



HAL
open science

Contribution de noyaux hypothalamiques et de leur interconnexion à la régulation du sommeil

Christophe Varin

► **To cite this version:**

Christophe Varin. Contribution de noyaux hypothalamiques et de leur interconnexion à la régulation du sommeil. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Lyon, 2016. Français. NNT : 2016LYSE1049 . tel-01382809

HAL Id: tel-01382809

<https://theses.hal.science/tel-01382809>

Submitted on 17 Oct 2016

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.

N° d'ordre NTT : 2016 LYSE1049

Année 2016

THÈSE DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

Délivrée par
L'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON 1

ÉCOLE DOCTORALE NEUROSCIENCES ET COGNITION

DIPLÔME DE DOCTORAT
(arrêté du 7 août 2006)

M. Christophe VARIN

**Contribution de noyaux hypothalamiques
et de leur interconnexion à la régulation du sommeil**

Thèse réalisée sous la direction de Patrice FORT

Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon
INSERM U1028, CNRS UMR 5292
Équipe Physiopathologie des réseaux neuronaux du cycle veille-sommeil

soutenue publiquement le 15 avril 2016

devant le jury composé de :

Pr Anne DIDIER	Présidente
Dr Véronique FABRE	Rapporteuse
Pr Stéphane CHARPIER	Rapporteur
Dr Thierry GALLOPIN	Examineur
Dr Patrice FORT	Directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

M. François-Noël GILLY

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur Hamda BEN HADID

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

M. le Professeur Philippe LALLE

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur Germain GILLET

Directeur Général des Services

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme Caroline FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur Georges TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. Jean-Claude PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. P. FOURNIER

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE

Résumé général

Chez les mammifères, l'alternance des états de vigilance nécessite la mise en jeu de mécanismes spécifiques qui facilitent les transitions entre l'éveil, le sommeil lent (SL) et le sommeil paradoxal (SP). L'objectif de cette thèse s'inscrit dans l'optique de disséquer, chez la souris, les processus neuronaux contrôlant l'alternance physiologique entre ces trois états de vigilance. Au cours de cette thèse, nous avons tout d'abord démontré, par des approches complémentaires *ex vivo* et *in vivo*, que le glucose peut favoriser l'endormissement par son action excitatrice directe sur les neurones promoteurs du SL localisés dans l'aire préoptique ventrolatérale (VLPO). Nous avons ensuite, par deux approches méthodologiques différentes et complémentaires, contribué à préciser le rôle physiologique des neurones exprimant l'hormone de mélano-concentration (MCH) dans la régulation du cycle veille-sommeil, démontrant ainsi qu'en plus de faciliter le déclenchement et le maintien du SP lorsqu'ils sont activés, ils contrôlent certains aspects du SL en favorisant, au cours SL, un SL plus profond ainsi que la terminaison des épisodes de SL. Forts de ces nouveaux résultats supportant une contribution des neurones MCH à la régulation du SL, nous avons déterminé une voie potentielle pouvant sous-tendre cette fonction physiologique à travers leurs projections efférentes sur le VLPO. Nos résultats préliminaires indiquent que la stimulation optogénétique des axones des neurones MCH dans le VLPO favorise le déclenchement d'un état de transition entre SL et SP sans pour autant conduire au SP.

Mots-clés : sommeil lent, sommeil paradoxal, VLPO, MCH, pharmacogénétique, optogénétique.

Abstract

In mammals, alternating between vigilance states requires some specific processes that facilitate transitions between wake, Slow-Wave Sleep (SWS), and Paradoxical Sleep (PS). The objective of this thesis was to decipher, in mice, the neuronal mechanisms that control the alternation between these three vigilance states. During this thesis, we first demonstrated using complementary *ex vivo* and *in vivo* approaches that glucose can facilitate sleep induction by directly exciting sleep-promoting neurons located within the ventrolateral preoptic nucleus (VLPO). Then, by developing two different and complementary approaches, we contributed to clarify the physiological role of melanin-concentrating hormone (MCH)-expressing neurons in sleep-wake regulation. Indeed, in addition to their PS-promoting effect when activated, we found that MCH neurons also contribute to the regulation of some aspects of SWS regulation by favouring the appearance of a deeper SWS and facilitating SWS episodes termination. These new results supporting a role of MCH neurons to SWS regulation led us to investigate a putative pathway underlying such an effect through efferent projections from MCH neurons to the VLPO. Preliminary results suggest that the optogenetic stimulation of axons from MCH neurons within the VLPO could facilitate the appearance of a transition state between SWS and PS without triggering PS onset.

Keywords: Slow-Wave Sleep, Paradoxical Sleep, VLPO, MCH, glucose, pharmacogenetics, optogenetics.

Table des matières

Introduction générale	1
Rappels Bibliographiques	8
Chapitre 1 : Phénoménologie du sommeil	
1.1. Caractérisation des états de vigilance	10
1.1.1. L'éveil	10
1.1.2. Le sommeil lent	10
1.1.3. Le sommeil paradoxal	11
1.2. Cycle veille-sommeil chez les mammifères	12
1.2.1. Comparaison entre les mammifères	12
1.2.2. Ontogenèse du sommeil	13
Chapitre 2 : Réseaux neuronaux contrôlant les états de vigilance	
2.1. Systèmes sous-tendant le maintien de l'éveil	16
2.1.1. Neurones cholinergiques du tegmentum ponto-mésencéphalique	16
2.1.2. Neurones noradrénergiques du locus coeruleus	17
2.1.3. Neurones sérotoninergiques du noyau du raphé dorsal	17
2.1.4. Système histaminergique du noyau tubéromammillaire	18
2.1.5. Télencéphale basal	19
2.1.6. Neurones sécrétant l'orexine de l'hypothalamus tubéral	20
2.2. Réseaux neuronaux contrôlant le sommeil lent	22
2.2.1. Rôle du thalamus dans la genèse des ondes lentes	22
2.2.2. La région préoptique	22
2.2.3. Neuromodulation des neurones du VLPO	25
2.3. Réseaux neuronaux contrôlant le sommeil paradoxal	27
2.3.1. Rôle des neurones du noyau sublatérodorsal	27
2.3.2. Hypothèse cholinergique du sommeil paradoxal	27
2.3.3. Vers un contrôle GABAergique du sommeil paradoxal	28

2.3.4. Une réconciliation ?	29
2.3.5. Contribution hypothalamique à la régulation du sommeil paradoxal	29

Chapitre 3 :

Mécanismes à l'origine de l'alternance entre états de vigilance

3.1. Moteur circadien	34
3.1.1. Noyau suprachiasmatique, principal oscillateur circadien	34
3.1.2. Rôle de l'hypothalamus dorsomédial	35
3.1.3. Existence d'autres « oscillateurs esclaves »	36
3.2. Moteur homéostatique du sommeil	36
3.2.1. L'adénosine, principale substance hypnogène	36
3.2.2. Régulation homéostatique des ondes lentes	38
3.2.3. VLPO et régulation homéostatique du sommeil lent	39
3.3. Autres facteurs impactant la transition entre états de vigilance	39
3.3.1. Impact d'un stress comportemental	39
3.3.2. Modulation du sommeil par les systèmes limbiques et corticaux	40
3.3.3. Couplage entre métabolisme et états de vigilance	40

Objectifs et approche expérimentale 44

Résultats 53

Chapitre 1 :

Activation par le glucose des neurones actifs pendant le sommeil lent de l'aire préoptique ventrolatérale — mise en évidence d'un moteur métabolique du sommeil

1.1. Présentation du premier article	55
1.2. Article 1 : « Glucose Induces Slow-wave Sleep by Exciting the Sleep-Promoting Neurons in the Ventrolateral Preoptic Nucleus: A New Link between Sleep and Metabolism »	57
1.3. Résultats complémentaires	69
1.3.1. Comparaison des caractéristiques électrophysiologiques des courants K_{ATP} dans les diverses populations neuronales du VLPO	69
1.3.2. Spécificité de l'effet modulateur du glucose sur l'ouverture des canaux K_{ATP} dans les neurones actifs pendant le SL	70
1.4. Conclusions du premier article	71
1.4.1. L'apport en glucose dans le VLPO facilite le SL	71
1.4.2. Le glucose excite spécifiquement les neurones du VLPO actifs pendant le SL.	71
1.4.3. Les neurones du VLPO actifs pendant le sommeil sont des senseurs glucidiques	72
1.4.4. Les canaux K_{ATP} lient l'excitabilité des neurones du VLPO au statut énergétique de la cellule	73
1.4.5. L'état métabolique participe à la régulation des états de vigilance	74

Chapitre 2 :

Rôle des neurones exprimant l'hormone de mélan-concentration dans le contrôle du cycle veille-sommeil — étude d'un modèle murin de lésion spécifique de ces neurones

2.1.	Présentation du deuxième article	76
2.2.	Article 2 : « Sleep architecture and homeostasis in mice with partial ablation of melanin-concentrating hormone neurons »	78
2.3.	Résultats complémentaires	90
2.3.1.	Compléments sur l'analyse de survie des durées des états de vigilance	90
2.3.2.	Effet de la lésion partielle des neurones MCH sur l'homéostasie du SP	91
2.4.	Conclusions du deuxième article	92
2.4.1.	Affiner les descripteurs pour une caractérisation plus détaillée du sommeil	92
2.4.2.	Les neurones MCH contribuent à la régulation du SL	93
2.4.3.	Le SP n'est pas affecté par la lésion des neurones MCH	94

Chapitre 3 :

Rôle des neurones exprimant l'hormone de mélan-concentration dans le contrôle du cycle veille-sommeil — modulation pharmacogénétique de leur activité

3.1.	Présentation du troisième article	96
3.2.	Article 3 : « Chempgenetic modulation of melanin-concentrating hormone neurons highlights their contribution to both slow-wave sleep and paradoxical sleep »	98
3.3.	Conclusions du troisième article	121
3.3.1.	Considérations méthodologiques	121
3.3.2.	L'activation des neurones MCH facilite le SP	121
3.3.3.	Les neurones MCH participent à la consolidation du SL et à la terminaison des épisodes de SL	122

Chapitre 4 :

Détermination par optogénétique de l'influence sur le sommeil des projections des neurones sécrétant l'hormone de mélan-concentration dans le VLPO

4.1.	Introduction	124
4.2.	Méthodes	125
4.2.1.	Animaux	125
4.2.2.	Préparation chirurgicale	125
4.2.3.	Enregistrements polysomnographiques	126
4.2.4.	Stimulations optogénétiques	126
4.2.5.	Analyse des données polysomnographiques	126
4.2.6.	Perfusion des animaux	127
4.2.7.	Histologie	127
4.2.8.	Statistiques	127

4.3.	Résultats	128
4.3.1.	Validation histologique du modèle	128
4.3.2.	La stimulation continue des terminaisons MCHergiques dans le VLPO favorise l'apparition d'un état intermédiaire entre SL et SP	129
4.3.3.	L'effet promoteur du TR est spécifique du SL	134
4.4.	Discussion	136
4.4.1.	Considérations méthodologiques	136
4.4.2.	La stimulation des axones MCHergiques dans le VLPO n'impacte aucunement le SP	136
4.4.3.	Promotion d'un état intermédiaire entre SL et SP	137

Discussion générale et Perspectives 140

Rappel des résultats principaux

Contrôle par le métabolisme des états de vigilance

1.1.	Effet des nutriments sur le sommeil	142
1.2.	Effet sur le sommeil d'hormones liées à la prise alimentaire	143
1.3.	Interconnexion entre les réseaux neuronaux contrôlant les états de vigilance et le métabolisme	144

Contribution des neurones MCH la régulation physiologique du sommeil

2.1.	Rôle dans la régulation du SL ou du SP	145
2.2.	Contribution des neurones MCH au contrôle su SP en conditions dégradées	147
2.3.	Mécanismes d'action des neurones MCH pendant les états de vigilance	148

Effet des neurones MCH sur le VLPO et régulation du sommeil

3.1.	Promotion d'un état de transition entre SL et SP	150
3.2.	Diversité cellulaire du VLPO	150
3.3.	Neuromodulation des neurones du VLPO par les neurones MCH et le peptide MCH	151

Mise à jour du modèle du réseau neuronal contrôlant l'alternance entre états de vigilance

Perspectives

Liste des publications 158

Références 163

Table des figures

Figure 1.1.1. Caractérisation polysomnographique des états de vigilance chez la souris.	11
Table 1.1.1. Durées quotidiennes totales de sommeil chez quelques espèces mammifères.	12
Figure 1.1.2. Les caractéristiques du sommeil ne sont pas homogènes chez tous les mammifères.	13
Figure 1.1.3. Évolution des états de vigilance dans les premiers stades postnataux.	14
Figure 1.2.1. Représentation schématique des populations neuronales intervenant dans le contrôle de l'éveil.	21
Figure 1.2.2. Le VLPO contient des neurones actifs pendant le SL.	23
Figure 1.2.3. Identification et caractérisation <i>ex vivo</i> des neurones du VLPO actifs pendant le SL.	24
Figure 1.2.4. Schéma illustrant le contrôle du déclenchement du SL par le VLPO.	25
Figure 1.2.5. Les neurones MCH pourraient contribuer à la régulation du SP.	30
Figure 1.2.6. Démonstration <i>in vivo</i> d'une contribution des neurones MCH à la régulation physiologique des états de vigilance.	31
Figure 1.2.7. Schéma illustrant les populations neuronales impliquée dans le contrôle du SP.	32
Figure 1.3.1. Intégration circadienne de certains rythmes biologiques.	35
Figure 1.3.2. Modifications de la concentration extracellulaire en adénosine mesurées par microdialyse pendant une privation de sommeil et la période de récupération chez le chat.	37
Figure 1.3.3. VLPO et homéostasie du sommeil.	38
Figure 1.3.4. Rôle des neurones MCH et orexine dans le couplage entre métabolisme et sommeil.	41
Figure 2.1.1. Comparaison des propriétés des canaux K_{ATP} dans deux sous-populations de neurones du VLPO.	69
Figure 2.1.2. La concentration extracellulaire en glucose contrôle l'état d'ouverture des canaux K_{ATP} spécifiquement dans les neurones actifs pendant le SL.	70
Figure 2.1.3. Modèle de la voie de signalisation sous-jacente de l'effet excitateur du glucose sur les neurones actifs pendant le SL du VLPO.	73
Figure 2.2.1. Effet de la lésion partielle des neurones MCH sur les propriétés dynamiques des états de vigilance.	90
Figure 2.2.2. Homéostasie du sommeil après 24 heures de privation spécifique de SP.	91
Figure 2.3.1. Principe de la technique de pharmacogénétique ou DREADD (<i>Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs</i>).	97
Figure 2.4.1. Validation histologique du modèle d'étude.	128
Table 2.4.1. Comparaison des paramètres liés aux états de vigilance entre souris eYFP et Chr2 évalués pendant la période diurne.	129

Figure 2.4.2. L'activation optogénétique des terminaisons des neurones MCH dans le VLPO favorise un état intermédiaire entre SL et SP.	130
Figure 2.4.3. Architecture du cycle veille-sommeil au cours de la stimulation optogénétique des fibres MCHergiques dans le VLPO.	131
Figure 2.4.4. Effets sur le sommeil de la stimulation aigüe aléatoire des fibres MCHergiques dans le VLPO.	133
Figure 2.4.5. L'alternance entre états de vigilance n'est pas affectée par la stimulation aigüe chez les souris contrôle eYFP.	133
Figure 2.4.6. Effet de la stimulation optogénétique en fonction des états de sommeil.	135
Figure 3.1. Schéma proposant un modèle des interactions neuronales impliquées dans le contrôle des états de vigilance et de leur alternance.	153

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Et Nyx enfanta l'odieux Mâros et la Kèr noire et Thanatos. Elle enfanta aussi Hypnos et la foule des Songes. Et la divine et sombre Nyx ne s'était unie pour cela à aucun Dieu. [...] C'est un gouffre énorme [...] qu'habitent les enfants de l'obscur Nyx, Hypnos et Thanatos, Dieux terribles. Et jamais le brillant Hèlios ne les éclaire de ses rayons, soit qu'il gravisse l'Ouranos, soit qu'il en descende. L'un, sur la terre et sur le large dos de la mer, tranquille, se promène, doux aux hommes ; mais le cœur de l'autre est d'airain, et son âme est d'airain dans sa poitrine, et il ne lâche point le premier qu'il a saisi parmi les hommes ; et il est odieux aux Immortels eux-mêmes.

La Théogonie,
Hésiode (VIII^e siècle av. J.-C.),
Traduction de Leconte de Lisle, 1869

D'après le mythe, sommeil et mort seraient ainsi les deux visages d'une seule et même condition de l'être, s'exprimant à travers le repos paisible et le repos éternel. Néanmoins, au delà au dogme des récits mythologiques, certains ont, dès l'Antiquité, cherché à déterminer la cause « matérielle » du sommeil.

Il faut expliquer maintenant la cause qui détermine le sommeil, et la nature de cette affection. [...] Mais pour tout ce qui a naturellement un mouvement, sans d'ailleurs pouvoir conserver ce mouvement toujours et continuellement, le repos est nécessairement agréable et utile ; et c'est avec toute vérité que l'on applique cette métaphore au sommeil qu'on regarde comme un repos et un délassement. Par conséquent, le sommeil est donné aux animaux en vue de leur conservation. Mais la fin en vue de laquelle le sommeil a lieu, c'est la veille ; car, sentir et penser est la fin véritable de tous les êtres qui ont l'une ou l'autre de ces facultés, parce qu'elles sont leur plus grand bien, et que la fin de chaque être est toujours son bien le plus grand.

Psychologie, Opuscules, Traité du Sommeil et de la Veille,
Aristote (384–322 av. J.-C.),
Traduction de Jules Barthélemy-Saint-Hilaire, 1847

Dans l'hylémorphisme aristotélicien, toute chose naturelle est composée de manière indissociable d'une matière et d'une forme. En particulier, l'âme est forme de la matière qu'est le corps et ne peut exister de manière séparée du corps qu'elle informe. Ainsi, Aristote propose que sommeil et éveil seraient la manifestation du fonctionnement d'un organe dédié à la perception sensorielle et que le sommeil servirait une fonction de récupération dans le but d'assurer l'éveil, associé à la perception et la cognition, véritable et seule fin de tout être.

Contemporain, Épicure défend une vision matérialiste héritée de l'atomisme de Démocrite selon laquelle, toute chose est composé d'*atomes*. L'atomisme épicurien, dans les vers de Lucrèce, illustre ainsi une vision différente du sommeil et s'essaie à proposer un mécanisme expliquant

le déclenchement du sommeil : les *atomes* constituant l'âme se séparent et, pour partie, fuient le corps par ses pores, tandis que le reste de ces *atomes* se réfugie dans les profondeurs du corps.

*Le sommeil se produit quand l'âme en nous s'altère,
Scindée en deux courants dont l'un fuit au dehors,
Dont l'autre se condense aux profondeurs du corps.
Cet abandon détend les ressorts et dissipe
Le sentiment, dont l'âme est l'assuré principe,
Dont le sommeil ne peut suspendre l'action,
Si l'âme n'est en proie à la confusion,
Si l'âme n'a quitté les membres ; non pas toute :
Car ce serait livrer la machine dissoute
Au froid mystérieux de la mort sans réveil*

De la Nature des Choses,
Lucrèce (98–55 av. J.-C.)
Traduction de André Lefèvre, 1876

Ces deux positions, aussi différentes puissent-elles être, partagent néanmoins de considérer le sommeil comme un état passif, une perte de vitalité, un défaut de conscience et différant de la mort seulement par son caractère réversible. Cette conception restera longtemps ancrée et traversera les époques, presque inchangée, à l'image des descriptions de Michel de Montaigne ou de Ambroise Paré.

Ce n'est pas sans raison qu'on nous fait regarder à nostre sommeil mesme, pour la ressemblance qu'il a de la mort. Combien facilement nous passons du veiller au dormir, avec combien peu d'interest nous perdons la connoissance de la lumiere et de nous ! A l'aventure pourroit sembler inutile et contre nature la faculté du sommeil, qui nous prive de toute action et de tout sentiment, n'estoit que par iceluy nature nous instruit, qu'elle nous a pareillement faicts pour mourir, que pour vivre, et dés la vie nous presente l'eternel estat qu'elle nous garde apres icelle, pour nous y accoustumer et nous en oster la crainte.

Les Essais,
Chapitre VI, De l'Exercitation,
Michel Eyquem de Montaigne, 1595

*D'où provient le dormir.
Le dormir n'est autre chose que le repos de tout le corps et principalement de la faculté animale. Celui-ci provient d'une humidité utile qui imbibe la surface du cerveau, qui s'appesantit et l'aggrave : ou bien d'une déféctuosité de fluides qui, diffusés par le travail, font que le corps ne peut rester debout et contraignent le cerveau à se reposer pour en réparer d'autres à partir des viandes prises dans l'estomac.*

Introduction à la Chirurgie,
Chapitre XIX, Du Dormir et du Veiller,
Ambroise Paré, 1579

Il faudra attendre la première moitié du *xx^e* siècle pour que cette représentation évolue, en particulier grâce au neurologue Constantin von Economo et son étude de l'encéphalite léthargique dont une violente épidémie avait frappé l'Europe en 1917. Au cours de ses travaux, von Economo

a remarqué que certains patients présentaient de profondes insomnies alors que d'autres souffraient de somnolence. L'examen post-mortem des cerveaux de ces patients a révélé que la localisation des lésions inflammatoires était corrélée aux symptômes observés sur le sommeil. Ces observations permirent à von Economo de postuler que l'hypothalamus postérieur serait un centre éveillant ou *Wachzentrum* et que l'hypothalamus antérieur serait un centre inducteur du sommeil ou *Schlafzentrum*, suggérant des mécanismes actifs participant au maintien de l'éveil et à la promotion du sommeil. La phénoménologie des états de vigilance a, de plus, largement bénéficié du développement des enregistrements polygraphiques de l'activité cérébrale (électroencéphalogramme, EEG), de l'activité musculaire (électromyogramme, EMG) et des mouvements des yeux (électrooculogramme, EOG) qui permirent de tracer les frontières entre éveil et sommeil et de caractériser un nouvel état de sommeil, le sommeil paradoxal. Les observations de von Economo ont, en parallèle, été confirmées par des études neurophysiologiques qui, procédant à des sections et des lésions plus limitées de l'encéphale, ont permis une définition de plus en plus fine des centres de l'éveil et du sommeil.

Ces travaux, puis tous ceux qui en ont découlé, ont permis d'identifier de nombreuses structures impliquées dans le contrôle du sommeil ou de l'éveil dans l'hypothalamus et la formation réticulée, interagissant les unes avec les autres et formant ainsi un réseau complexe dont l'activité concertée serait à l'origine de l'alternance entre états de vigilance. Brièvement, le maintien de l'éveil serait assuré par des populations de neurones monoaminergiques et cholinergiques localisées dans le tronc cérébral et l'hypothalamus postérieur. L'endormissement reposerait sur l'activation de neurones spécifiquement actifs pendant le sommeil localisés en particulier dans l'aire préoptique ventrolatérale (VLPO) qui contribueraient à l'inactivation des neurones actifs pendant l'éveil. À l'inverse pendant l'éveil les systèmes monoaminergiques et cholinergiques contribueraient à l'inhibition des neurones du VLPO. Ainsi, l'alternance entre éveil et sommeil reposerait sur l'interaction inhibitrice réciproque entre deux populations neuronales associées à l'éveil, d'une part, et au sommeil, d'autre part.

Par ailleurs, le déclenchement du sommeil paradoxal résulterait de l'activation de groupes neuro-naux pontiques actifs pendant le sommeil paradoxal, dits exécutifs du sommeil paradoxal, associée à l'inhibition de populations inactives pendant le sommeil paradoxal, dites permissives, et responsables de l'inhibition pendant l'éveil et le sommeil lent des systèmes exécutifs du sommeil paradoxal. Ainsi, à l'image de l'alternance entre éveil et sommeil, le déclenchement du sommeil paradoxal reposerait également sur l'interaction réciproque entre deux populations neuronales aux caractéristiques antagonistes.

L'ensemble de ces travaux a permis de définir un réseau neuronal contrôlant les différents états de vigilance. Néanmoins, cette description offre une vision relativement statique de ce système, sans préciser particulièrement les différents facteurs influençant l'alternance entre états de vigilance, puis les mécanismes qui gouvernent ces transitions entre états de vigilance. En particulier, un facteur, décrit depuis bien longtemps, semble capable de favoriser l'endormissement : la prise alimentaire.

*Volontiers le sommeil vient après le repas.
Car les mets, comme l'air coulant de veine en veine,
Agissent comme lui. La plénitude amène
Un surcroît de travail interne et de stupeur
Couvert d'une plus lourde et plus longue torpeur.*

De la Nature des Choses,
Lucrece (98–55 av. J.-C.)
Traduction de André Lefèvre, 1876

Plusieurs explications, essentiellement périphériques et indirectes, ont été proposées afin de rendre compte de cet effet. En réponse à l'arrivée de nourriture dans l'estomac et le petit intestin, l'activité du système nerveux parasympathique augmente et l'activité du système nerveux sympathique diminue, résultant en une sensation de fatigue subjective, à l'inverse de la réponse combat-fuite induite par une activité élevée du système sympathique. Une autre explication propose que l'insuline, dont la sécrétion augmente à la suite de la prise d'un repas à fort index glycémique, pourrait, en agissant sur la liaison du tryptophane à l'albumine, augmenter le transfert du tryptophane au niveau cérébral, résultant en une augmentation de la production de sérotonine favorable à l'endormissement.

Nous avons alors cherché à déterminer, par une approche multidisciplinaire *in vivo* et *ex vivo*, si, en complément des mécanismes précédents, un effet direct du glucose, principal substrat énergétique issu de l'alimentation, pouvait intervenir au niveau central pour favoriser l'endormissement, en particulier en agissant au niveau des neurones du VLPO responsables du déclenchement du sommeil.

D'autre part, le sommeil se divise en deux états : le sommeil lent et le sommeil paradoxal, et les mécanismes contrôlant ou régulant l'alternance entre ces deux états restent mal compris. Étant donné leur position dans le réseau neuronal contrôlant le sommeil ainsi que leur activité de décharge pendant les états de vigilance et les nombreuses projections qu'ils développent à travers l'intégralité de l'encéphale, les neurones sécrétant l'hormone de mélanocortine pourraient être des candidats intéressants dans la modulation de cette transition entre états de sommeil. Nous avons ainsi mis en œuvre deux approches afin de préciser le rôle de ces neurones dans le contrôle du cycle veille-sommeil : une approche par lésion spécifique de ces neurones et une approche pharmacogénétique permettant de moduler spécifiquement et de manière réversible leur activité. Afin de tenter de disséquer de quelle manière les neurones sécrétant l'hormone de mélanocortine pouvaient moduler cette transition entre sommeil lent et paradoxal, nous nous sommes enfin focalisé sur un élément particulier du réseau en étudiant spécifiquement, par optogénétique, la contribution des terminaisons axonales de ces neurones dans le VLPO.

Ainsi, l'intégralité des travaux détaillés ci-après dans ce manuscrit s'inscrivent dans la démarche de chercher à identifier certains mécanismes neuronaux sous-tendant les transitions entre états de vigilance, avec un intérêt particulier pour la transition entre éveil et sommeil et la transition entre sommeil lent et sommeil paradoxal.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

Chapitre 1 :

Phénoménologie du sommeil

Le développement des techniques d'électroencéphalographie (EEG) a marqué le début de l'histoire moderne de la recherche sur le sommeil. Grâce à cet outil l'activité électrique corticale de sujets éveillés ou endormis a pu être enregistrée. L'application de cette technique chez l'animal a permis de distinguer sans ambiguïté les différents états de vigilance à l'aide de critères objectifs (Bremer, 1935). Les enregistrements de l'activité musculaire (électromyogramme, EMG) et des mouvements oculaires (électrooculogramme, EOG) associés à l'EEG ont permis de définir précisément trois états de vigilance : l'éveil, le sommeil lent (SL) et le sommeil paradoxal (SP) (Dement et Kleitman, 1957 ; Jouvet et Michel, 1959).

1.1. Caractérisation des états de vigilance

1.1.1. L'éveil

L'éveil constitue la phase pendant laquelle un individu sera capable d'interagir avec l'environnement. L'individu pourra alors rester immobile, les yeux ouverts (éveil calme) ou s'engager dans une activité comportementale (éveil actif) dans le but de s'alimenter, se reproduire, explorer l'environnement, etc. Au cours de cet état, l'EEG se caractérise par une activité désynchronisée de faible amplitude et à haute fréquence (Figure 1.1.1). L'analyse spectrale d'un tracé EEG d'éveil révèle la présence d'ondes rapides dans les bandes β (20–30 Hz) et γ (30–60 Hz). Au cours d'un éveil attentif, des ondes dans la bande θ (5–10 Hz) originaires de l'hippocampe sont également présentes sur le tracé EEG. D'autre part, pendant l'éveil l'activité musculaire de l'individu se manifeste par un EMG dont l'amplitude est fonction de l'activité motrice avec de nombreux événements phasiques lorsque l'individu se déplace (Figure 1.1.1). L'activité oculaire est importante et reflète les nombreuses saccades oculaires pendant l'éveil. Le rythme cardiaque et la fréquence respiratoire sont élevés.

1.1.2. Le sommeil lent

Le SL correspond à un état au cours duquel l'individu est immobile, les yeux fermés et est moins sensible aux stimuli externes. Pendant le SL, l'EEG présente des ondes de forte amplitude et à

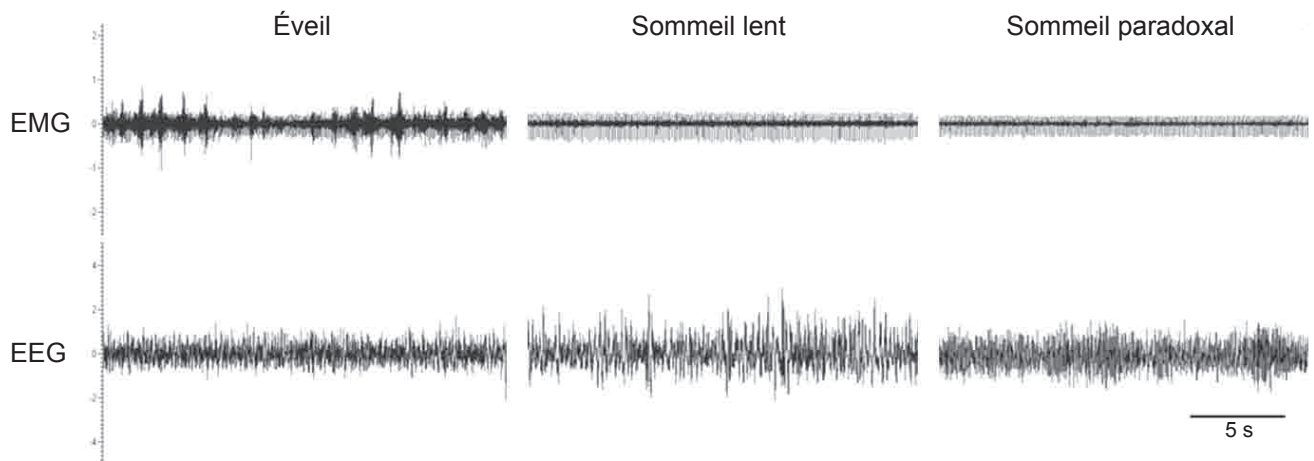


Figure 1.1.1. Caractérisation polysomnographique des états de vigilance chez la souris. Tracés électroencéphalographiques (EEG) au niveau du cortex pariétal et électromyographiques (EMG) représentatifs enregistrés chez la souris au cours de l'éveil, du sommeil lent et du sommeil paradoxal.

basse fréquence : il est dit synchronisé (Figure 1.1.1). Ces ondes lentes dans la bande δ (0,5–4 Hz) sont entrecoupées de fuseaux (10–14 Hz). L'amplitude de ces ondes lentes est un marqueur de la pression de sommeil et son homéostasie car celle-ci diminue à mesure que la pression de sommeil s'évacue (Tobler et Borbely, 1986 ; Vyazovskiy et coll., 2007). Le tonus musculaire enregistré sur l'EMG est diminué par rapport à l'éveil. De plus, les températures cérébrale et corporelle ainsi que les fréquences respiratoire et cardiaque diminuent et sont plus régulières pendant le SL.

1.1.3. Le sommeil paradoxal

Dans des conditions physiologiques, le SP intervient toujours après une phase de SL. Le SP se caractérise par la présence de phénomènes toniques, présents tout le long de l'épisode, et de phénomènes phasiques, intervenant ponctuellement au cours de l'épisode.

Tout au long d'un épisode de SP, la quasi totalité des muscles (excepté les muscles cardiaques, ventilatoires et oculaires) sont dans un état d'atonie. L'EEG est désynchronisé semblable à celui de l'éveil, mais se distingue de ce dernier par la prépondérance d'ondes θ (Figure 1.1.1). Cette association entre atonie musculaire, donc immobilité totale, et forte activité corticale, semblable à l'éveil, a été la source de la dénomination de sommeil paradoxal proposée par Michel Jouvét (Jouvét et Michel, 1959 ; Jouvét et coll., 1959).

Des phénomènes phasiques peuvent également survenir au cours d'un épisode de SP. Ceux-ci sont constitués de secousses musculaires très brèves ou *twitches* au niveau des extrémités de la face et des membres ainsi que de mouvements oculaires rapides. Cette dernière caractéristique a été à l'origine du terme anglo-saxon pour désigner le SP, *Rapid Eye Movement sleep (REM sleep)*, après sa découverte chez l'homme (Aserinsky et Kleitman, 1953).

1.2. Cycle veille-sommeil chez les mammifères

1.2.1. Comparaison entre les mammifères

Les quantités quotidiennes de sommeil varient considérablement d'une espèce mammifère à l'autre (Table 1.1.1). Certains animaux, tels les chauves-souris ou les opossums, dorment entre 18 et 20 heures par jour. D'autres, tels que les éléphants ou les girafes, ne dorment que 3 à 4 heures par jour (Campbell et Tobler, 1984 ; Tobler, 1995 ; Siegel, 2005 ; Zepelin et coll., 2005). Un sommeil consolidé, monophasique, n'a été observé que chez les primates, alors que la grande majorité des mammifères ont un sommeil polyphasique caractérisé par une succession d'alternances entre éveil et sommeil.

Table 1.1.1. Durées quotidiennes totales de sommeil chez quelques espèces mammifères.

Animal	Durée quotidienne de sommeil
Girafe	0,5/1,9/4,6 heures
Cheval	2,9 heures
Âne	3,1 heures
Éléphant	3,5 heures
Mouton	3,8 heures
Vache	4 heures
Phoque gris	6,2 heures
Cochon	7,8 heures
Humain	8 heures
Lapin	8,4 heures
Chimpanzé	9,7 heures
Renard roux	9,8 heures
Chien	10,1 heures
Grand dauphin	10,4 heures
Macaque rhésus	11,8 heures
Souris commune	12,5 heures
Chat	12,5 heures
Rat	12,6 heures
Lion	13,5 heures
Ornithorynque	14 heures
Écureuil	14,9 heures
Tigre	15,8 heures
Musaraigne	15,8 heures
Paresseux	14,4/16 heures
Opossum	18 heures
Tatou géant	18,1 heures
Petite chauve-souris brune	19,9 heures

La durée moyenne de ces cycles ultradiens varie également fortement entre les mammifères, entre 6 minutes chez le rat jusqu'à environ 2 heures chez l'éléphant (Campbell et Tobler, 1984). Ce rythme ultradien est corrélé à la masse corporelle et à la taille du cerveau, mais la cause de cette corrélation est inconnue. Cette dernière pourrait être liée à la corrélation inverse entre taux métabolique et masses cérébrale et corporelle, l'inertie thermique du cerveau et du corps ou encore la latence nécessaire à la diffusion de certaines substances dans le cerveau.

Tous les mammifères terrestres présentent, pendant le SL, un EEG synchronisé avec des ondes lentes dans les deux hémisphères. À l'inverse, les cétacés ne développent pratiquement jamais d'ondes lentes dans les deux hémisphères simultanément (Figure 1.1.2 A) (Mukhametov et coll., 1997 ; Lyamin et coll., 2004). Ce sommeil unihémisphérique a aussi été également observé chez les lamantins (Mukhametov et coll., 1992). Ce comportement semble servir plusieurs fonctions indispensables en milieu aquatique telles que la surveillance de l'environnement ou la conservation des mécanismes respiratoires (Mukhametov et coll., 1992 ; Lyamin et coll., 2008 ; Rattenborg et coll., 2000 ; Siegel, 2005).

La très grande majorité des études sur le sommeil des mammifères ont été

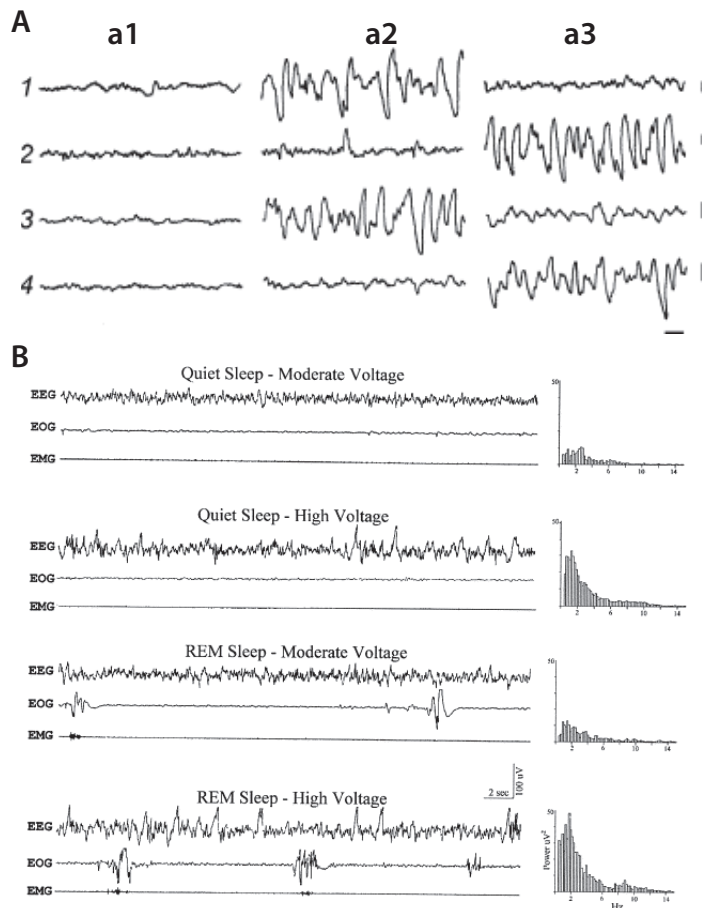


Figure 1.1.2. Les caractéristiques du sommeil ne sont pas homogènes chez tous les mammifères.

A, Enregistrements EEG au niveau des deux hémisphères (1 et 2) et des deux thalamus (3 et 4) pendant l'éveil (**a1**) et des épisodes de sommeil lent unihémisphérique dans l'hémisphère droit (**a2**) et gauche (**a3**) chez le grand dauphin (extrait de Lyamin et coll., 2008).

B, Tracés EOG, EMG et EEG enregistrés au cours du sommeil chez l'ornithorynque. Le SP (*REM sleep*) se distingue du sommeil calme (*quiet sleep*) par la présence de saccades oculaires (extrait de Siegel et coll., 1999).

réalisées chez les euthériens ou les marsupiaux. La troisième sous-classe de mammifères est constituée des monotrèmes que l'on trouve en Australie ou en Nouvelle-Guinée. Ces mammifères ovipares présentent de nombreuses similarités avec les reptiles (oviparité, morphologie de la ceinture scapulaire, présence d'un cloaque). Il est ainsi proposé que les monotrèmes posséderaient les caractéristiques de l'ancêtre commun aux mammifères (Grutzner et Graves, 2004). Bien qu'une première étude chez les échidnés avait proposé que le SP n'existerait pas chez les monotrèmes (Allison et Van Twyver, 1972 ; Allison et coll., 1972), des études complémentaires ont mis en évidence une forme atypique de SP. Pendant le sommeil, une activation du tronc cérébral a été détectée chez les échidnés et les ornithorynques (Figure 1.1.2 B). De plus, ces derniers présentent des mouvements phasiques des yeux et des membres (Siegel et coll., 1996 ; Siegel et coll., 1999). Cependant l'activation corticale caractéristique du SP chez les euthériens et les marsupiaux n'est pas observée chez les monotrèmes. Ainsi le SP mammalien « primitif » serait principalement localisé dans le tronc cérébral.

1.2.2. Ontogenèse du sommeil

La caractérisation du sommeil chez les individus juvéniles représente un défi car de nombreuses caractéristiques du sommeil des adultes sont absentes chez le juvénile. La plus importante de toutes est certainement que l'EEG cortical ne présente pas les signatures caractéristiques dépendantes des états de vigilance observées chez l'adulte. Par exemple, les ondes lentes n'apparaissent qu'après 115 à 120 jours post-conception chez le mouton (Clewlow et coll., 1983 ; Szeto et Hinman, 1985), 50 jours post-conception chez le cochon d'Inde (Umans et coll., 1985), environ

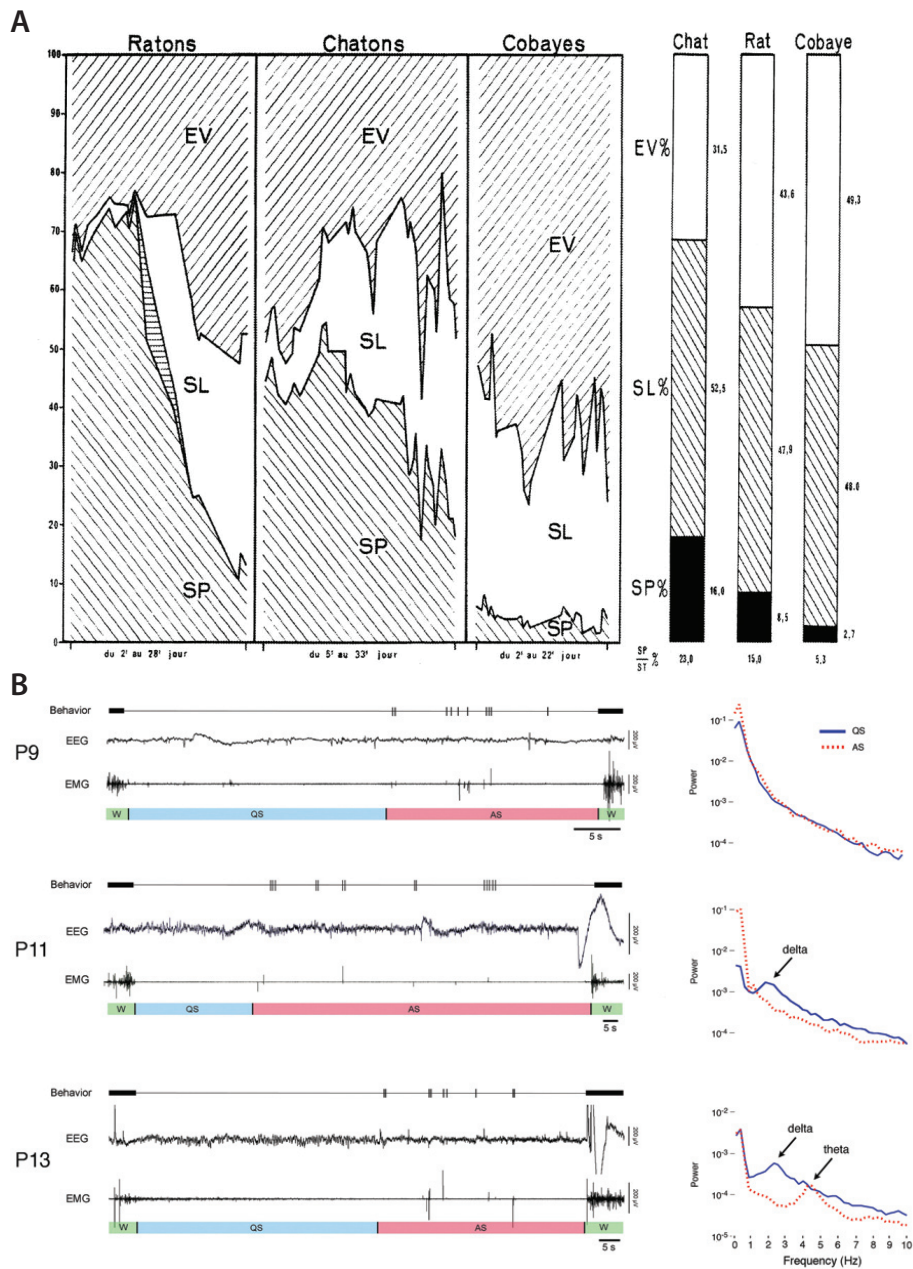


Figure 1.1.3. Évolution des états de vigilance dans les premiers stades postnataux.

A, Évolution des états de vigilance chez le rat, le chat et le cobaye durant le premier mois postnatal (gauche) ainsi qu'à l'âge adulte (extrait de Jouvét-Mounier et coll., 1970).

B, Illustration d'un cycle de sommeil chez des jeunes rats enregistrés 9 jours (P9), 11 jours (P11) et 13 jours (P13) après la naissance. Pour chaque enregistrement, la première trace représente les mouvements coordonnés (*behavior*), la deuxième trace le signal EEG, la troisième trace le signal EMG de la nuque. Les états de vigilance (W : éveil ; QS : sommeil calme ; AS : sommeil actif) sont indiqués sous le tracé EMG. À droite sont représentées les analyses spectrales du signal EEG durant le sommeil calme (QS, noir) et le sommeil actif (AS, rouge). Les premières ondes lentes apparaissent à P11 pendant le sommeil calme et les premières oscillations θ à P13 pendant le sommeil actif (extrait de Seelke et Blumberg, 2008).

32 semaines post-conception chez les nouveau-nés humains prématurés (Dreyfus-Brisac, 1975), et jusqu'à 12 jours postnatal chez le rat (Gramsbergen, 1976 ; Mirmiran et Corner, 1982 ; Frank et Heller, 1997). La description et la quantification des états de vigilance nécessite donc l'utilisation de mesures autres que l'EEG telles que les mouvements du corps, la respiration, la fréquence cardiaque, ou le tonus musculaire (Parmelee et coll., 1967a ; Parmelee et coll., 1967b ; Gramsbergen et coll., 1970 ; Nijhuis et coll., 1984). L'addition de ces paramètres permet de mettre en évidence, chez le rat, une continuité entre le sommeil actif, caractérisé par une atonie musculaire et la présence de *twitches* chez le juvénile, et le SP de l'adulte (Figure 1.1.3 B) (Karlsson et Blumberg, 2002 ; Seelke et Blumberg, 2008). De même, il existerait une continuité entre le sommeil calme observé chez le rat juvénile et le SL.

De plus, les quantités de sommeil évoluent durant la période postnatale (Figure 1.1.3 A). Par exemple, en comparant les quantités d'états de vigilance entre trois espèces mammifères – rat, chat et cobaye – il est possible de noter que le rat, qui naît très immature, passe environ 70 % du temps en SP pendant la première semaine postnatale, alors que le cobaye, qui naît quasiment mature, a environ 10 % de SP, ce qui est comparable aux taux mesurés chez le cobaye adulte. Pour le rat, les quantités de SP diminuent avec l'âge au profit du SL et de l'éveil. Le chat, quant à lui, semble développer un phénotype intermédiaire (Jouvet-Mounier et coll., 1970). Chez les mammifères, les jeunes immatures, comme les foetus, présentent de grandes quantités de SP, ce qui suggérerait un lien entre SP et maturation cérébrale (Roffwarg et coll., 1966 ; Jouvet-Mounier et Astic, 1968 ; Jouvet, 1980).

Chapitre 2 :

Réseaux neuronaux contrôlant les états de vigilance

L'existence de centres nerveux contrôlant l'éveil ou le sommeil est une idée relativement récente. Au début du xx^e siècle, le sommeil était perçu comme une perte de conscience provoquée notamment par l'absence de stimulations environnementales extérieures. Les travaux du neurologue von Economo sur l'encéphalite léthargique ont permis d'établir les prémices des théories actuelles proposant un contrôle par des systèmes neuronaux spécifiques des états de vigilance. Au cours de ses études, von Economo a remarqué que certains patients présentaient de profondes insomnies alors que d'autres souffraient de somnolence. L'examen post-mortem des cerveaux de ces patients a révélé que la localisation des lésions inflammatoires était corrélée aux symptômes observés sur le sommeil. Ces observations permirent à von Economo de postuler que l'hypothalamus postérieur serait un centre éveillant et que l'hypothalamus antérieur induirait le sommeil (von Economo, 1930).

2.1. Systèmes sous-tendant le maintien de l'éveil

Les modèles actuels concernant les systèmes activateurs ascendants associés à l'éveil reposent sur les observations de Moruzzi et Magoun (Moruzzi et Magoun, 1949) qui ont notamment démontré que la stimulation électrique de la formation réticulée mésencéphalique entraîne une désynchronisation corticale. Bien qu'il ait été initialement imaginé que les neurones responsables de l'éveil étaient dispersés dans la formation réticulée, des expériences ont finalement permis de démontrer que l'éveil était produit par l'activation de neurones monoaminergiques et cholinergiques localisés dans des noyaux spécifiques (Saper et coll., 2001 ; Fort et coll., 2009 ; Saper et coll., 2010).

2.1.1. Neurones cholinergiques du tegmentum ponto-mésencéphalique

Ces neurones cholinergiques sont localisés dans deux régions : le noyau tegmental latérodorsal (LDT) et le noyau tegmental pédonculopontin (PPT). Ils constituent la principale innervation

cholinergique vers le noyau réticulé du thalamus en provenance de la jonction mésopontine (Mesulam et coll., 1983). Ils projettent également sur l'hypothalamus postérieur, le télencéphale basal, le cortex préfrontal et le noyau intralaminaire du thalamus (Sato et Fibiger, 1986 ; Hallanger et coll., 1987). Le LDT et le PPT reçoivent des afférences en provenance du télencéphale basal, de l'hypothalamus tubéral, de la zona incerta, de la substance grise périaqueducule et de la formation réticulée mésencéphalique (Semba et Fibiger, 1992).

Des enregistrements *in vivo* de l'activité unitaire de ces neurones a permis de montrer que leur fréquence de décharge est plus élevée pendant l'éveil et le SP que pendant le SL, suggérant un rôle important de ces neurones dans l'activation corticale (el Mansari et coll., 1989 ; Kayama et coll., 1992 ; Steriade et coll., 1993). Des enregistrements extracellulaires combinés à des marquages juxtacellulaires ont permis de confirmer que les neurones cholinergiques du LDT déchargent pendant l'activation corticale et que l'augmentation de leur fréquence de décharge précède généralement la transition d'un signal EEG dominé par des ondes lentes vers un signal à plus haute fréquence (Boucetta et Jones, 2009).

2.1.2. Neurones noradrénergiques du locus coeruleus

Le locus coeruleus (LC) contient environ la moitié des neurones noradrénergiques du cerveau et projette de manière diffuse vers l'ensemble du cerveau. En particulier le LC envoie des projections ascendantes vers le cortex, l'hippocampe, le cervelet, le thalamus, le télencéphale basal (Olson et Fuxe, 1971 ; Jones et coll., 1977 ; Jones et Moore, 1977 ; Mason et Fibiger, 1979 ; Foote et coll., 1983 ; Jones et Yang, 1985 ; Jones, 1991a ; Losier et Semba, 1993) ou descendantes vers la moelle épinière (Nygren et Olson, 1977).

Des enregistrements extracellulaires des neurones noradrénergiques du LC ont démontré que ceux-ci ont une activité dépendante des états de vigilance : leur décharge lente et régulière de type *pacemaker* est maximale pendant l'éveil, diminue fortement pendant le SL et devient nulle pendant le SP (Chu et Bloom, 1974 ; Hobson et coll., 1974 ; McCarley et Hobson, 1975 ; Aston-Jones et Bloom, 1981a ; Takahashi et coll., 2010). De plus ces neurones atteignent un taux de décharge maximal en réponse à des stimuli sensoriels pendant un éveil attentionnel (Aston-Jones et Bloom, 1981a ; Aston-Jones et Bloom, 1981b ; Aston-Jones et coll., 1985). Ce résultat a également été confirmé par des immunomarquages de la protéine c-Fos, un marqueur d'activation neuronale, après 3 heures d'exposition à un nouvel environnement (Leger et coll., 2009).

D'autre part, l'inactivation pharmacologique du LC entraîne, chez le rat anesthésié, une augmentation de la puissance des ondes lentes (Berridge et coll., 1993) alors que sa stimulation pharmacologique induit une activation corticale (Berridge et Foote, 1991). Aussi, l'activation par optogénétique des neurones noradrénergiques du LC induit-elle des transitions vers l'éveil en quelques secondes et quelque soit l'état (SL ou SP) dans lequel l'animal se trouve (Carter et coll., 2010).

Ces données indiquent que les neurones noradrénergiques du LC jouent un rôle clé dans la mise en place et le maintien de l'éveil et également dans l'activation corticale caractéristique de cet état.

2.1.3. Neurones sérotoninergiques du noyau du raphé dorsal

À l'image des neurones du LC, les neurones sérotoninergiques du raphé dorsal (RD) envoient des projections vers l'ensemble du cerveau, en particulier vers l'hypothalamus, l'aire préoptique,

le télencéphale basal, l'hippocampe, le thalamus et le cortex cérébral (Descarries et Droz, 1968 ; Belin et coll., 1978 ; Belin et coll., 1979 ; Steinbusch, 1981 ; Steinbusch et Nieuwenhuys, 1981 ; Steinbusch et coll., 1981a ; Steinbusch et coll., 1981b ; Vertes, 1991 ; Vertes et Kocsis, 1994). Très tôt a été émise la théorie sérotoninergique du sommeil (Jouvet, 1972) selon laquelle la sérotonine aurait un rôle majeur à jouer dans l'endormissement. Chez le chat, la lésion du RD ou l'inhibition de la tryptophane hydroxylase (enzyme de synthèse de la sérotonine) induisent une insomnie qui est compensée par l'administration d'un précurseur de la sérotonine (Jouvet, 1968 ; Jouvet, 1969). Cette théorie a été depuis remise en cause.

L'administration systémique d'agonistes des récepteurs 5-HT_{1A} et 5HT_{1B} diminue les quantités de SP et à haute dose augmente l'éveil alors que l'administration d'antagonistes à ces mêmes récepteurs augmente le SP. De manière similaire, des souris déficientes pour les récepteurs 5-HT_{1A} ou 5HT_{1B} présentent une augmentation des quantités de SP sans modification sensible du SL ou de l'éveil (Boutrel et coll., 1999 ; Boutrel et coll., 2002).

Des enregistrements unitaires de neurones sérotoninergiques du RD ont permis de mettre en évidence que ceux-ci ont une fréquence de décharge maximale pendant l'éveil, qui diminue ensuite pendant le SL et devient nulle pendant le SP (McGinty et Harper, 1976 ; Trulson et Jacobs, 1979 ; Aghajanian et Vandermaelen, 1982 ; Lydic et coll., 1983 ; Sakai, 2011). Ces résultats sont confortés par des études biochimiques et électrochimiques indiquant que la libération de sérotonine est plus importante pendant l'éveil que pendant les autres états de vigilance (Puizillout et coll., 1979 ; Cespuglio et coll., 1981a ; Cespuglio et coll., 1981b ; Portas et McCarley, 1994).

L'ensemble de ces données suggère que les neurones sérotoninergiques du RD seraient impliqués dans le contrôle de l'éveil mais aussi du SP (Fort et coll., 2009 ; Saper et coll., 2010) ; leur action sur les états de vigilance demeure cependant encore mal comprise.

2.1.4. Système histaminergique du noyau tubéromammillaire

Le noyau tubéromammillaire (TMN) est localisé à la frontière ventrale de l'hypothalamus postérieur et contient la quasi totalité des neurones histaminergiques du cerveau (Panula et coll., 1984 ; Watanabe et coll., 1984 ; Lin et coll., 1993). Ces neurones histaminergiques envoient des axones dans l'ensemble du système nerveux central et, en particulier, vers des régions impliquées dans la régulation des états de vigilance telles que le thalamus, l'aire préoptique, le LC, le LDT/PPT (Panula et coll., 1984 ; Schwartz et coll., 1991). En retour, le TMN reçoit des afférences en provenance de l'aire préoptique, des noyaux noradrénergique, adrénérergique et sérotoninergique du tronc cérébral (Ericson et coll., 1991 ; Chou et coll., 2002).

Des enregistrements de l'activité unitaire des neurones histaminergiques du TMN ont permis de mettre en évidence que ces derniers ont une fréquence de décharge maximale pendant l'éveil attentif, celle-ci diminue ensuite pendant un éveil calme pour devenir nulle pendant le sommeil (Steininger et coll., 1999 ; Vanni-Mercier et coll., 2003 ; Takahashi et coll., 2006). Renforçant ce lien entre éveil et histamine, il a été montré, chez le rat, que les taux d'histamine intracérébrale sont plus élevés pendant la phase d'obscurité, pendant laquelle le rat est majoritairement actif, que pendant la phase diurne d'inactivité (Mochizuki et coll., 1992). La libération d'histamine pendant l'éveil produirait une activation tonique des neurones thalamiques et corticaux participant ainsi à la désynchronisation corticale caractéristique de l'éveil (Hill, 1990 ; McCormick, 1992 ; Arrang, 1994 ; Leurs et coll., 1995).

Des approches pharmacologiques ont permis de démontrer que l'injection intracérébroventriculaire d'histamine augmente l'éveil ainsi que la désynchronisation corticale (Monnier et coll.,

1970 ; Wolf et Monnier, 1973). De manière similaire, l'inhibition de la synthèse de l'histamine s'accompagne d'une augmentation des quantités de SL au détriment de l'éveil (Lin et coll., 1988) et l'inhibition de la dégradation de l'histamine augmente l'éveil et diminue le SL (Lin et coll., 1990 ; Lin et coll., 1996). Plus récemment, il a été montré que des souris déficientes pour l'histidine décarboxylase (enzyme de synthèse de l'histamine) semblaient plus somnolentes et étaient incapables de maintenir un éveil consolidé induit par différents stimuli comportementaux (Parmentier et coll., 2002).

Si les neurones histaminergiques du TMN partagent de nombreuses similitudes avec les neurones noradrénergiques du LC, il existe néanmoins une différence entre ces deux populations. En effet, contrairement aux neurones du LC, l'activation des neurones histaminergiques du TMN ne précède pas le début d'un épisode d'éveil et semble même apparaître avec un délai (Takahashi et coll., 2006). Ce résultat suggère un rôle différent de ces deux populations par rapport à l'éveil : les neurones histaminergiques du TMN seraient plus spécifiquement impliqués dans des mécanismes liés à l'activation corticale et au maintien de l'éveil sans être nécessaire pour le déclenchement de l'éveil.

2.1.5. Télencéphale basal

Le télencéphale basal regroupe plusieurs régions anatomiques : le septum médian, la substance innommée et les bandes verticale, diagonale et horizontale de Broca (Heimer et Alheid, 1991). Cette région comporte majoritairement des neurones cholinergiques, GABAergiques et glutamatergiques ; ces trois sous-populations représentent chacune environ un tiers des neurones du télencéphale basal (Manns et coll., 2001 ; Hur et Zaborszky, 2005). En particulier, les neurones cholinergiques du télencéphale basal constituent la source principale d'acétylcholine dans le cortex et l'hippocampe ainsi qu'une source secondaire dans le thalamus (Mesulam et coll., 1983). De plus, le télencéphale basal reçoit en particulier des afférences histaminergiques, noradrénergiques et sérotoninergiques (Jones et Cuello, 1989).

Les neurones du télencéphale basal participent à l'activation corticale en formant un relais extrathalamique entre le système réticulé activateur ascendant et le cortex (Jones, 2004). L'activité des neurones cholinergiques du télencéphale basal est maximale pendant l'éveil et le SP et minimale pendant le SL. De plus ils déchargent en bouffées de potentiels d'action synchronisées avec le rythme θ (Lee et coll., 2004 ; Lee et coll., 2005b). La lésion de certaines régions du télencéphale basal provoque un léger ralentissement de l'EEG sans modification des quantités d'éveil ou de sommeil (Kaur et coll., 2008). D'autre part, une inactivation transitoire du télencéphale basal augmente le SL alors que son activation produit de l'éveil (Cape et Jones, 2000).

De plus, l'activation optogénétique des neurones cholinergiques du TB pendant le SL produit des transitions immédiates vers l'éveil ou le SP, et, pendant l'éveil ou le SP soutient l'activation corticale (Han et coll., 2014 ; Irmak et de Lecea, 2014). À l'inverse, l'inactivation optogénétique de ces mêmes neurones prolonge la durée des épisodes de SL (Shi et coll., 2015). Néanmoins, les neurones cholinergiques ne constituent pas la seule population du TB, et des enregistrements de neurones glutamatergiques et GABAergiques exprimant la parvalbumine (PV) ont révélé que ceux-ci sont, à l'image des neurones cholinergiques, plus actifs pendant l'éveil et le SP que pendant le SL (Xu et coll., 2015). De plus, l'activation optogénétique de ces trois populations neuronales facilite l'éveil, alors que l'activation optogénétique des neurones GABAergiques exprimant la somatostatine (SOM) induit du SL (Xu et coll., 2015). Des observations similaires ont été obtenues par la modulation pharmacogénétique des neurones cholinergiques, GABAergiques ou glutamatergiques du TB (Anaclet et coll., 2015 ; Chen et coll., 2016). Au niveau

synaptique, les neurones actifs pendant l'éveil suivent une organisation hiérarchique avec des connexions excitatrices des neurones glutamatergiques sur les neurones cholinergiques, puis des neurones cholinergiques sur les neurones PV et ces trois populations reçoivent des entrées inhibitrices des neurones SOM (Xu et coll., 2015).

Le télencéphale basal semble donc constituer une structure importante pour l'activation corticale pendant l'éveil et le SP. Cependant sa contribution exacte dans les mécanismes de promotion des différents états de vigilance reste à préciser.

2.1.6. Neurones sécrétant l'orexine de l'hypothalamus tubéral

Localisé dorsalement et rostralement au TMN, l'hypothalamus tubéral contient des neurones sécrétant les neuropeptides orexine (orexine-A et orexine-B, aussi appelés hypocretine-1 et hypocretine-2). Ces neurones ont été initialement impliqués dans la régulation de la prise alimentaire (de Lecea et coll., 1998 ; Sakurai et coll., 1998). De nombreux neurones orexine contiennent du glutamate et le peptide dynorphine (Chou et coll., 2001 ; Torrealba et coll., 2003). De plus ils envoient des projections dans le cortex cérébral, le télencéphale basal et le tronc cérébral. Des densités de fibres particulièrement intenses sont observées dans le TMN ou le LC (Peyron et coll., 1998 ; Marcus et coll., 2001). Les neurones orexine reçoivent des afférences en provenance, en particulier, de l'amygdale, du noyau accumbens, du septum latéral, de l'aire préoptique, du raphé dorsal, du LC ou de la substance grise périaqueducale (Sakurai, 2005 ; Yoshida et coll., 2006).

Pendant le cycle veille-sommeil, les neurones orexine ont une activité en décharge de potentiels d'action principalement pendant l'éveil, et plus particulièrement pendant un éveil attentif, et sont, à l'inverse, silencieux pendant le sommeil (Lee et coll., 2005c ; Mileykovskiy et coll., 2005).

L'administration d'orexine-A dans le LC augmente les quantités d'éveil ainsi que l'activité des neurones du LC (Bourgin et coll., 2000). De manière similaire, l'injection d'orexine-A dans le TMN favorise l'éveil et cet effet est aboli chez des souris invalidées pour le récepteur H_1 de l'histamine (Huang et coll., 2001) ainsi qu'en présence d'un antagoniste de ce même récepteur (Yamanaka et coll., 2002). Ces résultats sont renforcés par des études d'électrophysiologie *ex vivo* qui démontrent un rôle excitateur du peptide orexine sur les neurones histaminergiques du TMN (Bayer et coll., 2001), noradrénergiques du LC (Horvath et coll., 1999), sérotoninergiques du RD (Liu et coll., 2002) et cholinergiques du LDT (Burlet et coll., 2002), ainsi que sur les neurones orexine eux-mêmes (Yamanaka et coll., 2010). De plus les neurones orexine pourraient faciliter l'activation corticale via un effet excitateur du peptide orexine sur des neurones thalamiques projetant au cortex (Bayer et coll., 2002) ainsi que sur les neurones de la couche 6b du néocortex (Bayer et coll., 2004). Les neurones orexine sont, quant à eux, stimulés par l'application de noradrénaline et d'acétylcholine, mais inhibés par la sérotonine (Muraki et coll., 2004 ; Bayer et coll., 2005). De manière intéressante, la réponse à la noradrénaline des neurones orexine est inversée à la suite d'une privation de sommeil (Grivel et coll., 2005).

En complément, des études récentes ont également démontré que l'activation spécifique des neurones orexine par optogénétique pendant le sommeil suffit à produire un réveil (Adamantidis et coll., 2007 ; Carter et coll., 2009). De manière remarquable, cet effet éveillant de l'activation des neurones orexine est supprimé lorsque les neurones noradrénergiques du LC sont inhibés simultanément (Carter et coll., 2012). À l'inverse l'inhibition des neurones orexine par la même technique induit l'apparition de SL (Tsunematsu et coll., 2011 ; Tsunematsu et coll., 2013) et la destruction spécifique de ces neurones par l'expression d'une toxine encodée génétiquement

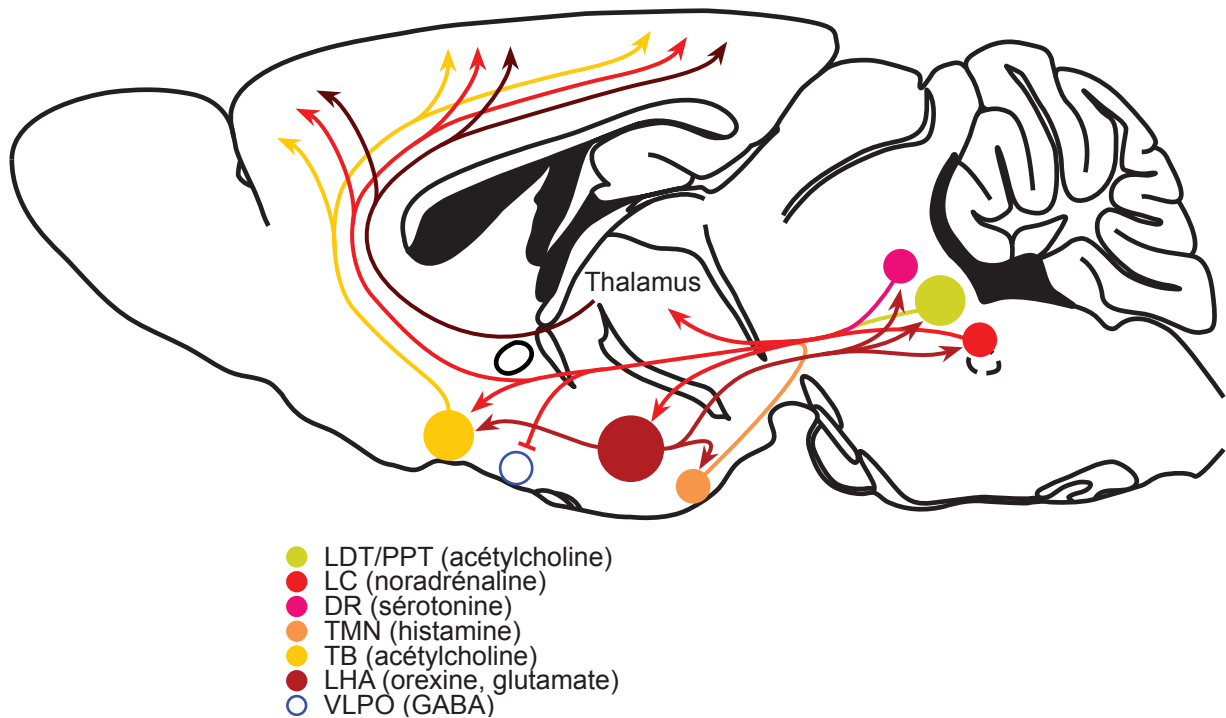


Figure 1.2.1. Représentation schématique des populations neuronales intervenant dans le contrôle de l'éveil.

Les populations pontiques cholinergiques et monoaminergiques participent à l'excitation du thalamus et des neurones actifs pendant l'éveil de l'hypothalamus et du télencéphale basal. Les neurones orexine (rouge foncé) contribuent à renforcer l'activité des neurones monoaminergiques et cholinergiques du tronc cérébral et excitent également le cortex cérébral et le télencéphale basal contribuant ainsi à l'activation corticale et à la stabilisation de l'éveil.

produit les symptômes de la narcolepsie, à savoir une fragmentation excessive de l'éveil ainsi que des entrées directes en SP à partir de l'éveil (Hara et coll., 2001 ; Fujiki et coll., 2009 ; Kantor et coll., 2009 ; Tabuchi et coll., 2014). Ce rôle important des neurones orexine dans le contrôle de l'éveil a également été confirmé par des approches de pharmacogénétique (Sasaki et coll., 2011).

La présence d'un nombre si important de structures impliquées dans le déclenchement et le maintien de l'éveil soulève la question de leurs interactions pour produire l'éveil (Figure 1.2.1). Les substances pharmacologiques qui bloquent l'un ou l'autre des neurotransmetteurs listés plus haut tendent à accroître la somnolence. Or la lésion des neurones cholinergiques du télencéphale basal (Blanco-Centurion et coll., 2006 ; Kaur et coll., 2008), du noyau tubéromammillaire (Gerashchenko et coll., 2004), du locus coeruleus et des neurones cholinergiques du tegmentum ponto-mésencéphalique (Webster et Jones, 1988 ; Shouse et Siegel, 1992 ; Lu et coll., 2006) ou d'une combinaison du télencéphale basal, du noyau tubéromammillaire et du locus coeruleus (Blanco-Centurion et coll., 2007) n'altèrent que peu les quantités d'éveil. Il pourrait alors exister une très forte redondance entre ces structures qui permettrait aux systèmes promoteurs de l'éveil restant de compenser facilement une défaillance d'un ou plusieurs composants du réseau.

2.2. Réseaux neuronaux contrôlant le sommeil lent

À la suite de la découverte des systèmes réticulés activateurs ascendants et de leur rôle dans le maintien de l'éveil, certains neurophysiologistes ont postulé que le SL était un phénomène passif provoqué par la fatigue de ces systèmes conduisant à une diminution de leur action activatrice (Moruzzi, 1972). Cette vision passive du SL a depuis été remise en cause par la démonstration de processus actifs de genèse du SL mettant en jeu des réseaux neuronaux dédiés et une régulation physiologique propre.

2.2.1. Rôle du thalamus dans la genèse des ondes lentes

Le thalamus ne joue pas un rôle dans la genèse ou la régulation du SL, mais contribue de manière cruciale à la synchronisation corticale caractéristique de cet état. En effet, la seule stimulation de certains noyaux thalamiques induit un état semblable au SL caractérisé par la présence d'ondes lentes corticales (Dempsey et Morison, 1941 ; Akert et coll., 1952 ; Hess, 1964). Cependant la lésion de ces noyaux thalamiques n'induit pas d'insomnie ce qui suggère qu'ils ne sont pas indispensables à la mise en place du SL (Angeleri et coll., 1969). De plus, le sommeil persiste même à la suite d'une ablation totale du thalamus (Villablanca et Salinas-Zeballos, 1972). Les ondes lentes enregistrées au niveau de l'EEG cortical sont dues à l'hyperpolarisation rythmique des neurones corticaux ; l'activité de ces neurones alterne entre un état dépolarisé durant lequel ils déchargent en bouffées de potentiels d'action, et un état hyperpolarisé durant lequel les neurones corticaux sont silencieux (Steriade, 2000 ; Timofeev et coll., 2001).

Des enregistrements de champ dans le néocortex ont révélé la présence de deux composantes aux ondes lentes : l'une d'origine corticale et l'autre originaire du thalamus. Des enregistrements électrophysiologiques ont mis en évidence la présence d'ondes lentes dans le néocortex après lésion des noyaux thalamiques. Ces ondes lentes ont également été enregistrées dans des explants néocorticaux (Villablanca et Salinas-Zeballos, 1972 ; Ball et coll., 1977). Les mécanismes responsables de ces ondes lentes corticales demeurent mal compris. Une hypothèse suggère qu'elles pourraient être générées par des neurones intrinsèquement oscillants (Steriade et Amzica, 1998). Les ondes lentes d'origine thalamique résultent de l'activité rythmique intrinsèque des neurones du noyau réticulé du thalamus par le jeu des conductances calciques activées à bas seuil (I_T) et des courants cationiques activés par l'hyperpolarisation (I_h). Les ondes lentes d'origine thalamique peuvent ainsi être observées quand les neurones du noyau réticulé du thalamus sont suffisamment hyperpolarisés pour dé-inactiver les canaux I_T (McCormick et Pape, 1990 ; Crunelli et coll., 2014).

2.2.2. La région préoptique

Dans les années 1920, l'étude de cerveaux de patients victimes de l'épidémie d'encéphalite léthargique permit au neurologue von Economo d'établir un lien entre la présence de lésions inflammatoires au niveau de l'aire préoptique et l'existence de profondes insomnies chez certains patients (von Economo, 1930), ce qui l'a amené à proposer l'hypothèse selon laquelle l'aire préoptique serait une structure essentielle dans la genèse du sommeil. Plus tard, cette hypothèse s'est trouvée renforcée par la démonstration que la lésion de l'aire préoptique chez le singe (Ranson, 1939) et chez le chat (Nauta, 1946 ; Sallanon et coll., 1989) réduisait le sommeil, alors que la stimulation électrique de cette aire chez le chat produisait l'apparition d'ondes lentes (Serman et Clemente, 1962). Néanmoins la nature exacte des neurones responsable du sommeil restait inconnue.

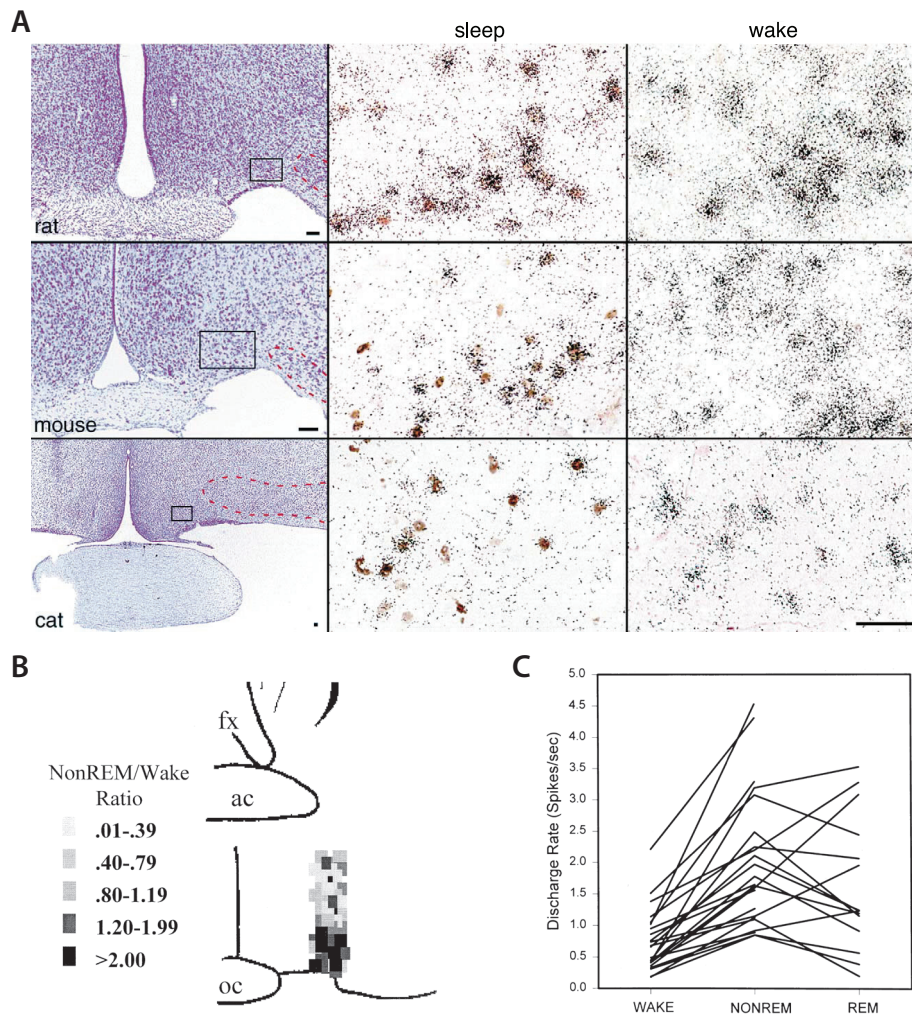


Figure 1.2.2. Le VLPO contient des neurones actifs pendant le SL.

A, Démonstration de l'existence chez plusieurs espèces mammifères de l'existence au niveau du VLPO (colonne de gauche) de neurones galaninergiques (hybridation *in situ*, grains noirs) actifs (immunomarquage c-Fos, noyaux marrons) après au moins une heure de sommeil (colonne centrale) et inactifs après au moins une heure d'éveil (colonne de droite) (extrait de Gaus et coll., 2002).

B-C, Des enregistrements unitaires dans l'aire préoptique latérale révèlent que le VLPO contient la plus forte densité de neurones plus actifs pendant le SL que l'éveil (**B**). L'évolution de la fréquence de décharge des neurones du VLPO actifs pendant le SL indique que certains de ces neurones continuent à être actifs pendant le SP alors que d'autres ont une fréquence de décharge qui retourne aux niveaux enregistrés pendant l'éveil (**C**) (extrait de Szymusiak et coll., 1998).

En 1996, la cartographie des neurones activés pendant une hypersomnie de SL, grâce à l'immunodétection du marqueur d'activation neuronale c-Fos, a permis de mettre en évidence une sous-structure dans la partie ventrale de l'aire préoptique, nommée aire préoptique ventrolatérale (VLPO), concentrant la plus forte densité de neurones activés (Figure 1.2.1 A) (Sherin et coll., 1996). La lésion bilatérale de cette structure induit une profonde insomnie, avec une diminution de près de 50 % des quantités de SL (Lu et coll., 2000). Ces neurones du VLPO actifs après

une hypersomnie de SL sont de nature GABAergique et galaninergique (Figure 1.2.1 A) (Sherin et coll., 1998 ; Gaus et coll., 2002). En complément du VLPO, de nombreux neurones exprimant *c-Fos* après une hypersomnie de SL sont également présent dans le noyau préoptique médian (MnPO) (Gong et coll., 2004). Dans ces deux structures, le nombre de neurones immunoréactifs pour *c-Fos* est corrélé aux quantités de SL avant le sacrifice de l'animal.

En accord avec la distribution des neurones immunoréactifs pour *c-Fos*, des enregistrements unitaires dans l'aire préoptique ont mis en évidence l'existence, au niveau du VLPO, de neurones dont la fréquence de décharge est plus élevée pendant le SL que pendant l'éveil (Figure 1.2.1 B) (Szymusiak et coll., 1998 ; Takahashi et coll., 2009). Parmi ces neurones actifs pendant le SL, certains s'arrêtent de décharger pendant le SP alors que pour les autres leur fréquence de décharge augmente (Figure 1.2.1 C).

Les neurones du VLPO développent des projections GABAergiques vers l'ensemble des systèmes associés à l'éveil et reçoivent également des projections en provenance de tous ces systèmes

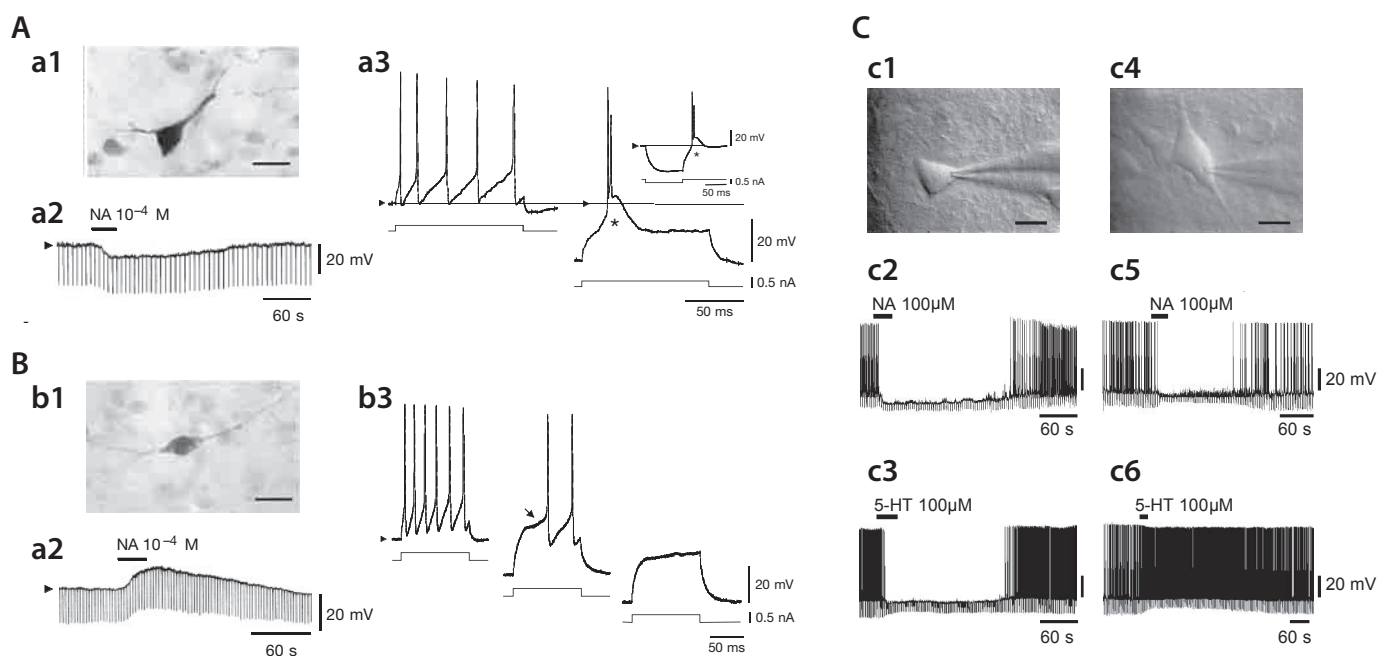


Figure 1.2.3. Identification et caractérisation *ex vivo* des neurones du VLPO actifs pendant le SL.

A–B, Il existe deux sous-populations de neurones dans le VLPO sur la base de critères morphologique, électrophysiologiques et de leur réponse à l'application de noradrénaline (NA). **(A)** La première sous-population est composée de neurones triangulaires (**a1**), excités par la NA (**a2**) et présentent un potentiel calcique activé à bas seuil (LTS, *low-threshold spike*) (**a3**). Ces neurones pourraient correspondre aux neurones actifs pendant le SL. **(B)** La seconde sous-population comprends les neurones bipolaires (**b1**), excités par la NA (**b2**) et ne présentant jamais de LTS (**b3**), potentiellement actifs pendant l'éveil et inactifs pendant le SL (extrait de Gallopin et coll., 2000).

C, L'application de sérotonine (5-HT) définit deux sous-populations de neurones actifs pendant le SL. Environ la moitié des neurones triangulaires (**c1**) et inhibés par la NA (**c2**) sont inhibés par la 5-HT (**c3**), alors que l'autre moitié (**c4,c5**) est excitée par la 5-HT (**c6**) (extrait de Gallopin et coll., 2005).

(Luppi et coll., 1995 ; Sherin et coll., 1998 ; Gervasoni et coll., 2000 ; Steininger et coll., 2001 ; Lee et coll., 2005a ; Uschakov et coll., 2006 ; Suntsova et coll., 2007). Ainsi les neurones du VLPO pourraient être capables d'inhiber les systèmes d'éveil pendant le SL. Cette hypothèse est renforcée par la mesure d'une élévation de la concentration extracellulaire en GABA pendant le SL par rapport à l'éveil au sein des systèmes associés à l'éveil (Nitz et Siegel, 1996 ; Nitz et Siegel, 1997a ; Nitz et Siegel, 1997b ; Gervasoni et coll., 1998). De plus, la stimulation électrique de l'aire préoptique latérale entraîne une inhibition GABAergique des neurones du TMN (Yang et Hatton, 1997) et la stimulation pharmacogénétique des neurones GABAergiques de l'aire préoptique induit une augmentation des quantités de SL, en particulier *via* une inhibition des neurones orexine (Saito et coll., 2013).

2.2.3. Neuromodulation des neurones du VLPO

Un élément important dans l'organisation du système est que les neurones du VLPO reçoivent des projection réciproques en provenance des systèmes monoaminergiques et cholinergiques régulant l'éveil. L'effet des neurotransmetteurs associés à l'éveil à pu être étudié sur les neurones du VLPO grâce à la caractérisation *ex vivo* de ces neurones. Deux population neuronales ont pu être définies sur la base de leurs propriétés électrophysiologiques, morphologiques et leur réponse à l'application de noradrénaline (Gallopain et coll., 2000 ; Matsuo et coll., 2003 ; Gallopain et coll., 2004 ; Saint-Mleux et coll., 2004 ; Gallopain et coll., 2005 ; Saint-Mleux et coll., 2007 ; Liu et coll., 2010 ; Wang et coll., 2013). Une première sous-population est caractérisée par une

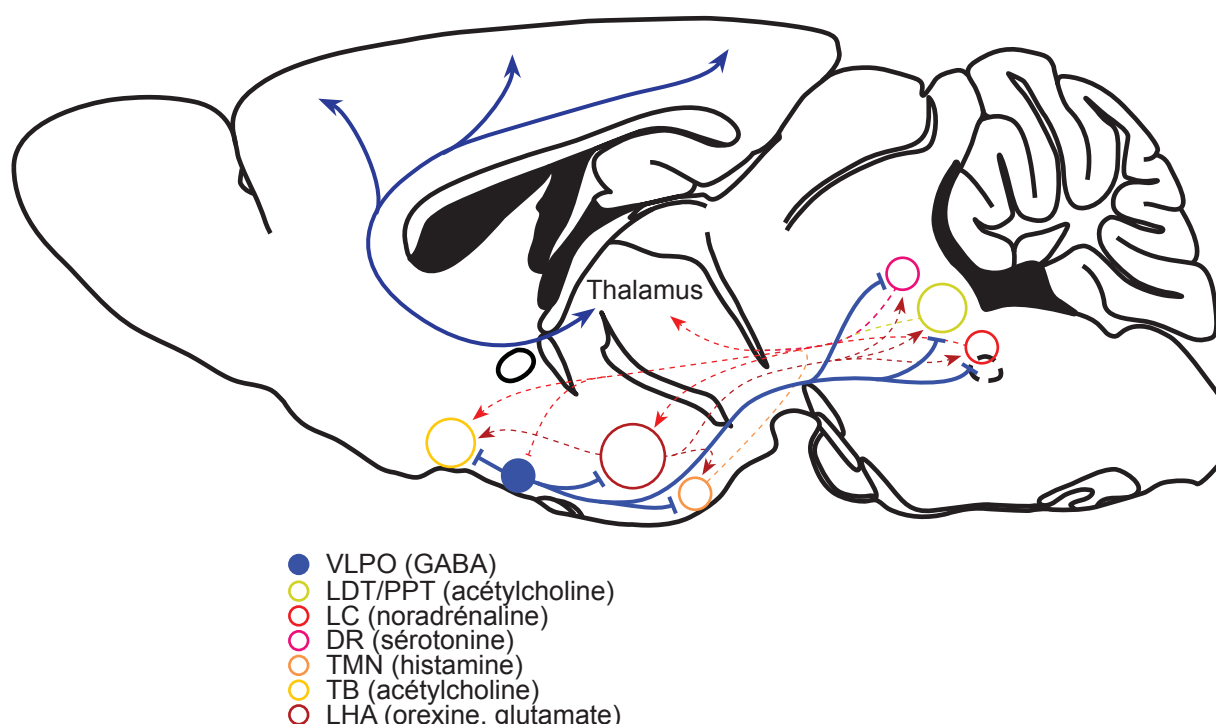


Figure 1.2.4. Schéma illustrant le contrôle du déclenchement du SL par le VLPO.

Pendant le SL les neurones du VLPO (bleu) sont actifs et inhibent les systèmes monoaminergiques et cholinergiques associés à l'éveil. À l'inverse, pendant l'éveil, les neurones du VLPO sont inhibés par les systèmes associés à l'éveil (cercles vides ; traits pointillés), inhibant ainsi l'entrée en SL.

morphologie triangulaire, la présence d'un potentiel calcique activé à bas seuil (LTS, *low-threshold spike*) et par un effet inhibiteur de la noradrénaline (Figure 1.2.3 A). Cette dernière caractéristique suggère que ces neurones correspondraient aux neurones inactifs pendant l'éveil et actifs pendant le SL. La seconde sous-population se caractérise par une morphologie bipolaire, l'absence de LTS et un effet excitateur de la noradrénaline (Figure 1.2.3 B) et pourrait ainsi correspondre aux quelques neurones actifs pendant l'éveil enregistrés *in vivo* (Szymusiak et coll., 1998 ; Takahashi et coll., 2009). De plus les neurones LTS inhibés par la noradrénaline le sont aussi par l'acétylcholine alors que les neurones excités par la noradrénaline le sont aussi par l'acétylcholine et la sérotonine (Gallopain et coll., 2000 ; Gallopain, 2002). En plus d'un effet post-synaptique, l'acétylcholine peut également favoriser l'inhibition des neurones du VLPO actifs pendant le SL via l'activation de récepteurs nicotiques pré-synaptiques facilitant la libération de noradrénaline (Saint-Mleux et coll., 2004). L'histamine, quant à elle, inhibe indirectement les neurones LTS via l'excitation des neurones excités par la noradrénaline (Liu et coll., 2010 ; Williams et coll., 2014). Ce résultat suggère que les neurones excités par la noradrénaline pourraient être une population d'interneurones dans le VLPO. En plus des effets de l'histamine, les neurones du TMN pourraient également inhiber le VLPO via une libération de GABA (Airaksinen et coll., 1992) ou l'activation de récepteurs μ -opioïde (Greco et coll., 2008).

Par ailleurs, les effets de la sérotonine sur les neurones du VLPO inhibés par la noradrénaline permettent de définir deux sous-populations de neurones actifs pendant le SL (Figure 1.2.3 C) : les neurones de type-1 sont inhibés par la sérotonine alors que les neurones de type-2 sont excités par la sérotonine (Gallopain et coll., 2005). Ces deux sous-populations pourraient intervenir différemment dans les mécanismes d'induction et de consolidation du SL.

