



HAL
open science

La narcolepsie de type 1 : une pathologie du sommeil paradoxal ?

Alexis Roman

► **To cite this version:**

Alexis Roman. La narcolepsie de type 1 : une pathologie du sommeil paradoxal?. Neurosciences. Université de Lyon, 2017. Français. NNT : 2017LYSE1329 . tel-02412882

HAL Id: tel-02412882

<https://theses.hal.science/tel-02412882v1>

Submitted on 16 Dec 2019

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 NNT : 2017 LYSE329

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale 476
Neurosciences et cognition

Spécialité de doctorat : Neurosciences

Soutenue publiquement le 15/12/2017, par :
Alexis ROMAN

La narcolepsie de type 1 : une pathologie du sommeil paradoxal ?

Devant le jury composé de :

JULLIARD, Karyn Professeur des Universités, Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon **Présidente**

DAUVILLIERS, Yves PU-PH, CHU de Montpellier **Rapporteur**

FABRE, Véronique Chargée de recherche, Institut de Biologie Paris Seine **Rapporteuse**

BENCHENANE, Karim Chargé de recherche, Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielle **Examineur**

SCHMIDT Markus Professeur, Université de Berne Suisse **Examineur**

PEYRON, Christelle Chargée de recherche, Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon **Directrice de thèse**

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur G.RODE

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. X. PERROT

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. THEVENARD |
| Département Chimie Biochimie | Directeur : Mme C. FELIX |
| Département GEP | Directeur : M. Hassan HAMMOURI |
| Département Informatique | Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE |
| Département Mathématiques | Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV |
| Département Mécanique | Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID |
| Département Physique | Directeur : M. le Professeur J-C 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. le Professeur E.PERRIN |
| 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 |

REMERCIEMENTS

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

Merci à Karyn Julliard qui me fait l'honneur de présider la soutenance de cette thèse et qui a contribué à éveiller l'intérêt que je porte aux neurosciences lors de ma formation universitaire.

Merci à Karim Benchenane d'avoir accepté de consacrer du temps à la lecture de ce manuscrit et de son intérêt pour ce travail pourtant éloigné de ses thématiques habituelles de recherche.

Merci à Markus Schmidt, d'avoir accepté d'être membre du jury malgré une demande de dernière minute suite à des démêlées administratives. Merci de votre disponibilité, votre enthousiasme et votre sollicitude.

Un immense merci à Véronique Fabre et Yves Dauvilliers qui ont gentiment accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit et d'y consacrer du temps, malgré leurs nombreuses obligations. Je les remercie sincèrement pour leur disponibilité et l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail.

Je remercie très chaleureusement Christelle Peyron de m'avoir accordé une grande confiance dans la réalisation de ce projet, d'avoir été autant disponible et à l'écoute de mes divers doutes et préoccupations. Merci d'avoir décelé en moi le potentiel de docteur en Neurosciences et de m'avoir obligé à me surpasser.

Merci à Pierre Hervé Luppi pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, pour son enthousiasme et son intérêt pour mon travail tout au long de ces années.

Merci à Thierry Gallopin pour m'avoir accueilli à deux reprises dans son labo. J'ai finalement du abandonné le DREADD, mais merci encore de m'avoir initié à l'*in vitro* et d'avoir consacré du temps à ce projet.

Merci à Guillaume Dugué, qui m'a fait gagner un temps considérable en me montrant son système d'injection de virus. Enfin merci à lui et Claude Gronfier pour leurs précieux conseils et pour avoir su m'aiguiller au cours des deux CST.

A tous mes collègues qui ont participé de près ou de loin à ce travail. Paul-Antoine et Sébastien en pole position. Pour votre patience infinie, dans certaines périodes où je venais vous solliciter toutes les 15 minutes. C'était un immense plaisir de travailler avec vous (raison pour laquelle je revenais vous voir toutes les 15 minutes). Merci à Anne-Laure pour la masse de travail réalisée dans cette thèse, du génotypage à l'hybridation *in situ*. Tes petits schémas explicatifs et autres protocoles m'ont été d'une aide très précieuse. Merci à Patrice, Nadia et Fred, d'avoir su être à l'écoute et me conseiller lorsque je me confrontais à des difficultés techniques (qui défiaient parfois les lois de la physique). Merci à Paul et Gaël qui m'ont accueilli au 5^{ème} étage durant les longs mois de rédaction

et pour leur bonne humeur perpétuelle. Enfin merci à Valérie d'être toujours aussi cool et disponible pour les petits étudiants que nous sommes ☺

A tous les étudiants que j'ai pu croiser au labo et qui ont rendu le quotidien soutenable, parfois même agréable ☺ Mention toute particulière à Marius, que ce soit au labo ou en dehors, ces 4 années ont définitivement été hors-normes grâce à toi. Manon et Megane pour avoir corrigé les innombrables fautes d'orthographe mais surtout pour m'avoir supporté pendant la rédaction de thèse. Baptiste et Manon pour avoir toujours fait en sorte que je gagne au tarot ;) Merci à Sara, Francesca, Julien, Jordan, Nico, Olivier, Claire, Léa pour tous ces moments inoubliables entre Bale, Théoule sur mer, la Roche aux fées, l'Atmo, la Fourmillière et j'en passe.

Une immense pensée pour toutes ces ptites souris qui m'ont bien aidé à obtenir ces résultats, et à ma Mamie Violette qui les apprécie tant.

A mes colocs et tous mes proches, dans un ordre tout à fait aléatoire : Antho (pour m'avoir donné la chance d'habiter avec LE champion du monde), Julia (best wingman ever !! et pour m'avoir mis Golden Brooown dans la tête chaque jour de ma vie), Léo (pour les immenses fou-rires et ptites crasses du quotidien), Reun's (le pilier du libéralisme, fer de lance de la démocratie), Tom (pour m'avoir souvent invité à dormir avec lui dans mon propre canap), Emile (car maintenant je sais praliner des noisettes, au sens propre), Quentin (the dude, le meilleur parmi les meilleurs), Ben (bonne bouteille de rouge, omelette di fromage, et panaco-ti), Gus (pour avoir toujours fait en sorte que je ne meurs pas de soif), Alex (pour ne jamais s'être perdu de vu depuis la maternelle), Henri (pour ces discussions inépuisables sur tout et sur rien), Renaud (de st-ex à la thèse 2007-2017 Coudène en force !!), Arnaud (et sa passion sans bornes pour Gramatik), Luc (les music-sessions, aux Clameurs à la colloc et ailleurs), Célestine (ma ptite artiste en herbe !), Jeannot (le corse le plus cool du monde), Clem (Maaaaad Woooooorld), Flo & Dana (mes nouveaux croix-roussieeeeeeeens !), Juliette (sans qui je n'aurais jamais atteint le M2), Richard (toujours à l'affut d'un fact-train et d'un jeu de mot franco-anglais incompréhensible), Rihannon (pour m'avoir mis face à face avec Jon Hopkins <3), Nico & Célia (Péruco, ptite douche & café du matin), Lou (MEILLEUR date tinder), Mylène (prsqu'envoyer des piques était si fun que j'ai du oublier d'être sympa), Nina & Greg (qui m'ont montrer le chemin de la vie d'adulte) Gio (ce rire qui me suivra toute ma vie), Flo (le voisin que tt le monde aimerait avoir), Nikita (seule Cléopatre qui danse comme Michael Jackson), Seb (le Seb de ENCORE ? oui !), Clémence (pour m'avoir hébergé tant de fois et ri à chacune de mes phrases), Morgane (la Morgane de ENCORE fan de Francis Cabrel ? oui), Jordan (mon cajoniste préféré), Juliette (ptit dancefloor aux planches quand on sera riche), Claudia (et ses goûts musicaux très douteux), Arthur (déso pour la soirée raclette..) ... J'espère n'oublier personne.

Merci à Clem, sans qui je ne me serais probablement jamais aventuré dans cette thèse.

Un merci infini à ma famille pour leur amour et leur soutien sans faille.

Résumé

La narcolepsie de type 1 (NT1) est une maladie neurologique rare caractérisée par une hypersomnolence diurne et des attaques de cataplexie. Chez l'homme, la NT1 est due à la mort spécifique et postnatale des neurones à orexine (Orex) promoteurs de l'éveil, et est considérée comme une pathologie de l'éveil. Toutefois, les observations cliniques suggèrent une dérégulation du sommeil paradoxal (SP) dans cette pathologie. Les patients NT1 ont une latence d'apparition du SP très courte et de fréquents endormissements en SP. De plus, la cataplexie est décrite comme une perte de tonus musculaire au cours de l'éveil et similaire à celle caractéristique du SP, suggérant que la narcolepsie pourrait également être une pathologie du SP. Nous avons testé cette hypothèse à travers deux études menées sur un modèle murin de narcolepsie : la souris Orex-KO. Dans une 1^{ère} étude nous avons montré que la régulation homéostasique du SP est intacte chez la souris Orex-KO. La propension à entrer en SP de façon inapproprié pendant la phase active suggère un nouveau rôle pour le neuropeptide Orex, celui d'inhibition du SP. Nos données indiquent donc que la NT1 est une maladie de l'éveil et du SP. Dans une 2^{ème} étude, nous avons cherché à déterminer si le réseau neuronal de l'atonie musculaire du SP était recruté pendant la cataplexie. Nos données suggèrent que contrairement à l'hypothèse généralement admise, les neurones glutamatergiques du noyau sublatérodorsal (SLD) - responsables de l'atonie musculaire pendant le SP - ne sont pas suffisants à la mise en place des cataplexies et ne seraient que partiellement impliqués dans ce symptôme. Cette dernière étude ne soutient pas l'hypothèse selon laquelle la cataplexie serait un état dissocié du SP pendant l'éveil. Ce travail de thèse a permis de mieux comprendre le rôle des Orex dans la régulation des états de vigilance, et d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes neurobiologiques de la cataplexie.

Abstract

Narcolepsy type 1 (NT1) is a rare neurological disease characterized by an excessive daytime sleepiness and episodes of cataplexy – a sudden loss of muscular tone triggered by strong emotions during wakefulness. In humans, NT1 is due to the specific and postnatal loss of orexin/hypocretin (Orex) neurons involved in wake promotion. It led to the description of NT1 as a disease of wakefulness. However, clinical observations have suggested a disrupted regulation of paradoxical (or REM) sleep in narcolepsy. Indeed, NT1 patients have shorter latency to enter REM sleep and frequent abnormal sleep onset in REM sleep. More, muscular atonia observed in cataplexy is one of the main features of REM sleep. Together, those data led to the hypothesis that narcolepsy would be a REM sleep disease. Here we have investigated this hypothesis with two different studies performed on a recognized model of murine narcolepsy: the Orex-KO mouse. In a first study, we found that despite an intact REM sleep homeostatic regulation, Orex-KO mice had an increased REM sleep propensity during active phase when orexin neurons are suppose to be active. We thus suggest a new role for the neuropeptide Orex: the role of inhibiting REM sleep. Then, we aimed to determine whether REM sleep atonia and cataplexy share the same neuronal network. In contrast to the currently admitted hypothesis, we demonstrate that glutamatergic neurons of the sublaterodorsal nucleus (SLD) are not necessary to generate cataplexy, and are only partially involved in this symptom. Taken together, data harvested during this thesis help us to better understand the role of Orex in REM sleep regulation and thus its dys-regulation in NT1 and to improve our knowledge about the neurobiological mechanisms of cataplexy.

Table des matières

| | |
|---|----|
| LISTE DES ABREVIATIONS | 1 |
| INTRODUCTION GENERALE | 4 |
| RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES | 6 |
| PARTIE I : ETATS DE VIGILANCES ET CYCLE VEILLE-SOMMEIL | 8 |
| I. Les états de vigilance | 8 |
| 1. Eveil..... | 8 |
| 2. Sommeil Lent..... | 8 |
| 3. Sommeil Paradoxal | 9 |
| II. L'organisation du cycle veille-sommeil..... | 9 |
| III. Régulation du cycle veille-sommeil..... | 10 |
| PARTIE II : LA NARCOLEPSIE | 14 |
| I. Description générale..... | 14 |
| 1. Critères diagnostiques..... | 14 |
| 2. Epidémiologie et qualité de vie..... | 16 |
| II. Symptomatologie | 17 |
| 1. La Somnolence diurne excessive | 17 |
| 2. La Cataplexie | 18 |
| 3. Hallucinations hypnagogiques..... | 19 |
| 4. Les paralysies du sommeil..... | 20 |
| 5. La perturbation du sommeil nocturne..... | 20 |
| 6. Autres signes cliniques | 21 |
| III. Physiopathologie..... | 22 |
| 1. Orexine et narcolepsie..... | 22 |
| 2. Facteurs génétiques et immunité..... | 23 |
| 3. Facteurs environnementaux | 23 |
| IV. Traitements symptomatiques | 24 |
| V. Modèle d'étude : la souris narcoleptique | 25 |
| 1. La souris Orexine Knock-out..... | 25 |
| 2. Les arrêts comportementaux | 27 |
| a) La cataplexie murine..... | 27 |
| b) Les attaques de sommeil | 31 |
| 3. Les autres modèles murins de narcolepsie..... | 31 |
| a) Les souris orexin-ataxin 3 | 31 |

| | | |
|---------------------|--|-----------|
| b) | Les souris double KO des récepteurs à orexine | 32 |
| c) | Les souris orexin-DTA..... | 32 |
| d) | Autres modèles n'altérant que partiellement la transmission orexinergiques | 32 |
| PARTIE III : | LE SOMMEIL PARADOXAL | 34 |
| I. | Neurobiologie du SP | 34 |
| 1. | Le sublatérodorsal (SLD)..... | 35 |
| a) | Les lésions électrolytiques du SLD et LDT/PPT | 35 |
| b) | Lésions et stimulations chimiques du SLD et LDT/PPT | 36 |
| c) | Neuroanatomie fonctionnelle (Fos) du SLD | 36 |
| d) | Electrophysiologie du SLD | 37 |
| e) | Etudes fonctionnelles des neurones glutamatergiques du SLD | 38 |
| f) | Mode d'action du SLD | 40 |
| 2. | Les neurones cholinergiques du tegmentum ponto-mésencéphalique..... | 40 |
| 3. | La partie ventrolatérale de la substance grise périaqueducal (vlPAG) | 42 |
| 4. | Les noyaux paragigantocellulaires du bulbe rachidien | 43 |
| 5. | Contrôle médullaire et spinal de l'atonie musculaire du SP | 44 |
| a) | Les motoneurones de la moelle épinière | 44 |
| b) | Les noyaux gigantocellulaires du bulbe rachidien | 47 |
| 6. | Les neurones MCH/GABA de l'hypothalamus latéral | 50 |
| II. | Le réseau de régulation du SP | 52 |
| III. | Processus de régulation du SP | 55 |
| 1. | Régulation circadienne..... | 55 |
| 2. | Régulation homéostasique | 56 |
| IV. | Un modèle du dysfonctionnement du réseau de l'atonie : le RBD..... | 57 |
| PARTIE IV : | NEUROBIOLOGIE DE LA NARCOLEPSIE DE TYPE 1 | 60 |
| I. | Mécanismes neuronaux de la narcolepsie de type 1 | 60 |
| 1. | Les neurones Orexines | 60 |
| 2. | Les neurones monoaminergiques..... | 65 |
| a) | Neurones histaminergiques du noyau tubéromamillaire (TMN) | 65 |
| b) | Neurones sérotoninergiques du Raphé Dorsal (DR)..... | 69 |
| c) | Neurones noradrénergiques du locus coeruleus (LC) | 72 |
| d) | Neurones dopaminergiques..... | 73 |
| 3. | La Medulla | 74 |
| 4. | Les structures limbiques | 75 |
| a) | L'amygdale | 75 |
| b) | Le cortex préfrontal..... | 81 |
| II. | Modèle du réseau..... | 82 |
| 1. | Hypersomnolence diurne | 82 |

| | |
|---|-----|
| 2. Cataplexie | 83 |
| OBJECTIFS HYPOTHESES | 85 |
| 1) La narcolepsie est-elle seulement une pathologie de l'éveil ou également du SP ? | 85 |
| 2) La cataplexie est-elle un état dissocié du SP ? | 86 |
| MATERIEL ET METHODES | 88 |
| I. ANIMAUX..... | 89 |
| II. POLYSOMNOGRAPHIE..... | 89 |
| 1. Electrodes..... | 89 |
| 2. Chirurgie : Implantation EEG/EMG..... | 90 |
| 3. Enregistrements polysomnographiques | 90 |
| III. ANALYSES..... | 91 |
| 1. Etats de vigilance et des arrêts comportementaux | 91 |
| 2. Analyse de l'EMG | 92 |
| 3. Analyse spectrale EEG | 94 |
| 4. Actimétrie | 94 |
| IV. PRIVATION DE SOMMEIL PARADOXAL..... | 95 |
| 1. Privation par la méthode piscine (small-platforms-over-water) | 95 |
| 2. Privation automatique | 96 |
| V. TESTS COMPORTEMENTAUX | 96 |
| 1. Test de l'Openfield | 97 |
| 2. Test du double compartiment ou Light Dark Box (LDB)..... | 97 |
| VI. DOSAGE DE CORTICOSTERONE PLASMATIQUE | 98 |
| VII. INDUCTION DES CATAPLEXIES..... | 99 |
| 1. Méthode Chocolat..... | 99 |
| 2. Méthode Piscine..... | 99 |
| VIII. TECHNIQUE D'ARN INTERFERENT | 99 |
| 1. Principe | 99 |
| 2. Mode d'action..... | 100 |
| 3. Structure des AAV-shRNA..... | 101 |
| 4. Injection de l'AAV, Chirurgie | 102 |
| IX. CONTROLES HISTOLOGIQUES | 103 |
| 1. Perfusion et préparation des coupes..... | 103 |
| 2. Hybridation <i>in situ</i> de vGAT et de vGluT2 | 103 |
| Principe..... | 103 |
| Protocole..... | 104 |

| | |
|--|-----|
| 3. Immunomarquages..... | 104 |
| Principe..... | 104 |
| • Révélation de la présence de protéine mCherry par immunohistochimie..... | 105 |
| • Double immunofluorescence mCherry et vGlut 2 | 106 |
| 4. Analyse histologique..... | 106 |
| • Etendue des sites de transfection des virus AAV..... | 106 |
| • Cartographie des sites d'injection | 106 |
| • Analyse en microscopie confocale..... | 106 |
| X. STATISTIQUES | 107 |
| | |
| RESULTATS | 108 |
| ARTICLE 1 | 110 |
| ARTICLE 2 | 150 |
| | |
| DISCUSSION GENERALE | 188 |
| Principaux résultats obtenus | 190 |
| Interprétation fonctionnelle des résultats | 192 |
| Perspectives..... | 200 |
| | |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 202 |

LISTE DES ABREVIATIONS

| | |
|-------------------|---|
| 5-HT | 5-hydrotryptamine ou sérotonine |
| AAV | virus adéno-associé (en anglais <i>adeno-associated virus</i>) |
| ACC | cortex cingulaire antérieur |
| ACh | acétylcholine |
| AP | axe antéro-postérieur |
| BDNF | facteur neurotrophique dérivé du cerveau (en anglais <i>brain-derived neurotrophic factor</i>) |
| BLA | noyau basolatéral de l'amygdale |
| BNST | noyau de la strie terminale |
| CAS | état associé aux cataplexies (en anglais <i>cataplexy-associated state</i>) |
| CeA | noyau centrale de l'amygdale |
| c-Fos | marqueur d'activité neuronale |
| ChAT | enzyme de synthèse de l'acétylcholine |
| CMH | complexe majeur d'histocompatibilité |
| CRF | hormone corticolibérine (en anglais <i>corticotropin-releasing factor</i>) |
| CTb | sous-unité b de la toxine cholérique |
| DA | dopamine |
| DAB | 3,3' diaminobenzidine tétrahydrochloride |
| dDpMe | partie dorsale du noyau réticulé mésencéphalique profond |
| Dox | doxycycline |
| DPGi | noyaux paragigantocellulaire dorsal |
| DR | noyau du raphé dorsal |
| DTA | toxine diphtérique A |
| DV | axe dorso-ventral |
| EEG | électroencéphalogramme |
| EMG | électromyogramme |
| EOG | électrooculogramme |
| EPSP | potentiels synaptiques excitateurs (en anglais <i>excitatory post-synaptic potential</i>) |
| ESP | endormissement en sommeil paradoxal |
| FG | fluorogold |
| Fos+ | neurone exprimant le marqueur d'activité neuronale c-Fos |
| GABA | acide γ -aminobutyrique (en anglais <i>gamma-aminobutyric acid</i>) |
| GABA _A | récepteur GABAergique de type A |
| GABA _B | récepteurs GABAergique de type B |
| GAD | glutamate décarboxylase, l'enzyme de synthèse du GABA |
| GAD 65/67 | enzymes de synthèse du neuropeptide GABA |
| GiA | noyau réticulé gigantocellulaire alpha du bulbe rachidien |
| GiV | noyau réticulé gigantocellulaire ventral de la medulla |
| Gly | glycine |
| GlyT2 | transporteur de la glycine type 2 |
| Hert | hypocrétine |
| HDC | histidine decarboxylase (enzyme de synthèse de l'histamine) |

| | |
|------------------|---|
| His | histamine |
| HL | aire latérale de l'hypothalamus |
| HLA | <i>human leukocyte antigen</i> (ou complexe majeur d'histocompatibilité, CMH, en français) |
| HRP | péroxydase du raifort |
| HSPT | bouffées d'activité thêta de haute amplitude (en anglais <i>hypersynchronous paroxysmal theta</i>) |
| ICV | intra-cérébro-ventriculaire |
| IPSP | potentiels synaptiques inhibiteurs (en anglais <i>inhibitory post-synaptic potential</i>) |
| IRMf | imagerie fonctionnelle |
| ISCD-3 | Classification Internationale des Troubles du Sommeil 3 ^{ème} édition |
| LC | locus coeruleus |
| LCR | liquide céphalo-rachidien |
| LDT | noyau du tegmentum pontique laterodorsal |
| LPB | noyau parabrachial latéral |
| LPGi | noyaux paragigantocellulaire latéral |
| Mc | noyau réticulaire magnocellulaire. |
| MCH | hormone de mélanocortination |
| ML | axe médio-latéral |
| MPB | noyau parabrachial médian |
| mPFC | cortex préfrontal médian |
| MTN- α | motoneurone alpha |
| NA | noradrénaline |
| NAc | noyau acubens |
| NREM sleep | sommeil sans mouvements oculaires (en anglais <i>non-rapid eye movements sleep</i>) |
| NT1 | narcolepsie de type 1 |
| NT2 | narcolepsie de type 2 |
| Orex | orexine |
| Orex- KO | orexine Knockout |
| Orex-Atax3 | orexine Ataxine-3 |
| OXR1/OXR2 | récepteur 1 et 2 de l'orexine |
| PA | potentiel d'action |
| PAG | substance grise périacqueductale |
| PB | tampon phosphate |
| péri-LC α | péri-locus-coeruleus alpha |
| PFA | paraformaldéhyde |
| PFC | cortex préfrontal |
| PHAL | leucoagglutinine du Phaseolus |
| PLC | cortex prélimbique |
| PPT | noyau tegmentum pédonculo-pontin |
| RBD | <i>REM sleep behavior disorder</i> (ou troubles comportementaux en sommeil paradoxal, TCSP en français) |
| REM sleep | sommeil aux mouvements oculaires rapides (en anglais <i>rapid eye movements sleep</i>) |

| | |
|-----------|---|
| RMg | noyau du raphé magnus |
| SCN | noyau supra-chiasmatic |
| SDE | somnolence diurne excessive |
| shRNA | petit brin d'ARN en épingle à cheveux (en anglais <i>short-hairpin RNA</i>) |
| SL | sommeil lent |
| SLD | noyau du sublatérodorsal |
| Sn | substance noire |
| SNC | système nerveux central |
| SOREM | <i>sleep-onset REM period</i> (ou endormissement en sommeil paradoxal, ESP en français) |
| SP | sommeil paradoxal |
| SP-like | état ressemblant au SP |
| SP-on/off | neurones actifs/inactifs pendant le SP |
| subLC | noyau du subcoeruleus |
| SWS | sommeil à ondes lentes (en anglais <i>slow wave sleep</i>) |
| TCSP | troubles comportementaux en sommeil paradoxal |
| TILE | tests itératifs de latence d'endormissement |
| TMN | noyau du tubéromamillaire |
| vGAT | transporteur vésiculaire du GABA |
| vGlut1 | transporteurs vésiculaires du glutamate type 1 |
| vGlut2 | transporteurs vésiculaires du glutamate type 2 |
| vIPAG | substance grise périaqueductal ventro-latéral |
| VLPO | aire préoptique ventrolatérale |
| VMM | medulla ventromédiale |
| VTA | aire tegmental ventrale |
| WT | sauvages (en anglais <i>wild-type</i>) |

INTRODUCTION GENERALE

En 1877, le neurologue allemand Westphal fut le premier à rapporter un cas de narcolepsie dans un journal scientifique ([Westphal, 1877; réédition Schenck et al., 2007](#)). Trois ans plus tard, le médecin militaire français Jean Baptiste Gélinau publie dans la Gazette des Hôpitaux ([Gélinau, 1880](#)) ses observations cliniques d'un patient souffrant de deux différents symptômes : des *attaques de sommeil* survenant dans diverses circonstances (au cours d'un repas, au théâtre) obligeant le plus souvent le patient à interrompre son activité en cours, et une faiblesse musculaire provoquée par une émotion (joyeuse ou pénible) pouvant provoquer jusqu'à sa chute, plus tard appelée *cataplexie* ([Löwenfeld 1902](#)). Il nomme cette association de symptômes : *narcolepsie* (du grec *narkê* : torpeur et *lépsis* : attaque). Elle est aussi communément appelée *maladie de Gélinau*. La même année, le docteur Camuset qui adresse ses patients au docteur Gélinau, publiera deux nouvelles observations de narcolepsie et terminera ainsi son article "Je suis persuadé que les sujets narcoleptiques vont sortir de terre, maintenant qu'ils sont signalés et étiquetés" (rapporté dans [Passouant, 1981](#)). Dès l'année suivante, le docteur Gélinau publiera une monographie de 14 autres cas de narcolepsie. D'autres symptômes furent plus tard associés tels que la paralysie du sommeil, les hallucinations hypnagogiques ou le sommeil nocturne perturbé ([Yoss and Daly, 1960; Plazzi et al., 2008; Mignot, 2012](#)).

Les découverte et description du sommeil paradoxal (SP) au milieu du 20^{ème} siècle ont ouvert les portes de la recherche moderne sur le sommeil ([Aserenski and Kleitman 1953 ; Jouvet, 1962](#)). Cet état de sommeil très spécifique est caractérisé par des mouvements oculaires rapides, une atonie musculaire totale, paradoxalement associée à une activité cérébrale similaire à celle de l'éveil. William C Dement, étudiant en psychiatrie lors de la découverte du SP, s'est intéressé aux rêves et a rapporté une forte association entre rêves et SP ([Dement and Wolpert, 1958](#)). De ces observations et des descriptions cliniques de la narcolepsie, il est alors apparu évident que les patients narcoleptiques présentaient un SP pathologique. En travaillant avec Alan Rechtschaffen, Dement décrit que contrairement aux sujets contrôles qui entrent en SP environ 90min après endormissement, les patients narcoleptiques ont souvent des entrées directes en SP ([Rechtschaffen et al, 1963 ; 1967](#)). De plus, les trois symptômes que sont les cataplexies, hallucinations hypnagogiques et paralysies du sommeil sont considérés comme des états dissociés du SP, du fait de leurs caractéristiques phénotypiques ([Dauvilliers et al., 2007; Antelmi et al., 2016](#)). La cataplexie serait notamment l'intrusion inopportune de l'atonie musculaire du SP au cours de l'éveil.

Les chercheurs formulent alors l'hypothèse selon laquelle la narcolepsie serait une maladie du SP. Le lien plus récent entre narcolepsie et les hypocrétines/orexine, neuropeptides éveillants, a remis en cause cette hypothèse. Toutefois, si les quantités totales de SP ne sont pas affectées dans cette pathologie, l'intégrité des mécanismes de régulation du SP et en particulier de la régulation

homéostasique du SP dans la narcolepsie reste peu étudiée. Dans une première étude, nous avons donc cherché à déterminer si les processus de régulation homéostasique du SP étaient affectés dans la narcolepsie de type 1 (NT1) grâce à l'étude de la souris narcoleptique.

D'autre part, l'hypothèse selon laquelle la cataplexie serait une intrusion de l'atonie du SP pendant l'éveil sous-entend que les mêmes voies neuronales sont recrutées pendant le SP et la cataplexie. La cataplexie est de mieux en mieux décrite dans la littérature, toutefois, aucune étude n'a encore démontré l'implication du réseau de l'atonie musculaire du SP. Dans ce contexte, mon travail de thèse a consisté à étudier dans une deuxième étude, si ce réseau est également recruté pendant les épisodes de cataplexie.

Du fait du lien supposé entre SP et narcolepsie, je vais brièvement présenter les différents états de vigilance et leurs organisations et régulations au cours du cycle veille-sommeil. Je ferai ensuite une présentation générale de la narcolepsie. J'aborderai plus en détails les processus neurobiologiques de régulation du SP et le réseau impliqué. Enfin, je présenterai les données physiopathologiques de la narcolepsie, ce qui m'amènera à exposer mes objectifs de recherches.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

PARTIE I : ETATS DE VIGILANCES ET CYCLE VEILLE-SOMMEIL

Le sommeil est une fonction vitale présente chez tous les mammifères et les oiseaux. Il a longtemps été simplement décrit comme la conséquence d'une réduction de l'activité cérébrale et de la perception sensorielle. Il est maintenant admis qu'il est essentiel dans la cognition, la fonction immunitaire et la santé générale des individus.

Trois états de vigilance sont différenciés : l'éveil, le sommeil lent et le SP. Ils sont caractérisés et quantifiés grâce à la polysomnographie qui comprend l'enregistrement de l'activité cérébrale (électroencéphalogramme, EEG), musculaire (électromyogramme, EMG), les mouvements des yeux (électrooculogramme, EOG), et des paramètres végétatifs associés de type cardio-respiratoire. Chez l'animal, l'analyse du sommeil classiquement utilisée regroupe les enregistrements EEG et EMG seulement (Fig.I-1).

I. Les états de vigilance

1. Eveil

L'état d'éveil peut être qualifié d'état réceptif aux stimuli environnementaux et de conscience. Chez l'adulte, cet état représente environ deux tiers d'une journée. Le rongeur, animal nocturne, est éveillé durant environ 60% de la période d'obscurité et 30% de la période éclairée. Pendant l'éveil, l'animal/individu a les yeux ouverts, des mouvements oculaires fréquents, une respiration rapide et une fréquence cardiaque élevée et régulière. Les informations extérieures sont relayées et intégrées par le système nerveux central (SNC). Ainsi la polysomnographie permet chez l'animal de distinguer l'état d'éveil par une activité électrique corticale rapide (> à 15 Hz) et de faible amplitude, qualifiée de « désynchronisée », et une activité musculaire sur l'EMG constituée d'épisodes phasiques (lors de mouvements) superposés à une composante tonique (tonus postural présent que l'animal soit actif ou calme).

