactive neurons was seen at hippocampal and neocortical level only after PS hypersomnia. These cells were seen in only three cortical structures, namely the dorsal (DGd) and ventral (DGv) dentate gyrus, the claustrum (CLA) and the cortical amygdaloid nucleus (COA). (B) Quantification of COX2 immunoreactivity showed that COX2 protein levels increased both in the dentate gyrus and CA3 after PS hypersomnia compared to the two other conditions (D, F: bars = 500 $\mu$ m). Significance: Kruskal Wallis followed by Mann Whitney. PSD vs PSC or PSC vs PSR \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ . PSD vs PSR ##  $p < 0.01$ , #  $p < 0.05$ .

**Fig. 2. A restricted number of cortical structures are active during PS compared to wakefulness.** FOS labeled neurons were counted in the hippocampal formation and the neocortex of four animals per group (PSC: PS control, PSD: PS deprivation, PSR: PS recovery and W: wakefulness). (A-C, F) The ventral (DGv) and dorsal dentate gyrus (DGd) are the only structures where the number of FOS immunoreactive (FOS+) cells is significantly increased in PSR animals (A, C) compared to the other groups including wakefulness (B, C) indicating that the dentate gyrus (DG) is specifically activated during PS. The histograms in C and F show the number of FOS-labeled cells in several hippocampal (CA1d and CA1v, dorsal and ventral CA1) and cortical structures. The medial entorhinal cortex (ENTm), the claustrum (CLA) and the cortical amygdaloid (COA) nucleus contained significantly more FOS+ cells both in PS recovery and W compared to the other groups indicating a comparable activation of these structures during PS and W. As reflected by the number of FOS-labeled cells, the retrosplenial (RSP) and the anterior cingulate cortex (ACA) were strongly activated during W and to a lesser extent during PS deprivation and recovery (F-I). Interestingly, the dorsal CA1, known to contain place cells contained a large number of Fos-labeled cells only after W (B, C). The somatosensory (SS) barrel (E), auditory (AUD) (F) and visual (VIS) cortices (G-I) contained a very large number of Fos-labeled neurons in wakefulness and a substantial number in PS deprivation indicating that these structures are highly activated during wakefulness but also significantly during PS deprivation. The low number of Fos-labeled cells in these structures after PS recovery (D, F-I) is quite surprising and indicates that they are deactivated during PS. A-E, bars = 200 $\mu$ m, cc: corpus callosum. Significance: Kruskal Wallis followed by Mann Whitney. PSD vs PSC or PSC vs PSR :or PSC vs W \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ . PSD vs PSR or PSD vs W ##  $p < 0.01$ , #  $p < 0.05$ . PSR vs W ++  $p < 0.01$ , +  $p < 0.05$ .