L'ensemble de ces données décrivent une inhibition réciproque entre les systèmes d'éveil et les neurones du VLPO : au déclenchement du SL, l'activation des neurones du VLPO conduit à l'inhibition des systèmes d'éveil qui indirectement participent à la désinhibition du VLPO, renforçant ainsi l'activation du VLPO et donc le SL (Figure 1.2.4). Ce *flip-flop switch* permettrait alors d'assurer des transitions rapides et complètes entre éveil et sommeil (Gallopain et coll., 2000 ; Fort et coll., 2004 ; Saper et coll., 2005 ; Fort et coll., 2009 ; Saper et coll., 2010).

2.3. Réseaux neuronaux contrôlant le sommeil paradoxal

La découverte du SP dans les années 1950 a stimulé la conduite de nombreux travaux visant à en comprendre les mécanismes. Les premières études ont permis d'identifier une origine pontique dans les mécanismes de genèse du SP grâce à des transections du tronc cérébral et des lésions larges de cette région (Jouvet, 1962 ; Webster et Jones, 1988).

2.3.1. Rôle des neurones du noyau sublatérodorsal

Plus précisément, les neurones responsables du déclenchement du SP seraient localisés dans la partie dorsale du noyau pontis oralis (PnO) et du noyau pontis caudalis (PnC) (Carli et Zanchetti, 1965 ; Sastre et coll., 1981), aussi appelée péri-locus coeruleus α (péri-LC α) chez le chat ou noyau sublatérodorsal (SLD) chez les rongeurs. Pas souci de clarté, cette dernière dénomination sera utilisée par la suite quelque soit l'espèce considérée. Le SLD contient de nombreux neurones spécifiquement actifs pendant le SP (Sakai et Koyama, 1996 ; Sakai et coll., 2001 ; Boissard et coll., 2002), potentiellement de nature glutamatergique (Luppi et coll., 1988 ; Lu et coll., 2006 ; Sapin et coll., 2009 ; Clement et coll., 2011). La lésion du SLD chez le rat induit une diminution des quantités de SP associée à une fragmentation accrue de cet état (Lu et coll., 2006). De plus une forte immunoréactivité c-Fos est observée dans le SLD après une hypersomnie de SP (Boissard et coll., 2002 ; Lu et coll., 2006) et l'application de kainate dans le SLD augmente le taux de décharge des neurones actifs pendant le SP et induit l'apparition d'un état similaire au SP (Boissard et coll., 2002).

Le SLD jouerait, de plus, un rôle important dans la mise en place de l'atonie musculaire et de l'activation corticale caractéristiques du SP. En effet, les neurones du SLD sont activés antidromiquement par la stimulation des noyaux intralaminaires du thalamus (el Mansari et coll., 1989) et l'injection de traceurs antérogrades dans le SLD a révélé la présence de projection du SLD vers certains noyaux thalamiques (Boissard et coll., 2002). De plus les neurones du SLD envoient des projections caudalement vers des structures inhibitrices pontiques et spinales, telles que le noyau gigantocellulaire ventral (GiV), dont l'activation conduit à l'inhibition des motoneurones, et ainsi à la mise en place de l'atonie musculaire (Fort et coll., 1989 ; Fort et coll., 1993 ; Rampon et coll., 1996 ; Boissard et coll., 2002 ; Luppi et coll., 2004 ; Lu et coll., 2006 ; Sapin et coll., 2009 ; Vetrivelan et coll., 2009).

2.3.2. Hypothèse cholinergique du sommeil paradoxal

Juste avant le déclenchement du SP et pendant toute la durée des épisodes apparaissent des ondes de grande amplitude dans le tronc cérébral, le corps géniculé latéral et le cortex occipital. Ces ondes sont synchronisées à la décharge de neurones localisés dans les noyaux LTD/PPT (Sakai et Jouvet, 1980 ; el Mansari et coll., 1989). De plus, les neurones cholinergique du LDT/PPT ont un taux de décharge maximal pendant l'éveil et le SP (el Mansari et coll., 1989 ; Kayama et coll., 1992 ; Steriade et coll., 1993 ; Boucetta et coll., 2014). À l'inverse la décharge des neurones du LC, du RD ou du TMN est presque nulle pendant le SP (Hobson et coll., 1974 ; Hobson et coll., 1975 ; Aston-Jones et Bloom, 1981a ; Aston-Jones et Bloom, 1981b ; Trulson et coll., 1981 ; Steininger et coll., 1999 ; Takahashi et coll., 2010). Cette relation laisse supposer que les neurones du LDT/PPT pourraient interagir avec les systèmes monoaminergiques pour réguler l'alternance entre SL et SP.

L'hypothèse cholinergique du SP a été renforcée par la démonstration que l'injection de carbachol (un agoniste cholinergique) dans le PnO augmente le SP (George et coll., 1964), et que cet effet était d'autant plus marqué que les injections étaient restreintes au SLD (Sakai et coll., 1979 ; Vanni-Mercier et coll., 1989 ; Lai et Siegel, 1990). À l'inverse l'injection de substances augmentant la signalisation monoaminergique inhibe le SP (Jones, 1991b ; Gervasoni et coll., 2002 ; Luppi et coll., 2006). De plus, des travaux de neuroanatomie fonctionnelle ont permis de démontrer, par l'immunomarquage de la protéine c-Fos, l'existence de neurones actifs après une hypersomnie de SP dans le LDT/PPT et que le nombre de neurones actifs était corrélé aux quantités de SP (Yamuy et coll., 1993 ; Shiromani et coll., 1996 ; Maloney et coll., 1999 ; Maloney et coll., 2000).

Toutefois cette hypothèse a été mise en doute par la démonstration que des lésions du PPT réduisait très faiblement le nombre d'entrées en SP et que des lésions du LDT ou du LC n'ont aucun effet sur le SP (Webster et Jones, 1988 ; Shouse et Siegel, 1992 ; Lu et coll., 2006). De plus, et contrairement aux résultats obtenus chez le chat, l'application, chez le rat, de carbachol dans le SLD induit soit une augmentation très limitée (Shiromani et Fishbein, 1986 ; Velazquez-Moctezuma et coll., 1989 ; Bourgin et coll., 1995), soit aucun changement des quantités de SP (Deurveilher et coll., 1997). Une étude a même rapporté une augmentation des quantités d'éveil, ainsi que l'absence de modulation de l'activité des neurones actifs pendant le SP du SLD suite à l'injection iontophorétique de carbachol dans le SLD (Boissard et coll., 2002).

2.3.3. Vers un contrôle GABAergique du sommeil paradoxal

Le déclenchement du SP pourrait alors être sous un contrôle GABAergique. En effet, des injections de GABA dans le SLD pendant le SP ou le SL donnent lieu à l'apparition d'éveil (Xi et coll., 1999 ; Xi et coll., 2001b ; Xi et coll., 2001a) alors que l'injection d'antagonistes GABA par iontophorèse provoque un état semblable au SP (Boissard et coll., 2002 ; Pollock et Mistleberger, 2003 ; Sanford et coll., 2003). Ces résultats suggèrent donc que, pendant l'éveil et le SL, les neurones du SLD seraient sous l'influence d'un fort tonus inhibiteur.

L'injection de traceurs rétrogrades dans le SLD a permis de mettre en évidence que le SLD reçoit une forte afférence GABAergique en provenance du SLD lui-même ainsi que de la région à la limite entre la substance grise périaqueducule ventrolatérale (vlPAG) et le noyau réticulé mésencéphalique profond (DpMe) (Boissard et coll., 2003 ; Lu et coll., 2006). Ces structures contiennent de plus un grand nombre de neurones GABAergiques activés par la privation de SP (Sapin et coll., 2009). Cette région contiendrait donc des neurones actifs pendant l'éveil et le SL dont la fonction serait d'inhiber le SLD et donc de prévenir l'entrée en SP (Fort et coll., 2009 ; Saper et coll., 2010). Aussi l'inhibition ou la lésion de cette structure entraîne-t-elle une augmentation des quantités de SP (Lu et coll., 2006) (Sastre et coll., 1996 ; Crochet et coll., 2006 ; Sapin et coll., 2009) et la stimulation optogénétique des neurones GABAergiques de la vlPAG inhibe le SP (Weber et coll., 2015).

Une contribution additionnelle à l'inhibition des neurones du SLD actifs pendant le SP pourrait provenir de neurones GABAergiques localisés dans le SLD (Lu et coll., 2006). Cette hypothèse est renforcée par le fait que l'injection dans le SLD d'oligonucléotides conduisant à un arrêt de l'expression de la GAD (enzyme de synthèse du GABA) conduit à une augmentation des quantités de SP (Xi et coll., 1999).

2.3.4. Une réconciliation ?

Ces deux hypothèses cholinergiques et GABAergique du contrôle du SP sont-elles complètement exclusives ? Comme présenté plus haut, les neurones actifs pendant le SP du SLD sont soumis à un fort tonus inhibiteur GABAergique pendant l'éveil et le SL. Il se pourrait donc que l'absence d'effet d'agonistes cholinergiques chez le rat soit due à une incapacité de la signalisation cholinergique à surpasser ce tonus inhibiteur. Dans ce sens, il a été montré chez le rat anesthésié ou décérébré, présentant probablement un tonus GABAergique sur le SLD réduit, que l'application de carbachol permet d'induire un état semblable au SP (Taguchi et coll., 1992 ; Fenik et coll., 1999). De plus, une étude récente utilisant la technique d'optogénétique pour stimuler spécifiquement les neurones cholinergiques du LDT ou du PPT a mis évidence que l'activation de ces neurones cholinergiques pendant le SL était suffisante pour déclencher le SP (Van Dort et coll., 2015) remettant ainsi à l'honneur l'hypothèse cholinergique du SP.

Une autre étude a récemment démontré, par des enregistrements électrophysiologiques *ex vivo* sur tranches de cerveaux de souris, que les neurones du SLD projetant à la moelle épinière étaient excités par l'acétylcholine via l'activation de récepteurs muscariniques M1 et M3 et que l'acétylcholine augmentait sur ces neurones la fréquence des courants présynaptiques excitateurs (Weng et coll., 2014).

Ces résultats récents suggéreraient une action concertée entre une activation cholinergique et la levée d'une inhibition GABAergique dans les mécanismes de genèse et de maintien du SP.

2.3.5. Contribution hypothalamique à la régulation du sommeil paradoxal

Une possible contribution de l'hypothalamus dans les mécanismes de régulation du SP a été proposée suite à l'observation que les mécanismes de régulation homéostatique du SP étaient absents chez le chat pontique alors que ceux-ci persistaient lorsqu'un isolat hypothalamique était laissé intact (Jouvet, 1988).

Des travaux consécutifs ont permis de démontrer que l'hypothalamus postérieur et, en particulier, l'hypothalamus tubéral, la zona incerta et l'aire périfornicale contenait de nombreux neurones activés après une hypersomnie de SP (Verret et coll., 2003 ; Verret et coll., 2006 ; Arthaud et coll., 2015), ce qui indiquerait que ces structures sont potentiellement impliquées dans la régulation du SP (Clement et coll., 2012). De plus, des enregistrements *in vivo* ont permis de montrer l'existence dans l'hypothalamus postérieur de neurones préférentiellement actifs pendant le SP (Steininger et coll., 1999 ; Alam et coll., 2002 ; Koyama et coll., 2003 ; Goutagny et coll., 2005 ; Hassani et coll., 2009 ; Hassani et coll., 2010). Néanmoins, l'hypothalamus postérieur est une structure très hétérogène contenant de nombreuses populations neuronales différentes.

Parmi les neurones activés après une hypersomnie de SP, les neurones sécrétant l'hormone de mélanocortine (MCH) représentent près de 50 % de la totalité des ces neurones activés (Figure 1.2.5 A) (Verret et coll., 2003). De plus, des enregistrements juxtacellulaires *in vivo* ont permis de déterminer que les neurones MCH déchargent spécifiquement pendant le sommeil et ont une fréquence de décharge maximale pendant le SP (Figure 1.2.5 B) (Hassani et coll., 2009). Ainsi les neurones MCH pourraient être impliqués dans la régulation du SP. Ces neurones localisés dans l'hypothalamus tubéral et la zona incerta envoient de très nombreuses projections dans l'ensemble du cerveau (Bittencourt et coll., 1992 ; Mouri et coll., 1993). En plus du peptide MCH et des peptides dérivés du promoteur *preproMCH*, ces neurones *a priori* GABAergiques

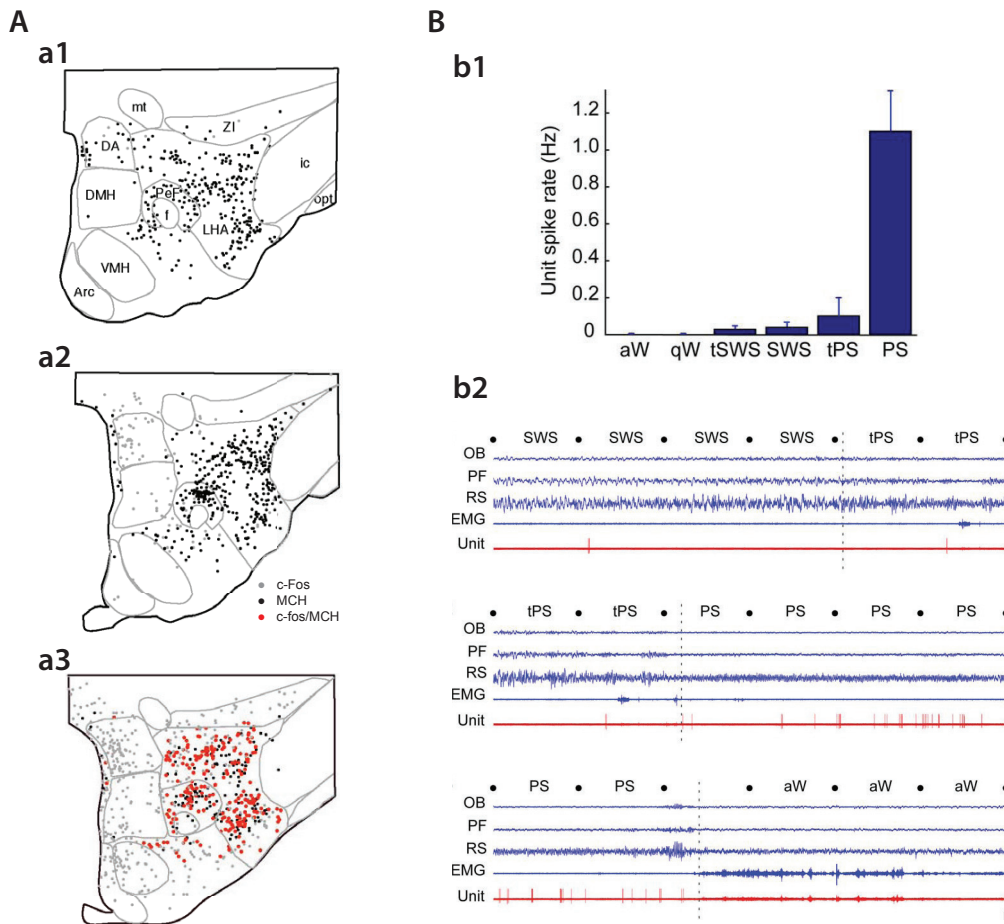


Figure 1.2.5. Les neurones MCH pourraient contribuer à la régulation du SP.

A, L'hypersomnie de SP faisant suite à une privation spécifique induit une expression du marqueur d'activation *c-Fos* dans les neurones MCH (**a3**), alors qu'en condition contrôle (**a1**) ou après la privation spécifique de SP (**a2**) les neurones MCH n'expriment pas *c-Fos* (extrait de Verret et coll., 2003).

B, Des enregistrements juxtacellulaires *in vivo* de neurones MCH indique que ceux-ci sont actifs exclusivement pendant le sommeil et ont un taux de décharge maximal pendant le SP (extrait de Hassani et coll., 2009).

(Sapin et coll., 2010 ; Jégo et coll., 2013) co-expriment la nesfatine-1 qui participerait à la régulation du SP (Fort et coll., 2008 ; Jégo et coll., 2012). Les neurones MCH qui développent des projections ascendantes vers le septum, l'hippocampe et le cortex co-expriment également *CART* (*cocaine- and amphetamine-regulated transcript*), alors que les neurones MCH non-*CART* envoient des projections vers le tronc cérébral et la moelle épinière (Hanriot et coll., 2007). Néanmoins, une étude récente propose que les neurones MCH pourraient également être glutamatergiques et seraient capables de libérer du glutamate dans le septum latéral (Chee et coll., 2015).

Des études complémentaires ont renforcé cette potentielle contribution des neurones MCH dans la régulation du sommeil. L'injection intracérébroventriculaire du peptide MCH augmente les quantités de SL et de SP (Verret et coll., 2003) alors que l'injection sous-cutanée d'un antagoniste du récepteur MCH-R1, seul récepteur du peptide MCH chez les rongeurs, diminue les quantités de SL et de SP (Ahnaou et coll., 2008). En complément, des injections intracérébrales

de MCH dans le DR, le LC ou le télencéphale basal ont permis de confirmer un rôle de ce peptide dans la promotion du SP (Lagos et coll., 2011 ; Lagos et coll., 2012 ; Devera et coll., 2015 ; Monti et coll., 2015). Cependant, lorsqu'il est injecté dans l'aire préoptique latérale, le peptide MCH favorise le SL (Benedetto et coll., 2013). Néanmoins, le SP n'est pas sensiblement altéré chez des souris transgéniques invalidées pour le gène codant pour l'expression du peptide MCH ou invalidées pour le récepteur MCH-R1 (Adamantidis et coll., 2008 ; Willie et coll., 2008).

Des enregistrements électrophysiologiques *ex vivo* ont permis de déterminer que les neurones MCH sont inhibés par la plupart des neurotransmetteurs associés à l'éveil tels que la noradrénaline, l'actétylcholine, la sérotonine (Gao et coll., 2003 ; van den Pol et coll., 2004 ; Bayer et coll., 2005) ou l'histamine (Parks et coll., 2014a). Par ailleurs, il a été montré que le peptide orexine pouvait exciter les neurones MCH (van den Pol et coll., 2004 ; Parks et coll., 2014b), cependant, cet effet excitateur semble concerner une minorité de neurones MCH, et la stimulation par optogénétique des neurones orexine a révélé une action inhibitrice indirecte de ces derniers sur les neurones MCH (Apergis-Schoute et coll., 2015). De plus, pendant le SL, les neurones MCH pourraient être inhibés par les neurones GABAergiques du VLPO actifs pendant le SL (Gao et coll., 2003). Ainsi les neurones MCH pourraient favoriser l'entrée en SP via l'inhibition de neurones monoaminergiques, des neurones orexine ou des neurones de la vlPAG/DpMe grâce aux nombreuses projections MCHergiques ainsi que l'expression de récepteurs MCH-R1 observées dans ces régions (Bittencourt et coll., 1992 ; Hervieu et coll., 2000 ; Kilduff et de Lecea, 2001 ; Hong et coll., 2011).

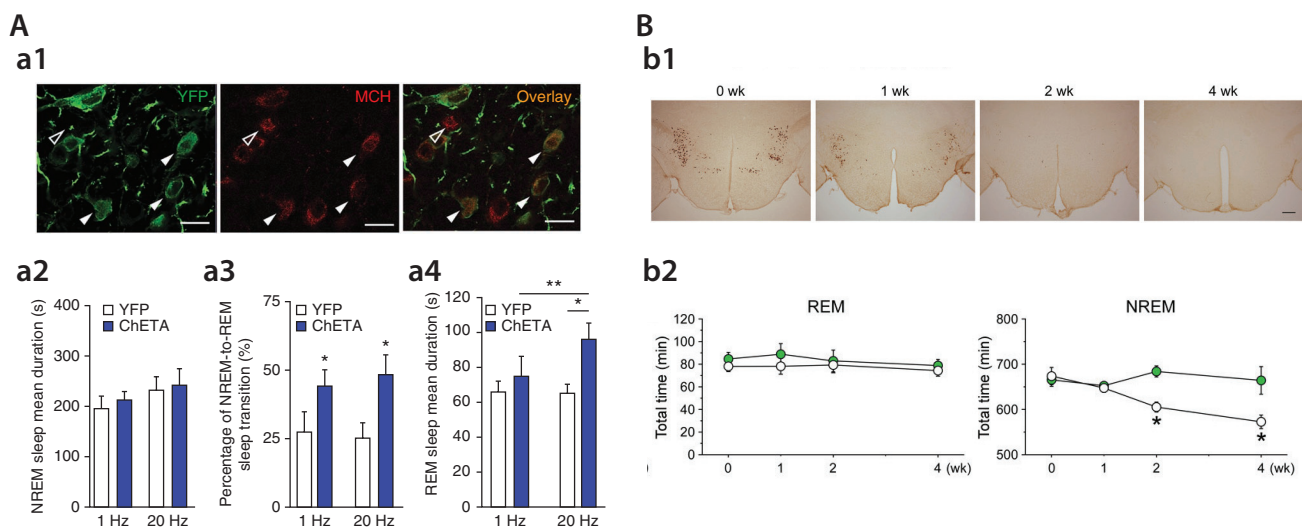


Figure 1.2.6. Démonstration *in vivo* d'une contribution des neurones MCH à la régulation physiologique des états de vigilance.

A, La stimulation des neurones MCH grâce à l'expression spécifiquement dans les neurones MCH un canal cationique photoactivable (**a1**) au début d'un épisode de SL n'affecte pas la durée de celui-ci (**a2**), mais augmente la probabilité de transition vers le SP (**a3**), et la stimulation au début d'un épisode de SP augmente la durée de cet épisode (**a4**) (extrait de Jegou et coll., 2013).

B, L'ablation spécifique des neurones MCH par expression de la toxine diphtérique sous contrôle de la doxycycline (**b1**) s'accompagne d'une diminution des quantités journalières de SL alors que le SP n'est pas affecté (points blancs) par rapport aux animaux contrôle (points verts) (**b2**) (extrait de Tsunematsu et coll., 2014).

Des études récentes reposant sur la stimulation des neurones MCH par optogénétique ont révélé que la stimulation chronique des neurones MCH induit une augmentation des quantités de SL et de SP (Konadhode et coll., 2013) ou une augmentation des quantités de SP accompagnée d'une diminution de celles de SL (Tsunematsu et coll., 2014). D'autre part, la stimulation aigüe des neurones MCH pendant le SL et le SP augmente respectivement la probabilité de transition vers le SP et la durée des épisodes de SP (Figure 1.2.6 A) (Jego et coll., 2013). Cet effet consolidateur du SP a été reproduit par la stimulation des terminaison axonales des neurones MCH dans le septum médian et le TMN (Jego et coll., 2013). Ces résultats confirment un rôle des neurones MCH dans la régulation de certains aspects du SP. Néanmoins l'inactivation par optogénétique des neurones MCH ou leur ablation par expression spécifique de la toxine diphtérique n'ont pas

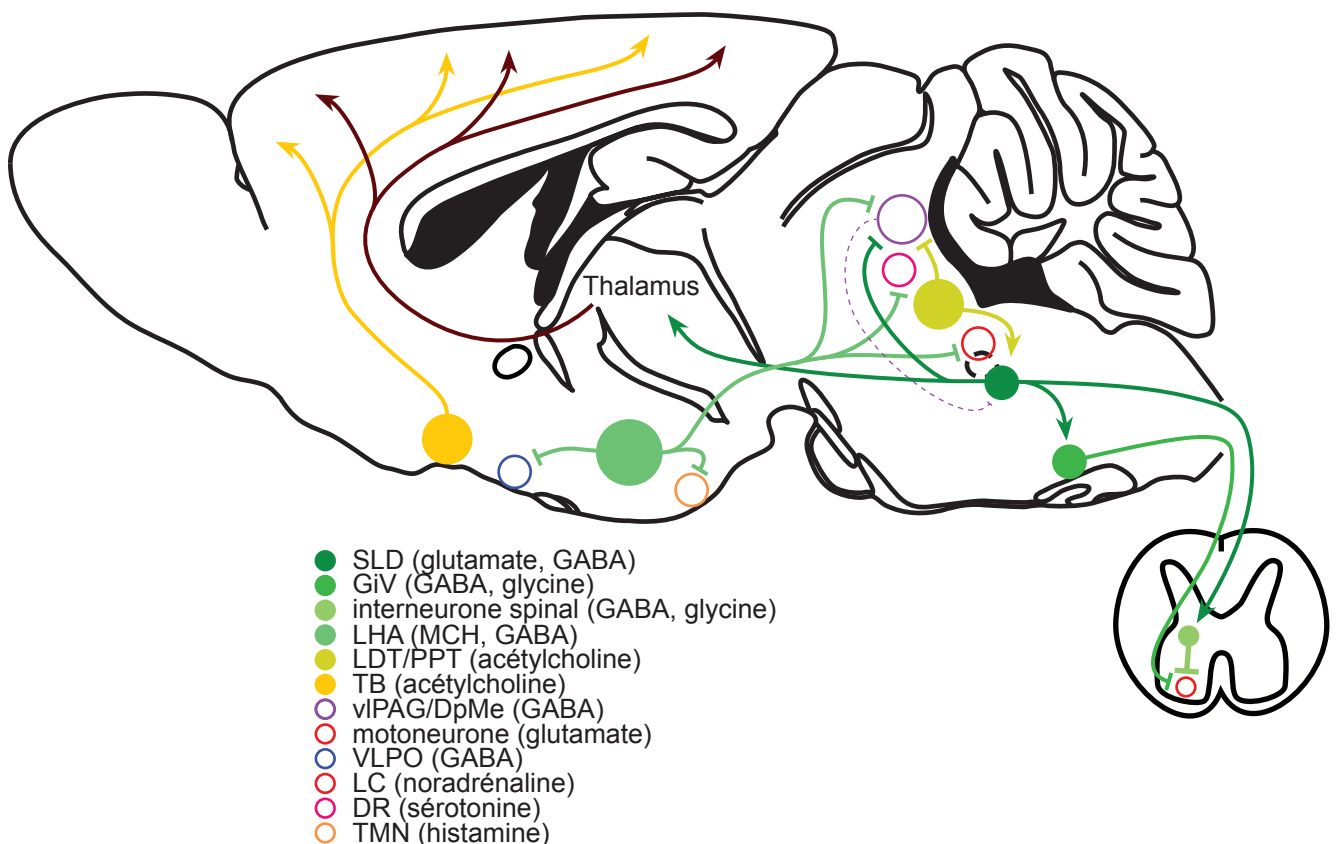


Figure 1.2.7. Schéma illustrant les populations neuronales impliquées dans le contrôle du SP.

Durant l'éveil et le SL, les neurones du SLD (vert foncé) contrôlant l'entrée en SP sont inhibés par des neurones GABAergiques dans la vlPAG/DpMe (violet).

Pendant le SP, les neurones du SLD sont actifs : une sous-population de neurones GABAergiques pourrait contribuer à l'hyperpolarisation de la vlPAG/DpMe tandis que des neurones glutamatergiques favoriseraient l'excitabilité du thalamus et génèrerait l'atonie musculaire par l'excitation d'interneurones spinaux ou de pré-motoneurones pontiques localisés dans le GiV. Les neurones cholinergiques du LDT/PPT (vert clair) pourraient contribuer au contrôle du SP en favorisant l'excitabilité du SLD et en facilitant l'inhibition de la vlPAG/DpMe. De plus les neurones MCH de l'hypothalamus tubéral (vert) en inhibant les structures inactives pendant le SP.

permis d'induire des altérations sensibles du SP (Figure 1.2.6 B) (Jego et coll., 2013 ; Tsunematsu et coll., 2014).

Malgré les nombreux efforts dans le but de comprendre le rôle des neurones MCH dans la régulation physiologique du sommeil, leur contribution précise dans les mécanismes liés au SP seul ou au SL et au SP demeure un sujet controversé (*Critical Topics Forum, SLEEP* : Szymusiak, 2013 ; Fraigne et Peever, 2013 ; Jones et Hassani, 2013 ; McGinty et Alam, 2013 ; Luppi et coll., 2013 ; Blouin et Siegel, 2013 ; Pelluru et coll., 2013 ; Jego et Adamantidis, 2013).

Si les neurones MCH semblent jouer un rôle dans la régulation du sommeil, ils ne représentent que 50 % de la totalité des neurones activés après une hypersomnie de SP (Verret et coll., 2003) et constituent une sous-population des neurones GABAergiques activés après une hypersomnie de SP (Sapin et coll., 2010). Des enregistrements juxtacellulaires *in vivo* ont également permis d'identifier une population de neurones GABAergiques n'exprimant pas le peptide MCH actifs pendant le SP, ainsi que des neurones GABAergiques actifs pendant le SL et le SP (Hassani et coll., 2010). Certains de ces neurones pourraient contribuer également à la régulation du SP.

À l'image du *flip-flop switch* entre systèmes d'éveil et VLPO responsable de l'alternance entre éveil et sommeil, l'entrée en SP semble également être contrôlé à travers l'inhibition réciproque entre des populations neuronales inactives pendant le SP localisées en particulier dans le vLPAG et des populations neuronales actives pendant le SP telles que les neurones du SLD. À nouveau, ce mécanisme permet de générer des transitions complètes et rapides vers le SP ainsi que l'expression et le maintien d'un état stable et non pas d'une superposition de plusieurs états.

Ainsi, de nombreux travaux ont permis d'identifier un grand nombre de populations neuronales impliquées dans le contrôle des différents états de vigilance. Toutefois éveil et sommeil pourraient être gouvernés par d'autres systèmes additionnels. Les lésions des neurones monoaminergiques et cholinergiques du tronc cérébral, de l'hypothalamus ou du télencéphale basal ne conduisent qu'à des effets minimes sur l'éveil ou le sommeil, et même des lésions combinées de plusieurs de ces populations conduisent à des effets à peine plus marqués. De même, des lésions larges et complètes du VLPO ne conduisent qu'à une diminution de moitié des quantités de sommeil, suggérant que d'autres systèmes sont en mesure d'assurer la même fonction en inhibant les systèmes ascendants associés à l'éveil. Il est donc très probable que des éléments de ce réseau contrôlant les états de vigilance restent encore à identifier.

Chapitre 3 :

Mécanismes à l'origine de l'alternance entre états de vigilance

Les modifications qui interviennent dans la physiologie interne d'un individu ou dans son environnement peuvent influencer l'alternance entre états de vigilance. Au cours du temps, ces changements peuvent intervenir lentement, alors que les transitions entre états de vigilance sont rapides et sous le contrôle des systèmes détaillés précédemment. Ces systèmes sont cependant modulés par divers facteurs qui reflètent les modifications de la physiologie ou de l'environnement et qui contribuent alors à favoriser l'un ou l'autre des états de vigilance.

3.1. Moteur circadien

À l'image de nombreux autres processus biologiques, l'alternance entre veille et sommeil est soumise à une oscillation circadienne.

3.1.1. Noyau suprachiasmatique, principal oscillateur circadien

Chez les mammifères, le rythme circadien est gouverné par le noyau suprachiasmatique (SCN), une horloge interne centrale qui gouverne un large nombre de comportements et de régulations physiologiques. Les neurones du SCN sont intrinsèquement rythmiques avec une périodicité d'environ 24 heures et ce même en l'absence de source lumineuse. Cette rythmicité est le produit d'interaction entre plusieurs gènes d'horloge (par exemple CLOCK, BMAL, PAR) qui eux-mêmes constituent des facteurs de transcription (Jin et coll., 1999 ; Reppert et Weaver, 2002). L'activité des neurones du SCN est sous le contrôle de l'alternance entre jour et nuit grâce à des entrées en provenance des cellules ganglionnaires photosensibles de la rétine (Gooley et coll., 2001 ; Hattar et coll., 2002). La lésion du SCN ou l'inactivation de certains gènes d'horloge dans le SCN conduisent à la perte de la plupart des rythmes circadiens (Moore et Eichler, 1972 ; Edgar et coll., 1993 ; Bunker et coll., 2000).

Le SCN développe peu de projections vers les centres régulateurs du sommeil ou de l'éveil (Watts et Swanson, 1987 ; Watts et coll., 1987). Néanmoins, la faible projection directe du SCN vers

le VLPO (Novak et Nunez, 2000 ; Sun et coll., 2001 ; Chou et coll., 2002) semble capable de moduler l'activité des neurones du VLPO actifs pendant le SL (Saint-Mleux et coll., 2007).

D'autre part, le SCN ne se contente pas de contrôler l'organisation circadienne de l'organisme, il est également régulé par des mécanismes de rétrocontrôle permettant par exemple de moduler l'activité des neurones du SCN en fonction de l'état de vigilance (Deboer et coll., 2003 ; Buijs et coll., 2006). En particulier, il a été montré par des enregistrements électrophysiologiques *ex vivo* que l'application d'orexine-A pouvait affecter l'activité de neurones du SCN (Klisch et coll., 2009).

3.1.2. Rôle de l'hypothalamus dorsomédial

La majeure partie des projections émanant du SCN se dirigent vers la zone subparaventriculaire ventrale dont la lésion supprime l'oscillation circadienne des états de vigilance (Lu et coll., 2001). Cependant la zone subparaventriculaire ventrale ne développe que peu de projections vers les

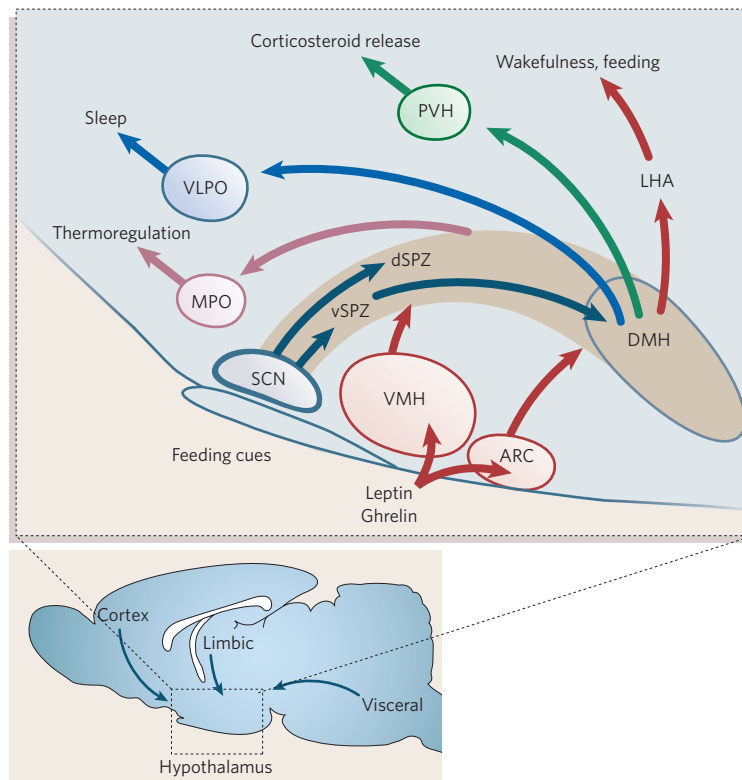


Figure 1.3.1. Intégration circadienne de certains rythmes biologiques.

Le SCN constitue l'horloge centrale, mais envoie peu de projections vers les centres régulateurs des états de vigilance. La majorité de ces projections se développe vers la zone subparaventriculaire ventrale (vSPZ) et dorsale (dSPZ) et indirectement vers le DMH. Les neurones de la vSPZ transmettent les informations pour la régulation circadienne du sommeil alors que les neurones de la dSPZ sont importants pour l'organisation circadienne de la thermorégulation. Le DMH intègre parmi d'autres les informations provenant de la vSPZ et contrôle les rythmes circadiens du sommeil, de l'activité, du comportement alimentaire et de la libération de corticostéroïdes (extrait de Saper et coll., 2005).

systèmes régulant les états de vigilance et projette essentiellement vers l'hypothalamus dorso-médial (DMH) (Chou et coll., 2003 ; Deurveilher et Semba, 2005). Le DMH contient des neurones GABAergiques qui innervent densément le VLPO et des neurones glutamatergiques qui projettent par exemple vers l'hypothalamus tubéral et en particulier vers les neurones orexine (Thompson et coll., 1996 ; Chou et coll., 2003). La lésion du DMH ou la délétion de certains gènes d'horloges responsable de l'oscillation du SCN éliminent en grande partie l'oscillation circadienne du cycle veille-sommeil, ainsi que d'autres rythmes tels que la prise alimentaire, l'activité locomotrice ou la sécrétion de corticostéroïdes, et augmentent les quantités totales d'éveil (Edgar et coll., 1993 ; Wisor et coll., 2002 ; Chou et coll., 2003 ; Laposky et coll., 2005). Cette dernière observation suggère que le système circadien favoriserait la promotion de l'éveil, ce qui serait en accord avec l'organisation des projections du DMH qui inhiberait le VLPO et exciterait les neurones orexine de l'hypothalamus tubéral.

3.1.3. Existence d'autres « oscillateurs esclaves »

Le SCN constitue par des projections directes, ou indirectes via le DMH, l'oscillateur « maître » responsable de l'organisation circadienne des états de vigilance. Cependant, il a été montré récemment que les neurones orexine de l'hypothalamus tubéral et que les neurones noradrénergiques du LC exprimaient le gène d'horloge PER1 et que cette expression oscillait en fonction du cycle circadien (Mahoney et coll., 2013). Une autre étude récente a mis en évidence que la délétion du gène d'horloge BMAL1 spécifiquement dans les neurones histaminergiques du TMN induisait une augmentation de la libération d'histamine pendant la période d'inactivité et conduisait à des altérations profondes du sommeil (Yu et coll., 2014).

Ces études laissent entrevoir la possibilité que certaines structures responsables du contrôle des états de vigilance constitueraient elles-mêmes des oscillateurs « esclaves » sous le contrôle du SCN, l'oscillateur « maître ».

3.2. Moteur homéostatique du sommeil

L'une des propriétés remarquables du SL et du SP est qu'ils sont soumis à une régulation homéostatique : après une privation plus ou moins longue de sommeil, celui-ci se retrouve compensé par une augmentation des quantités de sommeil (Borbely et Tobler, 1985 ; Achermann et Borbely, 2003).

3.2.1. L'adénosine, principale substance hypnogène

Il y a plus de cent ans, Pieron et Ishimori ont indépendamment découvert que le liquide cébrospinal de chiens privés de sommeil contenait des substances hypnogènes (Ishimori, 1909 ; Legendre et Pieron, 1913). Parmi ces substances, l'adénosine a reçu la plus grande attention de la part des chercheurs. L'adénosine est libérée et s'accumule dans l'espace extracellulaire comme un sous-produit du métabolisme cellulaire dans certaines régions cérébrales (Figure 1.3.2) (Radulovacki et coll., 1984 ; Benington et Heller, 1995 ; Porkka-Heiskanen et coll., 1997 ; Porkka-Heiskanen et coll., 2000 ; Strecker et coll., 2000 ; Huang et coll., 2005 ; Scharf et coll., 2008). Dans le cerveau, les réserves énergétiques sont principalement localisées dans les astrocytes sous forme de glycogène dont les taux diminuent au cours d'un éveil prolongé (Kong et coll., 2002). Alors que ces stocks énergétiques sont consommés, les astrocytes relargueraient de l'adénosine dans

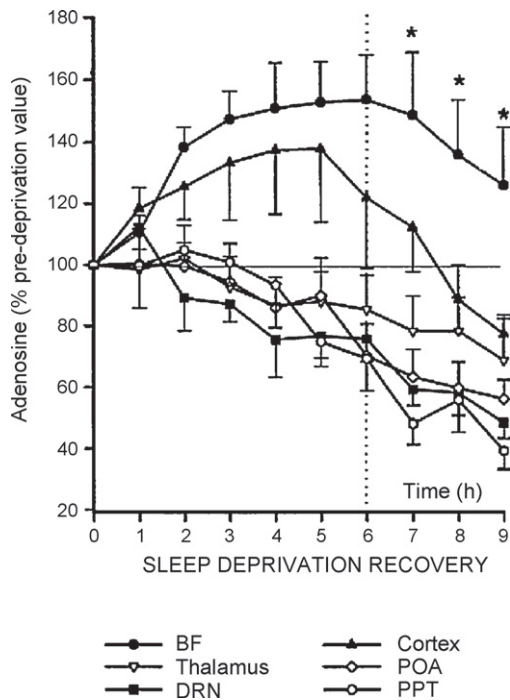


Figure 1.3.2. Modifications de la concentration extracellulaire en adénosine mesurées par microdialyse pendant une privation de sommeil et la période de récupération chez le chat.

Les taux d'adénosine extracellulaire augmentent pendant la privation de sommeil uniquement dans le télencéphale basal (BF, *basal forebrain*) et le cortex, puis diminuent pendant la récupération. Dans les autres régions étudiées, les taux d'adénosine diminuent progressivement (extrait de Porkka-Heiskanen et coll., 2000).

l'espace extracellulaire, cette dernière pourrait ensuite, à mesure qu'elle s'accumule, faciliter l'entrée en sommeil. Ce mécanisme a pu être mis en évidence par l'absence de rebond de sommeil après une privation chez des souris mutantes pour lesquelles la libération d'adénosine par les astrocytes était invalidée (Halassa et coll., 2009).

Il existe dans le cerveau deux types de récepteurs à l'adénosine : les récepteurs A_1 sont inhibiteurs alors que les récepteurs A_{2A} sont excitateurs. Les récepteurs A_1 sont distribués dans tout le cerveau et leur activation pourrait participer à l'inhibition des systèmes associés à l'éveil tels que le LC (Pan et coll., 1995), le TMN (Oishi et coll., 2008), le LDT/PPT (Rainnie et coll., 1994) ou les neurones orexine (Liu et Gao, 2007).

Les récepteurs A_{2A} se trouvent principalement dans le striatum et au niveau du VLPO (Svenningsson et coll., 1997). En particulier, dans le noyau accumbens, ces récepteurs A_{2A} pourraient participer à la régulation du sommeil (Lazarus et coll., 2011 ; Zhang et coll., 2013). Le VLPO semble aussi être une région importante intégrant les effets promoteurs du sommeil de l'adénosine. En effet, l'injection d'un agoniste des récepteurs A_{2A} dans l'espace subarachnoïde situé ventralement au VLPO induit une augmentation des quantités de sommeil et de l'immunoréactivité c-Fos dans le VLPO et le MnPO (Scammell et coll., 2001 ; Kumar et coll., 2013). De plus, des enregistrements électrophysiologiques ont mis en évidence que l'application d'adénosine dans le VLPO réduisait les courants post-synaptiques inhibiteurs sur les neurones actifs pendant le SL (Strecker et coll., 2000 ; Chamberlin et coll., 2003 ; Morairty et coll., 2004) et que l'application d'un agoniste du récepteur A_{2A} avait un effet excitateur direct sur certains de ces neurones du VLPO chez le rat (Figure 1.3.3 A) (Gallopain et coll., 2005). L'adénosine pourrait ainsi participer à la désinhibition des neurones actifs pendant le sommeil du VLPO et faciliter le déclenchement du sommeil.

L'adénosine semble donc jouer un rôle primordial dans la régulation homéostatique du sommeil. Cependant cette substance hypnogène n'est pas la seule. Par exemple, le monoxyde d'azote, la prostaglandine D2, les facteurs de nécrose tumorale, l'interleukine-1 ou encore l'hormone de

libération de l'hormone de croissance pourraient contribuer à la régulation homéostatique du SL, alors que le polypeptide vasointestinal ou la prolactine pourraient participer à la régulation homéostatique du SP (Krueger, 2008 ; Szymusiak et McGinty, 2008).

3.2.2. Régulation homéostatique des ondes lentes

Quelque soit la nature exacte des substances hypnogènes et leur action précise sur chacun des éléments du réseau neuronal contrôlant les états de vigilance, la puissance des ondes lentes pendant le SL constitue un marqueur de l'homéostasie du SL. En effet, un éveil prolongé se traduit par des ondes lentes plus intenses pendant le SL, et cette intensité décroît avec l'avancée du sommeil (Achermann et Borbely, 2003). La puissance des ondes lentes semble ainsi soumise à une régulation homéostatique et refléterait le besoin de sommeil (Vyazovskiy et coll., 2009). De plus, un éveil prolongé induit une augmentation du taux de décharge des neurones corticaux (Vyazovskiy et coll., 2009), et les structures corticales qui ont été particulièrement sollicitées

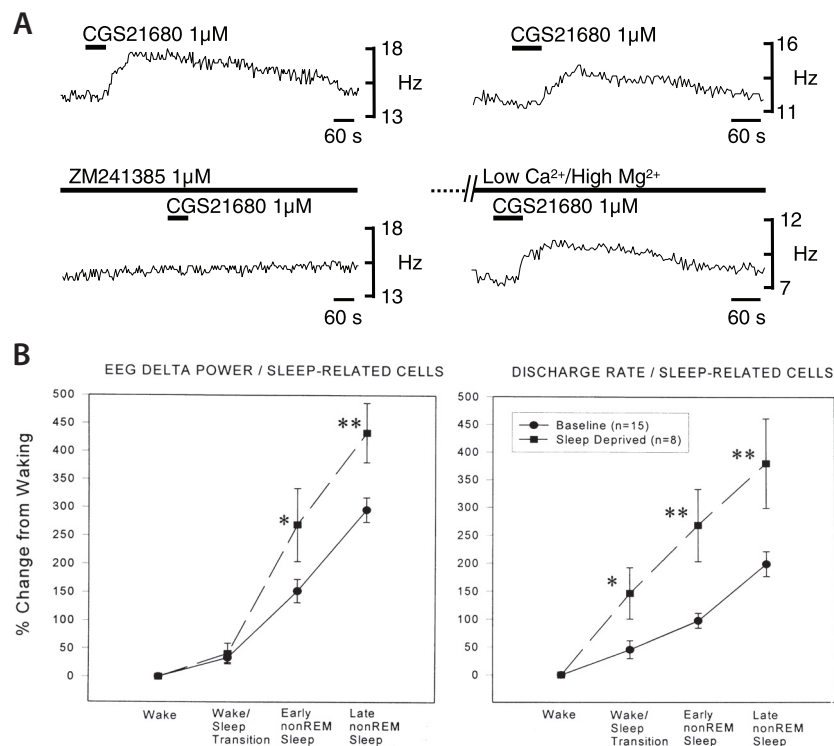


Figure 1.3.3. VLPO et homéostasie du sommeil.

A, Certains neurones du VLPO actifs pendant le SL sont excités par l'application d'un agoniste des récepteurs A_{2A} (CGS21680) ; cet effet est bloqué en présence d'un antagoniste des récepteurs A_{2A} (ZM241385) et persiste en conditions de découplage synaptique (bas Ca²⁺/haut Mg²⁺) (extrait de Gallopin et coll., 2005).

B, Après une privation de sommeil (*Sleep Deprived*), la puissance des ondes lentes mesurée sur l'EEG augmente pendant le SL (*nonREM sleep*) par rapport aux conditions basales (*baseline*) (graphique de gauche). Cet effet s'accompagne pendant la récupération après la privation d'une augmentation de la fréquence de décharge des neurones du VLPO actifs pendant le SL par rapport aux fréquences enregistrées en conditions basales (graphique de droite) (extrait de Szymusiak et coll., 1998).

pendant l'éveil présentent localement une plus grande puissance des ondes lentes pendant le SL suivant, ce qui suggère une nouvelle fois que la puissance des ondes lentes obéit à une régulation homéostatique (Vyazovskiy et coll., 2000 ; Huber et coll., 2004). Pour expliquer ce phénomène, il a été proposé que les ondes lentes pourraient refléter la réorganisation synaptique en réponse à l'activité récente des structures corticales (Vyazovskiy et coll., 2009). Il est également possible que l'activité accrue des neurones corticaux puisse entraîner une augmentation de la concentration en adénosine et en autres facteurs hypnogènes dans l'espace extracellulaire, ce qui faciliterait l'apparition des ondes lentes (Bjorness et coll., 2009 ; Halassa et coll., 2009).

3.2.3. VLPO et régulation homéostatique du sommeil lent

Des enregistrements de l'activité des neurones du VLPO au cours du cycle veille-sommeil ont mis en évidence que l'activité des neurones actifs pendant le SL augmentait avec la puissance des ondes lentes (Szymusiak et coll., 1998). De plus pendant la période de récupération suivant une privation totale de sommeil, la puissance des ondes lentes ainsi que la fréquence de décharge des neurones du VLPO sont toutes deux environ doublées (Figure 1.3.3 B) (Szymusiak et coll., 1998; Alam et coll., 2014). Cependant, dans cette condition, l'activité des neurones du VLPO n'augmente pas pendant la privation et ces neurones ne déchargent pas avant la transition de l'éveil vers le sommeil (Takahashi et coll., 2009). Ainsi, alors que la pression homéostatique s'accumule, celle-ci pourrait affecter l'activité d'autres structures cérébrales telles que le MnPO qui projette vers le VLPO (Chou et coll., 2002) et semble être activée par la privation de sommeil (Gvilia et coll., 2006). Confirmant cette hypothèse, il a pu être montré grâce à des enregistrements juxtacellulaires que l'activité de décharge de neurones du MnPO actifs pendant le sommeil augmentait pendant une privation de sommeil concomitamment à la pression de sommeil, évaluée à travers le nombre de tentative d'entrées en sommeil (Alam et coll., 2014). Ce dialogue entre MnPO et VLPO, respectivement intégrateur de la pression de sommeil et structure exécutive du sommeil, pourrait ainsi permettre une transition rapide entre éveil et sommeil.

3.3. Autres facteurs impactant la transition entre états de vigilance

L'alternance entre états de vigilance est ainsi soumise à deux moteurs circadien et homéostatiques. Cependant d'autres facteurs doivent également être en mesure d'affecter l'éveil ou le sommeil, en particulier lorsque des contraintes environnementales exigent de rester éveillé.

3.3.1. Impact d'un stress comportemental

Le stress comportemental est capable d'induire de profondes altérations du sommeil (Pawlyk et coll., 2008). Par exemple, un stress par immobilisation pendant 2 heures induit, chez le rat, une augmentation des quantités de SP (Rampin et coll., 1991), alors que la même procédure conduite pendant 22 heures diminue fortement SL et SP (Papale et coll., 2005). D'autre part, l'exposition à des chocs électriques est capable d'inhiber fortement le SP (Kant et coll., 1995 ; Palma et coll., 2000 ; Vazquez-Palacios et Velazquez-Moctezuma, 2000).

Dans le cas d'un stress léger induit par une immobilisation de courte durée, l'augmentation des quantités de SP pourrait être causée par une augmentation de la transmission opioïdérique et noradrénergique (Vazquez-Palacios et coll., 2004). Une augmentation de la libération de

prolactine pourrait également expliquer cet effet (Bodosi et coll., 2000). Par ailleurs, les stimuli stressants plus violents (immobilisation de longue durée ou exposition à des chocs électriques) entraînent une augmentation de la libération de nombreux neurotransmetteurs liés à la régulation des états de vigilance parmi lesquels la corticolibérine, la dopamine, la sérotonine ou la noradrénaline (McEwen, 2000). La corticolibérine pourrait constituer l'élément principal expliquant les effets du stress sur le sommeil (Opp, 1995). Par exemple, la corticolibérine infusée dans l'amygdale centrale entraîne une diminution des quantités de SP (Pawlyk et coll., 2006) et l'injection intracérébroventriculaire d'un antagoniste du récepteur CRF_1 à la corticolibérine réduit l'augmentation des quantités d'éveil induite par un stress d'immobilisation (Chang et Opp, 2002). La corticolibérine pourrait également agir sur l'éveil en excitant les neurones orexine par l'activation de récepteurs CRF_1 (Winsky-Sommerer et coll., 2005).

3.3.2. Modulation du sommeil par les systèmes limbiques et corticaux

Le stress induit l'activation de certaines structures limbiques et corticales telles que le cortex infralimbique, la strie terminale ou l'amygdale (Cano et coll., 2008) qui sont aussi fortement impliquées dans les processus liés à l'attention. Ces différentes régions projettent vers le LC, le TMN, l'hypothalamus tubéral ainsi que vers les structures pontiques génératrices du SP (Hurley et coll., 1991 ; Van Bockstaele et coll., 1991 ; Dong et coll., 2001 ; Sakurai et coll., 2005 ; Nakamura et coll., 2009 ; Zhang et coll., 2012). En particulier le cortex infralimbique envoie de nombreuses projections vers le VLPO (Chou et coll., 2002). L'activité de ces structures corticales et limbiques pourraient être cruciales dans la stabilisation de l'éveil lorsque le contexte environnemental le requiert.

Par exemple, il a été montré chez le rat que la lésion du cortex préfrontal ventromédial induit une augmentation des quantités de SP et accroît la fragmentation du sommeil (Chang et coll., 2014). Par ailleurs il existe dans l'amygdale centrale des neurones qui ont une décharge spécifiquement associée à certains états de vigilance (Jha et coll., 2005). De même, l'infusion d'agoniste aux récepteurs métabotropiques au glutamate de type II dans l'amygdale entraîne une diminution des quantités de SP (Dong et coll., 2012), alors que la stimulation électrique de l'amygdale centrale induit des courants excitateurs au niveau des structures pontiques responsables du SP (Xi et coll., 2012). De plus, il a été démontré que des lésions de l'amygdale pouvaient réduire le phénotype narcoleptique de souris déficientes pour le gène codant pour l'orexine (Burgess et coll., 2013). L'ensemble de ces systèmes pourrait ainsi contribuer à la régulation des états de vigilance.

3.3.3. Couplage entre métabolisme et états de vigilance

La privation alimentaire peut également être considérée comme un facteur de stress environnemental, en particulier chez les petits animaux qui possèdent des réserves énergétiques limitées. Expérimentalement, la privation alimentaire se traduit chez les rongeurs par une très forte augmentation de l'éveil et de l'activité locomotrice (Jacobs et McGinty, 1971 ; Dewasmes et coll., 1989 ; Minet-Ringuet et coll., 2004).

Un support neuronal potentiel de ce couplage entre sommeil et métabolisme a été trouvé avec les neurones orexine et les neurones MCH de l'hypothalamus tubéral qui jouent un rôle aussi bien dans la régulation des états de vigilance que dans celle de la prise alimentaire (Nicolaidis, 2006 ; Pissios et coll., 2006 ; Sakurai, 2007 ; Adamantidis et de Lecea, 2008 ; Parker et Bloom, 2012).

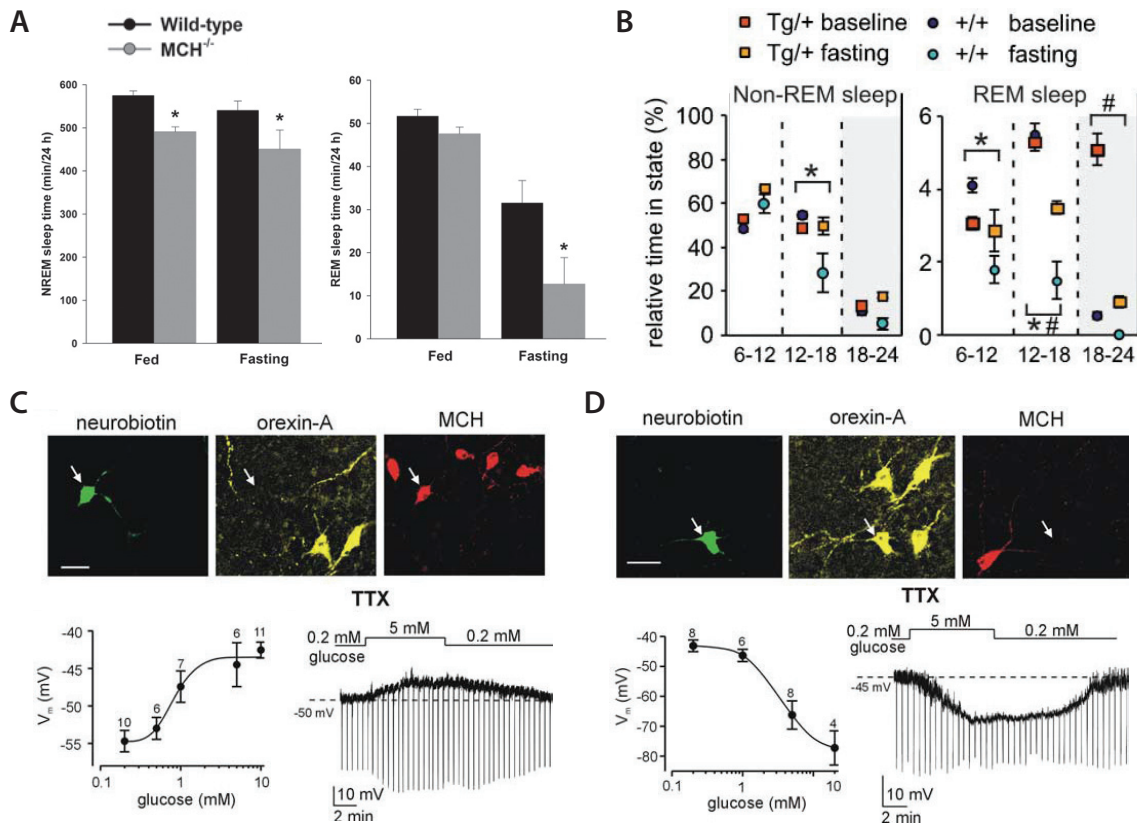


Figure 1.3.4. Rôle des neurones MCH et orexine dans le couplage entre métabolisme et sommeil.

A, La diminution des quantités de sommeil induite par la privation alimentaire (*fasting*) est augmentée chez des souris invalidées pour le gène codant pour l'expression de la MCH (MCH^{-/-}) par rapport à des animaux sauvages (*Wild-type*) (extrait de Willie et coll., 2008).

B, À l'inverse, chez des souris pour lesquelles les neurones orexine ont lésés (souris Tg/+), la perte de sommeil accompagnant une privation alimentaire est réduite par rapport aux animaux sauvages (souris +/+) (extrait de Yamanaka et coll., 2003).

C-D, Un support neuronal de ce couplage entre métabolisme et sommeil peut être trouvé dans la sensibilité au glucose des neurones MCH et orexine : des enregistrements électrophysiologiques sur tranches de cerveaux de souris ont révélé que les neurones MCH sont excités par une élévation de la concentration extracellulaire en glucose (**C**), alors que les neurones orexine sont inhibés (**D**) (extrait de Burdakov et coll., 2005).

En effet le système orexinergique jouerait un rôle dans la facilitation de la prise alimentaire et de la dépense énergétique ainsi que dans certains aspects des mécanismes de récompense associés à la prise alimentaire. Inversement, les neurones MCH seraient impliqués dans l'inhibition de la prise alimentaire et de la dépense énergétique.

Aussi, en réponse à une privation alimentaire, des souris invalidées pour le gène codant pour la MCH sont éveillées plus longtemps et présentent une activité locomotrice accrue (Willie et coll., 2008), alors que la lésion des neurones orexine conduit à une diminution des quantités d'éveil et de l'activité exploratoire en réponse à la même privation alimentaire (Figure 1.3.4 A-B) (Yamanaka et coll., 2003).

Un support neuronal de cet effet éveillant de la privation alimentaire peut être trouvé dans la sensibilité des neurones orexine et MCH au glucose. En effet les neurones orexine sont inhibés par une élévation de la concentration extracellulaire en glucose alors que les neurones MCH sont excités par le glucose (Figure 1.3.4 C–D) (Yamanaka et coll., 2003 ; Burdakov et coll., 2005 ; Burdakov et coll., 2006 ; Kong et coll., 2010).

Toutefois, il est à noter que la prise alimentaire peut également moduler les états de vigilance. Par exemple, la prise de repas riches en carbohydrates ou à fort index glycémique semble augmenter la somnolence ainsi que les quantités de sommeil chez les rongeurs et chez l'homme (Danguir et Nicolaidis, 1979 ; Porter et Horne, 1981 ; Landstrom et coll., 2000 ; Horne et Baulk, 2004 ; Anderson et Horne, 2006 ; Nicolaidis, 2006 ; Afaghi et coll., 2007). Cet effet hypnogène de la prise alimentaire pourrait, de même, résulter des effets respectivement inhibiteur et excitateur du glucose sur les neurones orexine et MCH. Néanmoins, si elle existe, l'action du glucose sur les systèmes exécutifs du sommeil reste à déterminer.

Ainsi, deux moteurs principaux circadien et homéostatique semblent à la source de la régulation de l'architecture du cycle veille-sommeil. À ces moteurs, s'ajoutent un grand nombre de facteurs environnementaux capables également d'impacter l'alternance veille-sommeil. En particulier, le métabolisme semble avoir une influence puissante sur les états de vigilance en favorisant le sommeil lorsque les réserves énergétiques sont comblés et en favorisant l'éveil lorsque les besoins énergétiques sont élevés.

OBJECTIFS ET APPROCHE EXPÉRIMENTALE

De nombreuses études convergent vers la démonstration de l'existence de processus actifs de genèse du SL mettant en jeu des réseaux neuronaux spécifiques et une régulation physiologique propre. En particulier, les neurones localisés dans le VLPO participent à la genèse du SL en exerçant un puissant contrôle inhibiteur sur les différents systèmes favorisant l'éveil (Fort et coll., 2009 ; Saper et coll., 2010). Cependant les mécanismes neurobiologiques conduisant à l'activation des neurones du VLPO, participant donc au déclenchement du SL, demeurent largement incompris.

La pression de sommeil, associée à la somnolence, ferait intervenir différentes voies de régulation circadienne et homéostatique toutes deux capables de moduler l'activité des neurones du VLPO. En effet, le VLPO reçoit des entrées directes et indirectes en provenance du SCN et de la rétine, importantes pour la synchronisation du rythme circadien du sommeil (Novak et Nunez, 2000 ; Chou et coll., 2002 ; Saint-Mleux et coll., 2007). Parallèlement, au cours de l'éveil, des substances hypnogènes telles que l'adénosine s'accumulent progressivement et conduiraient à une augmentation de l'excitabilité des neurones du VLPO actifs pendant le SL (Scammell et coll., 2001 ; Chamberlin et coll., 2003 ; Gallopin et coll., 2005 ; Scharf et coll., 2008), constituant un moteur homéostatique du sommeil. L'une des fonctions du sommeil serait ainsi de restaurer les réserves énergétiques entamées pendant l'éveil (Benington et Heller, 1995 ; Scharf et coll., 2008 ; Siegel, 2009). Dans ce sens, de nombreux travaux suggèrent que l'alternance des états de vigilance pourrait également être sous le contrôle d'un moteur métabolique. En effet, chez les mammifères, la variation d'apport énergétique, en particulier sous forme de glucose, semble capable de moduler les états de vigilance (Danguir et Nicolaidis, 1979 ; Porter et Horne, 1981 ; Landstrom et coll., 2000 ; Horne et Baulk, 2004 ; Anderson et Horne, 2006 ; Nicolaidis, 2006 ; Afaghi et coll., 2007 ; Karnani et Burdakov, 2011).

Néanmoins, les mécanismes physiologiques permettant de coupler l'état métabolique à l'activité des populations neuronales responsables de l'éveil ou du sommeil demeurent incomplètement établis.

Ainsi, il a été démontré, grâce à des préparations *ex vivo*, que l'augmentation de la concentration extracellulaire en glucose induirait une forte inhibition des neurones orexine (Yamanaka et coll., 2003 ; Burdakov et coll., 2005 ; Burdakov et coll., 2006 ; Gonzalez et coll., 2008) considérés comme les chefs d'orchestre des systèmes d'éveil (Adamantidis et coll., 2007). Cette inhibition pourrait contribuer à diminuer l'activité des autres systèmes associés à l'éveil sur lesquels les neurones orexine projettent, et ainsi contribuer à faciliter le déclenchement du sommeil. À l'inverse, lorsque les réserves énergétiques sont faibles, l'excitabilité de ces neurones serait augmentée favorisant ainsi l'éveil.

Suite à la découverte que l'une des principales structures responsable du maintien de l'éveil pouvait être inhibée par une augmentation de la concentration en glucose, nous avons émis l'hypothèse que le glucose pourrait simultanément exciter les neurones du VLPO actifs pendant le sommeil, facilitant ainsi plus fortement le déclenchement et le maintien du SL.

Objectif 1 : Déterminer si les neurones du VLPO actifs pendant le SL constituent des senseurs glucidiques centraux et s'ils participeraient ainsi à un moteur métabolique du sommeil.

Afin de répondre à cette question, nous avons tout d'abord testé si l'injection *in situ* de glucose dans le VLPO pouvait affecter les états de vigilance. Dans cette optique, des guides canule implantés au niveau du VLPO chez des souris préparées pour des enregistrements polysomnographiques chroniques ont permis de délivrer du glucose directement au sein du VLPO et d'évaluer les effets sur le sommeil. Par cette même approche, nous avons également cherché à déterminer si le glucose était capable *in vivo* de moduler l'activité de certaines populations neuronales grâce à l'immunomarquage de la protéine c-Fos, un marqueur d'activation neuronale.

Nous avons ensuite complété cette étude par des expériences d'électrophysiologie *ex vivo* sur tranches de cerveaux de souris, dans le but d'étudier la sensibilité au glucose extracellulaire des neurones du VLPO. Nous avons ainsi mesuré la dépendance à la concentration extracellulaire en glucose de l'activité spontanée en décharge de potentiels d'actions de neurones du VLPO grâce à des enregistrements en configuration *loose cell-attached*. Ces mêmes neurones ont ensuite été soumis à une application de noradrénaline et enregistrés en configuration cellule entière (*whole-cell*) afin de déterminer à quelle sous-population de neurones du VLPO ils appartenaient (Gallopín et coll., 2000 ; Gallopín et coll., 2005) et ainsi tenter de comparer d'éventuels effets du glucose dans les différentes sous-populations neuronales présentes dans le VLPO. Des études pharmacologiques ont également été réalisées afin de caractériser la voie de signalisation mise en jeu dans les effets du glucose.

Par ces diverses approches multidisciplinaires et complémentaires, nous avons pu mettre en évidence que le glucose infusé directement dans le VLPO facilite le déclenchement et le maintien du SL en augmentant l'excitabilité des neurones du VLPO. Les enregistrements en *patch-clamp* nous ont permis de déterminer que ces mêmes neurones actifs pendant le SL sont spécifiquement et directement excités par le glucose dans une gamme de concentrations compatible avec les variations physiologiques de la glycémie dans l'hypothalamus. Cet effet excitateur du glucose est dépendant de son catabolisme conduisant à une inhibition des canaux potassiques sensibles à l'ATP (K_{ATP}). Nous avons ainsi pu mettre en évidence que le glucose est capable d'influencer directement l'activité des neurones responsables du déclenchement du sommeil de manière inverse à ce qui se passe sur les neurones orexine, définissant ainsi un moteur métabolique du sommeil.

L'hypothalamus tubéral contient une autre population neuronale qui pourrait participer à ce couplage entre métabolisme et sommeil : les neurones exprimant le peptide MCH. À l'inverse des neurones orexine et à l'image des neurones actifs pendant le SL du VLPO, les neurones MCH sont excités par une élévation de la concentration extracellulaire en glucose (Burdakov et coll., 2005 ; Kong et coll., 2010) et sont situés, à l'image des neurones orexine, à l'interface entre les réseaux neuronaux régulant la dépense énergétique et le comportement alimentaire et les systèmes contrôlant l'alternance des états de vigilance (Adamantidis et de Lecea, 2008 ; Saito et Nagasaki, 2008 ; Antal-Zimanyl et Khawaja, 2009 ; Pissios, 2009 ; Karnani et Burdakov, 2011 ; Parker et Bloom, 2012).

Néanmoins, la contribution exacte des neurones MCH à la régulation du sommeil total ou du SP exclusivement reste un sujet d'intense débats.

Aussi deux hypothèses quant au rôle de ces neurones se font face. Une première propose que les neurones MCH seraient impliqués dans le déclenchement et le maintien du SP exclusivement

(Peyron et coll., 2009 ; Jego et Adamantidis, 2013 ; Luppi et coll., 2013a ; Luppi et coll., 2013b). Cette hypothèse repose notamment sur l'observation que les neurones MCH ont un taux de décharge maximal pendant le SP (Hassani et coll., 2009) et que l'hypersomnie de SP faisant suite à une privation spécifique de cet état s'accompagne d'un fort marquage c-Fos dans les neurones MCH (Verret et coll., 2003), alors qu'une telle activation neuronale n'est pas observée après un rebond faisant suite à une privation totale de sommeil (Modirrousta et coll., 2005). Ainsi les neurones MCH, spécifiquement actifs pendant le SP, contribueraient à la promotion et au maintien du SP, en particulier par l'inhibition de neurones GABAergiques de la vlPAG qui sont inhibiteurs vis à vis du SP (Clement et coll., 2012).

La seconde hypothèse propose que les neurones MCH constitueraient, avec les neurones du VLPO, une population impliquée dans le déclenchement et le maintien du sommeil (Pelluru et coll., 2013 ; Konadhode et coll., 2014) par le truchement d'une inhibition des neurones orexine (Rao et coll., 2008), conduisant à une diminution de l'activité des systèmes monoaminergiques et cholinergiques associés à l'éveil également inhibés par les neurones du VLPO (Sherin et coll., 1996 ; Sherin et coll., 1998 ; Szymusiak et coll., 2007). Par la suite, l'augmentation de l'activité des neurones MCH et des neurones de l'aire préoptique conduirait à l'inhibition des neurones de la vlPAG inactifs pendant le SP (Kaur et coll., 2009), conduisant ainsi à l'activation des structures responsables du SP. L'arrêt du sommeil serait produit par une auto-inhibition des neurones MCH (Gao et coll., 2003 ; van den Pol et coll., 2004).

Ces deux hypothèses, apparaissant diamétralement opposées, semblent irréconciliables et appellent de nouvelles expériences dans le but de clarifier le rôle des neurones MCH dans le contrôle des états de vigilance, en particulier concernant le SL.

Objectif 2 : Préciser la contribution des neurones sécrétant le peptide MCH dans la régulation physiologique du sommeil.

Afin d'élucider le rôle de ces neurones dans la régulation du sommeil, nous avons tout d'abord utilisé un modèle de souris transgéniques chez lesquelles est induite à l'âge adulte une neurodégénérescence ciblée des neurones MCH par l'expression et l'accumulation par ceux-ci d'ataxine-3, un puissant facteur apoptotique. Ce modèle a été développé dans l'équipe de J. M. Friedman pour préciser la contribution des neurones MCH dans le contrôle de la prise alimentaire et de la dépense énergétique (Alon et Friedman, 2006). Par cette approche, il a été démontré que l'accumulation d'ataxine-3 dans les neurones MCH conduit à une ablation progressive de ceux-ci à partir de la naissance des animaux et la perte neuronale atteint un pallier à partir de la 15^e semaine post-natale. Validant ce modèle expérimental, la perte des neurones MCH s'accompagne dès la 7^e semaine post-natale d'une perte de poids, d'une hypophagie et d'une augmentation de la dépense énergétique (Alon et Friedman, 2006).

Nous avons donc décidé d'étudier ce même modèle murin afin de mesurer les modifications de l'architecture veille-sommeil accompagnant la perte des neurones MCH. La validité de ce modèle a tout d'abord été vérifiée grâce à des techniques d'immunohistochimie afin de quantifier la perte neuronale et de PCR quantitative afin de contrôler les niveaux d'expression de certains marqueurs hypothalamiques. Dans le but de déterminer si la perte de neurones MCH affectait les états de vigilance, le sommeil de ces souris a ensuite été évalué en condition basale et pendant la période de récupération faisant suite à une privation totale de sommeil.

Ces expériences nous ont permis de mettre en évidence que la lésion des neurones MCH perturbe le SL en diminuant la durée des épisodes de SL et en limitant le développement des ondes lentes caractéristiques de cet état, suggérant de fait un rôle de ces neurones dans les mécanismes de consolidation du SL. En revanche, aucun phénotype clair concernant le SP n'a pu être mis en évidence.

Bien que cette approche permette, par opposition aux modèles *knock-out* caractérisés par une déficience dans la signalisation du peptide MCH, d'étudier l'effet de l'absence des neurones MCH, elle présente néanmoins certaines limitations. En particulier, l'ablation des neurones MCH est incomplète, lente et progressive et débute dès la naissance des souris. Ainsi, au cours du temps, de nombreuses adaptations du système peuvent survenir et alors conduire à une compensation de la perte de fonction des neurones MCH, limitant alors l'observation d'effets aigus robustes sur le sommeil. Ces mécanismes compensatoires associés à une lésion incomplète du système MCHergique pourraient ainsi expliquer l'absence d'effet détectable sur le SP ainsi que le phénotype subtile observé pour le SL.

Nous avons donc décidé, dans la même optique de caractériser la contribution des neurones MCH à la physiologie du sommeil, de mettre en œuvre une seconde approche expérimentale : la pharmacogénétique. Cette méthode repose sur l'expression spécifiquement dans les neurones MCH de récepteurs muscariniques, inhibiteurs ou excitateurs, mutés pour être rendus insensibles à l'acétylcholine mais activable par un ligand exogène, la clozapine N-oxide (CNO). Cette expression spécifique dans les neurones MCH est rendue possible grâce à l'utilisation de souris transgéniques exprimant la *cre*-recombinase dans ces neurones combinée à l'injection, dans l'hypothalamus tubéral, d'un vecteur viral contenant une séquence codant pour les récepteurs muscariniques mutés et dont l'expression dépend de la *cre*-recombinase. Cette méthode permet ainsi d'activer ou d'inactiver spécifiquement une population ciblée génétiquement de neurones pendant une période de plusieurs heures, et de manière réversible.

Pour cette étude, trois groupes de souris ont été étudiées de front : celles exprimant le récepteur hM3dq excitateur spécifiquement dans les neurones MCH, celles exprimant le récepteur hM4dq inhibiteur et un groupe contrôle formé de souris transfectées avec un vecteur viral conduisant à l'expression d'un rapporteur fluorescent uniquement. Notre modèle d'étude a tout d'abord été contrôlé afin de s'assurer, par une approche histologique, de la spécificité et de l'efficacité de la technique de transfection. L'expression fonctionnelle des récepteurs a également été contrôlée par des enregistrements électrophysiologiques *ex vivo* réalisés sur tranches d'hypothalamus de souris exprimant les récepteurs hM3dq ou hM4di visant à mesurer les variations de l'activité neuronale des neurones MCH fluorescents en réponse à des applications du CNO.

Nous avons par la suite évalué, par à des enregistrements polysomnographiques sur les trois groupes de souris, les effets sur le cycle veille-sommeil de l'excitation ou de l'inhibition aigües et réversibles des neurones MCH induites par l'administration à différentes concentrations du CNO, le ligand exogène des récepteurs mutés hM3dq et M4di. Nous avons ainsi pu confirmer que l'activation des neurones MCH favorise le déclenchement et la consolidation du SP. De plus, nous avons déterminé que l'inhibition et l'activation des neurones MCH respectivement prolonge et raccourcit la durée des épisodes de SL et que ces effets s'accompagnent de modifications des activités rythmiques électroencéphalographiques pendant le SL. Ces résultats suggèrent donc que les neurones MCH jouent un rôle dans les processus de terminaison des épisodes de SL ainsi que dans la consolidation de ceux-ci.

Ainsi, l'ensemble de ces expériences nous a permis de préciser la contribution des neurones MCH dans certains aspects de la régulation du cycle veille-sommeil. En particulier, nous avons pu mettre en évidence que ces neurones jouent un rôle dans la consolidation du SL ainsi que dans les mécanismes de terminaison des épisodes de SL. Nous avons également été en mesure de confirmer leur implication dans les mécanismes de transition entre SL et SP ainsi que dans la promotion et la consolidation du SP.

Ces résultats expérimentaux démontrent pour la première fois que les neurones MCH contribueraient activement à la régulation du SL en réprimant celui-ci, en complément de leur rôle facilitateur du SP.

Une cible potentielle permettant d'expliquer cet effet répressur sur le SL pourrait être le VLPO. En effet, ce noyau promoteur du SL contient une très forte densité d'axones et de boutons synaptiques immunoréactifs à la MCH ainsi qu'une expression substantielle de récepteurs MCH-R1 (Bittencourt et coll., 1992 ; Chee et coll., 2013), suggérant l'existence d'une connexion anatomique entre ces deux structures hypothalamiques.

Nous formulons donc l'hypothèse que les neurones MCH pourraient contribuer à l'inhibition du SL et favoriser la transition vers le SP à travers l'inhibition des neurones du VLPO actifs pendant le SL.

Objectif 3 : Déterminer la contribution à la régulation des états de vigilance – et en particulier de la transition entre SL et SP – de la projection des neurones MCH sur le VLPO.

Pour tester cette hypothèse fonctionnelle, nous avons choisi de développer une approche expérimentale *in vivo* reposant sur l'utilisation d'outils d'optogénétique. Cette technique permet de manipuler l'activité d'une population de neurones ciblée génétiquement avec une résolution temporelle très fine. Un autre avantage technologique majeur est qu'elle permet de focaliser l'étude sur une seule des multiples cibles cérébrales du système MCH, ici le VLPO, et ainsi d'isoler son rôle spécifique dans la régulation de la vigilance.

Pour atteindre cet objectif, nous avons utilisé, à nouveau, les souris transgéniques exprimant la cre-recombinase sous le contrôle du promoteur du gène codant pour la MCH. Ces souris ont reçu dans l'hypothalamus tubéral des injections d'un vecteur viral associé à l'adénovirus permettant l'expression dépendante de la cre-recombinase d'un canal cationique photo-activable par une lumière bleue (channelrhodopsine, ChR2). Une trentaine de jours après l'injection, la ChR2 est alors exclusivement et puissamment exprimée et adressée à la membrane somato-dendritique des neurones MCH mais surtout dans leurs axones et terminaisons synaptiques, en particulier au sein du VLPO. Ensuite, l'application d'un flash lumineux au travers d'une fibre optique implantée à demeure bilatéralement au dessus du VLPO permet de stimuler spécifiquement les terminaisons axonales MCH présentes en son sein provoquant la libération, sur les neurones promoteurs du SL, des neurotransmetteurs qu'elles véhiculent comme le GABA et la MCH. Par cette approche chez la souris libre de ses mouvements, nous avons pu analyser directement l'impact sur le cycle veille-sommeil, et en particulier sur l'alternance SL-SP, de ces stimulations optogénétiques et donc de déterminer la contribution fonctionnelle à cette régulation physiologique spécifiquement exercée par la connexion entre les neurones MCH et ceux du VLPO.

Bien que nos résultats soient encore préliminaires, nous mettons en évidence par cette approche expérimentale que l'activation des terminaisons axonales des neurones MCH dans le VLPO facilite l'arrêt du SL et favorise l'émergence d'un état de transition intermédiaire entre le SL et le SP. Toutefois, et de manière inattendue, cela ne semble affecter ni la promotion du SP ni la

consolidation de cet état. Ces données suggèrent que les neurones MCH, via le recrutement du VLPO, participeraient au contrôle de la transition entre SL et SP sans être capable pour autant de faciliter le déclenchement du SP. Néanmoins des études complémentaires seront nécessaires afin de préciser le mode d'action et la connectivité fonctionnelle entre les neurones MCH et les différentes sous-populations neuronales dans le VLPO.

RÉSULTATS

Chapitre 1 :

Activation par le glucose des neurones actifs pendant le sommeil lent de l'aire préoptique ventrolatérale — mise en évidence d'un moteur métabolique du sommeil

1.1. Présentation du premier article

Comme indiqué précédemment dans l'introduction, des neurones localisés dans l'aire préoptique ventrolatérale (VLPO) occupent une place de choix dans les processus à l'origine du déclenchement et du maintien du SL de part les connexions inhibitrices réciproques qu'ils développent avec les systèmes monoaminergiques et cholinergiques responsables de l'éveil (Fort et coll., 2009 ; Saper et coll., 2010). Par ailleurs, l'une des fonctions principales du sommeil serait de permettre la restauration des réserves énergétiques entamées pendant l'éveil (Benington et Heller, 1995). Sommeil et métabolisme semblent ainsi étroitement liés. En effet, l'éveil est augmenté par la privation alimentaire alors que le sommeil, ou *a minima* la somnolence, semble favorisé en réponse à une prise alimentaire (Roky et coll., 1999 ; Minet-Ringuet et coll., 2004 ; Jenkins et coll., 2006). Néanmoins, les mécanismes neurobiologiques sous-jacents de ce couplage entre l'état métabolique du de l'organisme et l'activité des structures responsables de l'éveil et du sommeil demeurent largement incompris.

Il a cependant été démontré récemment que les neurones sécrétant le peptide orexine et directement impliqués dans le maintien de l'éveil (Adamantidis et coll., 2007 ; Tsujino et Sakurai, 2009) sont fortement inhibés en réponse à une augmentation de la concentration extracellulaire en glucose (Yamanaka et coll., 2003 ; Burdakov et coll., 2006 ; Gonzalez et coll., 2008). Cette inhibition des neurones orexine pourrait contribuer à diminuer l'activité des autres systèmes associés à l'éveil et ainsi favoriser le déclenchement du sommeil.

Alors que ces résultats indirectement renforcent l'hypothèse d'un rôle facilitateur du glucose sur le déclenchement du sommeil par l'inhibition de l'éveil, une action excitatrice directe du glucose sur les populations neuronales responsables du déclenchement et du maintien du SL n'a jamais été envisagée ou testée jusqu'à présent.

Dans ce contexte, notre présente étude démontre que l'infusion bilatérale de glucose dans le VLPO induit une augmentation des quantités de SL ainsi que de la densité de neurones immunoréactifs pour la protéine c-Fos spécifiquement dans le VLPO. Au moyen d'enregistrements électrophysiologiques *ex vivo* sur tranches de cerveaux de souris, nous avons ensuite mis en évidence que les neurones du VLPO présentant les caractéristiques des neurones actifs pendant le SL sont spécifiquement excités par le glucose dans une gamme de concentrations compatible avec les variations physiologiques du glucose dans l'hypothalamus. Cet effet excitateur du glucose interviendrait grâce à la métabolisation par les neurones du glucose en ATP, qui, par la suite, inhiberait les canaux potassiques sensibles à l'ATP (K_{ATP}), provoquant ainsi une dépolarisation des neurones.

Ces résultats démontrent qu'un apport énergétique local est capable de maintenir un puissant tonus excitateur sur les neurones responsables du déclenchement et du maintien du SL. À l'inverse une diminution des niveaux de glucose circulant pourrait réduire l'activité de ces mêmes neurones et faciliter ainsi le maintien de l'éveil et donc l'expression de comportement associés à la recherche de sources alimentaires. De plus, ces données renforcent l'hypothèse d'un moteur métabolique qui agirait de concert avec les moteurs circadien et homéostatique pour la régulation du sommeil.

Glucose Induces Slow-Wave Sleep by Exciting the Sleep-Promoting Neurons in the Ventrolateral Preoptic Nucleus: A New Link between Sleep and Metabolism

Christophe Varin,^{1,2,3,4} Armelle Rancillac,^{1,2} Hélène Geoffroy,^{1,2} Sébastien Arthaud,^{3,4} Patrice Fort,^{3,4} and Thierry Gallopin^{1,2}

¹Brain Plasticity Unit, Sleep Neuronal Networks Team, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 8249, 75005 Paris, France, ²Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles ParisTech, 75005 Paris, France, ³Physiopathologie des Réseaux Neuronaux Responsables du Cycle Veille-Sommeil Team, INSERM, U1028, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 5292, Lyon Neuroscience Research Center, 69372 Lyon, France, and ⁴University Lyon 1, 69000 Lyon, France

Sleep-active neurons located in the ventrolateral preoptic nucleus (VLPO) play a crucial role in the induction and maintenance of slow-wave sleep (SWS). However, the cellular and molecular mechanisms responsible for their activation at sleep onset remain poorly understood. Here, we test the hypothesis that a rise in extracellular glucose concentration in the VLPO can promote sleep by increasing the activity of sleep-promoting VLPO neurons. We find that infusion of a glucose concentration into the VLPO of mice promotes SWS and increases the density of c-Fos-labeled neurons selectively in the VLPO. Moreover, we show in patch-clamp recordings from brain slices that VLPO neurons exhibiting properties of sleep-promoting neurons are selectively excited by glucose within physiological range. This glucose-induced excitation implies the catabolism of glucose, leading to a closure of ATP-sensitive potassium (K_{ATP}) channels. The extracellular glucose concentration monitors the gating of K_{ATP} channels of sleep-promoting neurons, highlighting that these neurons can adapt their excitability according to the extracellular energy status. Together, these results provide evidence that glucose may participate in the mechanisms of SWS promotion and/or consolidation.

Key words: glucose; homeostasis; hypothalamus; polysomnography; preoptic nucleus; sleep

Significance Statement

Although the brain circuitry underlying vigilance states is well described, the molecular mechanisms responsible for sleep onset remain largely unknown. Combining *in vitro* and *in vivo* experiments, we demonstrate that glucose likely contributes to sleep onset facilitation by increasing the excitability of sleep-promoting neurons in the ventrolateral preoptic nucleus (VLPO). We find here that these neurons integrate energetic signals such as ambient glucose directly to regulate vigilance states accordingly. Glucose-induced excitation of sleep-promoting VLPO neurons should therefore be involved in the drowsiness that one feels after a high-sugar meal. This novel mechanism regulating the activity of VLPO neurons reinforces the fundamental and intimate link between sleep and metabolism.

Introduction

An organism's energy status has a significant impact on the regulation of vigilance states, as evidenced by several reports (Benington and Heller, 1995; Scharf et al., 2008; Siegel, 2009).

Specifically, wakefulness is enhanced during fasting, whereas resting (i.e., sleeping/napping) is favored after food intake (Roky et al., 1999; Minet-Ringuet et al., 2004; Jenkins et al., 2006). Orexinergic neurons involved in arousal maintenance (Adamantidis et al., 2007; Tsujino and Sakurai, 2009) are inhibited by a rise in extracellular glucose concentration (Yamanaka et al., 2003; Burdakov and Alexopoulos, 2005; Burdakov et al., 2005), suggesting that ingesting a sweet meal may lead to an inhibition of

Received Feb. 13, 2015; revised May 29, 2015; accepted June 2, 2015.

Author contributions: C.V., P.F., and T.G. designed research; C.V., A.R., H.G., S.A., and T.G. performed research; C.V., S.A., and T.G. analyzed data; C.V., A.R., P.F., and T.G. wrote the paper.

This work was supported by the Fondation Pierre-Gilles de Gennes pour la Recherche (Grant ANR-12-JSV4-0001-01), the Centre National de la Recherche Scientifique, and Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles ParisTech. We thank Brandon Loveall of Improvence for English proofreading and Karim Benchenane for invaluable comments on the manuscript.

The authors declare no competing financial interests.

Correspondence should be addressed to Thierry Gallopin, PhD, Brain Plasticity Unit, CNRS UMR 8249, ESPCI ParisTech, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris, France. E-mail: thierry.gallopin@espci.fr.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.0609-15.2015

Copyright   2015 the authors 0270-6474/15/359900-12\$15.00/0

these arousal-related neurons and therefore a sensation of sleepiness. Despite the strong support for these observations, it has never been investigated whether neurons responsible for sleep induction and maintenance are influenced directly by the availability of energy and how they can adjust the animal's behavior to accommodate the energy state.

Numerous studies have shown that sleep-active neurons located within the ventrolateral preoptic nucleus (VLPO) play a crucial role in promoting and maintaining slow-wave sleep (SWS) (Sherin et al., 1996; Szymusiak et al., 1998; Saper et al., 2001; Takahashi et al., 2009). These neurons contain GABA and project to the wake-promoting systems (Sherin et al., 1998; Steininger et al., 2001). Neurons within the VLPO are therefore in a suitable position to favor SWS onset through an overall repression of the wake-promoting neurons. However, the mechanisms responsible for VLPO activation at sleep onset and deactivation during arousal remain poorly understood. To address this issue, we hypothesize that sleep-promoting VLPO neurons may integrate metabolic signals such as ambient glucose to modulate sleep propensity.

Here, we demonstrate in mice that bilateral microinjections of glucose into the VLPO significantly increase sleep and the density of c-Fos-expressing neurons specifically within the VLPO. In acute VLPO brain slices, we found that glucose specifically increases the excitability of neurons exhibiting properties of sleep-promoting neurons. This effect requires the intraneuronal metabolism of glucose to ATP, which in turn inhibits ATP-sensitive potassium (K_{ATP}) channels. These novel results provide strong evidence that VLPO neurons may be considered as a central glucose-sensing structure that contributes directly to sleep control in response to the fine tuning of the organism's metabolic status.

Materials and Methods

Animal experiments. Animal experiments were performed in accordance with the guidelines of the Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles ParisTech/University Claude Bernard, Lyon I/Centre National de la Recherche Scientifique Animal Care and Use Committee.