2. Sommeil Lent

Le sommeil lent (SL) constitue la première phase du sommeil. Chez l'homme il représente 75 à 80% du sommeil total et se décompose en plusieurs stades, allant d'un stade d'endormissement (stade I) au sommeil léger (stade II) puis au sommeil profond (stade III-IV). Il est également appelé « sommeil sans mouvements oculaires » (NREM sleep pour *Non-Rapid Eye Movements Sleep*) ou sommeil à ondes lentes (SWS pour *Slow Wave Sleep*). Chez le rongeur, un seul stade de SL est généralement différencié lors de l'analyse polysomnographique. Durant cette phase, l'animal est calme, immobile, et ses yeux sont fermés. L'EMG montre une forte baisse d'amplitude par rapport à l'éveil se traduisant par un tonus musculaire minimal (Fig.I-1). La respiration et le rythme cardiaque sont ralentis et réguliers. L'activité corticale est caractérisée par la prédominance d'ondes

lentes (1.5 – 4 Hz) de grande amplitude accompagnées de fuseaux d'ondes plus rapides (10 – 14 Hz) d'une durée de quelques secondes.

3. Sommeil Paradoxal

Le SP succède au SL, sauf cas pathologique ou lors de très longues privation de sommeil. Il représente 20 à 25% du sommeil total soit 2 heures de la nuit chez l'homme. Il a été nommé sommeil paradoxal par Michel Jouvet ([Jouvet et al., 1959](#)), car le sujet est totalement inerte et atonique tandis que son activité cérébrale sur l'EEG est très rapide et proche de celle de l'éveil actif. Chez le rongeur, les phases de SP durent environ 2 minutes et se caractérisent par une polysomnographie bien particulière (Fig.I-1). Tout d'abord, l'EEG montre une prédominance des ondes thêta (4 à 8 Hz) générées dans l'hippocampe, et la présence d'ondes gamma (30-40Hz). La mesure EMG révèle une absence du tonus musculaire : on parle d'atonie musculaire. Cette atonie serait due à l'hyperpolarisation des motoneurones. Si le tonus postural est globalement abolit, la présence occasionnelle d'évènements musculaires brefs, phasiques (des secousses musculaires, encore appelés twitches) est également caractéristique du SP. Il est également caractérisé par la présence de saccades oculaires rapides, pour cette raison il est aussi dénommé *Rapid Eye Movement Sleep* (REM sleep pour sommeil à mouvements oculaires rapides). Enfin, au cours du SP, on peut observer une érection pénienne tonique chez l'homme, et phasique chez le rongeur ([Jovanovi.uj, 1969](#); [Schmidt et al., 1994](#)).

II. L'organisation du cycle veille-sommeil

Les enregistrements polysomnographiques permettent d'évaluer la structure temporelle du sommeil d'un individu et ainsi tracer un hypnogramme c'est à dire un tracé des états de vigilance au cours du temps. Chez l'homme, le sommeil est consolidé pendant la nuit. Il se compose d'une série de trois à cinq cycles d'environ 90 minutes. Chez le rongeur, les cycles sont beaucoup plus courts et le sommeil plus fragmenté. Dans toutes les espèces, un cycle commence par une phase de SL auquel succède une phase de SP qui est généralement suivie d'un micro-réveil pour entrer dans un autre cycle de sommeil ou d'une longue phase de réveil, rarement mais parfois le SP est suivi d'une phase de SL.

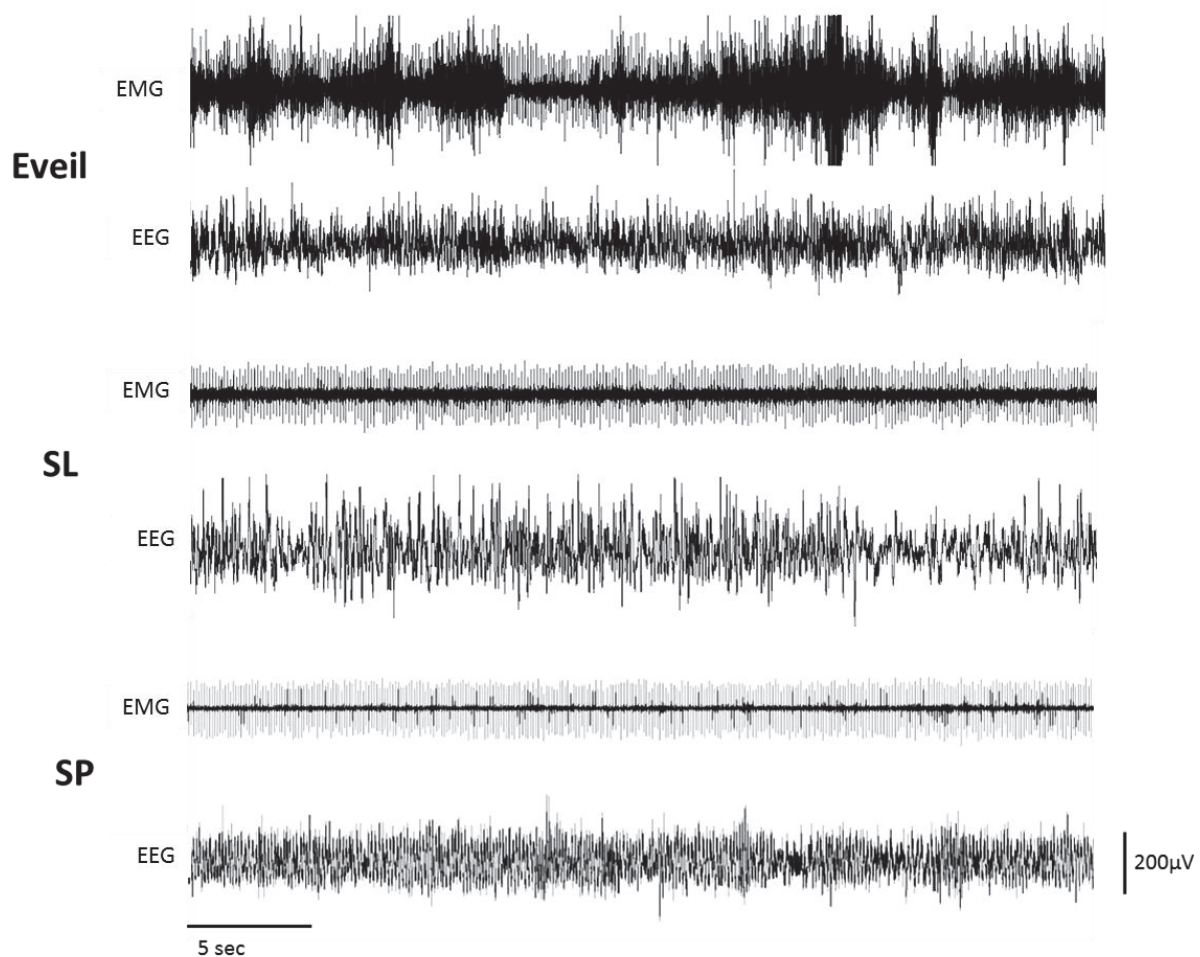


Figure I-1 : Caractérisation polysomnographique (EEG/EMG) des états de vigilances chez la souris. Les tracés obtenus sont représentatifs d'un éveil actif, de SL et de SP. L'EEG a été enregistré grâce à une électrode placée au dessus du cortex pariétal.

III. Régulation du cycle veille-sommeil

Le cycle veille-sommeil est régulé par deux mécanismes biologiques distincts comme illustré par le modèle de régulation proposé par l'équipe d'Alexander Borbély dès les années 80 ([Borbély, 1982](#); [Achermann and Borbély, 2003](#)). Ces deux composantes sont le rythme circadien (aussi appelé process C) qui régule les niveaux d'alerte et d'éveil sous contrôle de l'horloge biologique interne ; et la composante homéostatique (ou process S), permettant le maintien à l'équilibre des quantités de sommeil nécessaires au bon fonctionnement de l'organisme (Fig.I-2).

La **composante circadienne** influe sur le cycle veille-sommeil de façon indépendante aux quantités d'éveil ou de sommeil qui précèdent. Chez l'homme, l'organisation circadienne des états de veille et de sommeil s'acquiert progressivement après la naissance. En condition d'obscurité constante, les rythmes circadiens sont mis en place indépendamment de l'alternance jour/nuit. Chez l'humain, la durée des cycles circadiens varie entre 23,5 et 24,5 heures selon les individus

(Czeisler et al., 1999). Ce rythme se synchronise ensuite sur le cycle jour/nuit de 24h grâce aux informations de notre environnement (principalement la lumière). Le noyau supra-chiasmatique (SCN) est l'horloge biologique interne qui intègre les informations externes (notamment lumineuse) et synchronise les activités rythmiques comme le cycle veille-sommeil, la température corporelle, la production hormonale et autres fonctions.

La **composante homéostatique** va permettre de compenser une dette de sommeil. C'est un processus cumulatif, apparenté au « besoin de sommeil », qui augmente au cours de l'éveil et diminue pendant le sommeil. Il peut être vu comme le compteur interne qui génère une pression de sommeil en fonction de la durée de l'épisode d'éveil qui précède. De façon intéressante il existe une homéostasie distincte pour le SL et le SP bien qu'il soit possible que ces deux processus interagissent. Une privation de SL est toujours une privation totale de sommeil et va entraîner une phase de sommeil prolongée accompagnée d'une augmentation de la puissance des ondes lentes par rapport aux valeurs de références (Borbely et al., 1981; Franken et al., 1991). Par ailleurs, la privation spécifique de SP engendre une hypersomnie en SP reflétant ainsi la propension importante du SP (Jouvet et al., 1964; Endo et al., 1997). Les substrats neuronaux sous-jacents des processus homéostatiques restent peu décrits dans la littérature. Pour le SL, ils seraient médiés par la sécrétion et l'accumulation de substances endogènes au cours de l'éveil. En soutien de cette hypothèse, l'adénosine, produite continuellement au cours de l'éveil s'accumule dans certaines régions du SNC comme le télencéphale basale et joue un rôle hypnotique.

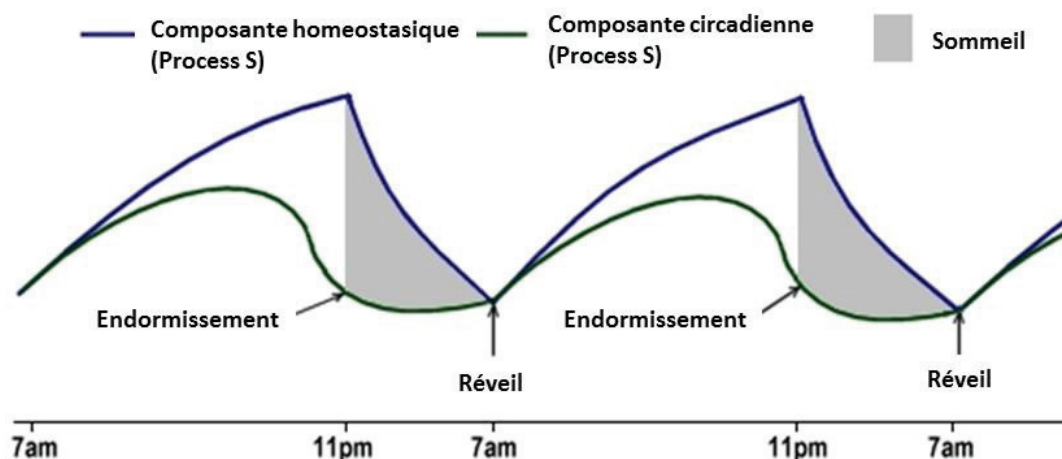


Figure I-2 : Représentation schématique des variations quotidiennes de sommeil soumises à l'interaction entre la composante homéostatique (process S) et circadienne (process C) (adapté d'une image de Luke Mastin, <http://www.howsleepworks.com>)

Enfin le rythme dit ultradien (inférieur à 24h) contrôle l'alternance entre le SL et le SP. Le rythme ultradien du SP, c'est-à-dire l'intervalle qui sépare le début d'une phase de SP au début de la suivante, est relativement fixe chez l'homme (90min). Ce rythme semble être fonction de la taille de l'animal (24 min chez le chat, 120 min chez l'éléphant).

De nombreuses données indiquent que la force des processus de régulation, circadien et homéostatique, est modulée par le bagage génétique de chaque individu (Partinen et al., 1983; Heath et al., 1990), expliquant les grandes différences interindividuelles dans la population, que ce soit en termes de besoin de sommeil comme d'adaptation au décalage horaires, de résistance à la privation etc. Enfin, le sommeil est également modulé par l'influence directe ou indirecte de facteurs environnementaux (nourriture, température ambiante, lumière, stress etc.) (Fig.I-3).

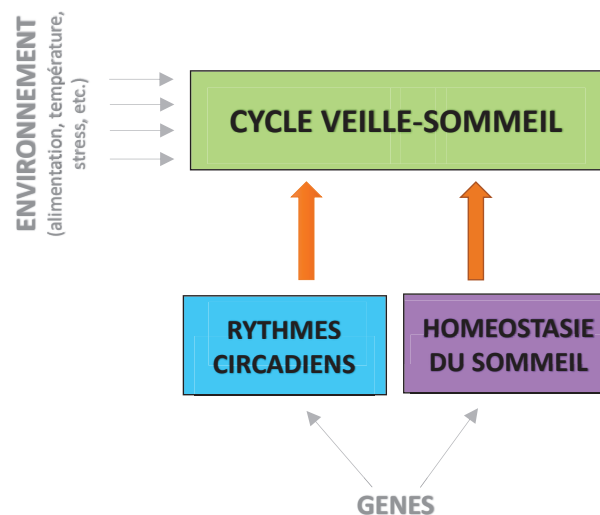


Figure I.3 : La régulation du cycle veille sommeil est dictée par la composante circadienne, homéostasique, le bagage génétique et les facteurs environnementaux (adapté d'une image de Luke Mastin, <http://www.howsleepworks.com>)

PARTIE II : LA NARCOLEPSIE

La narcolepsie est une pathologie neurologique rare, classiquement caractérisée par quatre symptômes majeurs : une somnolence diurne excessive (SDE), des cataplexies (pertes soudaine de tonus musculaire déclenchées par une émotion), des paralysies du sommeil et des hallucinations hypnagogiques (Dauvilliers et al., 2007). Une dérégulation du sommeil nocturne est également fréquemment rapportée et peut être considéré comme un cinquième symptôme (Roth et al., 2013). La prévalence et la sévérité de ces symptômes sont variables selon les patients. La narcolepsie a historiquement été divisée en deux catégories : avec et sans cataplexies. La découverte du déficit en hypocrétine/orexine (Hcr/Orx) comme cause de la pathologie (Nishino et al., 2000) a eu pour conséquence de modifier la classification des sous-types de narcolepsie.

Selon les critères de la Classification Internationale des Troubles du Sommeil 3^{ème} édition (ISCD-3, American Academy of Sleep Medicine 2014), la narcolepsie se définit d'abord par une hypersomnolence diurne chronique de plus de trois mois rapportée par le patient lors d'un entretien clinique et évaluée lors des tests itératifs de latence d'endormissement (TILE) définis plus bas. La **narcolepsie de type 1 (NT1)** se distingue par la présence d'épisodes de cataplexie et/ou d'un taux anormalement bas de neuropeptide orexine (Orex) dans le liquide céphalo-rachidien (LCR). La **narcolepsie de type 2 (NT2)** regroupe les cas de narcolepsie qui ne sont pas de type 1.

Dans ce chapitre nous passerons en revue les aspects cliniques de la NT1 : critères diagnostiques, épidémiologie, symptomatologie et physiopathologie. Puis nous présenterons les modèles murins de narcolepsie, avec une attention plus poussée sur le modèle de souris orexine Knock-out (Orex-KO) que j'ai utilisé dans mon travail de thèse.

I. Description générale

1. Critères diagnostiques

Le diagnostic de la narcolepsie est d'abord basé sur l'examen clinique. Le patient doit rapporter une hypersomnolence diurne quotidiennement depuis au moins trois mois. Un TILE permet d'objectiver la plainte. Il consiste en une série de 5 siestes au cours de la journée, planifiées chacune à 2 heures d'intervalle (Dauvilliers et al., 2007). Chaque test s'arrête après 15 min de sommeil ou bien après 20 min si le patient ne s'est pas endormi. Selon les critères de l'ISCD-3, un diagnostic de narcolepsie est posé lorsque son TILE présente : une latence moyenne d'endormissement sur les 5 siestes ≤ 8 min ainsi que la présence d'au moins deux endormissements en sommeil paradoxal (ESP ; également appelé SOREM pour *sleep-onset REM period*). Plus précisément, un ESP se définit par la survenue d'un épisode de SP au cours des 15 premières

minutes de sommeil. La latence d'endormissement ≤ 8 min et la présence de deux ESP au cours des TILE permettent une détection d'une spécificité de 95% et d'une sensibilité de 95% de la NT1 (Christensen et al., 2015). Il a récemment été montré que la présence d'ESP au cours de la nuit de polysomnographie qui précède le TILE était également hautement spécifique (99%) de la narcolepsie (Andlauer et al., 2013; Reiter et al., 2015). Cet ESP nocturne a donc été ajouté dans les critères diagnostiques de la narcolepsie (ICSD-3).

La discrimination des deux types de narcolepsie (NT1 et NT2) va ensuite reposer sur la présence ou l'absence de cataplexie et/ou le dosage du neuropeptide Orex. Il est à noter que les patients sont rarement examinés au moment d'un accès de cataplexie, et que sa présence doit être établie sur la base du seul entretien clinique. Lors d'exams plus poussés, des analyses du taux d'Orex dans le LCR peuvent être effectuées. Un taux est considéré pathologique lorsqu'il est inférieur ou égal à 110pg/mL ou à 1/3 des valeurs moyennes obtenues chez des sujets normaux avec le même dosage standardisé, par immunoréactivité (ICSD-3) (Fig.II-1). Il a été établi qu'une concentration inférieure à 110 ng/L permet d'identifier un cas de narcolepsie avec cataplexie avec une spécificité de 94% (Mignot et al., 2002).

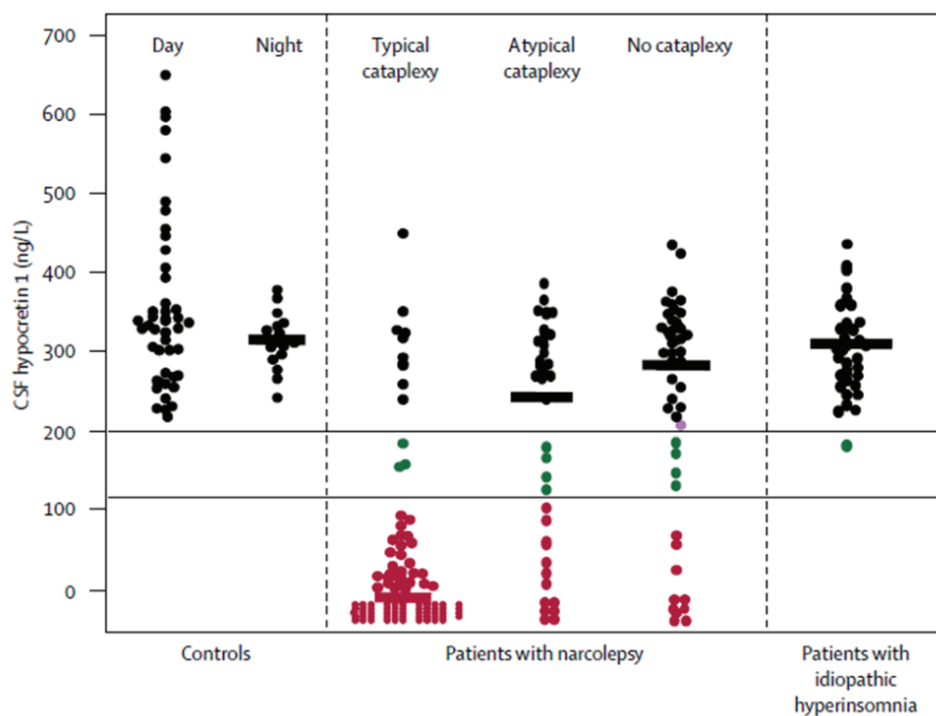


Figure II-1 : Concentration d'orexine-A (hypocretin 1) dans le liquide céphalo-rachidien (CSF pour cerebrospinal fluid) chez des patients narcoleptiques avec et sans cataplexie, souffrant d'hypersomnie idiopathique ou des sujets contrôles. Chaque point représente la concentration mesurée chez un individu. La valeur médiane est représentée par la barre noire pour chaque groupe. Le seuil d'un niveau normal (>200 ng/L) ou faible (<100 ng/L) d'Orex-A est représenté par les lignes complètes. Les niveaux d'Orex-A sont en moyenne plus bas chez les patients narcoleptiques avec cataplexie que chez des patients ayant des cataplexies atypiques ou pas de cataplexies. (d'après Dauvilliers et al, 2007).

2. Epidémiologie et qualité de vie

La prévalence de la NT1 se situe entre 20 et 50 cas pour 100 000 personnes et a une incidence de 0.74 nouveaux cas pour 100 000 personnes par an (Ohayon et al., 2002; Longstreth et al., 2007; Shin et al., 2008; Heier et al., 2009). La plupart des études de prévalence repose sur des entretiens ou questionnaires, seulement une minorité incluent des tests cliniques TILE et aucune n'inclue des mesures d'Orex pour confirmer le diagnostic (Kornum et al., 2017). Ainsi, la prévalence estimée comprend possiblement les deux types de narcolepsie. Il a été suggéré que la prévalence soit légèrement plus élevée chez les hommes (Silber et al., 2002; Wu et al., 2014), cependant nous ne savons pas si elle est due à un réel effet du genre. La plupart des études épidémiologiques n'inclue que trop peu de cas pour observer une différence de ce type. Bien que la majorité des populations asiatiques ait une prévalence similaire aux populations caucasiennes (Wing et al., 2002; Shin et al., 2008) il semble exister des variations spécifiques à certaines populations. Par exemple, la narcolepsie est plus fréquente au Japon (160 pour 100 000) (Juji et al., 1984) et moins fréquente en Israël et Arabie Saoudite (<10 pour 100 000) (Wilner et al., 1988; al Rajeh et al, 1993) qu'en Europe ou en Amérique du Nord. La prévalence de la NT2 est plus incertaine car moins étudiée. Selon l'ISCD-3, les cas de narcolepsie sans cataplexie représente 15% à 20% des populations cliniques de narcoleptiques (American Academy of Sleep Medicine 2014).

L'âge d'apparition de la narcolepsie suit une distribution bimodale. Il présente un premier pic maximal vers 14-15 ans et un second pic vers 35 ans (Dauvilliers et al., 2001; Thorpy and Krieger, 2014). Cette pathologie est très probablement sous-diagnostiquée, en partie à cause de la grande variété des caractéristiques cliniques. Il faut généralement plus de 10 ans entre l'émergence des premiers symptômes et l'établissement du diagnostic. Cette durée est raccourcie dans les pays où les médecins et patients sont mieux formés sur cette pathologie (Morrish et al., 2004).

Les patients atteints de narcolepsie ont une qualité de vie très dégradée comme le montrent toutes les mesures reconnues de la qualité de vie liée à la santé. L'impact sur la qualité de vie serait même plus sévère que d'autres maladies chroniques comme l'épilepsie (Broughton et al., 1984). Selon les études les plus récentes, 58% d'entre eux sont sans emploi et 43% de ces patients incriminent leur perte d'emploi à leur maladie. Les sujets narcoleptiques ont en moyenne des emplois moins qualifiés, ont moins fréquemment un statut marital et 7% d'entre eux déclarent avoir des difficultés, moyennes à sévères, à prendre soin d'eux-mêmes (Dodel et al., 2007). Le pourcentage de patients narcoleptiques dépressifs est significativement plus élevé que dans la population générale (Dauvilliers et al., 2009; Dimitrova et al., 2011; Ruoff et al., 2017). Avec l'âge et les années de maladie, les patients réduisent leurs interactions sociales et apprennent à gérer et éviter les situations émotionnelles inductrices de cataplexie. Ceci se traduit par une diminution du

nombre d'épisodes de cataplexie mais cela a un fort impact sur leur état dépressif et leur qualité de vie.

Selon des études récentes, le coût moyen annuel lié à la maladie est de 9572 euros par an pour le patient et de 3606 euros par an pour son partenaire ([Ingravallo et al., 2012](#); [Jenum et al., 2013](#)). En effet, comme de nombreuses pathologies chroniques, l'impact de la narcolepsie sur la qualité de vie n'est donc pas limité à celle du patient mais également à celle de son entourage.

II. Symptomatologie

Comme mentionné précédemment, la NT1 se caractérise par une tétrade de symptômes auxquels peut être ajouté un sommeil nocturne perturbé. Leurs fréquences, intensités et impacts sur la vie quotidienne sont très variables selon les individus ([Dauvilliers et al., 2007](#); [Scammell, 2015](#)). Seule une minorité de patients (10 à 25%) souffriraient des cinq symptômes ([National Institute of Neurological Disorders and Stroke 2009](#)).

1. La Somnolence diurne excessive

La SDE est le symptôme principal de la narcolepsie. Elle est la première cause de consultation des patients, et généralement le premier signe manifestant l'apparition de la pathologie ([pour revue Nishino, 2007](#)). Cliniquement, ce symptôme s'exprime par la survenue d'attaques de sommeil qui sont définies comme un besoin irrésistible de dormir. Au cours d'une journée, cette somnolence aiguë se manifeste environ toutes les 2 heures, cependant sa fréquence peut varier selon les individus ([Dauvilliers et al., 2007](#)). Il est très difficile voire impossible pour les patients de lutter contre ces attaques de sommeil, si bien qu'elles se terminent de façon quasi-systématique par une sieste. Malgré cette dénomination "attaque", ces accès de sommeil permettent habituellement aux patients narcoleptiques de trouver un endroit pour y succomber. La transition d'un état vigilant à un état endormi est donc progressive mais très courte ([Overeem et al., 2001](#)).

Cette somnolence est exacerbée lorsque le patient est physiquement inactif. Les circonstances favorables à l'apparition de cette somnolence sont similaires à celles observées chez un sujet sain privé de sommeil : regarder la télévision, être passager d'une voiture, lire le journal, etc. Plus rarement elles peuvent apparaître dans des situations inhabituelles comme marcher ou faire du vélo. Les patients sont encouragés à être les plus actifs possible pour prévenir ces crises. Les siestes sont généralement de courte durée (moins de 20 minutes) et restaurent un niveau "normal" d'éveil pour quelques heures.

La sévérité de ce symptôme reste stable au cours des années mais peut toutefois varier selon certaines périodes, mois ou semaines. La SDE se caractérise plus par une tendance à l'endormissement que par une augmentation des quantités de sommeil. En effet, bien que des patients s'endorment à toute heure de la journée, leurs quantités totales quotidiennes de sommeil

sont similaires à celles des sujets sains (Overeem et al., 2001). Si ce symptôme est nécessaire au diagnostic de la pathologie, il n'est cependant pas spécifique de celle-ci puisqu'il est également observé dans des cas d'apnées obstructives du sommeil ou d'hypersomnies idiopathiques.

2. La Cataplexie

La cataplexie est définie comme une perte soudaine de tonus musculaire au cours de l'éveil, engendrée par une forte émotion (Overeem et al., 2011) (Fig.II-2). Elle est totalement spécifique de la narcolepsie, ce qui en fait le meilleur marqueur de cette pathologie. Cette perte de tonus est depuis longtemps considérée comme une intrusion de l'atonie musculaire spécifique du SP au cours de l'éveil (Dauvilliers et al., 2003, 2007). Son diagnostic peut s'avérer difficile tant ce symptôme présente une variabilité dans la forme, le facteur déclenchant, la fréquence ou la sévérité. De plus, il est difficile de l'induire dans un cadre de consultation clinique.

La cataplexie touche les muscles de façon bilatérale mais peut être partielle ou totale. A l'exception du diaphragme et des muscles oculaires, tous les muscles striés sont concernés (Dauvilliers et al., 2014). Cependant l'effet est généralement plus grand sur les muscles de la face et de la nuque. Une faiblesse musculaire dans les genoux, les bras ou les épaules est aussi très fréquente et peut entraîner la chute de l'individu. Toutefois, les patients ne se blessent que rarement car la survenue d'une cataplexie est progressive et lui laisse le temps de s'asseoir ou de se coucher. La moitié des patients souffrent de cataplexies partielles et totales, tandis que 30% n'ont que des cataplexies partielles (Dauvilliers et al., 2014). L'état de conscience est préservé durant ces épisodes, si bien que les patients sont capables de se remémorer ce qui s'est passé avant, pendant et après l'épisode (Mayer, 2005). Cependant certains patients rapportent des hallucinations pendant les cataplexies, et certains entrent en SP mais cela reste rare.

La durée d'une cataplexie est généralement comprise entre plusieurs secondes et plusieurs minutes. La fréquence de ces épisodes peut varier entre moins d'une cataplexie par an à plusieurs cataplexies par jour. D'autre part, plusieurs patients rapportent que la privation de sommeil et la fatigue favorisent la survenue des cataplexies. Cependant aucune étude n'a encore montré de lien direct entre la sévérité de ce symptôme et différentes caractéristiques du sommeil (durée totale, efficacité du sommeil, proportion des différents stades etc.). Le nombre de cataplexies tend à diminuer avec l'âge, possiblement grâce à une meilleure gestion des émotions déclenchant de tels épisodes (Mattarozzi et al., 2008).

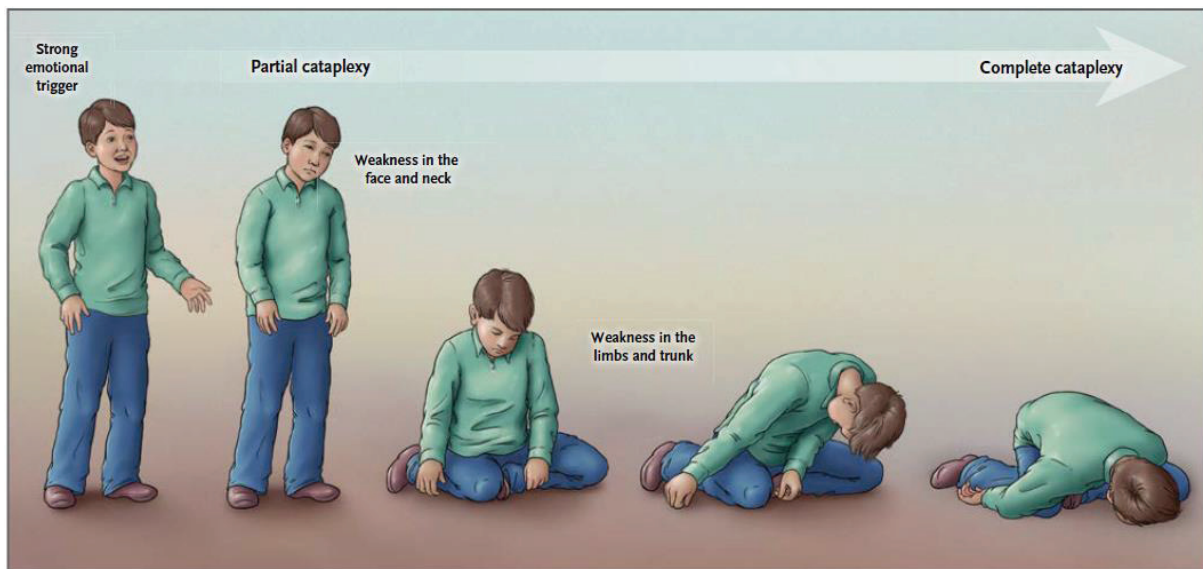


Figure II-2 : La cataplexie est une perte de tonus musculaire sans altération de conscience, déclenchée par une forte émotion positive (strong emotional trigger). Ces épisodes débutent classiquement par une faiblesse musculaire du visage et de la nuque et se propage aux muscles posturaux passant d'une cataplexie partielle à complète (d'après Scammell et al, 2015).