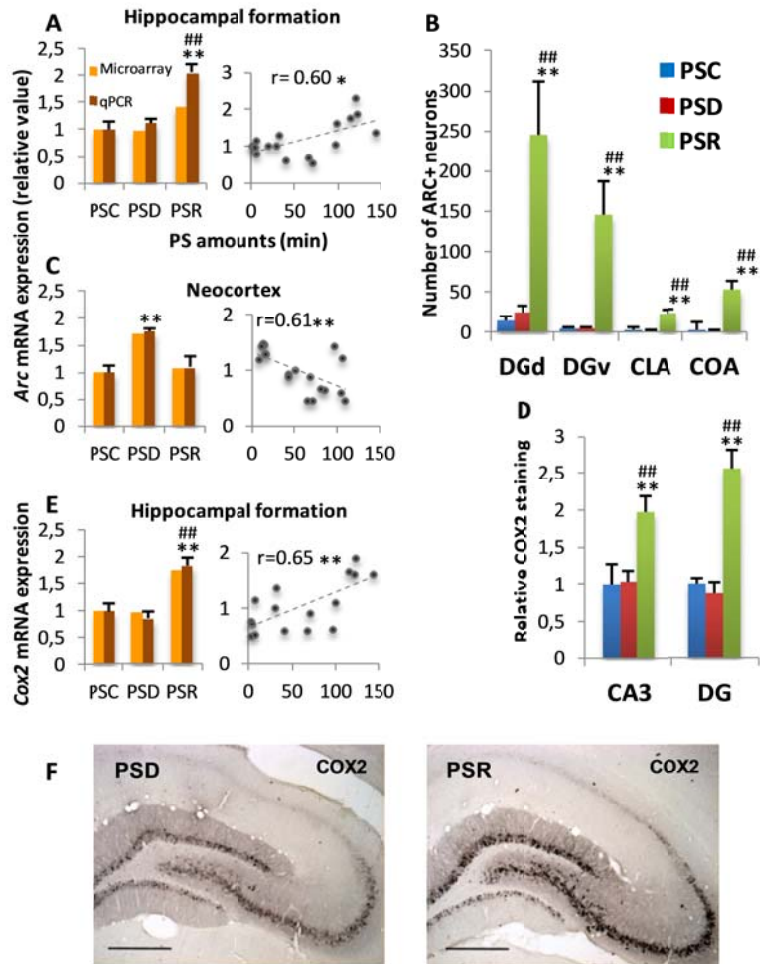
**Fig. 3. Cortical activation during PS is due to an excitatory projection from the supramammillary nucleus.** (A-C) Cholera toxin B (CTb) or Fluorogold (FG) immunostained sections showing representative injection sites in the dentate gyrus (GD, CTb, A), the anterior cingulate (ACA, FG, B) and retrosplenial cortices (RSP, CTb, C) in PS recovery (PSR) rats (Bars = 100 $\mu$ m). (D) Photomicrograph showing two representative double-labeled cells indicated by red arrow (with a black FOS labeled nucleus and a brown CTb stained cytoplasm) in the claustrum (CLA) of a PS recovery rat after a CTb injection in the retrosplenial cortex (RSP, Bar= 200 $\mu$ m, inset: Bar=25 $\mu$ m). (E) After all injections, a