In vivo glucose microinjection and sleep monitoring. To monitor the effects of glucose microinjections into the VLPO on vigilance states, 8 male C57BL/6j mice (10 weeks of age; Charles River) were anesthetized intraperitoneally with a ketamine/xylazine mix (100 and 10 mg/kg, respectively), mounted on a stereotaxic frame (David Kopf Instruments), and implanted with a bilateral guide cannula (26G; Plastics One) placed 1 mm above the targeted bilateral VLPO (AP: -0.1 mm; ML: 0.7 mm; DV: 4.5 mm) according to the Franklin and Paxinos atlas (2007). Mice were then prepared for polysomnographic recordings. Two stainless-steel screws (Plastics One) were implanted over the parietal cortices and one screw was implanted over the cerebellar cortex for EEG recordings. Two gold-coated electrodes were inserted into neck muscles to record EMG activity. The cannula guide and EEG/EMG electrodes soldered to a miniature plug (Plastics One) were fixed to the skull using Super-Bond (Sun Medical) and finally secured with acrylic dental cement (Paladur). For sleep recording and glucose infusion, mice were allowed to recover from surgery for 7 d and then housed in individual Plexiglas barrels with woodchip bedding and connected to a cable allowing free movements during continuous polysomnographic recording. Barrels were placed in an insulated soundproof box maintained under the following standard laboratory conditions: a 12 h/12 h light-dark cycle (lights on at 8:00 A.M.), $22 \pm 1^\circ\text{C}$ temperature, and access to water and food pellets *ad libitum*. After habituation, mice were treated with 0.3 μl of artificial CSF (ACSF) vehicle or 5 mM glucose (in ACSF vehicle) or 10 mM glucose (in ACSF vehicle) by pressure infusion in each hemisphere. ACSF vehicle contained the following (in mM): 137 NaCl, 2.7 KCl, 1.3 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 10 Na_2HPO_4 , and 1.76 KH_2PO_4 , pH 7.4. In all solutions, osmolality was equilibrated by adjusting sucrose concentration. All solutions were

stored at -20°C at their final concentration. All animals underwent 3 bilateral injections of vehicle, glucose 5 mM, and glucose 10 mM in a randomized order with treatments spaced by 2 d. For this, a 5 μl Hamilton syringe placed in a syringe pump (0.1 $\mu\text{l}/\text{min}$; New Era Pump Systems) was connected to the internal cannula (33G; Plastics One), which protruded out 1 mm from the guide cannula into VLPOs. Injections started at 9:00 A.M. Under isoflurane sedation (induction 2%, maintenance 1.5%) to minimize contention stress, injection cannulas were lowered into the brain and left in place for 5 min before and after infusion. Animals regained consciousness immediately after the removal of isoflurane. Isoflurane exposure never exceeded 18 min. During the injection procedure, animals were unplugged from the recording cable. Immediately after the end of the procedure, animals were returned to their barrels, reconnected to the cable, and polysomnographic recordings were begun. Acquired EEG and EMG signals were amplified (MCP+; Alpha-Omega Engineering), digitalized, and collected via a CED interface with Spike2 software (Cambridge Electronic Design) at a sampling frequency of 520.8 Hz. Three vigilance states, wake (W), SWS, and paradoxical sleep (PS), were scored and quantified offline in 5 s epochs. During W, desynchronized low-amplitude EEG was accompanied by a sustained EMG activity with phasic bursts; SWS was distinguished by high-voltage slow waves and the disappearance of phasic muscle activity. PS onset was signaled by a muscle atonia associated with decreased EEG amplitude including a regular and pronounced theta rhythm. Hypnograms were then drawn directly using a custom script in Spike2 (Cambridge Electronic Design). The values were finally exported to calculate standard parameters for each vigilance state (durations, percentage, number, and episode duration expressed as mean \pm SEM). In addition, normalized EEG spectral power was calculated during W, SWS, and PS with a Spike2 script computing a fast Fourier transform on 5 s EEG epochs (0.1 Hz resolution). The mean (\pm SEM) power for each EEG spectral band was then calculated as follows: δ , 0.5–4.5 Hz; θ , 5–9 Hz; σ , 10–14 Hz; β , 15–30 Hz; γ , 31–48 Hz). To detect statistical significance, data were analyzed as follows: for each vigilance state (W, SWS, PS), effect of glucose concentrations (vs vehicle) was tested using nonparametric Friedman tests. To detect pairwise differences, *post hoc* Wilcoxon tests were applied and corrected for multiple comparisons (Bonferroni correction). Each animal served as its own control. Significance was set at $p < 0.05$.

c-Fos immunohistochemistry. For c-Fos immunohistochemistry experiments, the same mice used for bilateral injections (described above) were injected under isoflurane sedation a fourth time into the VLPO with glucose (10 mM) in one hemisphere (randomly chosen) and vehicle in the contralateral hemisphere. Killing and perfusion of animals were performed 90 min after treatment. Under deep pentobarbital anesthesia (150 mg/kg, i.p.; Ceva Santé Animale), mice were transcardially perfused with Ringer's lactate solution containing 0.1% heparin, followed by cold 4% paraformaldehyde solution in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. Brains were removed, postfixed overnight in 4% paraformaldehyde at 4°C and cryoprotected in 30% sucrose solution for two d at 4°C . Brains were then frozen in dry-ice-cooled methylbutane and cut into 30- μm -thick coronal sections on a cryostat (Microm). Collected free-floating sections were successively incubated in the following: (1) rabbit anti-c-Fos antiserum (1:8000; Merck) in PBS containing 0.3% Triton X-100 and 0.1% sodium azide for 3 d at 4°C ; (2) a biotinylated goat anti-rabbit IgG (1:1000; Vector Laboratories) for 90 min at room temperature; and (3) an ABC-HRP complex (1:1000; Elite kit; Vector Lab) for 90 min at room temperature. The sections were then immersed in 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 7.6, containing 0.025% 3,3'-diaminobenzidine-4HCl (DAB; Sigma-Aldrich), 0.003% H_2O_2 , and 0.6% nickel ammonium sulfate for 20 min at room temperature. Three 10 min washes were performed between each incubation step. The staining appeared as a dense black nuclear coloration of c-Fos-immunoreactive (Fos+) neurons. The stained sections were finally mounted on glass gelatin-coated slides, counterstained with neutral red to delineate forebrain areas, dried, dehydrated, and coverslipped with DEPEX (VWR). The anti-c-Fos antiserum was made against a synthetic peptide corresponding to the N-terminal part (residues 4–17) of human Fos. This part of the protein displays 100% homology among human, rat, and mouse and shares no homology with

Fos-related antigens such as Fos B, Jun B, Fra-1 and Fra-2 (Blast 2 sequences; National Center for Biotechnology Information).

For each mouse used ($n = 8$), Fos-labeled sections evenly spaced throughout the rostrocaudal extent of the VLPO ($n = 4$ sections) were analyzed with an Axioskop 2 plus microscope (Zeiss) equipped with a motorized X–Y-sensitive stage and a video camera connected to a computerized image analysis system. Fos+ neurons were plotted using the Mercator version 2 software (ExploraNova). Mean amounts of Fos+ cells (\pm SEM) were calculated in both hemispheres (glucose vs vehicle) for the VLPO and three neighboring basal forebrain nuclei, the magnocellular nucleus (MCPO), the lateral preoptic area (LPOA) and the medial preoptic area (MPOA). The counting of Fos+ cell bodies within the MCPO, LPOA, and MPOA was computed according to their respective boundaries and surface areas; the latter two were determined by the changes in cellular densities and morphologies as revealed by neutral red counterstaining. In the VLPO, the quantification of Fos+ cells was performed by considering a half-ellipsoid area in the most ventral part of the basal forebrain (200–250 μm wide, 300–400 μm deep) drawn laterally to the optic chiasma (rostral sections) or to the supraoptic nucleus (caudal sections) (Takahashi et al., 2009). Fos+ neuronal densities were computed using surfaces of areas determined with neutral red staining. Photomicrographs were taken with a CCD Color 10-bit QiCam camera, imported into Adobe Photoshop version 7.0, digitally adjusted for brightness and contrast, and assembled into plates at a resolution of 300 dpi.

Slice preparation for electrophysiology and single-cell RT-PCR. In preparation for electrophysiology and single-cell RT-PCR (scRT-PCR), brain slices containing the VLPO were obtained from 14- to 18-d old male C57BL/6J mice (Charles River) maintained on a 12 h/12 h light-dark cycle (lights on at 8:00 A.M.). Food and water were continuously available. All experiments were performed during the light phase. The animals were decapitated and brains were quickly removed. Coronal slices (300 μm thick) were cut with a vibrating microtome (VT2000S; Leica) in cold slicing ACSF at 4°C. Slices were left to recover for at least 30 min before transfer to the recording chamber, where they were superfused with ACSF saturated with 95% O₂ and 5% CO₂ (at 32°C).

Electrophysiological experiments. ACSF contained the following (in mM): 130 NaCl, 5 KCl, 2.4 CaCl₂, 20 NaHCO₃, 1.25 KH₂PO₄, 1.3 MgSO₄, 10 D-glucose, and 15 sucrose, pH 7.35, and was constantly oxygenated (95% O₂/5% CO₂). During slicing, 1 mM kynurenatate was added to the ACSF. Individual slices were then transferred to a thermoregulated (32.5°C) chamber (Badcontroller V; Luigs & Neumann), placed under a microscope (Axioskop2FS; Zeiss) equipped with an infrared CCD camera (CoolSNAP HQ²; Roper Scientific). Slices were maintained immersed and continuously superfused at 3–5 ml/min with oxygenated kynurenatate-free ACSF. All electrophysiological experiments were performed with a MultiClamp700B (Molecular Devices) amplifier connected to an acquisition board (Digidata 1440; Molecular Devices) attached to a computer running pCLAMP software (Molecular Devices).

Extracellular recordings in loose-cell-attached configuration. Loose-cell-attached patch-clamp recordings were performed to monitor stable spontaneous firing activity of VLPO neurons for long periods of time, which is necessary for completing pharmacological experiments. Infrared videomicroscopy was used to choose VLPO neurons visually. Loose-cell-attached recordings were performed from the soma with patch micropipettes (3–6 M Ω) pulled from borosilicate glass capillary tubes (1.5 mm outer diameter, 0.86 mm inner diameter; Harvard Apparatus) on a horizontal puller (model P-1000; Sutter Instruments). Micropipettes were filled with oxygenated ACSF and fixed to an electric microdrive (Luigs & Neumann). The micropipette was placed in contact with the soma of a selected neuron under visual control. During recordings, a seal resistance of 10–15 M Ω was maintained to avoid damage or mechanical stimulation to the cell. Data are expressed as mean \pm SEM. Values were compared using nonparametric Wilcoxon tests or permutation tests according to sample sizes. A p value \leq 0.05 was considered statistically significant.

Patch-clamp recordings in whole-cell configuration. In whole-cell patch-clamp configuration, recordings were performed with patch-clamp pipettes (3–6 M Ω) filled with 8 μl of internal solution containing the

following (in mM): 144 K-gluconate, 3 MgCl₂, 0.2 EGTA, 10 HEPES, 1.25 ATP, pH 7.2, 285–295 mOsm. The pipette was slowly brought to on the selected neuron to be recorded in whole-cell configuration using infrared videomicroscopy guidance and clamped at -60 mV. During whole-cell patch-clamp recordings, the intrinsic membrane properties of neurons were assessed by applying current steps (800 ms) from -100 pA to firing saturation in 10 pA increments.

Pharmacological studies. The following drugs were used: noradrenaline (NA, 100 μM ; Sigma-Aldrich); α -cyano-4-hydroxycinnamate (4-CIN, 500 μM ; Sigma-Aldrich); pinacidil (500 μM ; Sigma-Aldrich); diazoxide (300 μM ; Sigma-Aldrich); and tolbutamide (500 μM ; Sigma-Aldrich). Stock solutions of NA (100 mM; water), 4-CIN (500 mM; DMSO), pinacidil (500 mM; DMSO), diazoxide (300 mM; NaOH 0.1 M), and tolbutamide (500 mM; NaOH 0.1 M) were stored as frozen aliquots at -20°C . Before application, drugs were dissolved in ACSF to their working concentrations. Various concentrations of D-glucose (1, 2.5, 5, 10, 25 mM), 2-deoxy-D-glucose (2-DG, 7.5 mM; Sigma-Aldrich), and alloxan (10 mM; Sigma-Aldrich) in the ACSF were tested on the activity of VLPO neurons. For these experiments, ACSF osmolarity was equilibrated systematically by adjusting the sucrose concentration. Note that the addition of sucrose to compensate medium osmolarity has no effect on energetic metabolism. Indeed, our RT-PCR control experiments confirmed the absence in the VLPO of mRNAs that encode the enzyme sucrose isomaltase, which is involved in breaking down sucrose and maltose, by comparing RT-PCR products of cDNA originating from 2.8 ng of RNA prepared from microdissected VLPO (homemade) and small intestine (Biochain). Sucrase isomaltase was detected in the small intestine and not in the VLPO (data not shown). Eventually, the postsynaptic action of glucose was tested in the synaptic uncoupling condition on neurons recorded in the loose-cell-attached configuration. For these experiments, slices were first submitted to a pretreatment (\sim 10 min) with a modified ACSF containing low Ca²⁺ (0.1 mM) and high Mg²⁺ (10 mM) concentrations. This condition is known to completely block the release of calcium-dependent neurotransmitters. The effects of glucose in the synaptic uncoupling condition were evaluated under various concentrations in this low Ca²⁺/high Mg²⁺ medium.

Studies of the K_{ATP} -dependent current were performed in voltage-clamp mode. The membrane potential was maintained at -75 mV and membrane currents were measured with two 100 ms potential steps at -65 mV and -85 mV separated by 100 ms. Steps were followed after 100 ms by a potential ramp from -115 mV to -45 mV within 400 ms. This stimulation protocol was repeated every 10 s. All membrane potentials were corrected for liquid junction potential (-15 mV). We applied a hyperpolarizing voltage step (10 mV) before each stimulation to monitor passive electrical properties of the recorded cell, as well as access resistance, which did not vary $>20\%$ during the analyzed recording period. Access resistance was not compensated.

scRT-PCR. The intrinsic membrane properties were determined in whole-cell current-clamp mode in a period not exceeding 10 min to minimize potential mRNA degradation. The cytoplasm was then aspirated into the patch pipette under visual control. The quality of the seal was monitored during harvesting to prevent extracellular contamination. The content of the pipette was expelled into an RNase-free PCR tube and the RT-PCR protocol was performed as described previously (Lambolez et al., 1992; Gallopin et al., 2006). The scRT-PCR protocol was designed to detect simultaneously the expression of the two isoforms of glutamic acid decarboxylase (GAD65 and GAD67), the four subunits composing K_{ATP} channels (Kir6.1, Kir6.2, SUR1, SUR2), one glucose transporter (GLUT3), and glucokinase (GK), a requirement for the entry of glucose into glycolysis. To amplify GK, GAD65, and GAD67 mRNAs, two primers sets, GK(1) and GK(2), GAD65(1), GAD65(2), GAD67(1), and GAD67(2), were designed. After the RT reaction, the cDNAs present in 10 μl of solution were first amplified simultaneously using the primers listed in Table 1. Taq polymerase (2.5 U; QIAGEN) and 20 pmol concentrations of each primer (Table 1) were added to the buffer supplied by the manufacturer (final volume, 100 μl) and 21 cycles of PCR were run (94°C for 30 s; 60°C for 30 s; 72°C for 35 s). The second amplification was performed using 1 μl of the first PCR product as a template. Each cDNA was amplified individually with a

Table 1. PCR primers

GenBank accession no.	First PCR primers	Size (bp)	Second PCR nested primers	Size (bp)
GAD65 (1) NM_008078	PPM25176G-200	84	PPM25176G-200	84
GAD65 (2) NM_008078	CCAAAAGTTCACGGGCGG, TCCTCCAGATTTTGGGTTG	375	CACCTGCGACAAAAACCCT, GATTTTGGGTTGGTCTGCC	248
GAD67 (1) NM_008077	PPM36500F-200	121	PPM36500F-200	121
GAD67 (2) NM_008077	ATGATACTTGGTGTGGCGTAGC, GTTTGCTCCTCCCGTCTTAG	253	CAATAGCTGGAAGAGAAGAGTCG, GTTTGCTCCTCCCGTCTTAG	177
SUR1 NM_011510.3	CACCGCTGTTCTGCTGCT, CGCTCTGGGTTGCTGTCT	523	TCATCGGAGGCTTCTCACC, TCTTCTCCTCGCTGTCTGG	208
SUR2 NM_001044720.1	GCAGTCAAAGCCATCATCAGTGT, CAAGGATGGAAGGAGAAGAG	373	CTTGAGCGATGAGATTGGTGAGG, AGATGATTTCCACAACCCACTT	310
Kir6.1 NM_008428.4	GCTGGTCTCTTCGCTATC, CATAAGGGGGCTACGCTTG	588	TGGGTTTGGAGGGAGAATGA, TGGCGTCGTGGTTTCTTGA	286
Kir6.2 NM_010602.2	GGGTGGTAACGGCATCTCC, ATGCTAAACTGGGCTTGCC	420	CGCTCTACGACCTGGCTCCT, GGGTCAGGGCATCCAGCAG	285
GK (1) NM_010292.4	GGCTGCAACCGCTGCTACAT, GCTCCTGAAGCTCGGGTGC	580	GGGGCGCATGTGTGCAACA, CACAATGTCGAGTCGGCGA	358
GK (2) NM_010292	PPM05095A-200	115	PPM05095A-200	115
GLUT3 NM_011401.4	ATGGGGACAACGAAGGTGAC, GCCACAGAAAATGCCAATGA	377	CATCTCTGGTGTCCCGGTG, CAGCATTCAACAGACTCCGC	338

second primer pair set internal to the pair used in the first PCR (nested primers; Table 1). Next, 35 cycles of PCR were performed and 10 μ l of each individual PCR product were run on a 2% agarose gel with a 100 bp ladder (Promega) as molecular weight markers and stained with ethidium bromide. The sizes of PCR-generated fragments were as predicted by the mRNA sequences (Table 1). The RT-PCR protocol was tested on 500 pg of total RNA purified from microdissected mouse VLPO and all transcripts were detected.

Results

Somnogenic properties of glucose when infused into the VLPO

Here, we investigated whether glucose (5 or 10 mM vs vehicle) can modify the sleep-waking cycle when bilaterally infused into the VLPO of mice chronically prepared for polysomnographic recordings. These animals received a randomized sequence of vehicle, glucose 5 mM, and glucose 10 mM, each spaced by 2 d. Seven of 8 mice treated had injection sites centered on both VLPO (Fig. 1A). In these animals, a significant effect of glucose injections was observed on both SWS durations (Friedman test, $p < 0.01$) and PS durations (Friedman test, $p < 0.05$) during the first 2 h after glucose or vehicle injections. *Post hoc* tests confirmed that SWS durations significantly increased between vehicle and both 5 and 10 mM glucose (Wilcoxon tests, $p < 0.05$; Fig. 1C, Table 2), whereas no significant pairwise difference was detected between groups for PS durations (Fig. 1C, Table 2). This somnogenic glucose-dependent effect is due to a severe reduction in waking amounts compared with the vehicle (Friedman test, $p < 0.01$; Table 2) and significantly shortened latencies to SWS (Friedman test, $p < 0.001$; Fig. 1B) and PS (Friedman test, $p < 0.01$). The *post hoc* analysis revealed a dose-dependent decrease in SWS latencies with significant differences between all groups (Wilcoxon tests, $p < 0.05$ for all comparisons; Fig. 1B, Table 2). Together, these results indicate that glucose would be able to modulate the activity of VLPO neurons and promote sleep.

Moreover, to test whether glucose could activate VLPO neurons, we performed on the same mice a final microinjection of glucose (10 mM) in one hemisphere and vehicle in the contralateral VLPO. The mice were then killed 90 min after this injection

to perform c-Fos immunohistochemistry. Sleep analysis during the period after injection and before killing (90 min) revealed that unilateral glucose injection led to a significant increase in the duration of SWS compared with that obtained after bilateral VEH infusions ($40.6 \pm 2.9\%$ vs $26.7 \pm 3.5\%$, respectively; $p < 0.05$). Notwithstanding, c-Fos immunostaining (Fig. 2A, B) revealed a density of c-Fos-labeled neurons that was significantly increased in the VLPO when infused with glucose compared with the contralateral VLPO infused with vehicle (Wilcoxon test $p < 0.05$; Fig. 2B, C, Table 3). In sharp contrast, the density of cells labeled for c-Fos remained unchanged in three adjacent forebrain areas (Fig. 2A): the MCPO (Fig. 2D, Table 3), the LPOA (Fig. 2E, Table 3), and the MPOA (Fig. 2F, Table 3). Together, these physiological and functional data strongly suggest that sleep-promoting VLPO neurons could be activated by glucose treatment. In addition, these results support the view that glucose may participate in the mechanisms of SWS promotion and/or consolidation.

To determine how glucose can modulate the activity of VLPO neurons, we performed *ex vivo* electrophysiological experiments.

Glucose responsiveness of VLPO neurons

To assess the glucose sensitivity of VLPO neurons, 49 spontaneously active neurons were recorded in a loose-cell-attached patch configuration. We observed that a rise in extracellular glucose concentrations led to a reversible increase in the firing rate in $\sim 73\%$ (36/49) of recorded neurons (Fig. 3), whereas the remaining cells (13/49) were insensitive (Fig. 4). Figure 3A illustrates a typical response of a glucose-excited VLPO neuron. A decrease in the glucose concentration from 5 to 1 mM induced a significant reduction in the firing frequency of these cells ($n = 8$, Wilcoxon test $p < 0.01$; Fig. 3A, B). This effect was reversible because a subsequent rise in glucose concentration to 5 mM induced a significant increase in the firing rate of the same cells ($n = 8$, Wilcoxon test $p < 0.01$; Fig. 3A, B). We noted that the inhibitory effect associated with lowering glucose appears faster (2.55 ± 0.50 min) than the excitatory effect (7.39 ± 1.75 min) induced by increasing glucose ($n = 8$, Wilcoxon test $p < 0.05$). Glucose

(1–25 mM) excited VLPO neurons in a dose-dependent manner across all concentrations tested, with an EC_{50} of 4.06 mM (Fig. 3C); this is compatible with the physiological glucose concentration range in the hypothalamus (Silver and Erecińska, 1994; Routh, 2002; de Vries et al., 2003).

Previous studies led to the identification of the electrophysiological, biochemical, morphological, and pharmacological properties of neurons active during SWS in the VLPO (Gallopín et al., 2000; Matsuo et al., 2003; Gallopín et al., 2004; Saint-Mleux et al., 2004; Gallopín et al., 2005; Saint-Mleux et al., 2007; Liu et al., 2010; Moore et al., 2012). Based on these studies, putative sleep-active neurons in the VLPO can be characterized *ex vivo* by the presence of a low threshold calcium spike (LTS) and by their inhibition after bath application of NA. Therefore, to establish that glucose-excited VLPO cells exhibit properties of sleep-promoting neurons, we investigated whether they displayed LTS and/or if they were inhibited by NA. Bath application of NA (100 μ M) to glucose-excited VLPO neurons recorded in a loose-cell-attached configuration induced a decrease in their firing rate ($n = 7/7$; Fig. 3D). Moreover, 17 glucose-excited neurons repatched in a whole-cell configuration systematically exhibited LTS ($n = 17/17$; Fig. 3E). This NA-induced inhibition and the presence of LTS were both identified in 4 glucose-excited cells ($n = 4/4$).

In addition, 13 VLPO neurons remained insensitive to changes in the extracellular glucose concentration, even in the case of an acute change from 2.5 to 25 mM ($n = 6$, Wilcoxon test $p = 0.7$; Fig. 4A,B). In this sample of cells, 10 of the 13 neurons were used for further characterization, revealing that they were excited by NA (100 μ M, $n = 7/7$) and devoid of any LTS ($n = 5/5$; Fig. 4C,D). This indicates that these cells should not correspond to sleep-active cells (Gallopín et al., 2000; Matsuo et al., 2003; Liu et al., 2010; Wang et al., 2013). Together, these results suggest that neurons with properties of putative sleep-promoting VLPO neurons are specifically excited by glucose and could be considered as glucose-sensing neurons.

Characterization of glucose-sensing mechanisms in VLPO neurons

Next, we addressed the mechanisms underlying this glucose sensitivity in VLPO neurons. We first demonstrated that the excitatory effect of glucose identified in NA-inhibited neurons persisted in synaptic uncoupling conditions using a modified ACSF with low Ca^{2+} /high Mg^{2+} ($n = 4$; Fig. 5A). This result indicates that glucose does have a direct postsynaptic action on the neurons. To further investigate the role of glucose metabolism in glucose-sensing VLPO neurons, we tested the effect of 2-DG, a nonmetabolizable analog of glucose. The firing rate of

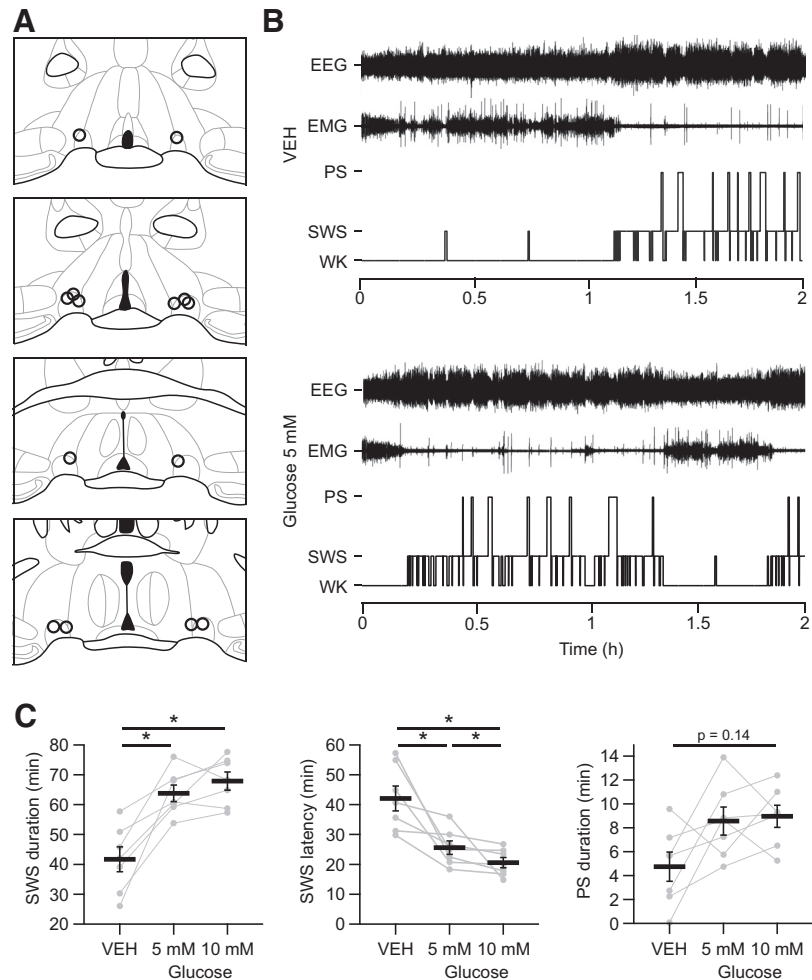


Figure 1. Microinjections of glucose into the VLPO increase sleep. **A**, Camera lucida drawings of frontal sections illustrating all injection sites (one open circle per animal). The four different sections are evenly spaced (120 μ m intervals) throughout the rostrocaudal extent of the VLPO. Bregma coordinates range approximately from 0.26 to -0.22 mm according to the Franklin and Paxinos atlas (2007). **B**, Hypnograms of a representative animal illustrating the organization of the sleep-waking cycle during the 2 h after a bilateral injection of vehicle (VEH; top) or glucose 5 mM (bottom) into the VLPO. Recordings began immediately after the injection procedure once the animals were returned to their home barrels and reconnected to the recording setup. **C**, Quantification of SWS durations (left), SWS latencies (middle), and PS (right) durations during the 2 h after bilateral glucose or VEH injection ($n = 7$). Individual data for each mouse injected bilaterally with glucose or VEH (gray dots and lines) are displayed and data are presented as mean \pm SEM (black bars). * $p < 0.05$, Wilcoxon test.

Table 2. Sleep architecture after bilateral injections of glucose versus vehicle

	0–2 h after injection		
	Vehicle	Glucose 5 mM	Glucose 10 mM
SWS			
Duration (%)	34.7 \pm 3.5	53.2 \pm 2.3*	56.6 \pm 2.5*
No. of episodes	43.0 \pm 4.6	66.0 \pm 3.4	62.1 \pm 2.4
Episode duration (s)	59.0 \pm 4.1	58.5 \pm 2.5	66.0 \pm 3.3
Latency (min)	42.1 \pm 4.1	25.6 \pm 2.3*	20.6 \pm 1.7*#
PS			
Duration (%)	4.0 \pm 1.0	7.1 \pm 1.0	7.5 \pm 0.8
No. of episodes	7.3 \pm 1.9	14.0 \pm 2.5	12.9 \pm 1.8
Episode duration (s)	39.1 \pm 8.6	38.6 \pm 4.3	44.7 \pm 4.5
Latency (min)	88.4 \pm 7.3	47.2 \pm 5.1*	37.3 \pm 2.2*
W			
Duration (%)	61.3 \pm 4.5	39.6 \pm 3.1*	35.9 \pm 3.0*

For each experimental condition, the percentage of time spent in SWS, PS, and W was scored per 5 s epoch during the first 2 h (0–2 h) after injections ($n = 7$). The number of SWS and PS episodes, the mean duration of PS and SWS episodes, and the latency to the first SWS and PS episodes are also reported. Significance levels are given for *post hoc* Bonferroni-corrected Wilcoxon tests between conditions. * $p < 0.05$ versus vehicle; # $p < 0.05$ versus glucose 5 mM.

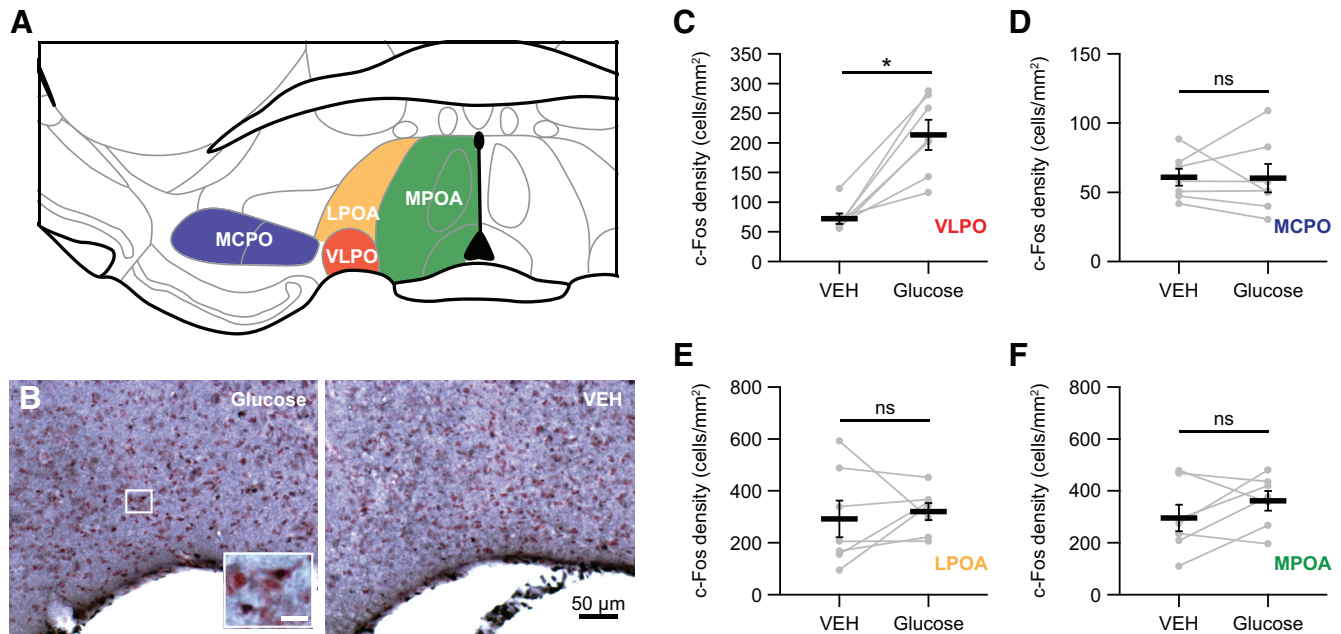


Figure 2. Density of c-Fos-labeled neurons in anterior hypothalamic regions after glucose infusion into the VLPO. **A**, Schema illustrating the VLPO and surrounding brain areas examined for c-Fos counting, including the VLPO (red), MCPO (blue), LPOA (orange), and MPOA (green). **B**, Photomicrographs of sections stained against c-Fos after unilateral infusions of glucose (left) and VEH (right) and counterstained with neutral red in a representative animal (c-Fos-labeled cells are shown in the bottom left inset at a higher magnification Scale bar, 10 μ m). **C–F**, Quantification of the density of c-Fos-labeled neurons in the VLPO (**C**), MCPO (**D**), LPOA (**E**), and MPOA (**F**) of animals that received glucose in one hemisphere and VEH in the other hemisphere ($n = 7$). Individual data for each hemisphere injected with glucose or VEH (gray dots and lines) are displayed and data are presented as mean \pm SEM (black bars). * $p < 0.05$, Wilcoxon test; ns.

Table 3. Expression of c-Fos-labeled cells in the VLPO and surrounding regions after glucose versus vehicle treatment

	c-Fos + neuronal density (cells/mm ²)		<i>p</i> value, Wilcoxon test
	Glucose (10 mM)	Vehicle	
VLPO	213.3 \pm 25.3	72.0 \pm 8.8	0.016*
MPOA	361.7 \pm 37.7	295.8 \pm 51.0	0.219 (ns)
LPOA	320.6 \pm 32.5	292.3 \pm 70.9	0.578 (ns)
MCPO	60.2 \pm 10.2	60.9 \pm 6.2	0.938 (ns)

* $p \leq 0.05$.

NA-inhibited neurons did not change when 2-DG (7.5 mM) was added to the control ACSF (2.5 mM glucose; $n = 4$, exact permutation test, $p = 1$; Fig. 5B). In contrast, replacement of 2-DG by an equimolar concentration of glucose (7.5 mM for a total concentration of 10 mM glucose) in the same cells led to a significant increase in the firing frequency of 4.83 ± 0.87 Hz ($n = 4$, exact permutation test, $p < 0.05$; Fig. 5B). This suggests that glucose is metabolized into cells to induce its excitatory effect.

Glucose is not the only energy supplier in the brain. Indeed, lactate derived from astrocytes is regarded as the privileged substrate for neurons (Pellerin et al., 1998; Magistretti et al., 2003; Levin et al., 2004). It is thus important to determine whether extracellular glucose is metabolized directly by glucose-excited VLPO neurons and/or if it is converted earlier to lactate by astrocytes. Therefore, we tested the excitatory effect of glucose in the presence of an inhibitor of monocarboxylate transporters, 4-CIN (500 μ M), or in the presence of the GK inhibitor alloxan (10 mM). The effects of drugs were tested independently on the resting membrane potential (RMP) of VLPO LTS neurons recorded in a whole-cell configuration. To avoid any voltage variability related to dialysis of the cells, RMP was measured immediately after passing to whole-cell configuration.

Consistent with our previous findings (Fig. 3), the mean RMP of LTS neurons was significantly more depolarized when the ex-

tracellular glucose concentration was 10 mM compared with 2.5 mM ($n = 10$ per group, Mann–Whitney test $p < 0.01$; Fig. 5C). Under 4-CIN treatment, the same increase in extracellular glucose concentration produced a similar and significant increase in RMP ($n = 12$ per condition; Mann–Whitney test $p < 0.01$; Fig. 5C). These results imply that the excitatory effect of glucose would not rely on the entry of astrocyte-derived lactate into neurons. In contrast, the RMP of identified LTS neurons remained unaffected by changes in extracellular glucose concentration under alloxan treatment ($n = 12$ per condition; Mann–Whitney test $p = 0.8$; Fig. 5C). This latter result indicates that glucose must be metabolized by these VLPO neurons to obtain sensitivity toward glucose. Using the scRT-PCR technique after patch-clamp recordings, we found that LTS VLPO neurons expressed mRNAs encoding glucose transporter type 3 (GLUT3, $n = 10/13$; Fig. 5D). GLUT1 and GLUT2 mRNAs were never detected in our sample of VLPO neurons. We also detected GK mRNAs in three neurons of our sample (Fig. 5D). Combined, the presence of GK mRNA in subset of VLPO neurons and the pharmacological blockage of glucose-induced excitation by GK inhibition indicate that putative VLPO sleep-active neurons are able to sense variations in glucose concentration directly without glial contribution.

VLPO neurons express functional K_{ATP} channels

Glucose-sensing neurons in the ventromedial hypothalamus (VMH) (Miki et al., 2001), the arcuate nucleus (Wang et al., 2004), and the lateral hypothalamus (Miki et al., 2001; Burdakov et al., 2006; Kong et al., 2010) engage K_{ATP} channels for coupling the cellular metabolic status to the membrane potential (Seino, 1999). These results motivated us to consider the involvement of these K_{ATP} channels in the glucose-induced excitation of VLPO neurons.

The K_{ATP} channel is composed of four pore-forming $K_{ir}6.1$ or $K_{ir}6.2$ subunits and four regulatory sulfonylurea receptor (SUR) SUR1 or SUR2 subunits (Seino, 1999; Moreau et al., 2005). We

detected in the VLPO functional $K_{ir,6.2}$ /SUR1-containing K_{ATP} channels in LTS neurons inhibited by NA (Fig. 6). Indeed, bath application of diazoxide ($300 \mu\text{M}$), a SUR activator, induced an outward current in neurons at -65 mV recorded in whole-cell configuration ($50.5 \pm 12.2 \text{ pA}$, $n = 12/12$; Fig. 6B). These effects were completely reversed after application of the K_{ATP} channel inhibitor tolbutamide ($500 \mu\text{M}$; Fig. 6B). Under the same conditions, application of pinacidil ($500 \mu\text{M}$), a selective SUR2 activator, did not induce any significant effect on VLPO neurons ($n = 3/3$; Fig. 6B). Depolarizing voltage ramps (from -115 mV to -45 mV in 400 ms) revealed that the diazoxide-induced current reversed at $-81.5 \pm 2.7 \text{ mV}$ ($n = 12$; Fig. 6C), which is close to the theoretical potassium equilibrium potential in our conditions ($E_{K^+} = -89 \text{ mV}$). Using the scRT-PCR technique, we detected mRNAs encoding the $K_{ir,6.2}$, but not $K_{ir,6.1}$, subunit in VLPO LTS neurons ($n = 10/24$; Fig. 6D). Although pharmacological experiments confirmed the presence of SUR1 in VLPO neurons, we could not detect mRNAs encoding SUR subunits by scRT-PCR. Together, these results indicate that VLPO neurons displaying intrinsic properties of putative sleep-promoting neurons express functional K_{ATP} channels that are composed of $K_{ir,6.2}$ and SUR1 subunits.

Extracellular glucose concentration monitors the gating of K_{ATP} channels

To investigate whether glucose-induced excitation of VLPO neurons is related to a change in the opening state of K_{ATP} channels, we evaluated the change in holding current of VLPO LTS cells $<10 \text{ mM}$ and 2.5 mM glucose concentrations. For this purpose, the baseline holding current of LTS neurons, held at -65 mV , was measured immediately after passing into whole-cell configuration and then during diazoxide and tolbutamide applications (Fig. 7). We found that the holding current measured just after passing in whole-cell (cell opening) configuration was significantly higher under an extracellular glucose concentration of 2.5 mM than that of cells at $<10 \text{ mM}$ glucose ($-4.0 \pm 4.0 \text{ pA}$; $-19.3 \pm 2.7 \text{ pA}$, respectively; $n = 8$ per conditions; Mann–Whitney test $p < 0.05$; Fig. 7A, B). This result is in agreement with our finding that the extracellular glucose concentration can modulate the excitability of VLPO cells.

Finally, we assessed the effects of diazoxide and tolbutamide on the holding current of LTS neurons at 2.5 and 10 mM extracellular glucose concentrations. The current values presented in Figure 7C correspond to the difference between the steady-state holding current during diazoxide and tolbutamide treatments

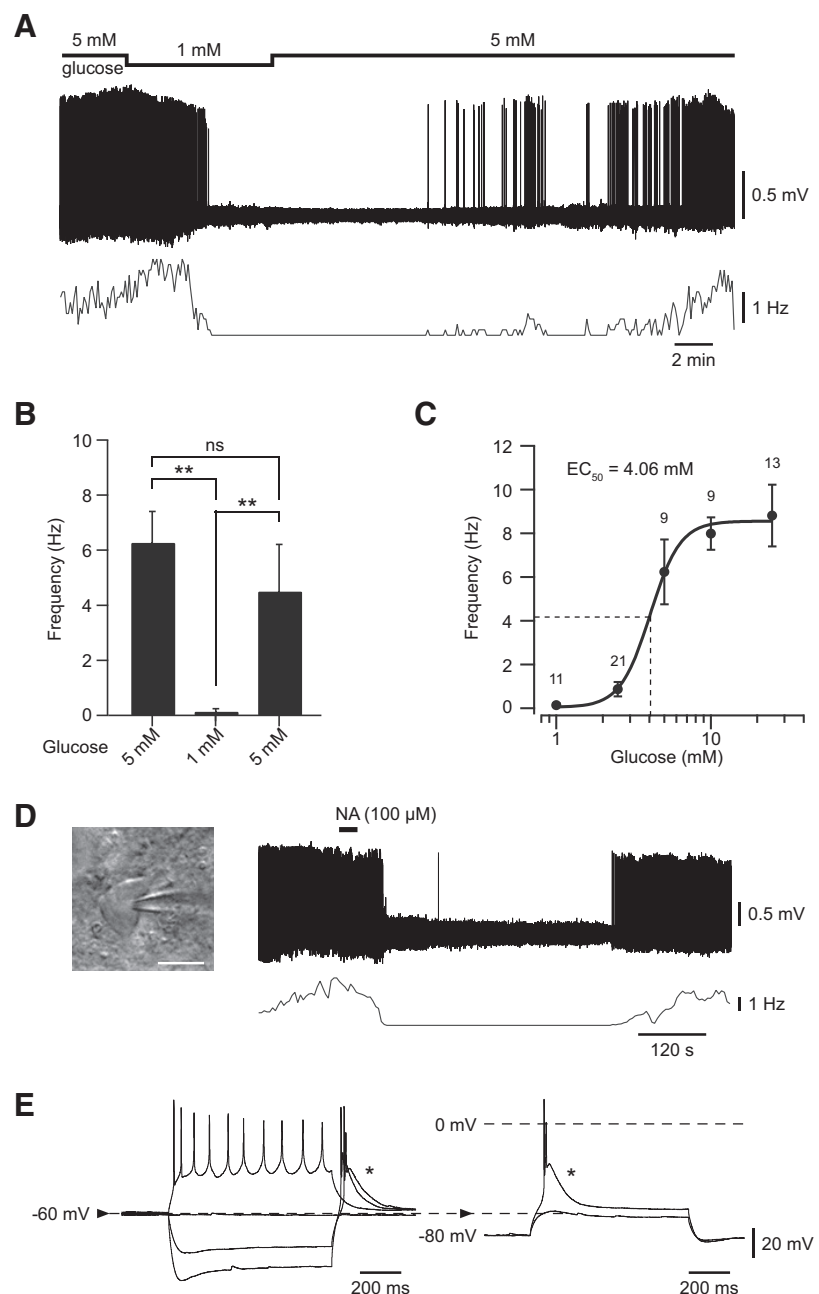


Figure 3. Effect of glucose applications on putative sleep-promoting VLPO neurons. **A**, Reversible inhibitory effect of decreasing extracellular glucose concentration from 5 to 1 mM on the spontaneous firing activity of a VLPO neuron recorded in loose-cell-attached configuration. **B**, Quantification of the excitatory effect of glucose (from 1 to 5 mM) on the spontaneous firing activity of glucose-responsive VLPO cells ($n = 8$). Data are presented as mean \pm SEM. ****** $p < 0.01$, Wilcoxon test; ns, not significant. **C**, Dose–response relationship of the excitatory effect of glucose on glucose-sensitive VLPO cells. Data fit a Hill curve with an EC_{50} of 4.06 mM and are presented as mean \pm SEM with group sizes for each glucose concentration (1, 2.5, 5, 10, 25 mM). **D**, Reversible inhibitory effect of bath-applied NA ($100 \mu\text{M}$; right) on the spontaneous firing activity of the same cell shown in **A** characterized by a multipolar shape (left). Scale bar, $20 \mu\text{m}$. **E**, Current-clamp recording of the same cell shown in **A** characterized by the presence of a potent LTS (*).

and the initial holding current at cell opening. At an extracellular glucose concentration of 2.5 mM , diazoxide ($300 \mu\text{M}$) induced an outward potassium current ($31.2 \pm 10.4 \text{ pA}$, $n = 8$; Fig. 7A, C) at -65 mV , which was reversed after tolbutamide application ($500 \mu\text{M}$). During tolbutamide treatment, the stabilized holding current was significantly lower than the initial current evaluated before dialysis ($-14.1 \pm 3.3 \text{ pA}$, $n = 8$, Wilcoxon test $p < 0.01$; Fig. 7A, C).

Diazoxide ($300 \mu\text{M}$) provoked a significantly larger outward current at 10 mM glucose ($60.5 \pm 16.7 \text{ pA}$, $n = 8$, Mann–Whitney

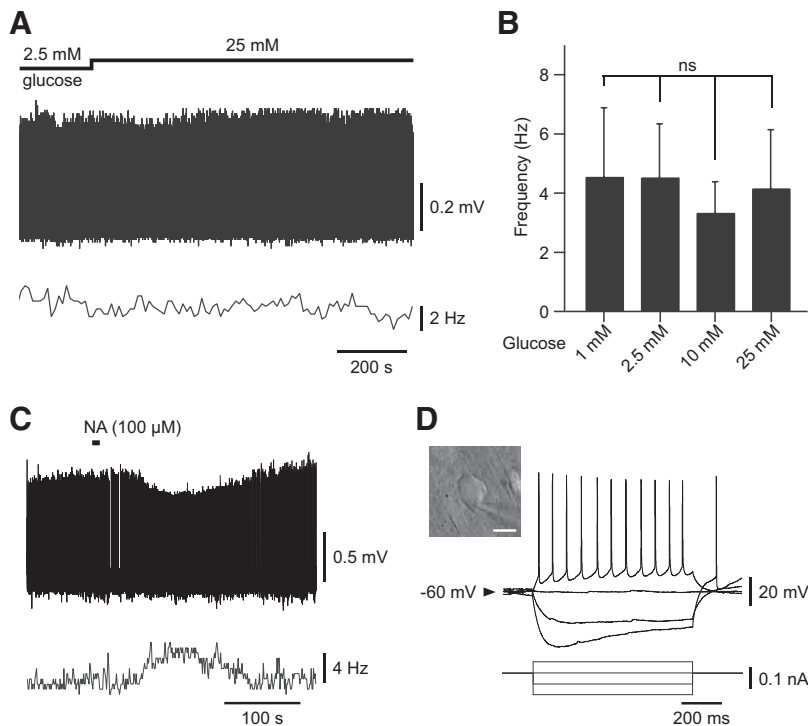


Figure 4. Absence of glucose effect on identified non-sleep-promoting neurons. **A**, Absence of effect of acute increase in extracellular glucose concentration on the spontaneous firing activity of a VLPO neuron. **B**, Spontaneous firing activity of VLPO neurons showing insensitivity to changes in extracellular glucose concentration for 1 mM ($n = 6$), 2.5 mM ($n = 5$), 10 mM ($n = 8$), and 25 mM ($n = 5$) glucose. Data are presented as mean \pm SEM. Mann–Whitney test: ns. **C**, Reversible excitatory effect of bath-applied NA (100 μ M) to the same cell shown in **A**. **D**, Current-clamp recording of VLPO cell devoid of LTS characterized by a bipolar shape (insert). Scale bar, 20 μ m.

test $p = 0.040$; Fig. 7*B, C*), which was reversed by tolbutamide (500 μ M). However, tolbutamide did not change the steady-state holding current of LTS neurons significantly compared with the holding current at cell opening (-4.3 ± 2.6 pA, $n = 8$, Wilcoxon test $p = 0.1$; Fig. 7*B, C*).

Our results indicate that, at 10 mM glucose, K_{ATP} channels would be in a more closed state than at 2.5 mM glucose, as seen by the absence of tolbutamide effect. Conversely, at 2.5 mM glucose, K_{ATP} channels would be likely in a more opened state compared with 10 mM glucose, as seen by the significant tolbutamide effect and the weaker diazoxide effect. Therefore, extracellular glucose may modulate the gating of K_{ATP} channels within VLPO LTS neurons, leading to their previously described glucose sensitivity.

Together, our results support the view that glucose may enhance the neuronal excitability of sleep-promoting neurons located in the VLPO and therefore may participate in the mechanisms of SWS promotion and/or consolidation.

Discussion

Using an integrated approach, we found here that infusion of glucose into the VLPO of mice promotes SWS and increases the density of c-Fos-labeled neurons selectively in the VLPO. Furthermore, we have demonstrated *ex vivo* that a rise in extracellular glucose increases the firing rate of putative sleep-promoting VLPO neurons. ATP synthesis in these neurons would proceed through the metabolism of glucose, which closes the K_{ATP} channels and leads to cellular depolarization. Functionally, the present results highlight that glucose likely contributes to sleep onset facilitation by increasing the excitability of sleep-promoting VLPO neurons and thus sleep propensity.

Glucose supply in the VLPO promotes SWS

We hypothesized that sleep-promoting VLPO neurons integrate the metabolic signal conveyed by glucose, thus enabling a metabolic drive of vigilance states. We tested this hypothesis here by investigating the influence of glucose on sleep regulation *in vivo* after direct bilateral glucose microinjection into the VLPO. We found that an increase in glucose concentration induces a significant increase in the time spent in SWS associated with a decrease in the latency to the first SWS episode. This is the first demonstration that local injections of glucose can affect vigilance states. Furthermore, this result illustrates a glucose effect on both the induction and maintenance of sleep because glucose appeared to increase sleep duration and sleep propensity. This finding is consistent with previous studies demonstrating a role for the VLPO in promotion and maintenance of SWS (Szymusiak and McGinty, 2008; Saper et al., 2010).

We performed c-Fos immunostaining after infusion of glucose to investigate whether glucose can activate VLPO neurons and if the effect that we observed on vigilance states could be restricted to the VLPO. In the VLPO, levels of c-Fos expression have been correlated with sleep durations, thus constituting a marker of sleep rebound (Lu et al., 2000; Gvilia et al., 2006; Dentico et al., 2009). In our experiments, no significant variation in c-Fos-labeled cells was observed in neighboring regions such as the MPOA, LPOA, and MCPO, whereas we observed a selective increase in c-Fos expression in the VLPO. These results strongly suggest that the increase in SWS elicited by glucose injection is a consequence of sleep-promoting VLPO neuronal activation.

Ex vivo identification of putative sleep-promoting VLPO neurons

Previous studies characterized the intrinsic and pharmacological properties of sleep-promoting VLPO neurons *ex vivo*. Indeed, a large majority of VLPO GABAergic neurons generate a potent LTS and are inhibited by wake-promoting neurotransmitters such as NA (Gallopín et al., 2000; Matsuo et al., 2003; Gallopín et al., 2004; Liu et al., 2010; Moore et al., 2012; McCarren et al., 2014). The inhibition of these VLPO GABAergic neurons by wake-promoting neurotransmitters is in agreement with their inactivity during wakefulness, strongly supporting the idea that they correspond to the sleep-active cells identified *in vivo* and are involved in the inhibition of arousal systems (Gallopín et al., 2000; Saper et al., 2001).

Glucose induces excitation of VLPO neurons through a metabolic pathway

Different neuronal populations in the brain that regulate glucose homeostasis or feeding behavior increase their firing according to a rise in ambient glucose (Levin et al., 2004; Burdakov et al., 2005). Using a nonmetabolizable glucose analog (2-DG), we have

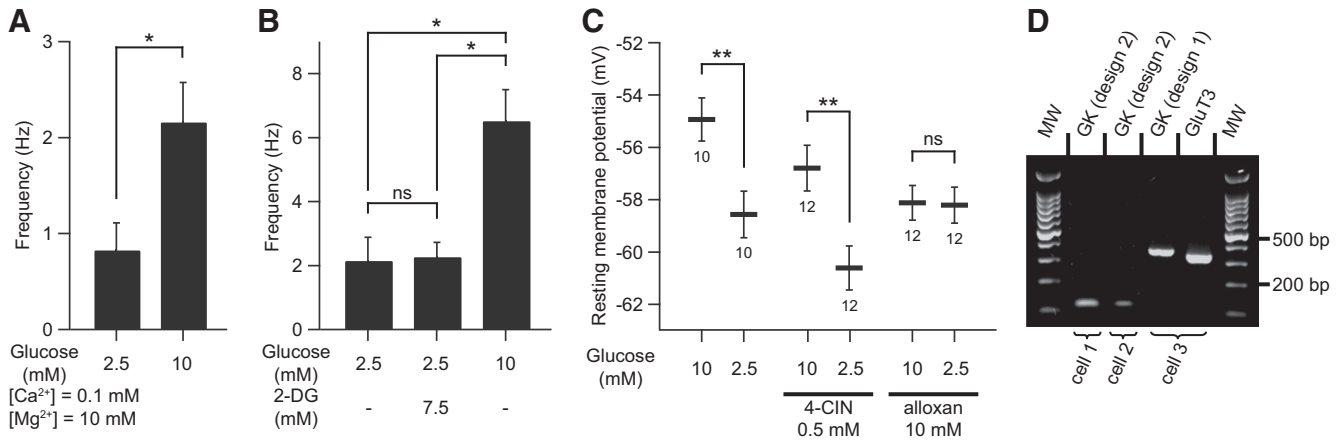


Figure 5. Glucose-induced excitation implies the catabolism of glucose in neurons. **A**, Excitatory effect of glucose on the spontaneous firing activity of identified sleep-active cells under synaptic uncoupling conditions (low Ca^{2+} /high Mg^{2+}) ($n = 4$). Data are presented as mean \pm SEM. $*p < 0.05$, permutation test. **B**, Effect of the application of a nonmetabolizable glucose analog (2-DG) on the spontaneous firing activity of identified putative sleep-promoting and glucose-excited neurons ($n = 4$). Data are presented as mean \pm SEM. $*p < 0.05$, permutation test; ns, not significant. **C**, Effect of the blockade of lactate transporters (4-CIN) and glucokinase inhibition (alloxan) on the glucose-induced increase in resting membrane potential of identified sleep-active neurons. Data are presented as mean \pm SEM with group sizes for each condition. $**p < 0.01$, Mann–Whitney test; ns, not significant. **D**, Gel electrophoresis of scRT-PCR products of three characterized sleep-promoting cells expressing GK mRNAs, with the third neuron expressing GK and GLUT3 mRNAs. MW, Molecular weight (100 bp ladder).

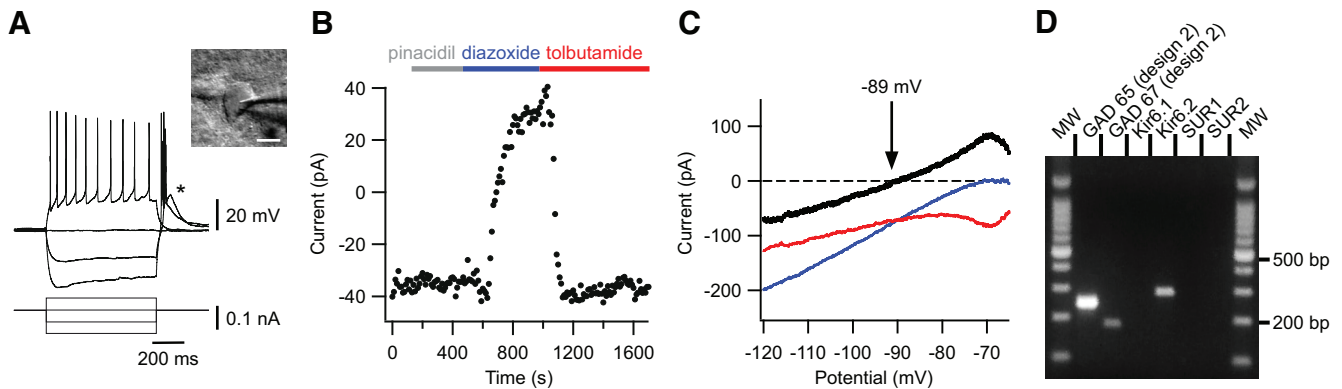


Figure 6. Characterization of K_{ATP} channels in VLPO neurons. **A**, Current-clamp recording of a sleep-promoting neuron identified by the presence of a potent LTS (*) and a multipolar shape (insert). Scale bar, 20 μm . **B**, Effect of pinacidil (500 μM), diazoxide (300 μM), and tolbutamide (500 μM) on the stationary currents recorded at -65 mV for the same cell shown in **A**. **C**, Effect of diazoxide (blue) and tolbutamide (red) on the I – V relationship of the same neuron shown in **A** and **B**. I – V plot of the net K_{ATP} -related current (black), which reverses near the K^+ equilibrium potential. **D**, Gel electrophoresis of scRT-PCR products of a sleep-promoting cell revealing the expression of Kir6.2 but not SUR1 or SUR2 mRNAs. MW, Molecular weight (100 bp ladder).

shown that glucose metabolism is required to induce excitation of VLPO neurons. This metabolism of glucose could occur in neurons and/or in astrocytes. Indeed, astrocyte-derived lactate is considered to be the major source of metabolic energy for neurons (Pellerin et al., 1998; Magistretti et al., 2003). We have demonstrated that the inhibition of the enzyme GK selectively expressed in neurons (Dunn-Meynell et al., 2002) abolished the glucose-induced excitation of putative sleep-promoting neurons, whereas blockade of lactate transport by 4-CIN did not affect the magnitude of the excitatory effect of glucose. Although we cannot exclude the possibility that astrocyte-derived glucose metabolites could influence VLPO neuronal activity, our results indicate that glucose by itself is sufficient to excite putative sleep-promoting VLPO neurons. Furthermore, single-cell mRNA detection revealed that VLPO LTS neurons express mRNAs that encode the glucose transporter GLUT3 and the enzyme GK. The single-cell mRNA detection of GK in a subset of cells is reinforced by the pharmacological effect of a GK inhibitor on the glucose-induced excitation. The expression of GK in neurons is reported to play an important role in the neuronal mechanisms of glucose

sensing by triggering a shift in metabolism in response to glucose supply changes (Kang et al., 2006; Dunn-Meynell et al., 2009).

Together, our results reveal that glucose affects VLPO neuronal excitability in a manner similar to what occurs in subsets of hypothalamic glucose-excited neurons and in insulin-secreting pancreatic β -cells (Matschinsky, 1990). In these mechanisms, glucose enters the cell through specific glucose transporters, where it is phosphorylated by GK and converted to energy by ATP production (González et al., 2009). This increase in the cytosolic ATP concentration closes the K_{ATP} channels, leading to the excitation of the cell.

K_{ATP} channels as a link between cellular energetics and excitability of VLPO neurons

The cooperative action of GK and K_{ATP} channels in some glucose-sensing neurons plays a crucial role in glucose-induced excitation by coupling metabolism with membrane excitability (Routh, 2002; Kang et al., 2006). K_{ATP} channels could differ in their combinations of Kir6.1 or Kir6.2 and SUR1 or SUR2 subunits. On the basis of our pharmacological and scRT-PCR exper-

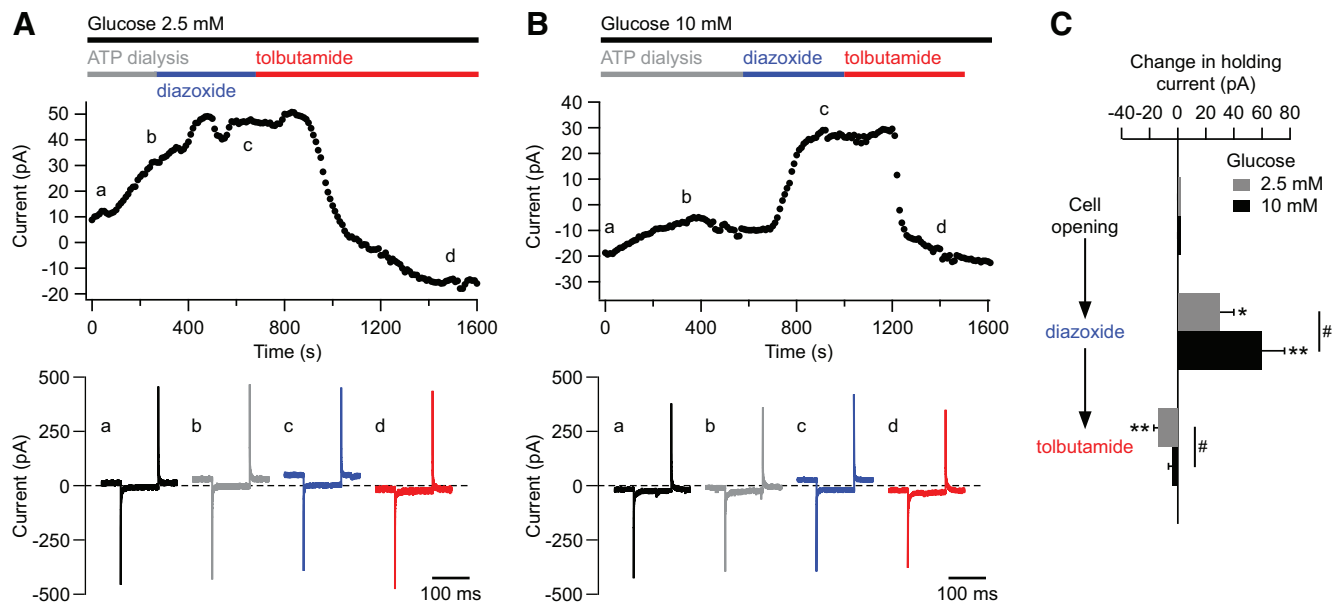


Figure 7. Extracellular glucose level monitors K_{ATP} channel opening state in sleep-promoting cells. **A–B**, Top, Representative traces of stationary currents recorded at -65 mV in 2.5 mM (**A**) and 10 mM (**B**) glucose and during diazoxide ($300 \mu\text{M}$) and tolbutamide ($500 \mu\text{M}$) application. Note the difference in currents induced by diazoxide and tolbutamide compared with the initial current. Bottom, Currents recorded during 100 ms voltage steps from -65 to -75 mV at times indicated by **a–d** in recordings illustrated above. **C**, Effect of diazoxide and tolbutamide applications on holding current of LTS neurons held at -65 mV. Data are presented as changes induced by pharmacological treatments from the initial value of the holding current at cell opening. Data are presented as mean \pm SEM; $n = 8$ per condition. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Wilcoxon test vs initial current at cell opening; # $p < 0.05$, Mann–Whitney test 2.5 mM vs 10 mM glucose.

iments, we favor the view that the K_{ATP} channels of sleep-promoting VLPO neurons are composed of Kir6.2 and SUR1 subunits. We showed that application of pinacidil, a selective SUR2 activator, did not induce any significant effect on VLPO neurons, indicating the absence of the SUR2 isoform. This result is in agreement with several studies indicating that pinacidil activates Kir6.2/SUR2, but not Kir6.2/SUR1 channels (Shindo et al., 1998; Ashcroft and Gribble, 2000; Wheeler et al., 2008). Moreover, we showed that diazoxide (a K_{ATP} channel opener) induces an outward current that was systematically reversed by tolbutamide (a K_{ATP} channel inhibitor), confirming the presence of functional K_{ATP} channels in VLPO neurons. However, we could not detect mRNAs encoding SUR subunits in individual cells. This is a common problem seen in scRT-PCR when mRNAs are present at low levels (Gallopini et al., 2006; Tsuzuki et al., 2001). Indeed, SUR mRNAs are present in very low abundance in neurons, even in the canonical glucose-sensing neurons of the VMH (Kang et al., 2004).

Moreover, the low proportion of putative sleep-active cells that are positive for GK at the cellular level could also be explained due to the very low amount of these mRNA species in cells even in glucose-responsive neurons (Lynch et al., 2000; Dunn-Meynell et al., 2002; Kang et al., 2004).

Concerning the expression of the Kir6 isoform, we detected the presence of Kir6.2 mRNAs in 41% of the harvested VLPO neurons (which might be underestimate by our detection method). However, this proportion is totally consistent with previous observations in glucose-excited neurons in the VMH (42%; Kang et al., 2004). In contrast to the widespread distribution of the Kir6.2 subunit in the brain, immunoreactivity of Kir6.1 in neurons has only been reported in specific brain regions that do not include the VLPO (Thomzig et al., 2005).

Energy metabolism and sleep homeostasis

Various pathways can regulate sleep pressure associated with drowsiness, including circadian and homeostatic drives, which

can both modulate the activity of VLPO neurons (Saper et al., 2005). Here, we demonstrate for the first time that putative sleep-promoting VLPO neurons are also able to integrate energetic signals such as ambient glucose directly to modulate behavioral states. Importantly, these results complement previous reports showing that glucose modulates the excitability of orexin-expressing neurons located in the lateral hypothalamus, which are involved in arousal maintenance (Tsujino and Sakurai, 2009). Indeed, *ex vivo* experiments have revealed that glucose inhibits orexinergic neurons (Yamanaka et al., 2003; Burdakov et al., 2006).

Physiological and physiopathological studies have illustrated that sleep maintains a close and cooperative relationship with metabolism. Metabolism-related compounds such as glucose, glycogen, lactate, and/or ATP have been shown to fluctuate over vigilance states (Netchiporouk et al., 2001; Shram et al., 2002; Dworak et al., 2010). Food deprivation in rodent models increases wakefulness, which is compatible with the development of food-seeking behaviors (Jacobs and McGinty, 1971; Dewasmes et al., 1989; Minet-Ringuet et al., 2004). In contrast, carbohydrate intake appears to enhance sleep (Danguir and Nicolaidis, 1979; Nicolaidis, 2006). Similar effects have been observed in humans, where it was shown that even if glucose intake leads to short-term cognitive improvement, it could eventually lead to an enhanced sleepiness and facilitated sleep onset (Landström et al., 2000; Horne and Baulk, 2004; Anderson and Horne, 2006; Afaghi et al., 2007).

Our results provide evidence that high-energy stores are important to maintain an excitation of neurons required to trigger and maintain SWS. Conversely, we would expect that a depletion of energy supplies in the VLPO could decrease the firing rate of these cells and would thus facilitate awakening. The novel mechanisms regulating the activity of VLPO neurons described herein reinforce the perspectives of a crucial link between sleep and metabolism.

References

- Adamantidis AR, Zhang F, Aravanis AM, Deisseroth K, de Lecea L (2007) Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons. *Nature* 450:420–424. [CrossRef Medline](#)
- Afaghi A, O'Connor H, Chow CM (2007) High-glycemic-index carbohydrate meals shorten sleep onset. *Am J Clin Nutr* 85:426–430. [Medline](#)
- Anderson C, Horne JA (2006) A high sugar content, low caffeine drink does not alleviate sleepiness but may worsen it. *Hum Psychopharmacol* 21:299–303. [CrossRef Medline](#)
- Ashcroft FM, Gribble FM (2000) New windows on the mechanism of action of K_{ATP} channel openers. *Trends Pharmacol Sci* 21:439–445. [CrossRef Medline](#)
- Benington JH, Heller HC (1995) Restoration of brain energy metabolism as the function of sleep. *Prog Neurobiol* 45:347–360. [CrossRef Medline](#)
- Bouzier-Sore AK, Voisin P, Canioni P, Magistretti PJ, Pellerin L (2003) Lactate is a preferential oxidative energy substrate over glucose for neurons in culture. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:1298–1306. [Medline](#)
- Burdakov D, Alexopoulos H (2005) Metabolic state signalling through central hypocretin/orexin neurons. *J Cell Mol Med* 9:795–803. [CrossRef Medline](#)
- Burdakov D, Luckman SM, Verkhatsky A (2005) Glucose-sensing neurons of the hypothalamus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360:2227–2235. [CrossRef Medline](#)
- Burdakov D, Jensen LT, Alexopoulos H, Williams RH, Fearon IM, O'Kelly I, Gerasimenko O, Fugger L, Verkhatsky A (2006) Tandem-pore K^+ channels mediate inhibition of orexin neurons by glucose. *Neuron* 50:711–722. [CrossRef Medline](#)
- Danguir J, Nicolaidis S (1979) Dependence of sleep on nutrients' availability. *Physiol Behav* 22:735–740. [CrossRef Medline](#)
- Dentico D, Amici R, Baracchi F, Cerri M, Del Sindaco E, Luppi M, Martelli D, Perez E, Zamboni G (2009) c-Fos expression in preoptic nuclei as a marker of sleep rebound in the rat. *Eur J Neurosci* 30:651–661. [CrossRef Medline](#)
- de Vries MG, Arseneau LM, Lawson ME, Beverly JL (2003) Extracellular glucose in rat ventromedial hypothalamus during acute and recurrent hypoglycemia. *Diabetes* 52:2767–2773. [CrossRef Medline](#)
- Dewasmes G, Duchamp C, Minaire Y (1989) Sleep changes in fasting rats. *Physiol Behav* 46:179–184. [CrossRef Medline](#)
- Dunn-Meynell AA, Routh VH, Kang L, Gaspers L, Levin BE (2002) Glucokinase is the likely mediator of glucosensing in both glucose-excited and glucose-inhibited central neurons. *Diabetes* 51:2056–2065. [CrossRef Medline](#)
- Dunn-Meynell AA, Sanders NM, Compton D, Becker TC, Eiki J, Zhang BB, Levin BE (2009) Relationship among brain and blood glucose levels and spontaneous and glucoprivic feeding. *J Neurosci* 29:7015–7022. [CrossRef Medline](#)
- Dworak M, McCarley RW, Kim T, Kalinchuk AV, Basheer R (2010) Sleep and brain energy levels: ATP changes during sleep. *J Neurosci* 30:9007–9016. [CrossRef Medline](#)
- Franklin KBJ, Paxinos G (2007) The mouse brain in stereotaxic coordinates, Ed 3. Amsterdam: Academic.
- Gallopin T, Fort P, Eggermann E, Cauli B, Luppi PH, Rossier J, Audinat E, Mühlethaler M, Serafin M (2000) Identification of sleep-promoting neurons in vitro. *Nature* 404:992–995. [CrossRef Medline](#)
- Gallopin T, Luppi PH, Rambert FA, Frydman A, Fort P (2004) Effect of the wake-promoting agent modafinil on sleep-promoting neurons from the ventrolateral preoptic nucleus: an in vitro pharmacologic study. *Sleep* 27:19–25. [Medline](#)
- Gallopin T, Luppi PH, Cauli B, Urade Y, Rossier J, Hayaishi O, Lambolez B, Fort P (2005) The endogenous somnogen adenosine excites a subset of sleep-promoting neurons via A2A receptors in the ventrolateral preoptic nucleus. *Neuroscience* 134:1377–1390. [CrossRef Medline](#)
- Gallopin T, Geoffroy H, Rossier J, Lambolez B (2006) Cortical sources of CRF, NKB, and CCK and their effects on pyramidal cells in the neocortex. *Cereb Cortex* 16:1440–1452. [Medline](#)
- González JA, Reimann F, Reimann F, Burdakov D (2009) Dissociation between sensing and metabolism of glucose in sugar sensing neurons. *J Physiol* 587:41–48. [CrossRef Medline](#)
- Gvilia I, Xu F, McGinty D, Szymusiak R (2006) Homeostatic regulation of sleep: a role for preoptic area neurons. *J Neurosci* 26:9426–9433. [CrossRef Medline](#)
- Horne JA, Baulk SD (2004) Awareness of sleepiness when driving. *Psychophysiology* 41:161–165. [CrossRef Medline](#)
- Jacobs BL, McGinty DJ (1971) Effects of food deprivation on sleep and wakefulness in the rat. *Exp Neurol* 30:212–222. [CrossRef Medline](#)
- Jenkins JB, Omori T, Guan Z, Vgontzas AN, Bixler EO, Fang J (2006) Sleep is increased in mice with obesity induced by high-fat food. *Physiol Behav* 87:255–262. [CrossRef Medline](#)
- Kang L, Routh VH, Kuzhikandathil EV, Gaspers LD, Levin BE (2004) Physiological and molecular characteristics of rat hypothalamic ventromedial nucleus glucosensing neurons. *Diabetes* 53:549–559. [CrossRef Medline](#)
- Kang L, Dunn-Meynell AA, Routh VH, Gaspers LD, Nagata Y, Nishimura T, Eiki J, Zhang BB, Levin BE (2006) Glucokinase is a critical regulator of ventromedial hypothalamic neuronal glucosensing. *Diabetes* 55:412–420. [CrossRef Medline](#)
- Kong D, Vong L, Parton LE, Ye C, Tong Q, Hu X, Choi B, Brüning JC, Lowell BB (2010) Glucose stimulation of hypothalamic MCH neurons involves $K(ATP)$ channels, is modulated by UCP2, and regulates peripheral glucose homeostasis. *Cell Metab* 12:545–552. [CrossRef Medline](#)
- Lambolez B, Audinat E, Bochet P, Crépel F, Rossier J (1992) AMPA receptor subunits expressed by single Purkinje cells. *Neuron* 9:247–258. [CrossRef Medline](#)
- Landström U, Knutsson A, Lennernäs M (2000) Field studies on the effects of food content on wakefulness. *Nutr Health* 14:195–204. [CrossRef Medline](#)
- Levin BE, Routh VH, Kang L, Sanders NM, Dunn-Meynell AA (2004) Neuronal glucosensing: what do we know after 50 years? *Diabetes* 53:2521–2528. [CrossRef Medline](#)
- Liu YW, Li J, Ye JH (2010) Histamine regulates activities of neurons in the ventrolateral preoptic nucleus. *J Physiol* 588:4103–4116. [CrossRef Medline](#)
- Lu J, Greco MA, Shiromani P, Saper CB (2000) Effect of lesions of the ventrolateral preoptic nucleus on NREM and REM sleep. *J Neurosci* 20:3830–3842. [Medline](#)
- Lynch RM, Tompkins LS, Brooks HL, Dunn-Meynell AA, Levin BE (2000) Localization of glucokinase gene expression in the rat brain. *Diabetes* 49:693–700. [CrossRef Medline](#)
- Matschinsky FM (1990) Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic beta-cells and hepatocytes. *Diabetes* 39:647–652. [Medline](#)
- Matsuo S, Jang IS, Nabekura J, Akaike N (2003) α 2-Adrenoceptor-mediated presynaptic modulation of GABAergic transmission in mechanically dissociated rat ventrolateral preoptic neurons. *J Neurophysiol* 89:1640–1648. [Medline](#)
- McCarren HS, Chalifoux MR, Han B, Moore JT, Meng QC, Baron-Hionis N, Sedigh-Sarvestani M, Contreras D, Beck SG, Kelz MB (2014) α 2-adrenergic stimulation of the ventrolateral preoptic nucleus destabilizes the anesthetic state. *J Neurosci* 34:16385–16396. [CrossRef Medline](#)
- Miki T, Liss B, Minami K, Shiuchi T, Saraya A, Kashima Y, Horiuchi M, Ashcroft F, Minokoshi Y, Roeper J, Seino S (2001) ATP-sensitive K^+ channels in the hypothalamus are essential for the maintenance of glucose homeostasis. *Nat Neurosci* 4:507–512. [Medline](#)
- Minet-Ringuet J, Le Ruyet PM, Tomé D, Even PC (2004) A tryptophan-rich protein diet efficiently restores sleep after food deprivation in the rat. *Behav Brain Res* 152:335–340. [CrossRef Medline](#)
- Moore JT, Chen J, Han B, Meng QC, Veasey SC, Beck SG, Kelz MB (2012) Direct activation of sleep-promoting VLPO neurons by volatile anesthetics contributes to anesthetic hypnosis. *Curr Biol* 22:2008–2016. [CrossRef Medline](#)
- Moreau C, Prost AL, Dérand R, Vivaudou M (2005) SUR, ABC proteins targeted by K_{ATP} channel openers. *J Mol Cell Cardiol* 38:951–963. [CrossRef Medline](#)
- Netchiporouk L, Shram N, Salvetti D, Cespuoglio R (2001) Brain extracellular glucose assessed by voltammetry throughout the rat sleep-wake cycle. *Eur J Neurosci* 13:1429–1434. [CrossRef Medline](#)
- Nicolaidis S (2006) Metabolic mechanism of wakefulness (and hunger) and sleep (and satiety): Role of adenosine triphosphate and hypocretin and other peptides. *Metab Clin Exp* 55:S24–S29. [CrossRef Medline](#)
- Pellerin L, Pellegrini G, Bittar PG, Charnay Y, Bouras C, Martin JL, Stella N, Magistretti PJ (1998) Evidence supporting the existence of an activity-dependent astrocyte-neuron lactate shuttle. *Dev Neurosci* 20:291–299. [CrossRef Medline](#)
- Roky R, Kapás L, Taishi TP, Fang J, Krueger JM (1999) Food restriction

- alters the diurnal distribution of sleep in rats. *Physiol Behav* 67:697–703. [CrossRef Medline](#)
- Routh VH (2002) Glucose-sensing neurons: are they physiologically relevant? *Physiol Behav* 76:403–413. [CrossRef Medline](#)
- Saint-Mleux B, Eggermann E, Bisetti A, Bayer L, Machard D, Jones BE, Mühlenthaler M, Serafin M (2004) Nicotinic enhancement of the noradrenergic inhibition of sleep-promoting neurons in the ventrolateral preoptic area. *J Neurosci* 24:63–67. [CrossRef Medline](#)
- Saint-Mleux B, Bayer L, Eggermann E, Jones BE, Mühlenthaler M, Serafin M (2007) Suprachiasmatic modulation of noradrenaline release in the ventrolateral preoptic nucleus. *J Neurosci* 27:6412–6416. [CrossRef Medline](#)
- Saper CB, Chou TC, Scammell TE (2001) The sleep switch: hypothalamic control of sleep and wakefulness. *Trends Neurosci* 24:726–731. [CrossRef Medline](#)
- Saper CB, Cano G, Scammell TE (2005) Homeostatic, circadian, and emotional regulation of sleep. *J Comp Neurol* 493:92–98. [CrossRef Medline](#)
- Saper CB, Fuller PM, Pedersen NP, Lu J, Scammell TE (2010) Sleep state switching. *Neuron* 68:1023–1042. [CrossRef Medline](#)
- Scharf MT, Naidoo N, Zimmerman JE, Pack AI (2008) The energy hypothesis of sleep revisited. *Prog Neurobiol* 86:264–280. [CrossRef Medline](#)
- Seino S (1999) ATP-sensitive potassium channels: a model of heteromultimeric potassium channel/receptor assemblies. *Annu Rev Physiol* 61:337–362. [CrossRef Medline](#)
- Sherin JE, Shiromani PJ, McCarley RW, Saper CB (1996) Activation of ventrolateral preoptic neurons during sleep. *Science* 271:216–219. [CrossRef Medline](#)
- Sherin JE, Elmquist JK, Torrealba F, Saper CB (1998) Innervation of histaminergic tuberomammillary neurons by GABAergic and galaninergic neurons in the ventrolateral preoptic nucleus of the rat. *J Neurosci* 18:4705–4721. [Medline](#)
- Shindo T, Yamada M, Isomoto S, Horio Y, Kurachi Y (1998) SUR2 subtype (A and B)-dependent differential activation of the cloned ATP-sensitive K⁺ channels by pinacidil and nicorandil. *Br J Pharmacol* 124:985–991. [CrossRef Medline](#)
- Shram N, Netchiporouk L, Cespuglio R (2002) Lactate in the brain of the freely moving rat: voltammetric monitoring of the changes related to the sleep-wake states. *Eur J Neurosci* 16:461–466. [CrossRef Medline](#)
- Siegel JM (2009) Sleep viewed as a state of adaptive inactivity. *Nat Rev Neurosci* 10:747–753. [CrossRef Medline](#)
- Silver IA, Erecińska M (1994) Extracellular glucose concentration in mammalian brain: continuous monitoring of changes during increased neuronal activity and upon limitation in oxygen supply in normo-, hypo-, and hyperglycemic animals. *J Neurosci* 14:5068–5076. [Medline](#)
- Steininger TL, Gong H, McGinty D, Szymusiak R (2001) Subregional organization of preoptic area/anterior hypothalamic projections to arousal-related monoaminergic cell groups. *J Comp Neurol* 429:638–653. [Medline](#)
- Szymusiak R, McGinty D (2008) Hypothalamic regulation of sleep and arousal. *Ann N Y Acad Sci* 1129:275–286. [CrossRef Medline](#)
- Szymusiak R, Alam N, Steininger TL, McGinty D (1998) Sleep-waking discharge patterns of ventrolateral preoptic/anterior hypothalamic neurons in rats. *Brain Res* 803:178–188. [CrossRef Medline](#)
- Takahashi K, Lin JS, Sakai K (2009) Characterization and mapping of sleep-waking specific neurons in the basal forebrain and preoptic hypothalamus in mice. *Neuroscience* 161:269–292. [CrossRef Medline](#)
- Thomzig A, Laube G, Prüss H, Veh RW (2005) Pore-forming subunits of K-ATP channels, Kir6.1 and Kir6.2, display prominent differences in regional and cellular distribution in the rat brain. *J Comp Neurol* 484:313–330. [CrossRef Medline](#)
- Tsujino N, Sakurai T (2009) Orexin/hypocretin: a neuropeptide at the interface of sleep, energy homeostasis, and reward system. *Pharmacol Rev* 61:162–176. [CrossRef Medline](#)
- Tsuzuki K, Lambolez B, Rossier J, Ozawa S (2001) Absolute quantification of AMPA receptor subunit mRNAs in single hippocampal neurons. *J Neurochem* 77:1650–1659. [CrossRef Medline](#)
- Wang Q, Yue XF, Qu WM, Tan R, Zheng P, Urade Y, Huang ZL (2013) Morphine inhibits sleep-promoting neurons in the ventrolateral preoptic area via mu receptors and induces wakefulness in rats. *Neuropsychopharmacology* 38:791–801. [CrossRef Medline](#)
- Wang R, Liu X, Hentges ST, Dunn-Meynell AA, Levin BE, Wang W, Routh VH (2004) The regulation of glucose-excited neurons in the hypothalamic arcuate nucleus by glucose and feeding-relevant peptides. *Diabetes* 53:1959–1965. [CrossRef Medline](#)
- Wheeler A, Wang C, Yang K, Fang K, Davis K, Styer AM, Mirshahi U, Moreau C, Revilloud J, Vivaudou M, Liu S, Mirshahi T, Chan KW (2008) Coassembly of different sulfonylurea receptor subtypes extends the phenotypic diversity of ATP-sensitive potassium (K_{ATP}) channels. *Mol Pharmacol* 74:1333–1344. [CrossRef Medline](#)
- Yamanaka A, Beuckmann CT, Willie JT, Hara J, Tsujino N, Mieda M, Tomiyama M, Yagami Ki, Sugiyama F, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T (2003) Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. *Neuron* 38:701–713. [CrossRef Medline](#)

1.3. Résultats complémentaires

1.3.1. Comparaison des caractéristiques électrophysiologiques des courants K_{ATP} dans les diverses populations neuronales du VLPO

La caractérisation des courants dépendants des canaux K_{ATP} dans les neurones du VLPO (Figure 6 de l'article 1) a également été effectuée sur les neurones ne présentant pas les caractéristiques des neurones actifs pendant le SL (neurones non-LTS) (Figure 2.1.1).

A l'image des neurones LTS actifs pendant le SL, les neurones non-LTS expriment également des canaux K_{ATP} fonctionnels. Néanmoins, le courant net dépendant des canaux K_{ATP} mesuré à -65 mV (observé entre les applications de diazoxide et de tolbutamide) est significativement inférieur dans les neurones non-LTS par rapport aux neurones LTS (test de Mann-Whitney : $p < 0,05$; Figure 2.1.1 B). De plus, la comparaison des courbes courant-potentiel a révélé que la conductance dépendante des courants K_{ATP} était plus grande pour les neurones LTS que pour les neurones non-LTS (Figure 2.1.1 A). La différence observée sur les courants moyens dépendants des canaux K_{ATP} pourrait refléter des différences morphologiques spécifiques à chacune des deux sous-populations neuronales. Afin de contrôler cet effet potentiel, pour chaque cellule enregistrée, les courants dépendants des canaux K_{ATP} ont été normalisés par la capacitance membranaire qui est directement proportionnelle à la surface membranaire (Zawar et coll., 1999 ; Gentet et coll., 2000 ; Griesemer et coll., 2002). Cette mesure constitue de plus un estimateur de la densité de canaux K_{ATP} fonctionnels adressés à la membrane cellulaire. La comparaison des courants K_{ATP} normalisés a révélé une différence significative entre les neurones non-LTS et les neurones LTS (test de Mann-Whitney : $p < 0,05$; Figure 2.1.1 C), ce qui indiquerait une plus grande densité de canaux K_{ATP} fonctionnels dans les neurones actifs pendant le SL.

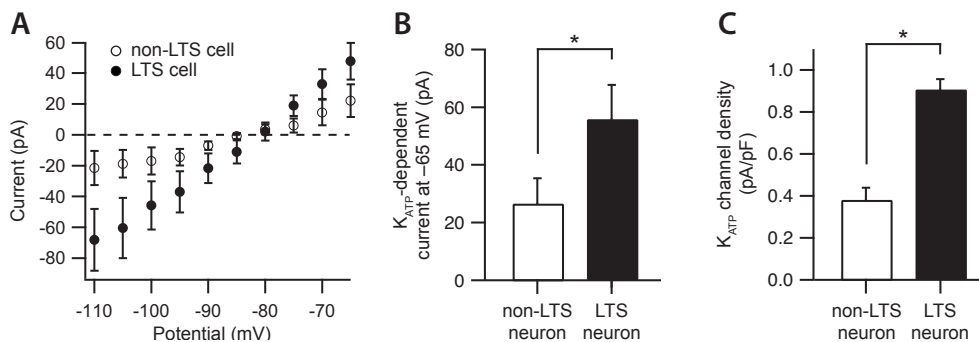


Figure 2.1.1. Comparaison des propriétés des canaux K_{ATP} dans deux sous-populations de neurones du VLPO.

A, Courbes courant-potentiel moyennes du courant net dépendant des canaux K_{ATP} mesuré dans des neurones LTS actifs pendant le SL (cercles noirs ; $n = 12$) et des neurones non-LTS (cercles blancs ; $n = 8$).

B, Comparaison des courants dépendants des canaux K_{ATP} mesurés à -65 mV entre les neurones LTS (noir ; $n = 12$) et non-LTS (blanc ; $n = 8$).

C, Comparaison des courants dépendants des canaux K_{ATP} mesurés à -65 mV normalisés par la capacitance membranaire entre les neurones LTS actifs pendant le SL (noir ; $n = 11$) et des neurones non-LTS (blanc ; $n = 6$).

Les mesures sont présentées par moyenne \pm SEM. Test de Mann-Whitney : * $p < 0,05$.

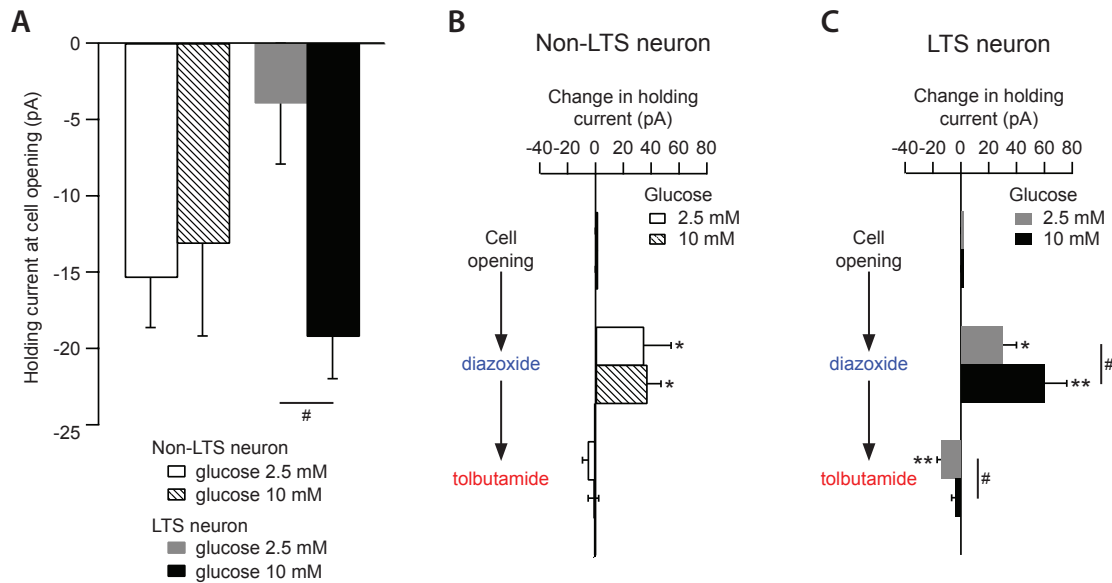


Figure 2.1.2. La concentration extracellulaire en glucose contrôle l'état d'ouverture des canaux K_{ATP} spécifiquement dans les neurones actifs pendant le SL.

A, Histogramme présentant les courants stationnaires à -65 mV mesurés à l'ouverture (passage en configuration cellule entière) de neurones du VLPO exposés à des concentrations extracellulaires de glucose de 2,5 mM et 10 mM.

Les mesures sont présentées par moyenne \pm SEM. Test de Mann-Whitney 2,5 mM par rapport à 10 mM glucose : # $p < 0,05$.

B-C, Effets de l'application de diazoxide puis de tolbutamide sur les courants stationnaires mesurés à -65 mV dans des neurones non-LTS (**B**) et des neurones LTS actifs pendant le SL (**C**). Les données sont représentées par la variation du courant stationnaire mesuré à la fin de l'application des substances pharmacologiques centrée par rapport au courant initial à l'ouverture de la cellule.

Les mesures sont présentées par moyenne \pm SEM. Test de Wilcoxon par rapport au courant initial : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; test de Mann-Whitney 2,5 mM par rapport à 10 mM glucose : # $p < 0,05$.

1.3.2. Spécificité de l'effet modulateur du glucose sur l'ouverture des canaux K_{ATP} dans les neurones actifs pendant le SL

Les mêmes mesures que celles présentées dans la Figure 7 de l'article 1 ont été également réalisées sur des neurones non-LTS. Ces neurones ont été enregistrés en configuration cellule entière et exposés à une concentration extracellulaire en glucose de 2,5 mM ou 10 mM ($n = 5$ par condition).

Aucune différence n'a été observée pour les neurones non-LTS concernant le courant stationnaire mesuré à -65 mV immédiatement après l'ouverture de la cellule en configuration cellule entière entre les deux concentrations de glucose extracellulaire (test de Mann-Whitney : $p = 0,21$; Figure 2.1.2 A), contrairement aux mesures réalisées sur les neurones LTS ($n = 8$ par condition ; test de Mann-Whitney : $p < 0,05$) Pour une concentration extracellulaire de glucose de 2,5 mM, comme pour celle de 10 mM, l'application de diazoxide a produit, pour les neurones non LTS, une augmentation significative du courant stationnaire (test de Wilcoxon : $p < 0,05$) similaire dans les deux conditions (test de Mann-Whitney : $p = 0,35$) (Figure 2.1.2 B). Ce courant

sortant induit par le diazoxide est supprimé par l'application de tolbutamide et le courant stationnaire mesuré en présence de tolbutamide n'est pas significativement différent de celui à l'ouverture de la cellule sous 2,5 mM et 10 mM de glucose (test de Wilcoxon : $p = 0,38$ et $p = 0,16$, respectivement). Ces effets induits par le tolbutamide ne sont donc pas différents entre les deux concentrations de glucose utilisées (test de Mann-Whitney : $p = 0,35$).

Cette absence d'effet de la concentration extracellulaire en glucose sur l'état d'ouverture des canaux K_{ATP} dans les neurones non-LTS contraste avec les mesures effectuées dans les neurones LTS (Figure 7 de l'article 1 et Figure 2.1.2 C), renforçant la spécificité de l'action excitatrice du glucose sur les neurones LTS actifs pendant le SL.