Les cataplexies sont le plus souvent provoquées par une forte émotion positive comme un fou-rire, le fait d'avoir une répartie (remarque vive et percutante), d'exulter, ou encore de rencontrer par surprise un ami (Overeem et al., 2011). Plus rarement elles peuvent être engendrées par des émotions négatives comme la colère, la douleur, la frustration, ou l'effort physique. La plupart des patients ont des attaques dites spontanées, sans déclencheur identifiable. Il est connu que le rire peut également provoquer des faiblesses musculaires des membres inférieurs chez la population saine. Cette faiblesse musculaire bénigne ainsi que la cataplexie sont associées à une suppression du réflexe H appelé signe de Hoffmann (Guilleminault, 1974).

3. Hallucinations hypnagogiques

Les hallucinations hypnagogiques sont vécues comme une expérience de "rêve éveillé" pendant la transition éveil-sommeil (Overeem et al., 2001). On utilise le terme hypnopompique pour des épisodes similaires au réveil. Bien que ce soit principalement des hallucinations visuelles (ombres, animaux, personnage menaçant), elles sont aussi fréquemment auditives (sonnerie de téléphone, bruits de pas,) ou somesthésiques (être hors de son corps, sensation d'être frôlé par quelqu'un). Chez la majorité des patients, le contenu de ces hallucinations est bizarre, inquiétant, et très rarement décrit comme plaisant (Hishikawa et al., 1976). Ce symptôme fascine par son potentiel lien avec les mécanismes neuronaux du rêve, raison pour laquelle il est supposé être un état dissocié du SP. Les hallucinations sont parfois si intenses que certains patients rapportent des difficultés à différencier rêves et réalité et peuvent ainsi être considérés à tort comme schizophrènes. Certains sujets doivent être convaincus par quelqu'un ou vérifier eux-mêmes si ce qu'ils expérimentent est réel.

On estime la prévalence des hallucinations hypnagogiques à 45-80% des patients narcoleptiques (Dahmen et al., 2002; Fortuyn et al., 2009). Une étude réalisée sur 100 patients narcoleptiques a observé une prévalence plus importante chez les NT1 (59%) que chez les NT2 (28%) (Leu-Semenescu et al., 2011). La durée de ces épisodes est toujours inférieure à 10 minutes. La fréquence varie de moins d'une par mois à plusieurs par jour. Elles peuvent être associées à la paralysie du sommeil. Beaucoup de patients ne rapportent pas spontanément ces épisodes car ils sont embarrassés de mentionner de tels épisodes de 'folie'.

Un autre phénomène observé chez les sujets narcoleptiques pourrait avoir un lien avec ces hallucinations bien qu'il ne soit pas décrit en tant que tel dans la littérature: le phénomène de confusion entre un souvenir rêvé et un souvenir réel. Il semble être prédominant chez les sujets narcoleptiques comparé aux sujets sains (Wamsley et al., 2014) et pourrait être une conséquence de ces hallucinations durant lesquelles rêves et réalité sont difficilement différenciables.

4. Les paralysies du sommeil

La paralysie du sommeil est caractérisée par une période d'incapacité totale de mouvement musculaire volontaire à l'endormissement ou au réveil (Overeem et al., 2001). Durant ces épisodes, les sujets sont éveillés et conscients, leurs mouvements oculaires et respiratoires sont intacts, mais ils sont dans l'incapacité temporaire de déplacer leurs membres, de parler ou d'ouvrir les yeux (Overeem et al., 2001). Les patients ont la sensation de devoir lutter pour bouger. Ces expériences sont habituellement assez courtes (quelques secondes) mais peuvent durer quelques minutes. Elles prennent souvent fin à la suite d'un bruit ou d'un stimulus externe. Elles sont très souvent associées à des hallucinations hypnagogiques qui rendent ces expériences très pénibles et anxiogènes (Hishikawa et al., 1976). Ces épisodes affectent entre 25% et 50% des sujets narcoleptiques mais ne sont pas spécifiques de cette pathologie (Parkes et al., 1974; Hishikawa et al., 1976; Mamelak, 2009). La prévalence des paralysies du sommeil isolées varient selon les groupes ethniques majoritairement de 5 à 30% (Dahlitz and Parkes, 1993).

5. La perturbation du sommeil nocturne

Le sommeil nocturne perturbé peut être considéré comme une cinquième composante à la tétrade de symptômes. Les sujets narcoleptiques rapportent de fréquents réveils pendant la nuit. Ces réveils sont souvent brefs mais certaines personnes restent éveillées pendant des heures. L'impact sur la qualité de vie des patients narcoleptiques serait plus important que les paralysies du sommeil ou hallucinations hypnagogiques. Une revue des données polysomnographiques obtenues chez les sujets narcoleptiques a rapporté de fréquents réveils, une augmentation du SL Stade I, une réduction du Stade III-IV, ainsi qu'une globale diminution de l'efficacité du sommeil (Roth et al., 2013). Il y aurait un déclin de l'activité en ondes lentes au cours des épisodes de SL associé à un sommeil de

nuit non consolidé (Khatami et al., 2007). L'ensemble de ces paramètres est le signe d'un sommeil de mauvaise qualité. Ce symptôme toucherait de 30% à 90% des narcoleptiques selon les études et critères utilisés (Seneviratne and Puvanendran, 2005; Plazzi et al., 2008). Cependant, il n'existe que peu de rapport clinique systématique permettant d'établir un modèle clinique de ce symptôme et de le différencier d'autres troubles du sommeil tel que l'insomnie.

Il semble exister un lien entre le sommeil perturbé et les symptômes diurnes de la narcolepsie (Harsh et al., 2000; Jimenez-Correa et al., 2009). Une étude a évalué que le sommeil nocturne perturbé et la SDE (évalué par TILE et tests de maintien d'éveil) étaient significativement mais modestement corrélés (Harsh et al., 2000). Les auteurs concluent que le sommeil perturbé peut exacerber la SDE sans pour autant en être la cause.

6. Autres signes cliniques

6.1 L'indice de masse corporelle (IMC) des narcoleptiques est en moyenne plus élevé chez les narcoleptiques (Okun et al., 2002). L'obésité concerne plus de la moitié des enfants narcoleptiques et a un impact délétère sur la qualité du sommeil (Inocente et al., 2013). Ce gain de poids survient, chez les enfants, avec l'apparition des premiers symptômes (Kotagal et al., 2004).

6.2 La narcolepsie qui apparait à un âge pré-pubère est accompagnée d'une puberté précoce dans 15% des cas (Plazzi et al., 2006; Poli et al., 2013). Il semblerait même que l'âge d'apparition des symptômes constituerait un caractère prédictif à la précocité de la puberté (Poli et al., 2013).

6.3 Durant la journée, les patients peuvent avoir des comportements automatiques sans se souvenir de ce qu'ils sont en train de faire. Il en résulte des phrases hors du contexte dans une conversation, le fait d'écrire quelque chose d'inapproprié, ou de se diriger vers un lieu inapproprié (Dauvilliers et al, 2007).

6.4 Les sujets narcoleptiques semblent sujets à diverses parasomnies. Des mouvements périodiques des jambes durant le sommeil ont été rapportés. De plus, la somniloquie et des troubles du comportement en SP (TCSP ; en anglais REM sleep Behavior Disorder ou RBD) sont fréquents chez un tiers des patients (Nightingale et al., 2005).

6.5 Comme mentionné plus haut, 30% des patients sont affectés de symptômes dépressifs et cela même chez l'enfant narcoleptique (Vandeputte and de Weerd, 2003; Inocente et al., 2014).

Une étude menée sur 757 patients a montré des premiers signes de comorbidité chez les sujets narcoleptiques avant diagnostic par rapport à une population saine (Jennum et al., 2013). Après diagnostic, cette comorbidité tend à augmenter et comprend notamment des apnées du sommeil, du diabète et des problèmes respiratoires (Jennum et al, 2013).

III. Physiopathologie

1. Orexine et narcolepsie

La NT1 est associée à la perte de 70 000 à 90 000 soit 85 à 100% des neurones à Orex ([Peyron et al., 2000](#); [Thannickal et al., 2000](#); [Crocker et al., 2005](#); [Honda et al., 2009](#)) (Fig.II-3). Le neuropeptide Orex est exclusivement exprimé dans l'hypothalamus latéral (HL). La perte du signal orexinergique serait due à l'activation du système immunitaire qui ciblerait et tuerait spécifiquement les neurones Orex ([Mahlios et al., 2013](#)). En effet il a été montré que les neurones à mélanocortine (MCH), voisins des neurones Orex dans l'HL, ne sont pas affectés par la perte neuronale ([Peyron et al., 2000](#)).

Le neuropeptide Orex provient d'un gène codant pour une protéine précurseur : la prépro-hypocrétine. Cette protéine est clivée par une enzyme en deux différents peptides : l'Orex-A et l'Orex-B, aussi appelés hypocrétine 1 (Hcr1) et hypocrétine 2 (Hcr2). Le signal est transmis via les récepteurs 1 et 2 de l'Orex (OXR1 & OXR2). Les neurones à Orex projettent de façon très diffuse dans le SNC et sont notamment impliqués dans les mécanismes d'éveil, le métabolisme ou encore le système de récompense ([Tsuji and Sakurai, 2009](#)).

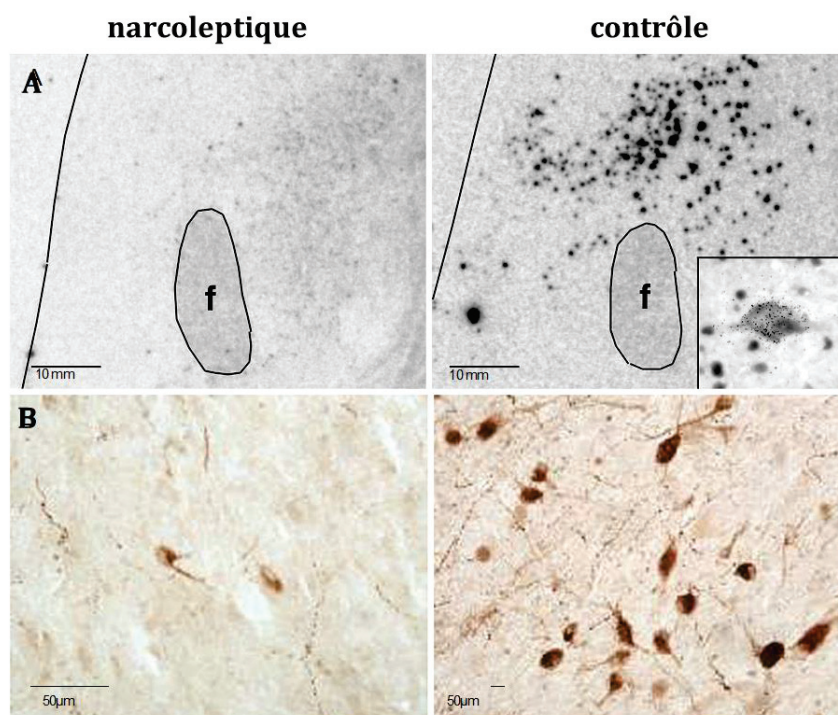


Figure II-3: Perte des neurones à Orex chez les sujets narcoleptiques mis en évidence par hybridation *in situ* (A; d'après [Peyron et al, 2000](#), f= fornix) et par immunohistochimie du neuropeptide Orex (d'après [Thannickal et al, 2000](#)).

L'une des évidences de l'implication des Orex dans la narcolepsie provient des modèles animaux de narcolepsie : le chien muté pour le OXR2 ainsi que plusieurs modèles murins comme la souris délétée pour le gène de la prépro-hypocrétine présentent un phénotype narcoleptique (Chemelli et al., 1999; Lin et al., 1999). Comme mentionné précédemment, les patients NT1 ont une concentration d'Orex dans le LCR anormalement basse voire indétectable (Nishino et al., 2000, 2001).

2. Facteurs génétiques et immunité

La narcolepsie n'est pas une maladie purement génétique. Toutefois, on répertorie 23 à 31% de jumeaux monozygotes concordants pour la narcolepsie (Mignot, 1998). De plus, le fait d'avoir un membre de sa famille au 1^{er} degré de parenté souffrant de narcolepsie augmente de 20 à 40% le risque de développer les symptômes (Mignot, 1998), ce qui indique que les facteurs génétiques jouent un rôle important dans le développement de NT1. Il semblerait que le risque génétique concerne majoritairement des gènes impliqués dans la réponse immunitaire.

Le risque génétique principal est l'association avec le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH, ou HLA [human leukocyte antigen] en anglais), et plus précisément avec l'allèle de type HLA-DQB1*06 :02 du CMH. En effet cet allèle est présent chez près de 98% des patients NT1 (Mignot, 1997). Les homozygotes pour cet allèle ont deux à quatre fois plus de risques d'être narcoleptique que les hétérozygotes (Pelin et al., 1998). La présence de l'allèle HLA-DQB1*06 :02 n'est toutefois pas suffisante au développement de la maladie. Aux Etats-Unis, 12% d'asiatiques, 25% de caucasiens et 38% d'afro-américains sont porteurs du HLA-DQB1*06 :02, et seulement 0,02% sont narcoleptiques (Mignot et al., 2001). De plus, seulement 40 à 60% des NT2 sont porteurs de cet allèle. Ces données mettent bien en évidence que la narcolepsie n'est pas une maladie génétique mais qu'elle a une prédisposition génétique forte, dont le déclenchement est le résultat de facteurs environnementaux. D'autres associations génétiques ont été mises en évidence avec les gènes codants pour les cathepsine H, le TCR β et OX40L, impliqués dans l'activation des lymphocytes T CD4⁺ (Jacob and Dauvilliers, 2014; Tafti et al., 2016). Les gènes impliqués dans le système immunitaire semblent donc conférer une prédisposition à la narcolepsie, ce qui a fortement contribué à formuler l'hypothèse selon laquelle elle aurait une origine auto-immune.

3. Facteurs environnementaux

L'environnement joue un rôle majeur dans le développement de la narcolepsie (Dauvilliers et al 2007). Une proportion importante de sujets narcoleptiques a rapporté des événements stressants durant l'année précédant l'apparition des symptômes (Orellana et al., 1994).

D'autre part, une étude chinoise a montré que l'apparition de la narcolepsie était hautement corrélée aux infections du tractus respiratoire telles que les infections à virus influenza de type

H1N1 (Han et al., 2011). Selon cette étude, l'incidence de la NT1 est saisonnière puisque la plupart des cas cliniques rapportent une apparition des premiers symptômes durant les 6 mois post-hivernal. L'incidence aurait été multipliée par 3 lors de la pandémie H1N1 de 2009 et aurait retrouvé un niveau habituel deux ans après (Han et al., 2013).

Dans cette même période, la campagne de vaccination aurait engendré une hausse importante de l'incidence de NT1 en Europe (Jacob and Dauvilliers, 2014). Cette hausse a été rapportée en France, Suède, Irlande, Norvège, Royaume-Uni et serait associée spécifiquement au vaccin Pandemrix (Dauvilliers et al., 2013a; Heier et al., 2013; O'Flanagan et al., 2014; Winstone et al., 2014). Le risque de développer la NT1 après vaccination était élevé chez les individus de moins de 20 ans mais également chez les adultes (Kornum et al., 2017). L'ensemble de ces données confortent l'hypothèse immune de l'apparition de la narcolepsie.

IV. Traitements symptomatiques

Malgré les avancées majeures de notre compréhension des mécanismes neurobiologiques de la narcolepsie, il n'existe toujours aucun traitement curatif de cette pathologie. Les thérapies aujourd'hui proposées visent uniquement à soulager les symptômes et restaurer une qualité de vie chez les patients. Un substitut orexinergiques constituerait une thérapie médicamenteuse idéale pour pallier les différents symptômes de la narcolepsie. Pour l'instant, l'administration d'Orex est rendue impossible car le peptide ne passe pas facilement la barrière hémato-encéphalique (Dauvilliers et al., 2014; Weinhold et al., 2014). A l'avenir, l'une des solutions pourrait être de trouver un mode d'administration de l'Orex ou un substitut orexinergique. En ce sens, la découverte récente d'un agoniste non-peptidergique pour le OXR2 constitue un espoir pour de futures thérapies (Irukayama-Tomobe et al., 2017).

A l'heure actuelle, la SDE est traité par l'administration de plusieurs psychostimulants. Le plus utilisé est le **modafinil**, dont les mécanismes d'actions restent peu connus, mais qui agirait principalement sur les systèmes éveillants noradrénergiques et dopaminergiques. Ce traitement est l'un des plus recommandé car sa durée d'action est longue : il a une demi-vie de 13,8h (Billiard et al., 2006; Thorpy and Dauvilliers, 2015) et les effets secondaires peu nombreux. Le **methylphenidate** est un stimulant qui agit également sur les neurones monoaminergiques, il bloque principalement la recapture de la dopamine (DA) (Leonard et al., 2004). Sa durée d'action est relativement courte (demi-vie de 6h) et est donc utilisé à des moments précis de la journée lorsqu'un niveau de vigilance élevé est requis, comme pour conduire. Les **amphétamines** sont utilisées comme traitement de la narcolepsie depuis 1935. Elles augmentent la libération de monoamine et principalement de la DA. Ces différents traitements mettent en évidence l'importance des neuropeptides monoaminergiques (dopamine, noradrénaline) dans la stimulation de l'éveil.

Le premier traitement des cataplexies a longtemps été les **antidépresseurs tricycliques**. Ils inhibent la recapture de noradrénaline ou sérotonine et réduisent les cataplexies et le SP ([pour revue Barateau et al., 2016](#)). Ainsi, la sérotonine et noradrénaline pourrait jouer un rôle dans les cataplexies. Plus récemment, le **sodium oxybate** (gamma hydroxybutyrate ou GHB) a montré une grande efficacité pour traiter les cataplexies et la SDE ([Black et al., 2004](#); [Black and Houghton, 2006](#); [Boscolo-Berto et al., 2012](#)). Il s'agit d'un agoniste des sous-types de récepteurs GABA_B dont les mécanismes d'action restent peu connus. Ce traitement est néanmoins assez contraignant : le patient doit prendre une première dose au coucher, puis de 2.5h à 4h ce qui nécessite de se réveiller.

Le **pitolisant** est un traitement très récent qui est très efficace contre la SDE ([Lin et al., 2008](#)) et qui réduirait également l'apparition de cataplexies ([Szakacs et al., 2017](#)). C'est un agoniste inverse du récepteur H3 de l'histamine permettant une activation des neurones à histamine. Il a une efficacité similaire au modafinil dans le traitement de la SDE ([Dauvilliers et al., 2013b](#)).

V. Modèle d'étude : la souris narcoleptique

Les modèles animaux ont toujours joué un rôle majeur dans les études neurobiologiques, et notamment dans l'étude de la narcolepsie. En 1972, le docteur Dement présentait une vidéo de narcolepsie-cataplexie lors d'un congrès à San Francisco lorsqu'un vétérinaire de l'audience nota une ressemblance frappante avec un phénomène observé chez l'un de ses chiens. Pendant les années suivantes, les docteurs Dement et Mitler visitèrent de nombreux vétérinaires à travers le pays et établirent une petite colonie de chiens narcoleptiques ([pour revue Mignot, 2014](#)). Puis en Juillet 1976, la reproduction de deux Dobermans narcoleptiques donna lieu à la première transmission génétique de cette pathologie. Le gène muté recherché et responsable de la narcolepsie canine sera nommé *carnc-1*. Le chien fut le seul modèle animal de narcolepsie pendant plus de deux décennies et permit, grâce à de nombreuses études pharmacologiques, de faire naître l'hypothèse d'une hyperactivité cholinergique et hypoactivité monoaminergique dans le pont ainsi que de perturbations dopaminergiques dans l'amygdale ([Hobson et al., 1975](#); [Baker et al., 1982](#); [Mefford et al., 1983](#); [Miller et al., 1990](#); [Nishino and Mignot, 1997](#)).

Un an après la découverte du neuropeptide Orex et de ses récepteurs chez la souris, le groupe d'Emmanuel Mignot identifiait que le gène *carnc-1* est le gène codant le récepteur 2 aux Orex ([Lin et al., 1999](#)). Parallèlement, le premier modèle de souris narcoleptique était obtenu par délétion du gène codant la prépro-hypocrétine : la souris Orex-KO ([Chemelli et al., 1999](#)). C'est le modèle murin de narcolepsie le plus étudié à ce jour et c'est celui que nous avons utilisé dans nos études.

1. La souris Orexine Knock-out

La lignée de souris Orex-KO a été développée et décrite pour la première fois en 1999 par l'équipe de Masashi Yanagisawa ([Chemelli et al., 1999](#)). Elle a été obtenue par la délétion de la

séquence codante du gène prépro-orexine précurseur des neuropeptides hypocrétine/orexine. Tout d'abord la souris Orex-KO est incapable de maintenir de longues périodes d'éveil et les épisodes de SL sont plus courts que chez les souris sauvages dites wild-type (WT) (Chemelli et al., 1999; Diniz et al., 2006). Ces deux éléments peuvent s'apparenter à la somnolence diurne et au sommeil de nuit fragmenté observés chez les patients narcoleptiques. La durée des cycles de sommeil, allant du début d'un épisode de SL à la fin d'un épisode de SP est globalement raccourcie. Le nombre d'épisodes d'éveil et de SL de ces souris est donc plus important et leurs hypnogrammes plus fragmentés (Fig.II-4). Ainsi le nombre de transitions entre les différents états est très augmenté et suggère une instabilité globale des états de vigilance (Mochizuki et al., 2004) (Fig.II-4). Cette fragmentation n'altère pas les quantités de SL, de SP et d'éveil sur 24 heures, et ceci chez la souris comme chez le patient narcoleptique.

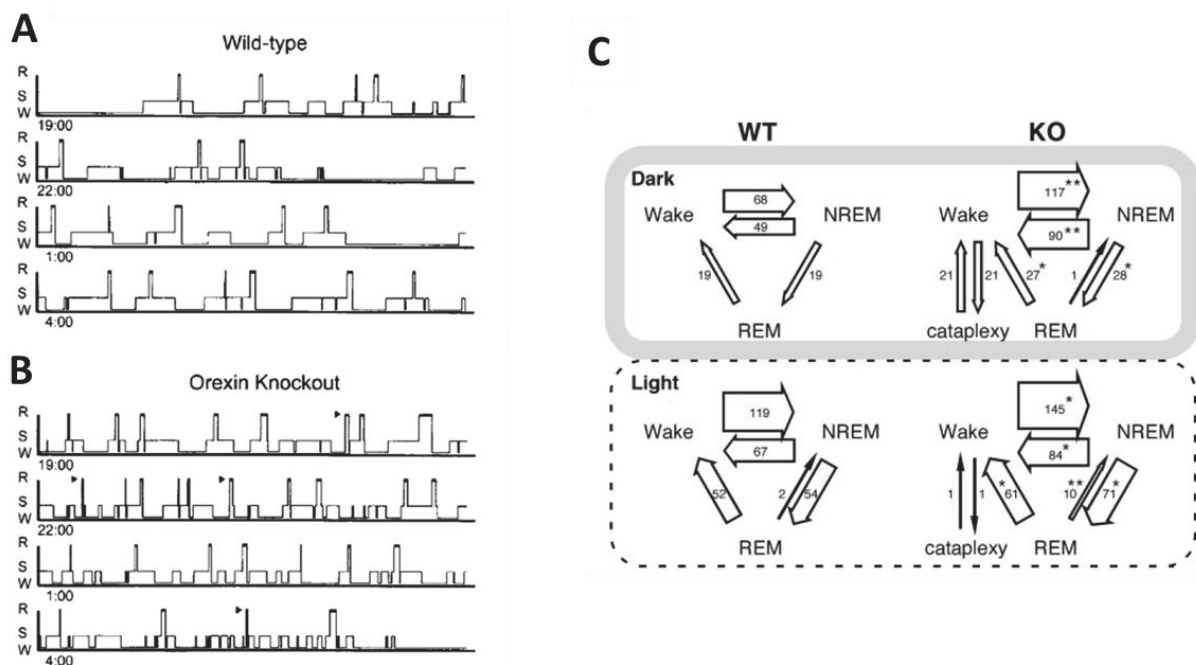


Figure II-4 : Les souris Orex-KO présentent une fragmentation des états de vigilances. **A-B :** Hypnogrammes représentatifs d'une souris sauvage (A) et Orex-KO (B) obtenus à partir des tracés EEG/EMG des souris. En vertical sont indiqués les états de vigilance W = éveil ; S = SL ; R = SP et en horizontal le déroulement temporel de la période obscure (19h – 7h) ; les flèches noires indiquent les arrêts comportementaux observés uniquement chez les souris Orex-KO (d'après Chemelli et al, 1999).

C : Représentation schématique du nombre de transitions entre chaque état de vigilance (éveil=wake ; NREM=SL ; REM=SP) pendant la période obscure (dark) ou lumineuse (light) des souris sauvages (WT) et narcoleptiques (KO). Le nombre de transitions entre chaque état est augmenté chez les souris Orex-KO (d'après Mochizuki et al., 2004).

Des études réalisées à partir d'enregistrements EEG ont montré que la variation circadienne des quantités d'éveil et de SL était préservée chez ces souris (Mochizuki et al., 2004; Ancelet et al., 2009). De plus, le rythme de la température corporelle est similaire à celui des souris WT en

conditions d'obscurité constante (Mochizuki et al., 2004). La fragmentation et l'instabilité de ces états de vigilance ne seraient donc pas dues à une altération du contrôle circadien. Les données sur le SP sont plus contrastées. L'équipe de T Scammell a montré une variation circadienne du SP similaire chez les souris WT et Orex-KO en conditions cyclées (lumière/obscurité) ou d'obscurité constante (Mochizuki et al., 2004; Kantor et al., 2009). En revanche, d'autres études réalisées en conditions de lumière cyclée ont observé chez les souris Orex-KO des quantités plus importantes de SP lors de la période active (phase d'obscurité) (Chemelli et al., 1999; Willie et al., 2003; Anaclet et al., 2009). Ces différences peuvent être attribuées aux critères d'analyses utilisés et principalement à la taille de la fenêtre de scorage (10sec/20sec/30sec). Nous étudierons les variations quotidiennes de SP dans notre première étude.

Au cours de la période active des souris (phase d'obscurité), les souris Orex-KO présentent des arrêts comportementaux. Ces arrêts s'apparentent aux cataplexies et constituent un élément important dans la validation de ce modèle de narcolepsie. Ils ont d'abord été définis comme un arrêt brutal de l'activité motrice, associé à une posture maintenue au cours de l'épisode et se terminant par un retour abrupt à une activité motrice (Chemelli et al., 1999). D'autres études ont ensuite suggéré la présence d'un autre arrêt comportemental chez ce modèle de souris narcoleptique : les attaques de sommeil (Willie et al., 2003; Burgess et al., 2010).

2. Les arrêts comportementaux

a) La cataplexie murine

Des arrêts comportementaux ont été immédiatement observés chez la souris par les différentes équipes de recherches, chacune leur donnant un attribut : épisodes narcoleptiques (Chemelli et al., 1999), arrêts comportementaux abrupts (Willie et al., 2003), cataplexie (Mochizuki et al., 2004) et transition directe de l'éveil au SP (en anglais DREM pour *direct REM sleep transitions from wake*) (Zhang et al., 2007).

La communauté scientifique s'est alors réunie pour s'accorder sur une définition consensuelle de la cataplexie murine (Scammell et al., 2009). Elle la définit comme étant un épisode abrupt d'atonie musculaire visualisée objectivement sur l'EMG mesuré sur les muscles de la nuque, d'immobilité sur la vidéo et d'une durée d'au moins 10 secondes. Elle est précédée d'au moins 40 secondes d'éveil actif et suivie d'une reprise brutale de l'activité motrice. Elle s'accompagne d'une activité cérébrale riche en rythme thêta (4-9 Hz) similaire à la signature EEG observée au cours du SP ou pendant l'éveil exploratoire. La particularité de la cataplexie chez l'homme réside dans le fait qu'elle est induite par une émotion et que l'état de conscience est préservé pendant la crise. Il est impossible de définir l'état de conscience d'une souris pendant ces épisodes. Toutefois, les cataplexies murines sont induites par des comportements à haute valence émotionnelle.

Induction des cataplexies

Lors d'enregistrements en condition basale, ces épisodes sont observables uniquement durant la phase active des souris (phase d'obscurité) et ceci en petite quantité (moins d'une cataplexie par heure). Afin de démontrer que ce phénotype est lié aux émotions et donc différent du SP et pour aborder les mécanismes neurobiologiques impliqués, de nombreuses études ont cherché des stimuli émotionnels pouvant engendrer de tels épisodes. Tout d'abord, il a été montré que le comportement précédant la survenue de ces épisodes était actif et orienté. Parmi eux, le toilettage, le fait de grimper, gratter la sciure ou l'exploration sont les comportements les plus fréquemment retrouvés (Chemelli et al., 1999 ; Willie et al., 2003). Ensuite, l'introduction d'une roue dans la cage des souris augmente le nombre de cataplexie par minute d'éveil. L'accès à ces roues peut doubler les quantités de cataplexies chez les souris Orex-KO (Clark et al., 2009). Dans ces conditions, les cataplexies sont souvent précédées par des courses intenses de la souris dans sa roue (España et al., 2007). D'ailleurs, le comportement de course dans une roue est considéré comme récompensant pour les souris (Lett et al., 2002). La connotation positive de ce protocole pourrait donc être à l'origine de l'augmentation des cataplexies. De plus les rongeurs produisent des vocalisations ultrasoniques lors d'événements sociaux positifs tels que jouer avec des congénères et il a été montré que ces vocalisations étaient corrélées positivement avec les cataplexies chez la souris Orex-KO (Burgess et al., 2008b).

D'autres études ont montré que la nourriture palatable augmentait également le nombre de cataplexies comme observé chez le chien narcoleptique (Babcock et al., 1976). Le chocolat augmente jusqu'à 8 fois le nombre de cataplexies au cours de la phase d'obscurité chez la souris Orex-KO (Oishi et al., 2013) (Fig.II-5). La nourriture apétente administrée après un protocole de restriction alimentaire augmente également le nombre de cataplexie considérablement (Clark et al., 2009). La connotation émotionnelle est donc un aspect capital dans l'expression de ces arrêts comportementaux observés chez la souris, et fournit un argument fort dans la similarité avec la cataplexie humaine.