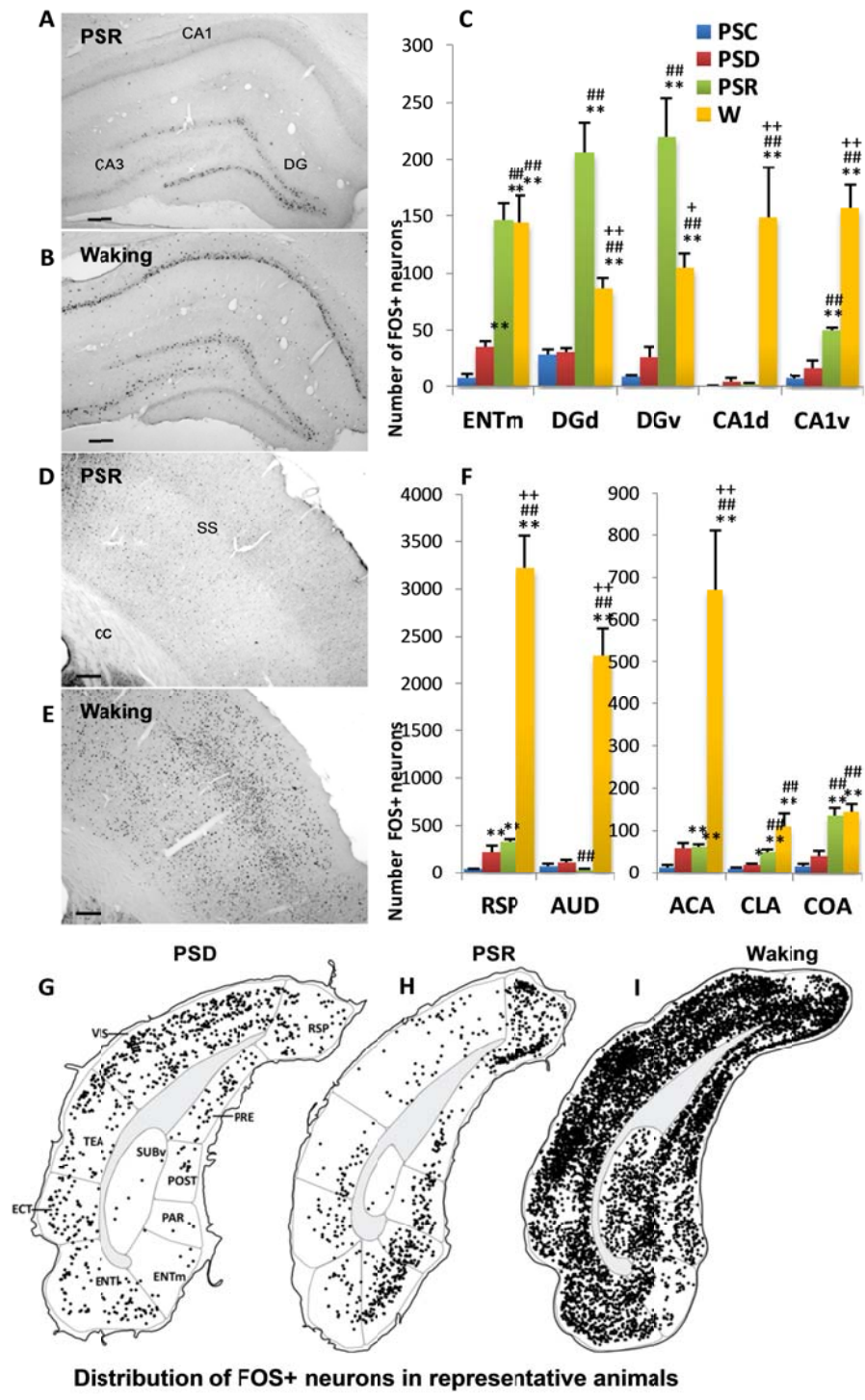
substantial number of double-labeled cells were seen only in the claustrum and/or the supramammillary nucleus (SUM). None or only a few double-labeled cells were seen in the thalamic nuclei (TH), the lateral hypothalamic area (LHA) and the basal forebrain (BF). These results indicate that the activation of the cortex during PS recovery is due to projections from the supramammillary nucleus and the claustrum. (H) Accordingly, a large number of anterogradely labeled fibers (in brown) were seen in close vicinity of FOS-labeled neurons (in black) in the dentate gyrus of a PS recovery rat after a CTb injection in the supramammillary nucleus (bar = 50 $\mu$ m, inset 500 $\mu$ m). (F-G) Further, lesion of the supramammillary nucleus by iontophoretic injection of ibotenic acid (I) induced a nearly complete disappearance of ARC and a strong decrease in the number of FOS-immunostained neurons in cortical structures. (J-M) Photomicrographs illustrating the lack of ARC immunostained neurons in the claustrum (L) and the dentate gyrus (M) after lesion of the supramammillary nucleus compared to sham animals (J, K)(bars=50 $\mu$ m). ENTl, entorhinal area; ECT, ectorhinal area; AUD, auditory areas. Significance: Kruskal Wallis followed by Mann Whitney. PSR-Sham vs PSR-Lesion \*\* p <0.01, \* p <0.05.