1.4. Conclusions du premier article

1.4.1. L'apport en glucose dans le VLPO facilite le SL

Au cours de cette étude, nous avons déterminé que l'injection bilatérale de glucose dans le VLPO augmente significativement le temps passé en SL et réduit la latence d'apparition du premier épisode de SL. De plus, nous avons observé que le glucose augmente de manière non significative le nombre et la durée moyenne des épisodes de SL. Ce résultat indique que le glucose pourrait agir sur la promotion ainsi que sur le maintien du SL. Afin de s'assurer que cet effet repose effectivement sur une modulation de l'activité des neurones du VLPO, nous avons analysé les effets de l'injection *in situ* du glucose sur le niveau d'activation des neurones du VLPO et de régions immédiatement adjacentes, évalué par l'immunomarquage de la protéine c-Fos. Cette approche d'anatomie fonctionnelle nous a permis de déterminer que l'injection de glucose augmente la densité de neurones immunoréactifs pour la protéine c-Fos dans le VLPO, suggérant que le glucose active directement des neurones de cette région. Ce même traitement n'ayant pas modifié le marquage c-Fos dans les régions voisines au VLPO, il apparaît alors que la possible diffusion du glucose dans les régions adjacentes au VLPO n'a pas affecté l'activation des neurones dans ces régions. Ainsi, l'effet somnogène du glucose serait restreint au VLPO.

1.4.2. Le glucose excite spécifiquement les neurones du VLPO actifs pendant le SL.

Des études précédentes d'électrophysiologie *ex vivo* ont permis d'établir les caractéristiques majeures des neurones du VLPO actifs pendant le SL et enregistrés *in vivo* (Sherin et coll., 1996 ; Sherin et coll., 1998 ; Szymusiak et coll., 1998 ; Lu et coll., 2000 ; Takahashi et coll., 2009). Ces neurones GABAergiques se caractérisent par la présence d'une bouffée de potentiels d'action déclenchée par l'activation d'un courant calcique activé à bas seuil (LTS, *low threshold calcium spike*) et par une morphologie triangulaire. De plus, ils sont inhibés par l'application de neurotransmetteurs associés à l'éveil tels que la noradrénaline et l'acétylcholine (Gallopain et coll., 2000 ; Chamberlin et coll., 2003 ; Matsuo et coll., 2003 ; Gallopain et coll., 2004 ; Morairty et coll., 2004 ; Saint-Mleux et coll., 2004 ; Gallopain et coll., 2005 ; Liu et coll., 2010). Ces neurones du VLPO qui innervent l'ensemble des systèmes associés à l'éveil sont supposés correspondre aux neurones promoteurs du SL permettant l'inhibition synchronisée des neurones monoaminergiques et cholinergiques actifs pendant l'éveil (Fort et coll., 2009 ; Saper et coll., 2010).

Dans cette étude, nous avons déterminé que les neurones du VLPO promoteurs du SL identifiés *ex vivo* sont spécifiquement excités en réponse à une augmentation de la concentration extracellulaire en glucose. À l'inverse, l'activité spontanée des neurones du VLPO dépourvus de LTS et excités par la noradrénaline est restée inchangée à la suite de modifications de la concentration extracellulaire en glucose. Notre étude a également révélé que la sensibilité au glucose des neurones du VLPO actifs pendant le SL suit une relation dose-réponse avec un EC_{50} autour de 4 mM, en accord avec les variations physiologiques de la concentration en glucose mesurées dans l'hypothalamus, celles-ci variant entre environ 1 et 5 mM (Silver et Erecinska, 1994 ; Routh, 2002 ; de Vries et coll., 2003). Ces résultats suggèrent que l'augmentation de la concentration en glucose qui interviendrait après un repas pourrait suffire à augmenter l'excitabilité des neurones du VLPO actifs pendant le sommeil.

1.4.3. Les neurones du VLPO actifs pendant le sommeil sont des senseurs glucidiques

Plusieurs populations neuronales impliquées dans la régulation de la glycémie, du comportement alimentaire ou des états de vigilance sont capables d'être excitées en réponse à une augmentation de la concentration ambiante en glucose (Ritter et coll., 1981 ; Miki et coll., 2001 ; Ibrahim et coll., 2003 ; Levin et coll., 2004 ; Burdakov et coll., 2005 ; Song et Routh, 2005 ; Balfour et coll., 2006 ; Parton et coll., 2007 ; Blouet et Schwartz, 2010 ; Kong et coll., 2010 ; Watts et Donovan, 2010). Certains mécanismes moléculaires ont été décrits pour expliquer la sensibilité de ces neurones au glucose, en définissant des voies de signalisation « métaboliques » et « indépendantes du métabolisme » (Gonzalez et coll., 2009). Dans certains cas, en particulier dans l'hypothalamus ventromédial, le glucose peut moduler l'activité neuronale par une action présynaptique (Song et coll., 2001 ; Routh, 2002). Dans notre étude, nous avons trouvé que l'effet excitateur du glucose persiste dans des conditions de découplage synaptique similaires à celles utilisées par Song et coll. (2001), ce qui indique une action postsynaptique du glucose. De plus, nous avons démontré que l'application d'un analogue non métabolisable du glucose ne mime pas les effets du glucose, indiquant que la métabolisation du glucose est requise pour produire l'effet excitateur observé. Nous avons également observé que les neurones du VLPO actifs pendant le SL expriment des ARNm codant pour le transporteur au glucose GluT3 et l'enzyme glucokinase (GK), exprimée uniquement dans certains neurones senseurs du glucose (Dunn-Meynell et coll., 2002) et qui constitue la première étape de la glycolyse en convertissant le glucose en glucose-6-phosphate. Bien que les ARNm de la GK n'aient été détectés que dans un faible nombre de neurones, l'importance de la GK est renforcée dans notre étude par la démonstration fonctionnelle que l'inhibition pharmacologique de cette enzyme est suffisante pour totalement abolir l'effet excitateur du glucose.

Il faut cependant garder en mémoire que le glucose n'est pas le seul substrat énergétique dans le cerveau ; le lactate produit par les astrocytes est considéré comme le substrat privilégié des neurones (Pellerin et coll., 1998 ; Pellerin et Magistretti, 2003 ; Levin et coll., 2004) (Figure 2.1.3). Cependant, nos résultats expérimentaux semblent permettre d'écarter une contribution significative du lactate dans le mécanisme mis en jeu dans les neurones du VLPO. En effet, le blocage des transporteurs au lactate n'affecte pas l'amplitude de l'effet excitateur du glucose alors que l'inhibition de la GK abolit complètement cet effet. Toutefois, nous avons également observé que l'application de l'inhibiteur des transporteurs du lactate conduisait à une faible diminution non significative du potentiel de membrane des neurones LTS. Ce résultat indiquerait qu'il existe, dans nos conditions expérimentales, une libération de lactate par les astrocytes qui contribuerait à l'augmentation de l'excitabilité des neurones du VLPO. Cependant, dans nos conditions

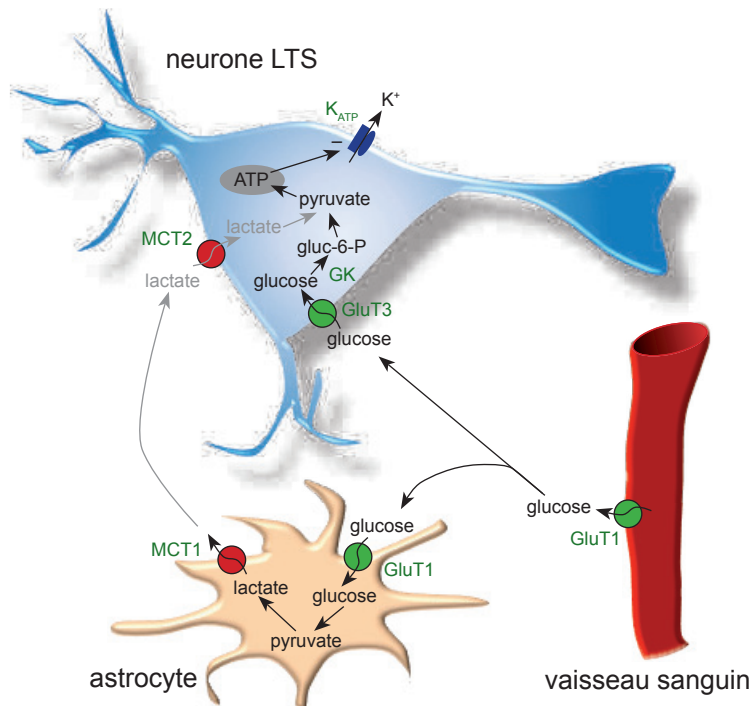


Figure 2.1.3. Modèle de la voie de signalisation sous-jacente de l'effet excitateur du glucose sur les neurones actifs pendant le SL du VLPO.

Le glucose pénètre directement dans la cellule *via* les transporteurs GluT3 où il est ensuite phosphorylé par la glucokinase (GK). Le catabolisme du glucose conduit à une élévation de la production d'ATP qui engendre une fermeture des canaux K_{ATP} et une dépolarisation de la cellule.

expérimentales, la production et la libération de lactate par les astrocytes ne seraient pas modifiées de manière significative par une modification de la concentration extracellulaire en glucose.

Ainsi, bien que nous ne puissions pas exclure une éventuelle contribution du lactate, nos résultats indiquent que le glucose seul est capable d'augmenter l'excitabilité des neurones du VLPO promoteurs du SL d'une manière similaire aux mécanismes précédemment décrits pour d'autres populations hypothalamiques ou dans les cellules β du pancréas. Dans ces mécanismes, le glucose pénètre dans les cellules grâce à des transporteurs spécifiques où il est alors phosphorylé par la GK ce qui conduit à une augmentation de la production d'ATP qui à son tour inhibe des canaux potassiques sensibles à l'ATP (K_{ATP}) aboutissant à une dépolarisation de la cellule (Ashcroft et Rorsman, 2004) (Figure 2.1.3).

1.4.4. Les canaux K_{ATP} lient l'excitabilité des neurones du VLPO au statut énergétique de la cellule

Les canaux K_{ATP} sont des hétéro-octamères composés de quatre sous-unités Kir6.1 ou Kir6.2 qui forment le pore du canal, et de quatre sous-unités régulatrices SUR1 ou SUR2 qui confèrent au canal une sensibilité au ratio ATP/ADP. L'utilisation de techniques complémentaires nous a permis de mettre en évidence que les neurones LTS du VLPO expriment des canaux K_{ATP} composés des sous-unités $K_{ir}6.2$ et SUR1 (Ammala et coll., 1996 ; Inagaki et coll., 1996 ; Isomoto et coll., 1996 ; Sun et coll., 2008). Grâce à la RT-PCR sur cellule unique, nous avons ainsi pu déterminer que les neurones LTS du VLPO exprimaient des ARNm codant pour l'expression de la sous-unité $K_{ir}6.2$ mais pas Kir6.1. Une approche pharmacologique nous a permis de déduire que les canaux K_{ATP} présents dans ces neurones contenaient la sous-unité régulatrice SUR1. Cependant, par RT-PCR sur cellule unique, nous n'avons pas été en mesure de détecter la présence de l'ARNm codant pour la sous-unité SUR1. Cette absence de détection pourrait être due à un très faible nombre de copies de cet ARN dans les neurones, le rendant de fait indétectable par RT-PCR sur cellule unique (Kang et coll., 2004 ; Gallopin et coll., 2006). Par cette approche expérimentale,

seul environ un tiers du cytoplasme de la cellule enregistrée est collecté et la limite de détection de cette méthode est estimée à environ 25 copies collectées de l'ARNm (Tsuzuki et coll., 2001).

Les neurones LTS du VLPO actifs pendant le SL ne sont pas les seuls à exprimer des canaux K_{ATP} fonctionnels ; ces derniers ont été également détectés dans les neurones non-LTS du VLPO bien que les courants induits par l'application de diazoxide et de tolbutamide soient bien inférieurs à ceux enregistrés dans les neurones LTS. De plus, l'estimation de la densité membranaire de canaux K_{ATP} indique que celle-ci serait plus importante dans les neurones actifs pendant le SL que dans les neurones non-LTS insensibles au glucose. Ce résultat est également en accord avec des études précédentes suggérant que les canaux K_{ATP} sont nécessaires mais non-suffisants pour caractériser des neurones sensibles au glucose ; l'expression de ces canaux K_{ATP} n'est pas restreinte à ces seules populations neuronales et ces canaux jouent un rôle important dans les mécanismes de neuroprotection en diminuant l'activité neuronale dans le contexte d'une diminution drastique des niveaux d'ATP comme, par exemple, au cours d'un épisode ischémique (Sun et coll., 2006). Néanmoins, même si les canaux K_{ATP} interviennent dans des conditions de stress métabolique intense, nous avons pu démontrer ici que des variations physiologiques de la concentration en glucose étaient directement couplées à l'état d'ouverture des canaux K_{ATP} dans les neurones LTS du VLPO mais pas dans les neurones dépourvus de LTS.

1.4.5. L'état métabolique participe à la régulation des états de vigilance

Sommeil et métabolisme entretiennent des relations étroites : chez les rongeurs, la privation alimentaire augmente l'état d'éveil, compatible avec le développement de comportement de recherche de nourriture (Jacobs et McGinty, 1971 ; Dewasmes et coll., 1989 ; Minet-Ringuet et coll., 2004). À l'inverse, la consommation d'aliments riches en carbohydrates semble faciliter le sommeil (Danguir et Nicolaidis, 1979 ; Nicolaidis, 2006). De même, chez l'homme, la prise de glucose semble augmenter la somnolence et faciliter l'endormissement (Landstrom et coll., 2000 ; Horne et Baulk, 2004 ; Anderson et Horne, 2006 ; Afaghi et coll., 2007). Ces résultats attestent d'un fort couplage entre le métabolisme et le sommeil.

Dans cette étude, nous avons pu démontrer pour la première fois que les neurones du VLPO actifs pendant le sommeil sont capables d'intégrer des modulations de l'état métabolique, à travers par exemple des variations de la concentration extracellulaire en glucose, dans le but de moduler les états de vigilance. Ces résultats sont complémentaires de ceux démontrant que le glucose est également capable de moduler l'activité des neurones orexine et des neurones MCH de l'hypothalamus tubéral impliqués respectivement dans le contrôle de l'éveil (Tsujino et Sakurai, 2009) et la régulation de certains aspects du sommeil (Verret et coll., 2003 ; Hassani et coll., 2009 ; Jégo et coll., 2013 ; Konadhode et coll., 2013 ; Tsunematsu et coll., 2014). Il a été ainsi démontré par des enregistrements électrophysiologiques *ex vivo* que les neurones orexine sont inhibés par le glucose (Yamanaka et coll., 2003 ; Burdakov et coll., 2005 ; Burdakov et coll., 2006) et qu'environ 70 % des neurones MCH sont excités par le glucose (Burdakov et coll., 2005 ; Kong et coll., 2010) dans des gammes de concentrations compatibles avec les valeurs physiologiques. Les neurones sensibles au glucose de l'hypothalamus ont à l'origine été décrits comme jouant un rôle déterminant dans l'homéostat énergétique et les comportements alimentaires (Oomura et coll., 1969 ; Oomura et coll., 1974 ; Silver et Erecinska, 1998 ; Williams et coll., 2008 ; Routh, 2010 ; Tsujino et Sakurai, 2013). Ce dernier point soulève la question de l'implication relative des neurones du VLPO sensibles au glucose dans le contrôle du métabolisme et des états de vigilance. Bien qu'aucune donnée expérimentale ne suggère un rôle du VLPO dans le contrôle du métabolisme,

celui-ci pourrait y contribuer indirectement à travers des projections axonales vers des systèmes notablement impliqués dans cette fonction tels que l'hypothalamus tubéral ou l'hypothalamus dorsomédial (Sherin et coll., 1998 ; Tsujino et Sakurai, 2013). D'autre part, dans nos conditions expérimentales, nous avons observé que l'augmentation du taux de décharge des neurones LTS du VLPO en réponse à une augmentation de la concentration en glucose est relativement lente à s'installer par rapport à ce qui a été précédemment rapporté pour d'autres populations neuronales excitées par le glucose et impliquées dans la régulation du métabolisme (Miki et coll., 2001 ; Wang et coll., 2004 ; Burdakov et coll., 2005 ; Kong et coll., 2010 ; Routh, 2010). Cette observation suggère que les neurones du VLPO actifs pendant le SL seraient capables d'intégrer des variations lentes, plutôt que des modifications rapides et abruptes, de la glycémie dans le but de moduler les états de vigilance en fonction de l'état métabolique.

La démonstration que l'injection de glucose directement dans le VLPO suffit à stimuler le sommeil et que les neurones du VLPO actifs pendant le sommeil pourraient être excités par une élévation de la concentration extracellulaire en glucose, et donc de la glycémie (Silver et Ereinska, 1994 ; Routh, 2002 ; de Vries et coll., 2003), renforce l'idée d'un moteur métabolique du sommeil. Il agirait alors de concert avec les moteurs circadien et homéostatique pour faciliter l'entrée en sommeil quand toutes les conditions propices sont réunies. De plus, cette action du glucose facilitatrice du sommeil est renforcée son action inhibitrice sur les neurones sécrétant le peptide orexine localisés dans l'hypothalamus tubéral (Yamanaka et coll., 2003 ; Burdakov et coll., 2006). Ainsi le glucose pourrait favoriser la promotion du sommeil par une action concertée en stimulant, d'une part, les neurones actifs pendant le sommeil du VLPO et, d'autre part, en inhibant les neurones orexine qui jouent un rôle crucial dans le maintien de l'éveil. À l'inverse, une baisse des niveaux de glucose circulants faciliterait l'éveil en augmentant l'excitabilité des neurones orexine et en diminuant celle des neurones du VLPO. Cette action concertée du glucose pourrait également être renforcée par son effet excitateur sur les neurones exprimant l'hormone de mélanocortine (neurones MCH) colocalisés avec les neurones orexine dans l'hypothalamus tubéral (Burdakov et coll., 2005 ; Kong et coll., 2010). Ces neurones MCH joueraient un rôle important dans la modulation du sommeil (Verret et coll., 2003 ; Ahnaou et coll., 2008 ; Fort et coll., 2009 ; Hassani et coll., 2009 ; Saper et coll., 2010 ; Jégo et coll., 2013 ; Konadhode et coll., 2013 ; Tsunematsu et coll., 2014). Néanmoins, leur contribution exacte dans la régulation du SP uniquement ou du SL et du SP reste intensément débattue (*Critical Topics Forum, SLEEP* : Szymusiak, 2013 ; Fraigne et Peever, 2013 ; Jones et Hassani, 2013 ; McGinty et Alam, 2013 ; Luppi et coll., 2013 ; Blouin et Siegel, 2013 ; Pelluru et coll., 2013 ; Jégo et Adamantidis, 2013).

Chapitre 2 :

Rôle des neurones exprimant l'hormone de mélanocortine dans le contrôle du cycle veille-sommeil — étude d'un modèle murin de lésion spécifique de ces neurones

2.1. Présentation du deuxième article

Dans l'étude précédente, nous avons démontré l'existence d'un moteur métabolique au sommeil qui pourrait moduler la transition entre l'éveil et le sommeil grâce à l'action excitatrice du glucose sur les neurones actifs pendant le SL du VLPO. Néanmoins, le VLPO n'est pas la seule région cérébrale dans laquelle le glucose pourrait agir pour faciliter le déclenchement du sommeil. Le glucose augmente également l'excitabilité des neurones MCH localisés dans l'hypothalamus tubéral (Burdakov et coll., 2005 ; Kong et coll., 2010). Ces neurones jouent un rôle important dans la régulation des comportements alimentaires et de la dépense énergétique (Alon et Friedman, 2006 ; Guyon et coll., 2009 ; Pissios, 2009 ; Semjonous et coll., 2009 ; Mul et coll., 2011 ; Barson et coll., 2013 ; Kosse et coll., 2015) ainsi que dans la régulation du sommeil. Néanmoins la contribution exacte de cette population neuronale dans le contrôle du SL et du SP ou du SP uniquement demeure l'objet de controverses intenses (*Critical Topics Forum, SLEEP* : Szymusiak, 2013 ; Fraigne et Peever, 2013 ; Jones et Hassani, 2013 ; McGinty et Alam, 2013 ; Luppi et coll., 2013 ; Blouin et Siegel, 2013 ; Pelluru et coll., 2013 ; Jengo et Adamantidis, 2013). Certaines études récentes proposent en effet que les neurones MCH seraient principalement impliqués dans la genèse et la consolidation du SP (Verret et coll., 2003 ; Clement et coll., 2012 ; Jengo et coll., 2013), alors que d'autres leur attribuent un rôle dans le contrôle des deux états de sommeil (Ahnaou et coll., 2008 ; Konadhode et coll., 2013 ; Tsunematsu et coll., 2014).

Dans le but de mieux comprendre la contribution des neurones MCH dans la physiologie du sommeil et tenter de combler le fossé entre ces différents résultats, nous avons étudié le sommeil et sa régulation homéostatique chez une lignée murine transgénique développant une ablation sélective des neurones sécrétant la MCH. Cette stratégie d'ablation ciblée génétiquement repose sur l'expression de la forme toxique de l'ataxine-3, responsable de la maladie de Machado-Joseph, sous le contrôle du promoteur du gène MCH (*preproMCH*). L'accumulation d'ataxine-3 dans les neurones MCH conduit à leur apoptose (Alon et Friedman, 2006).

Dans cette étude, nous avons déterminé que les souris exprimant l'ataxine-3 dans les neurones MCH (MCH^{Atax}) développent des altérations légères de la structure du SL et du SP dans des conditions basales et pendant la période de récupération faisant suite à une privation totale de sommeil. En particulier, nous avons mis en évidence un rôle des neurones MCH dans la régulation fine du SL : les neurones MCH sembleraient impliqués dans des mécanismes conduisant à l'amélioration de la qualité du SL par la consolidation des épisodes de SL et la facilitation de l'apparition d'ondes lentes de forte amplitude. Ces mécanismes pourraient jouer un rôle important particulièrement dans la fonction de restauration du sommeil.



Sleep architecture and homeostasis in mice with partial ablation of melanin-concentrating hormone neurons



Christophe Varin^{a,b}, Sébastien Arthaud^{a,b}, Denise Salvvert^{a,b}, Nadine Gay^{a,b},
Paul-Antoine Libourel^{a,b}, Pierre-Hervé Luppi^{a,b}, Lucienne Léger^{a,b}, Patrice Fort^{a,b,*}

^a Neuroscience Research Center of Lyon (CRNL), CNRS UMR 5292, INSERM U1028, SLEEP Team, Lyon, France

^b Université Claude Bernard, Lyon 1, Lyon, France

HIGHLIGHTS

- Using an original model of transgenic mice, we provide new insights regarding the contribution of the hypothalamic MCH-expressing neurons to the regulation of vigilance states.
- We indeed show that adult MCH^{Atax} mice with a severe alteration of central MCH system depicted subtle but deleterious qualitative and quantitative alterations of sleep.
- Whereas MCH neurons are thought to be involved in REM sleep physiology, our data suggests that when activated they also improve the depth of slow wave sleep (SWS) by favoring both its consolidation and related slow-wave activity (SWA).
- Such mechanisms could be recruited for restoring function of sleep especially following homeostatic challenge as sleep deprivation or learning/memory processes.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 July 2015

Received in revised form 23 October 2015

Accepted 25 October 2015

Available online 31 October 2015

Keywords:

MCH
Tuberal hypothalamus
Ataxin-3
REM sleep
Sleep deprivation
Sleep homeostasis

ABSTRACT

Recent reports support a key role of tuberal hypothalamic neurons secreting melanin concentrating-hormone (MCH) in the promotion of Paradoxical Sleep (PS). Controversies remain concerning their concomitant involvement in Slow-Wave Sleep (SWS). We studied the effects of their selective loss achieved by an Ataxin 3-mediated ablation strategy to decipher the contribution of MCH neurons to SWS and/or PS. Polysomnographic recordings were performed on male adult transgenic mice expressing Ataxin-3 transgene within MCH neurons (MCH^{Atax}) and their wild-type littermates (MCH^{WT}) bred on two genetic backgrounds (FVB/N and C57BL/6). Compared to MCH^{WT} mice, MCH^{Atax} mice were characterized by a significant drop in MCH mRNAs (−70%), a partial loss of MCH-immunoreactive neurons (−30%) and a marked reduction in brain density of MCH-immunoreactive fibers. Under basal condition, such MCH^{Atax} mice exhibited higher PS amounts during the light period and a pronounced SWS fragmentation without any modification of SWS quantities. Moreover, SWS and PS rebounds following 4-h total sleep deprivation were quantitatively similar in MCH^{Atax} vs. MCH^{WT} mice. Additionally, MCH^{Atax} mice were unable to consolidate SWS and increase slow-wave activity (SWA) in response to this homeostatic challenge as observed in MCH^{WT} littermates. Here, we show that the partial loss of MCH neurons is sufficient to disturb the fine-tuning of sleep. Our data provided new insights into their contribution to subtle process managing SWS quality and its efficiency rather than SWS quantities, as evidenced by the deleterious impact on two powerful markers of sleep depth, *i.e.*, SWS consolidation/fragmentation and SWA intensity under basal condition and under high sleep pressure.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Evidence implicates the tuberal hypothalamic area (THA) as an integrative center for the regulation of paradoxical sleep (PS), upstream to PS-promoting brainstem networks [1–4]. Recent data in rodents point to the involvement of THA neurons co-expressing melanin-concentrating hormone (MCH), CART, Nesfatin-1, GAD67 and vGluT2 in PS regulation [3,5–11]. These so-called MCH neurons send widespread efferents consistent with the brain distribution

* Corresponding author at: Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon (CRNL), CNRS UMR5292–INSERM U1028, Faculté de Médecine Lyon–Est–Laënnec/La Buire–UCBL 1, 7, rue Guillaume Paradin, 69372 LYON Cedex 08, France. Fax: +33 4 78 77 10 22.

E-mail address: patrice.fort@univ-lyon1.fr (P. Fort).

of MCH-R1 receptors and their potential contribution to SWS or PS [12–18]. They express the immediate early gene *c-Fos* after PS rebound following short (6 h) or long-lasting (72 h) PS deprivations in rats [10,11,19–21] and mice [22]. Their firing is quite specific to PS as revealed by juxtacellular recordings across natural sleep–waking cycle in head-restraint rats [23]. In mice, chronic optogenetic activation of MCH neurons at the beginning of the active period increases SWS and PS. The same protocol during the sleep period promotes PS and increases the probability of SWS to PS transition [24,25]. Furthermore, the acute optogenetic stimulation of MCH neurons during SWS increases the probability of PS occurrence whereas stimulation during PS extends the duration of the current episode [26]. However, no drastic effects were reported following their acute or chronic silencing achieved with inhibitory optogenetic tools [25,26]. The precise contribution of MCH neurons to SWS and/or PS regulation remains elusive despite an obvious experimental effort in recent years [27]. To bridge this gap, we took the opportunity to record sleep in transgenic mice with a targeted ablation of MCH cell bodies and their axons [28]. We used to attain this goal a toxin-mediated genetic cell ablation strategy consisting of a truncated Machado–Joseph disease gene product (Ataxin-3) under the control of an *MCH* gene promoter in FVB/N and C57BL/6 transgenic mice. Pro-apoptotic Ataxin-3 accumulates in MCH neurons from the first post-natal week, with a maximal loss of MCH cell bodies by post-natal week 15 [28].

Here, we found that adult MCH^{Atax} mice, endowed with a severe although partial impairment of MCH system, depicted subtle but deleterious qualitative and quantitative alterations of both SWS and PS during spontaneous sleep–wake cycle and recovery period following a total sleep deprivation. This suggests that the MCH neurons, when activated, improve SWS depth by favoring both its consolidation and related slow-wave activity (SWA). Such mechanisms could be recruited for restoring function of sleep especially following homeostatic challenge.

2. Material and methods

2.1. Characterization of MCH^{Atax} mice bred on C57BL/6 and FVB/N genetic backgrounds

2.1.1. Animal care

Experiments were carried out in strict accordance with the European Communities Council Directive (86/609/EEC) and recommendations in the guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health (NIH publication n° 85–23). Protocols were approved by the local “Comité d’Éthique en Expérimentation Animale de l’Université LYON 1 (C2EA)”. Breeding was done within the local “ALECS conventionnel” facility. Offspring were genotyped (at post-natal day 10) by PCR amplification of genomic DNA using the following primer sets (Eurofins, France): forward, CGGGACCTATCAGGACAGAGT; reverse, TCGCCTGCGACGCGGCATCT [28]. Once genotyped, mice were weaned at 3–4 weeks of age, grouped and housed according to gender. Only male transgenic (MCH^{Atax}) and wild-type (MCH^{WT}) littermates were used.

2.1.2. Breeding of FVB/N transgenic mice

Two 4-month old MCH^{Atax} males, provided by Pr. J.M. Friedman (The Rockefeller University, New York, USA), were the founders. The protocol for their generation has been previously detailed [28]. Our colony was maintained for the duration of experiments with a standard mating system: one MCH^{Atax} male with 2 WT females (Charles River Laboratories, France).

2.1.3. Transfer of the MCH-Ataxin-3 transgene to the C57BL/6 mice

We decided to transfer the transgene to C57BL/6 mice, genetic background widely used in basic sleep research, because FVB/N

mice are characterized by a short-onset retinal degeneration. FVB/N MCH^{Atax} males were mated with C57BL/6 WT females (Charles River) until the 8th generation to get a complete transgene transfer (Banbury Conference on genetic background in mice, 1997).

2.1.4. Real-time quantitative PCR analysis

This approach was used to compare expression levels of MCH and orexin mRNA in MCH^{Atax} vs. MCH^{WT} after the completion of MCH cell bodies ablation. Adult mice (post-natal weeks 15–20; *n* = 16 for each genotype and genetic background) were sacrificed by cervical dislocation. The hypothalamus (left and right hemispheres) were dissected in sterile ice-cold Ringer's solution and immediately stored at –80 °C. Total RNAs were extracted with the RNeasy Lipid Tissue minikit (Qiagen, Netherlands). Reverse transcription was subsequently performed on 1 µg of total RNAs in a final volume of 20 µL using M-MLV (Invitrogen, USA). cDNAs were amplified by real-time quantitative PCR (LightCycler, Roche, France) using custom primers (Eurofins). Nesfatin-1 and CART mRNAs co-expressed in MCH neurons [5,6] were also quantified in FVB/N mice. Data were normalized to cyclophilin expression using the same sample from the same animal.

Gene	Forward oligonucleotide	Reverse oligonucleotide
MCH	GTATGCTGGGAAGAGTCTAC	ACGTC AAGCATATCGCTTAC
Orexin	CTAGAGCCACATCCCTGCTC	GGGAAGTTTGGATCAGGACA
Nesfatin (Nucb2)	GATGGATTGGACCCTAATGACT	GTTGCTGGTCCAGTGTCTCC
CART	CATCTACGACAAGAAGTACG	CGTCCTTCAACAAGCACTTCA
Cyclophilin	CTGCACTGCCAAGACTGAATG	TTGCCAATCTGGACCCAAA

2.1.5. Immunohistochemistry

The dual immunodetection of MYC/MCH and MYC/Orexin was done to assess the selective expression of the Ataxin-3 transgene in MCH neurons in MCH^{Atax} mice and to quantify the loss of MCH cell bodies. At post-natal weeks 15–20, MCH^{Atax} and MCH^{WT} mice were deeply anesthetized (sodium pentobarbital, 150 mg/kg, i.p., Ceva Santé Animale, France) and transcardially perfused with Ringer's lactate solution containing 0.1% heparin and 50 mL of an ice-cold fixative (4% paraformaldehyde in 0.1 M PB, pH 7.4). Brains were postfixed for 24 h at 4 °C in the same fixative, dipped in PB containing 30% sucrose for 2 days and finally frozen in cold methyl-butane. Brain free-floating coronal sections (25 µm-thick) were obtained using a cryostat, collected in PBS with 0.3% Triton X100 and submitted to the standard sequential incubations for dual MYC/MCH or MYC/Orexin immunohistochemical staining as previously detailed [5]. Primary antibodies used were biotinylated goat anti-MYC (1:5,000, Vector Laboratories, USA), rabbit anti-MCH (1:50,000, Phoenix Pharmaceuticals, USA), or goat anti-Orexin (1:10,000, Santa Cruz Biotechnology, USA) for 2 h at 4 °C. Secondary biotinylated antisera (1:1,000, 90 min) and ABC Elite kit (1:1,000, 90 min) were purchased from Vector Labs (USA). Double-labeled sections evenly spaced throughout the THA extent (4 sections per mouse) were analyzed with an Axioskop 2 microscope (Zeiss, Germany) equipped with a motorized X–Y-sensitive stage and a video camera connected to a computerized image analysis system (ExploraNova, France). Labeled neurons were bilaterally plotted and automatically counted using Mercator v.2 software (ExploraNova). Photomicrographs were taken with a CCD Color 10-bit QiCam camera, imported into Adobe Photoshop 10 and digitally adjusted for brightness and contrast.

Finally, to determine whether glial cells were activated in the tuberal hypothalamus in MCH^{Atax} vs. MCH^{WT} mice at time polysomnographic recordings were done, glial markers were immunodetected using the following primary antibodies: rabbit anti-GFAP (1:10,000, Dako, Denmark); rabbit anti-S100 (1:10,000, Dako, Denmark); rabbit anti-Iba1 (1:5,000, Wako Chemicals, Germany).

2.2. Polysomnographic recordings in MCH^{Atax} and MCH^{WT} mice

A total of 32 FVB/N mice and 39 C57BL/6 adult mice (post-natal weeks 15–20) were used.

2.2.1. Surgical procedure

FVB/N (weight: 31.7 ± 0.6 g for MCH^{WT} vs. 29.1 ± 0.6 g for MCH^{Atax}) and C57BL/6 mice (weight: 29.4 ± 0.4 g for MCH^{WT} vs. 27.5 ± 0.5 g for MCH^{Atax}) were standardly prepared for polysomnography under anesthesia (ketamine and xylazine, 100 and 10 mg/kg, respectively). For EEG recordings, 3 stainless steel screws were inserted into the skull above the right parietal, frontal and cerebellar (electrical reference) cortices. The differential EMG recording was harvested using 2 wire electrodes with a gold-coated tin drop inserted in between neck muscles. All electrodes were connected into a miniature pedestal (Plastics One, Bilaney, Germany) and fixed to the skull with Super-Bond (C&B, Sun Medical Co., Ltd., Japan) and dental cement (Paladur, Heraeus Kuzler, Germany). At the end of surgery, Carprofen (5 mg/kg) was subcutaneously administered for pain caring. Implanted mice were housed in individual Plexiglas barrels (25 cm in diameter, height 40 cm) with woodchip bedding and *ad libitum* access to food pellets (Extra Labo, France) and water.

2.2.2. Baseline polysomnography

After 7 days of recovery, mice were transferred to an insulated soundproof box under the standard laboratory conditions (12 h/12 h light–dark cycle, lights on 8 a.m., 22 ± 1 °C) and connected to a cable plugged to a rotating connector (Plastics One) to allow free movements. After 2–3 days of habituation, 4 mice were simultaneously recorded (2 MCH^{WT} and 2 MCH^{Atax}) for 2 consecutive days. Unipolar EEG and bipolar EMG signals were amplified (MCP+, Alpha–Omega Engineering, Israel), analog-to-digital converted with a sampling rate of 520.8 Hz and collected on a PC located in a separated room *via* a CED-1401 Plus interface with Spike2 software (Cambridge Electronic design, CED, UK). Vigilance states were scored by 5 s epochs and classified as Waking, Slow-Wave Sleep (SWS), and Paradoxical Sleep (PS), based on the visual inspection of EEG/EMG signals. During waking, activated low-amplitude EEG is accompanied by a sustained EMG activity with phasic bursts. SWS is characterized by high voltage EEG slow waves, spindles, and the disappearance of phasic muscle activity. A decrease in the EEG amplitude associated with a flat EMG (muscle atonia) and a distinctive theta rhythm indicates the onset of PS episodes. Hypnograms were then drawn directly using a custom script in Spike2 (CED, UK). Finally, the values were exported to calculate standard parameters for each vigilance state (quantities, percentage, bout number and duration, as mean \pm SEM) over a 24-h cycle and 12-h light/dark periods (LP/DP).

2.2.3. Total sleep deprivation (TSD)

A subset of the same MCH^{Atax} and MCH^{WT} mice were then submitted to 4-h of TSD (starting at 10 a.m.) with the standard gentle deprivation protocol (tapping or oscillation of the barrel for few seconds whenever signs of sleep were visually detected). Physical contacts were rigorously avoided. At 2 p.m., mice were left undisturbed in their individual barrel for a 24-h recovery period.

2.3. Data analysis

2.3.1. Spectral analysis

In order to compare EEG rhythmic activities in MCH^{Atax} vs. MCH^{WT} mice, spectral analysis of parietal EEG power was computed using a fast Fourier transform (FFT; 0.1 Hz resolution)

on 5-s artifact-free epochs. Spectra were subsequently normalized by the power over the entire frequency range (0.5–45 Hz) of each epoch [29]. The mean power density was then calculated for each vigilance state in each spectral band (delta [0.5–4 Hz]; theta [4.2–9 Hz]; alpha [9.2–12 Hz]; beta [12.2–30 Hz]) over DP or LP and expressed as densities of EEG power. Mean power densities were computed as described above during recovery period following TSD over the first 4 h (vs. corresponding 4-h baseline).

2.3.2. Survival analysis

In order to detect subtle alterations in MCH^{Atax} vs. MCH^{WT} mice, we calculated Kaplan–Meier survival distributions for Waking, SWS, and PS bout durations: the survival function evaluates the probability that an episode will last for a given duration. Data were pooled by genotype to improve statistics. The validity of pooling data was first verified by applying the Kolmogorov–Smirnov test to data from each individual mouse compared to data pooled by genotype [30–32]. By not rejecting the null hypothesis in each case, we concluded that pooling data did not change the underlying distribution of durations. The same analysis was done by segregating SWS bouts into two categories according to the nature (PS or Waking) of the succeeding state.

2.3.3. Two-dimensional space analysis of vigilance states

Fast Fourier transform was applied to each 5-s epoch of parietal EEG signals and two spectral ratios were computed by integrating spectral power over specific frequencies determined to obtain the best cluster separation: ratio 1 = 6.5–9 Hz/0.5–9 Hz and ratio 2 = 0.5–20 Hz/0.5–45 Hz. Points corresponding to 5-s activity were smoothed by applying a 25-s wide Hann window to reduce variability within states and were finally plotted into the two-dimensional map leading to the formation of state clusters corresponding to Waking, SWS, and PS [33,34]. We then pooled data from multiple mice with the same genotype to compare the filling of the two-dimensional space in MCH^{Atax} vs. MCH^{WT} mice of each genetic background and calculated the density of points on a 100×100 grid extending from 0 to 0.9 for ratio 1 and from 0.7 to 1 for ratio 2; thus characterizing the distribution of EEG rhythmic activity during the three vigilance states.

2.4. Statistics

Statistical significance was set at 0.05 for all procedures. Normality and homoscedasticity assumptions were verified prior to the use of any parametric tests. In case of violation of any of these assumptions, standard transforms were applied to meet the above criteria. Differences were tested between genotypes with Mann–Whitney *U*-tests for neuroanatomical counts and qPCR experiments. Average values (mean \pm SEM) for sleep quantities and spectral analysis during baseline recordings and following TSD, were analyzed by repeated measure ANOVA. *Post-hoc* Bonferroni-corrected *t*-tests were used for baseline recordings to identify differences between genotypes. *Post-hoc* paired *t*-tests were used for TSD experiments to perform comparisons between baseline and recovery within a genotype and *t*-tests between genotypes; Bonferroni correction was subsequently applied. Survival functions were compared between genotypes for each vigilance state using log-rank tests.

3. Results

3.1. Adult MCH^{Atax} mice are endowed with a severe impairment of MCH neurons

The expression of the cytotoxic Ataxin-3 transgene in MCH-expressing neurons was assessed using double immunohis-

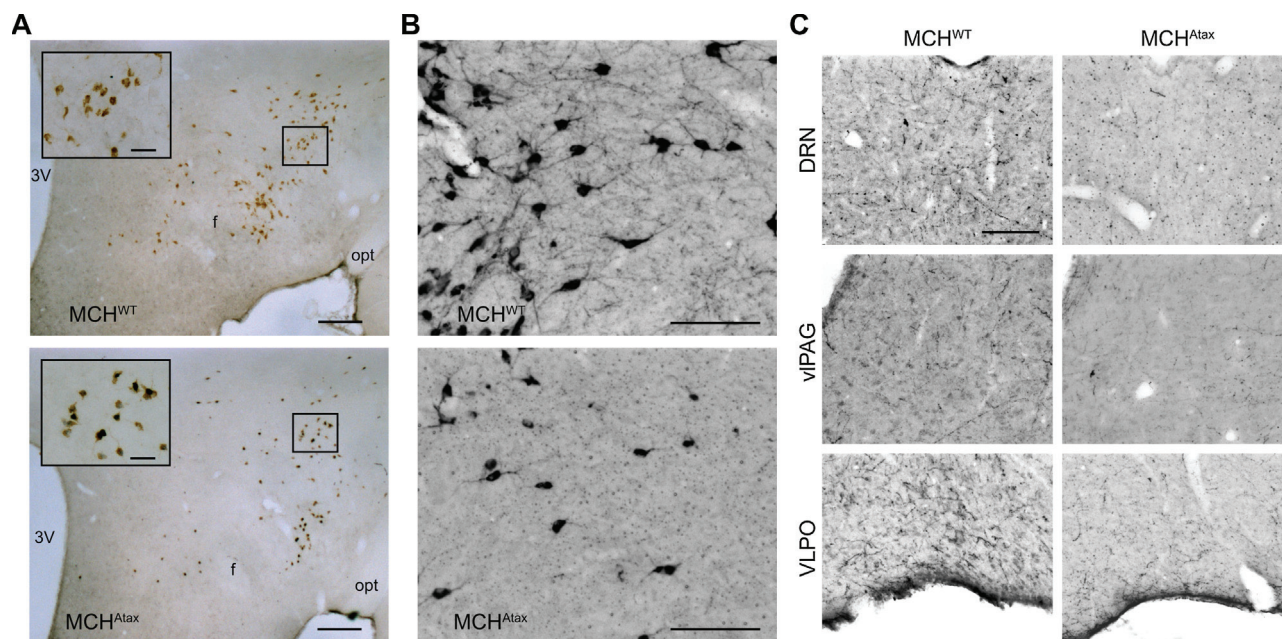


Fig. 1. MCH-immunoreactive neurons and their axons are specifically ablated in MCH^{Atax} mice.

A, Photomicrographs of coronal hypothalamic sections double-stained with anti-MCH antiserum (brown cytoplasm) and anti-MYC antiserum (dark nucleus) in representative MCH^{WT} (upper panel) and MCH^{Atax} (lower panel) mice (C57BL/6 genetic background). Note that, despite the specific co-expression of ataxin-3 transgene evidenced by labeling for MYC epitope, MCH-immunoreactive neurons with impaired morphology are still encountered within THA of adult transgenic MCH^{Atax} mice. Scale bars: 200 μ m/insert: 20 μ m. Abbreviations: 3V: third ventricle; f: fornix; opt: optic tract. B, Photomicrograph of hypothalamic sections stained against MCH at the level of the tuberal hypothalamus in representative MCH^{WT} (upper panel) and MCH^{Atax} (lower panel) mice (C57BL/6 genetic background). Note the impaired morphology of MCH-immunoreactive cell bodies and the reduced number of primary dendrites in MCH^{Atax} mice. Scale bar: 50 μ m. C, Photomicrographs comparing the density of MCH-immunoreactive terminals in representative MCH^{WT} (left panels) and MCH^{Atax} (right panels) mice (C57BL/6 genetic background) within the dorsal raphe nucleus (DRN), the ventrolateral periaqueductal gray matter (VIPAG) and the ventrolateral preoptic area (VLPO). Note that the partial ablation of MCH neurons in transgenic MCH^{Atax} mice is accompanied by a marked reduction in brain density of MCH-immunoreactive fibers. Scale bar: 50 μ m.

tochemistry. Brain sections from adult MCH^{Atax} mice were double stained with anti-MYC and anti-MCH antibodies. These experiments revealed a robust co-localization of MYC and MCH labeling (in $85.6 \pm 5.4\%$ of MCH-immunoreactive neurons; $n=4$ MCH^{Atax} FVB/N mice; Fig. 1A). Ectopic MYC expression was not detected in non-MCH-immunoreactive neurons (as orexin-immunoreactive neurons) neither in the rest of the brain of MCH^{Atax} mice or in sections from MCH^{WT} mice.

Adult MCH^{Atax} mice displayed a significant reduction in the number of MCH-immunoreactive cell bodies compared to MCH^{WT} mice for both FVB/N ($p < 0.001$; $n=6$ per genotype) and C57BL/6 ($p < 0.001$; $n=10$ MCH^{WT} and $n=9$ MCH^{Atax}) genetic backgrounds. This represents a mean loss of respectively 26.8% and 27.0% in the number of MCH-immunoreactive neurons (Figs. 1 A–B and 2 A–B). Morphometric analysis of MCH-immunoreactive neurons (100–160 neurons per mouse on 3 mice per genotype) revealed that remaining cell bodies in MCH^{Atax} mice exhibited a damaged morphology with significant reductions in both apparent cell body surface and maximal diameter. Additionally, primary dendrites appeared truncated and were significantly decreased in number compared to neurons in MCH^{WT} mice ($p < 0.001$ for all comparisons; Fig. 1B and Fig. 2C–D). Concomitant to the cell loss, densities of MCH-immunoreactive axons and synaptic boutons were markedly decreased throughout the brain of MCH^{Atax} mice, including areas involved in the regulation of vigilance states such as dorsal raphe nucleus (DRN), ventrolateral periaqueductal gray matter (VIPAG), or ventrolateral preoptic area (VLPO) (Fig. 1C). Besides, immunostaining for the glial markers GFAP, Iba1 and S100 revealed no sign of neuroinflammation in the tuberal hypothalamus of MCH^{Atax} mice as compared to MCH^{WT} mice at post-natal weeks 15–20 (Supplementary Fig. S1). This indicates that inflammatory processes and glial activation that could occur concomitantly to cell ablation is

likely terminated when polysomnographic recordings were performed.

Quantification of hypothalamic mRNAs using real-time qPCR consistently revealed a marked reduction in the amounts of MCH mRNAs in MCH^{Atax} vs. MCH^{WT} mice in both FVB/N ($p < 0.001$; $n=12$ MCH^{WT} and $n=16$ MCH^{Atax}) and C57BL/6 lines ($p < 0.001$; $n=11$ MCH^{WT} and $n=9$ MCH^{Atax}) (Fig. 2E–F). This represents a reduction of respectively 74.8% and 74.2% in MCH mRNA levels. This deeper decrease in mRNAs as compared to cell loss might be a consequence of a strong perturbation of MCH neurons cell machinery in MCH^{Atax} mice that would ultimately lead to synthesis perturbations of mRNAs and therefore the neuropeptide *itself* as well as morphological alteration. Additionally, in FVB/N mice, a significant decrease in hypothalamic levels of Nesfatin-1 (NUCB2) mRNAs (MCH^{WT}: 0.971 ± 0.021 , $n=12$; MCH^{Atax}: 0.893 ± 0.033 , $n=16$; $p < 0.05$) and a slight decrease in the amounts of CART mRNAs (MCH^{WT}: 0.900 ± 0.078 , $n=6$; MCH^{Atax}: 0.691 ± 0.047 , $n=9$; $p=0.0589$) were observed in MCH^{Atax} vs. MCH^{WT} mice. In contrast, quantities of orexin mRNAs remained unchanged (MCH^{WT}: 1.007 ± 0.078 , $n=6$; MCH^{Atax}: 1.139 ± 0.092 , $n=7$; $p=0.224$).

Taken together, these data settle that adult MCH^{Atax} mice are characterized by a severe impairment of MCH neurons and thus issued signaling toward their widespread brain targets.

3.2. Amounts of PS, not SWS, are increased in MCH^{Atax} mice

The sleep architecture of MCH^{Atax} vs. MCH^{WT} mice was first compared in baseline condition (Table 1; Fig. 3). The 4 samples of mice used (FVB/N: $n=15$ MCH^{WT} and 17 MCH^{Atax} mice; C57BL/6: $n=19$ MCH^{WT} and 20 MCH^{Atax} mice) displayed a standard circadian sleep–waking rhythm, characteristic of FVB/N and C57BL/6 mice, with higher amounts of total sleep during the light period

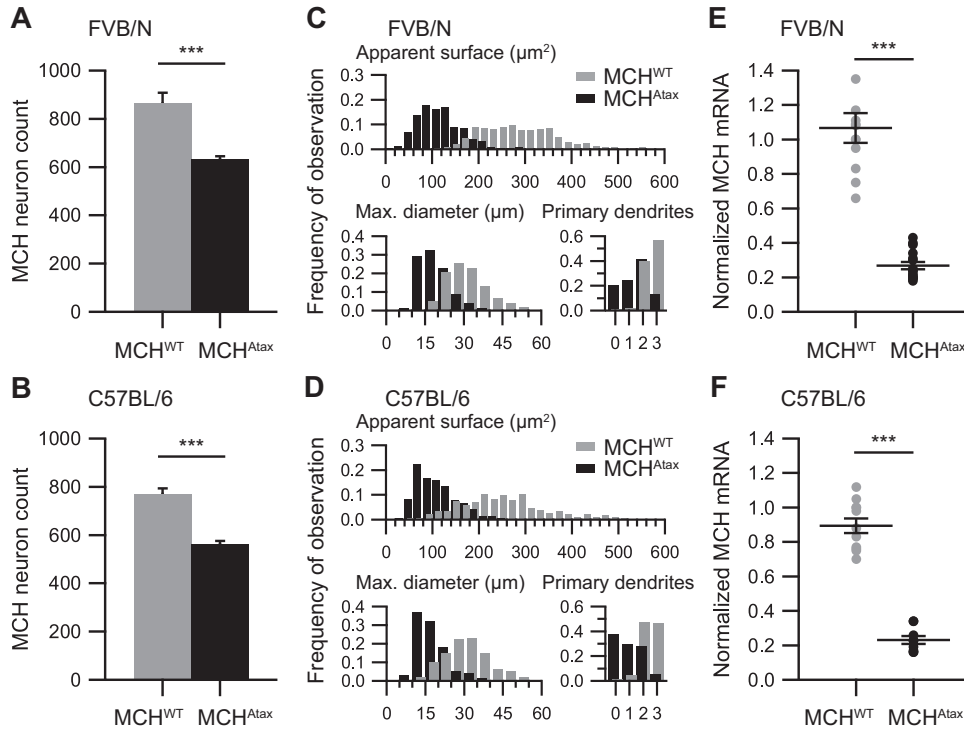


Fig. 2. Quantification of MCH-immunoreactive cell bodies and MCH mRNA expression within the hypothalamus of adult transgenic MCH^{Atax} vs. MCH^{WT} mice under both genetic background.

A–B, Histograms reporting the estimated mean number of MCH-immunoreactive cell bodies encountered within THA in a representative sample of adult MCH^{Atax} mice (black column) and age-matched MCH^{WT} littermates (grey column) bred on FVB/N (A) and C57BL/6 (B) genetic backgrounds. C–D, Frequency histograms of apparent surface, maximal diameter and number of primary dendrites of MCH-immunoreactive cell bodies (100–160 per mouse) in a sample of adult MCH^{WT} (grey bars) and MCH^{Atax} mice (black bars) on FVB/N (C) and C57BL/6 (D) genetic backgrounds ($n = 3$ mice per genotype). E–F, Plot diagrams illustrating the normalized levels of MCH mRNAs measured in the whole hypothalamus of a sample of adult MCH^{Atax} mice (black filled points) and age-matched MCH^{WT} littermates (grey filled points) bred on FVB/N (E) and C57BL/6 (F) genetic backgrounds. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

(LP) than the dark period (DP). When analyzed over a period of 24 h, data revealed an increase in daily PS quantities in MCH^{Atax} mice of both genetic backgrounds (C57BL/6: +12.6%, $p < 0.05$; FVB/N: +7.5%,

$p = 0.38$), whereas daily amounts of SWS were unchanged (Table 1). This PS hypersomnia is mainly due to a significant increase in PS amounts during the LP (FVB/N: +20.4%, $p < 0.01$; C57BL/6: +20.5%,

Table 1

Parameters of wake, SWS and PS in MCH^{WT} and MCH^{Atax} animals under both FVB/N and C57BL/6 backgrounds in basal conditions.

	FVB/N genetic background					
	24 h		12 h light (LP)		12 h dark (DP)	
	MCH ^{WT}	MCH ^{Atax}	MCH ^{WT}	MCH ^{Atax}	MCH ^{WT}	MCH ^{Atax}
Waking duration (min)	649.0 ± 17.0	650.8 ± 15.9	285.3 ± 9.1	261.6 ± 11.5	362.8 ± 10.2	389.1 ± 10.4
SWS duration (min)	684.1 ± 17.5	675.2 ± 17.1	370.8 ± 8.9	382.0 ± 10.7	313.4 ± 10.0	293.2 ± 9.7
PS duration (min)	105.3 ± 3.8	113.2 ± 3.3	63.3 ± 2.4	76.2 ± 3.1**	42.0 ± 2.7	37.0 ± 3.0
Total sleep duration (min)	789 ± 17.1	788.4 ± 15.9	434.1 ± 9.2	458.2 ± 11.5	355.3 ± 10.3	330.2 ± 10.4
Nb of SWS bouts	673.9 ± 33.6	651.9 ± 24.9	357.5 ± 17.6	346.8 ± 13.4	321.6 ± 17.4	310.3 ± 12.0
Nb of PS bouts	164.3 ± 9.5	169.3 ± 10.2	103.5 ± 5.0	114.9 ± 7.8	61.2 ± 5.5	54.8 ± 4.4
SWS mean duration (s)	63.7 ± 4.4	63.6 ± 2.9	65.2 ± 4.8	67.8 ± 3.4	61.5 ± 4.5	57.9 ± 2.7
PS mean duration (s)	39.3 ± 1.3	41.5 ± 1.6	37.1 ± 1.0	41.3 ± 1.8*	42.0 ± 2.7	37.0 ± 3.0
	C57BL/6 genetic background					
	24 h		12 h light (LP)		12 h dark (DP)	
	MCH ^{WT}	MCH ^{Atax}	MCH ^{WT}	MCH ^{Atax}	MCH ^{WT}	MCH ^{Atax}
Wake duration (min)	778.3 ± 19.1	767.9 ± 17.8	298.7 ± 10.1	278.7 ± 9.3	479.6 ± 13.3	489.8 ± 13.5
SWS duration (min)	582.5 ± 17.4	582.9 ± 15.7	367.6 ± 8.6	376.7 ± 7.8	214.9 ± 12.4	206.1 ± 11.8
PS duration (min)	78.8 ± 2.8	88.7 ± 3.0*	53.4 ± 2.1	64.3 ± 2.3**	25.4 ± 1.4	24.0 ± 2.1
Total sleep duration (min)	661.3 ± 19.0	671.6 ± 17.7	421.0 ± 10.1	441.0 ± 9.3	240.3 ± 13.3	230.1 ± 13.5
Nb of SWS bouts	269.3 ± 10.2	274.9 ± 11.4	169.0 ± 6.8	167.8 ± 5.9	100.5 ± 5.9	108.0 ± 9.5
Nb of PS bouts	103.8 ± 4.4	115.9 ± 5.4	69.3 ± 3.3	83.2 ± 3.6**	34.5 ± 2.6	32.4 ± 2.7
SWS mean duration (s)	132.9 ± 5.9	130.9 ± 5.6	134.6 ± 6.5	137.3 ± 4.9	131.6 ± 6.7	122.7 ± 7.4
PS mean duration (s)	46.1 ± 1.1	46.8 ± 1.4	46.8 ± 1.2	47.2 ± 1.6	46.5 ± 2.4	45.4 ± 1.8

Data are expressed as mean ± SEM.

* $p < 0.05$.

** $p < 0.01$, MCH^{Atax} vs. MCH^{WT}.

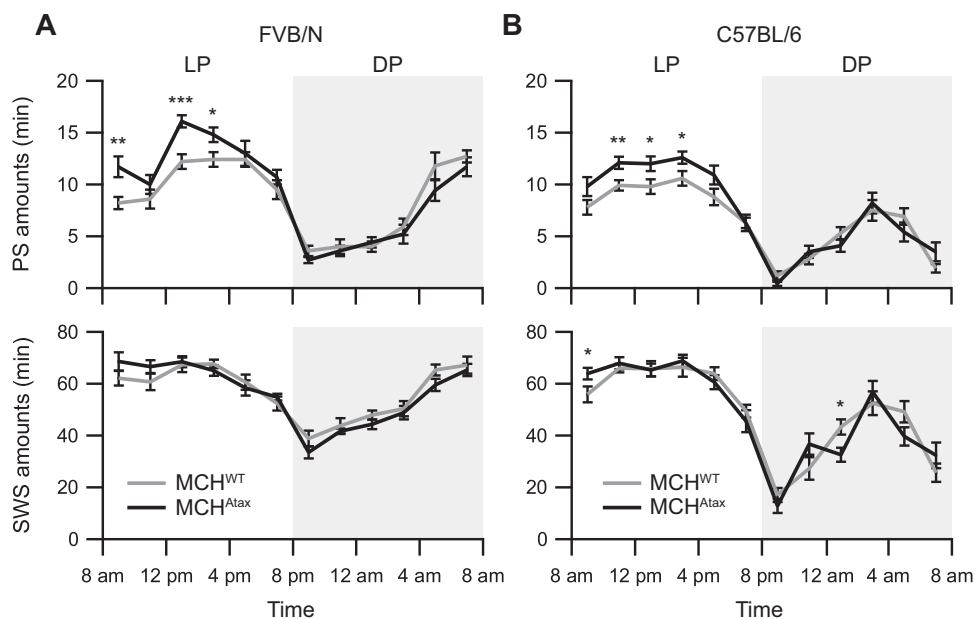


Fig. 3. Sleep architecture of adult MCH^{Atax} and respective MCH^{WT} mice under both genetic backgrounds.

Curves illustrating the circadian distribution of PS (upper panels) and SWS (lower panels) in MCH^{WT} (grey line) vs. MCH^{Atax} (black line) bred on FVB/N (A) and C57BL/6 (B) genetic backgrounds. Amounts of SWS and PS were cumulated over 2-h blocks across the light–dark cycle starting at 8 a.m. (light on). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

$p < 0.01$) compared to respective MCH^{WT} mice (Table 1; Fig. 3) caused by a longer mean duration of PS episodes in FVB/N mice ($p < 0.05$) and a higher number of PS bouts in C57BL/6 mice ($p < 0.01$) (Table 1). Finally, abnormal spontaneous Waking-to-PS transitions were never encountered in MCH^{Atax} mice.

Spectral analysis of EEG signals with a fast Fourier transform (FFT) during LP and DP did not reveal any visible changes in power densities over delta, theta, alpha, and beta frequency bands during PS in MCH^{Atax} mice (FVB/N: $n = 6$ MCH^{WT} and $n = 7$ MCH^{Atax} ; C57BL/6 $n = 7$ per genotype). Regarding SWS, a trend for a decrease in delta power density (SWA) was observed in both lines of MCH^{Atax} mice (for C57BL/6 mice, MCH^{WT} : $0.379 \pm 0.010\%$; MCH^{Atax} : $0.357 \pm 0.011\%$; $p = 0.16$).

The standard analysis of polysomnographic recordings did not reveal major modifications of the baseline sleep architecture in MCH^{Atax} mice, although PS was slightly upregulated compared to respective MCH^{WT} littermates.

3.3. Ultradian dynamics of SWS are impaired in MCH^{Atax} mice

In order to unravel any subtle changes in baseline sleep states, we investigated the dynamical properties of SWS and PS bouts in C57BL/6 mice using survival analysis ($n = 14$ mice per genotype). Comparison of survival distributions of PS episodes did not expose evidence of any difference between MCH^{Atax} and MCH^{WT} mice ($p = 0.46$; Fig. 4A–B). This result contrasts with analysis of SWS bouts, which unraveled a significant decrease in their survival behavior in MCH^{Atax} vs. MCH^{WT} mice during both LP and DP ($p < 0.001$ for LP and DP; Fig. 4C–D). We further evaluated the survival of SWS bouts while taking into account that they terminate by either PS or Waking. For the SWS-to-PS transition, no significant change was found in MCH^{Atax} vs. MCH^{WT} mice (LP, $p = 0.26$; DP, $p = 0.17$). For the SWS-to-Waking alternation, survival of SWS bouts was significantly reduced in MCH^{Atax} mice ($p < 0.001$ for LP and DP; Fig. 4E–F), revealing an increased SWS fragmentation in MCH^{Atax} mice. In order to further characterize this SWS instability, we compared the EEG spectral patterns over 24-h time frame across a two-dimensional map in MCH^{Atax} vs. MCH^{WT} mice ($n = 7$ for each genotype). The three states of vigilance consistently clustered into

distinct regions of the two-dimensional space with: (1) SWS in the upper left corner corresponding to epochs with slow oscillations (high ratio 2) and low theta activity (low ratio 1); (2) PS in the upper right corner characterized by high theta; and (3) Waking in the lower part of the map with a dispersion of points consistent with the large panel of behaviors during waking (Fig. 5A–B). We computed density plots across MCH^{Atax} and MCH^{WT} mice (Fig. 5C–D) and then subtracted MCH^{Atax} from MCH^{WT} density plot values (Fig. 5E). This analysis revealed that, compared to MCH^{WT} littermates, MCH^{Atax} mice spend less time in deep SWS characterized by high delta activity (cold blue spot in the upper left corner) balanced with higher amounts of light SWS characterized by low delta activity (hot red spot within the SWS cluster). Moreover, MCH^{Atax} mice spent less time in Waking with low theta band activity (i.e., quiet waking). In sharp contrast to SWS, no difference was evidenced regarding PS.

Supporting the tendency to a reduced SWA revealed by FFT analysis (reduced SWA), these consistent data unveil that MCH^{Atax} mice are endowed with a pronounced SWS fragmentation and likely a worsened quality of deep sleep.

3.4. Sleep homeostasis is qualitatively disturbed in MCH^{Atax} mice

In order to assess a putative contribution of MCH neurons to the homeostatic regulation of sleep states, MCH^{Atax} and MCH^{WT} mice were submitted to a 4-h total sleep deprivation (TSD) followed by a 12-h recovery period. Since similar results were obtained in both genetic backgrounds, we focused our analysis on data collected from C57BL/6 mice ($n = 15$ MCH^{WT} and $n = 16$ MCH^{Atax} mice). Both MCH^{Atax} and MCH^{WT} mice exhibited significant increases in SWS and PS amounts during the recovery period compared to baseline (SWS, $p < 0.001$; PS, $p < 0.001$; Table 2) but sleep amounts did not differ between genotypes (SWS, $p = 0.64$; PS, $p = 0.74$).

Regarding PS bouts, a decrease in their number was noticed in both genotypes compared to baseline values during the first 3 h of recovery (Table 2). Of particular interest, this decrease is significantly amplified in MCH^{Atax} ($-46.6 \pm 9.1\%$) than in MCH^{WT} mice ($-18.9 \pm 9.0\%$; $p < 0.05$). In order to deeply describe this point, we evaluated the rate of SWS and PS reaccumulation by computing the slope of hourly-cumulated changes in sleep amounts

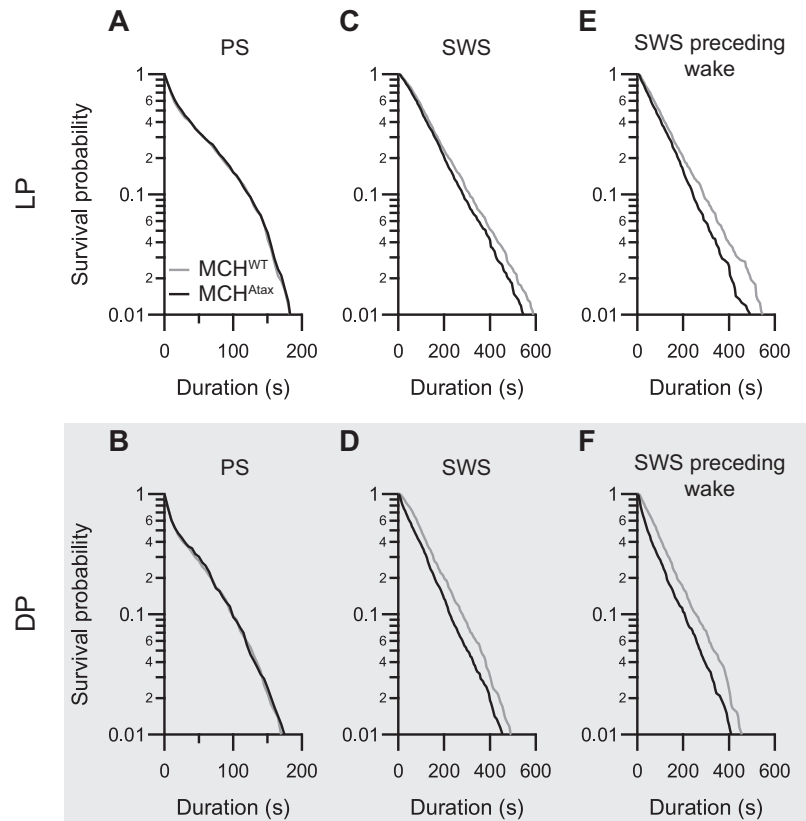


Fig. 4. Effect of partial MCH neuron loss on the dynamical properties of spontaneous SWS and PS bouts evidenced by survival analysis. A–D, Survival plots of PS (A–B) and SWS (C–D) bouts during LP and DP computed from a sample of MCH^{WT} (grey curves) and MCH^{Atax} (black curves) bred under C57BL/6 genetic background. Notice the significant decrease in the survival of SWS bouts in MCH^{Atax} vs. MCH^{WT} mice, whereas PS dynamics remained similar in both lines of mice. E–F, Curves illustrating the decreased survival of SWS bouts ended by wake entrance in MCH^{Atax} mice indicating a pronounced SWS fragmentation.

between recovery and baseline. No difference between genotypes was found for SWS (Fig. 6A). Conversely, a significantly slower rate of PS reaccumulation was seen during the first 3 h of the recovery period in MCH^{Atax} vs. MCH^{WT} (MCH^{Atax}: -0.26 ± 0.39 min/h; MCH^{WT}: 0.78 ± 0.30 min/h; $p < 0.05$; Fig. 6B). These results might reveal a slow-down or a delay in induction of PS reaccumulation in MCH^{Atax} mice submitted to 6 h TSD.

Besides, the change in the number of SWS episodes during recovery compared to baseline was significantly higher in MCH^{Atax} mice (MCH^{Atax}: $+11.6 \pm 5.2\%$; MCH^{WT}: $-4.1 \pm 4.2\%$; $p < 0.05$). Moreover, the standard increase in duration of SWS bouts during recovery appeared less pronounced in MCH^{Atax} than MCH^{WT} mice (Table 2). This later data was strengthened by survival analysis during the recovery period showing that the survival probability of

SWS bouts was significantly reduced in MCH^{Atax} mice ($p < 0.001$; Fig. 6C). In particular, the survival of SWS episodes followed by Waking was significantly impaired in MCH^{Atax} mice ($p < 0.001$; Fig. 6D) whereas survival remained similar when followed by PS ($p = 0.55$). Finally, standard spectral EEG analysis revealed that the typical increase in slow-wave activity during sleep rebound was significantly lower in MCH^{Atax} mice ($p < 0.05$; Fig. 6E). Taken together, these results indicate that, although sleep debt appears similarly repaid in both genotypes, the expected SWS consolidation after such homeostatic challenge is significantly less pronounced in MCH^{Atax} than in MCH^{WT} mice. One may propose that quality, efficiency, and depth of SWS, rather than quantity, are altered in MCH^{Atax} mice during sleep rebound, in a similar way to that in basal condition.

Table 2
Sleep parameters evaluated during 12 h following the end of a total sleep deprivation (TSD) (i.e. from 2 p.m. to 2 a.m.) and during the corresponding baseline for MCH^{WT} ($n = 15$) and MCH^{Atax} ($n = 16$) mice bred on C57BL/6 genetic background.

	12 h baseline		12 h recovery	
	MCH ^{WT}	MCH ^{Atax}	MCH ^{WT}	MCH ^{Atax}
Wake duration (min)	427.5 ± 13.2	435.5 ± 11.1	343.2 ± 13.2 ^{†††}	350.7 ± 13.2 ^{†††}
SWS duration (min)	258.7 ± 12.0	247.4 ± 9.8	329.7 ± 14.4 ^{†††}	321.1 ± 11.3 ^{†††}
PS duration (min)	33.1 ± 1.8	37.2 ± 1.7	47.2 ± 2.1 ^{†††}	48.3 ± 2.3 ^{†††}
Total sleep duration (min)	291.8 ± 13.2	284.6 ± 11.1	376.9 ± 15.3 ^{†††}	369.4 ± 13.2 ^{†††}
Nb of SWS bouts	127.5 ± 5.3	127.3 ± 6.7	122.3 ± 5.3	142.0 ± 8.5 ^{††}
Nb of PS bouts	43.8 ± 2.6	49.0 ± 3.5	57.6 ± 4.2 ^{††}	56.3 ± 4.2 ^{††}
SWS mean duration (s)	123.4 ± 5.9	121.3 ± 6.7	163.4 ± 8.0 ^{†††}	145.4 ± 11.8 ^{††}
PS mean duration (s)	45.8 ± 1.3	47.4 ± 2.4	50.8 ± 2.1	53.2 ± 2.3 [†]

Data are expressed as mean ± SEM.

[†] $p < 0.05$, ^{††} $p < 0.01$: MCH^{Atax} vs. MCH^{WT}.

^{†††} $p < 0.05$, ^{††††} $p < 0.01$, ^{†††††} $p < 0.001$: recovery vs. baseline.

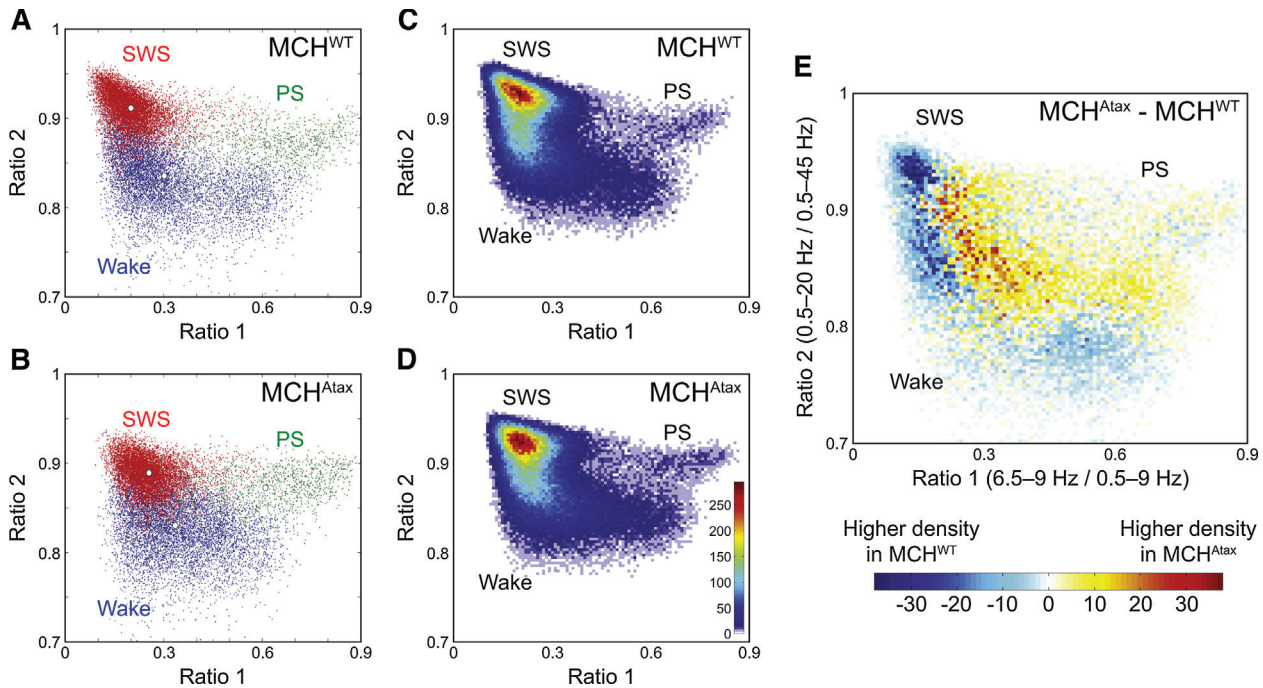


Fig. 5. Comparative distribution of EEG rhythmic activities during wake and sleep states in MCH^{Atax} vs. MCH^{WT} mice.

A–B, Spectral ratios of EEG rhythmic activities define a 2-dimensional state space with distinct clusters. Each plot illustrates 24 h of EEG activity recorded in one representative MCH^{WT} mouse (A) and one representative MCH^{Atax} mouse (B) bred under C57BL/6 genetic background. Each pseudocolored point forming the plots represents 5 s of a given EEG rhythmic activity (i.e., red point for SWS, green for PS and blue for waking). C–E, Averaged point densities across a representative sample of 6 MCH^{WT} (C) and 6 MCH^{Atax} (D) mice. The pseudocolor scale represents point densities (from warm to cold coding for higher to lower densities). A differential plot was finally computed by averaging the density pattern from MCH^{WT} mice subtracted from that of MCH^{Atax} mice (E). The color scale represents differences between genotypes: i.e., warm colors indicate regions where the average density is greater in MCH^{Atax} than in MCH^{WT} mice, whereas cold colors represent regions where the average density is lower in MCH^{Atax} than in MCH^{WT} mice. Note that MCH^{Atax} mice spend less time in deep delta-rich SWS (upper left corner) than MCH^{WT} mice that benefits to light SWS.

4. Discussion

Here we show that the selective ablation, although incomplete, of the hypothalamic so-called MCH neurons and their brain axons in adult mice is sufficient to significantly disturb specific aspect of SWS regulation whereas ultradian rhythm and EEG dynamics of PS remain largely unaffected. The combination of complementary mathematical analyses of vigilance states and EEG rhythmic activities across the sleep–waking cycle indeed revealed that MCH^{Atax} mice are endowed with a marked fragmentation of natural SWS. This fragmentation is likely concomitant to a worsened sleep quality as demonstrated by a drop in typical delta activity. Similar deterioration of SWS was observed during sleep rebound following 4-h TSD. This indicates an inability of MCH^{Atax} mice to consolidate SWS and to increase SWA in response to homeostatic challenges as observed in MCH^{WT} littermates. While no definitive conclusions can be added about the stated role of MCH neurons in the regulation of PS, the study of a murine model of deep functional disruption of this hypothalamic system has enabled us to achieve solid and convincing data that reinforce the idea that MCH neurons play a role in the fine-tuning of SWS in baseline condition and additionally when sleep needs are increased.

4.1. Partial loss of MCH neurons is not sufficient to severely affect PS

We report that MCH^{Atax} mice experienced higher daily PS amounts than MCH^{WT} littermates due to increased PS quantities only during the light period. No other prominent effects on PS ultradian rhythm and dynamics were evidenced. This phenotypic trait of MCH^{Atax} mice is surprising since a suppression of PS was expected and seems to contradict the hypothesis that MCH neurons trigger PS [11,23–26]. We can not rule out that adaptive changes

may occur nor that some other indirect effects could alter physiological functions such as feeding and energy homeostasis [28] or cognitive functions such as learning and memory deficits [35]. Such contributions were both previously reported in MCH^{Atax} mice and well known to be dependent of MCH neurons [36]. An alternative hypothesis arises when comparing present data to those obtained in orexin/Ataxin-3 mice. In these transgenic mice, the amplitude of PS rhythm was substantially reduced with an increase of PS amounts during the dark period [37]. This effect is remarkably in mirror of what we observed in MCH^{Atax} mice. These results suggest that the PS circadian rhythm requires balanced interactions at least between the wake-active orexin and sleep-active MCH neuronal systems. In line with this hypothesis, both neuronal groups are under a strong circadian drive, likely arising from the suprachiasmatic nucleus (SCN) [38]. Indeed, they receive direct as well as indirect inputs from the SCN [39–41] and reciprocally send efferents to the SCN [12,16,42,43]. Additionally, orexin and SCN neurons may be involved in a reciprocal inhibitory loop to which MCH neurons could be linked [44–46]. MCH neurons could indeed inhibit the SCN through activation of MCH-R1 receptors, thus repressing the facilitation of SCN-driven PS entry [38]. More likely, such discrepancy may be primarily the consequence of incomplete ablation and low degree of MCH neuronal loss, thus precluding more robust effects on PS. Supporting this proposal, the same study using orexin/Ataxin-3 mice revealed that cataplexy becomes evident only when more than 90% of orexin neurons were lost [37,47]. Another work using diphtheria toxin-mediated ablation demonstrated that a loss of at least 80% of orexin neurons is required to observe any effect on feeding behavior [48]. Additionally, the loss of MCH neurons early in life can lead to several network adaptations that can strictly compensate or at least markedly reduce phenotypic alterations. Indeed, the ablation of NPY/AgRP neurons using diphtheria toxin in adults produced a pronounced decreased in feeding

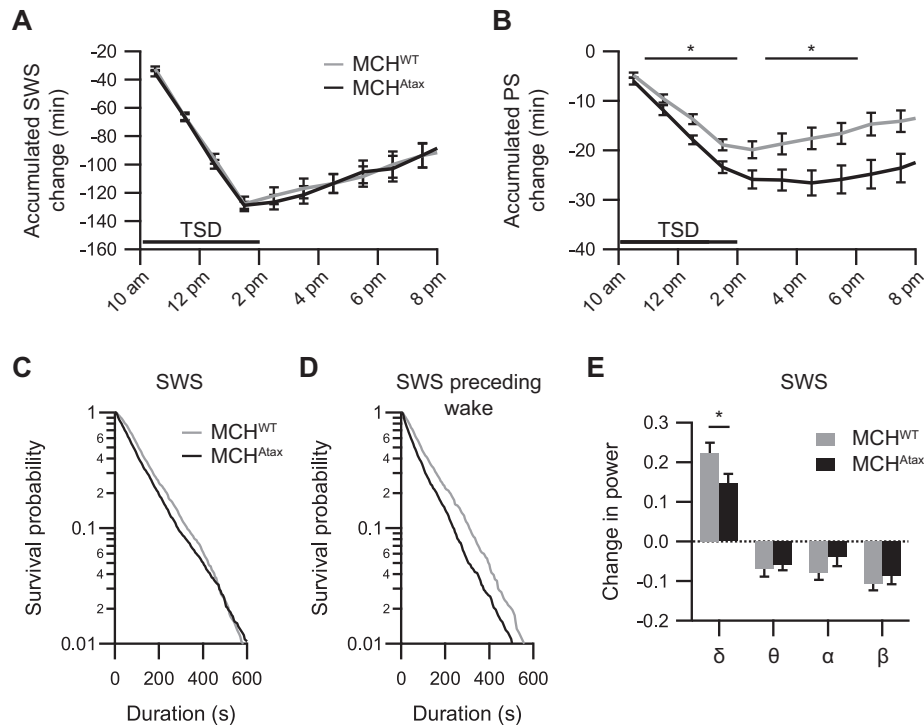


Fig. 6. Sleep homeostasis after 4-h total sleep deprivation (TSD) in MCH^{Atax} mice.

A–B, Rate of SWS (A) and PS (B) reaccumulation over the 6 first hours of recovery following 4-h TSD. Note the slower PS debt recovery, apparently delayed for 4 h in MCH^{Atax} compared to MCH^{WT} mice, while kinetics of SWS reimbursement were similar in both lines of mice. * $p < 0.05$. C–D, Survival plots of SWS bout durations (C) and SWS bout preceding wake durations (D) for MCH^{WT} (grey line) and MCH^{Atax} (black line) mice bred under C57BL/6 genetic background during 12 h following 4-h TSD. Note that SWS survival is decreased in MCH^{Atax} mice during rebound (log-rank test, $p < 0.001$) mainly due to a decreased survival of SWS bouts preceding wake (log-rank test, $p < 0.001$). This indicates an abnormal fragmentation of SWS during sleep rebound compared to MCH^{WT} mice. E, Histogram of EEG power spectral densities of SWS during the first 4 h of recovery period compared to the corresponding baseline period in MCH^{WT} (grey bars) and MCH^{Atax} (black bars) mice. Note the significant impairment in MCH^{Atax} (vs. MCH^{WT}) mice of the increase in SWS delta activity that is a typical EEG marker of SWS depth during sleep rebound. * $p < 0.05$.

behavior [49,50] whereas the same lesion in neonates did not alter feeding behavior in adults [49]. Interestingly the Ataxin-mediated ablation of NPY/AgRP neurons resulted in a decreased feeding behavior of lower magnitude than the one observed using diphtheria toxin [51]. Notwithstanding the methodological bias of our approach, and in line with our observations, recent experiments relying on loss-of-function of MCH neurons through optogenetic inhibition or with more than 90% MCH neuron loss using diphtheria toxin-mediated ablation also failed to detect drastic changes in PS [25,26]. In addition to these two recent studies, here we further demonstrated that, in MCH^{Atax} mice, sleep loss during 4 h did not succeed to quantitatively affect homeostatic PS rebound, which may be just delayed for few hours. It should also keep in mind that discrepancies concerning the contribution of MCH neurons to PS between recent reports using optogenetics or diphtheria toxin raise the point of necessity vs. sufficiency in loss- or gain-of-function experiments: in particular, MCH neurons could be sufficient to gate PS but not necessary for this sleep state to be promoted and maintained. However, the existence of several compensatory mechanisms and the high resilience to neuronal loss of networks regulating the sleep–waking cycle (as evidenced by previous lesion studies of major neurotransmitter systems as noradrenergic, serotonergic, cholinergic or histaminergic neurons [1]) lead to the impossibility to draw firm conclusions regarding the involvement of MCH neurons in PS regulatory mechanisms.

4.2. The recruitment of MCH neurons strengthens the quality of SWS by favoring its consolidation and depth

In this study, we found that severe impairment of MCH neurons and loss of their axons led to fragmentation of SWS and disturbed

establishment of slow-wave activity (SWA) during SWS, without significant modifications in SWS quantities. These effects were similarly observed under basal conditions and during the recovery period following 4-h TSD. Of particular interest, mice with a 60–70% loss of MCH neurons by cell-specific expression of diphtheria toxin A depicted decreased SWS quantities with significantly shortened mean duration of SWS bouts during the DP resembling SWS fragmentation [25]. As for PS, the absence of quantitative effects on SWS amounts might be due to an insufficient loss of MCH neurons leading to a less perturbed sleep phenotype. Besides, SWS may be directly dependent on the degree of MCH neuronal loss and the maintenance of daily amounts of SWS depends of the threshold of MCH neurons loss.

It remains that data gathered in both studies are consistent with previous works supporting a role of MCH neurons in some aspects of SWS regulation in rodents [11,52,53]. This point is also supported by recent studies using optogenetics. Indeed, chronic optogenetic activation of MCH neurons for 24 h increased SWS amounts only during the DP [24], whereas the acute stimulation during the LP had no effect [26] or even decreased SWS amounts [25]. Besides, acute optogenetic silencing of MCH neurons during LP has no quantitative effect on any vigilance states [25]. The apparent discrepancies between these studies might reflect the difference in timescales used for stimulating neurons, *i.e.*, repeated or chronic vs. acute protocols. Indeed, one might propose that acute stimulation or inhibition might only affect fast neurotransmission (*i.e.*, GABAergic and/or glutamatergic), whereas gathering additional peptidergic transmission would require longer protocols in order to be effective.

An unexpected role for MCH neurons, unraveled in the present work, is their major influence on SWS consolidation concomitant

to high SWA density in baseline and in response to homeostatic challenges. Indeed, survival and spectral pattern density analyses revealed an abnormal SWS fragmentation favoring light SWS in MCH^{Atax} mice which was undistinguishable by the calculation of the mean duration of SWS episodes and the standard FFT analysis of cortical EEG rhythms. As illustrated with MCH^{Atax} mice, the complexity of sleep inspires additional methods that provide supplemental pieces of information of great value to discriminate subtle phenotypic modifications [33,34,54]. This effect on SWS could be explained by the inhibitory action of MCH neurons and MCH neuropeptide itself on several wake-promoting neuronal populations, including neighboring orexin neurons [55,56]. Moreover, MCH and orexin neurons display reciprocal firing activities across the sleep–waking cycle in rats [23,57] and are inter-connected [58,59]. MCH neurons also send putative inhibitory projections to the noradrenergic locus coeruleus and the serotonergic dorsal raphe nucleus [14,18,60]. They also project to the histaminergic tuberomammillary nucleus where they are able to release both GABA and MCH; the latter could concomitantly facilitate presynaptic GABAergic transmission [26]. Thus, the SWS fragmentation and increase transitions toward waking that we observed in MCH^{Atax} mice might be attributed to a dampened inhibition or enhanced excitability of wake-promoting neurons. This could result in a destabilization of the “flip-flop switch” the wake-active neurons form with the sleep-promoting neurons in the ventrolateral pre-optic nucleus [1,61,62]. MCH neurons were recently demonstrated to be able to release glutamate in the lateral septum [8] indicating that they are not exclusively GABAergic and suggesting the presence of different sub-populations of MCH neurons (glutamatergic or GABAergic) or their bilingual nature. Thus the activation of MCH neurons could simultaneously contribute to the inhibition of some specific targets and facilitate the excitability of other brain regions. Besides, MCH neurons may also directly affect SWS through specific pathways such as the neocortical, thalamic, and limbic systems where they densely project [12,63]. By this means, they could easily and directly contribute to the stabilization of electrophysiological EEG rhythmic activities across the vigilance states.

Eventually, in the present work we demonstrated that partial loss of so-called MCH neurons led to a severe deficit in SWS consolidation. Additional investigations are needed to decipher the pathways and mechanisms dependent of MCH neurons recruited for SWS consolidation and thus, their physiological benefits for the brain and body.

Conflict of interest

The authors declare that no competing interests exist.

Authors' contributions

CV, LL and PF designed the experiments. CV, SA, DS and PF did the polysomnographic experiments. NG and LL performed neuroanatomical, genotyping and molecular experiments. SA and PAL adapted the set-up for EEG/EMG recording and analyses in mice. CV and PF performed analyses. CV, PHL and PF wrote the manuscript.

Acknowledgements

This research was supported by CNRS, INSERM, University of Lyon and University Claude Bernard Lyon 1, France. Christophe Varin received a PhD grant from the French Ministry of Research. We would like to thank Pr. J.M. Friedman (The Rockefeller University, New York, USA) for providing the male MCH^{Atax} transgenic mice that were the founders of our colonies in Lyon. We express

our gratitude to Yan Bellisle for useful comments and corrections on the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2015.10.051>.

References

- [1] P. Fort, C.L. Bassetti, P.H. Luppi, Alternating vigilance states: new insights regarding neuronal networks and mechanisms, *Eur. J. Neurosci.* 29 (2009) 1741–1753.
- [2] C. Peyron, E. Sapin, L. Léger, P.-H. Luppi, P. Fort, Role of the melanin-concentrating hormone neuropeptide in sleep regulation, *Peptides* 30 (2009) 2052–2059.
- [3] O. Clément, E. Sapin, P.-A. Libourel, S. Arthaud, F. Brisichoux, P. Fort, et al., The lateral hypothalamic area controls paradoxical (REM) sleep by means of descending projections to brainstem GABAergic neurons, *J. Neurosci.* 32 (2012) 16763–16774.
- [4] P.-H. Luppi, O. Clément, P. Fort, Paradoxical (REM) sleep genesis by the brainstem is under hypothalamic control, *Curr. Opin. Neurobiol.* (2013).
- [5] P. Fort, D. Salvvert, L. Hanriot, S. Jego, H. Shimizu, K. Hashimoto, et al., The satiety molecule nesfatin-1 is co-expressed with melanin concentrating hormone in tuberal hypothalamic neurons of the rat, *Neuroscience* 155 (2008) 174–181.
- [6] C. Broberger, Hypothalamic cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) neurons: histochemical relationship to thyrotropin-releasing hormone, melanin-concentrating hormone, orexin/hypocretin and neuropeptide Y, *Brain Res.* 848 (1999) 101–113.
- [7] C.F. Elias, C.E. Lee, J.F. Kelly, R.S. Ahima, M. Kuhar, C.B. Saper, et al., Characterization of CART neurons in the rat and human hypothalamus, *J. Comp. Neurol.* 432 (2001) 1–19.
- [8] M.J. Chee, E. Arrigoni, E. Maratos-Flier, Melanin-concentrating hormone neurons release glutamate for feedforward inhibition of the lateral septum, *J. Neurosci.* 35 (2015) 3644–3651.
- [9] L.F. Harthoorn, A. Sañé, M. Nethe, J.J. Van Heerikhuizen, Multi-transcriptional profiling of melanin-concentrating hormone and orexin-containing neurons, *Cell. Mol. Neurobiol.* 25 (2005) 1209–1223.
- [10] E. Sapin, A. Bérod, L. Léger, P.A. Herman, P.-H. Luppi, C. Peyron, A very large number of GABAergic neurons are activated in the tuberal hypothalamus during paradoxical (REM) sleep hypersomnia, *PLoS One* (2010) 2010.
- [11] L. Verret, R. Goutagny, P. Fort, L. Cagnon, D. Salvvert, L. Léger, et al., A role of melanin-concentrating hormone producing neurons in the central regulation of paradoxical sleep, *BMC Neurosci.* 4 (2003) 19.
- [12] J.C. Bittencourt, F. Presse, C. Arias, C. Peto, J. Vaughan, J.L. Nahon, et al., The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immunohistochemical characterization, *J. Comp. Neurol.* 319 (1992) 218–245.
- [13] G.J. Hervieu, J.E. Cluderay, D. Harrison, J. Meakin, P. Maycox, S. Nasir, et al., 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 (2000) 1194–1216.
- [14] Y. Saito, M. Cheng, F.M. Leslie, O. Civelli, Expression of the melanin-concentrating hormone (MCH) receptor mRNA in the rat brain, *J. Comp. Neurol.* 435 (2001) 26–40.
- [15] L.F. Harthoorn, Projection-dependent differentiation of melanin-concentrating hormone-containing neurons, *Cell. Mol. Neurobiol.* 27 (2007) 49–55.
- [16] V. Cvetkovic, F. Brisichoux, C. Jacquemard, D. Fellmann, B. Griffond, P.-Y. Risold, Characterization of subpopulations of neurons producing melanin-concentrating hormone in the rat ventral diencephalon, *J. Neurochem.* 91 (2004) 911–919.
- [17] S. Croizier, G. Franchi-Bernard, C. Colard, F. Poncet, A. La Roche, P.-Y. Risold, A comparative analysis shows morphofunctional differences between the rat and mouse melanin-concentrating hormone systems, *PLoS One* 5 (2010).
- [18] Y.S. Yoon, H.S. Lee, Projections from melanin-concentrating hormone (MCH) neurons to the dorsal raphe or the nuclear core of the locus coeruleus in the rat, *Brain Res.* 1490 (2013) 72–82.
- [19] S. Jego, D. Salvvert, L. Renouard, M. Mori, R. Goutagny, P.-H. Luppi, et al., Tuberal hypothalamic neurons secreting the satiety molecule nesfatin-1 are critically involved in paradoxical (REM) sleep homeostasis, *PLoS One* 7 (2012).
- [20] L. Hanriot, N. Camargo, A.C. Courau, L. Leger, P.H. Luppi, C. Peyron, Characterization of the melanin-concentrating hormone neurons activated during paradoxical sleep hypersomnia in rats, *J. Comp. Neurol.* 505 (2007) 147–157.
- [21] S. Vas, C. Adori, K. Könczöl, Z. Kátai, D. Pap, R.S. Papp, et al., Nesfatin-1/NUCB2 as a potential new element of sleep regulation in rats, *PLoS One* (2013) 2013.
- [22] S. Arthaud, C. Varin, N. Gay, P.-A. Libourel, F. Chauveau, P. Fort, et al., Paradoxical (REM) sleep deprivation in mice using the small-platforms-over-water method: polysomnographic analyses and melanin-concentrating hormone and hypocretin/orexin neuronal activation before, during and after deprivation, *J. Sleep Res.* (2014).