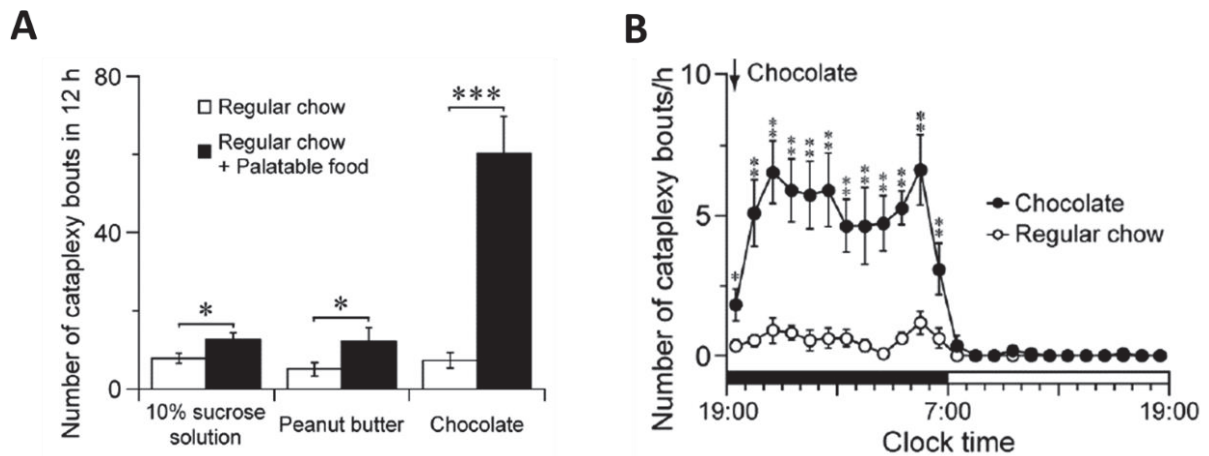


Figure II-5 : Le chocolat induit des cataplexies chez la souris Orex-KO. La nourriture palatable augmente le nombre de cataplexies pendant la phase active des souris (période obscure). Le chocolat augmente 8,1 fois le nombre d'épisodes par rapport à de la nourriture standard seule. Solution sucrose 10% n=7; beurre de cacahuète n=7; chocolat n=11 (A) le nombre de cataplexie augmente tout au long de la période d'obscurité (n=11) (B) (d'après Oishi et al., 2013)

Signature EEG des cataplexies

La signature électro-encéphalographique des cataplexies murines est classiquement associée à une activité cérébrale similaire à celle observée pendant le SP (riche en ondes thêta), lorsque l'EEG est enregistré en bipolaire fronto-parital ou sur l'électrode située au dessus du cortex pariétal (Fig.II-6). Toutefois, il semblerait que ces cataplexies murines ne soient pas un état stable. Tout d'abord une étude corrélative a montré que seulement 80% des arrêts brutaux observés avaient un pattern EEG similaire à celui observée pendant le SP (Willie et al., 2003). Plus récemment, une étude détaillée s'est intéressée aux différents patterns EEG observables au cours des cataplexies (Vassalli et al., 2013). Dans cette étude, l'analyse vidéo a permis de déterminer les cataplexies comme un arrêt brutal lors d'une activité intense. En parallèle, l'analyse des tracés de polysomnographie comprenait les états de vigilances habituels (éveil, sommeil lent, SP) ainsi qu'un autre état très irrégulier comprenant un mélange d'oscillations thêta (5-8Hz) et delta (1-4Hz) de haute amplitude nommé 'état associé aux cataplexies' (cataplexy-associated state ; CAS). L'analyse de 578 épisodes de cataplexies a permis de mettre en évidence une dynamique au cours de ces épisodes. Cette dynamique se caractérise par une activité EEG de type CAS en début d'épisode, suivie d'une activité type SP (Fig.II-6). Les cataplexies de plus de 60 secondes finissant invariablement par une activité thêta. La signature EEG de la fin d'une cataplexie n'est donc pas la même que celle de l'entrée. De plus au cours de la période d'éveil qui précède la survenue de l'épisode, il a été observé une diminution des oscillations delta et une hausse des oscillations thêta et gamme par rapport à l'éveil moyen au cours des 12hrs, ce qui correspond généralement à une intense exploration chez le rongeur (Mitchell et al., 2008).

L'analyse polysomnographique des souris Orex-KO montre une autre particularité : la présence de bouffées d'activité thêta de hautes amplitudes nommées HSPT (pour hypersynchronous paroxysmal thêta burst). Ces événements de 1 à 2 secondes ont d'abord été décrits par une équipe italienne (Bastianini et al., 2012). Ils surviennent uniquement pendant la phase d'obscurité au cours du SP ou des cataplexies. On en retrouve également chez les souris sauvages au cours du SP mais en moindre quantité. De tels pics d'activité seraient retrouvés chez l'enfant narcoleptique mais à un pic de fréquences moins élevé (3-5Hz) (Vassalli et al., 2013). Chez la souris, l'HSPT est majoritaire en début de cataplexie et se manifeste plusieurs fois dans les longues cataplexies (Vassalli et al., 2013). Ce rythme serait généré au niveau du lobe frontal et sa signification reste inconnue à ce jour.

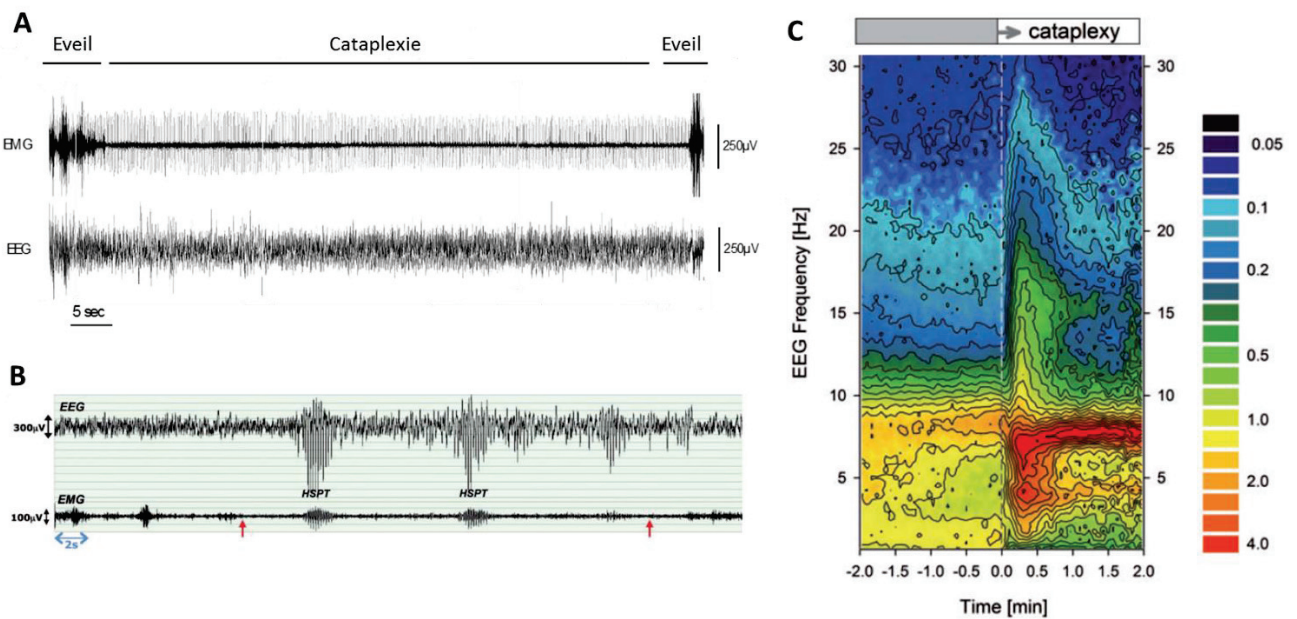


Figure II-6 : Caractérisation polysomnographique (EEG/EMG) des cataplexies chez la souris Orex-KO. Les tracés EEG ont été enregistrés grâce à une électrode placée au dessus du cortex pariétel (A ; données non publiées) ou par un signal différentiel fronto-pariétel (B,C,D ; d'après Vassalli et al., 2013). B : les flèches rouges représentent le début et la fin de l'épisode de cataplexie. L'EEG fronto-pariétel montre la présence de bouffées d'activité thêta de haute amplitude (HSPT). C : Représentation de la puissance spectrale moyenne par bande de fréquence en fonction du temps, avant et pendant (-2min et +2min) les cataplexies. Les valeurs ont été obtenues en moyennant la puissance spectrale de l'EEG fronto-pariétel de 578 cataplexies chez la souris Orex-KO. La densité des valeurs spectrales de l'EEG suivent un code couleur en fonction de leur puissance, et sont référencées sur une échelle logarithmique. On note que la cataplexie suit une dynamique en début d'épisode puis se stabilise sur un rythme thêta (7-8Hz).

b) Les attaques de sommeil

Willie et al., (2003) a distingué un autre type d'arrêt comportemental chez la souris Orex-KO. Il est défini comme un arrêt se mettant graduellement en place. Ces événements prendraient place au cours d'un éveil calme pendant la phase active et se distingueraient des autres arrêts comportementaux par la survenue d'une phase classique de repos par deux aspects. Premièrement, l'absence de préparation stéréotypée avant de dormir, comme le fait de préparer le nid, d'adopter une posture courbée etc. Deuxièmement, un hochement de tête de plusieurs secondes qui précède la chute postural. Ainsi, il y aurait une perte graduelle du tonus musculaire de la nuque enregistré avec l'EMG accompagné d'une activité cérébrale à prédominance d'ondes lentes de type delta. Ainsi, la polysomnographie au cours de ces épisodes révèle un pattern EEG typique du SL et peuvent donc être mis en parallèle avec les attaques de sommeil observées chez l'homme. De plus, l'enregistrement des muscles masséters montre des mouvements répétitifs de la mâchoire durant ces attaques de sommeil ce qui les distinguerait également des cataplexies (Burgess et al., 2010). Dans l'étude de Willie, l'administration d'un anticataplectique (la clomipramine) n'a montré aucun effet sur ces attaques alors qu'elle diminue fortement les cataplexies. En revanche, la caféine diminue ces épisodes et tend à augmenter les cataplexies suggérant ainsi des mécanismes physiologiques distincts pour ces deux arrêts comportementaux (Willie et al., 2003).

3. Les autres modèles murins de narcolepsie

D'autres modèles murins ont été créés dans l'objectif d'abolir la transmission orexinergique. Tous ont abouti à l'expression d'un phénotype de narcolepsie avec cataplexie, démontrant par là même que la narcolepsie est essentiellement due à la perte des neurones à hypocrétine/orexine.

a) Les souris orexin-ataxin 3

Les souris orexine Ataxine-3 (Orex-Atax3) ont été développées et décrites pour la première fois en 2001 par l'équipe de T. Sakurai et A. Yamanaka (Hara et al., 2001). Ce modèle génétique permet la dégénérescence postnatale sélective des neurones à orexine par l'expression d'une protéine mutée, l'ataxine-3, sous le contrôle du promoteur de la prépro-orexine. L'ataxine-3 muté va s'accumuler dans le cytoplasme et provoquer la mort du neurone. La perte des neurones est donc progressive, elle atteint 90% dès la 8ème semaine post-natale et est quasi-totale (99%) 12 semaines après la naissance de l'animal. Cependant la dégénérescence n'est pas totale chez certaines souris. Ces souris montrent un comportement narcoleptique similaire aux souris Orex-KO. Contrairement à ces dernières, les neurones sont tués provoquant la perte d'Orex mais également des neuropeptides glutamate, dynorphine, et neurotensine co-exprimés dans ces neurones. En ce sens, elles sont proches du modèle humain, mais moins adaptées pour l'étude de l'implication spécifique du neuropeptide Orex dans le phénotype observé. En outre, il n'est pas exclu que l'apoptose progressive des cellules induise des mécanismes de compensation.

b) Les souris double KO des récepteurs à orexine

L'une des stratégies adoptées pour stopper la transmission orexinergique a été de muter les gènes codant pour les deux récepteurs OXR1 et OXR2. Ainsi les souris doublement mutées OXR1-KO/OXR2-KO ont un phénotype narcoleptique similaire à la souris Orex-KO (Kisanuki et al., 2001).

c) Les souris orexin-DTA

La souris *orexin-tTA;TetO DTA*, développée en 2014 par A Yamanaka, permet l'ablation rapide et conditionnée des neurones à Orex (Tabuchi et al., 2014). Dans ce modèle génétique de souris, l'administration de doxycycline (Dox) via l'alimentation de l'animal permet la survie des neurones à Orex, en revanche l'arrêt de l'apport de Dox engendre l'expression d'un neurotoxique, la toxine diphtérique A (DTA), spécifiquement dans ces neurones. Ce modèle de souris est donc très intéressant puisque la mort neuronale peut être provoquée de façon postnatale de façon similaire à la narcolepsie humaine. En seulement 15 jours d'arrêt de la Dox, 95% des neurones sont tués et les cataplexies commencent à apparaître. Le phénotype pathologique obtenu s'aggrave graduellement et permet l'analyse temporelle de la mise en place des différents symptômes. Lors de la dernière période d'enregistrement, 13 semaines après arrêt de la Dox, les souris ont un éveil très fragmenté et des épisodes de cataplexies en grande quantité. Ce modèle de souris nécessite d'avoir un contrôle total et permanent sur l'alimentation des lignées puisque les souris doivent recevoir une dose de Dox quotidienne pour empêcher la mort neuronale.

d) Autres modèles n'altérant que partiellement la transmission orexinergiques

La souris mutée pour l'OXR1 n'a pas d'épisodes de cataplexie et montre une fragmentation du sommeil modérée par rapport aux souris Orex-KO (Kisanuki et al., 2001; Willie et al., 2001).

La souris mutée pour l'OXR2 a un phénotype narcoleptique mais présente une moins grande sévérité des symptômes que la souris Orex-KO (Willie et al., 2003). Comparé à cette dernière, ses cataplexies sont moins fréquentes voire inexistantes chez certains animaux. La souris OXR2-KO présente également une fragmentation des états de vigilance avec une incapacité à maintenir des longues périodes d'éveil et de SL de façon similaire aux souris Orex-KO. De plus, les épisodes d'attaques de sommeil affectent les deux lignées dans les mêmes proportions. Ces données suggèrent que l'OXR2 est fortement impliqué dans le phénotype narcoleptique observé.

PARTIE III : LE SOMMEIL PARADOXAL

En 1953, Aserinsky et Kleitman décrivent au cours du sommeil chez l'homme, un état caractérisé par une désynchronisation corticale accompagnée d'une augmentation de l'activité respiratoire et cardiaque ainsi que des mouvements oculaires rapides. Ils nomment cet état « REM Sleep », pour Rapid Eye Movement Sleep = sommeil aux mouvements rapides des yeux (Jouvet et al., 1959)(Aserinski & Kleitman 1953). Quelques années plus tard, le Pr Michel Jouvet, neurobiologiste lyonnais décrit chez le chat un état de sommeil bien particulier, caractérisé par la présence paradoxale d'une atonie posturale généralisée empêchant l'animal de bouger associée à une activité corticale soutenue similaire à celle de l'état d'éveil qu'il nomme « sommeil paradoxal» (Jouvet et al., 1959). Ce même état est ainsi dénommé REM sleep ou SP dans la littérature.

Cet état du sommeil a longtemps fasciné les chercheurs par sa singularité physiologique. Il a très tôt été décrit comme la phase du sommeil au cours de laquelle prenait place l'activité onirique (Dement and Kleitman, 1957). En effet 80% des souvenirs de rêves sont rapportés après des réveils au cours d'une phase de SP (contre 7% suite à des réveils après SL). On sait que le SP est nécessaire à la survie car une trop longue privation (15-20 jours) chez l'animal peut entraîner sa mort (Rechtschaffen et al., 1989). C'est un état stable qui fait suite à du SL profond (sauf conditions pathologiques) non modulé par l'état émotionnel mais qui pourrait jouer un rôle clef dans la mémoire émotionnelle. Il serait impliqué dans des fonctions aussi diverses que la maturation cérébrale, la neurogénèse ou la consolidation mnésique (Hobson and Pace-Schott, 2002; Guzman-Marín et al., 2008; Boyce et al., 2017).

Dans ce chapitre nous détaillerons les structures connues pour être impliquées dans la genèse et le maintien du SP, et notamment dans l'atonie musculaire spécifique de cet état. Pour faciliter la compréhension, elles seront illustrées sur une coupe schématique de cerveau (Fig.III-1). Enfin, nous décrirons une pathologie due au défaut d'atonie musculaire pendant le SP : le TCSP (ou RBD).

I. Neurobiologie du SP

L'étude des structures neuronales impliquées dans le SP débute véritablement en 1959, lors d'une étude menée par le Pr M Jouvet sur le chat (Jouvet et al., 1959). Il réalise des transections étagées du cerveau, et rapporte chez le chat dit « pontique » (ayant subi une transection cérébrale ponto-mésencéphalique et dont la partie antérieure du cerveau a été retirée) la présence d'un état considéré comme similaire au SP, caractérisé par une atonie musculaire et de mouvements oculaires alternant avec un état d'éveil. Ces travaux ont alors établi que le tronc cérébral contient les noyaux nécessaires et suffisants à la genèse et au maintien du SP.

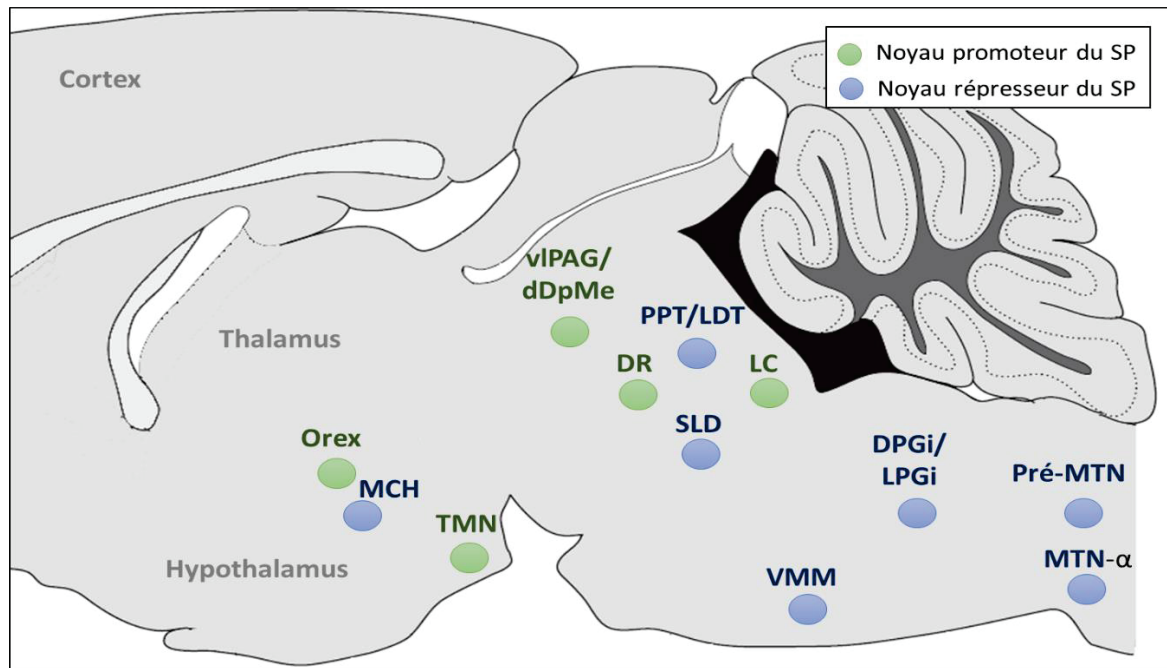


Figure III.1 : Représentation schématique des différentes structures impliquées dans la promotion ou l'inhibition du SP sur une coupe sagittale d'un cerveau de rongeur. Orex : neurones à Orex de l'hypothalamus latéral ; MCH : neurones à hormone de mélanocortine ; TMN : noyau du tubéromammillaire ; vIPAG : partie ventro latérale de la substance grise pariaqueductale ; dDpMe : noyau réticulé mésencéphalique profond ; DR : noyau du raphé dorsal ; SLD : noyau sublatérodorsal ; PPT : tegmentum pédonculo-pontin ; LDT : noyau tegmental latérodorsal ; LC : locus coeruleus ; VMM : medulla ventromédiale (incluant le GiA/GiV/RMg) ; DPGi : noyau paragigantocellulaire dorsal ; LPGi : noyau paragigantocellulaire latéral ; MTN- α : motoneurones spinaux ; pré-MTN : pré-motoneurones spinaux.

1. Le sublatérodorsal (SLD)

Dans les années 60-70, des études pionnières de lésions électrolytiques puis chimiques ont identifiées une région du pont rostro-dorsal cruciale dans la mise en place du SP chez le chat (Jouvet and Michel, 1960; Mouret and Delorme, 1967; Sakai et al., 1979). Ce groupe de neurones pontiques, localisé ventro-médialement au locus coeruleus (LC) est nommé péri-locus-coeruleus alpha (péri-LC α) chez le chat (Sakai et al., 1979, 2001). La région pontique homologue a été identifiée chez le rat et la souris et comprend une petite région du tegmentum pontique, situé ventralement au tegmentum laterodorsal (LDT) et rostro-médialement au LC. Cette région est appelée noyau du subcoeruleus (subLC) (Pollock and Mistlberger, 2003; Brown et al., 2006) ou sublaterodorsal (SLD) (Boissard et al., 2002; Lu et al., 2006; Clement et al., 2011) selon l'atlas de référence utilisé. Pour plus de clarté, nous nommerons cette structure « SLD » dans la suite de mon exposé.

a) Les lésions électrolytiques du SLD et LDT/PPT

L'identification de ce groupe de neurones a d'abord été rendue possible par de nombreuses études lésionnelles. Dans un premier temps, des lésions électrolytiques du SLD furent effectuées. Chez le chat, ces lésions ont engendré une perte de l'atonie musculaire du SP ou bien une diminution

des quantités de SP lorsque celles-ci englobaient la région adjacente comprenant le LDT et le noyau du tegmentum pédonculo-pontin (PPT) (Sastre and Jouvét, 1979; Jones, 1991). L'équipe du Pr. M. Jouvét a également observé chez le rat que la lésion électrolytique recouvrant une partie importante du tegmentum pontique supprimait totalement le SP sans affecter le SL. Des lésions restreintes au SLD engendraient quant à elles une augmentation du SL et une diminution des quantités de SP pendant les deux premiers jours suivant la lésion (Roussel et al., 1976b, 1976a). Toutefois, les lésions électrolytiques induisent la mort des neurones présents dans le site de lésions mais aussi des fibres de passage.

b) Lésions et stimulations chimiques du SLD et LDT/PPT

Trente ans plus tard l'équipe de Clifford Saper réalisa chez le rat des injections d'acide iboténique, un neurotoxique provoquant la mort neuronale par excitotoxicité en préservant les fibres de passage (Lu et al., 2006). Ainsi, la lésion du SLD/LDT a engendré des épisodes de SP très raccourcis ainsi qu'une diminution des quantités de SP de 40%. D'après les auteurs, les lésions restreintes au SLD ont induit une perte de l'atonie musculaire dans presque tous les épisodes de SP (Lu et al., 2006). Par ailleurs, la stimulation des neurones du SLD a également été réalisée sur les différents modèles animaux. La stimulation pharmacologique des neurones du SLD du chat, par injection d'un agoniste cholinergique, induit un état similaire au SP (Vannimercier et al., 1989). Chez le rat, la stimulation électrique du SLD engendre une perte bilatérale du tonus postural (Hajnik et al., 2000). De plus, l'injection locale par microiontophorèse d'acide kainique, un agoniste glutamatergique, provoque une hausse de la fréquence des potentiels d'actions de neurones SP-on ainsi que la mise en place d'un état similaire au SP, dit SP-like (Boissard et al., 2002). L'état observé se caractérise par une atonie musculaire, une activité cérébrale dominée par des ondes thêtas de faible amplitude, mais à la différence du SP, sans mouvements oculaires ni érections pénienues (Boissard et al., 2002).

Ensemble, ces données confèrent au SLD une place majeure dans le contrôle de l'atonie musculaire du SP et une implication de la région étendue au LDT dans la régulation des quantités de SP.

c) Neuroanatomie fonctionnelle (c-Fos) du SLD

Le marqueur d'activité neuronal c-Fos a révélé la présence et la localisation précise de neurones actifs (Fos+) pendant une hypersomnie de SP consécutive à une privation spécifique de SP chez le rat et la souris (Verret et al., 2006; Sapin et al., 2009; Clement et al., 2011). Ces neurones sont localisés dans le SLD et la partie ventrale du LDT (Fig.III-2). La majorité des neurones du SLD actifs pendant le SP expriment également le transporteur vésiculaire du glutamate VGlut2 (84% de neurones Fos+/VGlut2+) (Clement et al., 2011). Ces résultats suggèrent une place

importante des neurones glutamatergiques du SLD dans la régulation du SP. Les neurones GABAergiques sont quant à eux peu nombreux dans le SLD, et n'expriment pas le c-Fos après une hypersomnie de SP chez le rat (Maloney et al., 2000; Sapin et al., 2009). De surcroît, l'élimination locale et sélective de la neurotransmission GABAergique dans le SLD - obtenue par une méthode de type Cre-lox chez un modèle transgénique de souris - n'affecte pas le cycle veille-sommeil (Krenzer et al., 2011).

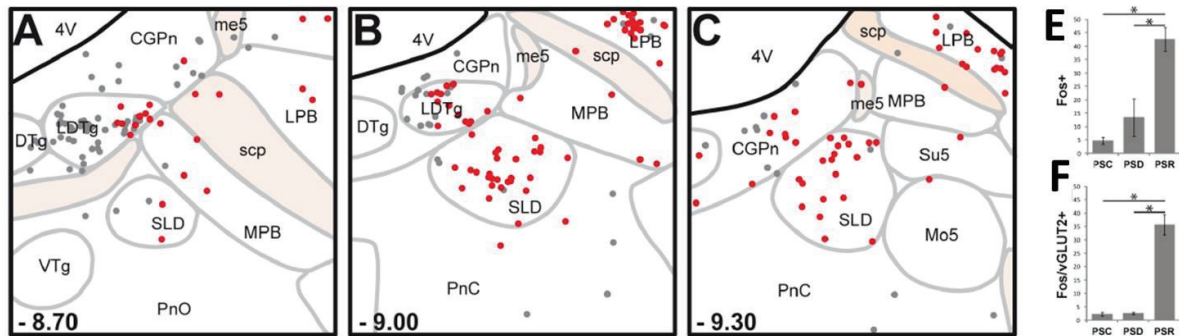


Figure III-2 : Les neurones du SLD qui expriment le c-Fos après une hypersomnie de SP sont essentiellement glutamatergiques A-C : Distribution schématique des neurones Fos+ (gris) et Fos-vGlut2 (rouge) sur des coupes frontales dans la région du SLD d'un rat représentatif ayant fait un rebond de SP suite à une privation spécifique de SP. La distance par rapport au bregma est indiquée en bas à gauche sur chaque plan de coupe. E-F Le nombre de neurones Fos+ et Fos/vGlut2+ dans le SLD dans des conditions contrôles (PSC : conditions basales), de privation spécifique de SP (PSD) ou d'hypersomnie de SP (PSR). 4V : 4^{ème} ventricule; CGPn : central gris du pont; DTg : noyau du tegmentum dorsale; LDTg : noyau du tegmentum latérodorsal; LPB : noyau parabrachial latéral; me5 : tractus trigéminal mésencéphalique; Mo5 : noyau trigéminal moteur; MPB : noyau parabrachial médial; PnC : partie caudale du noyau pontique réticulé; PnO : partie orale du noyau pontique réticulé; scp : pédoncule supérieur cérébelleux; SLD : noyau sublatérodorsal; su5, noyau du supratrigeminal; VTg : noyau du tegmentum ventral (D'après Clement et al, 2011)

d) Electrophysiologie du SLD

Les enregistrements unitaires réalisés chez le chat et le rongeur confirment la présence de neurones spécifiquement actifs pendant le SP (SP-on) dans la région du SLD (Sakai and Koyama, 1996; Boissard et al., 2002; Sakai, 2015) (Fig.III-3). Ces neurones, augmentent leur taux de décharge par anticipation à l'arrivée d'un épisode de SP, déchargent de façon tonique pendant tout l'épisode et redeviennent silencieux à la fin de l'épisode de SP. Enfin, une étude a identifié par immunohistochimie, la nature neurochimique des neurones du SLD enregistrés en juxtacellulaire chez le rat à tête restreinte (Boucetta et al., 2014). Cette étude a confirmé la présence dans le SLD d'une grande majorité de neurones glutamatergiques SP-on ou Eveil/SP-on (Boucetta et al., 2014). Dans cette même étude, les auteurs ont également enregistré dans cette région une minorité de neurones GABAergiques SP-on mais aucun neurone cholinergique n'est SP-on. Ainsi, ces neurones glutamatergiques du SLD sont actifs pendant le SP, anticipent la mise en place du SP et s'arrêtent avant la fin de l'épisode. Ils semblent donc être responsables du déclenchement et du maintien du SP.

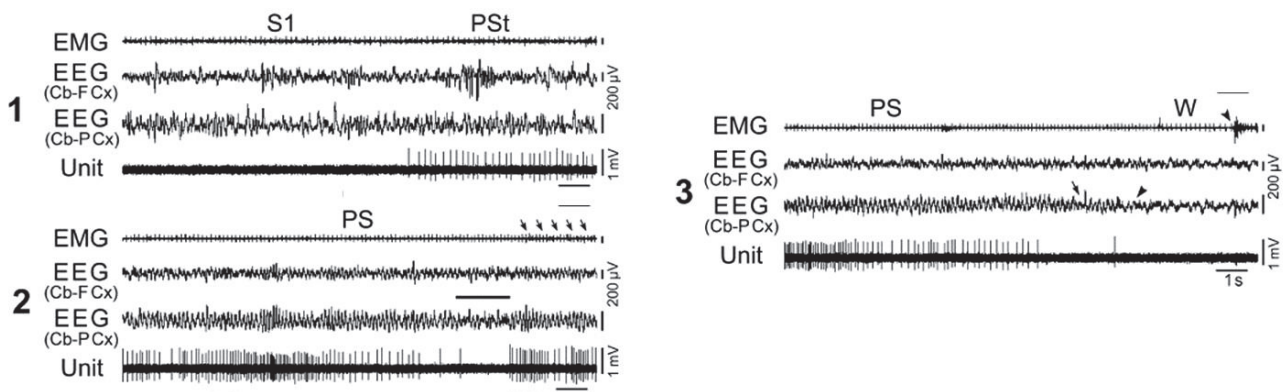


Figure III-3 : Activité d'un neurone SP-on dans le SLD obtenu par enregistrement unitaire pendant les différents états de vigilance chez la souris. Le neurone commence à décharger pendant le sommeil de transition (PSt) et de façon tonique tout au long du SP et s'arrête avant la fin de l'épisode (1-3). **2**: les flèches indiquent des secousses musculaires sur l'EMG, la grande barre noire horizontale indique un arrêt de l'activité theta corrélié à une diminution des décharges du neurone enregistré. Cela pourrait suggérer un rôle de ce neurone dans l'activation corticale **3**: La flèche indique la fin du rythme theta, la tête de flèche au dessus de l'EEG indique la fin du SP et celle au dessus de l'EMG la reprise de l'activité musculaire; S : sommeil lent; PS: sommeil paradoxal; W: éveil (d'après Sakai et al, 2015).

e) Etudes fonctionnelles des neurones glutamatergiques du SLD

Afin de déterminer le rôle précis joué par les neurones glutamatergiques du SLD dans la mise en place du SP, une première étude a invalidé l'allèle codant pour le transporteur vésiculaire du glutamate vGlut2 de façon locale dans le SLD grâce à la méthode dite Cre-lox (Krenzer et al., 2011). Ainsi, la perte de signal glutamatergique dans le SLD/LDT induit une diminution des quantités de SP ainsi qu'une perte de l'atonie musculaire au cours du SP résiduel. Celle-ci se manifeste sur la vidéo par la survenue de mouvements simples (mouvements de tout le corps, secousses, sauts) ou complexes (locomotion) et par des événements musculaire phasiques sur l'EMG. Les auteurs comparent ces mouvements à ceux observés chez le rat lésé dans l'étude de Lu et al 2006. Toutefois, aucune de ces deux études n'a quantifié objectivement les mouvements et/ou événements phasiques observés. Enfin, une récente étude menée au sein de notre laboratoire a réalisé une inactivation spécifique de la voie glutamatergique du SLD chez le rat par la technique d'ARN interférent dite shRNA (*short-hairpin RNA*, en français : brin d'ARN en épingle à cheveux) (Valencia-Garcia et al., 2017). En effet, l'injection du shRNA-vGlut2, un virus adéno-associé (AAV) contenant une séquence complémentaire de l'ARN de vGlut2, a été restreinte au SLD et à une partie du LDT ventrale. Les rats shRNA-vGlut2 présentent une diminution de 30% des quantités de SP. De plus, la perte de la neurotransmission glutamatergique dans cette structure engendre chez le rat des épisodes de SP sans atonie musculaire. La perte d'atonie musculaire a été objectivée par la quantification d'un tonus musculaire élevé sur l'EMG nuel et l'observation d'évènements EMG phasiques (Fig.III-4). L'analyse des enregistrements vidéo a également objectivé une augmentation significative des mouvements de l'animal (pattes avant/arrière, corps, etc.) pendant le SP (Fig III-4). Ces résultats confirment que les neurones glutamatergiques du SLD sont responsables de

l'atonie musculaire spécifique du SP. Cependant la faible perte de SP indique que ces neurones glutamatergiques du SLD ne sont pas responsables du déclenchement et du maintien du SP.