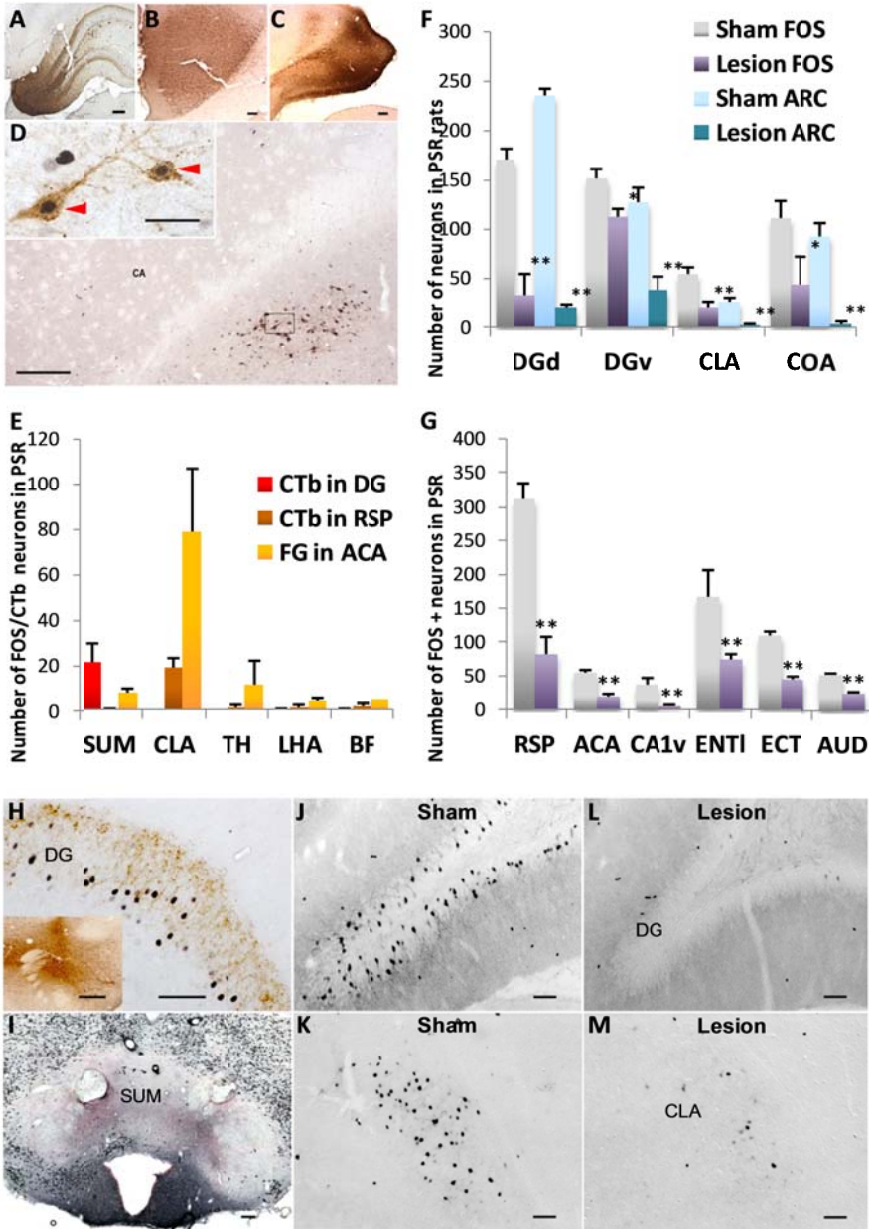
	Hippocampal Formation		Neocortex	
	PS+	PS-	PS+	PS-
<b>Nervous system development; apoptosis</b>	<b>5</b> <i>Sncg, Bdnf, Slc5a3, Mas1, S100a4</i>	<b>4</b> <i>Faim2, Htra1, Sgk, Gjb6</i>	<b>5</b> <i>Bdnf, Ntrk2, Mas1, Scg2, Syne1 (CPG2)</i>	<b>6</b> <i>Slc5a3, Htra1, Sgk, Egfr1, Itga1, Cryab</i>
<b>Signal transduction</b>	<b>4</b> <i>Pdpk1, Mt1a, Rgs2, Gnb1</i>	<b>0</b>	<b>1</b> <i>Avp</i>	<b>6</b> <i>Col3a1, Ddit4, Dusp1, Cort, Dusp6, Alb</i>
<b>Transcription, regulation</b>	<b>8</b> <i>Fos, Egr2, Klf10 (Tieg), Nr4a3, Nr4a1, Egr1 (zif-268), Rbm3, Khsrp</i>	<b>0</b>	<b>1</b> <i>Rbm3</i>	<b>5</b> <i>Fos, Nr4a1, Etv5_predicted, Dbp, Klf9</i>
<b>Synaptic transmission</b>	<b>5</b> <i>Homer1, Ptgs2 (Cox2), Nptx2, Arc, Pcdh8</i>	<b>0</b>	<b>1</b> <i>Nptx2</i>	<b>4</b> <i>Homer1, Arc, Alb, Vgf</i>
<b>Ion transport</b>	<b>0</b>	<b>2</b> <i>Fxyd6, Camk2d</i>	<b>0</b>	<b>1</b> <i>Camk2n1</i>
<b>Inflammatory response</b>	<b>1</b> <i>C3</i>	<b>0</b>	<b>1</b> <i>C3</i>	<b>0</b>
<b>Metabolism</b>	<b>0</b>	<b>7</b> <i>Bcat1, Itih3, Lrg1, Ldb2_predicted, Prkaa2 Sc5d, Gpd1</i>	<b>1</b> <i>Apoc1</i>	<b>5</b> <i>Bcat1, Sc5d, Gpd1, Sult1a1, Alas2</i>
<b>Response to stress</b>	<b>0</b>	<b>2</b> <i>Sgk, Prkaa2</i>	<b>1</b> <i>Avp</i>	<b>6</b> <i>Sult1a1, Cort, Oxt, Egfr, Sgk, Cryab</i>