- [23] O.K. Hassani, M.G. Lee, B.E. Jones, 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 (2009) 2418–2422.
- [24] R.R. Konadhode, D. Pelluru, C. Blanco-Centurion, A. Zayachkivsky, M. Liu, T. Uhde, et al., Optogenetic stimulation of MCH neurons increases sleep, *J. Neurosci.* 33 (2013) 10257–10263.
- [25] T. Tsunematsu, T. Ueno, S. Tabuchi, A. Inutsuka, K.F. Tanaka, H. Hasuwa, et al., Optogenetic manipulation of activity and temporally controlled cell-specific ablation reveal a role for MCH neurons in sleep/wake regulation, *J. Neurosci.* 34 (2014) 6896–6909.
- [26] S. Jogo, S.D. Glasgow, C.G. Herrera, M. Ekstrand, S.J. Reed, R. Boyce, et al., Optogenetic identification of a rapid eye movement sleep modulatory circuit in the hypothalamus, *Nat. Neurosci.* (2013).
- [27] R. Szymusiak, New insights into melanin concentrating hormone and sleep: a critical topics forum, *Sleep* 36 (2013) 1765–1766.
- [28] T. Alon, J.M. Friedman, Late-onset leanness in mice with targeted ablation of melanin concentrating hormone neurons, *J. Neurosci.* 26 (2006) 389–397.
- [29] R. Goutagny, P.-H. Luppi, D. Salvert, D. Gervasoni, P. Fort, GABAergic control of hypothalamic melanin-concentrating hormone-containing neurons across the sleep-waking cycle, *Neuroreport* 16 (2005) 1069–1073.
- [30] C.-C. Lo, L.A. Nunes Amaral, S. Havlin, P.C. Ivanov, T. Penzel, J.-H. Peter, et al., Dynamics of sleep-wake transitions during sleep, *Europhys. Lett.* 57 (2002) 625–631.
- [31] C.G. Diniz Behn, N. Kopell, E.N. Brown, T. Mochizuki, T.E. Scammell, Delayed orexin signaling consolidates wakefulness and sleep: physiology and modeling, *J. Neurophysiol.* 99 (2008) 3090–3103.
- [32] M.S. Blumberg, A.M. Seelke, S.B. Lowen, K.A. Karlsson, Dynamics of sleep-wake cyclicity in developing rats, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 14860–14864.
- [33] D. Gervasoni, S.C. Lin, S. Ribeiro, E.S. Soares, J. Pantoja, M.A. Nicolelis, Global forebrain dynamics predict rat behavioral states and their transitions, *J. Neurosci.* 24 (2004) 11137–11147.
- [34] C.G. Diniz Behn, E.B. Klerman, T. Mochizuki, S.-C.C. Lin, T.E. Scammell, Abnormal sleep/wake dynamics in orexin knockout mice, *Sleep* 33 (2010) 297–306.
- [35] L. Le Barillier, L. Leger, P.H. Luppi, P. Fort, G. Malleret, P.A. Salin, Genetic deletion of melanin-concentrating hormone neurons impairs hippocampal short-term synaptic plasticity and hippocampal-dependent forms of short-term memory, *Hippocampus* (2015).
- [36] A. Adamantidis, E. Thomas, A. Foidart, A. Tyhon, B. Coumans, A. Minet, et al., Disrupting the melanin-concentrating hormone receptor 1 in mice leads to cognitive deficits and alterations of NMDA receptor function, *Eur. J. Neurosci.* 21 (2005) 2837–2844.
- [37] S. Kantor, T. Mochizuki, A.M. Janisiewicz, E. Clark, S. Nishino, T.E. Scammell, Orexin neurons are necessary for the circadian control of REM sleep, *Sleep* 32 (2009) 1127–1134.
- [38] S. Wurts, D. Edgar, Circadian and homeostatic control of rapid eye movement (REM) sleep: promotion of REM tendency by the suprachiasmatic nucleus, *J. Neurosci.* (2000) 2000.
- [39] L.P. Morin, N. Goodless-Sanchez, L. Smale, R.Y. Moore, Projections of the suprachiasmatic nuclei, subparaventricular zone and retrochiasmatic area in the golden hamster, *Neuroscience* 61 (1994) 391–410.
- [40] E.E. Abrahamson, R.K. Leak, R.Y. Moore, The suprachiasmatic nucleus projects to posterior hypothalamic arousal systems, *Neuroreport* 12 (2001) 435–440.
- [41] F.K. Stephan, K.J. Berkley, R.L. Moss, Efferent connections of the rat suprachiasmatic nucleus, *Neuroscience* 6 (1981) 2625–2641.
- [42] K.E. Krout, J. Kawano, T.C. Mettenleiter, A.D. Loewy, CNS inputs to the suprachiasmatic nucleus of the rat, *Neuroscience* 110 (2002) 73–92.
- [43] M.J. Chee, P. Pissios, E. Maratos-Flier, Neurochemical characterization of neurons expressing melanin-concentrating hormone receptor 1 in the mouse hypothalamus, *J. Comp. Neurol.* 521 (2013) 2208–2234.
- [44] O.J. Marston, R.H. Williams, M.M. Canal, R.E. Samuels, N. Upton, H.D. Piggins, Circadian and dark-pulse activation of orexin/hypocretin neurons, *Mol. Brain* 1 (2008) 19.
- [45] T.M. Brown, A.N. Coogan, D.J. Cutler, A.T. Hughes, H.D. Piggins, Electrophysiological actions of orexins on rat suprachiasmatic neurons in vitro, *Neurosci. Lett.* 448 (2008) 273–278.
- [46] M.D. Belle, A.T. Hughes, D.A. Bechtold, P. Cunningham, M. Pierucci, D. Burdakov, et al., Acute suppressive and long-term phase modulation actions of orexin on the mammalian circadian clock, *J. Neurosci.* 34 (2014) 3607–3621.
- [47] J. Hara, C.T. Beuckmann, T. Nambu, J.T. Willie, R.M. Chemelli, C.M. Sinton, et al., Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity, *Neuron* 30 (2001) 345–354.
- [48] A. Inutsuka, A. Inui, S. Tabuchi, T. Tsunematsu, M. Lazarus, A. Yamanaka, Concurrent and robust regulation of feeding behaviors and metabolism by orexin neurons, *Neuropharmacology* 85 (2014) 451–460.
- [49] S. Luquet, F.A. Perez, T.S. Hnasko, R.D. Palmiter, NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates, *Science* 310 (2005) 683–685.
- [50] E. Gropp, M. Shanabrough, E. Borok, A.W. Xu, R. Janoschek, T. Buch, et al., Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding, *Nat. Neurosci.* 8 (2005) 1289–1291.
- [51] G.A. Bewick, J.V. Gardiner, W.S. Dhillon, A.S. Kent, N.E. White, Z. Webster, et al., Post-embryonic ablation of AgRP neurons in mice leads to a lean, hypophagic phenotype, *FASEB J.* 19 (2005) 1680–1682.
- [52] A. Ahnaou, W.H. Drinkenburg, J.A. Bouwknecht, J. Alcazar, T. Steckler, F.M. Dautzenberg, Blocking melanin-concentrating hormone MCH1 receptor affects rat sleep-wake architecture, *Eur. J. Pharmacol.* 579 (2008) 177–188.
- [53] J.T. Willie, C.M. Sinton, E. Maratos-Flier, M. Yanagisawa, Abnormal response of melanin-concentrating hormone deficient mice to fasting: hyperactivity and rapid eye movement sleep suppression, *Neuroscience* 156 (2008) 819–829.
- [54] K. Dzirasa, S. Ribeiro, R. Costa, L.M. Santos, S.C. Lin, A. Grosmark, et al., Dopaminergic control of sleep-wake states, *J. Neurosci.* 26 (2006) 10577–10589.
- [55] Y. Rao, M. Lu, F. Ge, D.J. Marsh, S. Qian, A.H. Wang, et al., Regulation of synaptic efficacy in hypocretin/orexin-containing neurons by melanin concentrating hormone in the lateral hypothalamus, *J. Neurosci.* 28 (2008) 9101–9110.
- [56] X.-B. Gao, Electrophysiological effects of MCH on neurons in the hypothalamus, *Peptides* 30 (2009) 2025–2030.
- [57] M.G. Lee, O.K. Hassani, B.E. Jones, Discharge of identified orexin/hypocretin neurons across the sleep-waking cycle, *J. Neurosci.* 25 (2005) 6716–6720.
- [58] L. Bayer, G. Mairet-Coello, P.-Y. Risold, B. Griffond, Orexin/hypocretin neurons: chemical phenotype and possible interactions with melanin-concentrating hormone neurons, *Regul. Pept.* 104 (2002) 33–39.
- [59] J.L. Guan, K. Uehara, S. Lu, Q.P. Wang, H. Funahashi, T. Sakurai, et al., 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 (2002) 1523–1532.
- [60] E. Del Cid-Pellitero, B.E. Jones, Immunohistochemical evidence for synaptic release of GABA from melanin-concentrating hormone containing varicosities in the locus coeruleus, *Neuroscience* 223 (2012) 269–276.
- [61] T. Gallopin, P. Fort, E. Eggermann, B. Cauli, P.H. Luppi, J. Rossier, et al., Identification of sleep-promoting neurons in vitro, *Nature* 404 (2000) 992–995.
- [62] C.B. Saper, P.M. Fuller, N.P. Pedersen, J. Lu, T.E. Scammell, Sleep state switching, *Neuron* 68 (2010) 1023–1042.
- [63] F.F. Lima, L.V. Sita, A.R. Oliveira, H.C. Costa, J.M. da Silva, R.A. Mortara, et al., Hypothalamic melanin-concentrating hormone projections to the septo-hippocampal complex in the rat, *J. Chem. Neuroanat.* 47 (2013) 1–14.

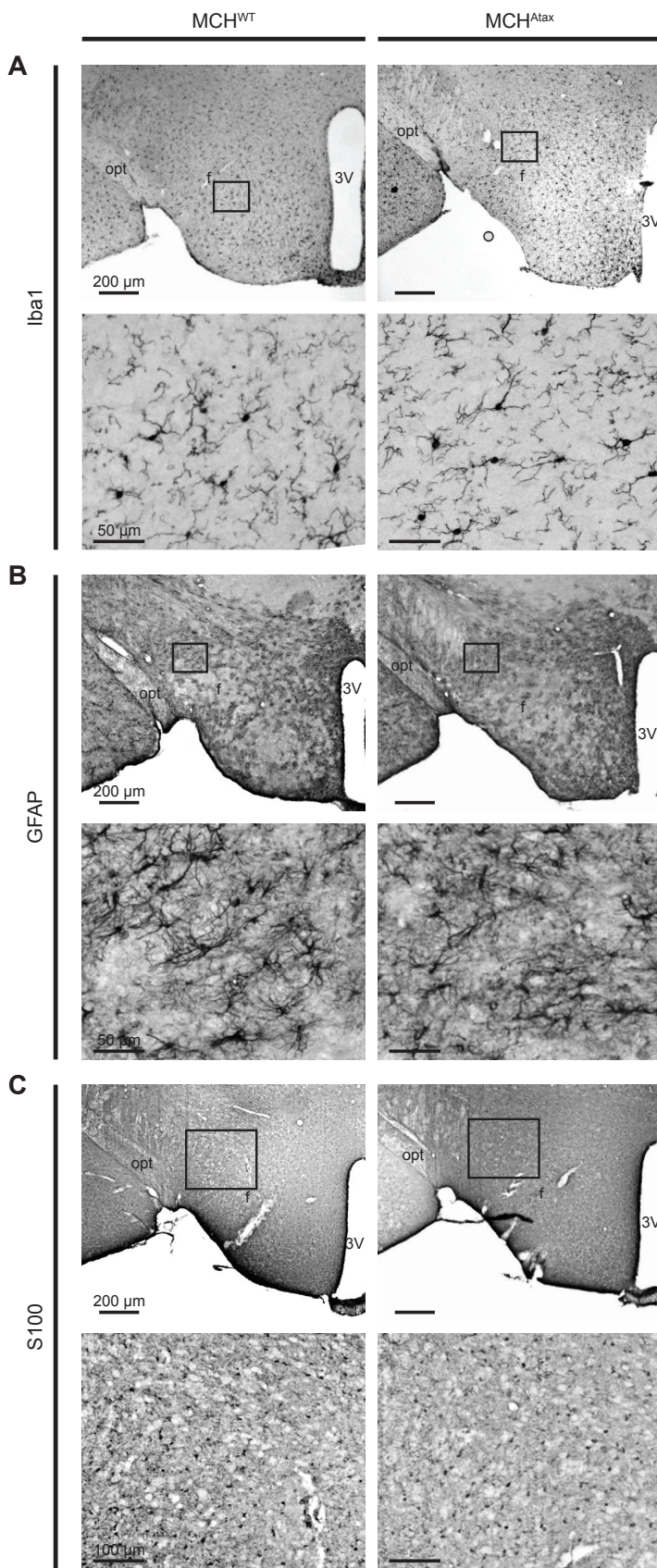


Fig. S1. Immunostaining of glial markers in brain sections of MCH^{WT} and MCH^{Atax} mice at the time when polysomnographic recordings were performed.

Representative photomicrographs comparing the immunolabelling of the glial markers Iba1 (A), GFAP (B), and S100 (C) in MCH^{WT} (left column) and MCH^{Atax} (right column) mice. Neither qualitative nor quantitative differences were observed between genotypes.

2.3. Résultats complémentaires

2.3.1. Compléments sur l'analyse de survie des durées des états de vigilance

Afin de préciser les données présentées Figure 4 de l'article 2, la Figure 2.2.1 illustre les courbes de survie des durées des épisodes pour tous les états de vigilance. La comparaison des courbes de survie des épisodes de SP ne révèle aucune différence entre les souris MCH^{Atax} et MCH^{WT} ($n = 14$ par génotype ; test *log-rank* : $p = 0,46$; Figure 2.2.1 C–D), ce qui indique des dynamiques de consolidation du SP similaires entre les deux génotypes. À l'inverse, l'analyse de la survie des épisodes de SL démontre une diminution significative de la survie chez les souris MCH^{Atax} pendant les périodes diurne et nocturne (test *log-rank* : $p < 0,001$; Figure 2.2.1 E–F). Plus précisément, pendant la période diurne, la diminution de la survie observée chez les souris MCH^{Atax} concerne les épisodes de SL d'une durée supérieure à environ 200 s, alors que, pendant la

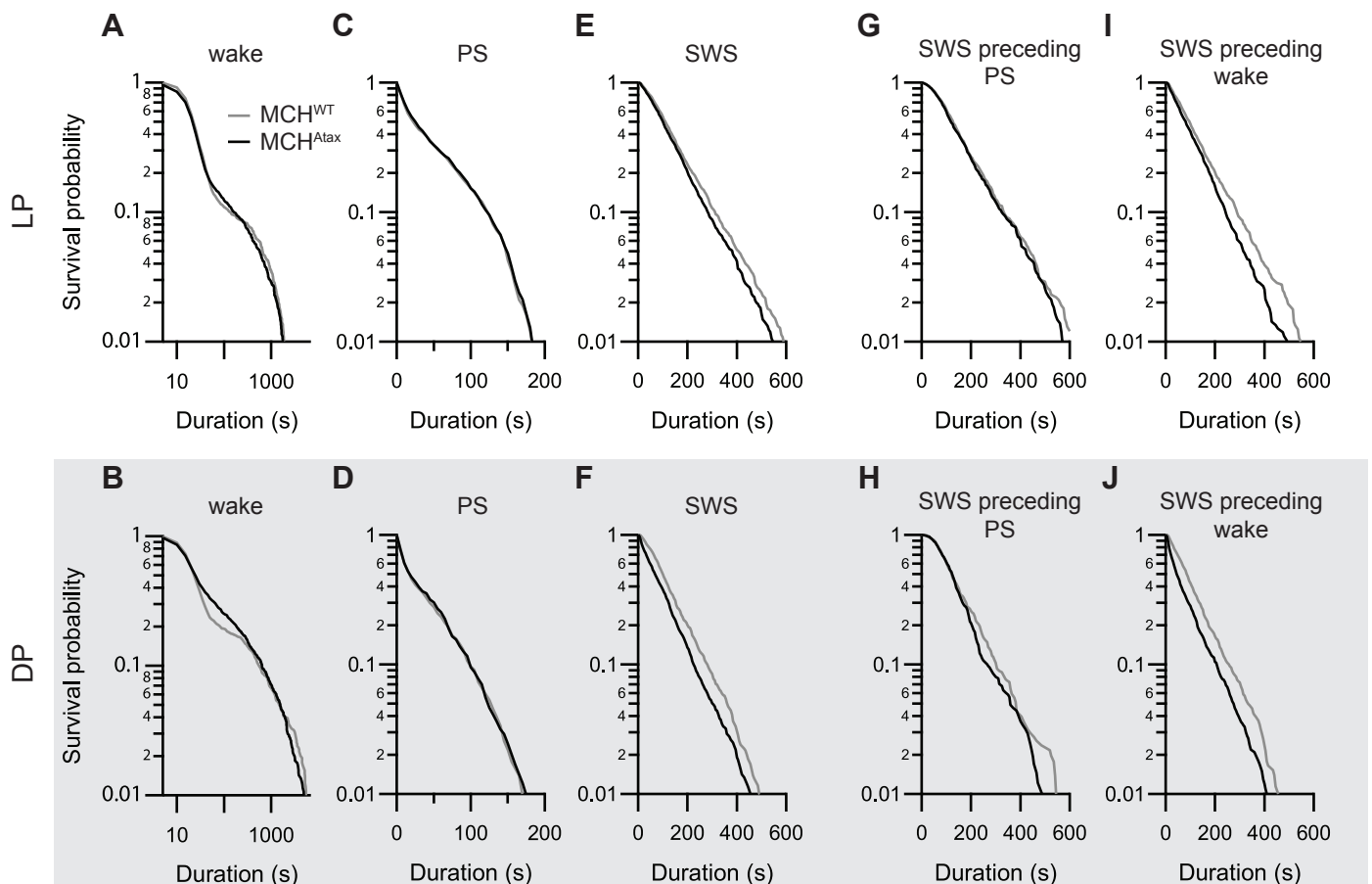


Figure 2.2.1. Effet de la lésion partielle des neurones MCH sur les propriétés dynamiques des états de vigilance.

A–F, Courbes de survie des durées des épisodes d'éveil (*wake*, **A–B**), de SP (*PS*, **C–D**) et de SL (*SWS*, **E–F**) pour des souris MCH^{WT} ($n = 14$, courbes grises) et MCH^{Atax} ($n = 14$, courbes noires) enregistrées pendant la phase diurne (*LP*, *light period*) et nocturne (*DP*, *dark period*). **G–I,** Comparaison de la distribution des durées des épisodes de SL suivis par du SP (*SWS preceding PS*, **G–H**) ou de l'éveil (*SWS preceding wake*, **C–D**) chez les mêmes animaux.

période nocturne, cette diminution de la survie intervient pour des épisodes de SL d'une durée plus courte, inférieure à environ 100 s. Pour des durées d'épisodes plus longues, les courbes correspondants aux deux génotypes semblent parallèles. Pendant la période nocturne, la perte des neurones MCH semble ainsi conduire à la perte d'un mécanisme initial de consolidation des épisodes de SL. Les épisodes de SL pouvant être suivis d'un épisode d'éveil ou de SP, nous avons analysé la survie des épisodes de SL en fonction de la nature de l'épisode suivant (Figure 2.2.1 G–J). Aucune différence significative entre les souris MCH^{Atax} et MCH^{WT} n'a été détectée en comparant les courbes de survie des épisodes de SL précédant un épisode de SP (phase diurne, test *log-rank* : $p = 0,26$; phase nocturne, test *log-rank* : $p = 0,17$; Figure 2.2.1 G–H). À l'inverse, la survie des épisodes de SL précédant un éveil est significativement réduite chez les souris MCH^{Atax} (phases nocturne et diurne, test *log-rank* : $p < 0,001$; Figure 2.2.1 I–J) avec des profils similaires à ceux décrits pour l'ensemble des épisodes de SL. Concernant la survie des épisodes d'éveil, l'analyse sur l'ensemble de la distribution ne révèle aucune différence significative entre génotypes (phase nocturne, test *log-rank* : $p = 0,25$; phase diurne test *log-rank* : $p = 0,07$; Figure 2.2.1 A–B). Cependant, lorsque l'analyse est restreinte aux épisodes d'éveil de durée intermédiaire ([60–100 s]), une augmentation significative de la survie de ces épisodes est mesurée pour les souris MCH^{Atax} (phase nocturne, test *log-rank* : $p < 0,01$; phase diurne, test *log-rank* : $p < 0,05$). Cette observation, en parallèle des mêmes analyses conduites chez des souris invalidées pour le gène codant pour le peptide orexine (Diniz-Behn et coll., 2008), suggérerait chez les souris MCH^{Atax} une hyperexcitabilité des neurones orexine en l'absence de neurones MCH.

2.3.2. Effet de la lésion partielle des neurones MCH sur l'homéostasie du SP

Ces mêmes animaux ont également été soumis à un protocole de privation spécifique de PS pendant 24 heures afin d'évaluer si la lésion partielle des neurones MCH affecte certains processus

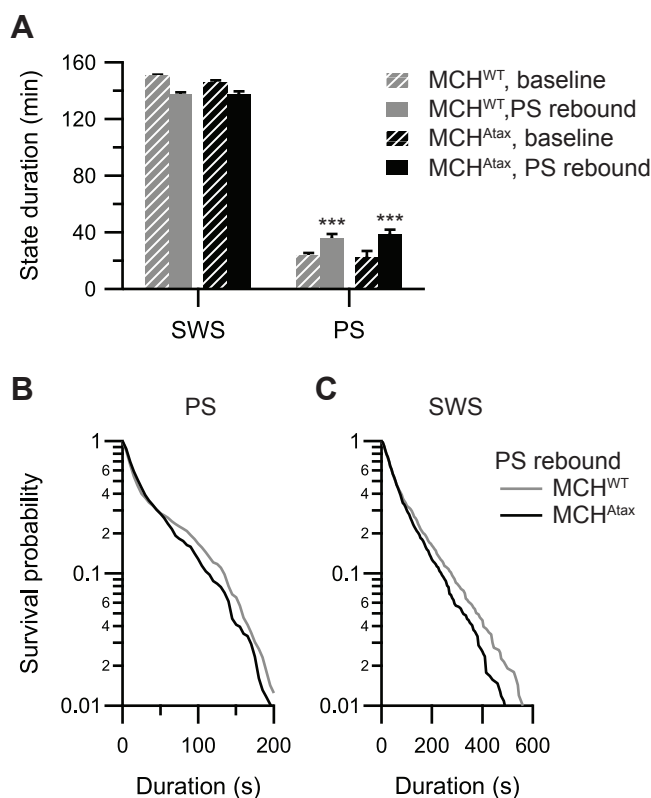


Figure 2.2.2. Homéostasie du sommeil après 24 heures de privation spécifique de SP.

A, Quantification des durées totales de SL (SWS) et de SP (PS) pendant 4 heures de rebond suivant la fin de la privation spécifique de SP (barres pleines) et au cours des enregistrements en condition basale correspondants (barres hachurées) chez des souris MCH^{WT} ($n = 11$, barres grises) et MCH^{Atax} ($n = 12$, barres noires).

Les mesures sont présentées par moyenne \pm SEM. Test de Student : *** $p < 0,001$, baseline vs. PS rebound.

B–C, Courbes de survie des durées des épisodes de SP (PS, **B**) et de SL (SWS, **C**) pendant 4 heures suivant l'arrêt de la privation chez des souris MCH^{WT} ($n = 11$, courbes grises) et MCH^{Atax} ($n = 12$, courbes noires).

contrôlant l'homéostasie du SP (Figure 2.2.2). Chez les deux lignées de souris, une augmentation significative des quantités de SP a été mesurée à la suite de cette privation (test de Student : $p < 0,001$ pour MCH^{WT} et MCH^{Atax}) (Figure 2.2.2 A). Cependant, la comparaison entre les génotypes MCH^{Atax} et MCH^{WT} n'a révélé aucune différence significative pour aucun paramètre analysé (quantités de SP, test de Student : $p = 0,54$; quantités de SL, test de Student : $p = 0,97$). De même, l'analyse des courbes de survie des durées des épisodes de SP ou de SL pendant la période de rebond n'a révélé aucune différence entre les souris MCH^{Atax} et MCH^{WT} (SP, test *log-rank* : $p = 0,35$; SL, test *log-rank* : $p = 0,19$; Figure 2.2.2 B–C).

Ce protocole n'a ainsi pas permis de révéler d'effet de la lésion des neurones MCH sur l'homéostasie du SP après 24 heures de privation spécifique de cet état.

2.4. Conclusions du deuxième article

2.4.1. Affiner les descripteurs pour une caractérisation plus détaillée du sommeil

Les analyses du cycle veille-sommeil sont généralement basées sur l'extraction de paramètres standards tels que la durée totale, le nombre d'épisodes ou la durée moyenne des épisodes d'un état de vigilance. Ces paramètres permettent en première intention de décrire certains aspects de l'alternance veille-sommeil ; néanmoins ils peuvent devenir imprécis lorsque les altérations du cycle veille-sommeil sont légères et subtiles. Un exemple trivial tiré de la présente étude concerne l'étude des quantités de SL qui ne permet pas de décrire la fragmentation du SL chez les souris MCH^{Atax} . La complexité de l'alternance des états de vigilance a alors inspiré le développement de mesures complémentaires qui permettent de générer des informations supplémentaires concernant la dynamique des états de vigilance. Ainsi, l'analyse de la distribution des durées des épisodes de SL et de SP est un outil intéressant pour caractériser cette dynamique (Lo et coll., 2002 ; Lo et coll., 2004). L'analyse de survie des durées des épisodes de sommeil ou d'éveil permet d'obtenir des informations complémentaires sur les processus responsables du maintien et de la terminaison des états de vigilance par exemple pendant la maturation post-natale des états du cycle veille-sommeil (Blumberg et coll., 2005 ; Karlsson et coll., 2005 ; Gall et coll., 2012), après des lésions du locus coeruleus (Gall et coll., 2009) ou chez des souris invalidées pour le gène codant pour le peptide orexine (Blumberg et coll., 2007 ; Diniz Behn et coll., 2008). Dans notre étude, l'utilisation des analyses de survie nous a permis de mettre en évidence une fragmentation robuste du SL qui était indiscernable par le calcul uniquement des durées moyennes des épisodes de SL. Un autre exemple de méthodes complémentaires repose sur l'utilisation des analyses en chaîne de Markov qui révèlent certains aspects de la dynamique de l'alternance entre états de vigilance (Kim et coll., 2009 ; Bianchi et coll., 2012 ; Stephenson et coll., 2013).

Les mêmes remarques peuvent être formulées concernant l'analyse des signaux EEG au cours des états de vigilance. À partir de ces signaux, les analyses spectrales sont souvent réalisées sur des périodes de temps longues et moyennées entre les sujets, ce qui peut conduire à une perte de sensibilité en particulier au niveau temporel. Pour pallier à ces limitations, des représentations alternatives des paramètres spectraux ont été développées telles que la représentation dans un espace bidimensionnel de ratios de la puissance spectrale dans certaines bandes de fréquence du spectre. Cette approche permet alors de détailler l'organisation des signaux EEG en terme de dynamique, de trajectoires ou de vélocité (Gervasoni et coll., 2004 ; Dzirasa et coll., 2006 ;

Diniz Behn et coll., 2010). Ainsi, la complexité du sommeil a encouragé le développement d'outils complémentaires permettant de décrire avec davantage de précision l'architecture du cycle veille-sommeil et les mécanismes subtils qui la régule.

2.4.2. Les neurones MCH contribuent à la régulation du SL

Au cours de cette étude, nous avons pu mettre en évidence que la disparition des neurones MCH conduisait à une fragmentation du SL et à une diminution de la puissance des ondes lentes pendant le SL sans altération des quantités de SL. Ces effets dus à la perte des neurones MCH ont été observés en conditions basale et au cours du rebond de sommeil faisant suite à une privation totale de sommeil. Ces résultats renforcent l'hypothèse d'une contribution des neurones MCH dans la régulation du SL (Verret et coll., 2003 ; Ahnaou et coll., 2008). En effet, l'administration du peptide MCH ou d'un antagoniste à son récepteur augmente ou diminue respectivement les quantités de SL. De même, l'ablation spécifique des neurones MCH par l'expression ciblée de la toxine diphtérique conduit à une diminution des quantités de SL qui résulte d'un raccourcissement de la durée des épisodes (Tsunematsu et coll., 2014). Chez les souris MCH^{Atax}, l'absence d'effet observé sur les quantités de SL pourrait être la conséquence de l'ablation partielle des neurones MCH dans notre modèle conduisant à un phénotype moins perturbé. Par ailleurs, les récentes études reposant sur la stimulation par optogénétique des neurones MCH divergent également sur un possible contrôle du SL par ces neurones MCH. Leur stimulation chronique pendant 24 heures produit une augmentation des quantités de SL pendant le période nocturne (Konadhode et coll., 2013), alors que leur stimulation aiguë pendant la période diurne n'affecte pas le SL (Jego et coll., 2013) ou en diminue les quantités (Tsunematsu et coll., 2014). L'apparente dissonance entre ces études pourrait refléter la différence entre les protocoles de stimulation mis en œuvre : des stimulations répétées et chroniques à comparer avec des stimulations aiguës. Il est alors possible que des stimulations aiguës n'affectent que la neurotransmission rapide GABAergique ou glutamatergique issue des neurones MCH alors que la modulation de la transmission peptidergique pourrait nécessiter des protocoles de stimulation sur une plus longue période de temps.

Cependant, les données présentées ici mettent en évidence un rôle majeur des neurones MCH dans les processus de consolidation du SL et de facilitation de l'émergence d'ondes lente de plus forte amplitude pendant le SL. Cet effet pourrait provenir d'une action inhibitrice des neurones MCH et du peptide MCH sur des populations neuronales responsables de l'éveil, en particulier les neurones exprimant l'orexine (Gao et coll., 2003 ; Rao et coll., 2008 ; Gao, 2009) avec lesquels ils sont interconnectés (Bayer et coll., 2002 ; Guan et coll., 2002). Les neurones MCH envoient également des projections vraisemblablement inhibitrices vers le locus coeruleus ou le noyau du raphé dorsal (Saito et coll., 2001 ; Del Cid-Pellitero et Jones, 2012 ; Yoon et Lee, 2013). Ils projettent également vers le noyau tubéromammillaire au niveau duquel les neurones MCH peuvent libérer du GABA ainsi que le peptide MCH qui faciliterait la libération pré-synaptique de GABA (Jego et coll., 2013). Les neurones MCH pourraient ainsi contribuer à réduire l'excitabilité des populations neuronales responsables de l'éveil et favoriser la désinhibition des neurones responsables du SL localisés en particulier dans le VLPO, et donc favoriser l'entrée en SL puis sa consolidation. Ces neurones pourraient également favoriser l'établissement des ondes lentes par une action directe au niveau de structures thalamiques et néocorticales sur lesquelles ils envoient de nombreuses projections (Bittencourt et coll., 1992 ; Lima et coll., 2013).

2.4.3. Le SP n'est pas affecté par la lésion des neurones MCH

Dans cette étude, nous avons trouvé que les quantités journalières de SP étaient augmentées chez les souris MCH^{Atax} essentiellement à cause d'une augmentation des quantités de SP pendant la période diurne. Des effets similaires ont été observés chez des souris invalidées pour le gène codant pour l'expression du récepteur MCH-R1 (Adamantidis et coll., 2008). Cette similitude laisse supposer une contribution des neurones MCH dans les mécanismes contrôlant la distribution circadienne du SP. Ce résultat est surprenant puisque, au regard des données disponibles, une diminution des quantités de SP était attendue et semble en opposition avec l'hypothèse selon laquelle les neurones MCH participeraient à la promotion du SP (Verret et coll., 2003 ; Hassani et coll., 2009 ; Jégo et coll., 2013 ; Konadhode et coll., 2013 ; Tsunematsu et coll., 2014). Il est impossible d'exclure que ce résultat pourrait être la conséquence de phénomènes de compensation ou encore d'adaptation de la régulation du sommeil provoquée par des altérations d'autres fonctions physiologiques telles que l'alimentation et la régulation de la dépense énergétique (Alon et Friedman, 2006 ; Guyon et coll., 2009 ; Pissios, 2009 ; Semjonous et coll., 2009 ; Mul et coll., 2011 ; Barson et coll., 2013 ; Kosse et coll., 2015) ou de fonctions cognitives (Adamantidis et coll., 2005 ; Le Barillier et coll., 2015). Une autre hypothèse peut émerger lorsque nos résultats sont mis en parallèle avec ceux obtenus chez des souris présentant une ablation spécifique des neurones orexine par l'expression ciblée de l'ataxine-3 dans cette population neuronale. Dans ce modèle, l'amplitude de l'oscillation circadienne du SP est réduite à cause d'une augmentation des quantités de SP pendant la phase nocturne (Kantor et coll., 2009). Cet effet est donc parfaitement à l'opposé de ce que nous avons pu observer sur les souris MCH^{Atax}. Ces données permettent de formuler l'hypothèse que l'oscillation circadienne du SP pourrait être sous le contrôle – au moins en partie – des neurones orexine actifs pendant l'éveil et des neurones MCH actifs pendant le sommeil. Cette hypothèse est renforcée par le fait que ces deux populations neuronales sont sous une forte influence du SCN par des projections directes ou indirectes (Stephan et coll., 1981 ; Morin et coll., 1994 ; Wurts et Edgar, 2000 ; Abrahamson et coll., 2001) et réciproquement envoient des projections vers le SCN (Bittencourt et coll., 1992 ; Krout et coll., 2002 ; Cvetkovic et coll., 2004 ; Chee et coll., 2013). Des études récentes ont également permis de démontrer que les neurones orexine et les neurones du SCN seraient impliqués dans une boucle inhibitrice réciproque (Marston et coll., 2008 ; Belle et coll., 2014) sur laquelle les neurones MCH pourraient également exercer un rôle. Ils pourraient par exemple inhiber le SCN, contrecarrant alors l'induction du SP produite par le SCN (Wurts et Edgar, 2000).

Il n'en reste pas moins vrai que l'analyse détaillée des enregistrements EEG chez les souris MCH^{Atax} ne nous a pas permis de mettre en évidence un effet de la perte des neurones MCH dans le rythme ultradien ou la dynamique du SP malgré les travaux précédents proposant un rôle des neurones MCH dans la facilitation de l'entrée en SP (Verret et coll., 2003 ; Hassani et coll., 2009 ; Jégo et coll., 2013 ; Konadhode et coll., 2013 ; Tsunematsu et coll., 2014). Cette absence d'effet peut être la conséquence d'une ablation incomplète des neurones MCH, limitant donc l'apparition d'effets robustes, ou d'une compensation de la défaillance du système MCHergique qui aurait tout le temps nécessaire pour se mettre en place. En effet, dans notre modèle, la perte neuronale commence dès la naissance alors que les expérimentations ont été réalisées à l'âge adulte. Néanmoins, il est également important de noter que les études proposant un rôle des neurones MCH dans la genèse du SP reposent essentiellement sur des expériences « gain de fonction » (Tsunematsu et coll., 2014) (Verret et coll., 2003 ; Jégo et coll., 2013 ; Konadhode et coll., 2013). À l'inverse, et de manière remarquable, des études récentes reposant également sur une perte de fonction des neurones MCH, grâce à leur inhibition par optogénétique ou leur ablation induite par l'expression spécifique de la toxine diphtérique, n'ont pas été non plus en

mesure de détecter des altérations sensibles du SP (Jego et coll., 2013). L'ensemble de ces études soulève la question de la « nécessité » ou de la « suffisance » dans le contexte d'expériences de « perte de fonction » ou de « gain de fonction » ; en particulier, l'activation des neurones MCH pourraient être suffisante pour promouvoir le SP mais pourrait ne pas être « nécessaire » à la promotion et au maintien de cet état de vigilance.

Dans cette étude, nous avons donc démontré que la perte partielle des neurones MCH conduit à une altération de la distribution circadienne du SP ainsi qu'à des déficits de consolidation du SL dans des conditions basales ou après une privation de sommeil.

Pour poursuivre plus avant la caractérisation de la contribution fonctionnelle des neurones MCH dans la régulation du cycle veille-sommeil, il apparaît nécessaire aujourd'hui de mettre en œuvre des méthodologies alternatives permettant d'inhiber avec plus d'efficacité les neurones MCH.

Chapitre 3 :

Rôle des neurones exprimant l'hormone de mélanocortine dans le contrôle du cycle veille-sommeil — modulation pharmacogénétique de leur activité

3.1. Présentation du troisième article

Face à certaines limitations expérimentales relevées précédemment, il semble utile de rechercher des alternatives permettant de moduler l'activité des neurones MCH en minimisant, en particulier, les potentielles adaptations à une défaillance prolongée du système MCHergique.

Aussi dans l'optique de répondre à la même problématique que celle exposée plus haut – à savoir la contribution exacte des neurones MCH à la régulation du cycle veille-sommeil – nous sommes nous tournés vers les outils de pharmacogénétique. Cette méthode, aussi appelée DREADD pour *Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs* (Armbruster et coll., 2007 ; Alexander et coll., 2009), repose sur l'expression dans une population cellulaire ciblée moléculairement de récepteurs muscariniques mutés pour être rendus incapables de lier leur ligand endogène, l'acétylcholine, mais activables par un ligand exogène la clozapine-N-oxyde (CNO) (Figure 2.3.1 A). Nous avons choisi d'utiliser les récepteurs hM3dq et hM4di respectivement activateur et inhibiteurs. L'activation du récepteur hM3dq par le CNO active une protéine Gq qui stimule la phospholipase C et conduit à l'augmentation de la concentration en calcium dans le cytosol et donc à une augmentation de l'excitabilité des neurones. À l'inverse, les récepteurs hM4di sont couplés à une protéine Gi et leur activation produit une hyperpolarisation, principalement par l'activation de canaux potassiques à rectification entrante $K_{ir}3$ (Dong et coll., 2010 ; Rogan et Roth, 2011) (Figure 2.3.1 B).

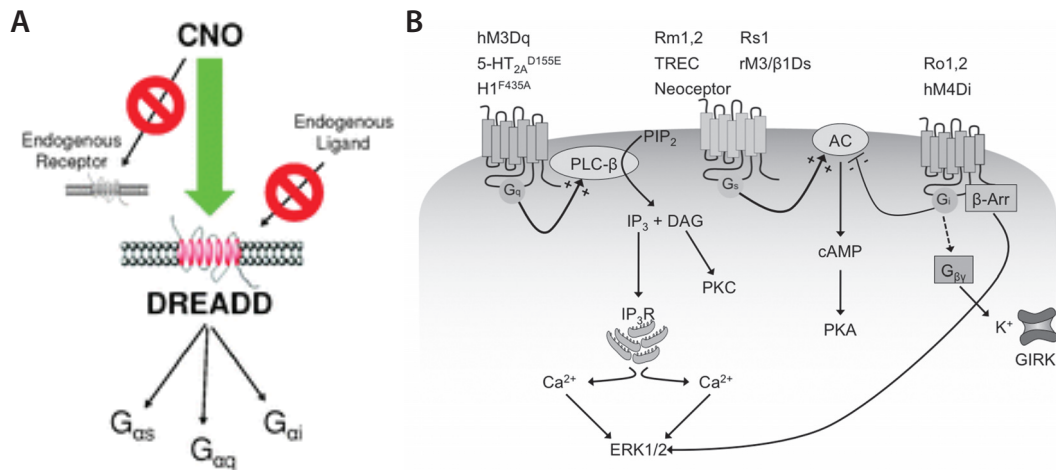


Figure 2.3.1. Principe de la technique de pharmacogénétique ou DREADD (*Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs*).

A, Schéma illustrant le principe des récepteurs DREADD : ces récepteurs muscariniques sont mutés pour devenir insensibles à leur ligand endogène et être activables par le CNO (extrait de Dong et coll., 2010).

B, Schéma d'activation des seconds messagers suite à l'activation des récepteurs DREADD (extrait de Rogan et Roth, 2011)

Afin de cibler l'expression de ces récepteurs DREADD dans les neurones MCH, des souris transgéniques exprimant la cre-recombinase sous contrôle du promoteur *preproMCH* ont reçu bilatéralement dans l'hypothalamus tubéral des injections d'un vecteur viral contenant une séquence floxée codant pour le récepteur DREADD choisi. Cette approche permet ainsi de faire exprimer uniquement par les neurones MCH transfectés ces récepteurs DREADD, ces derniers permettant alors par le truchement d'une injection intrapéritoneale de CNO d'activer ou d'inhiber les neurones MCH transfectés pendant plusieurs heures et de manière réversible. Cette approche pharmacogénétique présente deux avantages majeurs par rapport aux techniques d'optogénétique d'ors et déjà mises en œuvre pour étudier le rôle des neurones MCH dans la régulation physiologique du sommeil (Jego et coll., 2013 ; Konadhode et coll., 2013 ; Tsunematsu et coll., 2014) : premièrement, la pharmacogénétique reposant sur l'administration systémique du ligand CNO permet d'activer ou d'inhiber l'ensemble des neurones exprimant les récepteurs DREADD, quelque soit leur distribution topographique, et n'est pas seulement limitée aux neurones présents dans le cône d'illumination issu d'une fibre optique, ce qui peut être problématique dans le cas des neurones MCH qui sont très largement distribués au sein de l'hypothalamus tubéral ; deuxièmement, l'activation des récepteurs DREADD issus de mutations de récepteurs muscariniques, donc métabotropiques, ne devrait pas conduire à un profil de décharge hypersynchrone des neurones, comme souvent observé lors de stimulations par optogénétique.

Grâce à cette approche, nous avons été en mesure de confirmer l'implication des neurones MCH dans la promotion et la consolidation du SP. Nous démontrons également que les neurones MCH interviennent directement dans certains aspects de la régulation du SL. En effet, nous avons déterminé que l'inhibition et l'activation de ces neurones prolonge et raccourcit respectivement la durée des épisodes de SL et que ces effets s'accompagnent de modifications des caractéristiques des ondes lentes, suggérant ainsi un rôle des neurones MCH dans les processus de terminaison des épisodes de SL ainsi que dans la consolidation de ceux-ci.

Chemogenetic Modulation of Melanin-Concentrating Hormone Neurons Highlights their Contribution to both Slow-Wave Sleep and Paradoxical Sleep

Running title: Chemogenetic modulation of MCH neurons

Christophe VARIN^{1,2}, Sonia JEGO^{3,4}, Mickael LAZARUS⁵, Pierre-Hervé LUPPI^{1,2}, Antoine ADAMANTIDIS^{3,4} and Patrice FORT^{1,2,§}

¹ Neuroscience Research Center of Lyon (CRNL), CNRS UMR 5292, INSERM U1028, SLEEP Team, Lyon, FRANCE.

² Lyon1 Claude Bernard University, Lyon, FRANCE.

³ Douglas Mental Health University Institute, Department of Psychiatry, McGill University, Montreal, CANADA.

⁴ Department of Neurology, Inselspital University Hospital, University of Bern, Bern, SWITZERLAND.

⁵ International Institute for Integrative Sleep Medicine (WPI-IIIS), University of Tsukuba, Tsukuba, JAPAN.

[§] Corresponding author: Dr Patrice Fort

Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon (CRNL)

Faculté de Médecine Lyon-Est – Laënnec/La Buire - UCBL 1

7, rue Guillaume Paradin

69372 LYON Cedex 08 – France

patrice.fort@univ-lyon1.fr

Authors' contributions:

CV and PF designed the experiments. ML designed and provided AAV vectors. CV collected and analyzed anatomical, *in vitro* electrophysiological and polysomnographic data. SJ and AA collected and analyzed part of sleep data. All of the authors discussed the results. CV and PF wrote the manuscript.

Summary

Numerous reports described a critical role of hypothalamic neurons expressing melanin-concentrating hormone (MCH) in the regulation of sleep [1-6]. However, controversies remain concerning their exact contribution to both slow-wave sleep (SWS) and paradoxical sleep (PS) or to PS alone [7]. To address this point and complement recent findings from experiments using optogenetics [3-5] or cell-specific ablation of MCH neurons [5, 8], we examined the effects on sleep of their chemogenetic neuromodulation using the excitatory hM3dq and inhibitory hM4di DREADD receptors transfected in *Tg(Pmch-cre)* mice combined to clozapine N-oxide (CNO) treatments [9-11]. Using this approach, we extended previous findings revealing that the activation of MCH neurons invariably facilitates PS onset and maintenance. However their inhibition failed to demonstrate any consistent alteration in PS regulation. More originally, here we found that modulating the activity of MCH neurons by chemogenetics strongly affected SWS: their hM4di-mediated inhibition increases SWS amounts and extended SWS episode duration whereas their hM3dq-mediated excitation results in decreased SWS amounts and shorter SWS episodes. We also found that MCH neurons contribute to the fine-tuning of EEG delta rhythmic activities likely reflecting changes in SWS depth. Completing their admitted role during PS, we here demonstrate that MCH neurons are also crucially involved during SWS in basic mechanisms preparing PS genesis. We propose that, when MCH neurons are physiologically recruited, they potentiate the termination of SWS episodes and increase the sleep depth, two physiological processes likely strengthening the probability for the natural SWS to PS alternation.

Results

DREADD receptors are functional in genetically targeted MCH neurons

To confirm that the expression of excitatory hM3dq and inhibitory hM4di DREADD receptors fused to the fluorescent reporter mCherry was restricted to MCH-expressing neurons, we performed dual immunodetection of MCH and mCherry in Tg(*Pmch-cre*) mice that received bilateral infusions of viral vectors in the tuberal hypothalamus. Staining for mCherry was detected in $68.3 \pm 3.3\%$ and $62.1 \pm 2.1\%$ of MCH-immunoreactive neurons in hM3dq- and hM4di-transfected mice (Figures 1A–1B). In the same mice, $97.2 \pm 1.0\%$ and $96.8 \pm 1.1\%$ of mCherry-positive neurons were MCH-immunoreactive. Additionally, mCherry labeling was never detected in orexin-expressing neurons (Figure 1C). To evaluate the functional efficacy of DREADD receptors expressed in MCH neurons, we performed whole-cell recordings of mcherry-expressing neurons in acute brain slices. Bath application of clozapine N-oxide (CNO, $10 \mu\text{M}$) reliably depolarized hM3dq-expressing ($+13.8 \pm 0.7 \text{ mV}$; $n = 4$; Wilcoxon test $p < 0.05$) and hyperpolarized hM4di-expressing neurons ($-8.4 \pm 1.2 \text{ mV}$; $n = 4$; Wilcoxon test $p < 0.05$) (Figure 1D). Finally, CNO administration (1 mg/kg) in hM3dq-transfected mice 2-h prior to sacrifice resulted in a strong increase in c-Fos staining in MCH neurons (vehicle: $0.9 \pm 0.2\%$; CNO: $31.5 \pm 2.6\%$; $n = 3$ per condition; Mann-Whitney test $p = 0.05$; Figure 1E). Taken together, these results settle that the virally delivered transgenes are specifically expressed by MCH neurons and likely functionally efficient.

Modulating the activity of MCH-secreting neurons affects sleep

We then evaluated the effects of different CNO doses administrated at light onset (8 am) on sleep architecture of mice expressing hM3dq or hM4di DREADD receptors as well as mice transfected with a sequence encoding only for the fluorescent reporter (Ctrl). We first addressed whether CNO (*vs.* Veh.) treatments may induce nonspecific effects as this compound is known to be rapidly reduced into clozapine, an atypical antipsychotic with potent effects on sleep [12, 13]. When administrated in Ctrl mice, CNO dose-dependently increased SWS and decreased PS amounts (Figures 2 and S1) whereas wake amounts were not modified (one-way ANOVA: $F(4,34) = 1.81$, $p = 0.150$). Additionally, CNO dose-dependently decreased the number of PS and SWS episodes and increased the mean duration of SWS episodes and PS latencies (Figure S1). Keeping in mind these side effects in Ctrl

mice, we next administered the same CNO treatments in hM3dq- or hM4di-expressing mice. Activation of MCH neurons specifically increased PS amounts during the first 3-h following CNO injections at a dose of 0.5 mg/kg compared to Ctrl mice (Figure 2A). Conversely no effect of the inhibition of MCH neurons was detected on PS amounts, hM4di and Ctrl mice displaying the same dose-dependent decrease in PS amounts (Figure 2A). Further, CNO treatments in hM3dq mice resulted in a decrease in SWS amounts compared to Ctrl mice, significantly different at the dose of 5 mg/kg (Figure 2B). In hM4di mice, all CNO doses induced significant increases in SWS amounts compared to Ctrl mice (Figure 2B). These results suggest that, in addition to their well-described PS-facilitating role, the MCH neurons may also participate in impeding aspects of SWS regulation as supported by the inversed changes in SWS amounts after their chemogenetic inhibition or activation.

MCH neurons regulate PS promotion and maintenance

Numerous studies pointed to a role of MCH neurons in PS promotion and maintenance [2-6], in line with the increase of PS amounts following their chemogenetic activation (Figure 2A). To further characterize this effect, we quantified parameters related to PS promotion: the number of PS episodes, the ratio of PS *vs.* SWS episodes to estimate the probability of SWS to PS transition and the PS latency. In hM4di mice, CNO treatments significantly decreased the number of PS bouts as well as the transition probability to PS compared to Ctrl mice (Figures 3A–3B), whereas PS latency was not modified (Figure S2C). In hM3dq mice, a shorten PS latency was measured at CNO doses of 0.5 and 1 mg/kg compared to Ctrl mice (Figure 3C), while the two other parameters were not modified (Figures S2A–S2B). These data suggest that PS promotion might be slightly altered when the MCH neurons are inhibited whereas PS onset is facilitated when they are activated. Regarding the role of MCH neurons in PS maintenance, we next analyzed effects of CNO on the mean duration of PS episodes. In hM4di mice, no effect was detected (Figure S2D), whereas the mean duration of PS episodes was significantly increased in hM3dq *vs.* Ctrl mice (Figure 3D), indicating that PS is consolidated when MCH neurons are activated. Finally, no change on EEG power spectrum was noticed during PS after their chemogenetic activation or inhibition (Figure S2E).

Mice also received CNO injections at a different circadian time (8 pm) corresponding to the early dark phase. No effect of the inhibition of MCH neurons was found on any PS parameter examined (Figure S2J–S2K). Conversely, the activation of MCH neurons resulted in an inverted U-shaped relationship between CNO doses and PS amounts (Figure S2F), the

number of PS episodes (Figure S2G) and mean duration (Figure S2H). Inversely, the PS latency (Figure S2I) followed a U-shaped relationship according to increasing CNO doses. Taken together, these experiments confirm findings from previous reports highlighting a role of MCH neurons in PS promotion and maintenance during both photoperiods.

MCH neurons contribute to SWS termination and control EEG rhythms during SWS

As for PS, we extended the analysis to different SWS parameters since MCH neurons might also contribute to SWS regulation (Figure 2B). Whatever the CNO dose, there was no significant difference in the number of SWS episodes in either hM3dq or hM4di mice compared to Ctrl animals (Figure 4A). This indicates that neither the excitation nor the inhibition of MCH neurons significantly affected SWS promotion. We subsequently examined the mean duration of SWS bouts during the first 3-h post-treatments. We observed that CNO-mediated inhibition of MCH neurons in hM4di mice significantly extended the duration of SWS episodes whereas the activation of MCH neurons in hM3dq mice significantly shortened their duration compared to Ctrl mice (Figure 4B). Once again, these data suggest that MCH neurons favor the termination of SWS bouts.

Besides, EEG spectral analysis was computed from SWS episodes during 2-h following CNO treatments in hM3dq, hM4di and Ctrl mice. As for the amounts of sleep states, CNO (*vs.* Veh.) induced in Ctrl mice changes in spectral power within the delta band (0,5-4Hz; Figures 4C and S3). Notwithstanding these side effects, the excitation of MCH neurons in hM3dq mice induced significantly both a decrease in power within the slowest half (0.5–2 Hz) and an increase within the fastest half of the delta band (2.2–4 Hz), thus favoring a deeper SWS compared to Ctrl mice (Figures 4C and S3). Conversely, the inhibition of MCH neurons in hM4di mice provoked an opposite effect, with a significant increase within the slowest half of the delta band compared to Ctrl mice, thus advancing to light SWS (Figures 4C and S3). This spectral analysis revealed that MCH neurons participate to the modulation of EEG rhythmic activities during SWS likely underlying changes in sleep depth.

Discussion

Although MCH-expressing neurons are unanimously thought to participate in the regulation of sleep, in particular PS [1-6, 8], inconsistent or even discrepant results have been reported concerning their actual role in or during SWS, as typically illustrated by the recent works using optogenetics. Indeed, the light-induced activation of ChR2-expressing MCH neurons during 24-h increased SWS amounts only during the dark phase [4]. Their stimulation acutely applied at the onset of a SWS episode did not change the duration of the ongoing episode [3]. In contrast, their continuous stimulation for 3-h during the light period decreased SWS amounts [5]. In line with the latter study, we found using chemogenetic that CNO-mediated activation of MCH neurons during the light phase decreased SWS amounts during 3-h by shortening the duration of SWS episodes. Likely consolidating this finding, their chemogenetic inhibition produced the exact opposite effect on SWS. Collected together, our data suggest that MCH neurons might control the termination of SWS bouts under basal condition that might facilitate the alternation to PS. In support of this proposal, we further observed that the chemogenetic activation of MCH neurons is followed by an increase in EEG power into the fastest half of the delta band during SWS. Such a mechanism played by MCH neurons might thus participate in increasing SWS depth, a state that physiologically precedes and likely facilitates the occurrence of PS. Whether this effect on cortical EEG is mediated through ascending projections of MCH neurons that provide an inhibitory drive to the thalamo-cortical and cortical neurons thus favoring fastest delta oscillations remains to be established [14-19].

Finally, a puzzling result of the present work is that we failed to detect any drastic change in PS after the chemogenetic inhibition of MCH neurons. Similar negative results have been recently reported after optogenetic inhibition or cell-specific ablation of MCH neurons, whereas a suppression of PS was foreseen [3, 5, 8]. Without questioning the fact that activating MCH neurons facilitates PS onset and maintenance as reaffirmed here, this might raise the point of their actual function for and along natural PS during which these neurons fire maximally [2].

In conclusion, we have demonstrated using a chemogenetic approach that MCH neurons, when physiologically recruited, potentiate the termination of SWS episodes and increase the sleep depth, two physiological processes likely enhancing the probability for SWS to PS

alternation. We here propose that MCH neurons are crucially involved during SWS in basic mechanisms paving the way to PS onset, in addition to their certified role in PS maintenance.

References

1. Ahnaou, A., Drinkenburg, W.H., Bouwknecht, J.A., Alcazar, J., Steckler, T., and Dautzenberg, F.M. (2008). Blocking melanin-concentrating hormone MCH1 receptor affects rat sleep-wake architecture. *Eur J Pharmacol* 579, 177-188.
2. Hassani, O.K., Lee, M.G., and Jones, B.E. (2009). Melanin-concentrating hormone neurons discharge in a reciprocal manner to orexin neurons across the sleep-wake cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 2418-2422.
3. Jago, S., Glasgow, S.D., Herrera, C.G., Ekstrand, M., Reed, S.J., Boyce, R., Friedman, J., Burdakov, D., and Adamantidis, A.R. (2013). Optogenetic identification of a rapid eye movement sleep modulatory circuit in the hypothalamus. *Nat Neurosci* 16, 1637-1643.
4. Konadhode, R.R., Pelluru, D., Blanco-Centurion, C., Zayachkivsky, A., Liu, M., Uhde, T., Glen, W.B., Jr., van den Pol, A.N., Mulholland, P.J., and Shiromani, P.J. (2013). Optogenetic stimulation of MCH neurons increases sleep. *J Neurosci* 33, 10257-10263.
5. Tsunematsu, T., Ueno, T., Tabuchi, S., Inutsuka, A., Tanaka, K.F., Hasuwa, H., Kilduff, T.S., Terao, A., and Yamanaka, A. (2014). Optogenetic manipulation of activity and temporally controlled cell-specific ablation reveal a role for MCH neurons in sleep/wake regulation. *J Neurosci* 34, 6896-6909.
6. Verret, L., Goutagny, R., Fort, P., Cagnon, L., Salvert, D., Leger, L., Boissard, R., Salin, P., Peyron, C., and Luppi, P.H. (2003). A role of melanin-concentrating hormone producing neurons in the central regulation of paradoxical sleep. *BMC Neurosci* 4, 19.
7. Szymusiak, R.S. (2013). New insights into melanin concentrating hormone and sleep: a critical topics forum. *Sleep* 36, 1765-1766.
8. Varin, C., Arthaud, S., Salvert, D., Gay, N., Libourel, P.A., Luppi, P.H., Leger, L., and Fort, P. (2015). Sleep architecture and homeostasis in mice with partial ablation of melanin-concentrating hormone neurons. *Behav Brain Res* 298, 100-110.
9. Alexander, G.M., Rogan, S.C., Abbas, A.I., Armbruster, B.N., Pei, Y., Allen, J.A., Nonneman, R.J., Hartmann, J., Moy, S.S., Nicolelis, M.A., et al. (2009). Remote control of neuronal activity in transgenic mice expressing evolved G protein-coupled receptors. *Neuron* 63, 27-39.

10. Armbruster, B.N., Li, X., Pausch, M.H., Herlitze, S., and Roth, B.L. (2007). Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potently activated by an inert ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 5163-5168.
11. Krashes, M.J., Koda, S., Ye, C., Rogan, S.C., Adams, A.C., Cusher, D.S., Maratos-Flier, E., Roth, B.L., and Lowell, B.B. (2011). Rapid, reversible activation of AgRP neurons drives feeding behavior in mice. *J Clin Invest* *121*, 1424-1428.
12. Loffler, S., Korber, J., Nubbemeyer, U., and Fehsel, K. (2012). Comment on "Impaired respiratory and body temperature control upon acute serotonergic neuron inhibition". *Science* *337*, 646; author reply 646.
13. Hinze-Selch, D., Mullington, J., Orth, A., Lauer, C.J., and Pollmacher, T. (1997). Effects of clozapine on sleep: a longitudinal study. *Biol Psychiatry* *42*, 260-266.
14. Bittencourt, J.C. (2011). Anatomical organization of the melanin-concentrating hormone peptide family in the mammalian brain. *Gen Comp Endocrinol* *172*, 185-197.
15. Bittencourt, J.C., Presse, F., Arias, C., Peto, C., Vaughan, J., Nahon, J.L., Vale, W., and Sawchenko, P.E. (1992). The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. *J Comp Neurol* *319*, 218-245.
16. Amzica, F., and Steriade, M. (1998). Cellular substrates and laminar profile of sleep K-complex. *Neuroscience* *82*, 671-686.
17. Blethyn, K.L., Hughes, S.W., Toth, T.I., Cope, D.W., and Crunelli, V. (2006). Neuronal basis of the slow (<1 Hz) oscillation in neurons of the nucleus reticularis thalami in vitro. *J Neurosci* *26*, 2474-2486.
18. Crunelli, V., and Hughes, S.W. (2010). The slow (<1 Hz) rhythm of non-REM sleep: a dialogue between three cardinal oscillators. *Nat Neurosci* *13*, 9-17.
19. Zhu, L., Blethyn, K.L., Cope, D.W., Tsomaia, V., Crunelli, V., and Hughes, S.W. (2006). Nucleus- and species-specific properties of the slow (<1 Hz) sleep oscillation in thalamocortical neurons. *Neuroscience* *141*, 621-636.
20. Govindaiah, G., and Cox, C.L. (2006). Modulation of thalamic neuron excitability by orexins. *Neuropharmacology* *51*, 414-425.

Figure Legends

Figure 1. MCH neurons specifically express functional DREADD receptors

(A) Photomicrographs of coronal hypothalamic sections of Tg(*Pmch-cre*) mice expressing hM3dq or hM4di following *in situ* injections of corresponding Cre-dependent AAVs double immunostained for MCH (green) and mCherry (fluorescent reporter; red).

(B) Higher magnification photomicrographs of the same sections (boxes in A) illustrating that a high percentage of MCH neurons express mCherry (as colored in yellow on overlay) and thus hM3dq or hM4di DREADD receptors.

(C) High magnification photomicrographs of adjacent sections from the same animals double immunolabeled for orexin (green) and mCherry (red) illustrating that orexin-immunofluorescent neurons did not express hM3dq or hM4di DREADD receptors.

(D) Effects of bath-applied CNO (10 μ M) on the membrane potential of representative hM3dq- (upper panel) or hM4di-expressing (lower panel) MCH neurons recorded in patch-clamp configuration from acute brain slices. Note that CNO induced a reversible activation (depolarization and firing increase) in hM3dq-expressing neurons and a reversible inhibition (hyperpolarization and firing cessation) in hM4di-expressing neurons.

(E) Coronal hypothalamic sections from two representative hM3dq-transfected mice injected with Veh. (upper panels) or CNO (lower panels) 120 min prior perfusion that were processed for simultaneous c-Fos (nuclei colored in black) and MCH (cytoplasms colored in brown) immunostaining. As evidenced at high magnification (box), numerous MCH neurons express early gene c-Fos after the CNO treatment indicating that hM3dq DREADD receptors in MCH neurons are functional.

Figure 2. Pharmacogenetic modulation of MCH neurons alters PS and SWS amounts

(A) PS amounts (upper panels) and changes in PS amounts relative to Veh. (lower panels) during the first 3-h (8–11 am) following CNO treatments in hM3dq-expressing mice (n = 10; green; left panels) (two-way ANOVA with 1-factor repetition: CNO doses, $F(3,52) = 4.46$, $p < 0.01$; Ctrl/hM3dq, $F(1,17) = 0.88$, $p = 0.36$; interaction, $F(3,52) = 2.90$, $p < 0.05$; Dunnett's post-hoc test vs. Veh.: * $p < 0.05$; post-hoc test vs. Ctrl mice: # $p < 0.05$), and in hM4di-expressing mice (n = 9; red; right panels) (two-way ANOVA with 1-factor repetition: CNO doses, $F(3,41) = 28.87$, $p < 0.001$; Ctrl/hM4di, $F(1,15) = 0.07$, $p = 0.93$; interaction, $F(3,41) = 0.96$, $p = 0.42$; Dunnett's post-hoc test vs. Veh.: *** $p < 0.001$; post-hoc test vs. Ctrl mice: # $p < 0.05$) compared to respective Ctrl mice (n = 10; blue).

(B) SWS amounts (upper panels) and changes in SWS amounts relative to Veh. (lower panels) during the first 3-h (8–11 am) following CNO treatments in hM3dq-expressing mice (n = 10; green; left panels) (two-way ANOVA with 1-factor repetition: CNO doses, $F(3,52) = 2.24$, $p = 0.09$; Ctrl/hM3dq, $F(1,17) = 7.35$, $p < 0.05$; interaction, $F(3,52) = 3.13$, $p < 0.05$; Dunnett's post-hoc test vs. Veh.: * $p < 0.05$; post-hoc test vs. Ctrl mice: # $p < 0.05$), and in hM4di-expressing mice (n = 9; red; right panels) (two-way ANOVA with 1-factor repetition: CNO doses, $F(3,41) = 19.59$, $p < 0.001$; Ctrl/hM3dq, $F(1,15) = 0.28$, $p = 0.60$; interaction, $F(3,41) = 4.64$, $p < 0.01$; Dunnett's post-hoc test vs. Veh.: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; post-hoc test vs. Ctrl mice: # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$) compared to respective Ctrl mice (n = 10; blue).

In all graphs, individual data for each mouse are displayed (lines and dots; light colors) and averaged data are represented as mean \pm SEM (bars).

See also Figure S1.

Figure 3. MCH neurons contribute to PS promotion and maintenance

(A) Changes in the number of PS bouts relative to Veh. during the first 3-h following CNO treatments in hM4di (n = 9; red) compared to Ctrl mice (n = 10; blue) (two-way ANOVA with 1-factor repetition: CNO doses, $F(3,41) = 28.66$, $p < 0.001$; Ctrl/hM4di, $F(1,15) = 0.90$, $p = 0.36$; interaction, $F(3,41) = 2.81$, $p = 0.05$; Dunnett's post-hoc test vs. Veh.: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; post-hoc test vs. Ctrl mice: # $p < 0.05$).

(B) Changes in the transition probability relative to Veh. during the first 3-h following CNO treatments in the same sample of hM4di and Ctrl mice as in A (two-way ANOVA with 1-factor repetition: CNO doses, $F(3,41) = 9.75$, $p < 0.001$; Ctrl/hM4di, $F(1,15) = 4.50$, $p = 0.05$; interaction, $F(3,41) = 2.76$, $p = 0.05$; Dunnett's post-hoc test vs. Veh.: * $p < 0.05$; post-hoc test vs. Ctrl mice: # $p < 0.05$).

(C) Changes in PS latency normalized to Veh. following CNO treatments at light onset in hM3dq-expressing mice (n = 10; green) and Ctrl mice (n = 10; blue) (two-way ANOVA with 1-factor repetition: CNO doses, $F(3,52) = 9.22$, $p < 0.001$; Ctrl/hM3dq, $F(1,17) = 10.49$, $p < 0.01$; interaction, $F(3,52) = 6.24$, $p < 0.01$; Dunnett's post-hoc test vs. Veh.: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; post-hoc test vs. Ctrl mice: # $p < 0.05$).

(D) Changes in the mean duration of PS episodes relative to Veh. during the first 3-h after CNO treatments in the same sample of hM3dq and Ctrl mice as in C (two-way ANOVA with 1-factor repetition: CNO doses, $F(3,52) = 8.76$, $p < 0.001$; Ctrl/hM3dq, $F(1,17) = 3.24$,

$p = 0.09$; interaction, $F(3,52) = 3.32$, $p < 0.05$; Dunnett's post-hoc test *vs.* Veh.: ** $p < 0.01$; post-hoc test *vs.* Ctrl mice: ## $p < 0.01$).

In all graphs, individual data for each mouse are displayed (lines and dots; light colors) and averaged data are represented as mean \pm SEM (bars).

See also Figure S2.

Figure 4. The termination of SWS bouts and EEG rhythmic activities during SWS are modulated by the MCH neurons.

(A) No changes in the number of SWS episodes relative to Veh. were detected during the first 3-h following CNO treatments in hM3dq ($n = 10$; green; left panel) (two-way ANOVA with 1-factor repetition: CNO doses, $F(3,52) = 4.63$, $p < 0.01$; Ctrl/hM3dq, $F(1,17) = 0.86$, $p = 0.38$; interaction, $F(3,52) = 0.72$, $p = 0.54$; Dunnett's post-hoc test *vs.* Veh.: * $p < 0.05$; post-hoc test *vs.* Ctrl mice: # $p < 0.05$), and in hM4di mice ($n = 10$; red; right panel) (two-way ANOVA with 1-factor repetition: CNO doses, $F(3,41) = 23.88$, $p < 0.001$; Ctrl/hM4di, $F(1,15) = 0.81$, $p = 0.38$; interaction, $F(3,41) = 0.23$, $p = 0.88$; Dunnett's post-hoc test *vs.* Veh.: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; post-hoc test *vs.* Ctrl mice: # $p < 0.05$) compared to respective Ctrl mice ($n = 10$; blue).

(B) Mean SWS bout duration (upper panels) and changes in SWS bout duration relative to Veh. (lower panels) during the first 3-h following CNO treatments in hM3dq-expressing mice ($n = 10$; green; left panels) (two-way ANOVA with 1-factor repetition: CNO doses, $F(3,52) = 9.81$, $p < 0.001$; Ctrl/hM3dq, $F(1,17) = 0.55$, $p = 0.47$; interaction, $F(3,52) = 10.65$, $p < 0.001$; Dunnett's post-hoc test *vs.* Veh.: * $p < 0.05$; post-hoc test *vs.* Ctrl mice: # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$), and in hM4di-expressing mice ($n = 9$; red; right panels) (two-way ANOVA with 1-factor repetition: CNO doses, $F(3,41) = 44.92$, $p < 0.001$; Ctrl/hM4di, $F(1,15) = 1.81$, $p = 0.21$; interaction, $F(3,41) = 6.975$, $p < 0.001$; Dunnett's post-hoc test *vs.* Veh.: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$; post-hoc test *vs.* Ctrl mice: # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$) compared to respective Ctrl mice ($n = 10$; blue).

In A and B, individual data for each mouse are displayed (lines and dots; light colors) and averaged data are represented as mean \pm SEM (bars).

(C) Changes in the frontal EEG power spectral densities during SWS relative to Veh. (hatched horizontal line) over the first 2-h following CNO treatments in hM3dq-expressing mice (upper panel; $n = 6$; green) and hM4di-expressing mice (lower panel; $n = 8$; red). Note that spectral densities across the delta band are affected in a reciprocal manner when activating or inhibiting MCH neurons. The horizontal lines above graphs denote significant

differences between CNO treatments and Veh. injections. Spectral data for individual doses of CNO tested are represented as mean (lines) \pm SEM (light colors)

See also Figure S3.

Figure 1

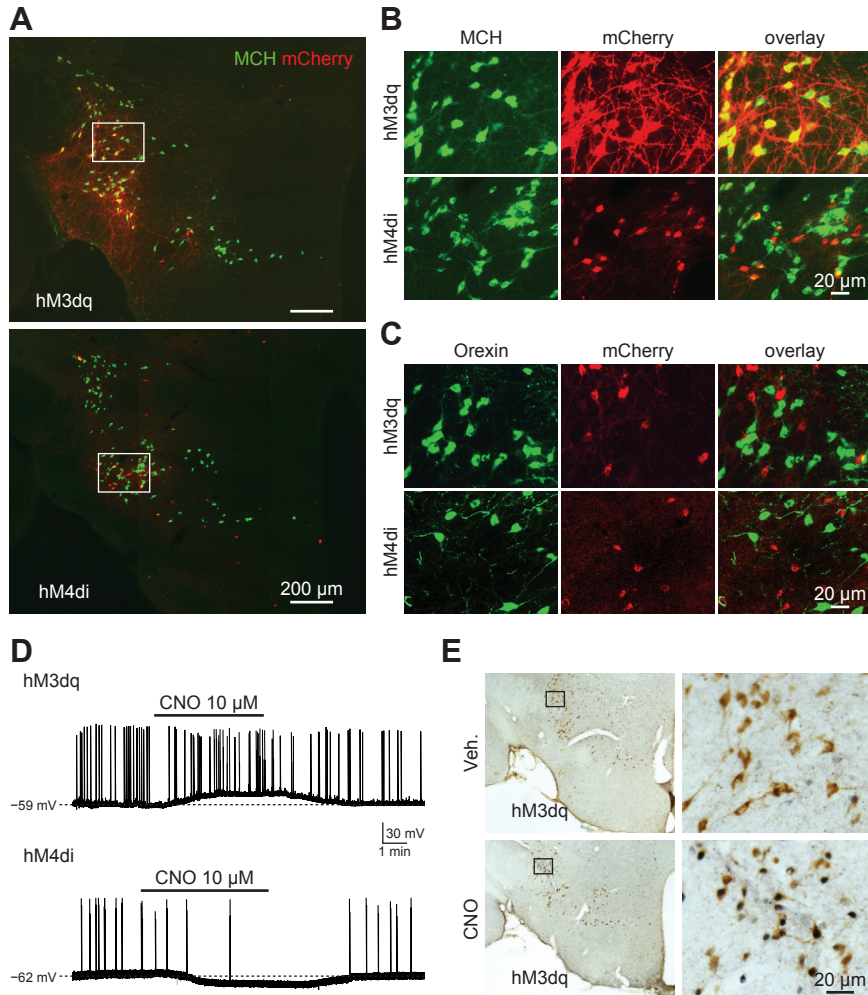


Figure 2

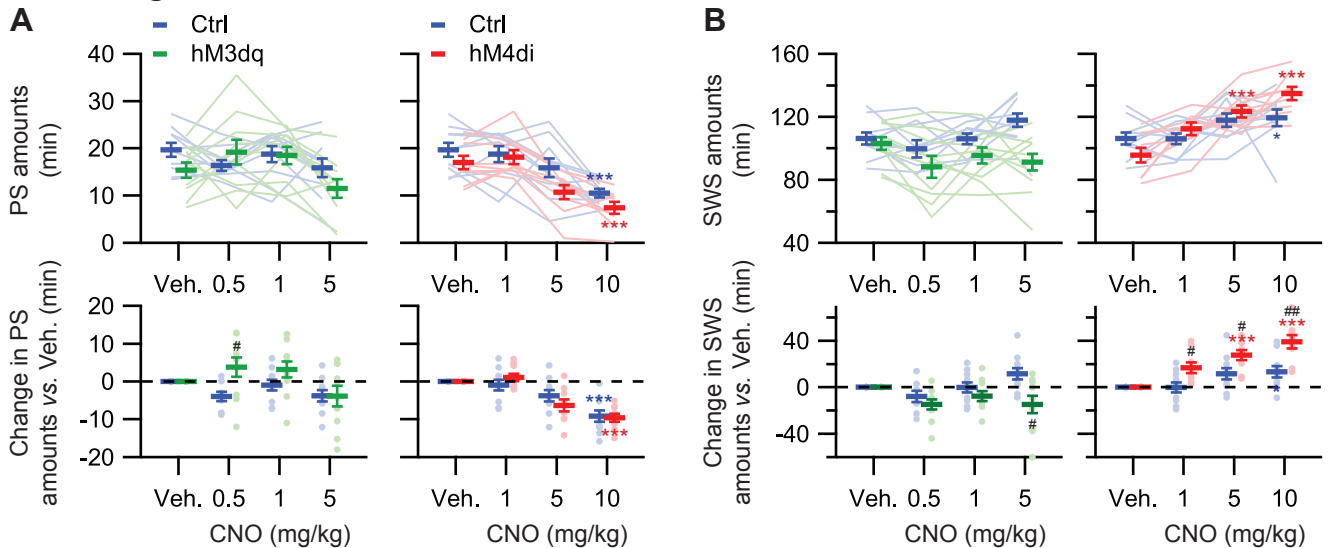


Figure 3

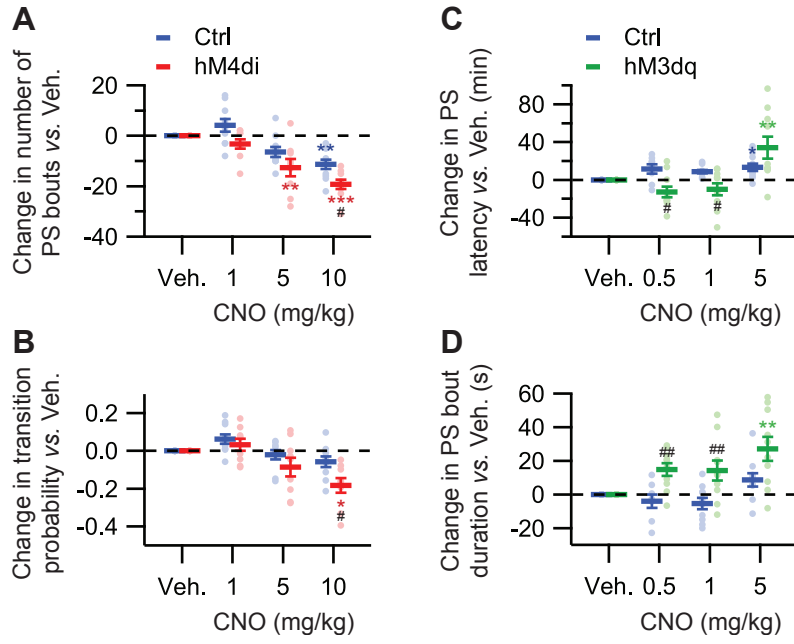
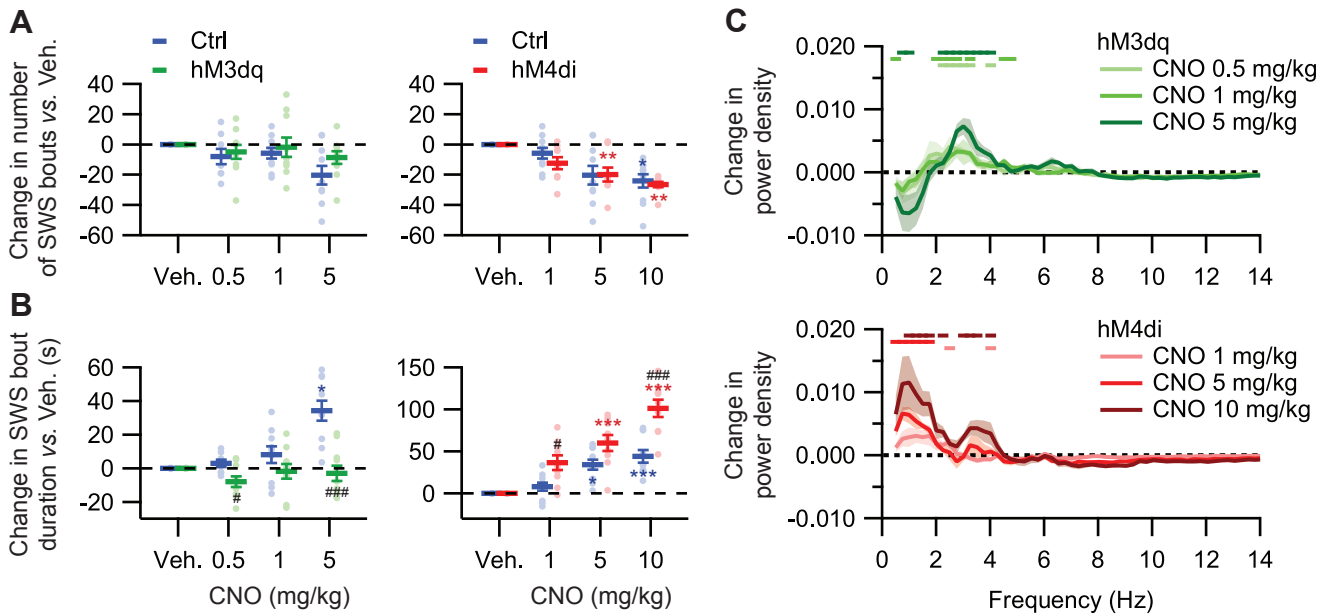


Figure 4



Supplemental Figures

Figure S1. Nonspecific effects on sleep of CNO when administered to Ctrl mice (related to Figure 2)

(A) CNO dose-dependently increases SWS amounts ($n = 10$; one-way repeated measures ANOVA: $F(4,34) = 4.67$, $p < 0.01$; Dunnett's post-hoc test *vs.* Veh.: ** $p < 0.01$) and decreases PS amounts (one-way repeated measures ANOVA: $F(4,34) = 14.49$, $p < 0.001$; Dunnett's post-hoc test *vs.* Veh.: *** $p < 0.001$) during the first 3-h (8–11 h) post-treatments.

(B) The number of SWS and PS episodes are both decreased by CNO administration (one-way repeated measures ANOVA: SWS, $F(4,34) = 7.14$, $p < 0.001$; PS, $F(4,34) = 8.37$, $p < 0.001$; Dunnett's post-hoc test *vs.* Veh.: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

(C) CNO dose-dependently increases the mean duration of SWS episodes (one-way repeated measures ANOVA: $F(4,34) = 19.83$, $p < 0.001$; Dunnett's post-hoc test *vs.* Veh.: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$). The mean duration of PS episodes remains unaffected (one-way repeated measures ANOVA: $F(4,34) = 1.16$, $p = 0.35$).

(D) CNO treatments do not affect the SWS latency (one-way repeated measures ANOVA: $F(4,34) = 0.96$, $p = 0.44$). In contrast, CNO dose-dependently extends the PS latency (one-way repeated measures ANOVA: $F(4,34) = 9.93$, $p < 0.001$; Dunnett's post-hoc test *vs.* Veh.: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$).

In all panels, individual data for each mouse are displayed (lines; light blue) and averaged data are represented as mean \pm SEM (bars; dark blue).

Figure S2. Complements on changes in PS-related parameters following acute and reversible excitation or inhibition of MCH neurons (related to Figure 3).

(A–B) Changes induced by CNO *vs.* Veh. treatments in the number of PS episodes (A) and in the transition probability from SWS to PS (B) in hM3dq mice ($n = 10$; green) compared to Ctrl animals ($n = 10$; blue) (two-way ANOVA with 1-factor repetition: CNO doses, $F(3,52) = 9.12$, $p < 0.001$; Ctrl/hM3dq, $F(1,17) = 3.31$, $p = 0.08$; interaction, $F(3,52) = 1.039$, $p = 0.38$ for the number of PS episodes; CNO doses, $F(3,52) = 6.44$, $p < 0.001$; Ctrl/hM3dq, $F(1,17) = 2.52$, $p = 0.10$; interaction, $F(3,52) = 2.13$, $p = 0.11$ for the transition probability; Dunnett's post-hoc test *vs.* Veh.: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$).

(C–D) Changes in the PS latency (C) and mean duration of PS bouts (D) during the first 3-h following CNO treatments relative to Veh. in hM4di mice ($n = 9$; red) compared to Ctrl animals ($n = 10$; blue) (two-way ANOVA with 1-factor repetition: CNO doses, $F(3,41) = 14.60$, $p < 0.001$; Ctrl/hM4di, $F(1,15) = 2.07$, $p = 0.17$; interaction, $F(3,41) = 0.07$, $p = 0.98$ for PS latencies; CNO doses, $F(3,41) = 1.76$, $p = 0.17$; Ctrl/hM3dq, $F(1,15) = 3.53$, $p = 0.08$; interaction, $F(3,52) = 1.80$, $p = 0.16$ for PS bout duration; Dunnett's post-hoc test *vs.* Veh.: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

(E) Power densities obtained from parietal EEG recordings and calculated from PS bouts during the first 2-h following CNO or Veh. injections in hM3dq (upper panel; $n = 6$) or hM4di mice (lower panel; $n = 9$). No significant change was detected whether MCH neurons were activated or inhibited. Spectral data for individual doses of CNO tested are represented as mean (lines) \pm SEM (light colors)

(F–I) Effects of CNO injections at light offset in hM3dq mice ($n = 10$) on the PS amounts (F; Friedman test: $\chi^2 = 20.02$, $p < 0.001$), the number of PS episodes (G; Friedman test: $\chi^2 = 20.67$, $p < 0.001$), the mean duration of

PS episodes (H; Kruskal-Wallis test: $\chi^2 = 9.60$, $p < 0.05$) and the PS latency (I; Friedman test: $\chi^2 = 15.92$, $p < 0.01$) over the first 3-h (8–11 pm) following treatments.

(J–K) The inhibition of MCH neurons by CNO in hM4di mice ($n = 6$) did not affect PS amounts (J; Friedman test: $\chi^2 = 6.36$, $p = 0.10$) and the number of PS episodes (K; Friedman test: $\chi^2 = 5.68$, $p = 0.13$).

In panels A–D and F–K, individual data for each mouse are displayed (dots; light colors) and averaged data are represented as mean \pm SEM (bars).

Figure S3. Modulating the activity of MCH neurons affects EEG oscillatory activity within the delta band during SWS (related to Figure 4).

(A–C) Examples of frontal EEG signals recorded during SWS after CNO or Veh. treatments in representative Ctrl (A), hM3dq (B) and hM4di (C) mice.

(D–F) Corresponding power spectral densities during SWS computed over the first 2-h following CNO and Veh. treatments in the Ctrl (D; $n = 8$), hM3dq (E; $n = 6$) or hM4di (F; $n = 8$) mice. Spectral data for individual doses of CNO tested are represented as mean (lines) \pm SEM (light colors).

(G) Changes in power induced by CNO treatments (relative to Veh.) integrated over the entire delta band (0.5–4 Hz; left), the slowest half (0.5–2 Hz; middle) and the fastest half (2.2–4 Hz; right) of the delta band in hM3dq (green) and hM4di (red) compared to Ctrl mice (blue) (two-way ANOVA with 1-factor repetition: CNO doses, $F(4,76) = 11.42$, $p < 0.001$; Ctrl/hM3dq/hM4di, $F(2,22) = 1.88$, $p = 0.18$; interaction, $F(6,76) = 3.27$, $p < 0.01$; Dunnett's post-hoc test vs. Veh.: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ and post-hoc test vs. Ctrl mice: # $p < 0.05$).

In panel G, individual data for each mouse are also displayed (dots) and averaged data are represented as mean \pm SEM (bars).