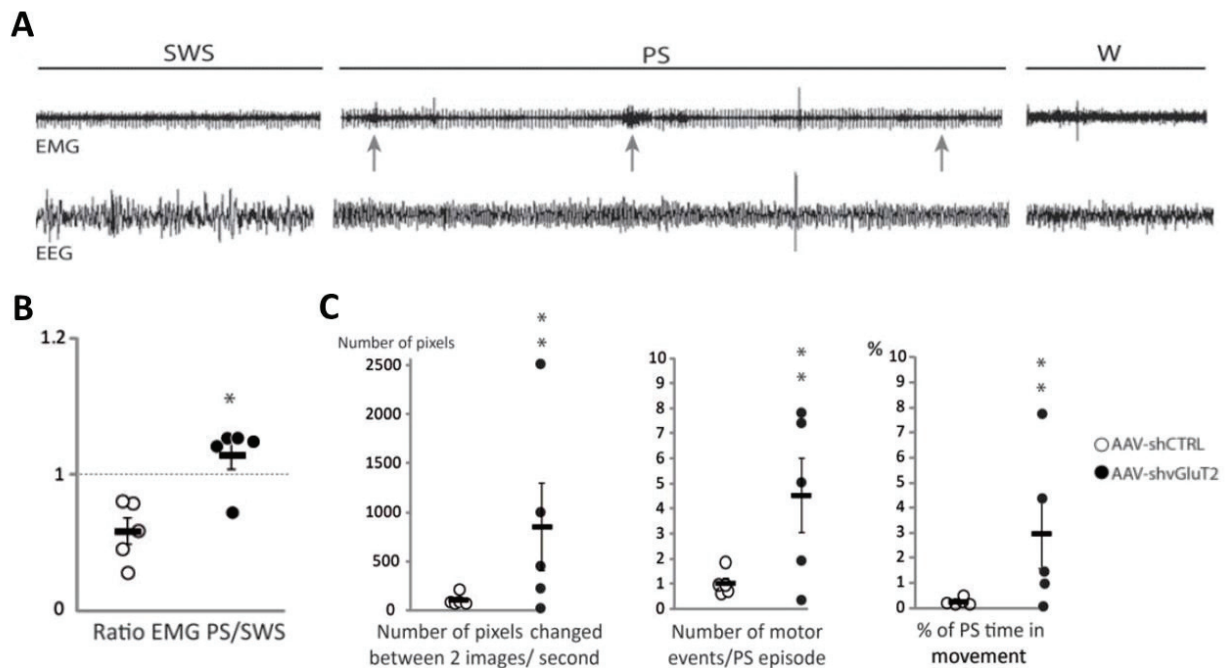


Figure III.4 : L'inactivation génétique des neurones glutamatergiques du SLD par la méthode d'ARN interférent shRNA a engendré une perte de l'atonie du SP chez le rat. **A** : les tracés EEG/EMG représentatifs d'un rat ayant subi une inactivation de ces neurones (AAV-shvGlu2) montrent la présence d'événements musculaires phasiques sur l'EMG, indiqués par les flèches. **B** : le ratio EMG PS/SWS rend compte de la diminution du tonus musculaire du SL au SP chez les animaux contrôles (AAV-shCTRL) et d'une augmentation du tonus chez les AAV-shvGlu2. **C** : l'étude de l'actimétrie à partir des enregistrements vidéo montre des mouvements plus importants au cours du SP, un nombre de mouvements par épisode de SP et une proportion du temps passé à bouger pendant l'épisode de SP augmentés chez les animaux AAV-shvGlu2 (d'après Valencia-Garcia et al, 2017)

La perte d'atonie observée dans les modèles animaux suite à l'inactivation de la transmission glutamatergique du SLD est assez similaire à celle observée dans une pathologie chez l'homme et nommée « trouble du comportement en SP » (TCSP ou RBD). En accord avec les observations faites chez l'animal, les rapports cliniques ont révélé une forte corrélation entre le développement de cette pathologie et une dégénérescence neuronale dans le pont dorsal chez l'humain. Par exemple, un cas de RBD a été rapporté à la suite d'une lésion causée par une encéphalite et restreinte au tegmentum pontique dorsal (Mathis et al., 2007). Un patient ayant eu un accident vasculaire cérébral unilatéralement au niveau de cette même région a également développé du RBD (Xi and Luning, 2009). Ces données confirment l'importance de cette structure dans l'atonie musculaire pendant le SP.

f) Mode d'action du SLD

Il a été proposé que l'activation des neurones glutamatergiques du SLD engendre l'atonie musculaire du SP via des relais inhibiteurs localisés dans la medulla ventromedial (VMM). Suite à l'injection d'un traçeur antérograde, la leucoagglutinine du Phaseolus (PHAL), un grand nombre de terminaisons axonales sont mis en évidence dans la partie ventrale de la formation réticulée bulbaire (Boissard et al., 2002). De plus, l'injection du traceur rétrograde de la sous-unité b de la toxine cholérique (CTb) dans le noyau réticulaire gigantocellulaire ventral (GiV) de la VMM a montré que la majeure partie des neurones SP-on du SLD (exprimants le c-Fos après hypersomnie de SP) envoient des projections vers le GiV (Valencia-Garcia et al., 2017). Le SLD pourrait aussi directement activer les pré-motoneurones inhibiteurs localisés dans la couche VIII de la moelle épinière (détaillé p48-49). En plus de ses projections descendantes responsables de l'atonie musculaire, le SLD envoie des projections ascendantes notamment dans le noyau centromédian intralaminaire du thalamus (Boissard et al., 2002). Toutefois, l'injection de traceur rétrograde Fluorogold (FG) dans le thalamus intralaminaire centro-médial et dorso-ventral couplée à l'immunohistochimie de c-Fos chez le rat, indique que ce ne sont pas les neurones Fos+ après hypersomnie de SP qui projettent au thalamus (Valencia-Garcia et al., 2017). Il reste possible que le site d'injection du traceur FG ne contienne pas le site de projection ascendant des neurones du SLD. Cependant les études d'inactivation fonctionnelle et de traçage remettent en cause le rôle des neurones du SLD dans l'activation corticale.

Le SLD est innervé par l'aire motrice primaire du cortex frontal, l'amygdale centrale (CeA), et l'hypothalamus postérieur (Boissard et al., 2002). Des études ont montré que pendant le SL et l'éveil, le SLD serait inhibé de façon tonique par une voie GABAergique (Boissard et al., 2002; Pollock and Mistlberger, 2003; Sanford et al., 2003). La levée d'inhibition par injection locale dans le SLD d'un antagoniste GABAergique, la bicuculline, induit un état de SP-like chez le rat (Boissard et al., 2002). L'inhibition GABAergique du SLD pourrait provenir de la substance grise périaqueducatale ventro-latérale (vlPAG) et sa région adjacente : la partie dorsale du noyau réticulé mésencéphalique profond (dDpMe). En effet, il a été montré que des neurones GABAergiques de ces régions projettent directement sur le SLD et qu'un grand nombre de ces neurones sont actifs Fos+ pendant la privation de SP et non pendant le rebond de SP (Boissard et al., 2003; Sapin et al., 2009). Le rôle de la vlPAG/dDpMe dans la suppression du SP sera détaillé dans un prochain chapitre.

2. Les neurones cholinergiques du tegmentum ponto-mésencéphalique

D'anciennes études pharmacologiques avaient suggéré un rôle de l'acétylcholine (ACh) dans la régulation du SP. En effet, l'injection de drogues cholinergiques dans le tegmentum

mésopontique dorsal chez le chat induit un état très similaire au SP (Amatruda et al., 1975; Baghdoyan et al., 1987). D'autres études non spécifiques de la voie cholinergique ont identifié un rôle potentiel de la structure LDT/PPT dans la mise en place du SP. Par exemple, la stimulation électrique du LDT augmente les quantités de SP chez le chat (Thakkar et al., 1996). L'injection de glutamate dans le PPT chez le rat libre de ses mouvements augmente les quantités de SP de façon dose-dépendante (Datta et al., 2001). Par ailleurs, l'injection d'un antagoniste des récepteurs de type GABA_A (picROTOXINE) dans le PPT entraîne une diminution des entrées en SP (Pal and Mallick, 2004). A l'inverse, l'inhibition du PPT par l'injection locale d'un agoniste GABA_A (muscimol) augmente les quantités de SP et le nombre d'épisodes (Pal and Mallick, 2009). Les études de lésions chimiques du LDT/PPT chez le chat et le rat n'ont en revanche montré aucune perturbation notable du SP (Webster and Jones, 1988; Lu et al., 2006). Ces résultats contradictoires pourraient s'expliquer par la grande hétérogénéité neurochimique de cette région pontique et la non-spécificité cellulaire de ces expérimentations à un type cellulaire.

L'étude du marqueur d'activité c-Fos après induction d'une hypersomnie de SP a montré des résultats contradictoires chez le rat. L'étude de Maloney a décrit que les neurones cholinergiques de la région LDT/PPT étaient significativement plus actifs (doublement marqués Fos+/ ChAT+ enzyme de synthèse de l'ACh) après un rebond de SP qu'après une privation de SP, mais pas par rapport à la condition contrôle (Maloney et al., 1999). Plus récemment, une étude utilisant un protocole expérimental similaire a évalué que les neurones cholinergiques ne représentaient que 3-5% des neurones actifs de cette même région après hypersomnie de SP (Verret et al., 2005). En accord avec ces données, aucune étude d'électrophysiologie couplée à une identification neurochimique n'a pu identifier la présence de neurones ACh strictement SP-on dans le LDT/PPT (Kohyama et al., 1998; Boucetta et al., 2014). Les neurones cholinergiques enregistrés dans le LDT sont uniquement de type Eveil/SP-on (Boucetta et al., 2014). De part leurs projections ascendantes, ils pourraient jouer un rôle dans l'activation corticale pendant le SP et l'éveil. Les neurones ACh Eveil/SP-on ont néanmoins une activité maximale pendant le SP, et commencent à augmenter leur taux de décharge avant le début de l'épisode, suggérant un possible rôle dans la transition SL- SP (Boucetta et al., 2014).

Conformément à cette hypothèse, la photostimulation des neurones ACh du LDT/PPT pendant le SL augmente la probabilité d'entrée en SP (Van Dort et al., 2015). Le rôle de ces neurones dans les transitions SL-SP pourrait notamment être médié via ses projections sur le noyau du SLD. En effet, il a été montré que l'ACh favorise l'activation des neurones du SLD projetant à la moelle épinière en facilitant la libération de glutamate et en augmentant l'excitation postsynaptiques des neurones du SLD (Weng et al., 2014). De plus, le blocage de la voie ACh au niveau du SLD ne change pas les quantités de SP observées mais entraîne une latence augmentée de la transition SL-SP et des tentatives échouées de transitions vers le SP chez le rat (Grace et al., 2014).

L'ensemble de ces résultats confère aux neurones ACh du LDT/PPT un rôle dans la transition du SL au SP en plus de celui d'activation corticale au cours de l'éveil et du SP. Toutefois, ils ne semblent pas avoir l'importance initialement attribuée pour la genèse du SP.

3. La partie ventrolatérale de la substance grise périacqueductale (vlPAG)

La substance grise périacqueductale (PAG) est constituée de trois colonnes qui s'étendent rostro-caudalement autour du 4^{ème} ventricule et de l'aqueduc de Sylvius. Cette structure, organisée longitudinalement, est subdivisée en régions impliquées dans les réponses émotionnelles actives et passives. La PAG dorsolatérale et latérale est recrutée lors d'une menace ou d'un stress (réponse active), et permet le comportement de fuite (hypertension, vasodilatation dans les membres, etc.). La vlPAG est impliquée dans les réponses passives, son activation entraînant l'immobilité, l'hypoactivité et un état de tranquillité (Keay and Bandler, 2001).

La lésion électrolytique de la vlPAG chez le chat est suivie d'une augmentation du SP pendant 4-5 jours, et a suggéré un rôle de cette structure dans la régulation des états de vigilance (Petitjean et al., 1975). Plus récemment, la lésion à l'acide iboténique de la vlPAG ou de sa région adjacente, le dDpMe, double les quantités de SP et provoque l'apparition d'épisodes d'atonie musculaire chez le rat (Lu et al., 2006). L'inhibition pharmacologique de la vlPAG/dDpMe par injection locale d'un agoniste GABA_A, le muscimol, induit une augmentation importante des quantités de SP chez le chat et le rat (Sastre et al., 1996; Sapin et al., 2009).

La vlPAG contient un grand nombre de neurones Fos+ chez des rats privés de SP, donc actifs pendant l'éveil et le SL, et dont la plupart sont GABAergiques (Verret et al., 2005; Sapin et al., 2009) (Fig.III-5). Une étude menée au laboratoire, couplant le traçage rétrograde par la CTb ainsi que l'immunochimie de l'enzyme de synthèse du GABA (la glutamate décarboxylase, GAD) a révélé que la vlPAG est à l'origine de la majorité des projections GABAergiques vers le SLD (Boissard et al., 2003). La photoactivation des neurones GABAergiques de la vlPAG diminue la probabilité d'entrée en SP, tandis que l'activation et l'inhibition par chemogénétique de ces mêmes neurones diminue et augmente respectivement les quantités de SP (Hayashi et al., 2015; Weber et al., 2015). Tout porte à croire que la vlPAG ainsi que le dDpMe jouent un rôle répressif du SP et notamment via l'inhibition des neurones du SLD.

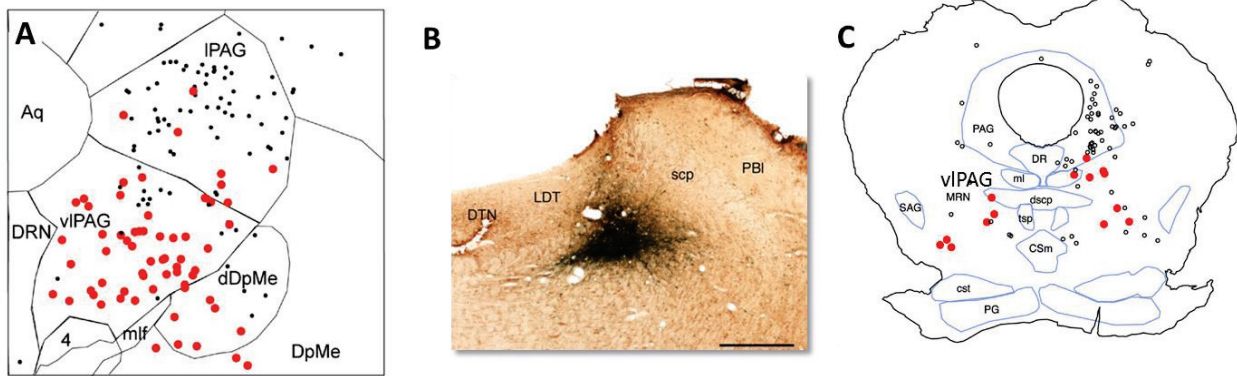


Figure III-5 : A : Les neurones GABAergiques de la vlPAG/dDpMe sont actifs après hypersomnie de SP (immunohistochimie de c-Fos couplée à l'hybridation *in situ* de GAD67, enzyme de synthèse du GABA). Cartographie de la distribution des neurones Fos+ (noir) et Fos+/GAD+ (rouge) dans la région de la vlPAG/dDpMe obtenue chez un rat représentatif Aq : Aqueduc de Sylvius ; DRN : noyau du raphé dorsal (d'après Sapin et al., 2009)

B-C : Les neurones GABAergiques de la vlPAG/dDpMe projettent sur le SLD. L'injection du traceur rétrograde CTb dans le SLD (B) a marqué des neurones GABA (révélé par immunohistochimie de la GAD) dans la vlPAG. Les points rouges sont les neurones GABA projetant au SLD (CTb+/GAD+). scp : pédoncule supérieur cérébelleux ; DTN : noyau du tegmentum dorsal ; LDT : noyau du tegmentum latérodorsal ; PBI : noyau du parabrachial latéral (d'après Boissard et al., 2003)

En conclusion, la mise en place du SP nécessite donc l'interruption de l'activité de la vlPAG/dDpMe : cette structure est dite inhibitrice du SP. Au cours de l'éveil et du SL, les neurones GABAergiques de la vlPAG/dDpMe inhiberaient de façon tonique le SLD afin de le maintenir inactif. Réciproquement, le SLD contient quelques neurones GABAergiques actifs pendant le SP, et qui projettent sur la vlPAG/dDpMe pouvant donc potentiellement les inhiber et permettre la mise en place ou le maintien du SP (Maloney et al., 2000; Lu et al., 2006). Pour corroborer cette hypothèse, l'activation chémo-génétique sélective de neurones issus d'une structure neuroépithéliale embryonnaire comprenant des neurones glutamatergiques localisés dans le SLD et projetant sur la dDpMe, a très largement diminué le nombre et la durée des épisodes de SP (Hayashi et al., 2015). La vlPAG/dDpMe et le SLD GABAergique formeraient ainsi un réseau d'inhibition réciproque permettant une régulation du SP. Cependant, il manque des données électrophysiologiques pour confirmer l'existence d'un tel réseau d'inhibition.

4. Les noyaux paragigantocellulaires du bulbe rachidien

La mise en place et le maintien du SP nécessite l'inhibition des centres de l'éveil que sont les neurones monoaminergiques et orexinergiques. Ce rôle peut être en partie attribué aux noyaux paragigantocellulaire dorsal (DPGi) et latéral (LPGi), situés respectivement dans la partie dorso-médiane et ventro-latérale du bulbe rachidien (Fig.III-1).

Une étude électrophysiologique menée au sein de notre laboratoire a démontré la présence de neurones SP-on dans le DPGi (Goutagny et al., 2008). Ils déchargent de façon tonique et prolongée pendant l'épisode de SP, et leur activité précède l'entrée en SP, suggérant un rôle dans la mise en

place de cet état. Notre équipe a également démontré que 86% des neurones du DPGi actifs (Fos+) après hypersomnie de SP étaient GABAergiques (Sapin et al., 2009). Le DPGi projette fortement sur les neurones noradrénergiques du LC, sérotoninergiques du noyau raphé dorsal (DR) et orexinergiques de l'HL, trois structures clés dans la promotion de l'éveil et l'inhibition du SP (Luppi et al., 1995; Gervasoni et al., 2000; Goutagny et al., 2008). Plus spécifiquement, les neurones SP-on du DPGi projettent sur le LC (Verret et al., 2006). De plus, la stimulation électrique des neurones du DPGi augmente les quantités de SP chez le rat via ses projections sur le LC (Kaur et al., 2001). Les neurones du DPGi innervent également la vIPAG/dDpMe impliquée dans l'inhibition du SLD au cours du SL et de l'éveil (Goutagny et al., 2008). Ainsi, au cours du SP, les neurones du DPGi pourraient inhiber les structures de l'éveil (LC, DR, Orex) ainsi que les structures répresses au SP (vIPAG/dDpMe) afin de permettre la mise place et le maintien du SP.

Le LPGi est une structure complexe et hétérogène, impliquée notamment dans la régulation de la pression sanguine et du système nerveux sympathique (Guyenet et al., 1990; Dampney, 1994) et contenant des neurones glycinergiques, GABAergiques et cholinergiques et noradrénergiques (Rampon et al., 1999; Verret et al., 2005; Sapin et al., 2009). L'immunohistochimie du marqueur d'activité c-Fos révèle un grand nombre de neurones Fos+ au sein du LPGi après hypersomnie de SP (Verret et al., 2005, 2006). Parmi ces neurones actifs, près de 70% expriment la GAD 67 (enzyme de synthèse du neuropeptide GABA) et sont donc GABAergiques (Sapin et al., 2009) et plus de 25% envoient des projections vers le LC (Verret et al., 2005, 2006). Ainsi les neurones GABAergiques du LPGi pourraient participer à l'inhibition du LC au cours du SP. Par ailleurs, le LPGi contient également une population de neurones Fos+ après privation sélective de SP, et donc SP-off, de nature noradrénergique (Leger et al., 2009). Les enregistrements extracellulaires réalisés chez le rat à tête restreinte ont confirmé la présence de neurones SP-on et SP-off dans le LPGi (Sirieix et al., 2012)

Pour finir, une récente étude a montré que la photostimulation des fibres de projections des neurones GABAergiques du LPGi sur la vIPAG, prolongeait le SP ou augmentait la probabilité d'entrée en SP (Weber et al., 2015). L'inhibition chémo-génétique des neurones GABAergiques du LPGi a quant à elle engendré une diminution des quantités de SP (Weber et al., 2015). Cette étude renforce l'hypothèse d'un rôle inhibiteur ascendant du LPGi vers les structures inhibitrices du SP.

5. Contrôle médullaire et spinal de l'atonie musculaire du SP

a) Les motoneurons de la moelle épinière

Les motoneurons alpha (MTN- α) situés dans la corne ventrale de la substance grise de la moelle épinière, constituent le dernier relais entre le système nerveux central et la musculature somatique. Chaque MTN innerve plusieurs fibres musculaires formant ainsi une unité motrice. Lorsque le MTN est stimulé toute l'unité motrice se contracte simultanément. Au cours de l'éveil, les MTN- α sont stimulés par les centres nerveux supérieurs tels que le cortex moteur, permettant

ainsi le maintien de la posture et la réalisation de mouvements. Pendant le SL, les MTN- α ne reçoivent pas de stimulations particulières des aires motrices, mais déchargent de façon stable afin de maintenir un tonus musculaire. Enfin, au cours du SP les MTN- α arrêtent de décharger, et il s'installe une atonie musculaire entrecoupée de l'activation synchronique de quelques unités motrices responsable des twitches (Morales and Chase, 1978). En plus d'une simple cessation d'activité, les MTN- α sont hyperpolarisés (inhibés) au cours du SP. Ces données ont été mises en évidence par l'équipe du Pr Chase qui a réalisé chez le chat vigile des enregistrements intracellulaires des MTN- α spinaux (au niveau lombaire, innervant les muscles des pattes arrières) et crâniens (au niveau du tronc cérébral, innervant les muscles masticateurs masséters). Ainsi, le SP se caractérise par une hyperpolarisation du potentiel de membrane des MTN- α puissante et soutenue et par des potentiels post-synaptiques inhibiteurs (IPSPs) de grande amplitude (Fig.III-6).

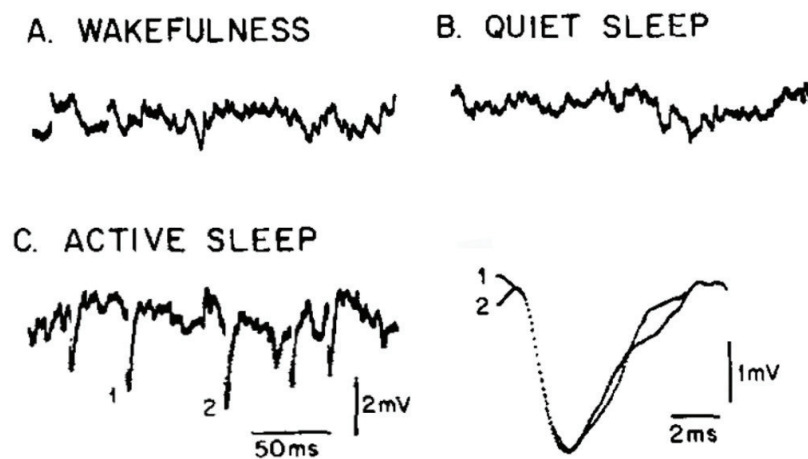


Figure III-6 : Enregistrement intracellulaire d'un motoneurone tibial au cours de l'éveil (A) du sommeil lent (B) et du sommeil paradoxal (C). Durant les 3 états, des IPSPs de petite amplitude sont enregistrés, en revanche des IPSPs de grande amplitude sont enregistrés uniquement pendant le SP. Deux potentiels synaptiques inhibiteurs de grande amplitude représentatifs (1 & 2) ont été agrandis et superposés (d'après Morales et al., 1987)

Chez le chat, des injections locales par microiontophorèse d'antagonistes GABAergiques (picrotoxine et bicuculline) et glycinergiques (strychnine) ont été réalisées à proximité de MTN- α lombaires enregistrés intracellulairement pendant le cycle veille-sommeil chez le chat vigile (Chase et al., 1989; Soja et al., 1991). L'application de strychnine a en partie inversé l'hyperpolarisation du potentiel de membrane caractéristique du SP, ramenant ainsi ce potentiel à la valeur mesurée pendant le SL (Chase et al., 1989; Soja et al., 1991) (Fig.III-7). En revanche, les antagonistes GABAergiques n'ont montré aucun effet sur le potentiel de membrane des MTN- α . Cela suggère que la glycine est en partie responsable de l'hyperpolarisation de ces MTN- α . Par ailleurs, pendant le SP une augmentation de la libération de glycine (Gly) et de GABA a été observée par microdialyse au niveau des MTN- α de la moelle épinière et de l'hypoglosse du chat (Kodama et al., 2003; Taepavarapruk et al., 2008). De plus, l'application simultanée de strychnine, bicuculline

(antagoniste GABA_A) et CGP52432 (antagoniste GABA_B) dans le noyau du trigéminal est nécessaire pour restaurer totalement un tonus musculaire des muscles de la mâchoire pendant le SP (Brooks and Peever, 2012). Enfin, le modèle de souris transgénique muté pour la sous-unité alpha du récepteur glycinergique et présentant une forte altération des transmissions glycinergiques et gabaergiques, montre une abolition de l'atonie musculaire au cours du SP (Brooks and Peever, 2011). L'ensemble de ces études indique que les neurotransmetteurs Gly et GABA sont tous deux impliqués dans l'hyperpolarisation des MTN- α pendant le SP et pourraient agir de façon synergique dans la mise en place de l'atonie du SP.

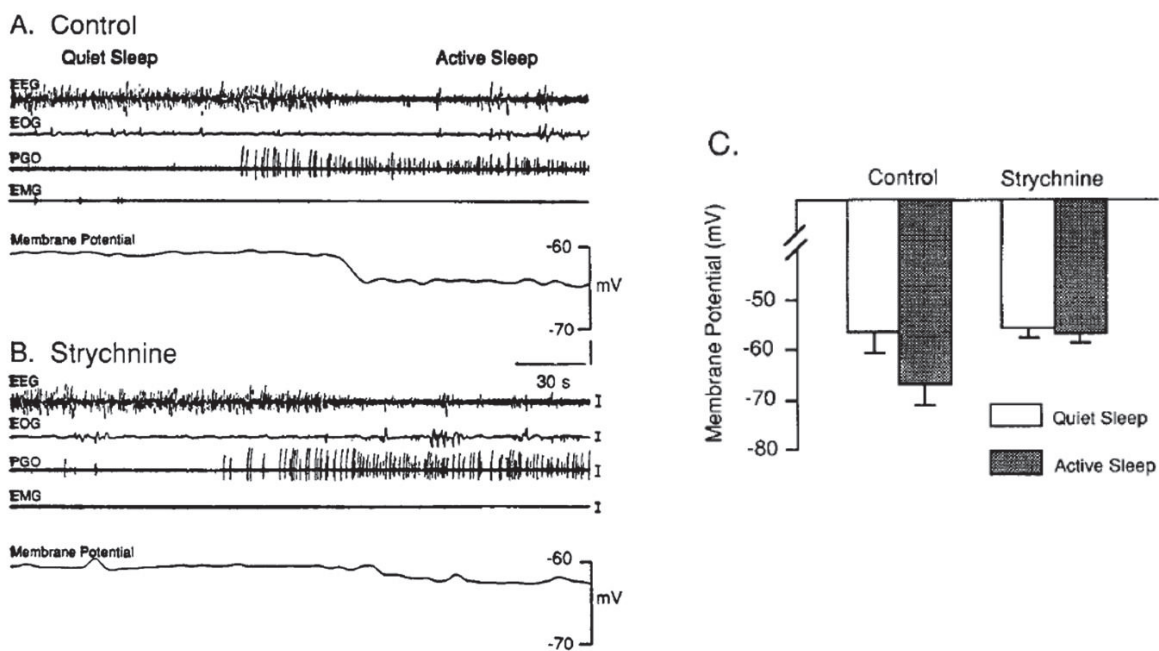


Figure III.7 : Effet de l'application de strychnine (antagoniste glycinergique) sur l'hyperpolarisation membranaire des motoneurons lombaires spécifique du SP. L'hyperpolarisation est abolie par la strychnine (B) par rapport au control (A). Le potentiel de membrane des MTN- α enregistrés présente les mêmes valeurs sous strychnine que pendant le SL (d'après Soja et al, 1991)

En plus de l'inhibition directe par les signaux GABA et Gly, l'inactivation des MTN- α pourrait résulter de l'inactivité des afférences excitatrices en provenance des groupes monoaminergiques. En effet, les neurones sérotoninergiques, noradrénergiques et histaminergiques qui sont SP-off, envoient des projections efférentes sur l'ensemble des pools de MTN- α du tronc cérébral et de la moelle épinière (Dobbins and Feldman, 1994). Au cours de l'éveil, ces neurotransmetteurs ont une action dépolarisante sur les MTN crâniens et spinaux, suggérant un rôle synergique dans l'activation des MTN lors de comportements moteurs motivés. De façon attendue, les niveaux de sérotonine (5-HT) et noradrénaline (NA) au niveau des noyaux moteurs de l'hypoglosse (muscles de la langue) et spinaux sont diminués pendant le SP chez le chat (Lai et al., 2001). Il a également été montré que l'infusion locale de 5HT, NA, histamine (His), leurs agonistes

et antagonistes au niveau des MTN- α de l'hypoglosse, modulait fortement le tonus musculaire du pharynx (Jelev et al., 2001; Fenik et al., 2005; Neuzeret et al., 2009).

La survenue de twitches au cours du SP proviendrait des entrées synaptiques excitatrices sur les MTN- α . En effet, des vagues de dépolarisations, mises en évidence par l'enregistrement des potentiels synaptiques excitateurs (EPSPs) peuvent, en s'additionnant, engendrer sporadiquement la genèse d'un potentiel d'action (PA) outrepassant ainsi l'hyperpolarisation tonique et entraînant l'apparition d'un twitch musculaire (Morales and Chase, 1978). La première étude visant à comprendre les mécanismes sous-jacents de cette dépolarisation a été menée par l'équipe du Pr. Chase sur les MTN- α lombaires enregistrés en intracellulaire chez le chat vigile (Soja et al., 1995). Ainsi, l'injection par iontophorèse d'acide kynurénique, un antagoniste glutamatergique, élimine les EPSPs et les PA générés pendant le SP, suggérant ainsi une implication du glutamate dans l'excitation des MTN- α au cours du SP (Soja et al., 1995). Une étude plus récente a affiné ces premières données en s'intéressant aux MTN du noyau moteur trigéminal chez le rat au cours du cycle veille-sommeil (Burgess et al., 2008a). L'application de glutamate par microdialyse inverse dans le noyau moteur trigéminal augmente le tonus dans les muscles masticateurs pendant l'éveil et le SL mais pas pendant le SP, confirmant l'hyperpolarisation des MTN- α spécifique au cours du SP. De plus, le glutamate a considérablement augmenté le nombre de twitches musculaires, mais pas leur amplitude (Burgess et al., 2008a). Les effets directs d'agonistes des récepteurs glutamatergiques de type NMDA (avec du NMDA) et AMPA (avec AMPA) ont ensuite été évalués. Tous deux ont provoqué une augmentation du tonus musculaire pendant l'éveil et le SL, mais seul l'agoniste AMPA a été capable d'induire un nombre plus important de twitches pendant le SP (sans en modifier l'amplitude). Aussi, l'application combinée des antagonistes NMDA et non-NMDA (acide 2-amino-5-phosphonovalérique, AP-5 ; 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione, CNQX respectivement) par microdialyse inverse, a fortement réduit le tonus musculaire pendant l'éveil, et le nombre et amplitude des twitches pendant le SP. Les auteurs ont pu décrire les twitches comme la résultante d'une importante libération synaptique de glutamate, provoquant l'activation de récepteurs post synaptiques de type non-NMDA. Ainsi, au cours du SP, la voie glutamatergiques sur les MTN- α semble toujours active et engendre quelques dépolarisations se manifestant physiologiquement par la survenue de twitches musculaires.

b) Les noyaux gigantocellulaires du bulbe rachidien

La formation réticulée bulbaire de la medulla ventromédiale (VMM) est constituée du noyau gigantocellulaire alpha (GiA) et ventral (GiV) ainsi que du Raphé Magnus (RMg) chez le rongeur (Fig.III-1). Ces noyaux situés dans la partie ventrale du bulbe rachidien ont une structure homologue chez le chat nommée noyau réticulaire magnocellulaire (Mc).