**Table 1 : Functional classification of genes whose expression level is associated with PS. Rows: Functional Roles from the GO database and from our literature search. Columns: positive (SP +) or negative (SP-) gene expression profile associated with PS depending on brain structure considered.** Abbreviations: *Alas 2*, aminolevulinic acid synthase 2 ; *Alb*, albumin ; *Apoc1*, apolipoprotein C-I ; *Arc*, Activity-regulated cytoskeletal-associated protein ; *Avp*, arginine vasopressin ; *Bcat1*, branched chain aminotransferase 1, cytosolic ; *Bdnf*, Brain-derived neurotrophic factor ; *C3*, complement component 3 ; *Camk2d*, calcium/calmodulin-dependent protein kinase II ; *Camk2n1*, calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1 ; *Col3a1*, procollagen, type III, alpha 1 ; *Cort*, cortistatin ; *CPG2*, CPG2 protein ; *Cryab*, crystallin, alpha B ; *Dbp*, D site albumin promoter binding protein ; *Ddit4*, DNA-damage-inducible transcript 4 ; *Dusp1/6*, dual specificity phosphatase 1/6 ; *Egfr*, epidermal growth factor receptor ; *Egr 1(ou Zif-268 )/2* , Early growth response 1/2 ; *Faim2*, fas apoptotic inhibitory molecule 2 ; *Fos*, FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog ; *Fxyd6*, FXD domain-containing ion transport regulator 6 ; *Gjb6 (cx-30)* gap junction membrane channel protein beta 6 ; *Gnb1*, Guanine nucleotide binding protein alpha q polypeptide/ beta 1 ; *Gpd1*, Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 ; *Homer1*, homer homolog 1 (Drosophila) ; *Htra1*, HtrA serine peptidase 1 ; *Itga1*, integrin alpha 1 ; *Itih3*, inter-alpha trypsin inhibitor, heavy chain 3 ; *Khsrp*, KH-type splicing regulatory protein ; *Klf9/10 (Tieg)*, Kruppel-like factor 9/10 ; *Ldb2\_predicted*, LIM domain binding 2 (predicted) ; *Lrg1*, leucine-rich alpha-2-glycoprotein1 ; *Mas1*, MAS1 oncogene ; *Mt1a*, Methallothionein ; *Nptx2*, neuronal pentraxin II ; *Nr4a1/3*, Nuclear receptor subfamily 4 group A member 1/3 ; *Ntrk2*, neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2 ; *Oxt*, oxytocin ; *Pcdh8*, Protocadherin 8 ; *Pdpk1*, 3-phosphoinositide dependent protein kinase-1 ; *Pex11b*, peroxisomal biogenesis factor 11b ; *Prkaa2*, Protein kinase AMP-activated alpha 2 catalytic subunit. ; *Ptgs2 (Cox2)*, Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 ; *Rbm3*, RNA binding motif protein 3 ; *Rgs2*, regulator of G-protein signaling 2 ; *Rsn*, restin (Reed-Steinberg cell-expressed intermediate filament-associated protein) ; *S100a4*, S100 calcium-binding protein A4 ;

*Sc5d*, sterol-C5-desaturase (fungal ERG3, delta-5-desaturase) homolog (*S. cerevisiae*) ; *Scg2*, secretogranin 2 ; *Sgk*, Serum/glucocorticoid-regulated kinase 1 ; *Slc5a3*, Solute carrier family 5 member 3 ; *Sncg*, synuclein, gamma ; *Sult1a1*, Sulfotransferase family 1A phenol-preferring member 1 ; *Vgf*, VGF nerve growth factor inducible.







#  
 #  
 #  
 #  
 #  
 #



#  
#  
#  
#  
#  
#  
#  
#  
#  
#  
#

#