Figure S1

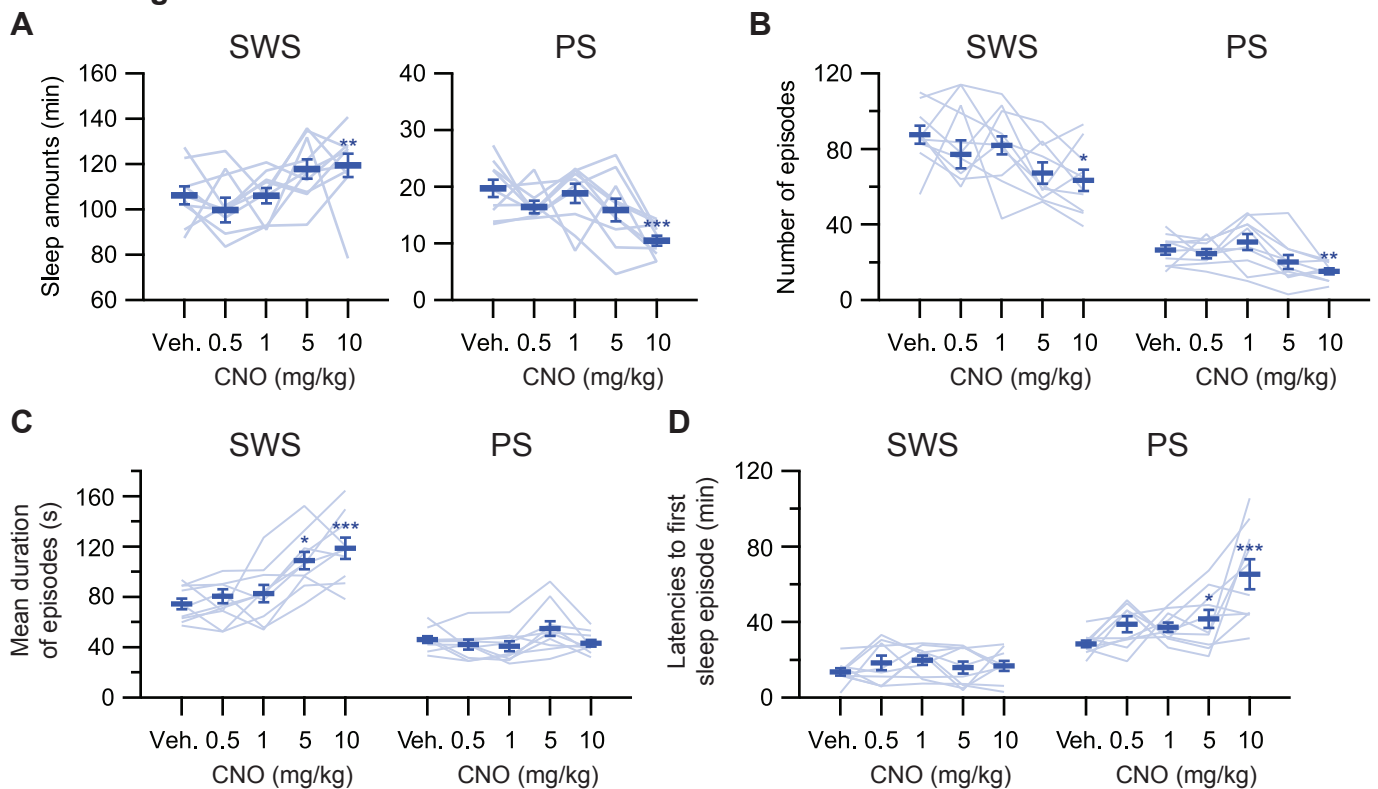


Figure S2

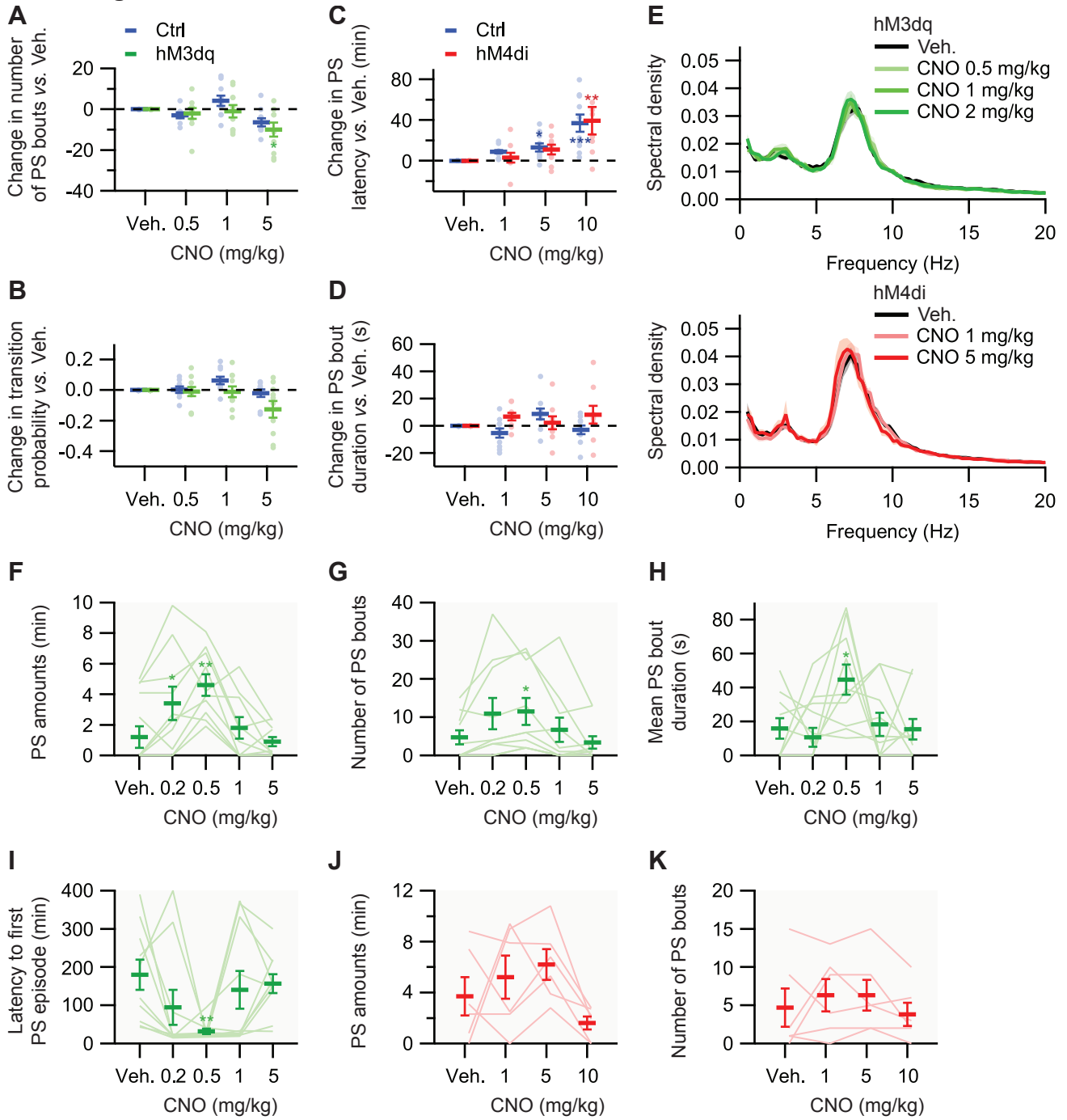
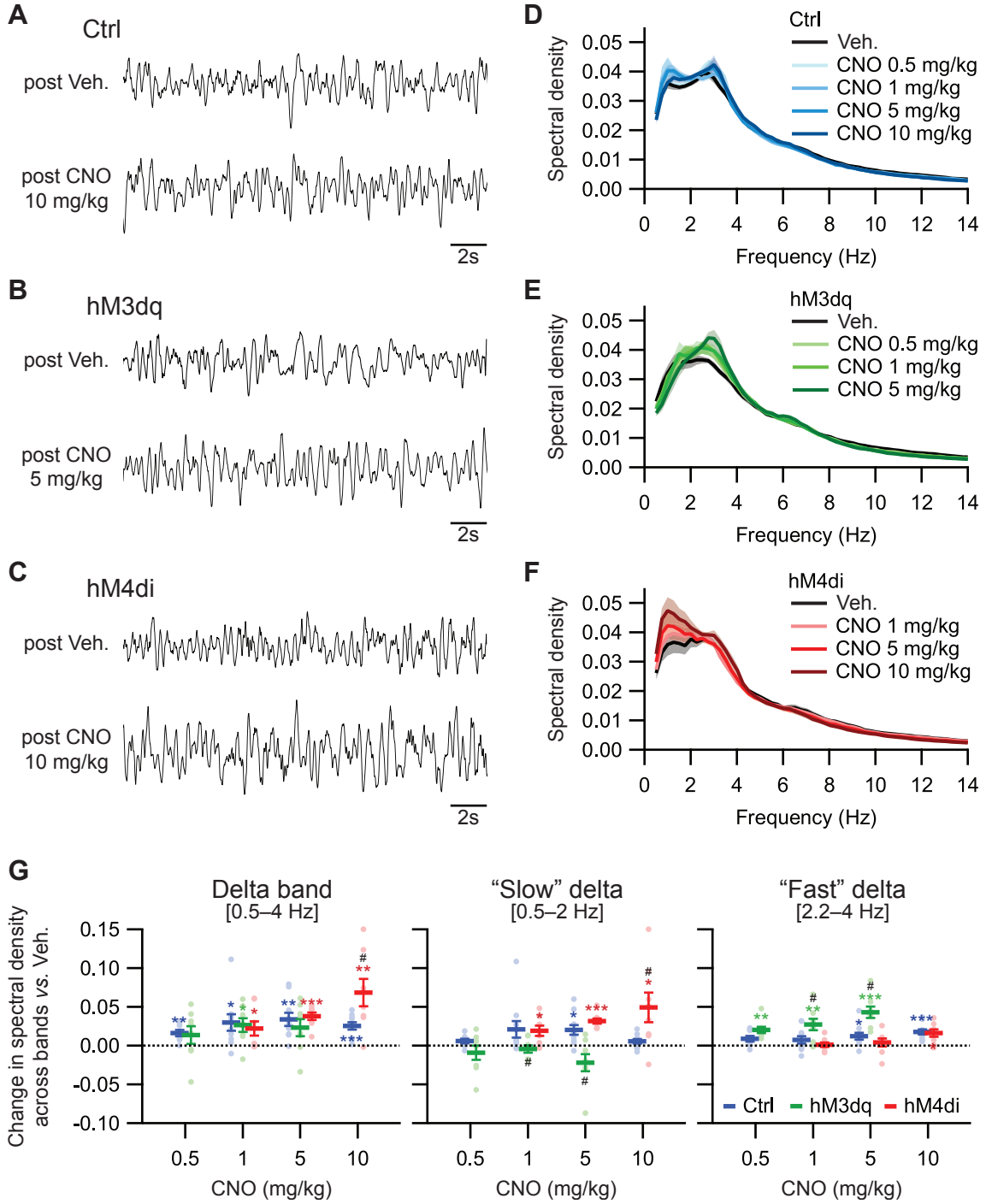


Figure S3



Supplemental Experimental Procedures

Animals

Experiments were carried out in strict accordance with the European Union directive 2010/63/EU and recommendations in the guide for the Care and Use of laboratory Animal of the National Institutes of Health (NIH publication n° 85–23). Protocols were approved by the Ethics Research Committee of Claude Bernard University-Lyon1 (C2EA-42; DR2014-39). The mouse strain used for this research project, STOCK Tg(Pmch-cre)KY133Gsat/Mmucd, identification number 034699-UCD, was obtained from the Mutant Mouse Regional Resource Center, a NCRR-NIH funded strain repository, and was donated to the MMRRC by the NINDS funded GENSAT BAC transgenic project. Heterozygous Tg(Pmch-cre) mice were maintained under a C57BL/6 genetic background. For breeding within the local “ALECS conventionnel” animal facility, mice were housed in a temperature-controlled room exposed to a standard 12 h/12 h light-dark cycle (light on at 8 am). Founders and subsequent offspring were genotyped by PCR amplification of genomic DNA using the following primer sets (Eurofins Scientific, France): forward, GAT CTC CGG TAT TGA AAC TCC AGC; reverse, GCT AAA CAT GCT TCA TCG TCG G. Once genotyped, mice were weaned at 3–4 weeks of age, grouped and housed according to gender with *ad libitum* access to food and water. Male Tg(Pmch-cre) mice were used for sleep recordings and both sexes were used for *in vitro* electrophysiological recordings.

Vectors production

Adeno-associated virus (AAV) vectors were produced using the AAV Helper-Free System (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) and purified as previously described [S1]. HEK293 cells were transfected with a pAAV vector plasmid including a gene of interest, pHelper, and pAAV-RC (serotype 10; Penn Vector Core) using a standard calcium phosphate method. After three days, the transfected cells were collected and suspended in ACSF that contained the following (in mM): 124 NaCl, 3 KCl, 26 NaHCO₃, 2 CaCl₂, 1 MgSO₄, 1.25 KH₂PO₄, and 10 D-Glucose. After 4 freeze-thaw cycles, the cell lysate was treated with benzonase nuclease (Merck, Darmstadt, Germany) at 45 °C for 15 min, and centrifuged 2 times during 10 min at 16,000 g. The supernatant was used as the virus-containing solution. The titer of purified virus was measured by quantitative PCR after dissolution in ACSF. The virus-containing solution was stored at –80 °C in aliquots until use. The pAAV-hSyn-DIO-hM3Dq-mCherry and pAAV-hSyn-DIO-hM4di-mCherry plasmids were purchased from Addgene (ID: 44361 and 44362, respectively).

Surgical preparation of animals

Male Tg(Pmch-cre) (8 to 10 weeks old) were anesthetized by an intraperitoneal (i.p.) injection with a mixture of ketamine and xylazine (100 mg/kg and 10 mg/kg; Ceva Santé Animale, France) and placed on a stereotaxic frame (David Kopf Instruments, USA). First, viral vectors were bilaterally infused (800 nL at 50 nL/min) under stereotaxic control in the tuberal hypothalamus (AP: –1.50 mm; ML: ±0.95 mm; DV: –5.35 mm relative to Bregma) through a cannula connected to a Hamilton syringe (10 µL) placed in a syringe pump (UMP3; World Precision Instruments Inc., USA). Cannula was lowered into the brain and left in place for 5 min before infusion and 10 min after infusion. Following viral vector administration, mice were prepared for polysomnographic

recordings as previously described [S2]. Two stainless steel screws were inserted into the skull above the right parietal (1.7 mm lateral to midline and 2.5 mm posterior to Bregma) and frontal (1.1 mm lateral to midline and 1.5 mm anterior to Bregma) cortices; a third reference electrode was fixed above the cerebellum (1 mm lateral to midline and 5 mm posterior to Bregma). Two wire electrodes ending by a gold-coated tin drop (about 1 mm diameter, AlphaWire, UK) were inserted in between neck muscles for a differential EMG recording. All electrodes were connected into a miniature pedestal (Plastics One, Bilaney, Germany) and fixed to the skull with Super-Bond (C&B, Sun Medical Co. Ltd, Japan) and dental cement (Paladur, Heraeus Kuzler, Germany). At the end of surgery, Carprofen (5 mg/kg) was subcutaneously administered for pain caring. Hereafter, mice were housed in individual Plexiglas barrels (diameter 25 cm; height 40 cm) with woodchip bedding and *ad libitum* access to standard rodent food pellets (Extra Labo, France).

***Ex vivo* electrophysiology**

In preparation for electrophysiological *ex vivo* recordings, brain slices containing the tuberal hypothalamus were obtained from 8 to 12 weeks old Tg(*Pmch-cre*) mice that received viral vector injections in the tuberal hypothalamus at least 3 weeks before use. All experiments were performed during the light period. Animals were deeply anesthetized (sodium pentobarbital, 150 mg/kg, i.p., Ceva Santé Animale, France) and transcardially perfused with ice-cold sucrose ACSF that contained the following (in mM): 2.5 KCl, 0.5 CaCl₂, 25 NaHCO₃, 1.2 NaH₂PO₄, 10 MgSO₄, 25 D-glucose, and 185 sucrose (pH 7.35). The animals were decapitated and brains were quickly removed. Coronal slices (300 μ m thick) were cut with a vibrating microtome in the same ice-cold ACSF. Slices were subsequently transferred to a chamber containing warm (~33 °C) ACSF containing the following (in mM): 130 NaCl, 5 KCl, 2.4 CaCl₂, 20 NaHCO₃, 1.25 KH₂PO₄, 1.3 MgSO₄, 10 D-glucose, 15 sucrose, and 1 kynurenate (pH 7.35) and constantly oxygenated (95% O₂/5% CO₂). Slices were left to recover for at least 30 min before transfer to the recording chamber in oxygenated ACSF at room temperature. Individual slices were then transferred to a thermoregulated (32.5 °C) chamber (Badcontroller V; Luigs & Neumann, Germany), placed under a microscope (Axioscop2; Zeiss, Germany) equipped with an infrared CCD camera (Hamamatsu, Japan). Slices were maintained immersed and continuously superfused at 3–5 ml/min with oxygenated kynurenate-free ACSF. All electrophysiological experiments were performed with an Axopatch 200B (Molecular Devices, USA) amplifier connected to an acquisition board (Digidata 1200B; Molecular Devices) attached to a computer running pCLAMP software (Molecular Devices).

Whole-cell patch-clamp recordings were performed with patch-clamp pipettes (3–6 M Ω) filled with 8 μ l of internal solution containing the following (in mM): 144 K-gluconate, 3 MgCl₂, 0.2 EGTA, 10 HEPES (pH 7.2, 285–295 mOsm). The pipette was slowly brought to on the selected neuron to be recorded in whole-cell configuration using infrared videomicroscopy guidance and clamped at –60 mV. During whole-cell patch-clamp recordings, the intrinsic membrane properties of neurons were assessed by applying current steps (800 ms) from –100 pA to firing saturation in 10 pA increments.

Drugs and administration

For *ex vivo* electrophysiology, clozapine N-oxide (CNO; C0832, Sigma-Aldrich) was freshly dissolved before each recording session in ACSF at 10 μ M from stock solutions of CNO (10 mM; DMSO) that were stored as frozen aliquots at -20°C .

For *in vivo* polysomnographic recordings, CNO was dissolved in 0.9% saline (vehicle, Veh.) and i.p. administered in volumes of 5 ml/kg. Mice received CNO or Veh. injections in randomized order. Five doses of CNO were used: 0.2 mg/kg, 0.5 mg/kg, 1 mg/kg, 5 mg/kg and 10 mg/kg. Before the beginning of polysomnographic recordings, mice were handled every day during 10 min and habituated to injections during at least 7 days.

Sleep recordings

After 7 days of post-surgical recovery, mice in their home barrel were transferred to an insulated soundproof box maintained under the standard laboratory conditions: a 12 h/12 h light-dark cycle (lights on at 8 am) and $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Mice were connected to a cable plugged to a rotating connector (Plastics One, Bilaney, Germany) to allow free movements. After 3 days of habituation to the recording environment, mice were continuously recorded and received pharmacological i.p. treatments spaced by at least 48 h. Unipolar EEG and bipolar EMG signals were amplified (MCP+, Alpha-Omega Engineering, Israel), analog-to-digital converted with a sampling rate of 520.8 Hz and collected on a computer *via* a CED-1401 Plus interface with Spike2 software (Cambridge Electronic design, CED, UK).

Data analysis

Animals behavioral states were scored by 5 s epochs and classified as waking, slow-wave sleep (SWS) and paradoxical sleep (PS) based on the visual inspection of EEG/EMG signals. During waking, activated low-amplitude EEG is accompanied by a sustained EMG activity with phasic bursts. SWS is characterized by high voltage EEG slow waves, spindles and the disappearance of phasic muscle activity. Paradoxical sleep (PS) is characterized by a decrease in the EEG amplitude associated with a flat EMG (muscle atonia) and a regular and pronounced theta rhythm. Hypnograms were then drawn using a custom script in Spike2 (CED, UK). Standard parameters for each vigilance state (amounts, numbers of bouts, mean durations of episodes and latencies) were computed over the first three hours following each treatment.

Spectral analysis of EEG signals was performed using a fast Fourier transform (0.1 Hz resolution) on 5-s artifact-free epochs. Spectra were subsequently normalized by the power over the entire frequency range (0.5–45 Hz) and the mean power spectrum density was calculated for each vigilance state for each animal. EEG spectral power densities were also computed across the following bands: delta [0.5–4 Hz]; theta [4.2–9 Hz]; alpha [9.2–12 Hz]; beta [12.2–30 Hz].

Immunohistochemistry

After the end of polysomnographic recordings all the mice were perfused to control transfection sites as well as the specificity and efficiency of transfection. Animals with unilateral injection or insufficient spreading of transfection were discarded from this study. Additionally a subset of Tg(*Pmch-cre*) mice that were transfected with AAV₁₀-hSyn-DIO-hM3dq-mCherry received a final CNO (1 mg/kg) or Veh. injection (n = 3 per condition)

at 8 am and was perfused 120 min later to evaluate c-Fos expression in hM3dq-expressing MCH neurons. Briefly, mice were deeply anesthetized (sodium pentobarbital, 150 mg/kg, i.p., Ceva Santé Animale, France) and then transcardially perfused with Ringer's lactate solution containing 0.1% heparin followed by 50 ml of an ice-cold fixative composed of 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4). Brains were postfixed for 24 h at 4 °C in the same fixative, dipped in PB containing 30% sucrose for 2 days and finally frozen in methyl-butane cooled with dry ice. Brain free-floating coronal sections (30 μ m-thick) were obtained using a cryostat, collected in PBS with 0.03% Triton X100 (PBST) and stored until use in the same buffer containing 0.1% sodium azide (PBST-Az).

The dual immunodetection of MCH and mCherry was performed by incubation of hypothalamic sections in rabbit anti-MCH (1:20,000; Abcam, UK) and rat anti-mCherry (1:50,000; Invitrogen, USA) antibodies in PBST-Az for 3 days at 4 °C. After three rinses in PBST, revelation was performed using donkey anti-rabbit Alexa 488 and goat anti-rat Alexa 568 (1:500 each; Invitrogen) fluorescent secondary antibodies in PBST at room temperature during 120 min. Immunodetection of orexin neurons was performed as described above using goat anti-orexin-A (1:2,000; PBST-Az; Santa Cruz, USA) and donkey anti-goat Alexa 488 (1:500; PBST; Invitrogen) as primary and secondary antibodies, respectively. The sections were finally mounted on glass gelatin-coated slides and coverslipped with Fluoromount (SouthernBiotech, USA)

The dual immunodetection of MCH and c-Fos was obtained by sequential incubations of the free-floating sections in (1) a rabbit anti-c-Fos antiserum (1:8,000; Merck, USA) in PBST-Az for 3 days at 4 °C, (2) a biotinylated goat anti-rabbit IgG (1:1,000; Vector Laboratories, UK) for 90 min at room temperature, (3) an ABC-HRP complex (1:1,000; Elite kit; Vector Labs) for 90 min at room temperature. The sections were then immersed in (4) 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 7.6, containing 0.025% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; Sigma-Aldrich, France), 0.003% H₂O₂, and 0.6% nickel ammonium sulfate for 20 min at room temperature. Three 10 min washes were performed between each incubation step. The staining appeared as a dense black nuclear coloration of c-Fos-immunoreactive neurons. After extensive rinses, pretreated sections were incubated with (5) rabbit anti-MCH (1:50,000, Phoenix Pharmaceuticals, USA) for 72 h at 4 °C, (6) biotinylated anti-rabbit IgG (1:1,000 in PBST; Vector Labs) for 90 min at room temperature, (7) an ABC-HRP complex (1:1,000 in PBST) for 90 min at room temperature, and (8) 0.05 M Tris-HCl buffer containing 0.025% 3,3'-diaminobenzidine-4 HCl and 0.003% H₂O₂ for 20 min. The cytoplasm and primary dendrites of MCH neurons were colored in orange-brown.

Counting procedure was conducted as follow: labeled sections evenly spaced throughout the extent of the lateral hypothalamus (4 sections per mouse) were analyzed with an Axioskop 2 microscope (Zeiss, Germany) equipped with a motorized X-Y-sensitive stage and a video camera connected to a computerized image analysis system (ExploraNova, France). Labeled neurons were bilaterally plotted and automatically counted using Mercator v.2 software (ExploraNova). Photomicrographs were taken with a CCD Color 10-bit QiCam camera, imported into Adobe Photoshop 10, digitally adjusted for brightness and contrast, and were assembled into plates at a resolution of 300 dpi.

Statistics

Statistical significance was set at 0.05 for all procedures detailed below. The effects of CNO application on neuronal activity recorded *ex vivo* were tested with non-parametric Friedman tests (baseline vs. CNO application

vs. washout) followed by *post-hoc* Wilcoxon tests to detect pairwise differences. Differences in c-Fos staining in MCH neurons after Veh. or CNO treatments were evaluated using non-parametric Mann-Whitney tests. Regarding polysomnographic recordings and prior to any further analyses, sleep data obtained following Veh. injections were compared between the three groups of mice (i.e. hM3dq, hM4di and Ctrl) using one-way ANOVA to assess homogeneity between groups (e.g. SWS amounts, $F(2,26) = 1.60$, $p = 0.220$; PS amounts, $F(2,26) = 2.07$, $p = 0.147$; wake amounts, $F(2,26) = 1.59$, $p = 0.223$). Then, sleep parameters obtained after CNO treatments at 8 am were compared using repeated measures ANOVA followed by Dunnett's *post-hoc* tests to compare within each group paired differences between CNO vs. Veh. treatments and *post-hoc* tests to compare the effects of CNO treatments vs. Veh. between the different groups of mice. Sleep parameters computed from injections performed at 8 pm never met normality or sphericity assumptions and were compared using Friedman test followed by Wilcoxon tests to detect pairwise differences between treatments. Moreover, because the mean duration of SWS or PS bouts can be unobserved in some animals in the beginning of the dark period, these parameters were compared using Kruskal-Wallis test followed by post-hoc Mann-Whitney tests. Spectral densities were compared across pharmacological treatments using Wilcoxon tests and across genotypes using Mann-Whitney tests both corrected for multiple comparisons.

Supplemental References

- S1. Lazarus, M., Shen, H.Y., Cherasse, Y., Qu, W.M., Huang, Z.L., Bass, C.E., Winsky-Sommerer, R., Semba, K., Fredholm, B.B., Boison, D., et al. (2011). Arousal effect of caffeine depends on adenosine A2A receptors in the shell of the nucleus accumbens. *J Neurosci* 31, 10067-10075.
- S2. Arthaud, S., Varin, C., Gay, N., Libourel, P.A., Chauveau, F., Fort, P., Luppi, P.H., and Peyron, C. (2015). Paradoxical (REM) sleep deprivation in mice using the small-platforms-over-water method: polysomnographic analyses and melanin-concentrating hormone and hypocretin/orexin neuronal activation before, during and after deprivation. *J Sleep Res* 24, 309-319.

3.3. Conclusions du troisième article

3.3.1. Considérations méthodologiques

La technique DREADD que nous avons employée dans cette étude repose sur l'utilisation de récepteurs muscariniques humains mutés de telle sorte qu'ils deviennent insensibles à l'acétylcholine endogène et puissent être activés par un ligand exogène, la clozapine N-oxide (CNO) (Alexander et coll., 2009 ; Rogan et Roth, 2011). Un avantage majeur de cette technique, en tout cas défendu dans un certain nombre d'articles princeps (Alexander et coll., 2009 ; Ray et coll., 2011 ; Sasaki et coll., 2011), réside dans le fait que le CNO serait un ligand biologiquement inerte, puisque sans récepteur natif spécifique. Pourtant, certaines observations indiquent le contraire (Jann et coll., 1994 ; Pirmohamed et coll., 1995 ; Takekawa et coll., 2001 ; Nawaratne et coll., 2008). En effet, chez les mammifères, environ 40 % du CNO administré par voie intrapéritonéale qui n'est pas éliminé par voie rénale peut être réduit en clozapine (Pirmohamed et coll., 1995 ; Takekawa et coll., 2001 ; Loffler et coll., 2012), cette dernière pouvant traverser comme le CNO la barrière hématoencéphalique (Bender et coll., 1994). Cette conversion du CNO en clozapine intervient également au niveau hépatique, où elle est également métabolisée en N4-desmethylclozapine (NDMC) (Pirmohamed et coll., 1995). Ces métabolites du CNO, clozapine et NDMC, ont une affinité pour de nombreux récepteurs tels que les récepteurs muscariniques, dopaminergiques, adrénergiques, histaminergique et sérotoninergiques (Devoto et coll., 2003 ; Sur et coll., 2003 ; McGuire et coll., 2004 ; Robertson et coll., 2004 ; Hampson et coll., 2007 ; Dong et coll., 2008 ; Loffler et coll., 2012), tous pouvant jouer un rôle dans le contrôle du cycle veille-sommeil. En particulier, la clozapine est un antipsychotique atypique utilisé en clinique humaine qui présente des effets secondaires sur le sommeil (Hinze-Selch et coll., 1997). D'autre part, la clozapine induit également un effet inhibiteur sur les canaux $K_{ir}3$ (Kobayashi et coll., 2004 ; Armbruster et coll., 2007), ce qui peut conduire à masquer en partie les effets de l'activation de récepteurs métabotropiques couplés à une protéine G_i tels que le récepteur muscarinique de type 4 mutant (hM4di) utilisé par la technique DREADD pour inhiber une population neuronale. Ainsi l'utilisation d'outils de pharmacogénétiques couplés à l'administration de CNO requiert de demeurer attentif aux produits de réduction et de dégradation de ce dernier qui peuvent tous ébranler la spécificité et l'efficacité attendues d'une telle approche.

3.3.2. L'activation des neurones MCH facilite le SP

Au cours de cette étude, nous avons pu mettre en évidence que l'activation des neurones MCH favorise le déclenchement et la consolidation du SP, reproduisant les résultats obtenus précédemment grâce à l'activation par optogénétique de ces mêmes neurones (Jego et coll., 2013 ; Konadhode et coll., 2013 ; Tsunematsu et coll., 2014) et confirmant ainsi que les neurones MCH contribuent à la régulation du SP.

Toutefois, dans nos conditions expérimentales, nous n'avons pas été en mesure d'observer d'effet robuste et spécifique de l'inhibition des neurones MCH sur le SP. Une fois de plus, il est toujours possible d'arguer que cette absence d'effet soit due à une inhibition incomplète des neurones MCH puisqu'il s'est avéré, sur la base des contrôles histologiques *post-mortem*, qu'une fraction des neurones MCH n'exprimaient pas de manière détectable le récepteur DREADD inhibiteur dans l'échantillon de souris utilisé. Il faut également garder à l'esprit qu'une éventuelle inhibition des quantités de SP dans ces conditions pourrait avoir été masquée par les effets non-spécifiques du CNO, inhibant le SP lorsqu'il est administré chez des souris contrôle.

Cependant, jusqu'à présent, l'ensemble des expérimentations visant à étudier la perte de fonction des neurones MCH, que ce soit par leur inhibition optogénétique (Jego et coll., 2013 ; Tsunematsu et coll., 2014) ou par leur lésion spécifique (Tsunematsu et coll., 2014 ; Varin et coll., 2015a) a échoué à mettre en évidence une altération du SP. Et il en est de même pour l'inhibition par pharmacogénétique des neurones MCH. Aussi, sans remettre en cause les données expérimentales nombreuses et diverses soutenant que l'activation des neurones MCH facilite le SP, ces résultats négatifs nous conduisent malgré tout à nous interroger sur la contribution réelle des neurones MCH dans la régulation physiologique du SP dans des conditions basales. En effet, les effets facilitateurs du SP sont observés en réponse à des stimulations optogénétiques des neurones MCH à des fréquences variant de 10 et 20 Hz (Jego et coll., 2013 ; Konadhode et coll., 2013 ; Tsunematsu et coll., 2014), fréquences bien supérieures aux taux de décharge en potentiels d'action rapportés pour les neurones MCH enregistrés à travers le cycle veille-sommeil naturel dans des conditions basales (Hassani et coll., 2009). Il est alors possible que le niveau d'activation des neurones MCH nécessaire à exhiber des effets facilitateurs sur le SP pourrait intervenir lorsque le système MCHergique est poussé dans des conditions extrêmes par rapport à son état dans des conditions basales. Un tel état d'activation des neurones MCH pourrait avoir lieu par exemple en réponse à une forte pression homéostatique de SP ou au cours d'une privation alimentaire. En effet, les neurones MCH semblent fortement sollicités dans ces conditions car ils expriment fortement le marqueur d'activation c-Fos après une hypersomnie de SP faisant suite à une privation spécifique de cet état (Verret et coll., 2003) et une augmentation de l'expression de pCREB est détectée dans les neurones MCH à la suite d'une privation alimentaire (Mogi et coll., 2005).

3.3.3. Les neurones MCH participent à la consolidation du SL et à la terminaison des épisodes de SL

L'originalité de notre étude pharmacogénétique réside dans la démonstration que les neurones MCH contribuent à la régulation de certains aspects du SL. En effet l'inhibition des neurones MCH augmente la durée des épisodes de SL significativement au-delà des effets non-spécifiques du CNO, et, inversement, l'excitation des neurones MCH renverse les effets non-spécifiques du CNO, suggérant une diminution de la durée des épisodes de SL. Ce résultat indique que les neurones MCH jouent un rôle dans le contrôle de la durée des épisodes de SL, et ce, même dans des conditions basales. Nous avons également observé que cet effet s'accompagne de modifications de l'activité EEG pendant le SL. L'excitation des neurones MCH favorise l'émergence d'ondes delta rapides alors que l'inhibition de ces neurones produit un ralentissement des ondes lentes dans la bande delta. Les neurones MCH pourraient directement ou indirectement via des projections ascendantes vers le thalamus et le néocortex (Bittencourt et coll., 1992 ; Bittencourt, 2011) contribuer à une augmentation de l'hyperpolarisation des neurones thalamocorticaux et ainsi favoriser une augmentation de la fréquence des oscillations lentes pendant le SL (Amzica et Steriade, 1998 ; Blethyn et coll., 2006 ; Zhu et coll., 2006 ; Crunelli et Hughes, 2010). De leur côté, les neurones orexine pourraient jouer un rôle inverse en dépolarisant les neurones thalamocorticaux (Govindaiah et Cox, 2006). Les neurones MCH pourraient ainsi favoriser l'apparition d'un sommeil lent plus profond et de meilleure qualité (Amzica et Steriade, 1998). Cette interprétation est de plus renforcée par nos précédentes observations chez les souris MCH^{Atax} pour lesquelles la qualité et la profondeur du SL semblent affectées par la lésion partielle des neurones MCH (Varin et coll., 2015a).

Toutefois, les données collectées ici semblent en contradiction avec les résultats obtenus après une lésion des neurones MCH : l'inhibition pharmacogénétique des neurones MCH augmente

la durée des épisodes de SL, alors que leur ablation produit l'effet inverse (Tsunematsu et coll., 2014 ; Varin et coll., 2015a). L'ablation des neurones MCH semble néanmoins produire une fragmentation du SL au profit de l'éveil, suggérant alors un déficit dans la consolidation des épisodes de SL, ce qui semble être également le cas lors de l'inhibition aigüe de neurones MCH qui se traduit par un allongement de la durée des épisodes de SL qui semblent constitués de SL léger. L'ensemble de ces études supporterait donc un rôle des neurones MCH dans l'émergence du SL profond.

Ainsi à travers la modulation pharmacogénétique de l'activité des neurones MCH, nous avons pu renforcer des données expérimentales précédemment rapportées selon lesquelles ces neurones contribuent activement au déclenchement et au maintien du SP. Nous apportons en revanche ici de nouveaux arguments supportant leur action également durant le SL, afin de favoriser l'approfondissement du SL et la transition vers le SP en facilitant la terminaison des épisodes de SL.

Chapitre 4 :

Détermination par optogénétique de l'influence sur le sommeil des projections des neurones sécrétant l'hormone de mélation dans le VLPO

4.1. Introduction

Les études précédentes ont mis en évidence que les neurones MCH jouent un rôle important dans la promotion du SP mais aussi dans certains aspects liés au SL. En particulier, nous avons démontré que l'inhibition pharmacogénétique de ces neurones rallonge la durée des épisodes de SL alors que leur activation provoque un net raccourcissement de ces épisodes. Sur la base de ces données, nous avons formulé une nouvelle hypothèse selon laquelle les neurones MCH joueraient un rôle répressif vis à vis du SL – accompagné paradoxalement d'une augmentation de la profondeur du SL – pavant ainsi la voie à des conditions physiologiques propices à une plus grande probabilité de transition vers le SP. Par la formulation même de cette hypothèse fonctionnelle, il est implicitement suggéré que cette action inhibitrice sur le SL des neurones MCH devrait s'exercer directement sur les neurones responsables du SL. *De facto*, le VLPO apparaît comme l'une des principales cibles potentielles des neurones MCH puisqu'il contient un grand nombre des neurones responsables du déclenchement et du maintien du SL (Gallopín et coll., 2000 ; Gallopín et coll., 2005 ; Fort et coll., 2009 ; Saper et coll., 2010). Cette hypothèse est renforcée par le fait que les neurones MCH seraient capables de libérer du GABA sur leurs cibles post-synaptiques cérébrales (Del Cid-Pellitero et Jones, 2012 ; Jégo et coll., 2013). De plus, le VLPO renferme une forte densité d'axones et boutons synaptiques immunoréactifs pour le peptide MCH par rapport aux zones hypothalamiques adjacentes. Enfin, l'expression locale de récepteurs post-synaptiques MCH-R1 mesurée par hybridation *in situ* est substantielle (Bittencourt et coll., 1992 ; Chee et coll., 2013).

Afin de déterminer si cette projection des neurones MCH dans le VLPO joue précisément un rôle majeur dans la régulation des états de vigilance, nous avons évalué les effets sur le cycle

veille-sommeil de la stimulation optogénétique des terminaisons axonales des neurones MCH localisées dans le VLPO. Les résultats préliminaires obtenus au cours de cette étude suggèrent que l'activation de la voie connectant les neurones MCH au VLPO favorise l'émergence d'un état de transition, intermédiaire entre le SL et le SP, sans néanmoins faciliter le déclenchement du SP ni modifier sensiblement les quantités de SL et de SP.

4.2. Méthodes

4.2.1. Animaux

La lignée de souris transgéniques utilisée pour ce projet, STOCK Tg(Pmch-cre)KY133Gsat/Mmucd (numéro d'identification : 034699-UCD), a été acquises auprès du *Mutant Mouse Regional Resource Center* (University of California, Davis, USA). Les souris Tg(Pmch-cre) ont été maintenues sur un fond génétique C57BL/6 par croisement entre un mâle transgénique avec 2 à 3 femelles sauvages C57BL/6 (Charles River, France). Les animaux sont hébergés au sein de l'animalerie « ALECS conventionnelle » dans les conditions standard de laboratoire (23 ± 1 °C, cycle lumière/obscurité de 12 h, allumage de la lumière à 08:00, accès *ad libitum* à l'eau et à la nourriture). Moins de 4 semaines après leur naissance, les souriceaux ont été systématiquement génotypés afin de vérifier la présence du transgène CRE grâce à l'amplification par PCR de l'ADN génomique obtenu à partir d'une biopsie de la première phalange d'un doigt. Les amorces suivantes ont été utilisées pour le génotypage : sens 5'-GAT CTC CGG TAT TGA AAC TCC AGC-3' et antisens 5'-GCT AAA CAT GCT TCA TCG TCG G-3'. Toutes les procédures ont été conduites en accord avec les règles d'éthique de l'Université Claude Bernard Lyon 1 (CE2A-55, protocole n° DR 2014-39).

4.2.2. Préparation chirurgicale

Injection intracérébrale du vecteur viral

Pour cette étude, deux vecteurs viraux associés à l'adénovirus (AAV) ont été utilisés : un AAV permettant l'expression de la channelrhodopsine-2 dépendant de la cre-recombinase (AAV2-Ef1a-DIO-hChR2(H134R)-eYFP-WPRE-pA, $3,2 \cdot 10^9$ particules/mL ; UNC Vector Core, USA) et un AAV contrôle permettant l'expression du rapporteur fluorescent eYFP seul dépendant de la cre-recombinase (AAV2-Ef1a-DIO-eYFP-WPRE-pA, $3,2 \cdot 10^9$ particules/mL ; UNC Vector Core, USA). Les souris mâles Tg(Pmch-cre), âgées de 8 à 10 semaines, ont été anesthésiées par une injection intrapéritonéale (i.p.) d'un mélange de kétamine et xylazine (100 mg/kg et 10 mg/kg respectivement ; Ceva Santé Animale, France). Elles ont ensuite été placées dans un cadre stéréotaxique (David Kopf Instruments, USA) pour permettre l'infusion *in situ* des AAV dans l'hypothalamus tubéral aux coordonnées : antéro-postérieure (AP) : -1,50 mm et médio-latérale (ML) : $\pm 0,95$ mm par rapport au Bregma et dorso-ventrale : -5,35 mm par rapport à la surface du crâne. Une trépanation a été réalisée dans le crâne au-dessus de chaque site d'injection à l'aide d'une fraise dentaire et la dure-mère a été réséquée. La solution d'AAV a été injectée bilatéralement à l'aide d'une canule de 200 μ m de diamètre externe, connectée à un cathéter rempli d'eau distillée, lui-même relié à une seringue Hamilton de 10 μ L insérée dans un pousse-seringue programmable (UMP3 ; modèle Micro4tm, World Precision Instruments Inc, UK). Après avoir prélevé la solution d'AAV dans la canule, celle-ci est positionnée aux coordonnées du site d'injection. La canule est laissée en place pendant 5 min avant de procéder à l'injection. 800 μ L de la solution d'AAV sont ensuite infusés à une vitesse de 40 nL/min. À la fin de l'injection, la canule

est laissée en place durant 10 minutes supplémentaires pour permettre la diffusion du vecteur viral dans le tissu. Une fois les deux injections réalisées, les trépan sont ensuite bouchés à l'aide de cire de Horsley et l'incision suturée et désinfectée. Après réveil, les souris ont été hébergées en cage individuelle pendant deux semaines jusqu'à l'implantation des fibres optiques et des électrodes EEG/EMG.

Implantation des fibres optiques et des électrodes EEG/EMG

Deux semaines après les injections d'AAV, les animaux sont une nouvelle fois anesthésiés par administration i.p. du même mélange de kétamine et xylazine et placés dans un cadre stéréotaxique. Sous contrôle stéréotaxique, une fibre optique double (Doric Lenses, Canada) a été implantée de façon à ce que l'extrémité de chaque fibre optique soit positionnée 500 μm au-dessus du VLPO (AP : -0.1 mm ; ML : ± 0.7 mm ; DV ; -5 mm). Pour l'acquisition des signaux EEG, deux vis en acier inoxydable (Plastics One, Bilaney, Allemagne) ont été implantées au-dessus des cortex pariétaux et une vis implantée au-dessus du cervelet. Une fois implantées, la fibre optique double et les électrodes EEG ont été solidarisées au crâne avec de la Super-bond (Sun Medical Co., Japon). Deux électrodes aurifiées ont été insérées entre deux plans musculaires de la nuque pour l'enregistrement de l'activité EMG. Les électrodes EEG et EMG ont été soudées à un micro-connecteur (Plastics One, Bilaney, Allemagne) puis enduites de ciment dentaire (Paladur, Heraeus Kulzer, Allemagne). La plaie a été suturée et désinfectée avec de la Bétadine. Après réveil, les souris ont finalement été replacées en cage individuelle pendant deux semaines avant le début des expérimentations.

4.2.3. Enregistrements polysomnographiques

Après deux semaines de récupération post-opératoire, les animaux ont été transférés dans des barils individuels en plexiglas (diamètre : 30 cm ; hauteur : 60 cm) placés dans un caisson d'enregistrement ventilé et isolé phoniquement. Les souris ont été connectées par un câble (Plastics One, Bilaney, Allemagne) à la chaîne d'acquisition des données polysomnographiques et par une fibre optique (Doric Lenses, Canada) aux sources laser (473 nm ; Laserglow, Canada). Pour permettre aux animaux de s'acclimater aux conditions expérimentales, une période d'habituation de 3 à 4 jours a été observée avant le début des expérimentations. Les signaux EEG et EMG sont amplifiés (MCP Plus, Alpha-Omega Engineering), numérisés à une fréquence d'échantillonnage de 520,8 Hz et enregistrés via une interface CED avec le logiciel Spike2 (Cambridge Electronic Design, UK).

4.2.4. Stimulations optogénétiques

Toutes les stimulations optogénétiques (pulses de 5 ms, 1–10 Hz) ont été générées par une carte USB (USB 1208-FS ; Measurement Computing, USA) contrôlée par un script Matlab (MathWorks, USA). La puissance lumineuse des lasers à la pointe des fibres optiques a été réglée à 15–20 mW pour chaque hémisphère.

4.2.5. Analyse des données polysomnographiques

Quatre états de vigilance ont été différenciés et quantifiés en différé par période de 2 secondes sur la base de l'analyse spectrale des signaux EEG et de l'examen du tonus musculaire de l'EMG. Pendant l'éveil, l'EEG est désynchronisé et accompagné d'une activité EMG soutenue présentant des événements phasiques. Le SL est caractérisé par des ondes lentes de forte amplitude et la disparition des événements musculaires phasiques. Le SP se distingue par une atonie musculaire

associée à l'apparition d'un rythme thêta prononcé sur l'EEG. La transition entre SL et SP (TR) a également été quantifiée : elle se caractérise par un signal EMG similaire au SL et par la superposition dans le signal EEG d'activités rythmiques lentes dans la bande delta similaires à celles du SL et plus rapides dans la bande thêta rappelant celles du SP. Les hypnogrammes sont ensuite dessinés directement en utilisant un script dans Spike-2 (CED, UK). Les valeurs sont finalement exportées pour calculer les paramètres standard de chaque état de vigilance.

4.2.6. Perfusion des animaux

En fin de protocole, les animaux ont été mis à mort par injection létale de pentobarbital sodique (150 mg/kg, i.p. ; Ceva Santé Animale) et immédiatement perfusés par voie intracardiaque avec du Ringer-Lactate contenant 1 % d'héparine (Virbac, France) suivi d'une solution froide (4 °C) de paraformaldéhyde (PFA) à 4 % dans du tampon phosphate (PB) à 0,1 M (Carlo Erba, France). Les cerveaux fixés ont été prélevés et post-fixés une nuit dans la même solution de PFA à 4 °C à l'abri de la lumière. Ils ont ensuite été cryoprotégés dans une solution de PB à 0,1 M contenant 30 % de sucrose (Sigma-Aldrich, France) pendant trois jours. Enfin, ces cerveaux ont été congelés dans du 2-méthylbutane à -40 °C et stockés à -80 °C avant d'être coupés au cryostat (Microm Microtech, France) à -20 °C en sections frontales de 30 µm d'épaisseur. Ces coupes dites flottantes ont été collectées dans six puits contenant un tampon PB à 0,02 M contenant du NaCl à 0,9 % (PBS) et 0,3 % de Triton X-100 (PBST ; Merck Schuchardt, France). Les coupes ont été rincées trois fois dans du PBST sous agitation à température ambiante et ont été enfin conservées dans du PBST contenant 1 g/L de sodium azide (PBST-az ; Merck) à 4 °C jusqu'à leur utilisation.

4.2.7. Histologie

Afin de contrôler l'efficacité et la spécificité de la transfection dans les neurones MCH, les coupes au niveau hypothalamique ont été traitées en immunofluorescence pour détecter simultanément l'expression du peptide MCH et du fluorophore eYFP d'une part, et du peptide orexine et du rapporteur eYFP d'autre part. Dans le premier cas, les coupes ont été incubées dans une solution d'anticorps primaires anti-preproMCH produit chez la chèvre (1:500, PBST-Az ; Santa Cruz Biotechnology, USA) et anti-GFP produit chez le lapin (1:5000, PBST-Az ; Abcam, UK) pendant 3 jours, sous agitation, à 4 °C. Après 3 rinçages dans du PBST, les coupes ont été incubées dans les anticorps secondaires anti-chèvre couplés Alexa Fluor 568 et anti-lapin couplés Alexa Fluor 488 (1:500, PBST ; Invitrogen, USA) pendant 2 heures, sous agitation, à température ambiante. Après trois rinçages dans du PBST, les coupes ont été montées entre lames et lamelles recouvertes de Fluoromount (CliniSciences, France). Dans le second cas, le même protocole que précédemment a été mis en œuvre en remplaçant l'anticorps anti-preproMCH par un anticorps anti-orexine-A produit chez la chèvre (1:2000, PBST-Az ; Santa Cruz Biotechnology).

De plus, pour chaque animal, afin de visualiser l'emplacement des fibres optiques, les coupes issues de l'un des six puits ont été immédiatement montées sur lames, contre-colorées au rouge neutre (Sigma Aldrich), séchées, déshydratées et recouvertes de DEPEX (VWR).

4.2.8. Statistiques

Étant donné le faible échantillon disponible pour le moment, l'ensemble des données ont été analysées à l'aide de tests non-paramétriques. Pour tous les tests, le seuil de significativité a été fixé à 0,05.

4.3. Résultats

4.3.1. Validation histologique du modèle

Afin de cibler génétiquement les neurones MCH localisés dans l'hypothalamus tubéral, nous avons utilisé des souris *Tg(Pmch-cre)* exprimant la cre-recombinase sous le contrôle du promoteur

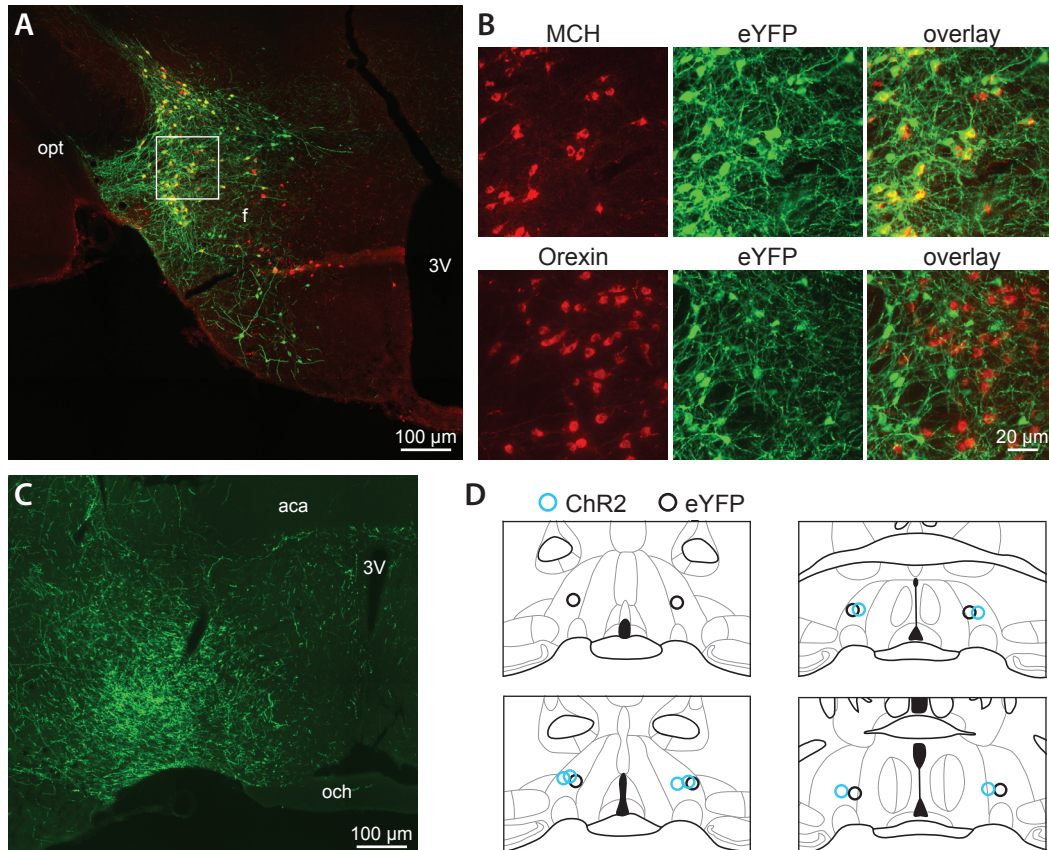


Figure 2.4.1. Validation histologique du modèle d'étude.

A, Section coronale représentative de cerveau de souris *Tg(Pmch-cre)* au niveau de l'hypothalamus tubéral exprimant le rapporteur fluorescent eYFP (marquage vert) spécifiquement dans les neurones immunoréactifs pour le peptide MCH (rouge). *Abréviations:* 3V, 3^{ème} ventricule ; opt, tractus optique ; f, fornix.

B, Illustration à plus forte magnification de coupes d'hypothalamus tubéral doublement marquées pour le MCH (rouge) et le fluorophore eYFP (vert) (panel supérieur) ou contre l'orexine (rouge) et l'eYFP (vert) (panel inférieur).

C, Coupe coronale au niveau de l'aire préoptique de l'hypothalamus antérieur illustrant la forte densité de terminaison axonales exprimant eYFP (marquage vert) issues des neurones MCH transfectés dans le VLPO. *Abréviations:* 3V, 3^{ème} ventricule ; aca, commissure antérieure ; och, chiasma optique

D, Représentation schématique de sections frontales au niveau de l'aire préoptique illustrant l'ensemble des emplacements de l'extrémité des fibres optiques pour tous les animaux contrôles (eYFP, $n = 4$) et ceux exprimant la ChR2 dans les neurones MCH (ChR2, $n = 4$). Les quatre sections sont espacées de 120 µm le long de l'étendue rostrocaudale du VLPO, entre +0,26 et +0,22 selon les coordonnées de l'atlas Franklin et Paxinos (2007).

Table 2.4.1. Comparaison des paramètres liés aux états de vigilance entre souris eYFP et ChR2 évalués pendant la période diurne.

		Période diurne	
		eYFP (<i>n</i> = 4)	ChR2 (<i>n</i> = 4)
Éveil	Durée totale (min)	271,9 ± 10,0	276,2 ± 9,7
	Nombre d'épisode	478,0 ± 37,5	457,5 ± 40,2
	Durée moyenne des épisodes (s)	31,7 ± 3,6	39,1 ± 4,0
SL	Durée totale (min)	307,3 ± 9,3	317,3 ± 10,1
	Nombre d'épisode	478,0 ± 37,5	457,5 ± 40,2
	Durée moyenne des épisodes (s)	36,2 ± 4,9	40,2 ± 3,7
TR	Durée totale (min)	65,5 ± 5,9	57,9 ± 6,1
	Nombre d'épisode	401,3 ± 41,5	375,8 ± 30,7
	Durée moyenne des épisodes (s)	10,6 ± 0,3	11,0 ± 0,7
SP	Durée totale (min)	72,2 ± 4,0	71,3 ± 2,2
	Nombre d'épisode	91,5 ± 2,5	88,5 ± 3,5
	Durée moyenne des épisodes (s)	47,4 ± 3,0	49,8 ± 5,3

preproMCH (*Pmch*). Après l'injection stéréotaxique du vecteur viral du vecteur viral associé à l'adénovirus (AAV) inducible par la Cre AAV2-EF1a-DIO-EYFP dans l'hypothalamus tubéral de ces souris, nous avons déterminé que $86.0 \pm 3.8 \%$ ($n = 4$) des neurones immunoréactifs pour le peptide MCH co-exprimaient le rapporteur eYFP. De plus, $92.7 \pm 3.1 \%$ ($n = 4$) des neurones immunofluorescents pour eYFP étaient de nature MCHergique puisque co-exprimant la MCH (Figure 2.4.1 A–B). Enfin, aucune immunofluorescence eYFP n'a été détectée dans les neurones orexine voisins des neurones MCH (Figure 2.4.1 B). Bien que ces quantifications n'aient pas encore été effectuées, le marquage est qualitativement similaire chez les animaux ayant reçu des injections du vecteur AAV2-EF1a-DIO-ChR2(H134R)-eYFP.

Nous avons également observé chez tous les animaux une très forte densité de fibres axonales exprimant eYFP dans la partie ventrale de l'aire préoptique latérale (Figure 2.4.1 C) correspondant à la région ciblée par les fibres optiques (Figure 2.4.1 D).

4.3.2. La stimulation continue des terminaisons MCHergiques dans le VLPO favorise l'apparition d'un état intermédiaire entre SL et SP

Tout d'abord, la distribution des états de vigilance a été comparée entre les souris *Tg(Pmch-cre)* transfectées avec le vecteur viral contenant la séquence permettant l'expression de la ChR2 (souris ChR2 ; $n = 4$) et les souris transfectées avec le vecteur viral contrôle (souris eYFP ; $n = 4$). Aucune différence n'a été relevée entre ces deux groupes d'animaux, indiquant que l'expression de la ChR2 dans les neurones MCH n'a pas d'impact sur le cycle veille-sommeil (Table 2.4.1).

Afin de déterminer si l'activation des terminaisons axonales des neurones MCHergiques dans le VLPO peut moduler les états de vigilance, les animaux ont dans un premier temps été soumis à un protocole de stimulation optogénétique continue pendant trois heures au cours de la période diurne (11:00–14:00) et à différentes fréquences de

pulses lumineux (0, 1, 5 et 10 Hz) (Figure 2.4.2). Chez les animaux Chr2, la stimulation optogénétique a induit une modification significative des quantités de SP (test de Friedman : $\chi^2 = 11,1$, $p < 0,001$) et de TR (état de transition entre SL et SP ; test de Friedman : $\chi^2 = 9,9$, $p < 0,01$). En revanche, les quantités d'éveil et de SL n'ont pas été significativement altérées (tests de Friedman : éveil, $\chi^2 = 5,7$, $p = 0,14$; SL, $\chi^2 = 6,3$, $p = 0,094$) (Figure 2.4.2 A,C). Plus précisément, les stimulations lumineuses à 1 et 5 Hz augmentent fortement les quantités de TR par rapport aux enregistrements de base à 0 Hz, potentiellement au détriment du SL, mais également du SP. Par ailleurs, la stimulation lumineuse à 10 Hz semble principalement induire un effet éveillant au détriment des trois autres états de vigilance (Figure 2.4.2 A,C). Cet effet éveillant de la stimulation à plus haute fréquence pourrait être du à l'activation et à l'accumulation d'un fort tonus inhibiteur au voisinage des neurones du VLPO responsables

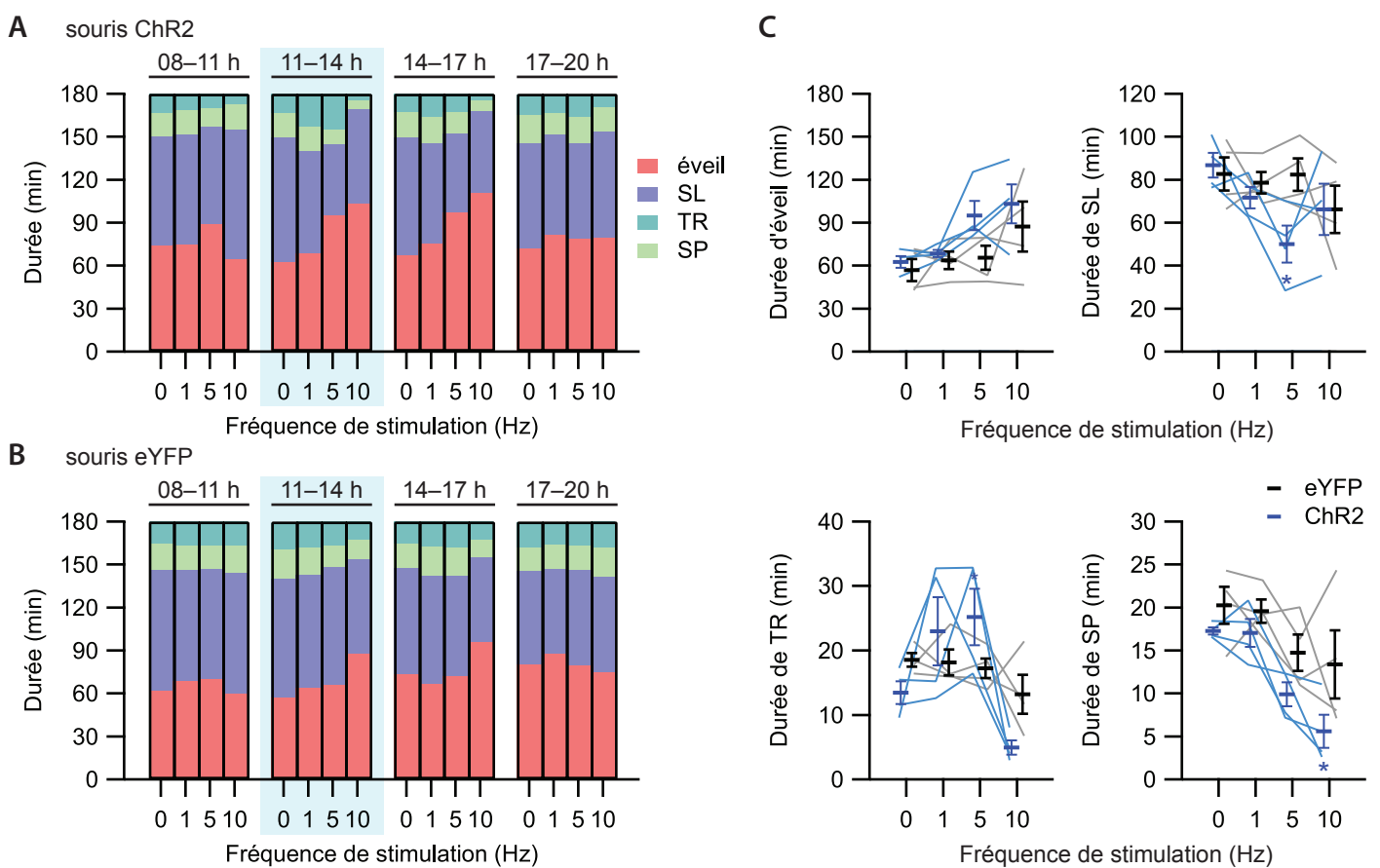


Figure 2.4.2. L'activation optogénétique des terminaisons des neurones MCH dans le VLPO favorise un état intermédiaire entre SL et SP.

A–B, Histogrammes cumulés des quantités de chaque état de vigilance pendant la période diurne, par tranches de 3 h en fonction de la fréquence de stimulation optogénétique pour les souris Chr2 ($n = 4$; **A**) et les souris eYFP ($n = 4$; **B**). La stimulation optogénétique intervient pendant la deuxième tranche de 3 heures, entre 11 h et 14 h.

C, Quantification de la durée totale de chaque état de vigilance au cours des 3 h de stimulation en fonction de la fréquence de stimulation pour les souris Chr2 ($n = 4$; bleu) et eYFP ($n = 4$; noir). Les données sont représentées pour chaque animal (traits, bleu clair et gris) ainsi que par la moyenne \pm SEM (barres). Test de Friedman suivi par des tests post-hoc de Wilcoxon par rapport à la ligne de base (0 Hz) : * $p < 0,05$.

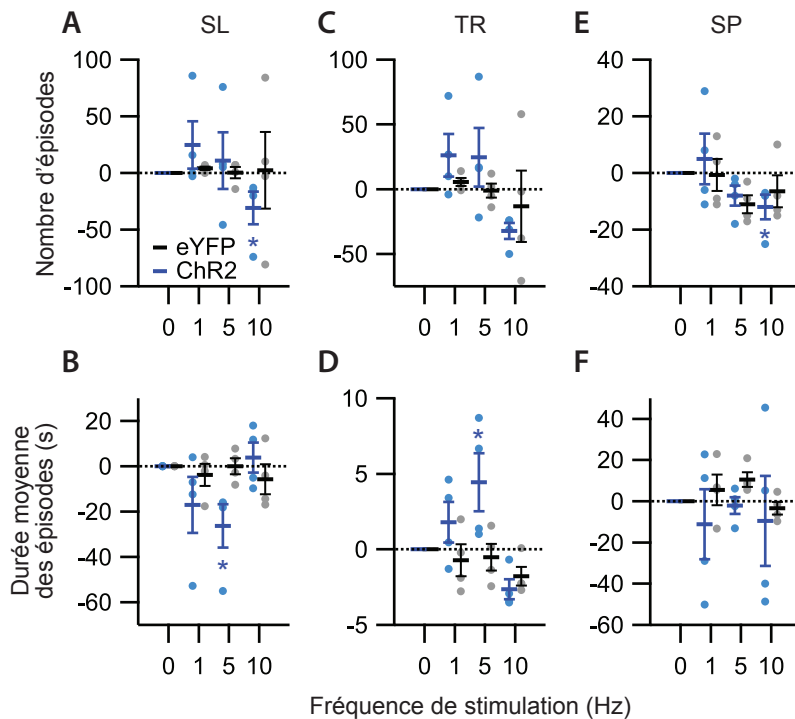


Figure 2.4.3. Architecture du cycle veille-sommeil au cours de la stimulation optogénétique des fibres MCHergiques dans le VLPO.

Évolution centrée par rapport à la ligne de base (0 Hz) en fonction de la fréquence de stimulation du nombre d'épisodes (**A, C, E**) et de la durée moyenne des épisodes (**B, D, F**) pour les états de SL (**A-B**), TR (**C-D**) et SP (**E-F**) au cours des 3 h de stimulation optogénétique pour les souris ChR2 ($n = 4$; bleu) et eYFP ($n = 4$; noir). Les données issues de chaque animal sont représentées (cercles, bleu clair et gris) ainsi que par moyenne \pm SEM (barres). Test de Friedman suivi par des tests post-hoc de Wilcoxon par rapport à la ligne de base (0 Hz) : * $p < 0,05$.

du déclenchement et du maintien du sommeil. D'autre part, la stimulation lumineuse pendant 3 heures n'a produit aucune altération significative des quantités d'états de vigilance chez les souris eYFP (tests de Friedman : éveil, $\chi^2 = 2,7$, $p = 0,51$; SL, $\chi^2 = 3,6$, $p = 0,36$; TR, $\chi^2 = 3,0$, $p = 0,43$; SP, $\chi^2 = 4,5$, $p = 0,24$) (Figure 2.4.2 B,C).

L'analyse détaillée des paramètres liés aux états de vigilance a permis de mettre en évidence que la stimulation lumineuse chez les souris ChR2 conduit à une augmentation du nombre d'épisodes de TR (test de Friedman : $\chi^2 = 8,4$, $p < 0,05$) ainsi que de leur durée moyenne (test de Friedman : $\chi^2 = 7,8$, $p < 0,05$) pour les fréquences de 1 et 5 Hz (Figure 2.4.3 C-D) associée à une diminution de la durée moyenne des épisodes de SL (test de Friedman : $\chi^2 = 9,3$, $p < 0,05$) pour ces mêmes fréquences. Le nombre d'épisodes de SL est inchangé pour des stimulation à 1 et 5 Hz, mais est significativement réduit pour la stimulation à 10 Hz (test de Friedman : $\chi^2 = 7,9$, $p < 0,05$) (Figure 2.4.3 A-B). De plus, les stimulations lumineuses entraînent une diminution dépendante de la fréquence du nombre d'épisodes de SP (test de Friedman : $\chi^2 = 8,9$, $p < 0,05$) sans affecter la durée moyenne des épisodes de SP (test de Friedman : $\chi^2 = 0$, $p = 1$) (Figure 2.4.3 E-F).

Chez les souris contrôle eYFP, aucun effet significatif de la stimulation optogénétique n'a été relevé pour les paramètres liés au SL (tests de Friedman : nombre d'épisodes, $\chi^2 = 1,46$, $p = 0,80$; durée moyenne, $\chi^2 = 1,5$, $p = 0,75$), au SP (tests de Friedman : nombre d'épisodes, $\chi^2 = 5,7$, $p = 0,14$; durée moyenne, $\chi^2 = 3,6$, $p = 0,36$) ou au TR (tests de Friedman : nombre d'épisodes, $\chi^2 = 2,1$, $p = 0,65$; durée moyenne, $\chi^2 = 2,7$, $p = 0,51$) (Figure 2.4.3). Ceci suggère que les effets observés chez les souris ChR2 sont bien la résultante spécifique de la stimulation optogénétique des terminaisons axonales MCH présentes dans le champs d'illumination des fibres optiques.

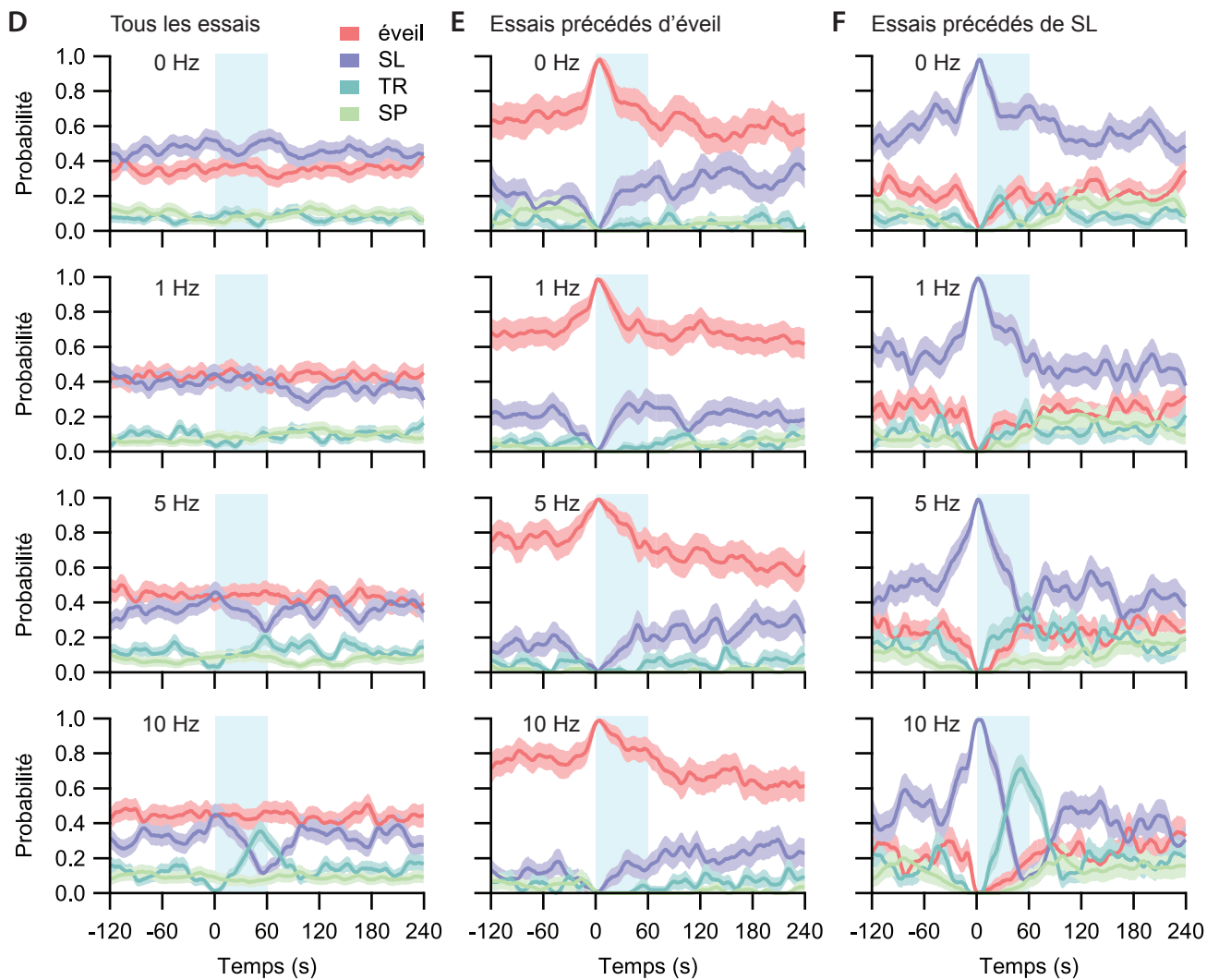
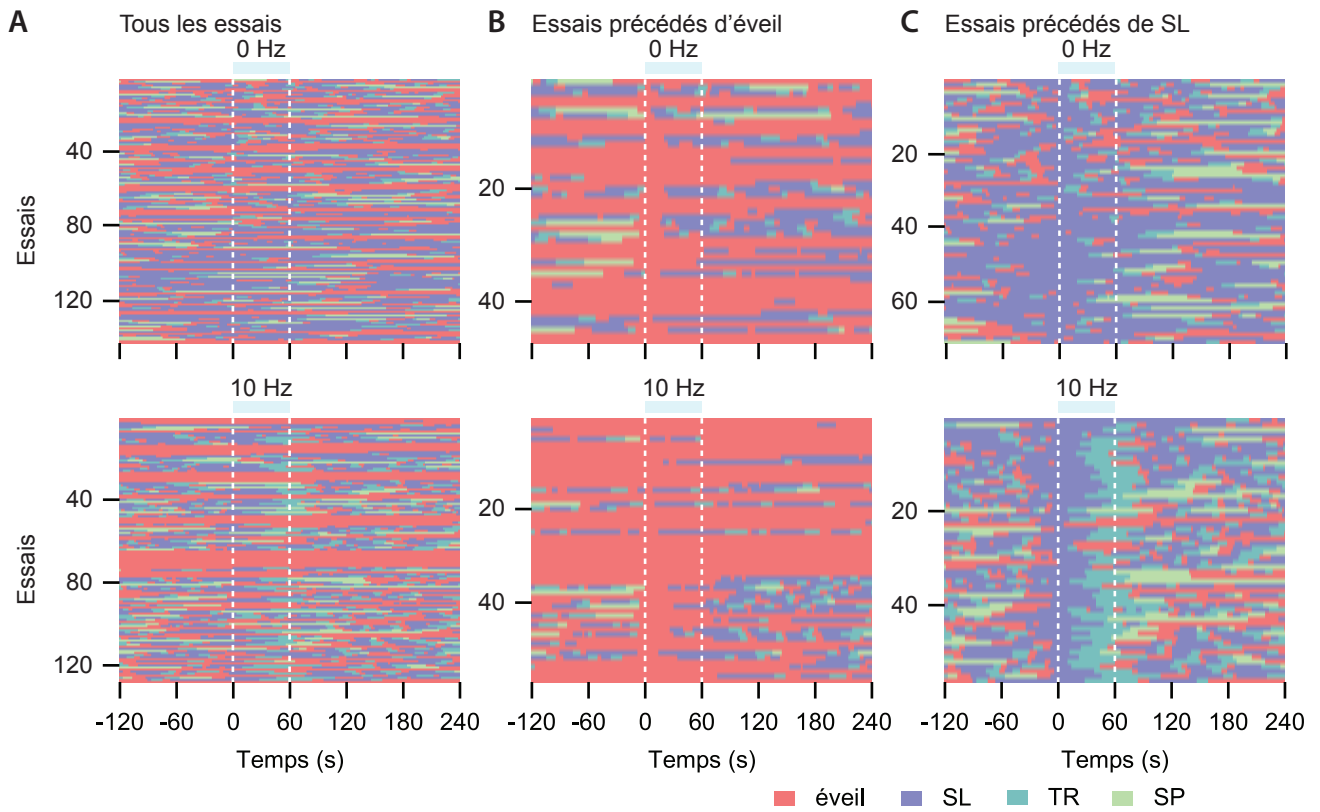


Figure 2.4.4. Effets sur le sommeil de la stimulation aigüe aléatoire des fibres MChergiques dans le VLPO.

A–C, Évolution des états de vigilance en condition basale (0 Hz ; haut) et pour des stimulations optogénétiques à une fréquence de 10 Hz (bas) d’une durée de 60 s déclenchées toutes les 10 min obtenue pour des souris ChR2 ($n = 2$). Sont représentés les états de vigilance l’ensemble des stimulations (**A**), ainsi que les essais pour lesquels les stimulations débutent aléatoirement pendant un épisode d’éveil (**B**) ou de SL (**C**).

D–F, Probabilité d’observer chaque état de vigilance pendant les stimulations à 0 Hz (première ligne), 1 Hz (deuxième ligne), 5 Hz (troisième ligne) et 10 Hz (dernière ligne) pour l’ensemble des essais (**D**), pour les essais précédés d’éveil (**E**) et pour les essais précédés de SL (**F**). Pour ces deux derniers cas la probabilité est de 1 pour l’éveil et le SL immédiatement après le début des stimulations. Les données sont représentées par la moyenne \pm 95% IC calculés par la méthode de bootstrap.

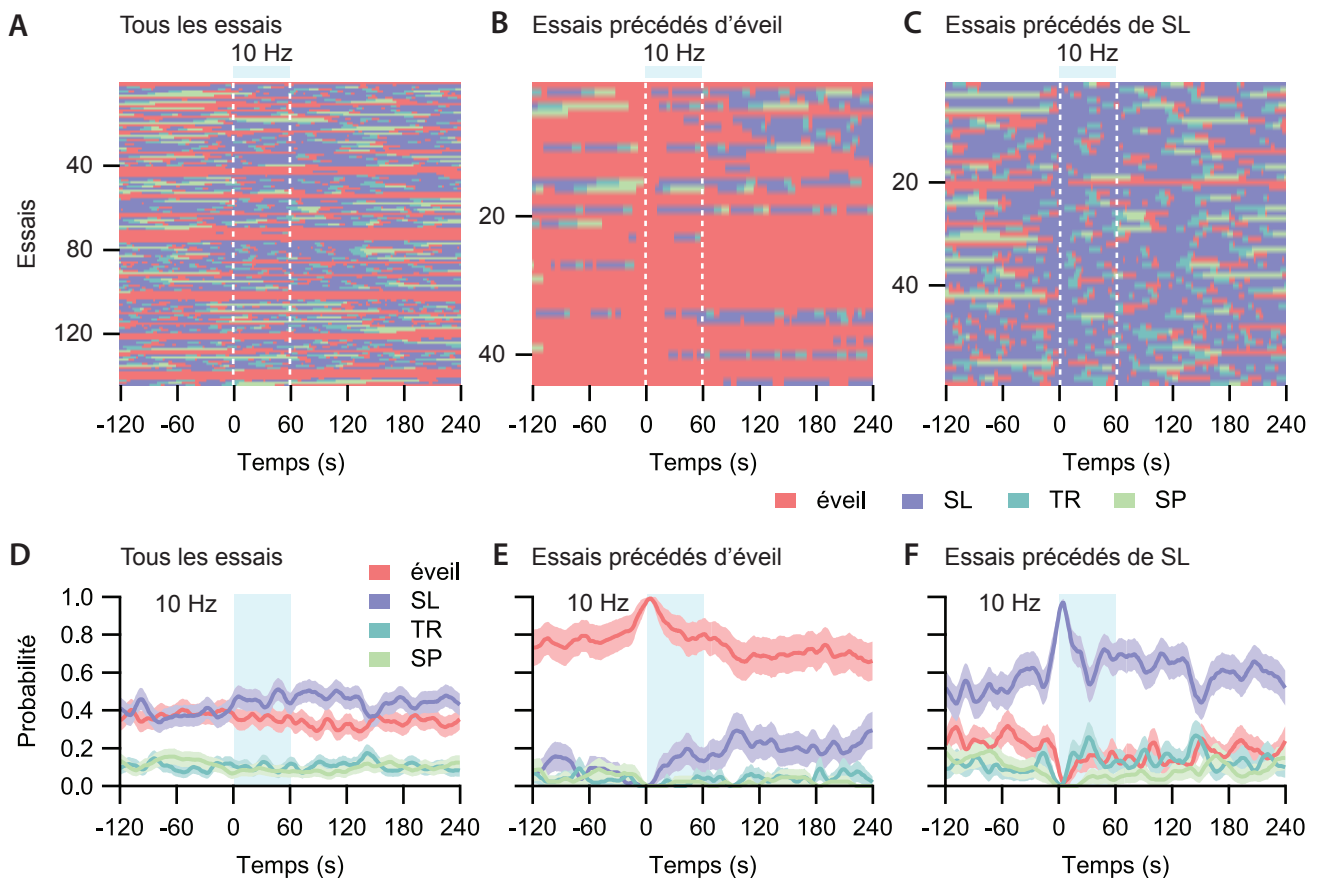


Figure 2.4.5. L’alternance entre états de vigilance n’est pas affectée par la stimulation aigüe chez les souris contrôle eYFP.

A–C, Évolution des états de vigilance pendant des stimulations laser à une fréquence de 10 Hz pour des souris eYFP ($n = 2$). Ce protocole ne favorise pas l’apparition de TR pour l’ensemble des essais (**A**) ou pour ceux précédés d’éveil (**B**) ou de SL (**C**).

D–F, Probabilité d’observer chaque état de vigilance pendant les stimulations à 10 Hz pour l’ensemble des essais (**D**), pour les essais précédés d’éveil (**E**) et pour les essais précédés de SL (**F**). Les données sont représentées par la moyenne \pm 95% IC calculés par la méthode de bootstrap.

Ainsi, l'activation des terminaisons axonales des neurones MCH présentes dans le VLPO favorise le déclenchement et le maintien d'un état de transition entre SL et SP au détriment du SL et sans pour autant conduire à la promotion du SP.

4.3.3. L'effet promoteur du TR est spécifique du SL

Les résultats précédents reposent sur une stimulation continue et de longue durée des axones des neurones MCH, un protocole peu en adéquation avec le profil de décharge de potentiels d'action de ces neurones rapportés précédemment dans des conditions physiologiques (Hassani et coll., 2009). Aussi, dans un deuxième temps, chez les mêmes souris ChR2 et eYFP, des protocoles aigus de stimulation ont été appliqués toutes les 10 min pendant 60 s à des fréquences de pulses lumineux de 0, 1, 5 et 10 Hz pendant les 12 h de la période diurne. Pour quantifier un éventuel effet, l'ensemble des essais obtenus à partir de deux souris ChR2 et deux souris eYFP ont été alignées par rapport au déclenchement de la stimulation (Figures 2.4.4 A–C et 2.4.5 A–C).

Pendant la durée de l'illumination laser, nous avons alors observé que la stimulation des fibres MCH produit une augmentation dépendante de la fréquence de la probabilité d'observer du TR accompagnée d'une diminution de la probabilité d'observer du SL (Figure 2.4.4 A,D). Aucune différence n'a été relevée concernant l'éveil ou le SP. Chez les animaux contrôle eYFP, le même protocole n'a produit aucun effet sur les probabilités d'observer un quelconque état de vigilance (Figure 2.4.5 A,D). Ces modifications complémentaires du SL et du TR suggèrent que les effets observés chez les souris ChR2 seraient dépendants du SL. Pour tester cette hypothèse, nous avons évalué les effets de la stimulation laser en fonction de l'état de vigilance (éveil ou SL) pendant lequel la stimulation est déclenchée. Lorsqu'elle intervient pendant l'éveil, aucune modification des différentes probabilités d'observer un quelconque état de vigilance n'a été détectée pour aucune des fréquences testées. À l'inverse, lorsque la stimulation intervient pendant un épisode de SL, une augmentation très forte et rapide de la probabilité d'observer du TR intervient pendant toute la durée de la stimulation lumineuse chez les souris ChR2 (Figure 2.4.4 C,F). Cet effet est d'autant plus marqué que la fréquence de stimulation est élevée. De plus, des transitions du SL vers le TR ont été observées dans 51,4 % (36/70) des essais à 0 Hz, 59,0 % (36/61) des essais à 1 Hz, 88,1 % (52/59) des essais à 5 Hz et 91,1 % (51/56) des essais à 10 Hz. D'autre part, dans cette condition, aucun effet des stimulations laser n'a été détecté sur la probabilité d'observer du SP chez les souris ChR2 (Figure 2.4.4 C,F), suggérant, à nouveau, que la stimulation optogénétique n'est pas suffisante pour déclencher le SP. De plus, aucun effet des stimulations n'a été observé chez les souris eYFP lorsqu'elles interviennent pendant un épisode d'éveil (Figure 2.4.5 B,E) ou de SL (Figure 2.4.5 C,F).

Bien que préliminaires, ces données tendent à démontrer que la stimulation des fibres MCHer-giques dans le VLPO spécifiquement pendant le SL suffirait à induire un état de transition entre SL et SP sans toutefois faciliter le déclenchement du SP.

Afin de préciser encore davantage la contribution des terminaisons axonales des neurones MCH dans le VLPO au contrôle de l'état de transition entre SL et SP, les animaux (ChR2, $n = 2$; eYFP, $n = 4$) ont été soumis à un dernier protocole de stimulation au cours duquel les stimulations optogénétiques (0, 1 et 10 Hz) ont été déclenchées manuellement 5–10 s après le déclenchement du SL ou du SP et arrêtées dès le changement d'état suivant vers le SP ou l'éveil. Qualitativement, les premières données acquises indiquent que la stimulation optogénétique dès le début d'un épisode de SL n'affecterait pas la durée des épisodes de SL (Figure 2.4.6 A), mais favoriserait spécifiquement la transition vers le TR (Figure 2.4.6 B) et contribuerait à augmenter la durée des épisodes de TR (Figure 2.4.6 A). De plus, la transition vers le SP ne semble pas affectée par cette

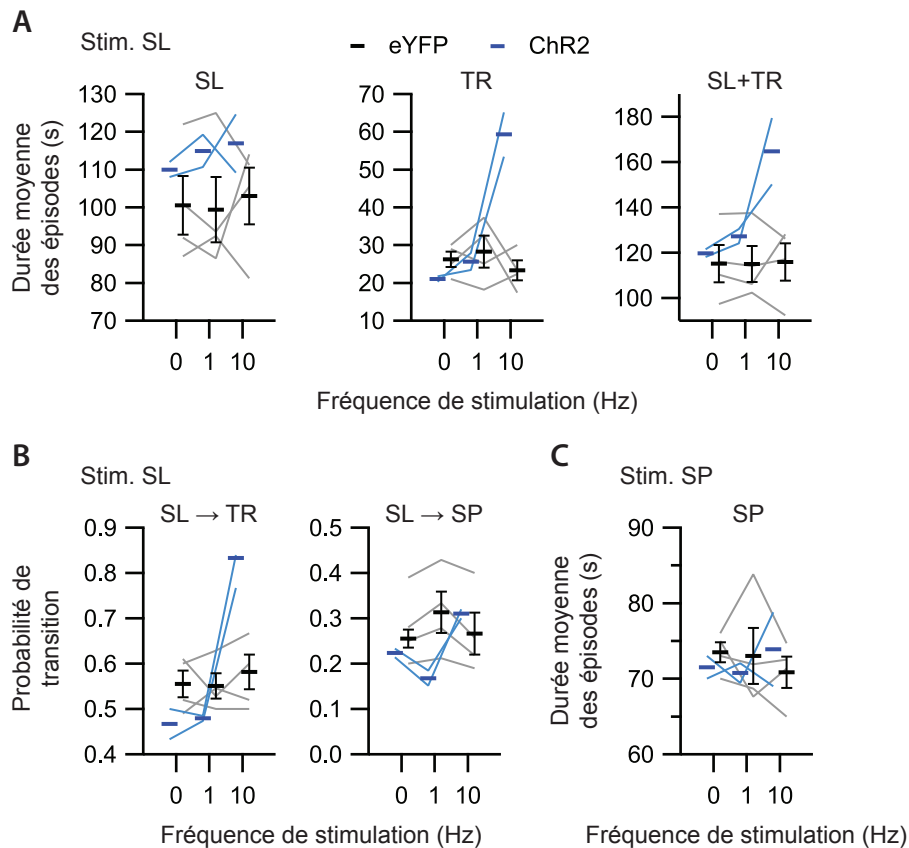


Figure 2.4.6. Effet de la stimulation optogénétique en fonction des états de sommeil.

A, Évolution de la durée moyenne des épisodes de SL, de TR et de SL suivi ou non de TR (SL+TR) pendant la stimulation des fibres MCHergiques dans le VLPO déclenchée au début d'épisodes de SL (Stim. SL) en fonction de la fréquence chez les souris ChR2 ($n = 2$; bleu) et eYFP ($n = 4$; noir).

B, La stimulation optogénétique pendant le SL (Stim. SL) favorise la probabilité d'occurrence de TR (SL \rightarrow TR) sans sensiblement modifier la probabilité de transition vers le SP (SL \rightarrow PS).

C, Durée moyenne des épisodes de SP en réponse à la stimulation optogénétique à 0, 1 et 10 Hz déclenchée au début des épisodes de SP (Stim. SP) chez les souris ChR2 ($n = 2$; bleu) et eYFP ($n = 4$; noir).

Les données issues de chaque animal sont représentées (cercles, bleu clair et gris) ainsi que la moyenne \pm SEM (barres noires) pour les souris eYFP et la moyenne (barres bleues) pour les souris ChR2. L'analyse est basée sur 25–35 stimulations et \sim 20 stimulations par animal et par fréquence pour les stimulations déclenchées respectivement au début des épisodes de SL et au début des épisodes de SP.

stimulation (Figure 2.4.6 B). D'autre part, la stimulation laser initiée au début d'un épisode de SP ne semble pas produire d'effet sur sa durée (Figure 2.4.6 C) à l'inverse de ce qui a été mis en évidence par la stimulation des fibres MCHergiques dans d'autres structures impliquées dans la régulation de la vigilance, comme le noyau tubéromammillaire ou le septum médian (Jego et coll., 2013).

Ainsi nos résultats préliminaires semblent indiquer que l'activation des fibres MCHergiques dans le VLPO favoriserait l'apparition et la consolidation d'un état intermédiaire que l'on peut qualifier de transition entre SL et SP, au détriment du SL sans pour autant favoriser la transition vers le SP ni la consolidation de cet état.

4.4. Discussion

Par cette étude encore très préliminaire, nous avons été en mesure d'observer que les entrées synaptiques dans le VLPO issues des neurones MCH hypothalamiques pourraient contribuer, en partie, aux mécanismes d'alternance entre les deux états de sommeil. En effet, la stimulation optogénétique des fibres MCHergiques dans le VLPO favorise l'établissement d'un état de transition intermédiaire entre SL et SP, mais ne semble pas être suffisante pour permettre l'initiation d'un état stable et consolidé de SP. Des travaux complémentaires sont néanmoins nécessaires afin de confirmer ces résultats et de déterminer les mécanismes neurobiologiques sous-jacents dans ces effets potentiels.

4.4.1. Considérations méthodologiques

Afin d'étudier le rôle physiologique sur le sommeil de la projection des neurones MCH dans le VLPO, nous avons choisi de mettre en œuvre des outils d'optogénétique. Toutefois, même si cette technique permet de stimuler spécifiquement une sous-population neuronale en fonction de son profil moléculaire et génétique avec une résolution temporelle très précise, certaines limitations méthodologiques se doivent d'être mentionnées.

Premièrement, l'activation optogénétique de soma ou d'axones produit une stimulation hypersynchrone de ces derniers, les plaçant dans un mode de décharge probablement assez éloigné de leur patron d'activité observé dans des conditions physiologiques (Hassani et coll., 2009). Cette problématique se pose également à propos du choix des fréquences de stimulation. Afin de prendre en compte au mieux ce dernier point, nous avons donc choisi pour notre étude de tester systématiquement différentes fréquences de stimulation entre 1 et 10 Hz. De plus, en cherchant à stimuler spécifiquement des terminaisons axonales des neurones MCH dans le VLPO, il n'est pas exclu que des potentiels d'action déclenchés en réponse à la stimulation lumineuse puissent se propager antidromiquement jusqu'aux soma des neurones MCH, et également dans l'intégralité de leur arborisation axonale pour au final impacter tout ou partie de leurs cibles post-synaptiques cérébrales. À l'heure actuelle, nous ne disposons pas de données robustes permettant d'exclure cet effet potentiel, si ce n'est que nos données préliminaires ne reproduisent pas les effets sur le déclenchement et la consolidation du SP observés dans d'autres études par la stimulation optogénétique des corps cellulaires des neurones MCH (Jego et coll., 2013 ; Konadhode et coll., 2013 ; Tsunematsu et coll., 2014) ou des terminaisons axonales de ces neurones dans le TMN ou le septum médian (Jego et coll., 2013).

4.4.2. La stimulation des axones MCHergiques dans le VLPO n'impacte aucunement le SP

Dans cette étude, nos premiers résultats indiquent que la stimulation des axones des neurones MCH dans le VLPO pendant le SL n'augmente pas la probabilité de transition vers le SP et que la stimulation pendant le SP ne favorise pas la consolidation de cet état, à l'inverse de ce qui a

été mis en évidence par la stimulation de ces mêmes axones dans le TMN ou le septum médian (Jego et coll., 2013).

Ce résultat négatif semble néanmoins cohérent si l'on se réfère à la position du VLPO au sein du réseau neuronal extrêmement complexe contrôlant les états de vigilance : ainsi, les neurones du VLPO ne projettent pas sur les structures pontiques exécutrices du SP, à l'exception de la vlPAG contenant des neurones répresseur du SP et recevant de faibles entrées synaptiques issues du VLPO (Sherin et coll., 1998 ; Lu et coll., 2002). En supposant une nature GABAergique des axones MCHergiques dans le VLPO (Sapin et coll., 2010 ; Jego et coll., 2013), leur activation optogénétique devrait induire une inhibition des neurones du VLPO qui pourrait conduire à une désinhibition des neurones répresseurs du SP de la vlPAG et ainsi un blocage du SP. Néanmoins ce mécanisme demeure très spéculatif étant donné que nous ne disposons pas à l'heure actuelle de données claires permettant de déterminer si les neurones MCH projettent monosynaptiquement sur les neurones du VLPO actifs pendant le sommeil et si ce sont bien ces derniers qui projettent directement sur la vlPAG. De plus, si une inhibition des neurones du VLPO actifs pendant le SL devait intervenir après la stimulation des axones MCH, elle devrait également conduire à une désinhibition des neurones du LC, du DRN ou du TMN actifs pendant l'éveil (Sherin et coll., 1998 ; Fort et coll., 2009 ; Saper et coll., 2010) et donc favoriser cet état. Un tel effet n'a pas été observé après des stimulations aiguës des axones MCHergiques dans le VLPO, mais semble apparaître pendant la stimulation continue pendant 3 heures, suggérant, pour ce protocole, une accumulation, potentiellement non physiologique, d'un tonus inhibiteur dans le VLPO.