Tout d'abord, des lésions cytotoxiques du Mc (par injections d'ACh, de glutamate, ou d'un agoniste des récepteurs AMPA, le quisqualate) provoquent l'apparition d'un SP sans atonie musculaire chez le chat (Schenkel and Siegel, 1989; Holmes and Jones, 1994). L'équipe du Pr Chase a procédé à des stimulations électriques dans la formation réticulaire bulbaire chez le chat et a découvert que seules les stimulations du noyau réticulé Mc engendraient des hyperpolarisations des MTN- α lombaires. L'hyperpolarisation induite bloquerait même les EPSPs habituellement induits par stimulation du nerf sciatique (Soja et al., 1987).

L'étude du marqueur neuronal d'activité c-Fos chez le chat après hypersomnie de SP provoquée par la stimulation cholinergique du péri-LC α a révélé un grand nombre de neurones actifs (Fos+) dans le Mc (Morales et al., 1999). De façon similaire l'hypersomnie de SP chez le chat consécutive à une privation sélective de SP a révélé un grand nombre de neurones Fos+ dans la VMM (Sapin et al., 2009). De plus, les enregistrements unitaires chez le chat confirment la présence dans le Mc de neurones SP-on commençant à décharger juste avant les épisodes de SP et restant silencieux au cours de l'éveil et le SL (Sakai et al., 1979; Sastre et al., 1981).

La nature neurochimique de la population neuronale SP-on de la VMM est hétérogène. Une grande partie des neurones Fos+ après hypersomnie de SP chez le rat sont GABAergiques (GiV : $87,8 \pm 3.1$ % ; GiA ; 34.7 ± 1.9 % ; RMg : 83.5 ± 3.0 % des neurones actifs) (Sapin et al., 2009). Chez le rat, un grand nombre de neurones immunoréactifs pour la Gly sont trouvés dans la formation réticulée bulbaire, incluant le GiA, GiV et RMg (Rampon et al., 1996a). De plus, l'induction pendant 90 min d'un état similaire au SP due à l'injection d'antagoniste GABA dans le SLD chez le rat engendre une forte expression de c-Fos dans les neurones glycinergiques du GiV (Boissard et al., 2002) (Fig.III-8). Il semble très probable que les neurones SP-on dans la VMM co-expriment le GABA et la Gly.

Comme mentionné précédemment, l'hyperpolarisation des MTN- α lombaires est médiée par le neuropeptide Gly (Soja et al., 1987). L'hyperpolarisation des MTN- α au cours du SP pourrait ainsi provenir des neurones GABA/Gly de la VMM/Mc. En effet, le Mc constitue une voie de projection majeure vers la moelle épinière, voire directement sur les motoneurones spinaux (MTN- α) (Sakai et al., 1979; Sastre et al., 1981). L'injection chez le rat du traceur retrograde CTb dans les MTN du trijumeau couplée à l'immunohistochimie de la glycine a révélé que les neurones Gly du noyau parvocellulaire (dorsal au GiV, RMg et GiA) projettent directement sur les motoneurones du trijumeau (Rampon et al., 1996b). De plus, il a été montré qu'au moins 50% des axones issus des neurones du RMg et du GiV qui contactent monosynaptiquement les MTN- α lombaires contiennent des vésicules synaptiques GABA et Glycinergiques chez le rat (Holstege and Calkoen, 1990; Holstege and Bongers, 1991).

L'ensemble des études chez le chat et le rat indique que les neurones GABA et Gly exercent un contrôle inhibiteur sur les MTN- α et pourraient être à l'origine de l'inhibition des MTN- α lors l'atonie musculaire du SP.

Nous avons précédemment défini le SLD comme générateur de l'atonie musculaire du SP. Les neurones GABA/Gly de la VMM joueraient ainsi un rôle de relai entre le SLD et les MTN- α dans la mise en place de cette atonie. L'injection du traceur antérograde PHAL dans le SLD a révélé un marquage des boutons synaptiques au contact des neurones Gly du GiV (Boissard et al., 2002). Le traçage de cette voie par injection de l'AAV-GFP dans le SLD a confirmé la présence de projections axonales dans la VMM (Lu et al., 2006). De plus, l'injection du traceur rétrograde CTb dans le GiV a marqué des neurones du SLD spécifiquement actifs après hypersomnie de SP chez le rat (Valencia-Garcia et al., 2017). L'injection d'un AAV-mCherry dans le SLD a montré des fibres du SLD (mCherry) au contact de neurones glycinergiques (hybridation *in situ* de GlyT2, transporteur vésiculaire de la Gly) dans le GiV et le RMg chez le rat (Valencia-Garcia et al., 2017)(Fig.III-8). Ainsi les neurones du GiV constituent une voie de projection des neurones du SLD actifs pendant le SP. Il existe également un lien fonctionnel entre le SLD et ces neurones de la VMM. En effet, la stimulation électrique du péri-LC-alpha est ainsi suivie d'une excitation des neurones SP-on bulbaire (Sastre et al., 1981). Les neurones glutamatergiques du SLD pourraient ainsi être impliqués puisque les niveaux de glutamate dans la VMM augmentent chez les chats qui entrent en SP, et le blocage du signal glutamatergique dans ces neurones entraîne un SP sans atonie (Lai and Siegel, 1988).

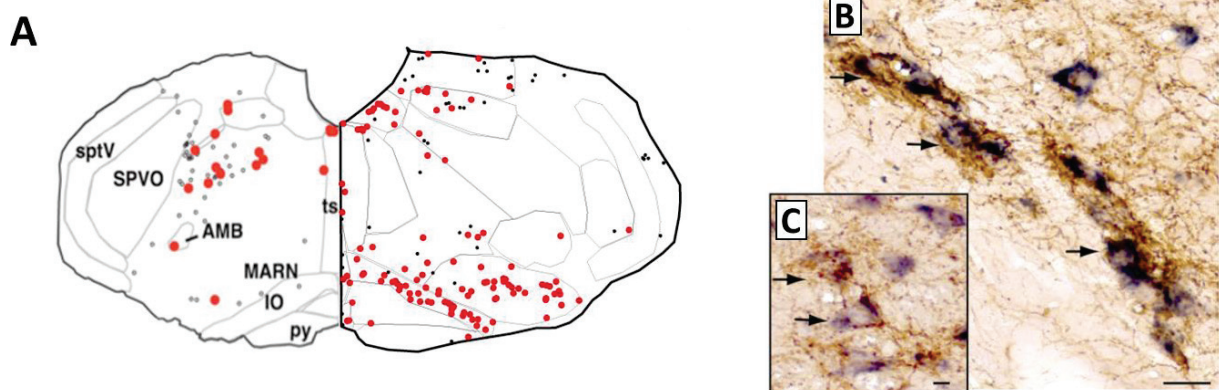


Figure III-8 : A. Cartographie des neurones glycinergiques actifs (Fos+) après une hypersomnie de SP sur une coupe représentative obtenue chez le rat. Les points rouges représentent les neurones doublement marqués (Gly/Fos+) et les points noirs représentent les neurones uniquement actifs après hypersomnie de SP (Fos+) AMB : noyau ambigu; sptV:tractus spinal du nerf trigéminal; SPVO noyau trigéminal spinal oral; py tractus pyramidal; IO : olive inférieur (d'après Boissard et al, 2002)

B-C. Microphotographies montrant les fibres du SLD (marquage marron, immunohistochimie mCherry) au contact des neurones glycinergiques (cytoplasme marqué en bleu, hybridation *in situ* GlyT2) dans le noyau réticulé gigantocellulaire (B) et le raphé magnus (C). barre d'échelle : 200 μ m (d'après Valencia-Garcia et al., 2017)

Le rôle de la VMM dans l'atonie musculaire reste cependant très discuté, si bien que deux différents modèles sont proposés. Une équipe américaine a d'abord montré qu'une très large lésion de la partie rostrale du bulbe rachidien à l'aide de la toxine orexine-B-saporine, n'induisait pas de

perte d'atonie chez le rat (Lu et al., 2006). Toutefois, cette toxine ne lèse que les neurones possédant le récepteur orexinergique. De plus cette lésion semble très rostrale et ne comprend surement qu'une partie de la VMM, très étendue rostro-caudalement. La même équipe a ensuite procédé à l'interruption locale dans le GiA et le Gi (noyau réticulé gigantocellulaire) de la transmission glutamatergique puis GABAergique par délétion des transporteurs vésiculaires grâce à la méthode Cre-lox (Vetrivelan et al., 2009). L'interruption de la voie glutamatergique a été la seule à engendrer une augmentation de l'amplitude des mouvements phasiques du SP. Ainsi, les auteurs font l'hypothèse que les neurones de la VMM impliqués dans la mise en place de l'atonie musculaire seraient de nature glutamatergique. La même approche expérimentale dans la moelle épinière cervicale 3 et 4 de la couche d'interneurones VII a montré une augmentation de l'activité phasique suite à l'inactivation de la voie GABAergique (Krenzer et al., 2011). Les auteurs proposent l'hypothèse suivante : l'inhibition des MTN- α au cours du SP provient des interneurones inhibiteurs localisés dans la moelle épinière. La VMM contiendrait des neurones excitateurs, relais entre le SLD et les interneurones spinaux.

L'autre hypothèse suggère que l'inhibition des motoneurones est engendrée depuis les neurones glutamatergiques du SLD via un relais sur les pré-motoneurones inhibiteurs GABA/Gly situés dans les noyaux de la VMM (GiA/GiV/RMg) (Luppi et al., 2014). Deux récentes études viennent corroborer cette hypothèse. D'abord, la lésion des neurones GABAergiques du Gi, GiV, GiA par l'injection locale d'un AAV exprimant la DTA a engendré des épisodes de SP avec des secousses musculaires et des mouvements rapportés par l'EMG et la vidéo (Chen et al., 2017). De plus, des travaux en cours de publication réalisés dans notre laboratoire par Dr Valencia-Garcia, montrent que les neurones GABA/Gly de la VMM sont spécifiquement actifs après une hypersomnie de SP, alors que les interneurones de la moelle épinière ne le sont pas. De plus les neurones de la VMM actifs après hypersomnie de SP, envoient des terminaisons axonales en apposition avec les motoneurones de la moelle épinière. Enfin, l'inactivation de la voie GABAergiques de la VMM contrôlant la moelle épinière, par injection locale d'AAV-shRNA-vGAT (vGAT : transporteur vésiculaire du GABA), a engendré une perte majeure d'atonie musculaire au cours du SP. Aux vues de l'ensemble de ces données, il est fort possible que Vetrivelan et al (2009) n'ont pas observé d'altération de l'atonie musculaire pendant le SP par lésion de la voie GABAergique VMM- moelle épinière parce que les effets physiologiques ne sont observables que lorsque toute la région (GiA/GiV/RMg), et notamment la partie la plus caudale (GiV), est touchée.

6. Les neurones MCH/GABA de l'hypothalamus latéral

Les travaux de Michel Jouvet sur le chat pontique ont montré que le pont est suffisant à la genèse et au maintien du SP (Jouvet 1962). Ces travaux ont conduit à grandement négliger pendant

de nombreuses années la contribution potentielle des structures du télencéphale telles que l'hypothalamus postérieur dans la régulation du SP. Pourtant chez le chat pontique, le rebond de SP n'était observé qu'en présence d'un îlot hypothalamique, conférant à cette structure un éventuel rôle de régulation homéostatique du SP (Jouvet, 1988).

Une étude de notre équipe a montré l'existence d'une population de neurones hypothalamiques impliqués dans le SP (Verret et al., 2003). Ces neurones, localisés exclusivement dans la région périfornicale, l'HL, le noyau hypothalamique dorso-médian, l'aire hypothalamique dorsale et la zona inertia, expriment le neuropeptide MCH (Bittencourt et al., 1992). Plus de la moitié des neurones MCH (environ 58%) expriment le marqueur d'activité c-Fos après une hypersomnie de SP, et l'administration intra-cérébro-ventriculaire (ICV) de MCH augmente de près de 200% les quantités de SP (Verret et al., 2003). De plus, une étude menée sur le rat vigile a montré que l'activité électrophysiologique des neurones MCH est maximale au cours du SP et presque inexistante pendant les autres états de vigilance (Hassani et al., 2009). En revanche ils n'anticipent pas l'entrée en SP en condition basale ce qui peut suggérer qu'ils ne sont pas impliqués dans la genèse de cet état mais plus dans son maintien ou sa régulation (Hassani et al., 2009). Plus récemment, il a été rapporté que l'activation spécifique de ces neurones, par optogénétique ou pharmacogénétique, augmente les quantités de SP (Jego et al., 2013; Tsunematsu et al., 2014; Vetrivelan et al., 2016). Un seul groupe a pu observer une augmentation du SL suite à l'activation optogénétique des neurones à MCH (Konadhode et al., 2013). Une étude menée au laboratoire sur la souris MCH Ataxine-3 a rapporté une perturbation du SL due à la perte chronique des neurones MCH (Varin et al., 2016). D'autre part, la photoinhibition ou l'ablation de ces neurones n'induit que des effets mineurs sur le SP, et la souris mutée pour le récepteur MCH a un SP presque normal (Adamantidis et al., 2008; Jego et al., 2013; Tsunematsu et al., 2014; Varin et al., 2016).

L'ensemble de ces données indique que le neuropeptide MCH favorise le SP mais n'est pas essentiel à sa genèse.

La MCH est un neuropeptide inhibiteur capable d'inhiber notamment les neurones du DR (Gao and van den Pol, 2001; Lagos et al., 2009). De plus, les neurones MCH exprimants la GAD 65 et la GAD 67, enzymes de synthèse du neuropeptide GABA (Elias et al., 2001; Harthoorn et al., 2005), co-localisent le transporteur vésiculaire du GABA (vGAT) dans certaines fibres (del Cid-Pellitero and Jones, 2012) et pourraient ainsi co-libérer le GABA. Cependant, la co-libération MCH/GABA n'a pas encore été observée. De façon intéressante, une petite sous-population (moins d'1%) des neurones MCH possède également les ARNm vGlut1 et vGlut2, transporteurs vésiculaires du glutamate (Harthoorn et al., 2005; Del Cid-Pellitero and Jones, 2012) et co-libèrent du glutamate dans le noyau latéral septal (Chee et al., 2015). Ces données rendent compte de l'hétérogénéité de cette population neuronale qui est capable de libérer des neuropeptides activateurs (glutamate) et/ou inhibiteurs (GABA et MCH).

Il a été émis l'hypothèse que les neurones à MCH favorisent le SP via l'inhibition des neurones SP-off inhibiteurs du SP comme les neurones monoaminergiques (Del Cid-Pellitero and Jones, 2012), histaminergiques (Jego et al., 2013) ou GABAergiques de la vIPAG/dDpMe (Sapin et al., 2010; Clement et al., 2012). En accord avec cette hypothèse, après hypersomnie de SP, l'hypothalamus postérieur contient un grand nombre de neurones MCH/Fos+ projetant vers la vIPAG/dDpMe (Clement et al., 2012). Les neurones à MCH pourraient aussi participer à l'inhibition des neurones voisins de l'hypothalamus latéral : les neurones à orexine. Deux études de double immunohistochimie ont mis en évidence des connections synaptiques réciproques entre les neurones à MCH et à Orex (Bayer et al., 2002; Guan et al., 2002). Les enregistrements intra et extracellulaires des neurones Orex chez la souris délétée du récepteur MCH ont suggéré un rôle de la MCH d'inhibition de la transmission orexinergique (Rao et al., 2008). Une récente étude menée sur des tranches de cerveau de souris a montré que la stimulation optogénétique des neurones Orex diminuait l'activité électrique des neurones MCH par voie de signalisation GABAergique (Apergis-Schoute et al., 2015). Ainsi les neurones à MCH (promoteur du sommeil) et Orex (promoteur de l'éveil) formeraient un microcircuit dans l'HL qui faciliterait les transitions entre les signaux d'éveil et de sommeil.

II. Le réseau de régulation du SP

Le modèle de Hobson et McCarley en 1975 attribuait la régulation du SP aux interactions réciproques entre les neurones cholinergiques du PPT/LDT impliqués dans la promotion du SP et les neurones monoaminergiques impliqués dans la suppression du SP (Hobson et al., 1975). Depuis, de nombreuses études ont intégré le SLD comme structure centrale de la régulation SP, renvoyant les neurones cholinergiques et monoaminergiques à un rôle de modulation (Luppi et al., 2014). Les données bibliographiques actuelles ont identifié les neurones glutamatergiques du SLD comme responsable de l'atonie musculaire du SP (Valencia-Garcia et al., 2017). Toutefois, une partie plus rostrale du/au SLD pourrait être impliquée dans la régulation des autres composantes du SP. De plus, la région du SLD étendue au LDT serait impliquée dans la genèse et le maintien du SP.

Selon l'hypothèse actuelle, l'atonie musculaire du SP est donc générée dans les neurones glutamatergiques du SLD. Lors d'un épisode de SP, les neurones glutamatergiques du SLD vont stimuler les pré-motoneurones inhibiteurs GABA/Gly localisés dans la VMM qui vont à leur tour inhiber les motoneurones spinaux et engendrer leur hyperpolarisation. Au cours du SP, des afférences glutamatergiques vont sporadiquement contrecarrer l'inhibition tonique des MTN et provoquer des secousses musculaires. Le réseau neuronal impliqué dans la mise en place de l'atonie musculaire pendant le SP est de mieux en mieux décrite dans la littérature, en revanche on ne connaît

que très peu les voies ascendantes liées à l'activation corticale au cours du SP. L'activation corticale serait en partie générée dans les neurones cholinergiques du LDT/PPT via un relais sur le thalamus.

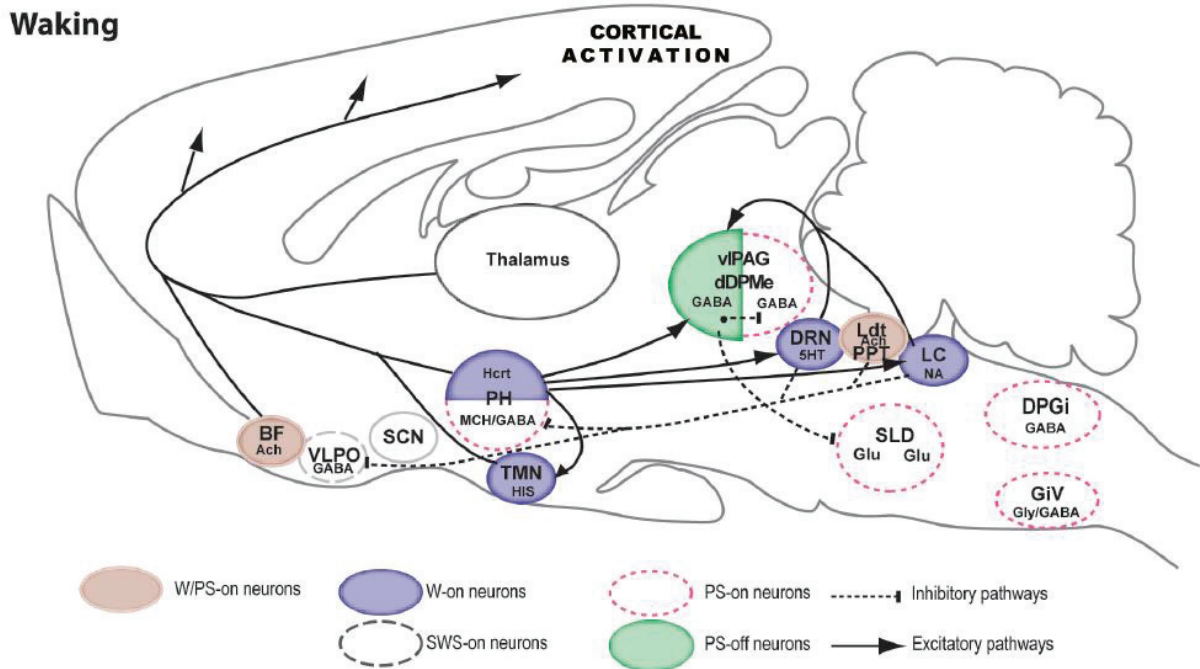


Figure III-9 : Modèle du réseau neuronal responsable de l'éveil. Durant l'éveil, les neurones GABAergiques SP-off de la vIPAG/dDpMe inhibent les neurones glutamatergiques du SLD. Ces neurones GABAergiques SP-off sont excités par les neurones Orex et monoaminergiques que sont les neurones sérotoninergiques (5HT) du raphé dorsal (DRN) et noradrénergiques (NA) du locus coeruleus (LC). Les neurones eveil-on activent le cortex directement ou indirectement via un relais dans la thalamus intralaminaire. Des projections noradrénergiques et sérotoninergiques vers le cortex contribuant à l'éveil ne sont pas représentés sur le schéma pour plus de clarté. 5HT, sérotonine ; Ach, acetylcholine; BF, télencéphal basal; DPGi, noyaux paragigantocellulaire dorsal; dDpMe, partie dorsale du noyau réticulé mésencéphalique profond; DRN, noyau du raphé dorsal; GiV, noyau réticulaire gigantocellulaire ventral de la medulla; Glu, glutamate; Gly, glycine; Hcrt, orexine ; His, histamine ; LC, locus coeruleus ; Ldt, noyau tegmental laterordorsal ; LPGi, noyaux paragigantocellulaire latéral ; MCH, hormone de mélanocortine; NA, noradrénaline ; PH, hypothalamus postérieur ; PPT, tegmentum pédonculo-pontin ; vIPAG, substance grise périaqueductal ventro-latéral ; VLPO, noyau préoptique ventrolatéral ; SCN, noyau suprachiasmatique ; SLD, noyau du sublatérodorsal (d'après Luppi et al., 2014).

Au cours de l'éveil et du SL, les neurones SP-off de la vIPAG/dDpMe vont empêcher la survenue d'un épisode de SP, notamment via une inhibition tonique des neurones SP-on du SLD. (Fig.III-9). Ainsi, le SP ne peut être généré et maintenu que si les neurones SP-off de la vIPAG/dDpMe sont inhibés. Durant l'éveil, ce tonus inhibiteur du SLD en provenance de la vIPAG/dDpMe serait renforcé par les projections excitatrices des neurones monoaminergiques sur la vIPAG/dDpMe. Pendant l'éveil, les neurones monoaminergiques -5HT du DR, NA du LC et His du noyau tubéromammillaire (TMN)- sont très actifs et stimulés par les neurones Orex. De plus, les neurones Orex pourraient exciter directement les neurones SP-off de la vIPAG/dDpMe pendant l'éveil. Ainsi, les neurones monoaminergiques et orexinergiques, essentiels à la promotion de l'éveil, joueraient un rôle direct ou indirect d'inhibition du SP. Leurs mécanismes d'actions seront détaillés Partie IV, chapitre I.2.

La mise en place du SP est permise par l'inhibition des neurones SP-off de la vIPAG/dDpMe (Fig.III-10). Les neurones GABAergiques SP-on du DPGi/LPGi situés dans le bulbe rachidien seraient responsables de cette inhibition. Les neurones cholinergiques du LDT/PPT, MCH de l'hypothalamus, ou GABAergiques du DPGi/LPGi modulent directement ou indirectement l'activité de la vIPAG/dDpMe et du SLD, participant ainsi à la genèse et au maintien du SP. Les neurones monoaminergiques et les neurones orexinergiques actifs pendant l'éveil pourraient jouer un rôle direct ou indirect d'inhibition du SP en renforçant l'activité des neurones GABAergiques SP-off de la vIPAG.

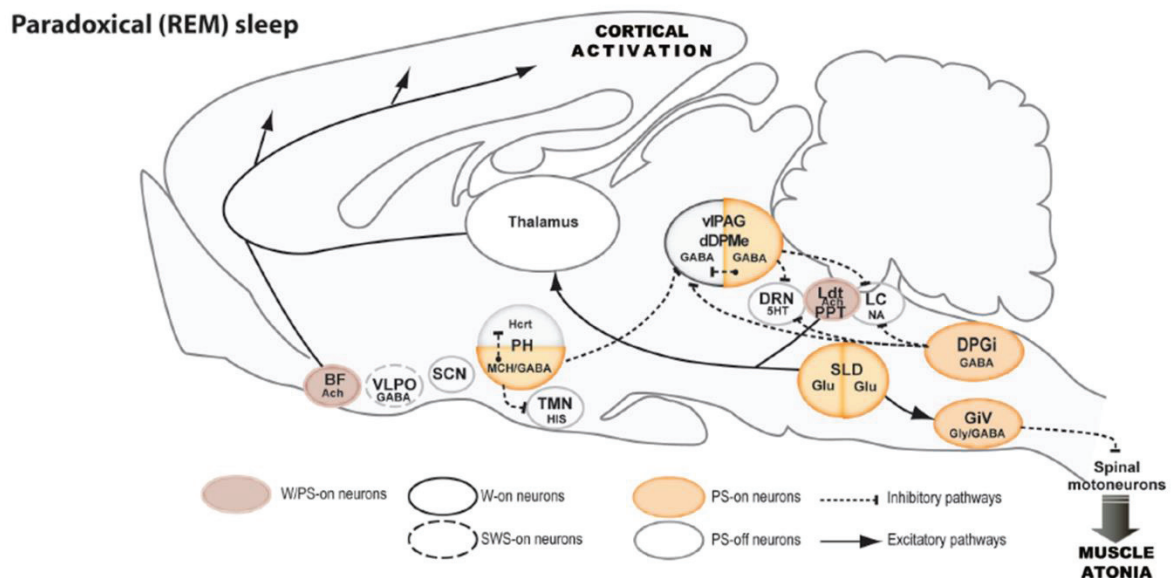


Figure III-10: Modèle du réseau neuronal du SP proposé par notre équipe. Les neurones GABAergiques de l'hypothalamus postérieur (dont les neurones MCH), la vIPAG/dDpMe et le DPGi vont engendrer la genèse et maintien du SP par l'inhibition des neurones générateurs de l'éveil (W-on) et des neurones SP-off de la vIPAG/dDpMe. Le SLD glutamatergique est désinhibé et va engendrer l'atonie musculaire par ces projections descendantes qui vont exciter les neurones Gly/GABA du GiV, induisant ainsi l'hyperpolarisation des motoneurones spinaux. L'activation corticale s'effectue en partie par les voies ascendantes du LDT/PPT sur le thalamus. (Modifié d'après Luppi et al, 2014)

III. Processus de régulation du SP

Le SP est sous le contrôle de processus circadiens et homéostasiques, qui vont déterminer à quel moment et dans quelle quantité cet état va se manifester.

1. Régulation circadienne

En conditions d'obscurité constante, la propension circadienne maximale du SP coïncide avec le moment où la température corporelle est la plus basse et commence à s'élever (Czeisler et al., 1980). Des sujets ont été soumis à des cycles veille-repos de 28 heures dans un environnement sans repères temporels, afin d'identifier la propension de chaque étape du sommeil au cours du rythme circadien endogène (Dijk and Czeisler, 1995). Dans cette étude, le lien corrélatif entre température et propension du SP est vérifié et témoigne de la régulation circadienne robuste du SP. Ces données suggèrent l'existence d'un oscillateur circadien de régulation du SP.

Le SCN est essentiel dans la régulation circadienne de l'éveil et du sommeil. Le rôle précis joué par le SCN dans la régulation circadienne spécifique du SP a été difficile à appréhender puisque la lésion du SCN abolit tous les rythmes biologiques d'un individu (pour revue Mistlberger, 2005). Une étude a réalisé des protocoles de désynchronisation forcée chez le rat et observé une corrélation positive entre les quantités de SP durant l'heure qui précède le sacrifice de l'animal, et l'expression de l'ARNm du gène *Per1* dans le SCN, suggérant une régulation du SP par le SCN (Lee et al., 2009).

Le modèle de régulation présenté précédemment ne tient pas compte de la composante circadienne du SP. Le relai entre le SCN et le réseau du SP pourrait s'effectuer dans diverses structures. McCarley et Massaquoi ont proposé un modèle où des afférences excitatrices en provenance de régions SP-off monoaminergiques permettraient l'inhibition du SP pendant la phase active (McCarley and Massaquoi, 1986, 1992). Or les neurones à Orex de l'HL reçoivent des projections directes et indirectes (via le noyau hypothalamique dorsal et dorsomédian) en provenance du SCN (Aston-Jones et al., 2001; Chou et al., 2003). Ils montrent une activité de type Eveil-on (Lee et al., 2005; Mileykovskiy et al., 2005). De plus, les neurones Orex excitent des régions actives pendant l'éveil et inhibitrices du SP comme les neurones 5-HT du DR, et NA du LC (Horvath et al., 1999; Brown et al., 2008). Les neurones Orex sont donc idéalement placés pour jouer un rôle dans la régulation circadienne du SP.

L'aire préoptique reçoit également des projections indirectes en provenance du SCN via l'aire préoptique médiale et l'hypothalamus dorsomédial (Chou et al., 2001, 2002; Deurveilher et al., 2002). La lésion de la région située dorsalement et médialement à l'aire préoptique ventrolatérale (VLPO), région importante pour le contrôle du SL, est corrélée avec une perte du SP (Lu et al.,

2000a). Cette perte est plus importante pendant la phase éclairée (phase inactive du rat). De plus, une augmentation des quantités de SP induite par une exposition prolongée à l'obscurité, est corrélée avec le nombre de neurones Fos+ dans la partie étendue du VLPO (Lu et al., 2002).

Ainsi, la régulation circadienne du SP pourrait être régulée par une suppression du SP dans la phase active par les Orex et les neurones monoaminergiques, et une promotion du sommeil dans la phase inactive médiée par le VLPO.

2. Régulation homéostatique

Le SP est également régulé de façon homéostatique, c'est-à-dire soumis à des mécanismes permettant de compenser une dette de SP. Des études menées chez le chat et le rat ont montré une hausse du nombre de tentatives d'entrées en SP au cours d'une privation spécifique de SP (Jouvet et al., 1964; Siegel and Gordon, 1965; Shea et al., 2008). L'étude de puissance spectrale de l'EEG a révélé une augmentation des ondes delta (0.2 – 4.5 Hz) et une diminution des ondes thêtas (5 – 10 Hz) au cours du SP résiduel pendant la privation chez le rat (Shea et al., 2008). Ces données suggèrent que l'augmentation du besoin de SP dépend de la durée de la dette accumulée. De plus, durant la période suivante de récupération, les quantités de SP sont augmentées produisant une hypersomnie appelée rebond du SP (Endo et al., 1997; Shea et al., 2008; Arthaud et al., 2015). Cette compensation serait proportionnelle à la dette de SP accumulée au cours de la privation (Dement, 1960; Gvilia et al., 2006). Ces différents facteurs constituent les marqueurs principaux de l'homéostasie du SP.

L'augmentation de SP pour compenser une dette suite à une privation de SP est observable chez des animaux lésés du SCN ce qui suggère que les composantes circadienne et homéostatique sont régulées indépendamment (Mistlberger et al., 1983; Tobler et al., 1983). En réalité la régulation du SP se ferait par l'interaction des composantes homéostatique et circadienne (Wurts and Edgar, 2000).

Contrairement au SL, le substrat anatomique ou moléculaire responsable de l'homéostasie du SP est encore peu connu. Pour le SL, le modèle proposé repose sur l'accumulation d'une molécule hypnagogique : l'adénosine. Les niveaux extracellulaires d'adénosine augmenteraient dans certaines régions cérébrales à cause de la dégradation de l'adénosine triphosphate (ATP : molécule fournissant l'énergie aux cellules) en adénosine diphosphate et/ou monophosphate. Ainsi, lors d'un éveil prolongé, l'adénosine s'accumule et favorise l'endormissement.

Il se pourrait que l'homéostasie du SP ait également un substrat moléculaire. En effet, une récente étude s'est intéressée à l'expression du facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF ; *Brain-derived neurotrophic factor*) après des privations de sommeil totales ou spécifiques de SP (Datta et al., 2015). Ainsi, après une privation sélective de SP, le BDNF est fortement exprimé dans

le SLD et le PPT. De plus, le taux d'expression du BDNF est fortement corrélé avec le nombre de tentatives d'entrée en SP durant les 2 dernières heures de privations (Datta et al., 2015). Pour finir, l'injection d'un inhibiteur du récepteur Trk B du BDNF dans le PPT réduit de façon dose dépendante la réponse homéostatique consécutive à une privation spécifique de SP (Barnes et al., 2017). Ces données semblent confirmer l'implication du BDNF, facteur de plasticité synaptique, dans les processus homéostatiques du SP.

IV. Un modèle du dysfonctionnement du réseau de l'atonie : le RBD

Le TCSP (troubles comportementaux en SP) ou RBD (pour REM Sleep Behavior Disorder) est une parasomnie caractérisé par la perte de l'atonie musculaire pendant le SP. Ce trouble est généralement associé à des rêves/cauchemars ainsi qu'à des comportements actifs pouvant conduire à des blessures du patient ou de son partenaire de lit, et qui constituent le premier motif de consultation. En effet, au cours des épisodes de SP, les patients RBD exécutent des mouvements brusques et violents (cris, coups, etc.) interprétés comme l'extériorisation comportementale et vocale des rêves du patient (De Cock and Arnulf, 2008). Les quantités et le rythme ultradien du SP ne sont cependant pas altérés (Iranzo and Aparicio, 2009). Le RBD est dit « idiopathique » lorsqu'il n'est associé à aucun autre trouble neurologique, ou symptomatique s'il est associé à un désordre tel que la narcolepsie ou une maladie neurodégénérative. Selon l'ICSD-2, le diagnostic du RBD est basé sur les critères suivants : (1) la présence d'un SP sans atonie musculaire sur l'EMG (2) des mouvements violents rapportés par une histoire de blessure (du sujet ou du conjoint) ou un comportement en SP anormal enregistré pendant une nuit de polysomnographique (3) l'absence de signes épileptiques sur l'EEG (4) l'absence d'autres pathologies pouvant expliquer les symptômes moteurs pendant le SP, comme les apnées du sommeil (American Academy of Sleep Medicine, 2005). Contrairement aux crises de somnambulisme, les sujets gardent les yeux fermés pendant ces épisodes, ne se lèvent que très rarement, et n'interagissent pas avec leur environnement (De Cock et Arnulf 2008).

La prévalence ce trouble dans la population générale reste mal connu. Une étude a suggéré une prévalence de 1.6% avec une prédominance chez les hommes (Ohayon and Schenck, 2010). Le RBD sous forme d'agitations nocturnes avec des comportements moins violents existe certainement et constituerait une forme moins diagnostiquée pouvant affecter une proportion importante de femmes. Le RBD se déclare généralement après l'âge de 50 ans, cependant on distingue également des RBD précoces notamment chez les patients narcoleptiques. Le RBD idiopathique est un signe précurseur des maladies neurodégénératives et essentiellement des synucléinopathies telles que la maladie de Parkinson, la démence des corps de Lewy et l'atrophie multisystématisée (Postuma and Montplaisir, 2009; Iranzo et al., 2013; Schenck et al., 2013). En effet, Postuma et ses collaborateurs ont estimé que 17.7% des patients atteints de RBD développaient une maladie neurodégénérative

5 après le diagnostic, 40.6% après 10 ans et de 52 à 70% après 15 ans ([Postuma and Montplaisir, 2009](#) ; [Iranzo et al, 2013](#)).

Le substrat anatomique sous-jacent du RBD reste inconnu. Cependant l'étude histopathologique post-mortem réalisée chez 6 patients RBD a décrit une perte neuronale importante dans la région du tegmentum pontique dorsal ([Iranzo et al, 2013](#)). De plus, des modèles animaux de RBD ont pu être observés chez le chat et le rongeur dont la région du SLD avait été lésée ([Sastre and Jouvet, 1979](#); [Lu et al., 2006](#); [Valencia-Garcia et al., 2017](#)). Tout porte à croire que la dégénérescence du SLD soit à l'origine de ce trouble du sommeil.

La narcolepsie représente la deuxième cause la plus fréquente de RBD après les maladies neurodégénératives. La fréquence de RBD est notamment très élevée dans la narcolepsie avec cataplexie, se situant environ entre 45 et 61%. Ce trouble n'est cependant pas inclus dans la tétrade de symptômes de la narcolepsie, et comporte quelques différences avec le RBD idiopathique. Le phénotype de RBD semble être moins sévère chez les sujets narcoleptiques, avec des mouvements moins violents et plus élémentaires. Il n'existe pas de prédominance en fonction du genre, et l'âge d'apparition de ce trouble est beaucoup plus précoce chez les sujets narcoleptiques ([Dauvilliers et al., 2013c](#)).

PARTIE IV : NEUROBIOLOGIE DE LA NARCOLEPSIE DE TYPE 1

Depuis 2000, il a été démontré que la NT1 est due à la perte des neurones à orexine localisés exclusivement dans l'hypothalamus tubéral (Peyron et al., 2000 ; Thannickal et al., 2000). L'implication de l'hypothalamus tubéral avait été suggérée dès les travaux du neurologue Autrichien Von Economo, peu après la 1^{ère} guerre mondiale, lorsqu'une épidémie d'encéphalite léthargique frappa l'Europe et provoqua chez les patients une très forte somnolence ou de profondes insomnies. Von Economo étudia les échantillons postmortem et montra une forte corrélation entre la somnolence des patients et des lésions au niveau de l'hypothalamus postérieur (Von Economo, 1931). De façon surprenante, seuls de rares patients souffrants d'encéphalite léthargique ont rapporté avoir des cataplexies, cependant des atonies atypiques ont pu être oubliées du diagnostic clinique (Symonds, 1922 ; Daniels, 1934). L'implication de la région hypothalamique a depuis été démontrée et la voie orexinergique constitue le point de départ dans l'étude des mécanismes neurobiologiques de la narcolepsie avec cataplexie.

Dans un premier paragraphe, nous passerons en revue la littérature connue à ce jour sur les réseaux de neurones impliqués ou affectés dans la narcolepsie. Sur la base de cette littérature, nous proposerons un modèle du réseau neuronal impliqué dans l'hypersomnolence et les cataplexies. Puis nous expliquerons brièvement sur quoi repose l'hypothèse dominante de la cataplexie et ferons état du débat qu'il existe sur la nature des cataplexies.

I. Mécanismes neuronaux de la narcolepsie de type 1

1. Les neurones Orexines

Les Orex A et Orex B, également appelés hypocretine 1 (Hcrt-1) et 2 (Hcrt-2), sont produits exclusivement dans l'hypothalamus tubéral. Ces deux neuropeptides, respectivement composés de 33 et 28 acides aminés, sont produits à partir de la protéolyse d'un même polypeptide précurseur : la prépro-orexine (ou prépro-hypocretine) (Fig.IV-1) (De Lecea et al., 1998; Sakurai et al., 1998). Les orexines sont des ligands endogènes de deux récepteurs couplés à une protéine G (OXR1 & OXR2) (Sakurai et al., 1998). Ces deux récepteurs semblent très conservés entre différentes espèces, ils sont notamment similaires à environ 94% entre l'homme et le rongeur (Sakurai et al., 1998). L'OXR1 a une affinité plus forte pour l'Orex-A que pour l'Orex-B tandis que l'OXR2 a une affinité similaire pour les deux neuropeptides. De plus, l'OXR1 est lié à une protéine G_{q/11} qui engendre une activation d'une phospholipase C et l'excitation du neurone, et l'OXR2 est lié à G_{q/11} ainsi qu'à une protéine inhibitrice G_i (Zhu et al., 2003). Les neuropeptides orexines sont excitateurs et vont dépolariser les neurones ciblés pendant quelques minutes lorsqu'ils se lient aux récepteurs (Gao et al., 2017).

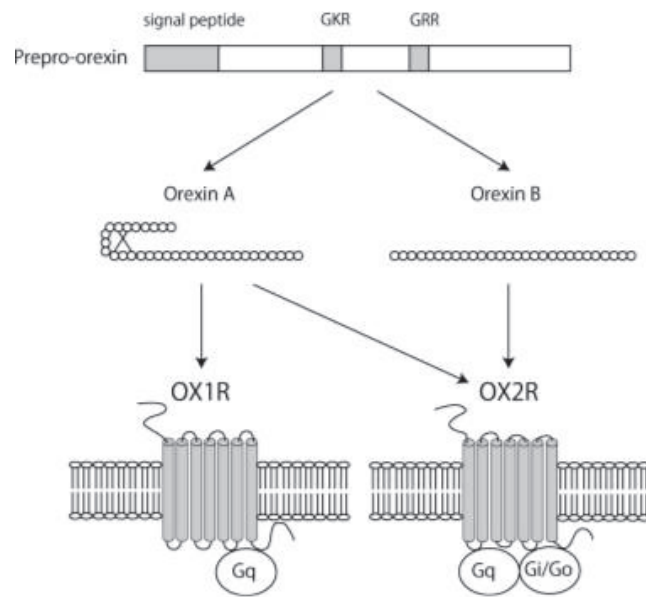


Figure IV.1 Représentation schématique des orexines et leurs récepteurs. La prépro-orexine est protéolysée en deux neuropeptides orexine-A (Orex-A) et orexine-B (Orex-B). L’Orex-A peut se fixer sur les deux récepteurs OXR1 & OXR2 tandis que l’Orex-B se fixe essentiellement sur l’OXR2. L’OXR1 est couplé exclusivement à une protéine Gq alors que l’OXR2 est couplé à une protéine Gi ou Gq. (Inutsuka & Yamanaka, 2013)

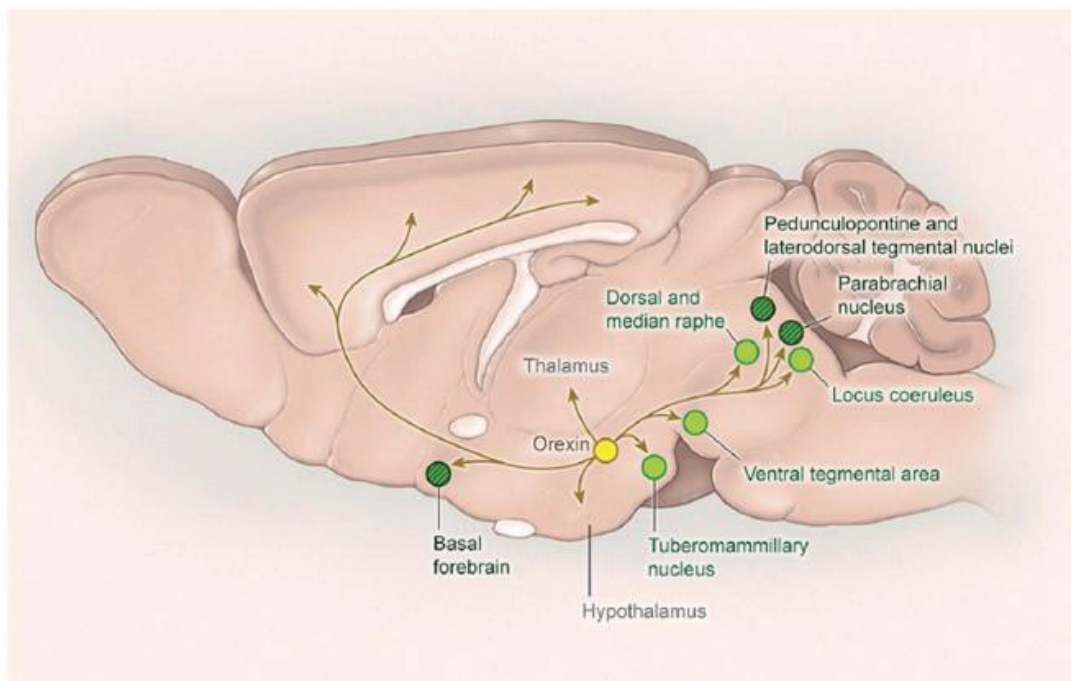


Figure IV.2 Projections des neurones orexines. Les neurones orexines sont produits dans l’hypothalamus latéral et excitent les neurones du cortex, du thalamus, et tous les centres de promotions de l’éveil comprenant : les neurones monoaminergiques (en vert clair) et d’autres structures éveillantes (vers foncé) (Scammell et al, 2017).

Les neurones à Orex sont exclusivement localisés dans l'aire périfornical et l'hypothalamus postérieur chez le rat (Peyron et al., 1998; Date et al., 1999; Nambu et al., 1999). Cette localisation a été confirmée chez l'humain (Elias et al., 1998; Peyron et al., 2000). Les neurones à orexine représentent une petite population de neurones : environ 4000 chez le rat et 50000 chez l'homme (Peyron et al., 2000 ; Thannickal et al., 2000). Ces cellules projettent de façon très diffuse dans le SNC à l'exception du cervelet (Fig.IV-2). Les immunomarquages de l'Orex ont montré des terminaisons très denses dans le noyau thalamique paraventriculaire, noyau arqué de l'hypothalamus, le DR, le TMN et du LC. Les neurones Orex libèrent également du glutamate (Rosin et al., 2003; Torrealba et al., 2003), le neuropeptide inhibiteur dynorphine (Abrahamson et al., 2001; Chou et al., 2001) ou encore la neurotensine (Furutani et al., 2013). De plus, une étude a récemment montré que le glutamate est co-libéré avec l'orexine (Schoene et al., 2014). Il contribue l'excitation des neurones histaminergiques (Schoene et al., 2014). La co-transmission de neuropeptides pourrait donc affecter la réponse des neurones cibles et avoir un rôle complémentaire de l'activation orexinergique.

Dans cette même étude, le blocage spécifique de l'excitation glutamatergique a mis en évidence la cinétique d'excitation propre aux Orex. Lorsque la voie glutamatergique est bloquée, la simulation optogénétique des neurones Orex engendre une augmentation du taux de décharges à des neurones histaminergiques éfferents pendant 60sec post-stimulation (Schoene et al., 2014) (Fig.IV-3).

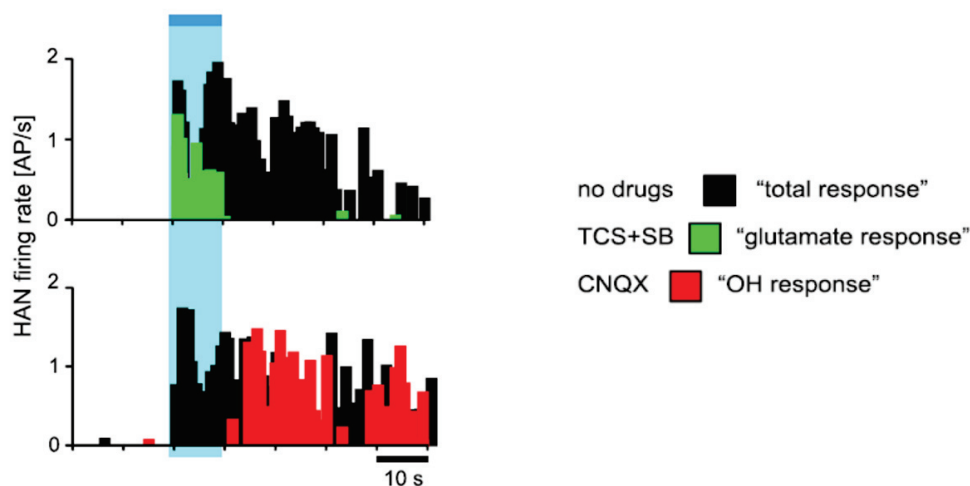


Figure IV-3 : Graphique représentatif du taux de décharge des neurones histamine suite à la photostimulation optogénétique des neurones Orex réalisée *in vitro* chez la souris. Le blocage de la réponse médiée par l'Orex par l'injection d'antagonistes orexinergiques (TCS+SB) dans la préparation met en évidence la réponse due à la libération de glutamate. Réciproquement, le blocage de la réponse glutamatergique par injection d'un antagoniste AMPA (CNQX) met en évidence la réponse médiée par l'Orex. Ainsi, le taux de décharge de la réponse totale (en noir) est représentatif de l'action du glutamate et de l'orexine combiné. Le blocage de la réponse glutamatergique (vert) révèle une action des Orex prolongée (rouge) (d'après Shoene et al., 2014).

Des études d'hybridation *in situ* ont montré que les régions innervées par les neurones Orex exprimaient fortement l'ARNm des récepteurs orexinergiques. Les OXR1 et OXR2 sont co-exprimés dans certaines régions, mais leur distribution est essentiellement distincte et complémentaire, suggérant différents rôles physiologiques. Ils sont tous deux très exprimés dans l'amygdale, le noyau de la strie terminale (BNST), le noyau thalamique paraventriculaire, le DR, l'aire tegmentale ventrale (VTA), les LDT/PPT. L'OXR1 est également exprimé dans le cortex préfrontal et infralimbique, l'hippocampe ou encore le LC et l'OXR2 dans le TMN, le noyau septal médian, le noyau arqué, le noyau hypothalamique dorsomédian, l'HL (Lu et al., 2000b; Marcus et al., 2001). Les projections diffuses et la forte expression des récepteurs confèrent au système orexinergique une capacité d'action étendue et une implication dans de nombreux mécanismes physiologiques.

De nombreuses publications et revues ont rapporté que les orexines étaient impliquées dans diverses fonctions telles que la régulation des états de vigilance, la prise alimentaire, l'homéostasie énergétique, le système de récompense ou encore l'anxiété (Sakurai, 2007; Peyron and Kilduff, 2017). Par souci de clarté nous ne détaillerons ici que le rôle de ces neurones dans la régulation du cycle veille-sommeil.

Tout d'abord, le marqueur d'activité c-Fos est très exprimé par les neurones à Orex suite à un éveil prolongé chez le rongeur (Estabrooke et al., 2001). Les niveaux extracellulaires d'Orex-A sont également élevés pendant la période active (obscur) des rats (Yoshida et al., 2001). De plus, les enregistrements unitaires réalisés chez le rongeur ont montré que les neurones Orex sont généralement silencieux pendant le SL et le SP ; peu actifs pendant l'éveil calme et très actifs pendant l'éveil actif et les transitions SP-éveil (Lee et al., 2005; Mileykovskiy et al., 2005; Takahashi et al., 2008) (Fig.IV- 4).

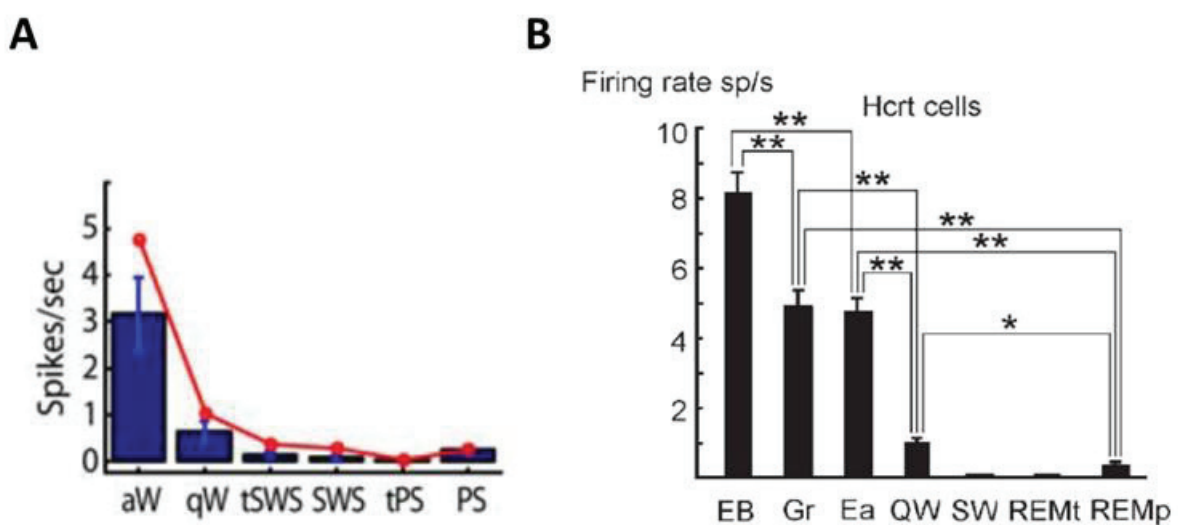


Figure IV-4 : Fréquences de décharges moyennes (spikes/sec) des neurones à orexine chez le rat vigile en contention (A) et chez le rat libre de se mouvoir (B) en fonction des états de vigilance et du comportement. (A) les neurones à Orex sont plus actifs pendant l'éveil actif (aW) que pendant l'éveil calme (qW). Leur fréquence de décharge est quasiment nulle pendant le sommeil (tSWS, SWS, tPS et PS) (d'après Lee et al., 2005). (B) EB :

comportement exploratoire ; Gr : toilette ; Ea : consommation d'un aliment ; QW : éveil calme ; SW : sommeil lent ; REMt, SP ; REMp : activation musculaire phasique pendant le SP (d'après Mileykovskiy et al., 2005).

Le rôle spécifique des neuropeptides Orex dans la régulation des états de vigilance a été étudié. En effet, l'injection ICV (10µg) d'Orex-A chez le rat augmente les quantités d'éveil diminue les quantités de SP pendant 3hrs post-injection (Hagan et al., 1999). L'éveil induit est actif : le comportement de toilette et l'activité locomotrice sont augmentés. De plus, la stimulation par optogénétique des neurones Orex au cours du SL ou du SP augmente la probabilité de transitions vers l'éveil tandis que l'inhibition de ces neurones favorise l'apparition du SL (Adamantidis et al., 2007; Tsunematsu et al., 2011) (Fig.IV-5).

De façon similaire, l'activation de ces mêmes neurones par pharmacogénétique augmente les quantités d'éveil et supprime le SP (Sasaki et al., 2011). De plus, la stimulation optogénétique des neurones Orex augmente les transitions vers l'éveil indépendamment du cycle lumière/obscurité (phase inactive/active des souris) (Carter et al., 2009). En revanche, une pression de sommeil accrue par des privations courtes (2hrs et 4hrs) diminue les effets de la photo-activation de ces neurones (Carter et al., 2009). Ainsi, ces neurones pourraient agir indépendamment des rythmes circadiens et leurs effets sont diminués par les processus homéostasiques.

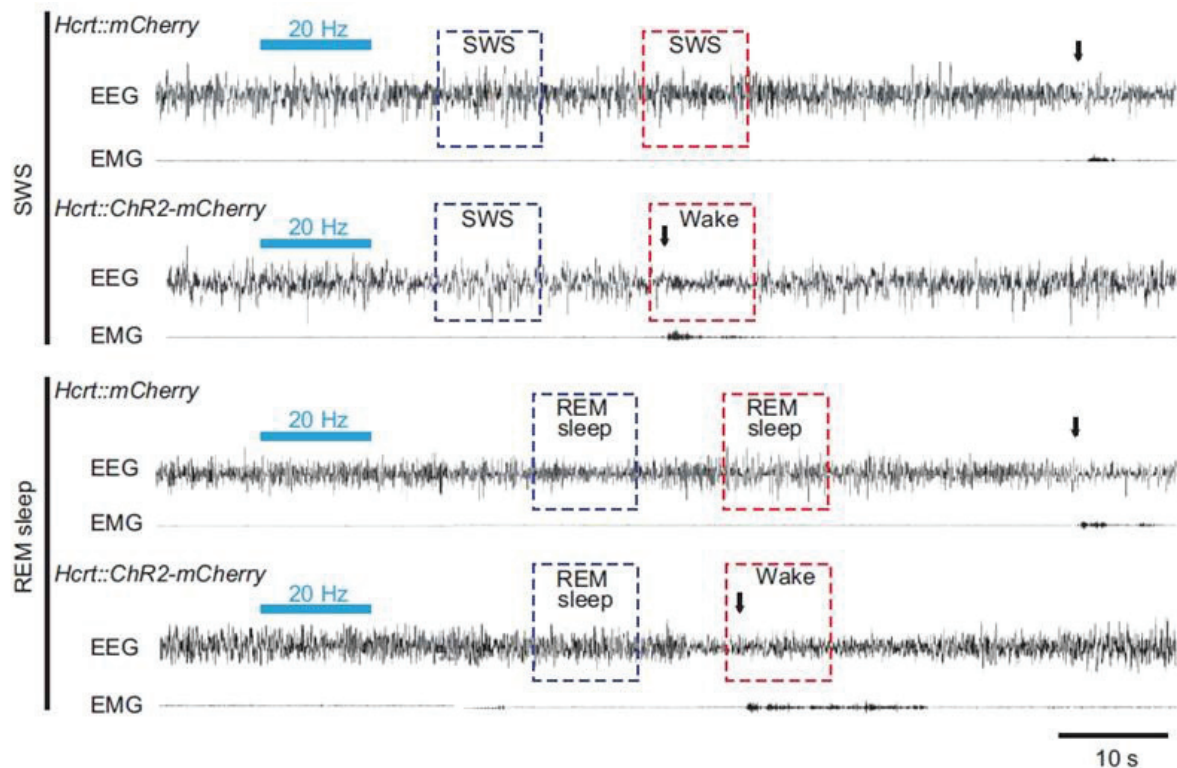


Figure IV-5 : Enregistrements EEG/EMG représentatifs illustrant les effets d'une photostimulation *in vivo* de neurones à Orexine (Hcrt) chez des souris sauvages (Hcrt::mCherry) et des souris exprimant le canal rhodopsine-2 spécifiquement dans les neurones à Orex (Hcrt::ChR2-mCherry). Chez la souris Hcrt:ChR2-mCherry, la stimulation des neurones à Orex par une fibre optique (barre horizontale bleue, 20Hz durant 10sec) au cours du

sommeil lent (SWS) ou du sommeil paradoxal (REM sleep) entraîne le réveil de l'animal (wake, fleche vers le bas) environ 40 sec après l'arrêt de la stimulation (d'après Adamantidis et al, 2007)

La narcolepsie met bien en évidence l'implication des orexines dans les mécanismes d'éveil. En effet la perte du signal orexinergique spécifique de cette pathologie engendre une incapacité à maintenir de longues périodes d'éveil, ainsi qu'une dérégulation du SP chez l'humain et les modèles animaux (Chemelli et al., 1999; Lin et al., 1999). Chez la souris *orexin-tTA;TetO DTA*, la perte progressive des neurones Orex engendre une diminution importante de la durée moyenne des épisodes d'éveil mais la quantité totale d'éveil n'est que peu réduite (Tabuchi et al., 2014; Branch et al., 2016). Ensemble, ces données confèrent aux neurones Orex un rôle essentiel de consolidation de l'éveil.

Par quelles voies neuronales permettent-ils le maintien de longues périodes d'éveil ? Certaines structures ciblées par les neurones Orex sont essentielles à la promotion de l'éveil. Parmi elles, les **noyaux monoaminergiques** : neurones 5HT du DR, NA du LC, His du TMN ; mais également le **télocéphale basale**, et les neurones cholinergiques du **PPT/LDT** (Fig.IV-2). De nombreuses études menées *in vitro*, ont montré que les orexines agissaient comme neuromodulateurs excitateurs des neurones NA du LC (Hagan et al., 1999; Tortorella et al., 2013), 5HT du DR (Liu et al., 2002), His du TMN, cholinergique du LDT (Burlet et al., 2002) ainsi que sur les noyaux intralaminaires du thalamus (Bayer et al., 2002). Chez la souris double KO des récepteurs à orexine, l'injection dans le LC d'un AAV codant pour OXR1 (récepteur à orexine majoritaire dans ces neurones) permettant l'expression locale de ce récepteur, met fin à la fragmentation de l'éveil (Hasegawa et al., 2014). De la même façon, chez une souris n'ayant plus de OXR2, la restauration de ce récepteur dans le TMN (rendue possible par injection d'un AAV codant pour l'enzyme Cre) maintient une durée normale des épisodes d'éveil (Mochizuki et al., 2011). Ainsi la maintenance de l'éveil serait assurée via les projections orexinergiques sur le TMN et le LC. De plus, la photo-inhibition du LC réduit les effets éveillant dus à la photo-stimulation des neurones Orex (Carter et al., 2012) suggérant que le LC est nécessaire aux effets éveillants des orexines. Cependant, il pourrait s'agir d'effets concomitants puisque la photo-inhibition du LC diminue les quantités d'éveil (Carter et al., 2010). Ainsi, les neurones orexines permettraient la consolidation de l'éveil via le maintien d'un tonus éveillant sur les différents centres de l'éveil que sont les noyaux monoaminergiques.

2. Les neurones monoaminergiques

a) Neurones histaminergiques du noyau tubéromamillaire (TMN)

Le TMN situé dans la partie la plus ventrale de l'hypothalamus postérieur constitue l'unique source du neuropeptide histamine dans le SNC. Ces neurones envoient des projections diffuses dans

le cerveau, et notamment sur des structures impliquées dans la régulation des états de vigilance telles que le cortex, le thalamus, la région préoptique, la PAG, l'amygdale, le striatum, l'hippocampe, la substance noire, et l'aire tegmentale ventrale (Panula et al., 1989). Ils projettent également sur les neurones monoaminergiques et cholinergiques du tronc cérébral et sur les motoneurones de la moelle épinière (Panula et al., 1989; Wu et al., 2012).

Les neurones du TMN deviennent actifs peu après le réveil, déchargent de façon maximale durant l'éveil actif et cessent toute activité pendant les phases de sommeil (Takahashi et al., 2006; Sakai et al., 2010). Le délai de quelques secondes observé entre le début d'un épisode d'éveil et l'activité de ces neurones laisse suggérer que ceux-ci ne sont pas impliqués dans l'induction de cet état mais plus dans son maintien. Par ailleurs, l'inhibition pharmacologique de la synthèse d'histamine au niveau du TMN induit une augmentation des quantités de SL alors que l'inhibition de sa dégradation induit de l'éveil (Lin et al., 1988). De plus, les souris H1-KO ne possédant plus de récepteur 1 à histamine présentent des quantités d'éveil diminuées ainsi qu'un effet moins éveillant du stress à un nouvel environnement (Parmentier et al., 2016). Le rôle de l'histamine dans l'éveil est donc incontestable, en revanche nous ne savons pas encore dans quels aspects de l'éveil (motivation, cognition ou autre) sont réellement impliqués ces neurones.