4.4.3. Promotion d'un état intermédiaire entre SL et SP

Nos résultats préliminaires convergent vers la démonstration que la stimulation des axones MCHergiques dans le VLPO suffirait à favoriser l'apparition d'un état de transition intermédiaire entre SL et SP. Des enregistrements juxtacellulaires *in vivo* chez le rat de l'activité de neurones du VLPO ont mis en évidence qu'il existait dans le VLPO deux sous-populations de neurones dont l'activité est plus élevée pendant le SL que pendant l'éveil : certains de ces neurones retrouvent, pendant le SP, une fréquence de décharge proche de celle observée pendant l'éveil, alors que, pour les autres, la fréquence de décharge reste similaire ou augmente pendant le SP (Szymusiak et coll., 1998 ; Takahashi et coll., 2009). De manière intéressante, des enregistrements électrophysiologiques *ex vivo* sur tranches de cerveaux de rats ont également démontré l'existence de deux sous-populations de neurones inhibés par la noradrénaline, donc potentiellement actifs pendant le sommeil, sur la base de leur réponse à l'application de sérotonine : environ la moitié de ces neurones est inhibée par la sérotonine, alors que l'autre moitié est excitée par la sérotonine (Gallopain et coll., 2000 ; Gallopain et coll., 2005). Ces données démontrent une hétérogénéité cellulaire et donc probablement fonctionnelle des neurones du VLPO actifs pendant le sommeil. Pendant l'éveil, l'ensemble des neurones du VLPO actifs pendant le sommeil seraient maintenus inhibés par les systèmes monoaminergiques et cholinergiques associés à l'éveil et l'excitation induite par la sérotonine sur certains d'entre eux ne serait pas suffisante pour lever cette inhibition. Au cours de la transition entre éveil et SL, l'augmentation de la concentration en sérotonine dans la région préoptique (Python et coll., 2001) pourrait permettre une activation des neurones excités par la sérotonine pendant la période d'endormissement (Szymusiak et coll., 1998 ; Takahashi et coll., 2009). Les neurones MCH pourraient ainsi de même moduler différenciellement l'activité de ces sous-populations de neurones dans le VLPO. Il serait alors important d'étudier, par exemple *ex vivo* sur tranches de cerveaux de souris, les effets de la stimulation optogénétique des fibres MCH sur les courants post-synaptiques enregistrés dans

chacune des sous-populations du VLPO ainsi que la réponse de ces neurones à l'application du peptide MCH : des neurones activés par le peptide MCH pourraient correspondre aux neurones actifs pendant les deux états de sommeil et favoriser *via* des projections spécifiques l'apparition d'un état intermédiaire entre SL et SP.

Dans cette étude préliminaire, nous avons donc isolé un élément du réseau neuronal pouvant moduler l'alternance entre SL et SP à travers la projection des neurones MCH sur le VLPO. Des études complémentaires seront néanmoins nécessaires afin de confirmer ces résultats et d'identifier plus précisément de quelle manière les neurones du VLPO sont modulés par l'activation des neurones MCH.

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Rappel des résultats principaux

L'objectif de cette thèse en Neurosciences Expérimentales s'inscrivait dans l'optique générale de disséquer chez la souris les processus neuronaux contrôlant l'alternance physiologique des trois principaux états de vigilance, plus précisément la transition entre l'éveil et sommeil lent, d'une part, et l'alternance du SL vers le SP, d'autre part.

Au cours de ce travail, nous avons tout d'abord démontré à la fois *ex vivo* et *in vivo* que le glucose peut favoriser l'endormissement par son action excitatrice directe sur les neurones promoteurs du SL identifiés au sein du VLPO.

Nous avons, par deux approches méthodologiques différentes et complémentaires, contribué à préciser le rôle physiologique des neurones MCH dans la régulation du cycle veille-sommeil. Nous avons ainsi pu déterminer qu'en plus de faciliter le déclenchement et le maintien du SP lorsqu'ils sont activés, ils pouvaient contrôler certains aspects du SL en favorisant, au cours SL, un SL plus profond ainsi que la terminaison des épisodes de SL.

Forts de ces nouveaux résultats supportant une contribution des neurones MCH à la régulation du SL, nous avons déterminé une voie pouvant potentiellement sous-tendre cette fonction physiologique à travers leurs projections efférentes sur le VLPO, l'un des principaux centres de promotion du SL. Grâce aux outils d'optogénétique, des résultats préliminaires indiquent que la stimulation des axones des neurones MCH dans le VLPO favorise l'apparition d'un état de transition entre SL et SP sans pour autant conduire au SP.

Contrôle par le métabolisme des états de vigilance

1.1. Effet des nutriments sur le sommeil

Les travaux présentés dans le premier article ont permis de mettre en évidence que le glucose peut directement exciter les neurones du VLPO actifs pendant le sommeil et ainsi favoriser l'endormissement. Parallèlement, le glucose est capable d'inhiber les neurones orexine, responsables

du maintien de l'éveil, et d'exciter les neurones MCH impliqués dans la régulation du sommeil (Yamanaka et coll., 2003 ; Burdakov et coll., 2005 ; Burdakov et coll., 2006 ; Kong et coll., 2010). L'action concertée du glucose sur ces différentes structures pourrait ainsi faciliter le déclenchement du sommeil. D'autre part, d'autres structures impliquées dans la régulation du sommeil pourraient également contribuer aux effets somnogènes du glucose. En particulier des ARNm codant pour l'expression des sous-unités Kir6.2 et SUR1 constitutives des canaux K_{ATP} ont été détectés dans le MnPO (Allen Brain Institute, hybridation *in situ*, expériences 69258035 et 70919388). Des canaux K_{ATP} sont également présents dans les neurones dopaminergiques de la VTA (Dragicevic et coll., 2015) ou noradrénergiques du LC (Dunn-Meynell et coll., 1998 ; Koyama et coll., 1999). Des expériences complémentaires seraient donc nécessaires afin de déterminer si le glucose est capable de moduler l'excitabilité des neurones dans ces différentes structures et ainsi contribuer aux effets facilitateur du sommeil du glucose, expliquant aux moins en partie les effets hypnogènes d'une prise alimentaire à haut index glycémique.

Toutefois, le glucose n'est pas le seul nutriment dérivant de la prise alimentaire : les acides aminés et les acides gras peuvent également affecter l'activité de certains neurones (Lam et coll., 2005a ; Lam et coll., 2005b ; Cota et coll., 2006) et éventuellement contribuer au couplage entre métabolisme et sommeil. Il a en effet été démontré que les acides gras peuvent moduler l'activité de neurones hypothalamiques (Oomura et coll., 1975 ; Wang et coll., 2006). De plus, les acides aminés essentiels semblent capables d'exciter les neurones orexine alors que les acides gras n'ont aucun effet sur ces mêmes neurones (Karnani et coll., 2011) suggérant que la prise de repas riches en protéines faciliterait l'éveil. Cette hypothèse est renforcée par la mise en évidence que des repas riches en protéines sont plus efficaces pour promouvoir un éveil cognitif que des repas riches en carbohydrates (Spring et coll., 1982 ; Fischer et coll., 2002).

Ainsi, l'ensemble des nutriments dérivés de la prise alimentaire (glucose, acides aminés et acides gras) pourraient contribuer à la régulation des états de vigilance. Néanmoins des études complémentaires sont nécessaires afin d'identifier l'ensemble des populations neuronales sensibles aux variations de la concentration extracellulaire en nutriments et de quelle manière ces variations sont intégrées afin de moduler la vigilance.

1.2. Effet sur le sommeil d'hormones liées à la prise alimentaire

La leptine est une protéine de 167 acides aminés principalement produite par les adipocytes ; elle est directement impliquée dans la régulation de la satiété par son action anorexigène, de la dépense énergétique et du comportement alimentaire (Friedman et Halaas, 1998). La ghréline est un peptide de 28 acides aminés sécrété principalement par l'estomac (Kojima et coll., 1999) mais également par certains neurones dans le noyau arqué de l'hypothalamus (Lu et coll., 2002) ; elle agit comme un antagoniste de la leptine en favorisant la prise alimentaire et l'augmentation de la masse adipeuse (Chen et coll., 2009).

Ces deux peptides semblent participer à la régulation du sommeil. En effet, l'injection systémique de leptine augmente le SL et diminue le SP (Sinton et coll., 1999). Toutefois, un phénotype similaire a été observé chez des animaux mutants caractérisés par une perte de fonction de la signalisation de la leptine : les souris *ob/ob*, incapables de produire de la leptine (Laposky et coll., 2006), les souris *db/db* portant une mutation de la forme longue du récepteur à la leptine (LRb) (Laposky et coll., 2008) et les souris *knock-out* pour le gène codant pour le récepteur pan-leptine (Wang et coll., 2013b).

Ces souches de souris présentent toutes une augmentation des quantités de SL, une fragmentation du SL et une diminution des quantités de SP. Ces modèles murins sont de plus caractérisés par une obésité prononcée ce qui pose la question de déterminer si les effets observés sur le sommeil sont la conséquence directe de l'obésité ou de la déficience dans la signalisation de la leptine. À l'inverse l'administration intraveineuse, intracérébroventriculaire ou intracérébrale dans l'hypothalamus latéral de ghréline produit une augmentation de l'éveil et une diminution des quantités de SL et de SP (Tolle et coll., 2002 ; Szentirmai et coll., 2006 ; Szentirmai et coll., 2007a ; Szentirmai, 2012). La délétion du gène précurseur de la ghréline entraîne également une diminution du SL au profit de l'éveil (Szentirmai et coll., 2007b) alors qu'aucun effet sur le sommeil n'est observé chez des souris déficientes pour le récepteur de la ghréline (Esposito et coll., 2012).

Ces effets de la leptine et de la ghréline sur le sommeil pourraient être dûs en particulier à leur action sur les neurones orexine. En accord avec les effets induits *in vivo* par ces peptides, l'application de leptine sur des tranches de cerveaux de souris provoque une hyperpolarisation des neurones orexine, alors que l'application de ghréline les dépolarise (Yamanaka et coll., 2003). À l'inverse, l'application de ghréline sur des tranches au niveau pontique produit une dépolarisation des neurones cholinergiques au sein du LDT et le PPT, impliqués dans la régulation du SP (Kim et coll., 2009 ; Takano et coll., 2009), alors que l'administration centrale de ghréline tend à inhiber le SP (Tolle et coll., 2002 ; Szentirmai et coll., 2006 ; Szentirmai et coll., 2007a ; Szentirmai, 2012). Les effets de la ghréline ou de la leptine sur d'autres systèmes exécutifs du sommeil ou de l'éveil n'ont pour le moment pas été étudiés, mais leur contribution au couplage entre états de vigilances et métabolisme est également envisageable.

De plus, d'autres hormones liées à la prise alimentaires pourraient également influencer les états de vigilance, à l'image du neuropeptide Y (Dyzma et coll., 2010) ou de la nesfatine-1 (Fort et coll., 2008 ; Chen et coll., 2012 ; Jego et coll., 2012).

1.3. Interconnexion entre les réseaux neuronaux contrôlant les états de vigilance et le métabolisme

Au delà des effets directs des nutriments ou des peptides liées au contrôle de la prise alimentaire et de la dépense énergétique sur les structures exécutrices de l'éveil ou du sommeil, les réseaux neuronaux régulant ces deux physiologies sont abondamment interconnectés. C'est exactement des neurones sécrétant les peptides orexine ou MCH de l'hypothalamus tubéral qui sont directement impliquées dans la régulation de ces deux physiologies et entretiennent d'abondantes interconnexions entre elles et également avec les différentes structures cérébrales régulant les états de vigilance, le comportement alimentaire et la dépense énergétique (Adamantidis et de Lecea, 2008).

Par ailleurs, les systèmes exécutifs de la régulation du comportement alimentaire et de la dépense énergétique pourraient aussi directement influencer l'activité des neurones localisés dans les centres contrôlant les états de vigilance. En effet, l'hypothalamus ventromédian envoie des projections, certes peu abondantes, vers le TMN, le noyau du raphé dorsal, la PAG, le LC (Canteras et coll., 1994) ou encore le VLPO (Chou et coll., 2002). De même, le noyau arqué de l'hypothalamus projette vers la PAG, le noyau du raphé dorsal, le LC (Sim et Joseph, 1991) ou le VLPO (Chou et coll., 2002).

L'ensemble de ces connections, renforcées par les effets directs des nutriments et des peptides liées à la prise alimentaire, pourraient former des boucles de régulations redondantes permettant d'assurer un couplage stable entre sommeil et métabolisme, dans le but, notamment, qu'un individu puisse élaborer des comportements propices à la recherche de nourriture lorsque ses réserves énergétiques sont faibles, puis de favoriser l'endormissement lorsque un niveau de satiété suffisant a été atteint.

Contribution des neurones MCH à la régulation physiologique du sommeil

2.1. Rôle dans la régulation du SL ou du SP

L'ensemble des données de la littérature démontre un rôle des neurones MCH dans le contrôle du sommeil. Néanmoins, leur implication dans la régulation spécifique du SL ou du SP reste à déterminer. Les premières expériences ont mis en évidence que le marqueur d'activation *c-Fos* était très fortement exprimé dans les neurones MCH (environ 60 % des neurones MCH) après une hypersomnie de SP faisant suite à une privation longue et spécifique de cet état (Verret et coll., 2003) alors qu'il ne s'exprime pas en condition basale. De plus, les neurones MCH expriment très faiblement *c-Fos* (environ 3 % des neurones MCH) après un rebond faisant suite à une privation de quelques heures de sommeil total, ce qui est néanmoins significativement supérieur au niveau d'expression relevé en condition basale (moins de 0,5 % des neurones MCH) (Modirrousta et coll., 2005).

Par la suite, de nombreuses études se sont intéressées à la contribution du peptide MCH dans le contrôle des états de vigilance. Ainsi, l'injection intracérébroventriculaire de MCH produit une augmentation des quantités de SL et de SP (Verret et coll., 2003), alors que l'administration sous-cutanée d'un antagoniste du récepteur MCH-R1 conduit à une diminution des quantités de SL profond et de SP (Ahnaou et coll., 2008). L'invalidation du gène codant pour l'expression du peptide MCH conduit, chez les souris mutantes, à une diminution des quantités de SL, particulièrement pendant la période diurne (Willie et coll., 2008) alors que l'invalidation du gène codant pour l'expression du récepteur MCH-R1 induit une augmentation des quantités de SP et du nombre d'épisodes de SP pendant la période diurne (Adamantidis et coll., 2008).

Il faut également garder en mémoire que les neurones MCH ne sécrètent pas uniquement le peptide MCH car ils co-expriment plusieurs neuropeptides comme la nesfatine-1, le CART, le peptide NEI (Hanriot et coll., 2007 ; Fort et coll., 2008 ; Jégo et coll., 2012). Plus importante encore est leur potentielle capacité à libérer au niveau de leurs terminaisons synaptiques du GABA – ces neurones exprimant l'ARNm codant pour GAD67 mais pas vGAT (Sapin et coll., 2010 ; Jégo et coll., 2013) – et du glutamate (Chee et coll., 2015), deux neurotransmetteurs à action antagoniste et plus rapide que celles exercées par des neuropeptides. Aussi, dans le cadre de cette

thèse, il était absolument crucial, pour comprendre le rôle physiologique des neurones MCH, de moduler expérimentalement leur activité plutôt que de se concentrer sur la transmission liée au seul peptide MCH qui ne représente qu'une fraction de leurs capacités de communication avec leurs cibles cérébrales.

Dans cette optique, plusieurs techniques ont été mises en œuvre récemment par d'autres équipes de recherche : l'optogénétique, la pharmacogénétique et la lésion spécifique de ces neurones (Jego et coll., 2013 ; Konadhode et coll., 2013 ; Tsunematsu et coll., 2014 ; Varin et coll., 2015a). Tout d'abord, les différentes approches par « gain de fonction » des neurones MCH, par optogénétique ou pharmacogénétique, convergent vers la démonstration que lorsqu'ils sont activés, ces neurones favorisent l'entrée en SP et la consolidation de cet état (Jego et coll., 2013 ; Konadhode et coll., 2013 ; Tsunematsu et coll., 2014). Toutefois, ces mêmes études divergent quant à la contribution des neurones MCH dans la régulation du SL : l'activation optogénétique semi-chronique favorise le SL (Konadhode et coll., 2013) alors que la stimulation optogénétique spécifiquement pendant le SL augmente la probabilité de transition vers le SP sans affecter la durée des épisodes de SL (Jego et coll., 2013), la stimulation optogénétique continue pendant 3 heures diminue les quantités et la durée moyenne des épisodes de SL (Tsunematsu et coll., 2014), alors que nous montrons dans cette thèse que l'activation pharmacogénétique diminue les quantités de SL, ce dernier étant caractérisé par des épisodes plus courts mais plus profonds. Par ailleurs, la « perte de fonction » par optogénétique des neurones MCH n'a pas permis de mettre en évidence d'effet prédominant sur les états de vigilance (Jego et coll., 2013 ; Tsunematsu et coll., 2014) alors que nous avons observé que l'inhibition pharmacogénétique des neurones MCH induit une augmentation des quantités de SL caractérisé par des épisodes plus longs mais potentiellement composés d'un SL plus léger. De même, la lésion spécifique des neurones MCH n'a pas permis de mettre en évidence d'effet prédominant sur le SP mais induit des altérations du SL qui est plus fragmenté et moins profond (Tsunematsu et coll., 2014 ; Varin et coll., 2015a).

Les résultats de nos expériences nous amènent également à nous interroger sur l'implication des neurones MCH dans le contrôle du SP dans des conditions physiologiques basales. L'ensemble des expériences « perte de fonction » des neurones MCH ont en effet échoué à démontrer des altérations significatives du SP (Jego et coll., 2013 ; Tsunematsu et coll., 2014) alors que des effets solides sont reportés concernant le SL (Tsunematsu et coll., 2014 ; Varin et coll., 2015a). Il est évident que cette absence d'effet sur le SP pourrait être la conséquence d'une ablation ou d'une inhibition incomplètes des neurones MCH, de mécanismes de compensation ou d'une très forte résilience des réseaux neuronaux contrôlant le SP (voir discussion de l'Article 2). Cependant, aucune diminution des quantités de SP, du nombre d'épisodes de SP ou de la durée moyenne des épisodes de SP n'a été rapportée en utilisant ces approches d'inhibition optogénétique et pharmacogénétique ou de lésion cellulaire génétiquement ciblée.

En conclusion, nous proposons donc que les neurones MCH contribueraient, en conditions basales, à la régulation du SL en favorisant un SL plus profond, puis en potentialisant l'arrêt des épisodes de SL. Un tel mécanisme pourrait alors faciliter la transition vers le SP. De plus, les neurones MCH pourraient également contribuer à la consolidation du SP lorsqu'ils sont suffisamment sollicités.

2.2. Contribution des neurones MCH au contrôle du SP en conditions dégradées

Si les neurones MCH ne contribuent pas au SP basal, les observations optogénétiques ou pharmacogénétiques, ainsi que la pharmacologie du peptide MCH, démontrent clairement que lorsqu'ils sont – suffisamment – activés, les neurones MCH favorisent le déclenchement et la consolidation du SP. Ainsi la question peut se poser de savoir si ce niveau d'activation est réellement atteint dans nos conditions basales d'enregistrement du cycle veille-sommeil chez la souris, et d'autre part quelles conditions expérimentales permettent de l'atteindre.

Les expériences d'activation des neurones MCH par optogénétique ont révélé des effets sur la promotion et la consolidation du SP pour des fréquences de stimulation – supposées mimer des fréquences physiologiques de décharge en potentiels d'action des neurones MCH – de 10–20 Hz (Jego et coll., 2013 ; Konadhode et coll., 2013 ; Tsunematsu et coll., 2014), qui se situent bien au-delà de la fréquence de décharge moyenne des neurones MCH pendant le SP mesurée par des enregistrements juxtacellulaires au cours du cycle veille-sommeil chez le rat en contention stéréotaxique et qui se situe autour de 1 Hz (Hassani et coll., 2009). Or, il a été rapporté que la stimulation optogénétique des neurones MCH à 5 Hz n'affecte pas le SP (Konadhode et coll., 2013) et la stimulation à une fréquence de 1 Hz appliquée pendant les épisodes de SP ne favorise pas leur consolidation (Jego et coll., 2013). Ces effets de l'activation des neurones MCH sur la consolidation du SP pourraient donc intervenir pour des fréquences de décharge supérieures à celle rapportée *in vivo* (1 Hz), qui seraient éventuellement atteintes au cours de certains états neurophysiologiques « dégradés ». Par exemple, les niveaux d'expression du marqueur d'activation *c-Fos* sont très élevés dans les neurones MCH après une hypersomnie de SP faisant suite à sa privation spécifique (Verret et coll., 2003). À l'inverse, les niveaux d'expression de *c-Fos* sont quasi-nuls dans les neurones MCH à la suite à un rebond de sommeil suivant une privation totale (Modirrousta et coll., 2005). Avec le même paradigme expérimental, nous avons pourtant montré que la lésion partielle des neurones MCH perturbe le SL pendant la période de récupération (Varin et coll., 2015a), ce qui suggère que les neurones MCH sont bien recrutés dans un tel paradigme alors qu'ils n'expriment pas ou très faiblement *c-Fos*. Ainsi, étant donné que l'intensité du marquage *c-Fos* est sensé représenter le niveau d'activation de neurones, il est possible d'imaginer que la fréquence de décharge des neurones MCH pendant l'hypersomnie de SP suivant une privation spécifique de SP soit bien plus élevée que les niveaux mesurés en condition basale.

La privation de SP pourrait ainsi induire, au niveau des neurones MCH, l'accumulation d'un tonus exciteur leur permettant d'atteindre pendant la période de récupération des fréquences de décharge plus élevées conduisant ainsi une augmentation de la consolidation du SP, à l'image des neurones du VLPO actifs pendant le sommeil qui doublent leurs fréquences de décharge après une privation totale de sommeil (Szymusiak et coll., 1998). Cette hypothèse devra être néanmoins confirmée notamment par des enregistrements *in vivo* de l'activité des neurones MCH pendant des privations de sommeil total ou spécifique de SP et pendant les périodes de récupération suivantes.

De même, les neurones MCH pourraient participer à la régulation du SP dans des conditions de challenge métabolique. En effet, chez des souris invalidées pour le gène codant pour l'expression du peptide MCH, le SP n'est pas altéré en conditions basales, mais ces animaux présentent une diminution du SP plus importante que les animaux sauvages en réponse à une privation alimentaire (Willie et coll., 2008). Les neurones MCH pourraient ainsi contribuer à l'initiation et à la

consolidation du SP dans des conditions de challenge métabolique, renforçant, de par là même, le couplage étroit existant entre sommeil et régulation de la dépense énergétique.

De part leur position dans le réseau neuronal hypothalamique et d'après les perturbations de la distribution circadienne du SP observées chez des animaux invalidés pour le récepteur MCH-R1 ou porteurs d'une lésion partielle des neurones MCH (Adamantidis et coll., 2008 ; Varin et coll., 2015a), ces derniers pourraient être également impliqués dans la régulation circadienne du SP (discussion Article 2).

2.3. Mécanismes d'action des neurones MCH pendant les états de vigilance

Pendant l'éveil, les neurones MCH ne sont pas actifs (Hassani et coll., 2009) et probablement maintenus hyperpolarisés par l'action des différents systèmes ascendants associés à l'éveil. En effet, les neurones MCH sont hyperpolarisés par la noradrénaline, l'acétylcholine, la sérotonine et l'histamine (Gao et coll., 2003 ; van den Pol et coll., 2004 ; Bayer et coll., 2005 ; Parks et coll., 2014a). De plus, bien qu'une faible proportion de neurones MCH soit excitée par le peptide orexine (van den Pol et coll., 2004 ; Parks et coll., 2014b), il a été démontré que l'activation optogénétique des neurones orexine provoque une inhibition des neurones MCH par l'augmentation des courants post-synaptiques inhibiteurs probablement par le recrutement d'interneurones GABAergiques (Apergis-Schoute et coll., 2015). Ainsi, l'ensemble des systèmes associés à l'éveil semble capable d'inhiber les neurones MCH et de les maintenir silencieux pendant l'éveil.

À l'inverse lorsque les neurones MCH sont activés, ils pourraient contribuer à inhiber l'éveil au profit du sommeil. En effet, ces neurones envoient des projections axonales vers l'ensemble des régions impliquées dans le contrôle de l'éveil (Bittencourt et coll., 1992). En particulier, les terminaisons des neurones MCH dans le LC pourraient directement inhiber les neurones noradrénergiques par la libération de GABA (Del Cid-Pellitero et Jones, 2012) et la stimulation optogénétique de ces axones dans le TMN produit des courants GABAergiques sur les neurones histaminergiques (Jego et coll., 2013). De plus, le peptide MCH pourrait indirectement favoriser l'inhibition des neurones orexine (Rao et coll., 2008). Ainsi, les neurones MCH pourraient contribuer, lorsqu'ils sont actifs, à l'inhibition des systèmes d'éveil pour maintenir le sommeil. L'augmentation de l'activité des neurones MCH entre SL et SP, ou pendant des états dégradés pourrait également contribuer à l'inhibition des neurones de la vLPAG répresseurs du SP, facilitant ainsi le déclenchement et le maintien du SP (Bittencourt et coll., 1992 ; Saito et coll., 2001 ; Clement et coll., 2012). De manière surprenante, les neurones MCH pourraient également être impliqués dans une boucle auto-inhibitrice car l'application de peptide MCH sur les neurones MCH, sans modifier le potentiel de membrane, diminue l'amplitude des courants calciques dépendants du voltage (Broberger et coll., 1998 ; Elias et coll., 1998 ; Gao et coll., 2003)

Néanmoins, les effets du peptide MCH sur les différentes cibles du réseau contrôlant le cycle veille sommeil ne peuvent pas être généralisés à l'ensemble des populations neuronales. Les récepteurs MCH-R1 peuvent être couplés à des protéines Gi/o ou Gq, et ce couplage ainsi que la localisation intracellulaire des récepteurs semblent régulés par des modifications post-traductionnelles (Saito et coll., 2013). Par exemple, l'application de peptide MCH peut induire des effets excitateurs et inhibiteurs sur des neurones de l'hypothalamus ventromédian ou du noyau arqué de l'hypothalamus et la proportion de neurones excités et inhibés par le peptide MCH peut être modulée en fonction des conditions expérimentales (par exemple, entre des animaux

contrôle et des animaux privés de nourriture) (Davidowa et coll., 2002). La nature exclusivement GABAergique des neurones MCH (Sapin et coll., 2010 ; Del Cid-Pellitero et Jones, 2012 ; Jégo et coll., 2013) a également été remise en cause récemment par la démonstration que ces neurones pouvaient libérer du glutamate sur des neurones du septum latéral (Chee et coll., 2015) illustrant un possible « bilinguisme » entre les neurones MCH et leurs cibles à l'image des neurones de la VTA (Root et coll., 2014 ; Shabel et coll., 2014), des cellules granulaires hippocampiques (Münster-Wandowski et coll., 2013), du noyau supra-mamillaire latéral (Boulland et coll., 2009 ; Soussi et coll., 2010 ; Billwiller, 2016) ou dans le bulbe olfactif (Didier et coll., 2001). Cette dernière observation évoque également la possibilité d'une grande diversité cellulaire au sein des neurones exprimant le peptide MCH. Bien que l'existence d'au moins deux sous-populations de neurones MCH ait été rapportée sur la base de leur date de genèse embryonnaire, de l'expression du peptide CART et de leur profil de projections efférentes (Cvetkovic et coll., 2004 ; Croizier et coll., 2010), d'autres sous-populations pourraient encore être ségréguées sur la base d'autres critères, moléculaires et génétiques par exemple.

La démonstration de l'implication des neurones MCH dans la régulation du sommeil ne doit pas néanmoins masquer le fait que ces neurones ne représentent que la moitié environ des neurones activés au sein de l'hypothalamus tubéral après une hypersomnie de SP sur la base de l'expression du marqueur d'activité neuronale *c-Fos* (Verret et coll., 2003). En particulier, un grand nombre de ces neurones activés expriment l'ARNm codant pour la GAD67 et seraient ainsi de nature GABAergique (Sapin et coll., 2010). Des enregistrements juxtacellulaires *in vivo* au cours du cycle veille-sommeil ont ensuite confirmé la présence dans cette zone hypothalamique de neurones GABAergiques – identifiés sur la base de l'expression de l'ARNm *vGAT* – actifs pendant le sommeil ou actifs pendant le SP (Hassani et coll., 2010). Ainsi d'autres neurones GABAergiques non-MCH pourraient contribuer également à la régulation du sommeil. Néanmoins, la stimulation optogénétique de neurones GABAergiques (souris *vGAT-cre*) de l'hypothalamus latéral n'exprimant pas le peptide MCH semble, à l'inverse, favoriser l'éveil (Herrera et coll., 2015). Ces observations divergentes sont probablement en lien avec la grande diversité cellulaire et probablement fonctionnelle relevée pour les neurones GABAergiques exprimant GAD65 et non-MCH de l'hypothalamus postérieur (Karnani et coll., 2013).

Ainsi, des travaux complémentaires sont nécessaires afin de rendre compte de la contribution à la régulation des états de vigilance de ces différentes sous-populations, d'une part, de neurones MCH, et, d'autre part, de neurones GABAergiques non-MCH, ainsi que leurs interconnexions dans le réseau local de l'hypothalamus tubéral.

Effet des neurones MCH sur le VLPO et régulation du sommeil

3.1. Promotion d'un état de transition entre SL et SP

En activant par optogénétique les terminaisons axonales des neurones MCH spécifiquement dans le VLPO, nos premiers résultats indiquent que cette voie serait suffisante pour favoriser l'apparition d'un état de transition, intermédiaire entre le SL et le SP. Cet état intermédiaire se caractérise par la présence dans l'enregistrement EEG d'une superposition d'ondes lentes, caractéristiques du SL, et d'oscillations plus rapides, dans la bande thêta, proches de celles observées pendant le SP, et probablement différentes des fuseaux de sommeil. De plus, l'atonie musculaire caractéristique du SP n'est pas observée pendant cet état de transition.

En condition basale, cet état de transition intervient à la fin d'environ 60–70 % des épisodes de SL, dure en moyenne une dizaine de secondes et se poursuit dans environ 30 % des cas par du SP. Au cours de nos enregistrements, nous n'avons jamais observé de transition directe du SL vers le SP sans passer par cet état intermédiaire. Cet état intermédiaire serait donc une étape nécessaire mais non suffisante à l'occurrence du SP, ce qui suggérerait une activation/inactivation séquentielle et « relativement lente » de populations neuronales, à partir du SL, pour permettre l'apparition du SP. Dans ce contexte, l'activation optogénétique des terminaisons axonales des neurones MCH dans le VLPO favoriserait cet état intermédiaire, en particulier lorsque la stimulation laser est déclenchée pendant le SL. Ainsi la modulation de l'activité de neurones du VLPO pourrait permettre de favoriser l'activation de structures impliquées dans la genèse de l'oscillation thêta sans pour autant conduire à l'activation des réseaux responsables du déclenchement du SP et en particulier les systèmes pontiques générateurs du SP (vlPAG, SLD, GiV). Un tel mécanisme pourrait intervenir par exemple par le truchement des nombreuses projections des neurones du VLPO vers le septum latéral ou la bande diagonale de Broca alors que ces mêmes neurones ne projettent que peu vers les structures caudales exécutrices du SP (Sherin et coll., 1998).

3.2. Diversité cellulaire du VLPO

Le VLPO est une structure hétérogène dans laquelle plusieurs sous-populations neuronales ont été identifiées. Deux types de neurones ont pu être définis sur la base de leurs propriétés électrophysiologiques, morphologiques et leur réponse à l'application de noradrénaline (Gallopain et coll., 2000 ; Gallopain, 2002 ; Matsuo et coll., 2003 ; Gallopain et coll., 2004 ; Saint-Mleux et coll., 2004 ; Gallopain et coll., 2005 ; Saint-Mleux et coll., 2007 ; Liu et coll., 2010 ; Wang et coll., 2013a). Une première sous-population, pouvant correspondre aux neurones actifs pendant le sommeil, est caractérisée par une morphologie triangulaire, la présence d'un potentiel calcique activé à bas seuil et par un effet inhibiteur de la noradrénaline et de l'acétylcholine. La seconde sous-population se caractérise par une morphologie bipolaire, l'absence de potentiel calcique activé à bas seuil et un effet excitateur de la noradrénaline et de l'acétylcholine ; ils pourraient correspondre aux neurones actifs pendant l'éveil enregistrés *in vivo* (Szymusiak et coll., 1998 ;

Takahashi et coll., 2009). De plus, les effets de la sérotonine permettent de définir deux sous-populations de neurones potentiellement actifs pendant le SL : les neurones de type-1 sont inhibés par la sérotonine alors que les neurones de type-2 sont excités par la sérotonine (Gallopini et coll., 2005).

Ces deux sous-populations de neurones inhibés par la noradrénaline et potentiellement actifs pendant le SL pourraient intervenir différemment dans les mécanismes d'induction et de consolidation du SL du fait du rôle de la sérotonine dans le maintien de l'éveil mais aussi dans la genèse du SL (Jouvet, 1999). Pendant l'éveil l'ensemble des neurones de type-1 ou de type-2 sont maintenus hyperpolarisés par les systèmes monoaminergiques et cholinergiques associés à l'éveil, l'effet dépolarisant de la sérotonine seule sur les neurones de type-2 ne suffisant pas à balancer cette hyperpolarisation. Au moment de l'endormissement, l'augmentation de la libération de sérotonine dans la région préoptique (Python et coll., 2001), associée à une diminution de l'activité des systèmes d'éveil, pourrait favoriser l'activation des neurones actifs pendant le sommeil de type-2. L'activation de ces derniers pendant la transition entre éveil et SL pourrait favoriser l'inhibition des systèmes d'éveil et ainsi renforcer leur propre activation et également conduire à la désinhibition des neurones de type-1, complétant ainsi la transition vers le SL. Ce mécanisme hypothétique est renforcé par l'existence dans le VLPO de neurones dont la fréquence de décharge augmente durant la période d'endormissement précédant le SL (Szymusiak et coll., 1998 ; Takahashi et coll., 2009).

Ces deux sous-populations de neurones du VLPO actifs pendant le sommeil semblent ainsi avoir des rôles différents pendant les transitions entre éveil et SL, et par extension pourraient probablement également avoir des contributions physiologiques différentes pendant les phases de transition entre SL et SP car certains neurones du VLPO actifs pendant le SL le sont également pendant le SP alors que d'autres sont spécifiquement actifs pendant le SL (Szymusiak et coll., 1998 ; Takahashi et coll., 2009).

3.3. Neuromodulation des neurones du VLPO par les neurones MCH et le peptide MCH

Cette diversité cellulaire et potentiellement fonctionnelle des neurones du VLPO doit évidemment être sérieusement considérée pour l'interprétation des résultats obtenus *in vivo* par la stimulation optogénétique des terminaisons axonales MCH dans le VLPO. Des données électrophysiologiques préliminaires indiquent que l'application du peptide MCH sur des tranches de cerveaux de souris contenant le VLPO inhiberait les neurones actifs pendant le sommeil de type-1 alors qu'il exciterait les neurones actifs pendant le sommeil de type-2 (Olive, 2013). Ces premiers résultats démontrent une modulation différente des neurones du VLPO par les neurones MCH. Les neurones MCH ne sécrétant pas uniquement ce neuropeptide, ces observations doivent être confirmées par l'analyse *ex vivo*, sur tranches de cerveaux de souris exprimant la Chr2 dans les axones des neurones MCH, des courants post-synaptiques évoqués par la photostimulation dans les différentes sous-populations de neurones du VLPO. Il sera important de déterminer la nature GABAergique (Del Cid-Pellitero et Jones, 2012 ; Jégo et coll., 2013) ou glutamatergique (Chee et coll., 2015) de ces courants évoqués ainsi que leur amplitude en fonction des différents sous-types cellulaires. Ces expériences complémentaires permettraient de déterminer la nature et la contribution de la transmission « rapide » glutamatergique ou

GABAergique sur l'ensemble des types cellulaires présents dans le VLPO et ainsi proposer une interprétation fonctionnelle aux résultats observés *in vivo*.

En supposant que les effets de la neurotransmission « rapide » coïncident avec les effets peptidergiques, alors les neurones de type-1 inhibés par la sérotonine et la MCH pourraient correspondre aux neurones du VLPO actifs uniquement pendant le SL, alors que les neurones de type-2 excités par la sérotonine pourraient correspondre aux neurones actifs pendant le SL et le SP. L'inhibition des premiers et le maintien ou le renforcement de l'activité des seconds pourraient alors, grâce à des projections spécifiques restant à mettre en évidence et à décrire, favoriser l'émergence d'un état de transition entre SL et SP qui semble être une étape nécessaire à la mise en place et au déclenchement du SP.

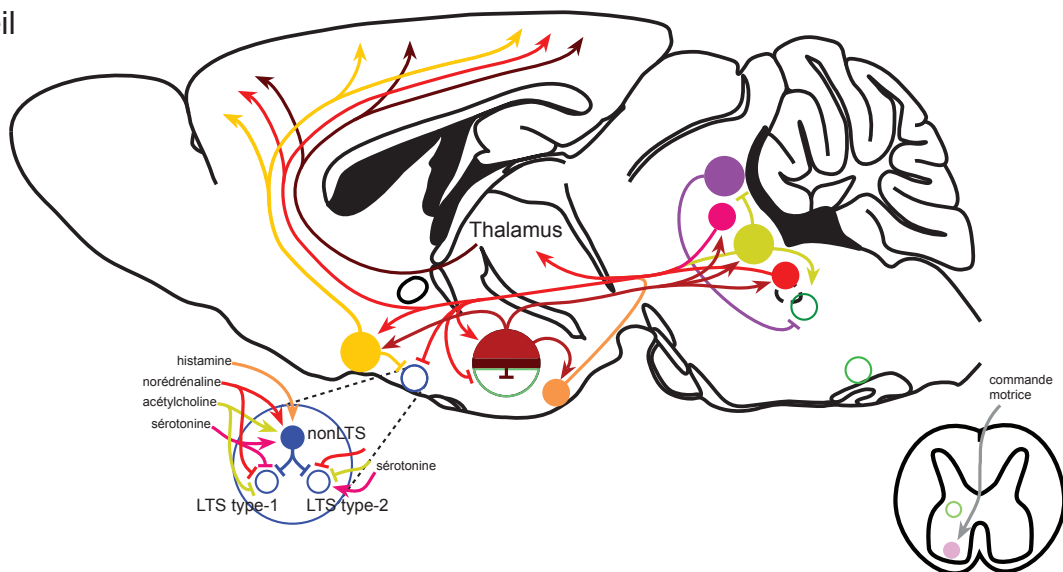
Mise à jour du modèle du réseau neuronal contrôlant l'alternance entre états de vigilance

L'ensemble des travaux décrits dans ce manuscrit permet de proposer certains ajustements dans le modèle décrivant les réseaux neuronaux responsables de l'alternance entre les états de vigilance (Figure 3.1).

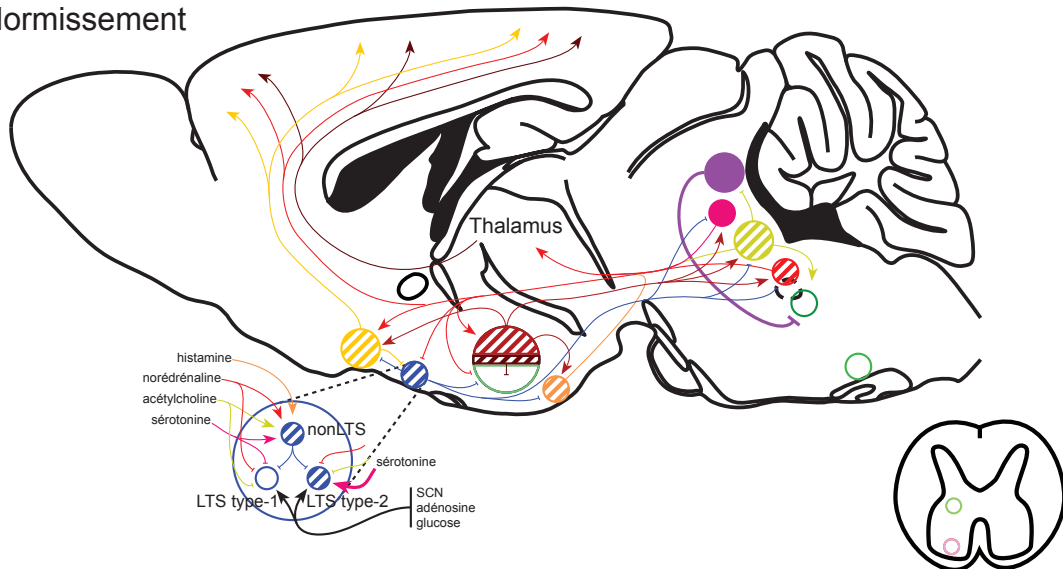
Pendant l'éveil l'ensemble des systèmes monoaminergiques et cholinergiques sont actifs et participent par des projections vers le thalamus et le néocortex à l'activation corticale. De plus ces systèmes contribuent, directement ou indirectement par le recrutement d'interneurones locaux (neurones non-LTS), à maintenir hyperpolarisés les neurones LTS du VLPO actifs pendant le sommeil (Figure 3.1 Éveil). Au moment de l'endormissement (transition de l'éveil vers le SL), la diminution de l'activité des systèmes associés à l'éveil associée à une forte augmentation de la libération de sérotonine dans le VLPO pourrait conduire à l'activation des neurones LTS de type-2 qui à leur tour pourraient renforcer l'inhibition des systèmes d'éveil (Figure 3.1 Endormissement). La levée d'inhibition résultante sur les neurones du VLPO de type-1 complèterait alors la transition vers le SL. Ainsi, pendant le SL, l'ensemble des systèmes associés à l'éveil sont maintenus inhibés par les neurones de type-1 et de type-2 du VLPO, ce qui permet le développement d'oscillations lentes au niveau cortical (Figure 3.1 Sommeil lent). De plus, pendant les phases plus avancées du SL, une possible activation des neurones MCH pourrait participer à la modulation de ces ondes lentes.

Au cours de la transition entre le SL et le SP, les neurones MCH pourraient stimuler les neurones du VLPO de type-2 et inhiber ceux de type-1. En imaginant – et cela reste à démontrer – que les neurones de type-2 ne projettent pas sur les populations cholinergiques du TB et du LDT/PPT, l'inhibition des neurones de type-1 pourrait permettre l'activation du TB et du LDT/PPT favorisant ainsi l'émergence d'activités rapides sur l'enregistrement EEG cortical. En parallèle, les neurones MCH pourraient également favoriser l'inhibition des neurones de la vIPAG répresseurs du SP (Figure 3.1 État intermédiaire). Finalement, pendant le SP, l'inhibition de la vIPAG

Éveil



Endormissement

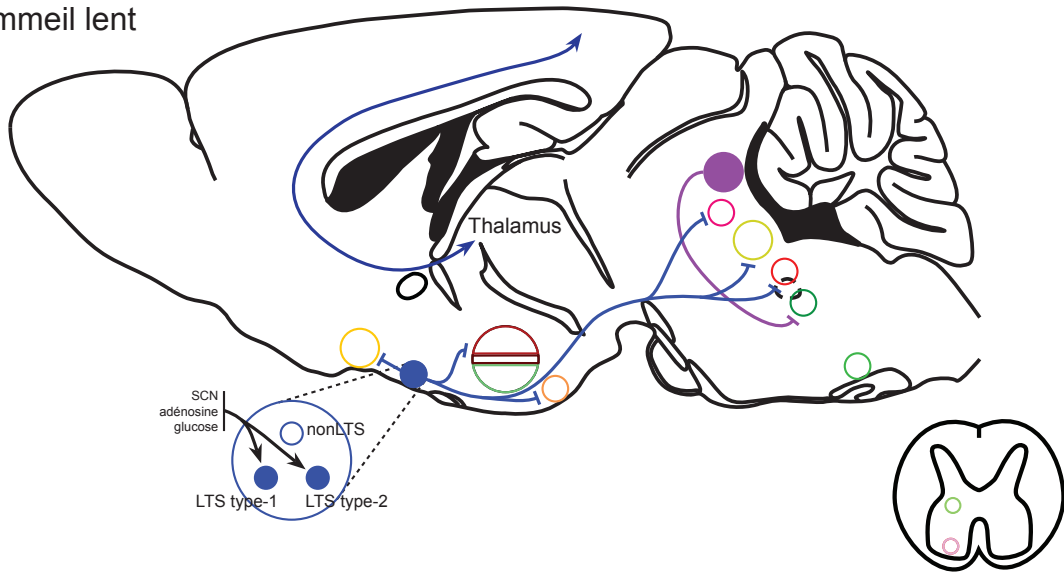


- | | | |
|----------------------------|---------------------------|---------------------------------------|
| ● LC (noradrénaline) | ● LDT/PPT (acétylcholine) | ● SLD (glutamate, GABA) |
| ● DR (sérotonine) | ● TB (acétylcholine) | ● GiV (GABA, glycine) |
| ● TMN (histamine) | ● VLPO (GABA) | ● interneurone spinal (GABA, glycine) |
| ● LHA (orexine, glutamate) | ● LHA (MCH, GABA) | ● motoneurone (glutamate) |
| ● LHA (GABA, non-MCH) | ● vlPAG/DpMe (GABA) | |

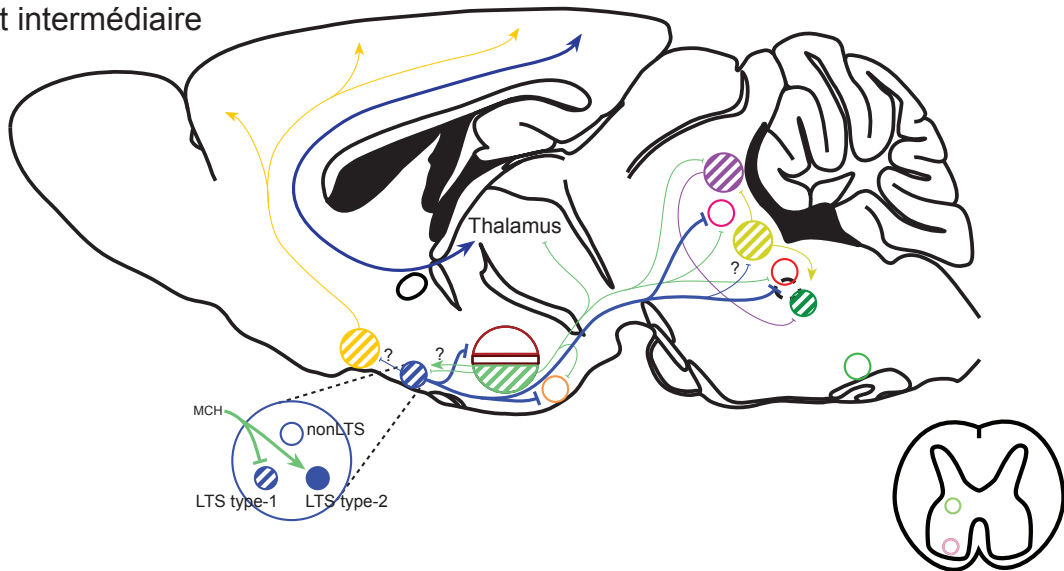
Figure 3.1. Schéma proposant un modèle des interactions neuronales impliquées dans le contrôle des états de vigilance et de leur alternance.

Dans ce modèle, les différentes aires cérébrales impliquées dans le contrôle des états de vigilance et des transitions entre ces états sont représentées par des cercles de différentes couleurs. Pour chacune des aires considérées dans ce modèle, les cercles pleins représentent des aires actives pendant l'état de vigilance, les cercles vides représentent des aires inactives et les cercles hachurés indiquent un niveau d'activation intermédiaire. Les connexions entre les différentes structures sont représentées par des traits dont l'épaisseur reflète la force de la connexion et terminés par des flèches ou des barres pour les projections excitatrices et inhibitrices, respectivement. *Abréviations : LC, locus coeruleus ; DR, raphé dorsal ; TMN, noyau tubéromammillaire ; LHA, hypothalamus latéral ; LDT/PPT : noyaux tegmental latérodorsal et tegmental pédonculo-pontin ; TB : télencéphale basal ; VLPO ; noyau préoptique ventrolatéral ; vlPAG/DpMe : substance grise périaqueducule ventrolatérale et noyau réticulé mésencéphalique profond (DpMe) ; SLD : noyau sublatérodorsal ; GiV : noyau gigantocellulaire ventral*

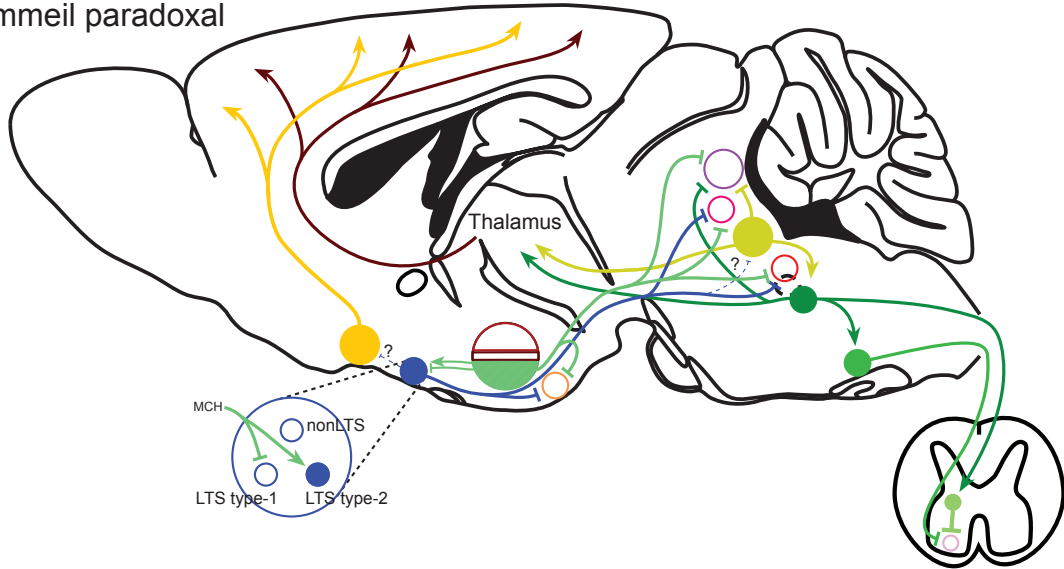
Sommeil lent



État intermédiaire



Sommeil paradoxal



- | | | |
|----------------------------|---------------------------|---------------------------------------|
| ● LC (noradrénaline) | ● LDT/PPT (acétylcholine) | ● SLD (glutamate, GABA) |
| ● DR (sérotonine) | ● TB (acétylcholine) | ● GiV (GABA, glycine) |
| ● TMN (histamine) | ● VLPO (GABA) | ● interneurone spinal (GABA, glycine) |
| ● LHA (orexine, glutamate) | ● LHA (MCH, GABA) | ● motoneurone (glutamate) |
| ● LHA (GABA, non-MCH) | ● VIPAG/DpMe (GABA) | |

conduit à l'activation des neurones exécutifs du SP du SLD. La stabilisation du SP peut également être renforcée par l'action des neurones MCH sur la vlPAG et l'ensemble des systèmes monoaminergiques (Figure 3.1 Sommeil paradoxal).

Perspectives

Dans ce manuscrit, l'importance du VLPO – et en particulier des neurones LTS – dans le déclenchement et le maintien du SL a été longuement discuté et défendu. Néanmoins, à l'heure actuelle, la preuve directe que ces neurones LTS sont effectivement actifs pendant le sommeil et qu'ils sont responsables du déclenchement du sommeil reste à établir. En effet, l'identification *ex vivo* des neurones LTS comme potentiellement actifs pendant le sommeil repose essentiellement sur leur hyperpolarisation induite par la noradrénaline ou l'acétylcholine (Gallopain et coll., 2000 ; Gallopain, 2002 ; Gallopain et coll., 2004 ; Gallopain et coll., 2005) et la démonstration fonctionnelle d'une contribution du VLPO à la régulation du sommeil repose sur des observations corrélatives (Sherin et coll., 1996 ; Szymusiak et coll., 1998 ; Gaus et coll., 2002) ou sur des lésions neurotoxiques de cette région (Lu et coll., 2000). Ainsi, et même si de nombreuses données expérimentales convergent vers l'idée que les neurones LTS du VLPO seraient importants dans la genèse du sommeil (Scammell et coll., 2001 ; Sun et coll., 2001 ; Chamberlin et coll., 2003 ; Morairty et coll., 2004 ; Saint-Mleux et coll., 2004 ; Saint-Mleux et coll., 2007 ; Greco et coll., 2008 ; Lu et coll., 2008 ; Liu et coll., 2010 ; Eikermann et coll., 2011 ; Moore et coll., 2012 ; Wang et coll., 2013a ; Varin et coll., 2015b), la preuve directe d'un tel rôle est manquante. Ce point est fondamental, néanmoins y apporter une réponse claire et définitive par des approches telles que l'optogénétique ou la pharmacogénétique demeure compliqué car il n'existe pas de marqueur spécifique des neurones LTS du VLPO qui pourraient permettre de cibler ces neurones. De nouveaux outils pourraient cependant permettre de dépasser ce problème. Par exemple, l'utilisation de souris exprimant la protéine tétracycline transactivator (tTA) sous contrôle du promoteur c-Fos (souris cFos-tTA) croisées avec des souris rapotrices tetO-GFP (Taylor et coll., 2013) pourraient permettre, en l'absence de doxycycline, l'expression d'un rapporteur fluorescent spécifiquement dans des neurones actifs pendant certaines conditions telles qu'un rebond de sommeil faisant suite à une privation totale. Dans cette condition, la distribution de la fluorescence GFP devrait correspondre à la distribution des neurones c-Fos observée après une hypersomnie de sommeil (Sherin et coll., 1996 ; Gaus et coll., 2002), donc actifs pendant le sommeil. Des enregistrements électrophysiologiques *ex vivo* devraient ainsi permettre de confirmer que les neurones actifs pendant le sommeil exprimant le rapporteur GFP correspondent bien aux neurones caractérisés par la présence d'un LTS et hyperpolarisés par la noradrénaline (Gallopain et coll., 2000). Cette même approche pourrait être mise en œuvre *in vivo*, cette fois-ci en injectant des AAV tetO-ChR2 ou tetO-Arch dans le VLPO de souris cFos-tTA, afin d'activer ou d'inhiber par optogénétique les neurones du VLPO actifs pendant une hypersomnie et ainsi démontrer de manière directe et causale le rôle de ces neurones dans la genèse et le maintien du sommeil (Ramirez et coll., 2013).

D'autre part, notre avancement dans la compréhension des mécanismes contrôlant les états de vigilance se retrouve confrontée à la dissection d'un réseau complexe faisant intervenir de nombreuses populations neuronales hétérogènes et interagissant entre elles. Ce fait est d'autant plus

saillant lorsqu'il s'agit de décrire la succession d'activations/inactivations de structures cérébrales conduisant à l'alternance entre états de vigilance. Il serait ainsi particulièrement intéressant de pouvoir enregistrer de manière synchrone l'activité de plusieurs populations neuronales. L'utilisation de techniques d'enregistrement multi-unitaire et multi-sites pourrait permettre de décrire et de suivre, au cours des transitions entre états de vigilance, ces cascades d'activations/inactivations entre diverses populations. De plus, cette technique pourrait être couplée à l'optogénétique permettant ainsi d'identifier, sur la base de leur profil neurochimique, les cellules enregistrées (Anikeeva et coll., 2012 ; Weber et coll., 2015 ; Xu et coll., 2015). En complément de cette dernière approche, et pour poursuivre la description fonctionnelle de ce réseau complexe, il serait également intéressant de combiner l'excitation ou l'inhibition optogénétique ou pharmacogénétique de plusieurs structures en même temps, à l'image de ce qui a d'ors et déjà été mis en œuvre par l'excitation et l'inhibition simultanées des neurones orexine d'une part et noradrénergiques du LC d'autre part (Carter et coll., 2012). Ainsi est-il possible de combiner l'excitation de plusieurs populations neuronales en associant une channelrhodopsine activable par une lumière bleue et des mutants de la channelrhodopsine dont le pic d'excitation est décalé vers le rouge (Chuong et coll., 2014 ; Klapoetke et coll., 2014). De même la combinaison des opsines inhibitrices Mac et halorhodopsine (Chow et coll., 2010) permettrait d'inhiber spécifiquement et simultanément deux populations neuronales différentes. La combinaison des approches de pharmacogénétique et d'optogénétique pourrait également permettre d'interroger la même population neuronale ou plusieurs populations neuronales sur des échelles de temps différentes et complémentaires.

LISTE DES PUBLICATIONS

Articles

Arthaud S, **Varin C**, Gay N, Libourel P-A, Chauveau F, Fort P, Luppi P-H, Peyron C. Paradoxical (REM) sleep deprivation in mice using the small-platforms-over-water method: polysomnographic analyses and melanin-concentrating hormone and hypocretin/orexin neuronal activation before, during and after deprivation. *Journal of Sleep Research* ; 2015 June ; 24(3):309-319

Varin C, Rancillac A, Geoffroy H, Arthaud S, Fort P, Gallopin T. Glucose induces slow-wave sleep by exciting neurons in the ventrolateral preoptic nucleus: a new link between sleep and metabolism. *Journal of Neuroscience* ; 2015 July 8 ; 35(27):9900-9911

Varin C, Arthaud S, Salvert D, Gay N, Libourel P-A, Luppi P-H, Léger L, Fort P. Sleep architecture and homeostasis in mice with partial ablation of Melanin-Concentrating Hormone neurons. *Behavioural Brain Research* ; 2016 Feb 1 ; 298(Part B):100-110

Varin C, Jego S, Lazarus M, Luppi P-H, Adamantidis A, Fort P. Chemogenetic modulation of Melanin-Concentrating Hormone highlights their contribution to both slow-wave sleep and paradoxical sleep. (en préparation)

Communications affichées

8th FENS Forum of Neurosciences, 2012, Barcelone :

Varin CG, Rancillac A, Geoffroy H, Fort P, Vitalis T, Gallopin T. Identification of sleep-promoting neurons in the ventrolateral preoptic nucleus as glucose-sensing neurons.

21st Congress of the European Sleep Research Society, 2012, Paris :

Varin CG, Rancillac A, Geoffroy H, Fort P, Vitalis T, Gallopin T. Glucose excites the sleep-promoting neurons in the ventrolateral preoptic nucleus: a new link between sleep and metabolism.

Prix du meilleur poster ESRS-Weinmann

11^e colloque de la Société Française des Neurosciences, 2013, Lyon :

Varin CG, Arthaud S, Gay N, Luppi P-H, Léger L, Fort P. Sleep architecture and homeostasis of MCH-Ataxin-3 transgenic mice.

9th FENS Forum of Neurosciences, 2014, Milan :

Varin C, Arthaud S, Chérasse Y, Lazarus M, Gallopin T, Luppi P-H, Fort P. Modulation of MCH-expressing neurons by pharmacogenetic tools strongly alters the sleep-waking cycle in mice.

22nd Congress of the European Sleep Research Society, 2014, Tallin :

Varin C, Arthaud S, Chérasse Y, Lazarus M, Gallopin T, Luppi P-H, Fort P. Modulation of hypothalamic MCH-expressing neurons by pharmacogenetic tools strongly alters the sleep-waking cycle in mice.

45th annual meeting Society for Neurosciences, 2015, Chicago :

Varin C, Jegu S, Arthaud S, Lazarus M, Gallopin T, Luppi P-H, Adamantidis A, Fort P. Modulation of hypothalamic MCH-expressing neurons by pharmacogenetic tools strongly alters the sleep-waking cycle in mice.

Le Congrès du Sommeil, 2015, Nantes :

Varin C, Jegu S, Arthaud S, Lazarus M, Luppi P-H, Adamantidis A, Fort P. Altérations du sommeil en réponse à la modulation par pharmacogénétique de l'activité des neurones exprimant l'hormone de mélan-concentration.

RÉFÉRENCES

- Abrahamson, E. E., Leak, R. K. et Moore, R. Y. (2001). The suprachiasmatic nucleus projects to posterior hypothalamic arousal systems. *Neuroreport* 12(2):435-440.
- Achermann, P. et Borbely, A. A. (2003). Mathematical models of sleep regulation. *Front Biosci* 8:s683-693.
- Adamantidis, A. et de Lecea, L. (2008). Sleep and metabolism: shared circuits, new connections. *Trends Endocrinol Metab* 19(10):362-370.
- 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):1793-1800.
- Adamantidis, A., Thomas, E., Foidart, A., Tyhon, A., Coumans, B., Minet, A., Tirelli, E., Seutin, V., Grisar, T. et Lakaye, B. (2005). Disrupting the melanin-concentrating hormone receptor 1 in mice leads to cognitive deficits and alterations of NMDA receptor function. *Eur J Neurosci* 21(10):2837-2844.
- Adamantidis, A. R., Zhang, F., Aravanis, A. M., Deisseroth, K. et de Lecea, L. (2007). Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons. *Nature* 450(7168):420-424.
- Afaghi, A., O'Connor, H. et Chow, C. M. (2007). High-glycemic-index carbohydrate meals shorten sleep onset. *Am J Clin Nutr* 85(2):426-430.
- Aghajanian, G. K. et Vandermaelen, C. P. (1982). Intracellular recordings from serotonergic dorsal raphe neurons: pacemaker potentials and the effect of LSD. *Brain Res* 238(2):463-469.
- Ahnaou, A., Drinkenburg, W. H., Bouwknecht, J. A., Alcazar, J., Steckler, T. et Dautzenberg, F. M. (2008). Blocking melanin-concentrating hormone MCH1 receptor affects rat sleep-wake architecture. *Eur J Pharmacol* 579(1-3):177-188.
- Airaksinen, M. S., Alanen, S., Szabat, E., Visser, T. J. et Panula, P. (1992). Multiple neurotransmitters in the tuberomammillary nucleus: comparison of rat, mouse, and guinea pig. *J Comp Neurol* 323(1):103-116.
- Akert, K., Koella, W. P. et Hess, R., Jr. (1952). Sleep produced by electrical stimulation of the thalamus. *Am J Physiol* 168(1):260-267.
- 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):619-631.
- Alexander, G. M., Rogan, S. C., Abbas, A. I., Armbruster, B. N., Pei, Y., Allen, J. A., Nonneman, R. J., Hartmann, J., Moy, S. S., Nicoletis, M. A., McNamara, J. O. et Roth, B. L. (2009). Remote control of neuronal activity in transgenic mice expressing evolved G protein-coupled receptors. *Neuron* 63(1):27-39.

- Allison, T. et Van Twyver, H. (1972). Electrophysiological studies of the echidna, *Tachyglossus aculeatus*. II. Dormancy and hibernation. *Arch Ital Biol* 110(2):185-194.
- Allison, T., Van Twyver, H. et Goff, W. R. (1972). Electrophysiological studies of the echidna, *Tachyglossus aculeatus*. I. Waking and sleep. *Arch Ital Biol* 110(2):145-184.
- Alon, T. et Friedman, J. M. (2006). Late-onset leanness in mice with targeted ablation of melanin concentrating hormone neurons. *J Neurosci* 26(2):389-397.
- Ammala, C., Moorhouse, A., Gribble, F., Ashfield, R., Proks, P., Smith, P. A., Sakura, H., Coles, B., Ashcroft, S. J. et Ashcroft, F. M. (1996). Promiscuous coupling between the sulphonylurea receptor and inwardly rectifying potassium channels. *Nature* 379(6565):545-548.
- Amzica, F. et Steriade, M. (1998). Cellular substrates and laminar profile of sleep K-complex. *Neuroscience* 82(3):671-686.
- Anaclet, C., Pedersen, N. P., Ferrari, L. L., Venner, A., Bass, C. E., Arrigoni, E., Fuller, P. M. (2015). Basal forebrain control of wakefulness and cortical rhythms. *Nat Commun* 6:8744.
- Anderson, C. et Horne, J. A. (2006). A high sugar content, low caffeine drink does not alleviate sleepiness but may worsen it. *Hum Psychopharmacol* 21(5):299-303.
- Angeleri, F., Quattrini, A. et Chinzari, P. (1969). [Circadian rhythm of wakefulness and sleep in cats with bilateral lemniscal electrolytic lesions at the mesencephalo-thalamic level]. *Boll Soc Ital Biol Sper* 45(15):985-989.
- Antal-Zimanyl, I. et Khawaja, X. (2009). The role of melanin-concentrating hormone in energy homeostasis and mood disorders. *J Mol Neurosci* 39(1-2):86-98.
- Apergis-Schoute, J., Iordanidou, P., Faure, C., Jego, S., Schone, C., Aitta-Aho, T., Adamantidis, A. et Burdakov, D. (2015). Optogenetic evidence for inhibitory signaling from orexin to MCH neurons via local microcircuits. *J Neurosci* 35(14):5435-5441.
- Armbruster, B. N., Li, X., Pausch, M. H., Herlitze, S. et Roth, B. L. (2007). Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potently activated by an inert ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(12):5163-5168.
- Arrang, J. M. (1994). Pharmacological properties of histamine receptor subtypes. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 40(3):275-281.
- Arthaud, S., Varin, C., Gay, N., Libourel, P. A., Chauveau, F., Fort, P., Luppi, P. H. et Peyron, C. (2015). Paradoxical (REM) sleep deprivation in mice using the small-platforms-over-water method: polysomnographic analyses and melanin-concentrating hormone and hypocretin/orexin neuronal activation before, during and after deprivation. *J Sleep Res* 24(3):309-319.
- Aserinsky, E. et Kleitman, N. (2003). Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep. 1953. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 15(4):454-455.
- Ashcroft, F. et Rorsman, P. (2004). Type 2 diabetes mellitus: not quite exciting enough? *Hum Mol Genet* 13 Spec No 1:R21-31.
- Aston-Jones, G. et Bloom, F. E. (1981a). Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep-waking cycle. *J Neurosci* 1(8):876-886.

- Aston-Jones, G. et Bloom, F. E. (1981b). Norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats exhibit pronounced responses to non-noxious environmental stimuli. *J Neurosci* 1(8):887-900.
- Aston-Jones, G., Foote, S. L. et Segal, M. (1985). Impulse conduction properties of noradrenergic locus coeruleus axons projecting to monkey cerebrocortex. *Neuroscience* 15(3):765-777.
- Balfour, R. H., Hansen, A. M. et Trapp, S. (2006). Neuronal responses to transient hypoglycaemia in the dorsal vagal complex of the rat brainstem. *J Physiol* 570(Pt 3):469-484.
- Ball, G. J., Gloor, P. et Schaul, N. (1977). The cortical electromicrophysiology of pathological delta waves in the electroencephalogram of cats. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 43(3):346-361.
- Barson, J. R., Morganstern, I. et Leibowitz, S. F. (2013). Complementary roles of orexin and melanin-concentrating hormone in feeding behavior. *Int J Endocrinol* 2013:983964.
- Bayer, L., Eggermann, E., Saint-Mleux, B., Machard, D., Jones, B. E., Muhlethaler, M. et Serafin, M. (2002). Selective action of orexin (hypocretin) on nonspecific thalamocortical projection neurons. *J Neurosci* 22(18):7835-7839.
- 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):807-811.
- Bayer, L., Eggermann, E., Serafin, M., Saint-Mleux, B., Machard, D., Jones, B. et Muhlethaler, M. (2001). Orexins (hypocretins) directly excite tuberomammillary neurons. *Eur J Neurosci* 14(9):1571-1575.
- Bayer, L., Serafin, M., Eggermann, E., Saint-Mleux, B., Machard, D., Jones, B. E. et Muhlethaler, M. (2004). Exclusive postsynaptic action of hypocretin-orexin on sublayer 6b cortical neurons. *J Neurosci* 24(30):6760-6764.
- Belin, M. F., Aguera, M., Tappaz, M., Jouvet, M. et Pujol, J. F. (1978). [Identification of GABA accumulating neurons in the dorsal raphe nucleus]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 287(9):865-869.
- Belin, M. F., Aguera, M., Tappaz, M., McRae-Degueurce, A., Bobillier, P. et Pujol, J. F. (1979). GABA-accumulating neurons in the nucleus raphe dorsalis and periaqueductal gray in the rat: a biochemical and radioautographic study. *Brain Res* 170(2):279-297.
- Belle, M. D., Hughes, A. T., Bechtold, D. A., Cunningham, P., Pierucci, M., Burdakov, D. et Piggins, H. D. (2014). Acute suppressive and long-term phase modulation actions of orexin on the mammalian circadian clock. *J Neurosci* 34(10):3607-3621.
- Bender, D., Holschbach, M. et Stocklin, G. (1994). Synthesis of n.c.a. carbon-11 labelled clozapine and its major metabolite clozapine-N-oxide and comparison of their biodistribution in mice. *Nucl Med Biol* 21(7):921-925.
- Benedetto, L., Rodriguez-Servetti, Z., Lagos, P., D'Almeida, V., Monti, J. M. et Torterolo, P. (2013). Microinjection of melanin concentrating hormone into the lateral preoptic area promotes non-REM sleep in the rat. *Peptides* 39:11-15.
- Benington, J. H. et Heller, H. C. (1995). Restoration of brain energy metabolism as the function of sleep. *Prog Neurobiol* 45(4):347-360.

- Berridge, C. W. et Foote, S. L. (1991). Effects of locus coeruleus activation on electroencephalographic activity in neocortex and hippocampus. *J Neurosci* 11(10):3135-3145.
- Berridge, C. W., Page, M. E., Valentino, R. J. et Foote, S. L. (1993). Effects of locus coeruleus inactivation on electroencephalographic activity in neocortex and hippocampus. *Neuroscience* 55(2):381-393.
- Bianchi, M. T., Eiseman, N. A., Cash, S. S., Mietus, J., Peng, C. K. et Thomas, R. J. (2012). Probabilistic sleep architecture models in patients with and without sleep apnea. *J Sleep Res* 21(3):330-341.
- Bittencourt, J. C. (2011). Anatomical organization of the melanin-concentrating hormone peptide family in the mammalian brain. *Gen Comp Endocrinol* 172(2):185-197.
- 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):218-245.
- Bjorness, T. E., Kelly, C. L., Gao, T., Poffenberger, V. et Greene, R. W. (2009). Control and function of the homeostatic sleep response by adenosine A1 receptors. *J Neurosci* 29(5):1267-1276.
- Blanco-Centurion, C., Gerashchenko, D. et Shiromani, P. J. (2007). Effects of saporin-induced lesions of three arousal populations on daily levels of sleep and wake. *J Neurosci* 27(51):14041-14048.
- Blanco-Centurion, C. A., Shiromani, A., Winston, E. et Shiromani, P. J. (2006). Effects of hypocretin-1 in 192-IgG-saporin-lesioned rats. *Eur J Neurosci* 24(7):2084-2088.
- Blethyn, K. L., Hughes, S. W., Toth, T. I., Cope, D. W. et Crunelli, V. (2006). Neuronal basis of the slow (<1 Hz) oscillation in neurons of the nucleus reticularis thalami in vitro. *J Neurosci* 26(9):2474-2486.
- Blouet, C. et Schwartz, G. J. (2010). Hypothalamic nutrient sensing in the control of energy homeostasis. *Behav Brain Res* 209(1):1-12.
- Blouin, A. M. et Siegel, J. M. (2013). Relation of melanin concentrating hormone levels to sleep, emotion and hypocretin levels. *Sleep* 36(12):1777.
- Blumberg, M. S., Coleman, C. M., Johnson, E. D. et Shaw, C. (2007). Developmental divergence of sleep-wake patterns in orexin knockout and wild-type mice. *Eur J Neurosci* 25(2):512-518.
- Blumberg, M. S., Seelke, A. M., Lowen, S. B. et Karlsson, K. A. (2005). Dynamics of sleep-wake cyclicity in developing rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(41):14860-14864.
- Bodosi, B., Obal, F., Jr., Gardi, J., Komlodi, J., Fang, J. et Krueger, J. M. (2000). An ether stressor increases REM sleep in rats: possible role of prolactin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279(5):R1590-1598.
- Boissard, R., Fort, P., Gervasoni, D., Barbagli, B. et Luppi, P. H. (2003). Localization of the GABAergic and non-GABAergic neurons projecting to the sublaterodorsal nucleus and potentially gating paradoxical sleep onset. *Eur J Neurosci* 18(6):1627-1639.
- 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):1959-1973.

- Borbely, A. A. et Tobler, I. (1985). Homeostatic and circadian principles in sleep regulation in the rat. D. J. McGinty. *Brain Mechanisms Of Sleep*. New York, Raven Press: pp. 35-44.
- Boucetta, S., Cisse, Y., Mainville, L., Morales, M. et Jones, B. E. (2014). Discharge profiles across the sleep-waking cycle of identified cholinergic, GABAergic, and glutamatergic neurons in the pontomesencephalic tegmentum of the rat. *J Neurosci* 34(13):4708-4727.
- Boucetta, S. et Jones, B. E. (2009). Activity profiles of cholinergic and intermingled GABAergic and putative glutamatergic neurons in the pontomesencephalic tegmentum of urethane-anesthetized rats. *J Neurosci* 29(14):4664-4674.
- Bourgin, P., Escourrou, P., Gaultier, C. et Adrien, J. (1995). Induction of rapid eye movement sleep by carbachol infusion into the pontine reticular formation in the rat. *Neuroreport* 6(3):532-536.
- Bourgin, P., Huitron-Resendiz, S., Spier, A. D., Fabre, V., Morte, B., Criado, J. R., Sutcliffe, J. G., Henriksen, S. J. et de Lecea, L. (2000). Hypocretin-1 modulates rapid eye movement sleep through activation of locus coeruleus neurons. *J Neurosci* 20(20):7760-7765.
- Boutrel, B., Franc, B., Hen, R., Hamon, M. et Adrien, J. (1999). Key role of 5-HT_{1B} receptors in the regulation of paradoxical sleep as evidenced in 5-HT_{1B} knock-out mice. *J Neurosci* 19(8):3204-3212.
- Boutrel, B., Monaca, C., Hen, R., Hamon, M. et Adrien, J. (2002). Involvement of 5-HT_{1A} receptors in homeostatic and stress-induced adaptive regulations of paradoxical sleep: studies in 5-HT_{1A} knock-out mice. *J Neurosci* 22(11):4686-4692.
- Broberger, C., De Lecea, L., Sutcliffe, J. G. et Hokfelt, T. (1998). Hypocretin/orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems. *J Comp Neurol* 402(4):460-474.
- Buijs, R. M., Scheer, F. A., Kreier, F., Yi, C., Bos, N., Goncharuk, V. D. et Kalsbeek, A. (2006). Organization of circadian functions: interaction with the body. *Prog Brain Res* 153:341-360.
- Bunger, M. K., Wilsbacher, L. D., Moran, S. M., Clendenin, C., Radcliffe, L. A., Hogenesch, J. B., Simon, M. C., Takahashi, J. S. et Bradfield, C. A. (2000). Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell* 103(7):1009-1017.
- Burdakov, D., Gerasimenko, O. et Verkhatsky, A. (2005). Physiological changes in glucose differentially modulate the excitability of hypothalamic melanin-concentrating hormone and orexin neurons in situ. *J Neurosci* 25(9):2429-2433.
- Burdakov, D., Jensen, L. T., Alexopoulos, H., Williams, R. H., Fearon, I. M., O'Kelly, I., Gerasimenko, O., Fugger, L. et Verkhatsky, A. (2006). Tandem-pore K⁺ channels mediate inhibition of orexin neurons by glucose. *Neuron* 50(5):711-722.
- Burgess, C. R., Oishi, Y., Mochizuki, T., Peever, J. H. et Scammell, T. E. (2013). Amygdala lesions reduce cataplexy in orexin knock-out mice. *J Neurosci* 33(23):9734-9742.
- Burlet, S., Tyler, C. J. et Leonard, C. S. (2002). Direct and indirect excitation of laterodorsal tegmental neurons by Hypocretin/Orexin peptides: implications for wakefulness and narcolepsy. *J Neurosci* 22(7):2862-2872.

- Campbell, S. S. et Tobler, I. (1984). Animal sleep: a review of sleep duration across phylogeny. *Neurosci Biobehav Rev* 8(3):269-300.
- Cano, G., Mochizuki, T. et Saper, C. B. (2008). Neural circuitry of stress-induced insomnia in rats. *J Neurosci* 28(40):10167-10184.
- Canteras, N. S., Simerly, R. B. et Swanson, L. W. (1994). Organization of projections from the ventromedial nucleus of the hypothalamus: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study in the rat. *J Comp Neurol* 348(1):41-79.
- 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):2166-2184.
- Carli, G. et Zanchetti, A. (1965). A study of pontine lesions suppressing deep sleep in the cat. *Arch Ital Biol* 103(4):751-788.
- Carter, M. E., Adamantidis, A., Ohtsu, H., Deisseroth, K. et de Lecea, L. (2009). Sleep homeostasis modulates hypocretin-mediated sleep-to-wake transitions. *J Neurosci* 29(35):10939-10949.
- Carter, M. E., Brill, J., Bonnavion, P., Huguenard, J. R., Huerta, R. et de Lecea, L. (2012). Mechanism for Hypocretin-mediated sleep-to-wake transitions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(39):E2635-2644.
- Carter, M. E., Yizhar, O., Chikahisa, S., Nguyen, H., Adamantidis, A., Nishino, S., Deisseroth, K. et de Lecea, L. (2010). Tuning arousal with optogenetic modulation of locus coeruleus neurons. *Nat Neurosci* 13(12):1526-1533.
- Cespuglio, R., Faradji, H., Ponchon, J. L., Buda, M., Riou, F., Gonon, F., Pujol, J. F. et Jouvett, M. (1981a). Differential pulse voltammetry in brain tissue. I. Detection of 5-hydroxyindoles in the rat striatum. *Brain Res* 223(2):287-298.
- Cespuglio, R., Faradji, H., Riou, F., Buda, M., Gonon, F., Pujol, J. F. et Jouvett, M. (1981b). Differential pulse voltammetry in brain tissue. II. Detection of 5-hydroxyindeacetic acid in the rat striatum. *Brain Res* 223(2):299-311.
- Chamberlin, N. L., Arrigoni, E., Chou, T. C., Scammell, T. E., Greene, R. W. et Saper, C. B. (2003). Effects of adenosine on gebergic synaptic inputs to identified ventrolateral preoptic neurons. *Neuroscience* 119(4):913-918.
- Chang, C. H., Chen, M. C., Qiu, M. H. et Lu, J. (2014). Ventromedial prefrontal cortex regulates depressive-like behavior and rapid eye movement sleep in the rat. *Neuropharmacology* 86:125-132.
- Chang, F. C. et Opp, M. R. (2002). Role of corticotropin-releasing hormone in stressor-induced alterations of sleep in rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283(2):R400-407.
- Chee, M. J., Arrigoni, E. et Maratos-Flier, E. (2015). Melanin-concentrating hormone neurons release glutamate for feedforward inhibition of the lateral septum. *J Neurosci* 35(8):3644-3651.
- Chee, M. J., Pissios, P. et Maratos-Flier, E. (2013). Neurochemical characterization of neurons expressing melanin-concentrating hormone receptor 1 in the mouse hypothalamus. *J Comp Neurol* 521(10):2208-2234.
- Chen, C. Y., Asakawa, A., Fujimiya, M., Lee, S. D. et Inui, A. (2009). Ghrelin gene products and the regulation of food intake and gut motility. *Pharmacol Rev* 61(4):430-481.

- Chen, L., Yin, D., Wang, T. X., Guo, W., Dong, H., Xu, Q., Luo, Y. J., Cherasse, Y., Lazarus, M., Qiu, Z. L., Lu, J., Qu, W. M. et Huang, Z. L. (2016). Basal forebrain cholinergic neurons primarily contribute to inhibition of electroencephalogram delta activity, rather than inducing behavioral wakefulness in mice. *Neuropsychopharmacology* [Epub ahead of print]
- Chen, X., Dong, J. et Jiang, Z. Y. (2012). Nesfatin-1 influences the excitability of glucosensing neurons in the hypothalamic nuclei and inhibits the food intake. *Regul Pept* 177(1-3):21-26.
- Chou, T. C., Bjorkum, A. A., Gaus, S. E., Lu, J., Scammell, T. E. et Saper, C. B. (2002). Afferents to the ventrolateral preoptic nucleus. *J Neurosci* 22(3):977-990.
- Chou, T. C., Lee, C. E., Lu, J., Elmquist, J. K., Hara, J., Willie, J. T., Beuckmann, C. T., Chemelli, R. M., Sakurai, T., Yanagisawa, M., Saper, C. B. et Scammell, T. E. (2001). Orexin (hypocretin) neurons contain dynorphin. *J Neurosci* 21(19):RC168.
- Chou, T. C., Scammell, T. E., Gooley, J. J., Gaus, S. E., Saper, C. B. et Lu, J. (2003). Critical role of dorsomedial hypothalamic nucleus in a wide range of behavioral circadian rhythms. *J Neurosci* 23(33):10691-10702.
- Chu, N. S. et Bloom, F. E. (1974). Activity patterns of catecholamine-containing pontine neurons in the dorso-lateral tegmentum of unrestrained cats. *J Neurobiol* 5(6):527-544.
- 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.
- Clement, O., Sapin, E., Libourel, P. A., Arthaud, S., Brischox, F., Fort, P. et Luppi, P. H. (2012). The lateral hypothalamic area controls paradoxical (REM) sleep by means of descending projections to brainstem GABAergic neurons. *J Neurosci* 32(47):16763-16774.
- Clewlow, F., Dawes, G. S., Johnston, B. M. et Walker, D. W. (1983). Changes in breathing, electrocortical and muscle activity in unanaesthetized fetal lambs with age. *J Physiol* 341:463-476.
- Cota, D., Proulx, K., Smith, K. A., Kozma, S. C., Thomas, G., Woods, S. C. et Seeley, R. J. (2006). Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science* 312(5775):927-930.
- Crochet, S., Onoe, H. et Sakai, K. (2006). A potent non-monoaminergic paradoxical sleep inhibitory system: a reverse microdialysis and single-unit recording study. *Eur J Neurosci* 24(5):1404-1412.
- Croizier, S., Franchi-Bernard, G., Colard, C., Poncet, F., La Roche, A. et Risold, P. Y. (2010). A comparative analysis shows morphofunctional differences between the rat and mouse melanin-concentrating hormone systems. *PLoS One* 5(11):e15471.
- Crunelli, V., David, F., Leresche, N. et Lambert, R. C. (2014). Role for T-type Ca²⁺ channels in sleep waves. *Pflugers Arch* 466(4):735-745.
- Crunelli, V. et Hughes, S. W. (2010). The slow (<1 Hz) rhythm of non-REM sleep: a dialogue between three cardinal oscillators. *Nat Neurosci* 13(1):9-17.

- Cvetkovic, V., Brischoux, F., Jacquemard, C., Fellmann, D., Griffond, B. et Risold, P. Y. (2004). Characterization of subpopulations of neurons producing melanin-concentrating hormone in the rat ventral diencephalon. *J Neurochem* 91(4):911-919.
- Danguir, J. et Nicolaidis, S. (1979). Dependence of sleep on nutrients' availability. *Physiol Behav* 22(4):735-740.
- Davidowa, H., Li, Y. et Plagemann, A. (2002). Hypothalamic ventromedial and arcuate neurons of normal and postnatally overnourished rats differ in their responses to melanin-concentrating hormone. *Regul Pept* 108(2-3):103-111.
- de Lecea, L., Kilduff, T. S., Peyron, C., Gao, X., Foye, P. E., Danielson, P. E., Fukuhara, C., Battenberg, E. L., Gautvik, V. T., Bartlett, F. S., 2nd, Frankel, W. N., van den Pol, A. N., Bloom, F. E., Gautvik, K. M. et Sutcliffe, J. G. (1998). The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(1):322-327.
- de Vries, M. G., Arseneau, L. M., Lawson, M. E. et Beverly, J. L. (2003). Extracellular glucose in rat ventromedial hypothalamus during acute and recurrent hypoglycemia. *Diabetes* 52(11):2767-2773.
- Deboer, T., Vansteensel, M. J., Detari, L. et Meijer, J. H. (2003). Sleep states alter activity of supra-chiasmatic nucleus neurons. *Nat Neurosci* 6(10):1086-1090.
- Del Cid-Pellitero, E. et Jones, B. E. (2012). Immunohistochemical evidence for synaptic release of GABA from melanin-concentrating hormone containing varicosities in the locus coeruleus. *Neuroscience* 223:269-276.
- Dement, W. et Kleitman, N. (1957). Cyclic variations in EEG during sleep and their relation to eye movements, body motility, and dreaming. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 9(4):673-690.
- Dempsey, E. W. et Morison, R. S. (1941). The production of rhythmically recurrent cortical potentials after localized thalamic stimulation. *American Journal of Physiology* 135:293-300.
- Descarries, L. et Droz, B. (1968). [Incorporation of noradrenaline-3H(NA-3H) in the central nervous system of adult rats. Radioautographic study with electron microscopy]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 266(26):2480-2482.
- Deurveilher, S., Hars, B. et Hennevin, E. (1997). Pontine microinjection of carbachol does not reliably enhance paradoxical sleep in rats. *Sleep* 20(8):593-607.
- Deurveilher, S. et Semba, K. (2005). Indirect projections from the suprachiasmatic nucleus to major arousal-promoting cell groups in rat: implications for the circadian control of behavioural state. *Neuroscience* 130(1):165-183.
- Devera, A., Pascovich, C., Lagos, P., Falconi, A., Sampogna, S., Chase, M. H. et Torterolo, P. (2015). Melanin-concentrating hormone (MCH) modulates the activity of dorsal raphe neurons. *Brain Res* 1598:114-128.
- Devoto, P., Flore, G., Vacca, G., Pira, L., Arca, A., Casu, M. A., Pani, L. et Gessa, G. L. (2003). Co-release of noradrenaline and dopamine from noradrenergic neurons in the cerebral cortex induced by clozapine, the prototype atypical antipsychotic. *Psychopharmacology (Berl)* 167(1):79-84.
- Dewasmes, G., Duchamp, C. et Minaire, Y. (1989). Sleep changes in fasting rats. *Physiol Behav* 46(2):179-184.

- Didier, A., Carleton, A., Bjaalie, J. G., Vincent, J. D., Ottersen, O. P., Storm-Mathisen, J. et Lledo, P. M. (2001). A dendrodendritic reciprocal synapse provides a recurrent excitatory connection in the olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(11):6441-6446.
- Diniz Behn, C. G., Klerman, E. B., Mochizuki, T., Lin, S. C. et Scammell, T. E. (2010). Abnormal sleep/wake dynamics in orexin knockout mice. *Sleep* 33(3):297-306.
- Diniz Behn, C. G., Kopell, N., Brown, E. N., Mochizuki, T. et Scammell, T. E. (2008). Delayed orexin signaling consolidates wakefulness and sleep: physiology and modeling. *J Neurophysiol* 99(6):3090-3103.
- Dong, E., Nelson, M., Grayson, D. R., Costa, E. et Guidotti, A. (2008). Clozapine and sulpiride but not haloperidol or olanzapine activate brain DNA demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(36):13614-13619.
- Dong, E., Wellman, L. L., Yang, L. et Sanford, L. D. (2012). Effects of microinjections of Group II metabotropic glutamate agents into the amygdala on sleep. *Brain Res* 1452:85-95.
- Dong, H. W., Petrovich, G. D., Watts, A. G. et Swanson, L. W. (2001). Basic organization of projections from the oval and fusiform nuclei of the bed nuclei of the stria terminalis in adult rat brain. *J Comp Neurol* 436(4):430-455.
- Dong, S., Allen, J. A., Farrell, M. et Roth, B. L. (2010). A chemical-genetic approach for precise spatio-temporal control of cellular signaling. *Mol Biosyst* 6(8):1376-1380.
- Dragicevic, E., Schiemann, J. et Liss, B. (2015). Dopamine midbrain neurons in health and Parkinson's disease: emerging roles of voltage-gated calcium channels and ATP-sensitive potassium channels. *Neuroscience* 284:798-814.
- Dreyfus-Brisac, C. (1975). Neurophysiological studies in human premature and full-term newborns. *Biol Psychiatry* 10(5):485-496.
- Dunn-Meynell, A. A., Rawson, N. E. et Levin, B. E. (1998). Distribution and phenotype of neurons containing the ATP-sensitive K⁺ channel in rat brain. *Brain Res* 814(1-2):41-54.
- Dunn-Meynell, A. A., Routh, V. H., Kang, L., Gaspers, L. et Levin, B. E. (2002). Glucokinase is the likely mediator of glucosensing in both glucose-excited and glucose-inhibited central neurons. *Diabetes* 51(7):2056-2065.
- Dyzma, M., Boudjeltia, K. Z., Faraut, B. et Kerkhofs, M. (2010). Neuropeptide Y and sleep. *Sleep Med Rev* 14(3):161-165.
- Dzirasa, K., Ribeiro, S., Costa, R., Santos, L. M., Lin, S. C., Grosmark, A., Sotnikova, T. D., Gainetdinov, R. R., Caron, M. G. et Nicolelis, M. A. (2006). Dopaminergic control of sleep-wake states. *J Neurosci* 26(41):10577-10589.
- Edgar, D. M., Dement, W. C. et Fuller, C. A. (1993). Effect of SCN lesions on sleep in squirrel monkeys: evidence for opponent processes in sleep-wake regulation. *J Neurosci* 13(3):1065-1079.
- 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):519-529.
- Elias, C. F., Saper, C. B., Maratos-Flier, E., Tritos, N. A., Lee, C., Kelly, J., Tatro, J. B., Hoffman, G. E., Ollmann, M. M., Barsh, G. S., Sakurai, T., Yanagisawa, M. et Elmquist, J. K. (1998). Chemically de-

- finned projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *J Comp Neurol* 402(2):442-459.
- Ericson, H., Blomqvist, A. et Kohler, C. (1991). Origin of neuronal inputs to the region of the tuberomammillary nucleus of the rat brain. *J Comp Neurol* 311(1):45-64.
- Esposito, M., Pellinen, J., Kapas, L. et Szentirmai, E. (2012). Impaired wake-promoting mechanisms in ghrelin receptor-deficient mice. *Eur J Neurosci* 35(2):233-243.
- Fenik, V., Ogawa, H., Davies, R. O. et Kubin, L. (1999). Pontine carbachol produces a spectrum of REM sleep like and arousal-like electrocortical responses in urethane-anesthetized rats. *Sleep Res Online* 2(Suppl.):30.
- Fischer, K., Colombani, P. C., Langhans, W. et Wenk, C. (2002). Carbohydrate to protein ratio in food and cognitive performance in the morning. *Physiol Behav* 75(3):411-423.
- Foote, S. L., Bloom, F. E. et Aston-Jones, G. (1983). Nucleus locus ceruleus: new evidence of anatomical and physiological specificity. *Physiol Rev* 63(3):844-914.
- Fort, P., Bassetti, C. L. et Luppi, P. H. (2009). Alternating vigilance states: new insights regarding neuronal networks and mechanisms. *Eur J Neurosci* 29(9):1741-1753.
- Fort, P., Luppi, P. H. et Gallopin, T. (2004). In vitro identification of the presumed sleep-promoting neurons of the ventrolateral preoptic nucleus (VLPO). P. H. Luppi. *Sleep: Circuits and Functions*, CRC Press.
- Fort, P., Luppi, P. H. et Jouvet, M. (1993). Glycine-immunoreactive neurones in the cat brain stem reticular formation. *Neuroreport* 4(9):1123-1126.
- Fort, P., Sakai, K., Luppi, P. H., Salvert, D. et Jouvet, M. (1989). Monoaminergic, peptidergic, and cholinergic afferents to the cat facial nucleus as evidenced by a double immunostaining method with unconjugated cholera toxin as a retrograde tracer. *J Comp Neurol* 283(2):285-302.
- Fort, P., Salvert, D., Hanriot, L., Jego, S., Shimizu, H., Hashimoto, K., Mori, M. et Luppi, P. H. (2008). The satiety molecule nesfatin-1 is co-expressed with melanin concentrating hormone in tuberal hypothalamic neurons of the rat. *Neuroscience* 155(1):174-181.
- Fraigne, J. J. et Peever, J. H. (2013). Melanin-concentrating hormone neurons promote and stabilize sleep. *Sleep* 36(12):1767-1768.
- Frank, M. G. et Heller, H. C. (1997). Development of REM and slow wave sleep in the rat. *Am J Physiol* 272(6 Pt 2):R1792-1799.
- Friedman, J. M. et Halaas, J. L. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395(6704):763-770.
- Fujiki, N., Cheng, T., Yoshino, F. et Nishino, S. (2009). Specificity of direct transition from wake to REM sleep in orexin/ataxin-3 transgenic narcoleptic mice. *Exp Neurol* 217(1):46-54.
- Gall, A. J., Joshi, B., Best, J., Florang, V. R., Doorn, J. A. et Blumberg, M. S. (2009). Developmental emergence of power-law wake behavior depends upon the functional integrity of the locus coeruleus. *Sleep* 32(7):920-926.
- Gall, A. J., Todd, W. D. et Blumberg, M. S. (2012). Development of SCN connectivity and the circadian control of arousal: a diminishing role for humoral factors? *PLoS One* 7(9):e45338.

- Gallopín, T. (2002). Électrophysiologie et neuromodulation d'un système de contrôle du sommeil lent : études in vitro des neurones du noyau préoptique ventro-latéral chez le rat. Lyon, Université Claude Bernard - Lyon1. Doctorat.
- Gallopín, T., Fort, P., Eggermann, E., Cauli, B., Luppi, P. H., Rossier, J., Audinat, E., Muhlethaler, M. et Serafin, M. (2000). Identification of sleep-promoting neurons in vitro. *Nature* 404(6781):992-995.
- Gallopín, T., Geoffroy, H., Rossier, J. et Lambolez, B. (2006). Cortical sources of CRF, NKB, and CCK and their effects on pyramidal cells in the neocortex. *Cereb Cortex* 16(10):1440-1452.
- Gallopín, T., Luppi, P. H., Cauli, B., Urade, Y., Rossier, J., Hayaishi, O., Lambolez, B. et Fort, P. (2005). The endogenous somnogen adenosine excites a subset of sleep-promoting neurons via A2A receptors in the ventrolateral preoptic nucleus. *Neuroscience* 134(4):1377-1390.
- Gallopín, T., Luppi, P. H., Rambert, F. A., Frydman, A. et Fort, P. (2004). Effect of the wake-promoting agent modafinil on sleep-promoting neurons from the ventrolateral preoptic nucleus: an in vitro pharmacologic study. *Sleep* 27(1):19-25.
- Gao, X. B. (2009). Electrophysiological effects of MCH on neurons in the hypothalamus. *Peptides* 30(11):2025-2030.
- Gao, X. B., Ghosh, P. K. et van den Pol, A. N. (2003). Neurons synthesizing melanin-concentrating hormone identified by selective reporter gene expression after transfection in vitro: transmitter responses. *J Neurophysiol* 90(6):3978-3985.
- Gaus, S. E., Strecker, R. E., Tate, B. A., Parker, R. A. et Saper, C. B. (2002). Ventrolateral preoptic nucleus contains sleep-active, galaninergic neurons in multiple mammalian species. *Neuroscience* 115(1):285-294.
- Gentet, L. J., Stuart, G. J. et Clements, J. D. (2000). Direct measurement of specific membrane capacitance in neurons. *Biophys J* 79(1):314-320.
- George, R., Haslett, W. L. et Jenden, D. J. (1964). A Cholinergic Mechanism in the Brainstem Reticular Formation: Induction of Paradoxical Sleep. *Int J Neuropharmacol* 3:541-552.
- Gerashchenko, D., Chou, T. C., Blanco-Centurion, C. A., Saper, C. B. et Shiromani, P. J. (2004). Effects of lesions of the histaminergic tuberomammillary nucleus on spontaneous sleep in rats. *Sleep* 27(7):1275-1281.
- Gervasoni, D., Darracq, L., Fort, P., Souliere, F., Chouvet, G. et Luppi, P. H. (1998). Electrophysiological evidence that noradrenergic neurons of the rat locus coeruleus are tonically inhibited by GABA during sleep. *Eur J Neurosci* 10(3):964-970.
- Gervasoni, D., Lin, S. C., Ribeiro, S., Soares, E. S., Pantoja, J. et Nicolelis, M. A. (2004). Global forebrain dynamics predict rat behavioral states and their transitions. *J Neurosci* 24(49):11137-11147.
- Gervasoni, D., Panconi, E., Henninot, V., Boissard, R., Barbagli, B., Fort, P. et Luppi, P. H. (2002). Effect of chronic treatment with milnacipran on sleep architecture in rats compared with paroxetine and imipramine. *Pharmacol Biochem Behav* 73(3):557-563.
- Gervasoni, D., Peyron, C., Rampon, C., Barbagli, B., Chouvet, G., Urbain, N., Fort, P. et Luppi, P. H. (2000). Role and origin of the GABAergic innervation of dorsal raphe serotonergic neurons. *J Neurosci* 20(11):4217-4225.

- Gong, H., McGinty, D., Guzman-Marin, R., Chew, K. T., Stewart, D. et Szymusiak, R. (2004). Activation of *c-fos* in GABAergic neurones in the preoptic area during sleep and in response to sleep deprivation. *J Physiol* 556(Pt 3):935-946.
- Gonzalez, J. A., Jensen, L. T., Fugger, L. et Burdakov, D. (2008). Metabolism-independent sugar sensing in central orexin neurons. *Diabetes* 57(10):2569-2576.
- Gonzalez, J. A., Reimann, F. et Burdakov, D. (2009). Dissociation between sensing and metabolism of glucose in sugar sensing neurones. *J Physiol* 587(Pt 1):41-48.
- Gooley, J. J., Lu, J., Chou, T. C., Scammell, T. E. et Saper, C. B. (2001). Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract. *Nat Neurosci* 4(12):1165.
- 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):1069-1073.
- Govindaiah, G. et Cox, C. L. (2006). Modulation of thalamic neuron excitability by orexins. *Neuropharmacology* 51(3):414-425.
- Gramsbergen, A. (1976). The development of the EEG in the rat. *Dev Psychobiol* 9(6):501-515.
- Gramsbergen, A., Schwartz, P. et Precht, H. F. (1970). The postnatal development of behavioral states in the rat. *Dev Psychobiol* 3(4):267-280.
- Greco, M. A., Fuller, P. M., Jhou, T. C., Martin-Schild, S., Zadina, J. E., Hu, Z., Shiromani, P. et Lu, J. (2008). Opioidergic projections to sleep-active neurons in the ventrolateral preoptic nucleus. *Brain Res* 1245:96-107.
- Griesemer, D., Zawar, C. et Neumcke, B. (2002). Cell-type specific depression of neuronal excitability in rat hippocampus by activation of ATP-sensitive potassium channels. *Eur Biophys J* 31(6):467-477.
- Grivel, J., Cvetkovic, V., Bayer, L., Machard, D., Tobler, I., Muhlethaler, M. et Serafin, M. (2005). The wake-promoting hypocretin/orexin neurons change their response to noradrenaline after sleep deprivation. *J Neurosci* 25(16):4127-4130.
- Grutzner, F. et Graves, J. A. (2004). A platypus' eye view of the mammalian genome. *Curr Opin Genet Dev* 14(6):642-649.
- 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):1523-1532.
- Guyon, A., Conductier, G., Rovere, C., Enfissi, A. et Nahon, J. L. (2009). Melanin-concentrating hormone producing neurons: Activities and modulations. *Peptides* 30(11):2031-2039.
- Gvilia, I., Xu, F., McGinty, D. et Szymusiak, R. (2006). Homeostatic regulation of sleep: a role for preoptic area neurons. *J Neurosci* 26(37):9426-9433.
- Halassa, M. M., Florian, C., Fellin, T., Munoz, J. R., Lee, S. Y., Abel, T., Haydon, P. G. et Frank, M. G. (2009). Astrocytic modulation of sleep homeostasis and cognitive consequences of sleep loss. *Neuron* 61(2):213-219.

- Hallanger, A. E., Levey, A. I., Lee, H. J., Rye, D. B. et Wainer, B. H. (1987). The origins of cholinergic and other subcortical afferents to the thalamus in the rat. *J Comp Neurol* 262(1):105-124.
- Hampson, L. J., Mackin, P. et Agius, L. (2007). Stimulation of glycogen synthesis and inactivation of phosphorylase in hepatocytes by serotonergic mechanisms, and counter-regulation by atypical antipsychotic drugs. *Diabetologia* 50(8):1743-1751.
- Han, Y., Shi, Y. F., Xi, W., Zhou, R., Tan, Z. B., Wang, H., Li, X. M., Chen, Z., Feng, G., Luo, M., Huang, Z. L., Duan, S. et Yu, Y. Q. (2014) Selective activation of cholinergic basal forebrain neurons induces immediate sleep-wake transitions. *Curr Biol* 24(6):693-698.
- 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):147-157.
- Hara, J., Beuckmann, C. T., Nambu, T., Willie, J. T., Chemelli, R. M., Sinton, C. M., Sugiyama, F., Yagami, K., Goto, K., Yanagisawa, M. et Sakurai, T. (2001). Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron* 30(2):345-354.
- Hassani, O. K., Henny, P., Lee, M. G. et Jones, B. E. (2010). GABAergic neurons intermingled with orexin and MCH neurons in the lateral hypothalamus discharge maximally during sleep. *Eur J Neurosci* 32(3):448-457.
- Hassani, O. K., Lee, M. G. et Jones, B. E. (2009). Melanin-concentrating hormone neurons discharge in a reciprocal manner to orexin neurons across the sleep-wake cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(7):2418-2422.
- Hattar, S., Liao, H. W., Takao, M., Berson, D. M. et Yau, K. W. (2002). Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* 295(5557):1065-1070.
- Heimer, L. et Alheid, G. F. (1991). Piecing together the puzzle of basal forebrain anatomy. *Adv Exp Med Biol* 295:1-42.
- Herrera, C. G., Cadavieco, M. C., Jago, S., Ponomarenko, A., Korotkova, T. et Adamantidis, A. (2015). Hypothalamic feedforward inhibition of thalamocortical network controls arousal and consciousness. *Nat Neurosci*.
- 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):1194-1216.
- Hess, R. (1964). The Electroencephalogram in Sleep. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 16:44-55.
- Hill, S. J. (1990). Distribution, properties, and functional characteristics of three classes of histamine receptor. *Pharmacol Rev* 42(1):45-83.
- Hinze-Selch, D., Mullington, J., Orth, A., Lauer, C. J. et Pollmacher, T. (1997). Effects of clozapine on sleep: a longitudinal study. *Biol Psychiatry* 42(4):260-266.
- Hobson, J. A., McCarley, R. W., Freedman, R. et Pivik, R. T. (1974). Time course of discharge rate changes by cat pontine brain stem neurons during sleep cycle. *J Neurophysiol* 37(6):1297-1309.

- Hobson, J. A., McCarley, R. W. et Wyzinski, P. W. (1975). Sleep cycle oscillation: reciprocal discharge by two brainstem neuronal groups. *Science* 189(4196):55-58.
- Hong, E. Y., Yoon, Y. S. et Lee, H. S. (2011). Differential distribution of melanin-concentrating hormone (MCH)- and hypocretin (Hcrt)-immunoreactive neurons projecting to the mesopontine cholinergic complex in the rat. *Brain Res* 1424:20-31.
- Horne, J. A. et Baulk, S. D. (2004). Awareness of sleepiness when driving. *Psychophysiology* 41(1):161-165.
- Horvath, T. L., Peyron, C., Diano, S., Ivanov, A., Aston-Jones, G., Kilduff, T. S. et van Den Pol, A. N. (1999). Hypocretin (orexin) activation and synaptic innervation of the locus coeruleus noradrenergic system. *J Comp Neurol* 415(2):145-159.
- Huang, Z. L., Qu, W. M., Eguchi, N., Chen, J. F., Schwarzschild, M. A., Fredholm, B. B., Urade, Y. et Hayaishi, O. (2005). Adenosine A2A, but not A1, receptors mediate the arousal effect of caffeine. *Nat Neurosci* 8(7):858-859.
- Huang, Z. L., Qu, W. M., Li, W. D., Mochizuki, T., Eguchi, N., Watanabe, T., Urade, Y. et Hayaishi, O. (2001). Arousal effect of orexin A depends on activation of the histaminergic system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(17):9965-9970.
- Huber, R., Ghilardi, M. F., Massimini, M. et Tononi, G. (2004). Local sleep and learning. *Nature* 430(6995):78-81.
- 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):351-373.
- Hurley, K. M., Herbert, H., Moga, M. M. et Saper, C. B. (1991). Efferent projections of the infralimbic cortex of the rat. *J Comp Neurol* 308(2):249-276.
- Ibrahim, N., Bosch, M. A., Smart, J. L., Qiu, J., Rubinstein, M., Ronnekleiv, O. K., Low, M. J. et Kelly, M. J. (2003). Hypothalamic proopiomelanocortin neurons are glucose responsive and express K(ATP) channels. *Endocrinology* 144(4):1331-1340.
- Inagaki, N., Gonoj, T., Clement, J. P., Wang, C. Z., Aguilar-Bryan, L., Bryan, J. et Seino, S. (1996). A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K⁺ channels. *Neuron* 16(5):1011-1017.
- Irmak, S.O. et de Lecea, L. (2014). Basal forebrain cholinergic modulation of sleep transitions. *Sleep* 37(12):1941-1951.
- Ishimori, K. (1909). True cause of sleep: A hypnogenic substance as evidenced in the brain of sleep-deprived animals. *Tokyo Igakkai Zasshi* 23:429-457.
- Isomoto, S., Kondo, C., Yamada, M., Matsumoto, S., Higashiguchi, O., Horio, Y., Matsuzawa, Y. et Kurachi, Y. (1996). A novel sulfonylurea receptor forms with BIR (Kir6.2) a smooth muscle type ATP-sensitive K⁺ channel. *J Biol Chem* 271(40):24321-24324.
- Jacobs, B. L. et McGinty, D. J. (1971). Effects of food deprivation on sleep and wakefulness in the rat. *Exp Neurol* 30(2):212-222.
- Jann, M. W., Lam, Y. W. et Chang, W. H. (1994). Rapid formation of clozapine in guinea-pigs and man following clozapine-N-oxide administration. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 328(2):243-250.

- Jego, S. et Adamantidis, A. (2013). MCH neurons: vigilant workers in the night. *Sleep* 36(12):1783-1786.
- Jego, S., Glasgow, S. D., Herrera, C. G., Ekstrand, M., Reed, S. J., Boyce, R., Friedman, J., Burdakov, D. et Adamantidis, A. R. (2013). Optogenetic identification of a rapid eye movement sleep modulatory circuit in the hypothalamus. *Nat Neurosci* 16(11):1637-1643.
- Jego, S., Salvert, D., Renouard, L., Mori, M., Goutagny, R., Luppi, P. H. et Fort, P. (2012). Tuberal hypothalamic neurons secreting the satiety molecule Nesfatin-1 are critically involved in paradoxical (REM) sleep homeostasis. *PLoS One* 7(12):e52525.
- Jenkins, J. B., Omori, T., Guan, Z., Vgontzas, A. N., Bixler, E. O. et Fang, J. (2006). Sleep is increased in mice with obesity induced by high-fat food. *Physiol Behav* 87(2):255-262.
- Jha, S. K., Ross, R. J. et Morrison, A. R. (2005). Sleep-related neurons in the central nucleus of the amygdala of rats and their modulation by the dorsal raphe nucleus. *Physiol Behav* 86(4):415-426.
- Jin, X., Shearman, L. P., Weaver, D. R., Zylka, M. J., de Vries, G. J. et Reppert, S. M. (1999). A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell* 96(1):57-68.
- Jones, B. E. (1991a). Noradrenergic locus coeruleus neurons: their distant connections and their relationship to neighboring (including cholinergic and GABAergic) neurons of the central gray and reticular formation. *Prog Brain Res* 88:15-30.
- Jones, B. E. (1991b). Paradoxical sleep and its chemical/structural substrates in the brain. *Neuroscience* 40(3):637-656.
- Jones, B. E. (2004). Activity, modulation and role of basal forebrain cholinergic neurons innervating the cerebral cortex. *Prog Brain Res* 145:157-169.
- Jones, B. E. et Cuello, A. C. (1989). Afferents to the basal forebrain cholinergic cell area from pontomesencephalic--catecholamine, serotonin, and acetylcholine--neurons. *Neuroscience* 31(1):37-61.
- Jones, B. E., Halaris, A. E., McIlhenny, M. et Moore, R. Y. (1977). Ascending projections of the locus coeruleus in the rat. I. Axonal transport in central noradrenaline neurons. *Brain Res* 127(1):1-21.
- Jones, B. E. et Hassani, O. K. (2013). The role of Hcrt/orx and MCH neurons in the sleep-wake state regulation. *Sleep* 36(12):1769-1772.
- Jones, B. E. et Moore, R. Y. (1977). Ascending projections of the locus coeruleus in the rat. II. Autoradiographic study. *Brain Res* 127(1):25-53.
- Jones, B. E. et Yang, T. Z. (1985). The efferent projections from the reticular formation and the locus coeruleus studied by anterograde and retrograde axonal transport in the rat. *J Comp Neurol* 242(1):56-92.
- Jouvet, M. (1962). [Research on the neural structures and responsible mechanisms in different phases of physiological sleep]. *Arch Ital Biol* 100:125-206.
- Jouvet, M. (1968). Insomnia and decrease of cerebral 5-hydroxytryptamine after destruction of the raphe system in the cat. *Adv Pharmacol* 6(Pt B):265-279.
- Jouvet, M. (1969). Biogenic amines and the states of sleep. *Science* 163(3862):32-41.

- Jouvet, M. (1972). The role of monoamines and acetylcholine-containing neurons in the regulation of the sleep-waking cycle. *Ergeb Physiol* 64:166-307.
- Jouvet, M. (1980). Paradoxical sleep and the nature-nurture controversy. *Prog Brain Res* 53:331-346.
- Jouvet, M. (1988). The regulation of paradoxical sleep by the hypothalamo-hypophysis. *Arch Ital Biol* 126(4):259-274.
- Jouvet, M. (1999). Sleep and serotonin: an unfinished story. *Neuropsychopharmacology* 21(2 Suppl):24S-27S.
- Jouvet, M. et Michel, F. (1959). [Electromyographic correlations of sleep in the chronic decorticate & mesencephalic cat]. *C R Seances Soc Biol Fil* 153(3):422-425.
- Jouvet, M., Michel, F. et Courjon, J. (1959). [On a stage of rapid cerebral electrical activity in the course of physiological sleep]. *C R Seances Soc Biol Fil* 153:1024-1028.
- Jouvet-Mounier, D. et Astic, L. (1968). [Study of the course of sleep in the young rat during the 1st postnatal month]. *C R Seances Soc Biol Fil* 162(1):119-123.
- Jouvet-Mounier, D., Astic, L. et Lacote, D. (1970). Ontogenesis of the states of sleep in rat, cat, and guinea pig during the first postnatal month. *Dev Psychobiol* 2(4):216-239.
- Kang, L., Routh, V. H., Kuzhikandathil, E. V., Gaspers, L. D. et Levin, B. E. (2004). Physiological and molecular characteristics of rat hypothalamic ventromedial nucleus glucosensing neurons. *Diabetes* 53(3):549-559.
- Kant, G. J., Pastel, R. H., Bauman, R. A., Meininger, G. R., Maughan, K. R., Robinson, T. N., 3rd, Wright, W. L. et Covington, P. S. (1995). Effects of chronic stress on sleep in rats. *Physiol Behav* 57(2):359-365.
- Kantor, S., Mochizuki, T., Janisiewicz, A. M., Clark, E., Nishino, S. et Scammell, T. E. (2009). Orexin neurons are necessary for the circadian control of REM sleep. *Sleep* 32(9):1127-1134.
- Karlsson, K. A. et Blumberg, M. S. (2002). The union of the state: myoclonic twitching is coupled with nuchal muscle atonia in infant rats. *Behav Neurosci* 116(5):912-917.
- Karlsson, K. A., Gall, A. J., Mohs, E. J., Seelke, A. M. et Blumberg, M. S. (2005). The neural substrates of infant sleep in rats. *PLoS Biol* 3(5):e143.
- Karnani, M. et Burdakov, D. (2011). Multiple hypothalamic circuits sense and regulate glucose levels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300(1):R47-55.
- Karnani, M. M., Apergis-Schoute, J., Adamantidis, A., Jensen, L. T., de Lecea, L., Fugger, L. et Burdakov, D. (2011). Activation of central orexin/hypocretin neurons by dietary amino acids. *Neuron* 72(4):616-629.
- Karnani, M. M., Szabo, G., Erdelyi, F. et Burdakov, D. (2013). Lateral hypothalamic GAD65 neurons are spontaneously firing and distinct from orexin- and melanin-concentrating hormone neurons. *J Physiol* 591(Pt 4):933-953.
- 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.

- Kaur, S., Thankachan, S., Begum, S., Liu, M., Blanco-Centurion, C. et Shiromani, P. J. (2009). Hypocretin-2 saporin lesions of the ventrolateral periaqueductal gray (vlPAG) increase REM sleep in hypocretin knockout mice. *PLoS One* 4(7):e6346.
- 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):210-220.
- Kilduff, T. S. et de Lecea, L. (2001). Mapping of the mRNAs for the hypocretin/orexin and melanin-concentrating hormone receptors: networks of overlapping peptide systems. *J Comp Neurol* 435(1):1-5.
- Kim, J., Nakajima, K., Oomura, Y., Wayner, M. J. et Sasaki, K. (2009a). Electrophysiological effects of ghrelin on pedunculo-pontine tegmental neurons in rats: An in vitro study. *Peptides* 30(4):745-757.
- Kim, J. W., Lee, J. S., Robinson, P. A. et Jeong, D. U. (2009b). Markov analysis of sleep dynamics. *Phys Rev Lett* 102(17):178104.
- Klisch, C., Inyushkin, A., Mordel, J., Karnas, D., Pevet, P. et Meissl, H. (2009). Orexin A modulates neuronal activity of the rodent suprachiasmatic nucleus in vitro. *Eur J Neurosci* 30(1):65-75.
- Kobayashi, T., Washiyama, K. et Ikeda, K. (2004). Modulators of G protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels: potentially therapeutic agents for addictive drug users. *Ann N Y Acad Sci* 1025:590-594.
- Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H. et Kangawa, K. (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402(6762):656-660.
- Konadhode, R. R., Pelluru, D., Blanco-Centurion, C., Zayachivsky, A., Liu, M., Uhde, T., Glen, W. B., Jr., van den Pol, A. N., Mulholland, P. J. et Shiromani, P. J. (2013). Optogenetic stimulation of MCH neurons increases sleep. *J Neurosci* 33(25):10257-10263.
- Konadhode, R. R., Pelluru, D. et Shiromani, P. J. (2014). Neurons containing orexin or melanin concentrating hormone reciprocally regulate wake and sleep. *Front Syst Neurosci* 8:244.
- Kong, D., Vong, L., Parton, L. E., Ye, C., Tong, Q., Hu, X., Choi, B., Bruning, J. C. et Lowell, B. B. (2010). Glucose stimulation of hypothalamic MCH neurons involves K(ATP) channels, is modulated by UCP2, and regulates peripheral glucose homeostasis. *Cell Metab* 12(5):545-552.
- Kong, J., Shepel, P. N., Holden, C. P., Mackiewicz, M., Pack, A. I. et Geiger, J. D. (2002). Brain glycogen decreases with increased periods of wakefulness: implications for homeostatic drive to sleep. *J Neurosci* 22(13):5581-5587.
- Kosse, C., Gonzalez, A. et Burdakov, D. (2015). Predictive models of glucose control: roles for glucose-sensing neurones. *Acta Physiol (Oxf)* 213(1):7-18.
- Koyama, S., Jin, Y. H. et Akaike, N. (1999). ATP-sensitive and Ca²⁺-activated K⁺ channel activities in the rat locus coeruleus neurons during metabolic inhibition. *Brain Res* 828(1-2):189-192.
- 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):1209-1219.
- Krout, K. E., Kawano, J., Mettenleiter, T. C. et Loewy, A. D. (2002). CNS inputs to the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Neuroscience* 110(1):73-92.

- Krueger, J. M. (2008). The role of cytokines in sleep regulation. *Curr Pharm Des* 14(32):3408-3416.
- Lagos, P., Monti, J. M., Jantos, H. et Torterolo, P. (2012). Microinjection of the melanin-concentrating hormone into the lateral basal forebrain increases REM sleep and reduces wakefulness in the rat. *Life Sci* 90(23-24):895-899.
- Lagos, P., Torterolo, P., Jantos, H. et Monti, J. M. (2011). Immunoneutralization of melanin-concentrating hormone (MCH) in the dorsal raphe nucleus: effects on sleep and wakefulness. *Brain Res* 1369:112-118.
- Lai, Y. Y. et Siegel, J. M. (1990). Cardiovascular and muscle tone changes produced by microinjection of cholinergic and glutamatergic agonists in dorsolateral pons and medial medulla. *Brain Res* 514(1):27-36.
- Lam, T. K., Pocai, A., Gutierrez-Juarez, R., Obici, S., Bryan, J., Aguilar-Bryan, L., Schwartz, G. J. et Rossetti, L. (2005a). Hypothalamic sensing of circulating fatty acids is required for glucose homeostasis. *Nat Med* 11(3):320-327.
- Lam, T. K., Schwartz, G. J. et Rossetti, L. (2005b). Hypothalamic sensing of fatty acids. *Nat Neurosci* 8(5):579-584.
- Landstrom, U., Knutsson, A., Lennernas, M. et Soderberg, L. (2000). Laboratory studies of the effects of carbohydrate consumption on wakefulness. *Nutr Health* 13(4):213-225.
- Laposky, A., Easton, A., Dugovic, C., Walisser, J., Bradfield, C. et Turek, F. (2005). Deletion of the mammalian circadian clock gene *BMAL1/Mop3* alters baseline sleep architecture and the response to sleep deprivation. *Sleep* 28(4):395-409.
- Laposky, A. D., Bradley, M. A., Williams, D. L., Bass, J. et Turek, F. W. (2008). Sleep-wake regulation is altered in leptin-resistant (db/db) genetically obese and diabetic mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295(6):R2059-2066.
- Laposky, A. D., Shelton, J., Bass, J., Dugovic, C., Perrino, N. et Turek, F. W. (2006). Altered sleep regulation in leptin-deficient mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290(4):R894-903.
- Lazarus, M., Shen, H. Y., Cherasse, Y., Qu, W. M., Huang, Z. L., Bass, C. E., Winsky-Sommerer, R., Semba, K., Fredholm, B. B., Boison, D., Hayaishi, O., Urade, Y. et Chen, J. F. (2011). Arousal effect of caffeine depends on adenosine A2A receptors in the shell of the nucleus accumbens. *J Neurosci* 31(27):10067-10075.
- Le Barillier, L., Leger, L., Luppi, P. H., Fort, P., Malleret, G. et Salin, P. A. (2015). Genetic deletion of melanin-concentrating hormone neurons impairs hippocampal short-term synaptic plasticity and hippocampal-dependent forms of short-term memory. *Hippocampus* 25(11):1361-1373.
- Lee, H. S., Kim, M. A. et Waterhouse, B. D. (2005a). Retrograde double-labeling study of common afferent projections to the dorsal raphe and the nuclear core of the locus coeruleus in the rat. *J Comp Neurol* 481(2):179-193.
- Lee, M. G., Hassani, O. K., Alonso, A. et Jones, B. E. (2005b). Cholinergic basal forebrain neurons burst with theta during waking and paradoxical sleep. *J Neurosci* 25(17):4365-4369.
- Lee, M. G., Hassani, O. K. et Jones, B. E. (2005c). Discharge of identified orexin/hypocretin neurons across the sleep-waking cycle. *J Neurosci* 25(28):6716-6720.

- Lee, M. G., Manns, I. D., Alonso, A. et Jones, B. E. (2004). Sleep-wake related discharge properties of basal forebrain neurons recorded with micropipettes in head-fixed rats. *J Neurophysiol* 92(2):1182-1198.
- Legendre, R. et Pieron, H. (1913). Recherches sur le besoin de sommeil consecutif à une veille prolongée. *Zeitschrift für Allgemeine Physiologie* 14:235-262.
- Leger, L., Goutagny, R., Sapin, E., Salvert, D., Fort, P. et Luppi, P. H. (2009). Noradrenergic neurons expressing Fos during waking and paradoxical sleep deprivation in the rat. *J Chem Neuroanat* 37(3):149-157.
- Leurs, R., Smit, M. J. et Timmerman, H. (1995). Molecular pharmacological aspects of histamine receptors. *Pharmacol Ther* 66(3):413-463.
- Levin, B. E., Routh, V. H., Kang, L., Sanders, N. M. et Dunn-Meynell, A. A. (2004). Neuronal gluco-sensing: what do we know after 50 years? *Diabetes* 53(10):2521-2528.
- Lima, F. F., Sita, L. V., Oliveira, A. R., Costa, H. C., da Silva, J. M., Mortara, R. A., Haemmerle, C. A., Xavier, G. F., Canteras, N. S. et Bittencourt, J. C. (2013). Hypothalamic melanin-concentrating hormone projections to the septo-hippocampal complex in the rat. *J Chem Neuroanat* 47:1-14.
- Lin, J. S., Hou, Y., Sakai, K. et Jouvet, M. (1996). Histaminergic descending inputs to the mesopontine tegmentum and their role in the control of cortical activation and wakefulness in the cat. *J Neurosci* 16(4):1523-1537.
- Lin, J. S., Kitahama, K., Fort, P., Panula, P., Denney, R. M. et Jouvet, M. (1993). Histaminergic system in the cat hypothalamus with reference to type B monoamine oxidase. *J Comp Neurol* 330(3):405-420.
- Lin, J. S., Sakai, K. et Jouvet, M. (1988). Evidence for histaminergic arousal mechanisms in the hypothalamus of cat. *Neuropharmacology* 27(2):111-122.
- Lin, J. S., Sakai, K., Vanni-Mercier, G., Arrang, J. M., Garbarg, M., Schwartz, J. C. et Jouvet, M. (1990). Involvement of histaminergic neurons in arousal mechanisms demonstrated with H3-receptor ligands in the cat. *Brain Res* 523(2):325-330.
- Liu, R. J., van den Pol, A. N. et Aghajanian, G. K. (2002). Hypocretins (orexins) regulate serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus by excitatory direct and inhibitory indirect actions. *J Neurosci* 22(21):9453-9464.
- Liu, Y. W., Li, J. et Ye, J. H. (2010). Histamine regulates activities of neurons in the ventrolateral preoptic nucleus. *J Physiol* 588(Pt 21):4103-4116.
- Liu, Z. W. et Gao, X. B. (2007). Adenosine inhibits activity of hypocretin/orexin neurons by the A1 receptor in the lateral hypothalamus: a possible sleep-promoting effect. *J Neurophysiol* 97(1):837-848.
- Lo, C. C., Chou, T., Penzel, T., Scammell, T. E., Strecker, R. E., Stanley, H. E. et Ivanov, P. (2004). Common scale-invariant patterns of sleep-wake transitions across mammalian species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(50):17545-17548.
- Lo, C. C., Nunes Amaral, L. A., Havlin, S., Ivanov, P. C., Penzel, T., Peter, J.-H. et Stanley, H. E. (2002). Dynamics of sleep-wake transitions during sleep. *Europhys Lett* 57(5):625-631.

- Loffler, S., Korber, J., Nubbemeyer, U. et Fehsel, K. (2012). Comment on «Impaired respiratory and body temperature control upon acute serotonergic neuron inhibition». *Science* 337(6095):646; author reply 646.
- Losier, B. J. et Semba, K. (1993). Dual projections of single cholinergic and aminergic brainstem neurons to the thalamus and basal forebrain in the rat. *Brain Res* 604(1-2):41-52.
- Lu, J., Bjorkum, A. A., Xu, M., Gaus, S. E., Shiromani, P. J. et Saper, C. B. (2002a). Selective activation of the extended ventrolateral preoptic nucleus during rapid eye movement sleep. *J Neurosci* 22(11):4586-4576.
- Lu, J., Greco, M. A., Shiromani, P. et Saper, C. B. (2000). Effect of lesions of the ventrolateral preoptic nucleus on NREM and REM sleep. *J Neurosci* 20(10):3830-3842.
- Lu, J., Sherman, D., Devor, M. et Saper, C. B. (2006). A putative flip-flop switch for control of REM sleep. *Nature* 441(7093):589-594.
- Lu, J., Zhang, Y. H., Chou, T. C., Gaus, S. E., Elmquist, J. K., Shiromani, P. et Saper, C. B. (2001). Contrasting effects of ibotenate lesions of the paraventricular nucleus and subparaventricular zone on sleep-wake cycle and temperature regulation. *J Neurosci* 21(13):4864-4874.
- Lu, S., Guan, J. L., Wang, Q. P., Uehara, K., Yamada, S., Goto, N., Date, Y., Nakazato, M., Kojima, M., Kangawa, K. et Shioda, S. (2002b). Immunocytochemical observation of ghrelin-containing neurons in the rat arcuate nucleus. *Neurosci Lett* 321(3):157-160.
- Luppi, P. H., Aston-Jones, G., Akaoka, H., Chouvet, G. et Jouvet, M. (1995). Afferent projections to the rat locus coeruleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing with cholera-toxin B subunit and Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *Neuroscience* 65(1):119-160.
- Luppi, P. H., Clement, O. et Fort, P. (2013a). Paradoxical (REM) sleep genesis by the brainstem is under hypothalamic control. *Curr Opin Neurobiol* 23(5):786-792.
- Luppi, P. H., Gervasoni, D., Boissard, R., Verret, L., Goutagny, R., Peyron, C., Salvert, D., Léger, L., Barbagli, B. et Fort, P. (2004). Brainstem structures responsible for paradoxical sleep onset and maintenance. *Arch Ital Biol* 142(4):397-411.
- 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):271-283.
- Luppi, P. H., Peyron, C. et Fort, P. (2013b). Role of MCH neurons in paradoxical (REM) sleep control. *Sleep* 36(12):1775-1776.
- Luppi, P. H., Sakai, K., Fort, P., Salvert, D. et Jouvet, M. (1988). The nuclei of origin of monoaminergic, peptidergic, and cholinergic afferents to the cat nucleus reticularis magnocellularis: a double-labeling study with cholera toxin as a retrograde tracer. *J Comp Neurol* 277(1):1-20.
- Lyamin, O. I., Manger, P. R., Ridgway, S. H., Mukhametov, L. M. et Siegel, J. M. (2008). Cetacean sleep: an unusual form of mammalian sleep. *Neurosci Biobehav Rev* 32(8):1451-1484.
- Lyamin, O. I., Mukhametov, L. M. et Siegel, J. M. (2004). Relationship between sleep and eye state in Cetaceans and Pinnipeds. *Arch Ital Biol* 142(4):557-568.
- Lydic, R., McCarley, R. W. et Hobson, J. A. (1983). The time-course of dorsal raphe discharge, PGO waves, and muscle tone averaged across multiple sleep cycles. *Brain Res* 274(2):365-370.

- Mahoney, C. E., Brewer, J. M. et Bittman, E. L. (2013). Central control of circadian phase in arousal-promoting neurons. *PLoS One* 8(6):e67173.
- 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):3057-3072.
- 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):4669-4679.
- Manns, I. D., Mainville, L. et Jones, B. E. (2001). Evidence for glutamate, in addition to acetylcholine and GABA, neurotransmitter synthesis in basal forebrain neurons projecting to the entorhinal cortex. *Neuroscience* 107(2):249-263.
- Marcus, J. N., Aschkenasi, C. J., Lee, C. E., Chemelli, R. M., Saper, C. B., Yanagisawa, M. et Elmquist, J. K. (2001). Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *J Comp Neurol* 435(1):6-25.
- Marston, O. J., Williams, R. H., Canal, M. M., Samuels, R. E., Upton, N. et Piggins, H. D. (2008). Circadian and dark-pulse activation of orexin/hypocretin neurons. *Mol Brain* 1:19.
- Mason, S. T. et Fibiger, H. C. (1979). Regional topography within noradrenergic locus coeruleus as revealed by retrograde transport of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 187(4):703-724.
- Matsuo, S., Jang, I. S., Nabekura, J. et Akaike, N. (2003). alpha 2-Adrenoceptor-mediated presynaptic modulation of GABAergic transmission in mechanically dissociated rat ventrolateral preoptic neurons. *J Neurophysiol* 89(3):1640-1648.
- 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 and their role in neuromodulation of thalamocortical activity. *Prog Neurobiol* 39(4):337-388.
- 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.
- McEwen, B. S. (2000). Allostasis and allostatic load: implications for neuropsychopharmacology. *Neuropsychopharmacology* 22(2):108-124.
- McGinty, D. et Alam, N. (2013). MCH neurons: the end of the beginning. *Sleep* 36(12):1773-1774.
- McGinty, D. J. et Harper, R. M. (1976). Dorsal raphe neurons: depression of firing during sleep in cats. *Brain Res* 101(3):569-575.
- McGuire, M., Zhang, Y., White, D. P. et Ling, L. (2004). Serotonin receptor subtypes required for ventilatory long-term facilitation and its enhancement after chronic intermittent hypoxia in awake rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286(2):R334-341.
- Mesulam, M. M., Mufson, E. J., Levey, A. I. et Wainer, B. H. (1983). Cholinergic innervation of cortex by the basal forebrain: cytochemistry and cortical connections of the septal area, diagonal band nuclei, nucleus basalis (substantia innominata), and hypothalamus in the rhesus monkey. *J Comp Neurol* 214(2):170-197.

- Miki, T., Liss, B., Minami, K., Shiuchi, T., Saraya, A., Kashima, Y., Horiuchi, M., Ashcroft, F., Mino-koshi, Y., Roeper, J. et Seino, S. (2001). ATP-sensitive K⁺ channels in the hypothalamus are essential for the maintenance of glucose homeostasis. *Nat Neurosci* 4(5):507-512.
- Mileykovskiy, B. Y., Kiyashchenko, L. I. et Siegel, J. M. (2005). Behavioral correlates of activity in identified hypocretin/orexin neurons. *Neuron* 46(5):787-798.
- Minet-Ringuet, J., Le Ruyet, P. M., Tome, D. et Even, P. C. (2004). A tryptophan-rich protein diet efficiently restores sleep after food deprivation in the rat. *Behav Brain Res* 152(2):335-340.
- Mirmiran, M. et Corner, M. (1982). Neuronal discharge patterns in the occipital cortex of developing rats during active and quiet sleep. *Brain Res* 255(1):37-48.
- Mochizuki, T., Yamatodani, A., Okakura, K., Horii, A., Inagaki, N. et Wada, H. (1992). Circadian rhythm of histamine release from the hypothalamus of freely moving rats. *Physiol Behav* 51(2):391-394.
- Modirrousta, M., Mainville, L. et Jones, B. E. (2005). Orexin and MCH neurons express c-Fos differently after sleep deprivation vs. recovery and bear different adrenergic receptors. *Eur J Neurosci* 21(10):2807-2816.
- Monnier, M., Sauer, R. et Hatt, A. M. (1970). The activating effect of histamine on the central nervous system. *Int Rev Neurobiol* 12:265-305.
- Monti, J. M., Lagos, P., Jantos, H. et Torterolo, P. (2015). Increased REM sleep after intra-locus coeruleus nucleus microinjection of melanin-concentrating hormone (MCH) in the rat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 56:185-188.
- Moore, R. Y. et Eichler, V. B. (1972). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res* 42(1):201-206.
- Morairty, S., Rainnie, D., McCarley, R. et Greene, R. (2004). Disinhibition of ventrolateral preoptic area sleep-active neurons by adenosine: a new mechanism for sleep promotion. *Neuroscience* 123(2):451-457.
- Morin, L. P., Goodless-Sanchez, N., Smale, L. et Moore, R. Y. (1994). Projections of the suprachiasmatic nuclei, subparaventricular zone and retrochiasmatic area in the golden hamster. *Neuroscience* 61(2):391-410.
- Moruzzi, G. (1972). The sleep-waking cycle. *Ergeb Physiol* 64:1-165.
- Moruzzi, G. et Magoun, H. W. (1949). Brain stem reticular formation and activation of the EEG. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1(4):455-473.
- Mouri, T., Takahashi, K., Kawachi, H., Sone, M., Totsune, K., Murakami, O., Itoi, K., Ohneda, M., Sasano, H. et Sasano, N. (1993). Melanin-concentrating hormone in the human brain. *Peptides* 14(3):643-646.
- Mukhametov, L. M., Lyamin, O. I., Chetyrbok, I. S., Vassilyev, A. A. et Diaz, R. P. (1992). Sleep in an Amazonian manatee, *Trichechus inunguis*. *Experientia* 48(4):417-419.
- Mukhametov, L. M., Oleksenko, A. I. et Polyakova, I. G. (1997). The Black Sea bottlenose dolphin: the structure of sleep. V. E. Sokolov and V. E. Romanenko. *The Black Sea Bottlenose Dolphin*. Nauka, Moscow: pp. 492-512.

- Mul, J. D., la Fleur, S. E., Toonen, P. W., Afrasiab-Middelmann, A., Binnekade, R., Schetters, D., Verheij, M. M., Sears, R. M., Homberg, J. R., Schoffelmeer, A. N., Adan, R. A., DiLeone, R. J., De Vries, T. J. et Cuppen, E. (2011). Chronic loss of melanin-concentrating hormone affects motivational aspects of feeding in the rat. *PLoS One* 6(5):e19600.
- Münster-Wandowski, A., Gomez-Lira, G. et Gutierrez, R. (2013). Mixed neurotransmission in the hippocampal mossy fibers. *Front Cell Neurosci* 22(7):210.
- Muraki, Y., Yamanaka, A., Tsujino, N., Kilduff, T. S., Goto, K. et Sakurai, T. (2004). Serotonergic regulation of the orexin/hypocretin neurons through the 5-HT_{1A} receptor. *J Neurosci* 24(32):7159-7166.
- Nakamura, S., Tsumori, T., Yokota, S., Oka, T. et Yasui, Y. (2009). Amygdaloid axons innervate melanin-concentrating hormone- and orexin-containing neurons in the mouse lateral hypothalamus. *Brain Res* 1278:66-74.
- Nawaratne, V., Leach, K., Suratman, N., Loiacono, R. E., Felder, C. C., Armbruster, B. N., Roth, B. L., Sexton, P. M. et Christopoulos, A. (2008). New insights into the function of M4 muscarinic acetylcholine receptors gained using a novel allosteric modulator and a DREADD (designer receptor exclusively activated by a designer drug). *Mol Pharmacol* 74(4):1119-1131.
- Nicolaidis, S. (2006). Metabolic mechanism of wakefulness (and hunger) and sleep (and satiety): Role of adenosine triphosphate and hypocretin and other peptides. *Metabolism* 55(10 Suppl 2):S24-29.
- Nijhuis, J. G., Staisch, K. J., Martin, C. B., Jr. et Prechtel, H. F. (1984). A sinusoidal-like fetal heart-rate pattern in association with fetal sucking--report of 2 cases. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 16(5):353-358.
- Nitz, D. et Siegel, J. (1997a). GABA release in the dorsal raphe nucleus: role in the control of REM sleep. *Am J Physiol* 273(1 Pt 2):R451-455.
- Nitz, D. et Siegel, J. M. (1996). GABA release in posterior hypothalamus across sleep-wake cycle. *Am J Physiol* 271(6 Pt 2):R1707-1712.
- Nitz, D. et Siegel, J. M. (1997b). GABA release in the locus coeruleus as a function of sleep/wake state. *Neuroscience* 78(3):795-801.
- Novak, C. M. et Nunez, A. A. (2000). A sparse projection from the suprachiasmatic nucleus to the sleep active ventrolateral preoptic area in the rat. *Neuroreport* 11(1):93-96.
- Nygren, L. G. et Olson, L. (1977). A new major projection from locus coeruleus: the main source of noradrenergic nerve terminals in the ventral and dorsal columns of the spinal cord. *Brain Res* 132(1):85-93.
- Oishi, Y., Huang, Z. L., Fredholm, B. B., Urade, Y. et Hayaishi, O. (2008). Adenosine in the tuberomammillary nucleus inhibits the histaminergic system via A₁ receptors and promotes non-rapid eye movement sleep. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(50):19992-19997.
- Olive, E. (2013). Effet du peptide « l'hormone concentrant la mélanine » sur l'activité des neurones promoteurs du sommeil lent du noyau ventrolatéral préoptique, Université Pierre et Marie Curie. Master Recherche de Sciences et Technologie, Mention Biologie Intégrative et Physiologie: 24.

- Olson, L. et Fuxe, K. (1971). On the projections from the locus coeruleus noradrenaline neurons: the cerebellar innervation. *Brain Res* 28(1):165-171.
- Oomura, Y., Nakamura, T., Sugimori, M. et Yamada, Y. (1975). Effect of free fatty acid on the rat lateral hypothalamic neurons. *Physiol Behav* 14(04):483-486.
- Oomura, Y., Ono, T., Ooyama, H. et Wayner, M. J. (1969). Glucose and osmosensitive neurones of the rat hypothalamus. *Nature* 222(5190):282-284.
- Oomura, Y., Ooyama, H., Sugimori, M., Nakamura, T. et Yamada, Y. (1974). Glucose inhibition of the glucose-sensitive neurone in the rat lateral hypothalamus. *Nature* 247(5439):284-286.
- Opp, M. R. (1995). Corticotropin-releasing hormone involvement in stressor-induced alterations in sleep and in the regulation of waking. *Adv Neuroimmunol* 5(2):127-143.
- Palma, B. D., Suchecki, D. et Tufik, S. (2000). Differential effects of acute cold and footshock on the sleep of rats. *Brain Res* 861(1):97-104.
- Pan, W. J., Osmanovic, S. S. et Shefner, S. A. (1995). Characterization of the adenosine A1 receptor-activated potassium current in rat locus ceruleus neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 273(1):537-544.
- Panula, P., Yang, H. Y. et Costa, E. (1984). Histamine-containing neurons in the rat hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(8):2572-2576.
- Papale, L. A., Andersen, M. L., Antunes, I. B., Alvarenga, T. A. et Tufik, S. (2005). Sleep pattern in rats under different stress modalities. *Brain Res* 1060(1-2):47-54.
- Parker, J. A. et Bloom, S. R. (2012). Hypothalamic neuropeptides and the regulation of appetite. *Neuropharmacology* 63(1):18-30.
- Parks, G. S., Olivas, N. D., Ikrar, T., Sanathara, N. M., Wang, L., Wang, Z., Civelli, O. et Xu, X. (2014a). Histamine inhibits the melanin-concentrating hormone system: implications for sleep and arousal. *J Physiol* 592(Pt 10):2183-2196.
- Parks, G. S., Wang, L., Wang, Z. et Civelli, O. (2014b). Identification of neuropeptide receptors expressed by melanin-concentrating hormone neurons. *J Comp Neurol* 522(17):3817-3833.
- Parmelee, A. H., Akiyama, Y. et Schulte, F. J. (1967a). Power spectral analysis of the EEG in newborn infants during sleep. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 23(1):81-82.
- Parmelee, A. H., Jr., Wenner, W. H., Akiyama, Y., Schultz, M. et Stern, E. (1967b). Sleep states in premature infants. *Dev Med Child Neurol* 9(1):70-77.
- 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):7695-7711.
- Parton, L. E., Ye, C. P., Coppari, R., Enriori, P. J., Choi, B., Zhang, C. Y., Xu, C., Vianna, C. R., Balthasar, N., Lee, C. E., Elmquist, J. K., Cowley, M. A. et Lowell, B. B. (2007). Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. *Nature* 449(7159):228-232.
- Pawlyk, A. C., Morrison, A. R., Ross, R. J. et Brennan, F. X. (2008). Stress-induced changes in sleep in rodents: models and mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev* 32(1):99-117.

- Pawlyk, A. C., Sanford, L. D., Brennan, F. X., Morrison, A. R. et Ross, R. J. (2006). Corticotropin-releasing factor microinjection into the central nucleus of the amygdala alters REM sleep. *Pharmacol Rep* 58(1):125-130.
- Pellerin, L. et Magistretti, P. J. (2003). How to balance the brain energy budget while spending glucose differently. *J Physiol* 546(Pt 2):325.
- Pellerin, L., Pellegrini, G., Bittar, P. G., Charnay, Y., Bouras, C., Martin, J. L., Stella, N. et Magistretti, P. J. (1998). Evidence supporting the existence of an activity-dependent astrocyte-neuron lactate shuttle. *Dev Neurosci* 20(4-5):291-299.
- Pelluru, D., Konadhode, R. R. et Shiromani, P. J. (2013). MCH neurons are the primary sleep-promoting group. *Sleep* 36(12):1779-1781.
- Peyron, C., Sapin, E., Leger, L., Luppi, P. H. et Fort, P. (2009). Role of the melanin-concentrating hormone neuropeptide in sleep regulation. *Peptides* 30(11):2052-2059.
- Peyron, C., Tighe, D. K., van den Pol, A. N., de Lecea, L., Heller, H. C., Sutcliffe, J. G. et Kilduff, T. S. (1998). Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci* 18(23):9996-10015.
- Pirmohamed, M., Williams, D., Madden, S., Templeton, E. et Park, B. K. (1995). Metabolism and bioactivation of clozapine by human liver in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 272(3):984-990.
- Pissios, P. (2009). Animals models of MCH function and what they can tell us about its role in energy balance. *Peptides* 30(11):2040-2044.
- Pissios, P., Bradley, R. L. et Maratos-Flier, E. (2006). Expanding the scales: The multiple roles of MCH in regulating energy balance and other biological functions. *Endocr Rev* 27(6):606-620.
- Pollock, M. S. et Mistlberger, R. E. (2003). Rapid eye movement sleep induction by microinjection of the GABA-A antagonist bicuculline into the dorsal subcoeruleus area of the rat. *Brain Res* 962(1-2):68-77.
- Porkka-Heiskanen, T., Strecker, R. E. et McCarley, R. W. (2000). Brain site-specificity of extracellular adenosine concentration changes during sleep deprivation and spontaneous sleep: an in vivo microdialysis study. *Neuroscience* 99(3):507-517.
- Porkka-Heiskanen, T., Strecker, R. E., Thakkar, M., Bjorkum, A. A., Greene, R. W. et McCarley, R. W. (1997). Adenosine: a mediator of the sleep-inducing effects of prolonged wakefulness. *Science* 276(5316):1265-1268.
- Portas, C. M. et McCarley, R. W. (1994). Behavioral state-related changes of extracellular serotonin concentration in the dorsal raphe nucleus: a microdialysis study in the freely moving cat. *Brain Res* 648(2):306-312.
- Porter, J. M. et Horne, J. A. (1981). Bed-time food supplements and sleep: effects of different carbohydrate levels. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 51(4):426-433.
- Puizillout, J. J., Gaudin-Chazal, G., Daszuta, A., Seyfritz, N. et Ternaux, J. P. (1979). Release of endogenous serotonin from «encephale isole» cats. II - Correlations with raphe neuronal activity and sleep and wakefulness. *J Physiol (Paris)* 75(5):531-537.

- Python, A., Steimer, T., de Saint Hilaire, Z., Mikolajewski, R. et Nicolaidis, S. (2001). Extracellular serotonin variations during vigilance states in the preoptic area of rats: a microdialysis study. *Brain Res* 910(1-2):49-54.
- Radulovacki, M., Virus, R. M., Djuricic-Nedelson, M. et Green, R. D. (1984). Adenosine analogs and sleep in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 228(2):268-274.
- Rainnie, D. G., Grunze, H. C., McCarley, R. W. et Greene, R. W. (1994). Adenosine inhibition of mesopontine cholinergic neurons: implications for EEG arousal. *Science* 263(5147):689-692.
- Rampin, C., Cespuglio, R., Chastrette, N. et Jouvet, M. (1991). Immobilisation stress induces a paradoxical sleep rebound in rat. *Neurosci Lett* 126(2):113-118.
- Rampon, C., Peyron, C., Petit, J. M., Fort, P., Gervasoni, D. et Luppi, P. H. (1996). Origin of the glycinergic innervation of the rat trigeminal motor nucleus. *Neuroreport* 7(18):3081-3085.
- Ranson, S. W. (1939). Somnolence caused by hypothalamic lesions in the monkey. *Arch NeurPsych* 41(1):1-23.
- Rao, Y., Lu, M., Ge, F., Marsh, D. J., Qian, S., Wang, A. H., Picciotto, M. R. et Gao, X. B. (2008). Regulation of synaptic efficacy in hypocretin/orexin-containing neurons by melanin concentrating hormone in the lateral hypothalamus. *J Neurosci* 28(37):9101-9110.
- Rattenborg, N. C., Amlaner, C. J. et Lima, S. L. (2000). Behavioral, neurophysiological and evolutionary perspectives on unihemispheric sleep. *Neurosci Biobehav Rev* 24(8):817-842.
- Ray, R. S., Corcoran, A. E., Brust, R. D., Kim, J. C., Richerson, G. B., Nattie, E. et Dymecki, S. M. (2011). Impaired respiratory and body temperature control upon acute serotonergic neuron inhibition. *Science* 333(6042):637-642.
- Reppert, S. M. et Weaver, D. R. (2002). Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418(6901):935-941.
- Ritter, R. C., Slusser, P. G. et Stone, S. (1981). Glucoreceptors controlling feeding and blood glucose: location in the hindbrain. *Science* 213(4506):451-452.
- Robertson, G. S., Lee, C. J., Sridhar, K., Nakabeppu, Y., Cheng, M., Wang, Y. M. et Caron, M. G. (2004). Clozapine-, but not haloperidol-, induced increases in deltaFosB-like immunoreactivity are completely blocked in the striatum of mice lacking D3 dopamine receptors. *Eur J Neurosci* 20(11):3189-3194.
- Roffwarg, H. P., Muzio, J. N. et Dement, W. C. (1966). Ontogenetic development of the human sleep-dream cycle. *Science* 152(3722):604-619.
- Rogan, S. C. et Roth, B. L. (2011). Remote control of neuronal signaling. *Pharmacol Rev* 63(2):291-315.
- Roky, R., Kapas, L., Taishi, T. P., Fang, J. et Krueger, J. M. (1999). Food restriction alters the diurnal distribution of sleep in rats. *Physiol Behav* 67(5):697-703.
- Root, D. H., Mejias-Aponte, C. A., Zhang, S., Wang, H. L., Hoffman, A. F., Lupica, C. R. et Morales, M. (2014). Single rodent mesohabenular axons release glutamate and GABA. *Nat Neurosci* 17(11):1543-1551.

- Routh, V. H. (2002). Glucose-sensing neurons: are they physiologically relevant? *Physiol Behav* 76(3):403-413.
- Routh, V. H. (2010). Glucose sensing neurons in the ventromedial hypothalamus. *Sensors (Basel)* 10(10):9002-9025.
- Saint-Mleux, B., Bayer, L., Eggermann, E., Jones, B. E., Muhlethaler, M. et Serafin, M. (2007). Suprachiasmatic modulation of noradrenaline release in the ventrolateral preoptic nucleus. *J Neurosci* 27(24):6412-6416.
- Saint-Mleux, B., Eggermann, E., Bisetti, A., Bayer, L., Machard, D., Jones, B. E., Muhlethaler, M. et Serafin, M. (2004). Nicotinic enhancement of the noradrenergic inhibition of sleep-promoting neurons in the ventrolateral preoptic area. *J Neurosci* 24(1):63-67.
- 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., Hamamoto, A. et Kobayashi, Y. (2013). Regulated Control of Melanin-Concentrating Hormone Receptor 1 through Posttranslational Modifications. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4:154.
- Saito, Y. et Nagasaki, H. (2008). The melanin-concentrating hormone system and its physiological functions. *Results Probl Cell Differ* 46:159-179.
- Saito, Y. C., Tsujino, N., Hasegawa, E., Akashi, K., Abe, M., Mieda, M., Sakimura, K. et Sakurai, T. (2013). GABAergic neurons in the preoptic area send direct inhibitory projections to orexin neurons. *Front Neural Circuits* 7:192.
- Sakai, K. (2011). Sleep-waking discharge profiles of dorsal raphe nucleus neurons in mice. *Neuroscience* 197:200-224.
- Sakai, K., Crochet, S. et Onoe, H. (2001). Pontine structures and mechanisms involved in the generation of paradoxical (REM) sleep. *Arch Ital Biol* 139(1-2):93-107.
- Sakai, K. et Jouvet, M. (1980). Brain stem PGO-on cells projecting directly to the cat dorsal lateral geniculate nucleus. *Brain Res* 194(2):500-505.
- Sakai, K., Kanamori, N. et Jouvet, M. (1979). [Neuronal activity specific to paradoxical sleep in the bulbar reticular formation in the unrestrained cat]. *C R Seances Acad Sci D* 289(6):557-561.
- Sakai, K. et Koyama, Y. (1996). Are there cholinergic and non-cholinergic paradoxical sleep-on neurons in the pons? *Neuroreport* 7(15-17):2449-2453.
- Sakurai, T. (2005). Roles of orexin/hypocretin in regulation of sleep/wakefulness and energy homeostasis. *Sleep Med Rev* 9(4):231-241.
- Sakurai, T. (2007). The neural circuit of orexin (hypocretin): maintaining sleep and wakefulness. *Nat Rev Neurosci* 8(3):171-181.
- Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R. M., Tanaka, H., Williams, S. C., Richardson, J. A., Kozlowski, G. P., Wilson, S., Arch, J. R., Buckingham, R. E., Haynes, A. C., Carr, S. A., Annan, R. S., McNulty, D. E., Liu, W. S., Terrett, J. A., Elshourbagy, N. A., Bergsma, D. J. et Yanagisawa, M. (1998). Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92(4):573-585.

- Sakurai, T., Nagata, R., Yamanaka, A., Kawamura, H., Tsujino, N., Muraki, Y., Kageyama, H., Kunita, S., Takahashi, S., Goto, K., Koyama, Y., Shioda, S. et Yanagisawa, M. (2005). Input of orexin/hypocretin neurons revealed by a genetically encoded tracer in mice. *Neuron* 46(2):297-308.
- Sanford, L. D., Tang, X., Xiao, J., Ross, R. J. et Morrison, A. R. (2003). GABAergic regulation of REM sleep in reticularis pontis oralis and caudalis in rats. *J Neurophysiol* 90(2):938-945.
- Saper, C. B., Chou, T. C. et Scammell, T. E. (2001). The sleep switch: hypothalamic control of sleep and wakefulness. *Trends Neurosci* 24(12):726-731.
- Saper, C. B., Fuller, P. M., Pedersen, N. P., Lu, J. et Scammell, T. E. (2010). Sleep state switching. *Neuron* 68(6):1023-1042.
- Saper, C. B., Scammell, T. E. et Lu, J. (2005). Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature* 437(7063):1257-1263.
- 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.
- Sasaki, K., Suzuki, M., Mieda, M., Tsujino, N., Roth, B. et Sakurai, T. (2011). Pharmacogenetic modulation of orexin neurons alters sleep/wakefulness states in mice. *PLoS One* 6(5):e20360.
- Sastre, J. P., Buda, C., Kitahama, K. et Jouvet, M. (1996). Importance of the ventrolateral region of the periaqueductal gray and adjacent tegmentum in the control of paradoxical sleep as studied by muscimol microinjections in the cat. *Neuroscience* 74(2):415-426.
- Sastre, J. P., Sakai, K. et Jouvet, M. (1981). Are the gigantocellular tegmental field neurons responsible for paradoxical sleep? *Brain Res* 229(1):147-161.
- Satoh, K. et Fibiger, H. C. (1986). Cholinergic neurons of the laterodorsal tegmental nucleus: efferent and afferent connections. *J Comp Neurol* 253(3):277-302.
- Scammell, T. E., Gerashchenko, D. Y., Mochizuki, T., McCarthy, M. T., Estabrooke, I. V., Sears, C. A., Saper, C. B., Urade, Y. et Hayaishi, O. (2001). An adenosine A2a agonist increases sleep and induces Fos in ventrolateral preoptic neurons. *Neuroscience* 107(4):653-663.
- Scharf, M. T., Naidoo, N., Zimmerman, J. E. et Pack, A. I. (2008). The energy hypothesis of sleep revisited. *Prog Neurobiol* 86(3):264-280.
- Schwartz, J. C., Arrang, J. M., Garbarg, M., Pollard, H. et Ruat, M. (1991). Histaminergic transmission in the mammalian brain. *Physiol Rev* 71(1):1-51.
- Seelke, A. M. et Blumberg, M. S. (2008). The microstructure of active and quiet sleep as cortical delta activity emerges in infant rats. *Sleep* 31(5):691-699.
- Semba, K. et Fibiger, H. C. (1992). Afferent connections of the laterodorsal and the pedunculo-pontine tegmental nuclei in the rat: a retro- and antero-grade transport and immunohistochemical study. *J Comp Neurol* 323(3):387-410.

- Semjonous, N. M., Smith, K. L., Parkinson, J. R., Gunner, D. J., Liu, Y. L., Murphy, K. G., Ghatei, M. A., Bloom, S. R. et Small, C. J. (2009). Coordinated changes in energy intake and expenditure following hypothalamic administration of neuropeptides involved in energy balance. *Int J Obes (Lond)* 33(7):775-785.
- Shabel, S. J., Proulx, C. D., Piriz, J. et Malinow, R. (2014). Mood regulation. GABA/glutamate co-release controls habenula output and is modified by antidepressant treatment. *Science* 345(6203):1494-1498.
- Sherin, J. E., Elmquist, J. K., Torrealba, F. et Saper, C. B. (1998). Innervation of histaminergic tuberomammillary neurons by GABAergic and galaninergic neurons in the ventrolateral preoptic nucleus of the rat. *J Neurosci* 18(12):4705-4721.
- Sherin, J. E., Shiromani, P. J., McCarley, R. W. et Saper, C. B. (1996). Activation of ventrolateral preoptic neurons during sleep. *Science* 271(5246):216-219.
- Shiromani, P. J. et Fishbein, W. (1986). Continuous pontine cholinergic microinfusion via mini-pump induces sustained alterations in rapid eye movement (REM) sleep. *Pharmacol Biochem Behav* 25(6):1253-1261.
- Shiromani, P. J., Winston, S. et McCarley, R. W. (1996). Pontine cholinergic neurons show Fos-like immunoreactivity associated with cholinergically induced REM sleep. *Brain Res Mol Brain Res* 38(1):77-84.
- Shouse, M. N. et Siegel, J. M. (1992). Pontine regulation of REM sleep components in cats: integrity of the pedunculo-pontine tegmentum (PPT) is important for phasic events but unnecessary for atonia during REM sleep. *Brain Res* 571(1):50-63.
- Siegel, J. M. (2005). Clues to the functions of mammalian sleep. *Nature* 437(7063):1264-1271.
- Siegel, J. M. (2009). Sleep viewed as a state of adaptive inactivity. *Nat Rev Neurosci* 10(10):747-753.
- Siegel, J. M., Manger, P. R., Nienhuis, R., Fahringer, H. M. et Pettigrew, J. D. (1996). The echidna *Tachyglossus aculeatus* combines REM and non-REM aspects in a single sleep state: implications for the evolution of sleep. *J Neurosci* 16(10):3500-3506.
- Siegel, J. M., Manger, P. R., Nienhuis, R., Fahringer, H. M., Shalita, T. et Pettigrew, J. D. (1999). Sleep in the platypus. *Neuroscience* 91(1):391-400.
- Silver, I. A. et Erecinska, M. (1994). Extracellular glucose concentration in mammalian brain: continuous monitoring of changes during increased neuronal activity and upon limitation in oxygen supply in normo-, hypo-, and hyperglycemic animals. *J Neurosci* 14(8):5068-5076.
- Silver, I. A. et Erecinska, M. (1998). Glucose-induced intracellular ion changes in sugar-sensitive hypothalamic neurons. *J Neurophysiol* 79(4):1733-1745.
- Sim, L. J. et Joseph, S. A. (1991). Arcuate nucleus projections to brainstem regions which modulate nociception. *J Chem Neuroanat* 4(2):97-109.
- Sinton, C. M., Fitch, T. E. et Gershenfeld, H. K. (1999). The effects of leptin on REM sleep and slow wave delta in rats are reversed by food deprivation. *J Sleep Res* 8(3):197-203.
- Song, Z., Levin, B. E., McArdle, J. J., Bakhos, N. et Routh, V. H. (2001). Convergence of pre- and postsynaptic influences on glucosensing neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus. *Diabetes* 50(12):2673-2681.

- Song, Z. et Routh, V. H. (2005). Differential effects of glucose and lactate on glucosensing neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus. *Diabetes* 54(1):15-22.
- Spring, B., Maller, O., Wurtman, J., Digman, L. et Cozolino, L. (1982). Effects of protein and carbohydrate meals on mood and performance: interactions with sex and age. *J Psychiatr Res* 17(2):155-167.
- Steinbusch, H. W. (1981). Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. *Neuroscience* 6(4):557-618.
- Steinbusch, H. W. et Nieuwenhuys, R. (1981). Localization of serotonin-like immunoreactivity in the central nervous system and pituitary of the rat, with special references to the innervation of the hypothalamus. *Adv Exp Med Biol* 133:7-35.
- Steinbusch, H. W., Nieuwenhuys, R., Verhofstad, A. A. et Van der Kooy, D. (1981a). The nucleus raphe dorsalis of the rat and its projection upon the caudatoputamen. A combined cytoarchitectonic, immunohistochemical and retrograde transport study. *J Physiol (Paris)* 77(2-3):157-174.
- Steinbusch, H. W., Verhofstad, A. A., Penke, B., Varga, J. et Joosten, H. W. (1981b). Immunohistochemical characterization of monoamine-containing neurons in the central nervous system by antibodies to serotonin and noradrenalin. A study in the rat and the lamprey (*Lampetra fluviatilis*). *Acta Histochem Suppl* 24:107-122.
- 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):138-147.
- Steininger, T. L., Gong, H., McGinty, D. et Szymusiak, R. (2001). Subregional organization of preoptic area/anterior hypothalamic projections to arousal-related monoaminergic cell groups. *J Comp Neurol* 429(4):638-653.
- Stephan, F. K., Berkley, K. J. et Moss, R. L. (1981). Efferent connections of the rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* 6(12):2625-2641.
- Stephenson, R., Famina, S., Caron, A. M. et Lim, J. (2013). Statistical properties of sleep-wake behavior in the rat and their relation to circadian and ultradian phases. *Sleep* 36(9):1377-1390.
- Steriade, M. (2000). Corticothalamic resonance, states of vigilance and mentation. *Neuroscience* 101(2):243-276.
- Steriade, M. et Amzica, F. (1998). Slow sleep oscillation, rhythmic K-complexes, and their paroxysmal developments. *J Sleep Res* 7 Suppl 1:30-35.
- Steriade, M., McCormick, D. A. et Sejnowski, T. J. (1993). Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain. *Science* 262(5134):679-685.
- Sterman, M. B. et Clemente, C. D. (1962). Forebrain inhibitory mechanisms: cortical synchronization induced by basal forebrain stimulation. *Exp Neurol* 6:91-102.
- Strecker, R. E., Morairty, S., Thakkar, M. M., Porkka-Heiskanen, T., Basheer, R., Dauphin, L. J., Rainnie, D. G., Portas, C. M., Greene, R. W. et McCarley, R. W. (2000). Adenosinergic modulation of basal forebrain and preoptic/anterior hypothalamic neuronal activity in the control of behavioral state. *Behav Brain Res* 115(2):183-204.

- Sun, H. S., Feng, Z. P., Miki, T., Seino, S. et French, R. J. (2006). Enhanced neuronal damage after ischemic insults in mice lacking Kir6.2-containing ATP-sensitive K⁺ channels. *J Neurophysiol* 95(4):2590-2601.
- Sun, X., Whitefield, S., Rusak, B. et Semba, K. (2001). Electrophysiological analysis of suprachiasmatic nucleus projections to the ventrolateral preoptic area in the rat. *Eur J Neurosci* 14(8):1257-1274.
- Sun, X. L., Zeng, X. N., Zhou, F., Dai, C. P., Ding, J. H. et Hu, G. (2008). KATP channel openers facilitate glutamate uptake by GluTs in rat primary cultured astrocytes. *Neuropsychopharmacology* 33(6):1336-1342.
- Suntsova, N., Guzman-Marin, R., Kumar, S., Alam, M. N., Szymusiak, R. et McGinty, D. (2007). The median preoptic nucleus reciprocally modulates activity of arousal-related and sleep-related neurons in the perifornical lateral hypothalamus. *J Neurosci* 27(7):1616-1630.
- Sur, C., Mallorga, P. J., Wittmann, M., Jacobson, M. A., Pascarella, D., Williams, J. B., Brandish, P. E., Pettibone, D. J., Scolnick, E. M. et Conn, P. J. (2003). N-desmethylclozapine, an allosteric agonist at muscarinic 1 receptor, potentiates N-methyl-D-aspartate receptor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(23):13674-13679.
- Svenningsson, P., Le Moine, C., Kull, B., Sunahara, R., Bloch, B. et Fredholm, B. B. (1997). Cellular expression of adenosine A_{2A} receptor messenger RNA in the rat central nervous system with special reference to dopamine innervated areas. *Neuroscience* 80(4):1171-1185.
- Szentirmai, E. (2012). Central but not systemic administration of ghrelin induces wakefulness in mice. *PLoS One* 7(7):e41172.
- Szentirmai, E., Hajdu, I., Obal, F., Jr. et Krueger, J. M. (2006). Ghrelin-induced sleep responses in ad libitum fed and food-restricted rats. *Brain Res* 1088(1):131-140.
- Szentirmai, E., Kapas, L. et Krueger, J. M. (2007a). Ghrelin microinjection into forebrain sites induces wakefulness and feeding in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292(1):R575-585.
- Szentirmai, E., Kapas, L., Sun, Y., Smith, R. G. et Krueger, J. M. (2007b). Spontaneous sleep and homeostatic sleep regulation in ghrelin knockout mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293(1):R510-517.
- Szeto, H. H. et Hinman, D. J. (1985). Prenatal development of sleep-wake patterns in sheep. *Sleep* 8(4):347-355.
- Szymusiak, R. (2013). New insights into melanin concentrating hormone and sleep: a critical topics forum. *Sleep* 36(12):1765-1766.
- Szymusiak, R., Alam, N., Steininger, T. L. et McGinty, D. (1998). Sleep-waking discharge patterns of ventrolateral preoptic/anterior hypothalamic neurons in rats. *Brain Res* 803(1-2):178-188.
- Szymusiak, R., Gvilia, I. et McGinty, D. (2007). Hypothalamic control of sleep. *Sleep Med* 8(4):291-301.
- Szymusiak, R. et McGinty, D. (2008). Hypothalamic regulation of sleep and arousal. *Ann N Y Acad Sci* 1129:275-286.
- Tabuchi, S., Tsunematsu, T., Black, S. W., Tominaga, M., Maruyama, M., Takagi, K., Minokoshi, Y., Sakurai, T., Kilduff, T. S. et Yamanaka, A. (2014). Conditional ablation of orexin/hypocretin

- neurons: a new mouse model for the study of narcolepsy and orexin system function. *J Neurosci* 34(19):6495-6509.
- Taguchi, O., Kubin, L. et Pack, A. I. (1992). Evocation of postural atonia and respiratory depression by pontine carbachol in the decerebrate rat. *Brain Res* 595(1):107-115.
- Takahashi, K., Kayama, Y., Lin, J. S. et Sakai, K. (2010). Locus coeruleus neuronal activity during the sleep-waking cycle in mice. *Neuroscience* 169(3):1115-1126.
- Takahashi, K., Lin, J. S. et Sakai, K. (2006). Neuronal activity of histaminergic tuberomammillary neurons during wake-sleep states in the mouse. *J Neurosci* 26(40):10292-10298.
- Takahashi, K., Lin, J. S. et Sakai, K. (2009). Characterization and mapping of sleep-waking specific neurons in the basal forebrain and preoptic hypothalamus in mice. *Neuroscience* 161(1):269-292.
- Takano, S., Kim, J., Ikari, Y., Ogaya, M., Nakajima, K., Oomura, Y., Wayner, M. J. et Sasaki, K. (2009). Electrophysiological effects of ghrelin on laterodorsal tegmental neurons in rats: an in vitro study. *Peptides* 30(10):1901-1908.
- Takekawa, K., Kitamura, S., Sugihara, K. et Ohta, S. (2001). Non-enzymatic reduction of aliphatic tertiary amine N-oxides mediated by the haem moiety of cytochrome P450. *Xenobiotica* 31(1):11-23.
- Thompson, R. H., Canteras, N. S. et Swanson, L. W. (1996). Organization of projections from the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: a PHA-L study in the rat. *J Comp Neurol* 376(1):143-173.
- Timofeev, I., Grenier, F. et Steriade, M. (2001). Disfacilitation and active inhibition in the neocortex during the natural sleep-wake cycle: an intracellular study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(4):1924-1929.
- Tobler, I. (1995). Is sleep fundamentally different between mammalian species? *Behav Brain Res* 69(1-2):35-41.
- Tobler, I. et Borbely, A. A. (1986). Sleep EEG in the rat as a function of prior waking. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 64(1):74-76.
- Tolle, V., Bassant, M. H., Zizzari, P., Poindessous-Jazat, F., Tomasetto, C., Epelbaum, J. et Bluet-Pajot, M. T. (2002). Ultradian rhythmicity of ghrelin secretion in relation with GH, feeding behavior, and sleep-wake patterns in rats. *Endocrinology* 143(4):1353-1361.
- Torrealba, F., Yanagisawa, M. et Saper, C. B. (2003). Colocalization of orexin a and glutamate immunoreactivity in axon terminals in the tuberomammillary nucleus in rats. *Neuroscience* 119(4):1033-1044.
- Trulsson, M. E. et Jacobs, B. L. (1979). Raphe unit activity in freely moving cats: correlation with level of behavioral arousal. *Brain Res* 163(1):135-150.
- Trulsson, M. E., Jacobs, B. L. et Morrison, A. R. (1981). Raphe unit activity during REM sleep in normal cats and in pontine lesioned cats displaying REM sleep without atonia. *Brain Res* 226(1-2):75-91.
- Tsujino, N. et Sakurai, T. (2009). Orexin/hypocretin: a neuropeptide at the interface of sleep, energy homeostasis, and reward system. *Pharmacol Rev* 61(2):162-176.

- Tsujino, N. et Sakurai, T. (2013). Role of orexin in modulating arousal, feeding, and motivation. *Front Behav Neurosci* 7:28.
- Tsunematsu, T., Kilduff, T. S., Boyden, E. S., Takahashi, S., Tominaga, M. et Yamanaka, A. (2011). Acute optogenetic silencing of orexin/hypocretin neurons induces slow-wave sleep in mice. *J Neurosci* 31(29):10529-10539.
- Tsunematsu, T., Tabuchi, S., Tanaka, K. F., Boyden, E. S., Tominaga, M. et Yamanaka, A. (2013). Long-lasting silencing of orexin/hypocretin neurons using archaerhodopsin induces slow-wave sleep in mice. *Behav Brain Res* 255:64-74.
- Tsunematsu, T., Ueno, T., Tabuchi, S., Inutsuka, A., Tanaka, K. F., Hasuwa, H., Kilduff, T. S., Terao, A. et Yamanaka, A. (2014). Optogenetic manipulation of activity and temporally controlled cell-specific ablation reveal a role for MCH neurons in sleep/wake regulation. *J Neurosci* 34(20):6896-6909.
- Tsuzuki, K., Lambolez, B., Rossier, J. et Ozawa, S. (2001). Absolute quantification of AMPA receptor subunit mRNAs in single hippocampal neurons. *J Neurochem* 77(6):1650-1659.
- Umans, J. G., Cox, M. J., Hinman, D. J., Dogramajian, M. E., Senger, G. et Szeto, H. H. (1985). The development of electrocortical activity in the fetal and neonatal guinea pig. *Am J Obstet Gynecol* 153(4):467-471.
- Uschakov, A., Gong, H., McGinty, D. et Szymusiak, R. (2006). Sleep-active neurons in the preoptic area project to the hypothalamic paraventricular nucleus and perifornical lateral hypothalamus. *Eur J Neurosci* 23(12):3284-3296.
- Van Bockstaele, E. J., Aston-Jones, G., Pieribone, V. A., Ennis, M. et Shipley, M. T. (1991). Subregions of the periaqueductal gray topographically innervate the rostral ventral medulla in the rat. *J Comp Neurol* 309(3):305-327.
- van den Pol, A. N., Acuna-Goycolea, C., Clark, K. R. et Ghosh, P. K. (2004). Physiological properties of hypothalamic MCH neurons identified with selective expression of reporter gene after recombinant virus infection. *Neuron* 42(4):635-652.
- Van Dort, C. J., Zachs, D. P., Kenny, J. D., Zheng, S., Goldblum, R. R., Gelwan, N. A., Ramos, D. M., Nolan, M. A., Wang, K., Weng, F. J., Lin, Y., Wilson, M. A. et Brown, E. N. (2015). Optogenetic activation of cholinergic neurons in the PPT or LDT induces REM sleep. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(2):584-589.
- Vanni-Mercier, G., Gigout, S., Debilly, G. et Lin, J. S. (2003). Waking selective neurons in the posterior hypothalamus and their response to histamine H3-receptor ligands: an electrophysiological study in freely moving cats. *Behav Brain Res* 144(1-2):227-241.
- Vanni-Mercier, G., Sakai, K., Lin, J. S. et Jouvet, M. (1989). Mapping of cholinceptive brainstem structures responsible for the generation of paradoxical sleep in the cat. *Arch Ital Biol* 127(3):133-164.
- Varin, C., Arthaud, S., Salvvert, D., Gay, N., Libourel, P. A., Luppi, P. H., Leger, L. et Fort, P. (2015a). Sleep architecture and homeostasis in mice with partial ablation of melanin-concentrating hormone neurons. *Behav Brain Res* 298(Pt B):100-110.
- Varin, C., Rancillac, A., Geoffroy, H., Arthaud, S., Fort, P. et Gallopin, T. (2015b). Glucose Induces Slow-Wave Sleep by Exciting the Sleep-Promoting Neurons in the Ventrolateral Preoptic Nucleus: A New Link between Sleep and Metabolism. *J Neurosci* 35(27):9900-9911.

- Vazquez-Palacios, G., Retana-Marquez, S., Bonilla-Jaime, H. et Velazquez-Moctezuma, J. (2004). Stress-induced REM sleep increase is antagonized by naltrexone in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 171(2):186-190.
- Vazquez-Palacios, G. et Velazquez-Moctezuma, J. (2000). Effect of electric foot shocks, immobilization, and corticosterone administration on the sleep-wake pattern in the rat. *Physiol Behav* 71(1-2):23-28.
- Velazquez-Moctezuma, J., Gillin, J. C. et Shiromani, P. J. (1989). Effect of specific M1, M2 muscarinic receptor agonists on REM sleep generation. *Brain Res* 503(1):128-131.
- 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):573-586.
- Verret, L., Goutagny, R., Fort, P., Cagnon, L., Salvert, D., Leger, L., Boissard, R., Salin, P., Peyron, C. et Luppi, P. H. (2003). A role of melanin-concentrating hormone producing neurons in the central regulation of paradoxical sleep. *BMC Neurosci* 4:19.
- Vertes, R. P. (1991). A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 313(4):643-668.
- Vertes, R. P. et Kocsis, B. (1994). Projections of the dorsal raphe nucleus to the brainstem: PHA-L analysis in the rat. *J Comp Neurol* 340(1):11-26.
- Vetrivelan, R., Fuller, P. M., Tong, Q. et Lu, J. (2009). Medullary circuitry regulating rapid eye movement sleep and motor atonia. *J Neurosci* 29(29):9361-9369.
- Villablanca, J. et Salinas-Zeballos, M. E. (1972). Sleep-wakefulness, EEG and behavioral studies of chronic cats without the thalamus: the 'athalamic' cat. *Arch Ital Biol* 110(3):383-411.
- von Economo, C. (1930). Sleep as a problem of localization. *The Journal of Nervous and Mental Disease* 71(3).
- Vyazovskiy, V., Borbely, A. A. et Tobler, I. (2000). Unilateral vibrissae stimulation during waking induces interhemispheric EEG asymmetry during subsequent sleep in the rat. *J Sleep Res* 9(4):367-371.
- Vyazovskiy, V. V., Achermann, P. et Tobler, I. (2007). Sleep homeostasis in the rat in the light and dark period. *Brain Res Bull* 74(1-3):37-44.
- Vyazovskiy, V. V., Olcese, U., Lazimy, Y. M., Faraguna, U., Esser, S. K., Williams, J. C., Cirelli, C. et Tononi, G. (2009). Cortical firing and sleep homeostasis. *Neuron* 63(6):865-878.
- Wang, Q., Yue, X. F., Qu, W. M., Tan, R., Zheng, P., Urade, Y. et Huang, Z. L. (2013a). Morphine inhibits sleep-promoting neurons in the ventrolateral preoptic area via mu receptors and induces wakefulness in rats. *Neuropsychopharmacology* 38(5):791-801.
- Wang, R., Cruciani-Guglielmacci, C., Migrenne, S., Magnan, C., Cotero, V. E. et Routh, V. H. (2006). Effects of oleic acid on distinct populations of neurons in the hypothalamic arcuate nucleus are dependent on extracellular glucose levels. *J Neurophysiol* 95(3):1491-1498.
- Wang, R., Liu, X., Hentges, S. T., Dunn-Meynell, A. A., Levin, B. E., Wang, W. et Routh, V. H. (2004). The regulation of glucose-excited neurons in the hypothalamic arcuate nucleus by glucose and feeding-relevant peptides. *Diabetes* 53(8):1959-1965.

- Wang, Y., He, J., Kastin, A. J., Hsueh, H. et Pan, W. (2013b). Hypersomnolence and reduced activity in pan-leptin receptor knockout mice. *J Mol Neurosci* 51(3):1038-1045.
- Watanabe, T., Taguchi, Y., Shiosaka, S., Tanaka, J., Kubota, H., Terano, Y., Tohyama, M. et Wada, H. (1984). Distribution of the histaminergic neuron system in the central nervous system of rats; a fluorescent immunohistochemical analysis with histidine decarboxylase as a marker. *Brain Res* 295(1):13-25.
- Watts, A. G. et Donovan, C. M. (2010). Sweet talk in the brain: glucosensing, neural networks, and hypoglycemic counterregulation. *Front Neuroendocrinol* 31(1):32-43.
- Watts, A. G. et Swanson, L. W. (1987). Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: II. Studies using retrograde transport of fluorescent dyes and simultaneous peptide immunohistochemistry in the rat. *J Comp Neurol* 258(2):230-252.
- Watts, A. G., Swanson, L. W. et Sanchez-Watts, G. (1987). Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: I. Studies using anterograde transport of Phaseolus vulgaris leucoagglutinin in the rat. *J Comp Neurol* 258(2):204-229.
- Weber, F., Chung, S., Beier, K. T., Xu, M., Luo, L. et Dan, Y. (2015). Control of REM sleep by ventral medulla GABAergic neurons. *Nature* 526(7573):435-438.
- Webster, H. H. et Jones, B. E. (1988). Neurotoxic lesions of the dorsolateral pontomesencephalic tegmentum-cholinergic cell area in the cat. II. Effects upon sleep-waking states. *Brain Res* 458(2):285-302.
- Weng, F. J., Williams, R. H., Hawryluk, J. M., Lu, J., Scammell, T. E., Saper, C. B. et Arrigoni, E. (2014). Carbachol excites sublaterodorsal nucleus neurons projecting to the spinal cord. *J Physiol* 592(Pt 7):1601-1617.
- Williams, R. H., Alexopoulos, H., Jensen, L. T., Fugger, L. et Burdakov, D. (2008). Adaptive sugar sensors in hypothalamic feeding circuits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(33):11975-11980.
- Williams, R. H., Chee, M. J., Kroeger, D., Ferrari, L. L., Maratos-Flier, E., Scammell, T. E. et Arrigoni, E. (2014). Optogenetic-mediated release of histamine reveals distal and autoregulatory mechanisms for controlling arousal. *J Neurosci* 34(17):6023-6029.
- Willie, J. T., Sinton, C. M., Maratos-Flier, E. et Yanagisawa, M. (2008). Abnormal response of melanin-concentrating hormone deficient mice to fasting: hyperactivity and rapid eye movement sleep suppression. *Neuroscience* 156(4):819-829.
- Winsky-Sommerer, R., Boutrel, B. et de Lecea, L. (2005). Stress and arousal: the corticotrophin-releasing factor/hypocretin circuitry. *Mol Neurobiol* 32(3):285-294.
- Wisor, J. P., O'Hara, B. F., Terao, A., Selby, C. P., Kilduff, T. S., Sancar, A., Edgar, D. M. et Franken, P. (2002). A role for cryptochromes in sleep regulation. *BMC Neurosci* 3:20.
- Wolf, P. et Monnier, M. (1973). Electroencephalographic, behavioural and visceral effects of intraventricular infusion of histamine in the rabbit. *Agents Actions* 3(3):196.
- Wurts, S. W. et Edgar, D. M. (2000). Circadian and homeostatic control of rapid eye movement (REM) sleep: promotion of REM tendency by the suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci* 20(11):4300-4310.

- Xi, M., Fung, S. J., Zhang, J., Sampogna, S. et Chase, M. H. (2012). The amygdala and the pedunculo-pontine tegmental nucleus: interactions controlling active (rapid eye movement) sleep. *Exp Neurol* 238(1):44-51.
- Xi, M. C., Morales, F. R. et Chase, M. H. (1999). A GABAergic pontine reticular system is involved in the control of wakefulness and sleep. *Sleep Res Online* 2(2):43-48.
- Xi, M. C., Morales, F. R. et Chase, M. H. (2001a). Induction of wakefulness and inhibition of active (REM) sleep by GABAergic processes in the nucleus pontis oralis. *Arch Ital Biol* 139(1-2):125-145.
- Xi, M. C., Morales, F. R. et Chase, M. H. (2001b). The motor inhibitory system operating during active sleep is tonically suppressed by GABAergic mechanisms during other states. *J Neurophysiol* 86(4):1908-1915.
- Xu, M., Chung, S., Zhang, S., Zhong, P., Ma, C., Chang, W. C., Weissbourd, B., Sakai, N., Luo, L., Nishino, S. et Dan, Y. (2015). Basal forebrain circuit for sleep-wake control. *Nat Neurosci* 18(11):1641-1647.
- Yamanaka, A., Beuckmann, C. T., Willie, J. T., Hara, J., Tsujino, N., Mieda, M., Tominaga, M., Yagami, K., Sugiyama, F., Goto, K., Yanagisawa, M. et Sakurai, T. (2003). Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. *Neuron* 38(5):701-713.
- Yamanaka, A., Tabuchi, S., Tsunematsu, T., Fukazawa, Y. et Tominaga, M. (2010). Orexin directly excites orexin neurons through orexin 2 receptor. *J Neurosci* 30(38):12642-12652.
- Yamanaka, A., Tsujino, N., Funahashi, H., Honda, K., Guan, J. L., Wang, Q. P., Tominaga, M., Goto, K., Shioda, S. et Sakurai, T. (2002). Orexins activate histaminergic neurons via the orexin 2 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 290(4):1237-1245.
- Yamuy, J., Mancillas, J. R., Morales, F. R. et Chase, M. H. (1993). C-fos expression in the pons and medulla of the cat during carbachol-induced active sleep. *J Neurosci* 13(6):2703-2718.
- Yang, Q. Z. et Hatton, G. I. (1997). Electrophysiology of excitatory and inhibitory afferents to rat histaminergic tuberomammillary nucleus neurons from hypothalamic and forebrain sites. *Brain Res* 773(1-2):162-172.
- Yoon, Y. S. et Lee, H. S. (2013). Projections from melanin-concentrating hormone (MCH) neurons to the dorsal raphe or the nuclear core of the locus coeruleus in the rat. *Brain Res* 1490:72-82.
- Yoshida, K., McCormack, S., Espana, R. A., Crocker, A. et Scammell, T. E. (2006). Afferents to the orexin neurons of the rat brain. *J Comp Neurol* 494(5):845-861.
- Yu, X., Zecharia, A., Zhang, Z., Yang, Q., Yustos, R., Jager, P., Vyssotski, A. L., Maywood, E. S., Chesham, J. E., Ma, Y., Brickley, S. G., Hastings, M. H., Franks, N. P. et Wisden, W. (2014). Circadian factor BMAL1 in histaminergic neurons regulates sleep architecture. *Curr Biol* 24(23):2838-2844.
- Zawar, C., Plant, T. D., Schirra, C., Konnerth, A. et Neumcke, B. (1999). Cell-type specific expression of ATP-sensitive potassium channels in the rat hippocampus. *J Physiol* 514 (Pt 2):327-341.
- Zepelin, H., Siegel, J. M. et Tobler, I. (2005). Mammalian sleep. M. H. Kryger, T. Roth and W. C. Dement. *Principles and practices of sleep medicine*. New York, Saunders: pp. 91-100.
- Zhang, J., Xi, M., Fung, S. J., Sampogna, S. et Chase, M. H. (2012). Projections from the central nucleus of the amygdala to the nucleus pontis oralis in the rat: an anterograde labeling study. *Neurosci Lett* 525(2):157-162.

Zhang, J. P., Xu, Q., Yuan, X. S., Cherasse, Y., Schiffmann, S. N., de Kerchove d'Exaerde, A., Qu, W. M., Urade, Y., Lazarus, M., Huang, Z. L. et Li, R. X. (2013). Projections of nucleus accumbens adenosine A2A receptor neurons in the mouse brain and their implications in mediating sleep-wake regulation. *Front Neuroanat* 7:43.

Zhu, L., Blethyn, K. L., Cope, D. W., Tsomaia, V., Crunelli, V. et Hughes, S. W. (2006). Nucleus- and species-specific properties of the slow (<1 Hz) sleep oscillation in thalamocortical neurons. *Neuroscience* 141(2):621-636.