Nombre de neurones à Histamine dans la NT1

La place des neurones à histamine dans la narcolepsie représente une question cruciale dans l'étude de cette pathologie. L'implication du système histaminergique dans la NT1 a d'abord été suggérée par le lien anatomique et fonctionnel fort qu'il existe avec les neurones orexinergiques. En effet, une étude menée chez le rat a montré que les neurones His du TMN constituent une voie de projection majeure des neurones Orex de l'HL (Peyron et al., 1998). Ainsi les neurones Orex vont activer directement les neurones His et via le OXR2 (Eriksson et al., 2001; Yamanaka et al., 2002). D'autre part, la co-libération de dynorphine par les neurones Orex peut désinhiber les neurones His, via un contrôle sur les entrées GABAergiques du TMN (Eriksson et al., 2004). Ce lien établi, la perte des neurones à orexine dans la narcolepsie pourrait avoir une incidence directe sur l'activité ou la libération d'histamine.

Cependant, les mesures d'histamine dans le LCR chez le sujet narcoleptique ont montré des résultats contrastés. Chez les patients ayant un déficit en Orex-A et sans traitement pharmacologique, le taux d'histamine dans le LCR est soit plus faible (Kanbayashi et al., 2009; Nishino et al., 2009; Bassetti et al., 2010) soit normal (Lin et al., 2008; Dauvilliers et al., 2012) par rapport à des sujets sains. Il est important de noter que l'obtention de mesures fiables d'His dans le LCR représente un challenge important, comme le montre la grande variabilité des valeurs chez les sujets contrôles. Ce taux semble varier en fonction de l'âge des individus, des procédures et de l'heure du prélèvement (Dauvilliers et al., 2012). La mesure de la méthyl-histamine, le produit de

dégradation de l'His n'a également montré aucune différence entre les sujets narcoleptiques et contrôles (Dauvilliers et al., 2012). En 2013, deux équipes indépendantes ont observé une augmentation très importante (de 1,5 à 2 fois) du nombre de neurones His chez les patients narcoleptiques (n=12) à l'autopsie par rapport aux témoins (n=19) (John et al., 2013; Valko et al., 2013) (Fig.IV-6). De plus, cette augmentation semble plus importante lors d'une perte quasi-totale (>90%) des neurones à Orex que lors d'une perte moins importante (Valko et al., 2013). Ainsi cette augmentation du nombre de neurones His pourrait être associée à la diminution drastique du nombre de neurones à Orex caractéristique de cette pathologie. Dans ces mêmes études, le nombre de neurones à histamine chez des modèles animaux de narcolepsie a en revanche donné des résultats très différents. Valko et ses collaborateurs observent une hausse significative de 53% chez les souris Orex-KO et non significative de 28% chez les souris Orex-Ataxin-3 par rapport aux souris sauvages (Valko et al., 2013). Les auteurs proposent que la hausse observée serait un mécanisme compensatoire dû à la perte des neurones à Orex et pourrait également jouer un rôle dans la symptomatologie de la NT1 (Valko et al., 2013). En revanche, l'étude de John et al., n'a montré aucun changement dans le nombre de neurones His chez le chien Orex receptor-2 mutant, la souris Orex-KO, la souris Orex-Atax3 et la souris Orexin-DTA (John et al., 2013). L'ensemble de ces modèles animaux a un phénotype narcoleptique induit génétiquement contrairement à l'homme chez qui une attaque auto-immune semble causer l'apparition des symptômes (John et al., 2013). John et ses collaborateurs font donc l'hypothèse que cette hausse du nombre de neurones His pourrait être consécutive aux processus de neuroinflammation auto-immuns de la NT1. Les traitements utilisés chez l'homme pourraient aussi expliquer une telle différence.

L'ensemble de ces résultats contradictoires, expliqués en partie par le défi technique que constituent le dosage de l'histamine et l'immunohistochimie de l'histidine décarboxylase (HDC, enzyme de synthèse de l'histamine) laisse ouverte la question d'une altération du signal histaminergique dans la narcolepsie. Toutefois, il est important de noter que l'His a un rôle crucial dans les mécanismes auto-immuns dans le SNC (pour revue Shan et al., 2015). Par exemple, ils permettent d'augmenter la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique et de faciliter ainsi l'entrée de cellules T dans le SNC. Dans la narcolepsie, ils pourraient permettre d'accélérer la dégénérescence cellulaire tout comme ils le font dans la maladie de Parkinson (pour revue Shan et al., 2015).

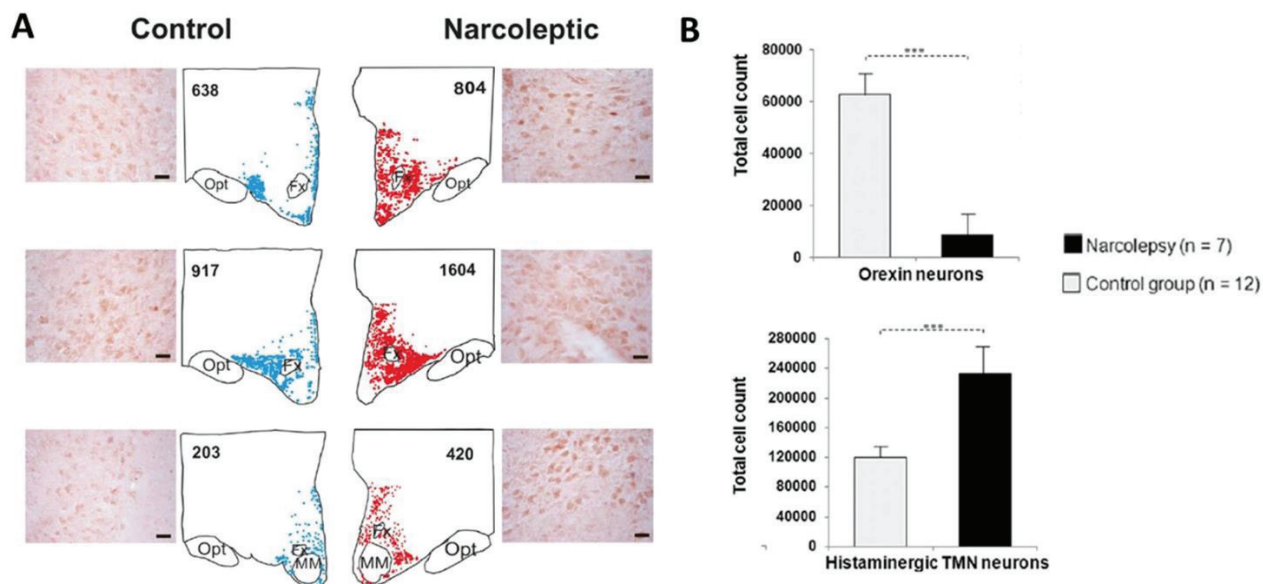


Figure IV-6 : La perte des neurones à Orex est associée à une augmentation du nombre de neurones à Histamine dans le noyau du tubéromamillaire (TMN) chez les sujets narcoleptiques. A : Distribution des neurones à histamine chez les sujets narcoleptiques et contrôles. Le nombre de cellules est indiqué chez un patient contrôle et narcoleptique représentatifs. Fx : Fornix ; MM : corps mamillaire ; Opt : tractus optique. Echelle = 50µm. (d'après Jonh et al., 2013). B : comparé aux sujets controles, les patients NT1 ont 86% de neurones Orex en moins et 94% de neurones His en plus dans le TMN. (D'après Valko et al., 2013)

Histamine et symptômes narcoleptiques

L'implication de la voie histaminergique dans la symptomatologie de la narcolepsie a également été examinée. Les souris HDC-KO ne possédant plus le neuropeptide histamine ne présentent ni cataplexie ni fragmentation du sommeil ce qui prouve que la perte du signal histaminergique n'engendre pas le phénotype narcoleptique. En revanche il peut contribuer à certains facteurs de comorbidité de la pathologie, puisque la perturbation respiratoire pendant le SP et les problèmes métaboliques (obésité) sont observés chez les souris HDC-KO. Les effets observés sont d'autant plus grands chez les souris doublement mutées, ne possédant ni histamine ni orexine (Bastianini et al., 2015). Chez la souris OXR2 mutée, la restauration locale des récepteurs OXR2 au niveau du TMN abolit la fragmentation des états de vigilance (Mochizuki et al., 2011) indiquant que la voie Orex-His est importante pour la consolidation de l'éveil. En effet, l'amélioration de la transmission histaminergique, obtenue par l'administration pharmacologique d'un agoniste inverse des autorécepteurs H3 (tripolisant), limite la SDE chez l'homme et promeut l'éveil des souris narcoleptiques (Lin et al., 2008).

Histamine et cataplexie

Durant les cataplexies chez le chien narcoleptique qui a une mutation du récepteur 2, des neurones de la partie ventrale de l'hypothalamus postérieur, donc possiblement à histamine, sont les seuls neurones monoaminergiques à garder un pattern d'activité similaire à celui qu'ils ont pendant l'éveil calme (John et al., 2004). De plus, chez la souris narcoleptique mutée pour les OXR1

et OXR2, la restauration sélective du récepteur OXR2 dans le TMN n'abolit pas les cataplexies (Hasegawa et al., 2014). L'action de l'Orex dans l'abolition des cataplexies ne se fait donc pas via l'histamine. En revanche, certaines études suggèrent que l'activation pharmacologique des neurones à His pourrait diminuer les cataplexies. Lin et ses collaborateurs ont notamment montré chez la souris Orex-KO une diminution des épisodes de cataplexies à l'administration du tripolisant (Lin et al., 2008). De plus, une récente étude réalisée sur 117 patients a montré que le pitolisant, un agoniste inverse des autorécepteurs H3 similaire au tripolisant, diminuait de 75% la survenue des cataplexies contre 38% pour les patients ayant reçu un placebo après un mois de traitement (Szakacs et al., 2017). L'ensemble de ces données suggère que la voie histaminergique peut favoriser considérablement une amélioration des symptômes de la narcolepsie que sont l'hypersomnolence et les épisodes de cataplexies. L'effet sur les cataplexies pourrait être indirect par une augmentation de l'éveil, une diminution de l'EDS.

b) Neurones sérotoninergiques du Raphé Dorsal (DR)

Le DR est une structure médiane située dans la partie ventromédiane de la substance grise périaqueductale, dans la partie rostrale du pont. Il est le noyau sérotoninergique le plus important du SNC, puisqu'il contient plus de la moitié des 20 000 neurones sérotoninergiques chez le rat (Descarries et al., 1982). La population neuronale du DR est hétérogène, 50% de ses neurones sont 5HT et il contient également des neurones GABA, glutamate, nitric oxide, ou encore DA (pour revue Vasudeva et al., 2011). Ces neurones innervent et reçoivent des projections réciproques de structures cérébrales impliquées dans la régulation du cycle veille sommeil (noyaux monoaminergiques, télencéphale basale), et également de l'amygdale, l'insula et le cortex préfrontal (Peyron et al., 1996; Weissbourd et al., 2014).

Le rôle des neurones 5-HT du DR dans la régulation des états de vigilance est étudié depuis plusieurs décennies. L'activité de ces neurones est lente et régulière au cours de l'éveil (1Hz en éveil calme), diminue pendant le SL et cesse pendant le SP (Trulson and Jacobs, 1979; Levine and Jacobs, 1992; Gervasoni et al., 2000). Ils font donc parti des neurones SP-off, c'est-à-dire inactifs durant le SP. De nombreuses études ont démontré l'implication des neurones 5-HT du DR dans la promotion de l'éveil. Dès 1972, le professeur Jouvet montrait que la destruction du DR par coagulation, ainsi que l'inhibition de l'enzyme de synthèse de la 5-HT (la tryptophane hydroxylase), induisent chez le chat une profonde insomnie (Jouvet, 1972). En revanche, les drogues augmentant le tonus sérotoninergiques ont un effet éveillant et suppriment le SP. Enfin, la photoactivation par optogénétique de ces neurones 5-HT double les quantités d'éveil et fragmente le SL (Ito et al., 2013). Ces neurones contribuent à l'inhibition du VLPO, structure clé du SL (Gallopain et al., 2000). Les neurones 5-HT sont également essentiels pour la thermogénèse, la régulation de l'humeur, et sont impliqués dans le système de récompense (Lowry et al., 2005; Murray et al., 2015).

Noyau du raphé dorsal et NT1

Le lien anatomique et fonctionnel fort entre ce noyau DR et les neurones Orex de l'HL en font un maillon essentiel dans l'étude de la narcolepsie. En effet les neurones 5-HT du DR reçoivent une forte innervation orexinergique (Peyron et al., 1998; Liu et al., 2002), expriment les deux types de récepteurs Orex (Trivedi et al., 1998; Marcus et al., 2001) et sont dépolarisés par l'Orex-A (Brown et al., 2002; Ishibashi et al., 2016). La contribution possible des neurones du DR dans les différents symptômes de la narcolepsie a été étudiée. Tout d'abord, l'enregistrement des neurones 5-HT du DR chez le chien narcoleptique a révélé que les neurones SP-off ne cessaient pas de décharger au cours des cataplexies (Wu et al., 2004) (Fig.IV-7). Pendant ces épisodes, le taux de décharge est réduit par rapport à l'éveil et équivalent au taux observé en SL. Certains psychostimulant comme la methamphetamine, connus pour augmenter les niveaux de monoamines (notamment 5-HT mais également DA) au niveau synaptique, sont utilisés pour traiter la somnolence de la narcolepsie (Banerjee et al., 2004). D'autre part, les cataplexies sont souvent traitées par des antidépresseurs tricycliques (Thorpy, 2007) et inhibiteurs de la recapture de la 5-HT et NA (Thorpy and Dauvilliers, 2015). Il est intéressant de noter que ces antidépresseurs ont également un effet délétère sur le SP, ce qui soutient l'idée d'une similitude importante entre SP et cataplexies.

Une récente étude menée chez la souris Orex-KO a montré que l'administration d'agonistes aux récepteurs sérotoninergiques (MDMA), 5-HT_{1A} (8-OH-DPAT) et 5-HT₂ (DIO) palliait l'hypolocomotion de ces souris pendant la phase d'activité (Mori et al., 2016). En condition basale, ces souris présentent des quantités quotidiennes de SP plus élevées que des souris contrôles. Toutefois, les auteurs ne discriminent pas les cataplexies ce qui pourrait expliquer l'observation d'une telle hypersomnie. L'administration de 8-OHDPAT supprime cette hypersomnie de SP chez les souris Orex-KO, ce qui pourrait alors être le fait d'une suppression des cataplexies. Dans cette même étude, l'utilisation de RT-PCR a montré des niveaux d'ARNm du récepteur 5-HT_{1A} diminués dans le cortex préfrontal (Mori et al., 2016). De plus, le taux extracellulaire de métabolite 5HTIAA dans le cortex préfrontal mesuré par microdialyse augmente pendant la phase active chez les souris WT, et non chez les souris Orex-KO (Mori et al., 2016). Ainsi, la voie sérotoninergique vers le cortex préfrontal serait détériorée chez ces souris narcoleptiques.

Noyau du raphé dorsal et cataplexie

Le rôle potentiel des neurones du DR sur les cataplexies a également été mis en évidence chez la souris OXR1-KO/OXR2-KO (Hasegawa et al., 2014). Dans cette étude, les auteurs ont notamment procédé à l'injection locale d'un AAV codant pour l'OXR2, sous contrôle d'un promoteur ubiquitaire, afin de restaurer sélectivement la voie orexinergique dans le DR seulement. L'expression sélective de ces récepteurs dans le DR a totalement aboli l'apparition de cataplexies,

en revanche elle ne semble pas améliorer la fragmentation de l'éveil. Toutefois, cette expression de l'OXR2 dans l'ensemble des neurones du DR (promoteur ubiquitaire) ne reproduit pas les conditions physiologiques. Les neurones 5-HT du DR pourraient néanmoins prévenir l'apparition des cataplexies lorsqu'ils sont activés par les orexines.

La même équipe a très récemment expliqué l'importance de ces neurones 5-HT dans la cataplexie, via ses projections sur l'amygdale (Hasegawa et al., 2017). Dans cette étude menée sur les souris Orex-Atax3, la stimulation optogénétique des neurones sérotoninergiques a diminué drastiquement la survenue des épisodes de cataplexies sans affecter la fragmentation de l'éveil. De plus, l'activation et l'inhibition de ces mêmes neurones par pharmacogénétique a respectivement augmenté et diminué la quantité de cataplexies observées (Hasegawa et al., 2017). La stimulation des neurones 5-HT au niveau des projections vers l'amygdale, SLD, le LDT, la vIPAG ou la partie compact de la substance noire, a révélé que seules les projections serotoninergiques sur l'amygdale basolatérale (BLA) étaient impliquées dans les cataplexies. Pour finir, la stimulation de la voie des neurones 5-HT vers l'amygdale réduit la proportion de cellules actives Fos+ dans la BLA et du CeA (Hasegawa et al., 2017) (Fig.IV-7). Cette stimulation s'accompagne d'une augmentation extracellulaire de 5-HT dans la BLA/CeA qui pourrait ainsi médier l'inhibition de ces neurones. Ainsi, les neurones 5-HT du DR joueraient un rôle majeur de répression des cataplexies, via l'inhibition des structures de l'amygdale.

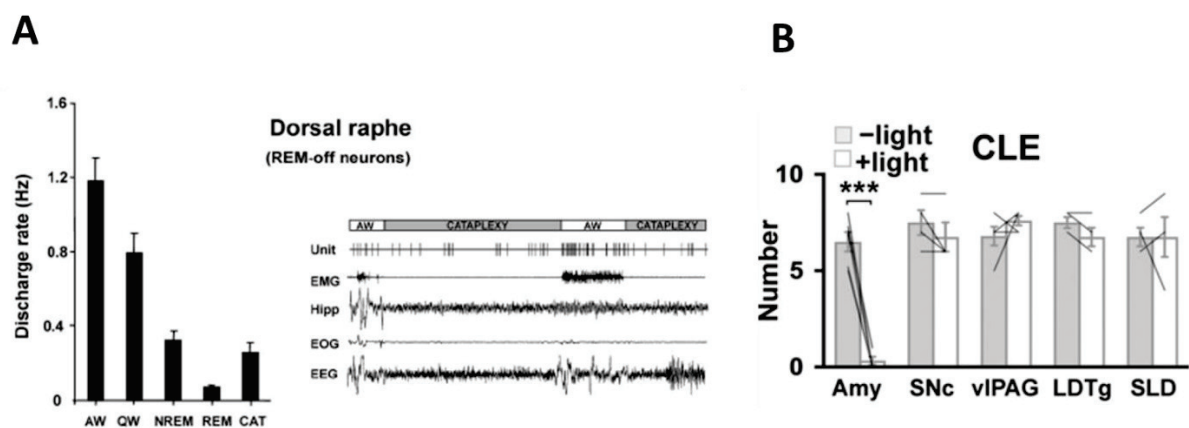


Figure IV.7 : A. Activité des neurones SP-off du DR enregistrés chez le chien narcoleptique au cours du cycle veille-sommeil et des cataplexies. Le graphique de gauche représente le taux de décharge moyen au cours de l'éveil actif (AW) calme (QW) du SL (NREM) SP (REM) et cataplexies (Cat). A droite, les tracés polysomnographiques et l'enregistrement unitaire d'un neurone SP-off du DR représentatif (Unit) (d'après Wu et al., 2004).

B. La stimulation optogénétique des fibres des neurones 5-HT du DR sur l'amygdale inhibe les cataplexies chez la souris Orex-Atax-3. L'opsine est spécifiquement exprimée dans les neurones 5-HT des souris. Les stimulations (light+) s'effectuent au cours d'un protocole d'induction de cataplexie avec chocolat et ont été réalisées dans l'amygdale (Amy) le SNc (partie compact de la substance noire), la vIPAG, le LDT et le SLD. Seule les projections des neurones 5-HT du DR sur l'amygdale abolit les cataplexies (d'après Hasegawa et al., 2017).

c) Neurones noradrénergiques du locus coeruleus (LC)

Le LC constitue la source majeure de NA dans le cerveau. Comme les autres systèmes monoamines, ce noyau a des projections très diffuses dans le cerveau que ce soit ascendante (cortex, hippocampe, thalamus) (Dahlstrom and Fuxe, 1964; Card et al., 2006) ou descendante (cervelet, moelle épinière) (Nygren and Olson, 1977). Il est la source majeure de NA pour le cortex. D'autre part, il est fortement innervé par les noyaux DPGi et LPGi (Astonjones et al., 1986) mais reçoit aussi de nombreuses projections en provenance de l'hypothalamus postérieur et de la substance grise périaqueducule (Luppi et al., 1995; Clement et al., 2014). Ces neurones sont impliqués dans la promotion de l'éveil et sont essentiels lorsqu'un haut niveau d'alerte est requis. L'administration d'un agoniste noradrénergique augmente les quantités d'éveil et la stimulation par optogénétique de ces neurones provoque un réveil rapide chez la souris (Carter et al., 2010). Inversement, l'administration d'un agoniste alpha-2 qui diminue la libération de NA, ou la photo-inhibition de ces neurones, augmente les transitions vers le SL et réduit légèrement les quantités d'éveil (Carter et al., 2010). Au cours de l'éveil, le LC est notamment très actif lors d'un stress, un stimulus nouveau ou inhabituel (Aston-Jones and Cohen, 2005). Les neurones du LC ont une forte activité pendant l'éveil calme et actif, diminuent leur activité pendant le SL et cessent toute activité pendant le SP. De plus leur activité est liée à une augmentation du tonus musculaire (Wu et al., 1999).

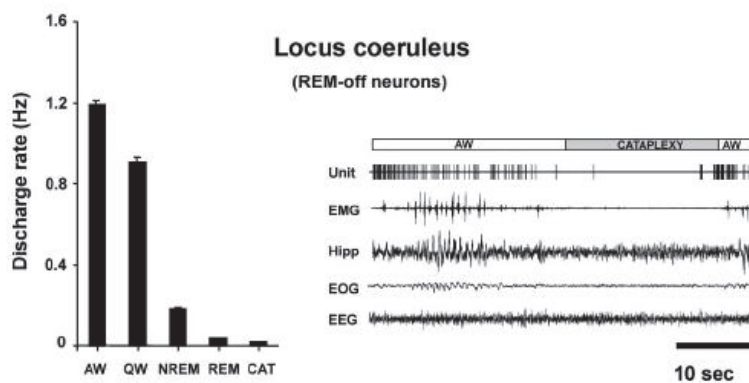


Figure IV.8 : Activité des neurones SP-off du LC enregistrés chez le chien narcoleptique au cours du cycle veille-sommeil et des cataplexies. A droite sont représentés les tracés polysomnographiques et l'enregistrement unitaire d'un neurone SP-off du LC représentatif (Unit) (d'après Wu et al., 1999)

De nombreuses études, pharmacologiques et électrophysiologiques, ont attribué à ce noyau un rôle important dans la narcolepsie. Tout d'abord, il a été considéré comme un candidat probable dans la mise en place des cataplexies. Chez l'homme, le chien, et la souris narcoleptique, l'administration de drogues augmentant le tonus noradrénergique supprime drastiquement les cataplexies tandis que des bloqueurs NA aggrave les symptômes (Nishino and Mignot, 1997; Wu et al., 1999; Hirai and Nishino, 2011). De plus, l'enregistrement unitaire des neurones du LC chez le chien narcoleptique a montré un arrêt total d'activité pendant les épisodes de cataplexies (Wu et al., 1999) (Fig.IV-8). Cependant, plusieurs études semblent aller à l'encontre d'une implication du LC dans ce symptôme. En effet, cette structure exprime uniquement le OXR1 (Bourgin et al., 2000;

Mieda et al., 2011), or la souris OXR1-KO ne présente pas de cataplexies et le chien narcoleptique a un récepteur 1 intact (Kisanuki et al., 2001; Sakurai, 2007). De plus, la restauration du signal orexinergique au niveau du LC par l'expression du OXR1 chez une souris doublement muté OXR1-KO/OXR2-KO, n'a aucun effet sur les cataplexies, en revanche elle augmente la durée des épisodes d'éveil (Hasegawa et al., 2014). L'action de l'Orex sur l'abolition des cataplexies ne passerait pas par le LC. En revanche le LC semble avoir un rôle dans la fragmentation de l'éveil. L'effet bénéfique des drogues modifiant la libération de NA sur la suppression des cataplexies pourraient alors impliquer d'autres structures noradrénergiques comme les noyaux A1, A2, A5 et A7 de la medulla ou agir sur le niveau d'éveil moteur, l'excitation ou les comportements inducteurs de cataplexies.

d) Neurones dopaminergiques

Le neuropeptide DA est essentiellement exprimé dans deux régions du SNC : la substance noire (SN) et l'aire tegmentale ventrale (VTA). Les neurones DA de la VTA innervent fortement le striatum ventral et le cortex préfrontal, et seraient impliqués dans l'association à une récompense (pour revue Bissonette and Roesch, 2016). La photoinhibition des terminaisons de ces neurones au niveau du noyau accumbens (NAc) ou du CeA réveille la souris, tandis que leur inhibition par pharmacogénétique diminue les quantités d'éveil (Eban-Rothschild et al., 2016). En revanche, ces résultats pourraient refléter un effet indirect sur l'éveil, par l'induction d'une émotion liée à la récompense. De plus, les amphétamines et le Modafinil favorisent l'éveil en augmentant les concentrations synaptiques de DA (Wisor et al., 2001). Les neurones DA du SN ont quant à eux un rôle critique dans le contrôle des mouvements volontaires puisque leur mort neuronale est à l'origine de la maladie de Parkinson (pour revue Bissonette and Roesch, 2016). Cependant, ces deux groupes de neurones ont une activité de décharge similaire pendant les différents états de vigilance (Hyland et al., 2002).

La VTA a une interaction privilégiée avec les neurones à Orex, puisque 20% des afférences provenant de l'HL vers la VTA sont orexinergiques, et ces fibres Orex contiennent de denses vésicules au niveau de la VTA (Balcita-Pedicino and Sesack, 2007; Baimel et al., 2015). Ce lien anatomique pourrait être à l'origine de symptômes narcoleptiques. Le rôle la DA dans la narcolepsie a été étudié car la plupart des drogues utilisées pour traiter la somnolence et les cataplexies (modafinil, amphétamines, gamma-hydroxybutyrate) ont un effet sur le système dopaminergique. En effet ces drogues jouent notamment sur la libération, la recapture de la DA, ou encore sur l'expression de ces récepteurs (Howard and Feigenbaum, 1997; Schmidt-Mutter et al., 1999; Wisor et al., 2001). Ces drogues n'étant toutefois pas entièrement spécifiques du système dopaminergique, leurs effets pourraient engager d'autres voies monoaminergiques. Une étude menée chez 7 patients narcoleptiques a montré par marquage scintigraphique des récepteurs D2 que le taux de liaison des récepteurs D2 était plus élevé que chez les sujets contrôles et fortement corrélé avec la fréquence des cataplexies (Eisensehr et al., 2003). Plusieurs études réalisées chez le chien narcoleptique ont

montré que la manipulation des récepteurs D2/D3 de la DA par perfusion locale d'agoniste/antagoniste modulait la survenue des cataplexies (Reid et al., 1996; Honda et al., 1999; Okura et al., 2004). Pour finir, l'équipe du Dr Peever a récemment confirmé la diminution des différents symptômes (cataplexie, somnolence) via l'injection d'amphétamines chez la souris narcoleptique. Plus intéressant, l'activation ou le blocage spécifique des récepteur D2 a respectivement induit chez ces souris une aggravation ou une diminution des cataplexies (Burgess et al., 2010). La modulation spécifique du récepteur D1 n'a montré aucun effet sur les cataplexies mais un effet sur la somnolence. La DA semble avoir un effet sur les différents symptômes de la narcolepsie, en revanche les mécanismes d'action et sa contribution réelle au phénotype narcoleptique restent inconnus à ce jour.

3. La Medulla

L'hypothèse selon laquelle la cataplexie et l'atonie musculaire au cours du SP empruntent la même voie neuronale suggère que des neurones soient actifs à la fois pendant les épisodes de cataplexies et pendant le SP. Une étude publiée en 1991 s'est intéressée aux neurones de la medulla actifs pendant le SP et a cherché à identifier dans cette région, des cellules dont l'activité serait liée aux cataplexies (Siegel et al., 1991) (Fig.IV-9). Pour cela, ils ont procédé à l'enregistrement unitaire de 86 neurones des noyaux gigantocellulaires réticulés chez le chien narcoleptique. Ils ont pu les catégoriser en 3 populations de neurones : la plus grande proportion de cellules (60%) présentait une activité maximale pendant le SP et l'éveil, et ont été nommé "cataplexy-off" ; une plus petite portion (10 cellules enregistrées) ont montré pendant le SP et les cataplexies des patterns similaires d'activité. Ces derniers augmentaient leurs fréquences de décharges au début ou juste avant la diminution du tonus musculaire. Cette étude semble suggérer une implication du réseau médullaire du SP dans les cataplexies.

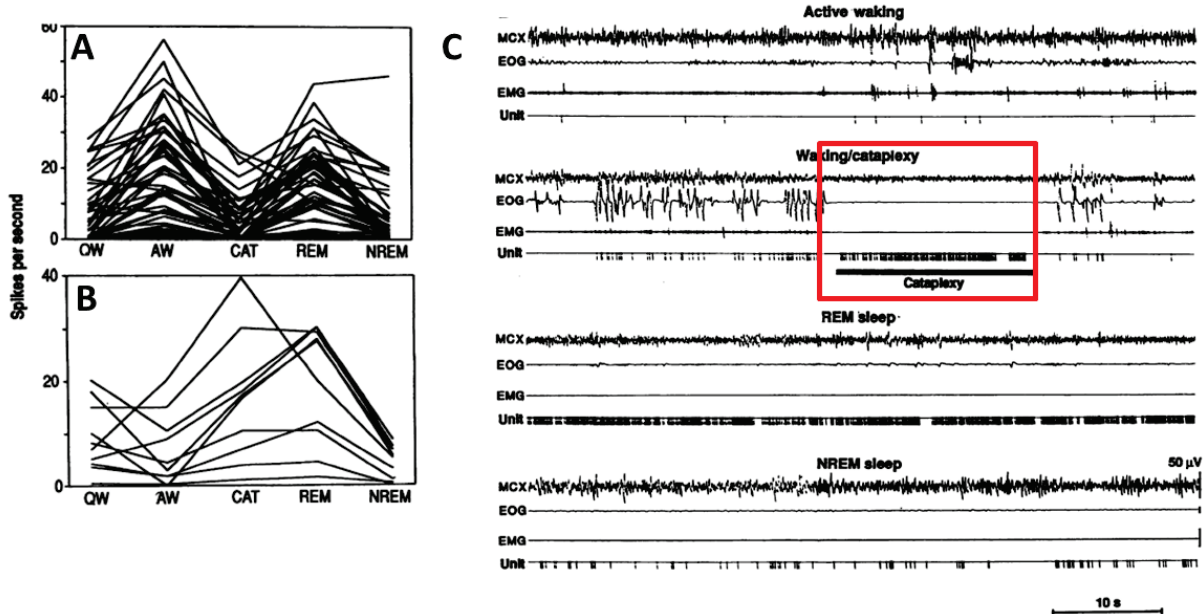


Figure IV.9 : Profil d'activité des neurones cataplexie-off (A) ou cataplexie-on (B) pendant l'éveil calme (QW) l'éveil actif (AW) les cataplexies (CAT) le SP (REM) et le SL (NREM). C : Pattern de décharge d'une cellule cataplexie-on obtenue à partir de l'enregistrement unitaire chez le chien narcoleptique. MCX : électroencéphalogramme du cortex moteur ; Unit : enregistrement unitaire du neurone. Le carré rouge entoure la cataplexie (d'après Siegel et al., 1991)

4. Les structures limbiques

Le lien entre émotions et cataplexies n'est plus à démontrer. Les émotions fortes et positives contribuent de façon indéniable à l'apparition des épisodes de cataplexie. La valence émotionnelle d'un stimulus a d'autant plus d'importance qu'elle peut empêcher (stimulus négatif) ou déclencher (stimulus positif) l'apparition de ces crises. Ainsi, ce lien fort entre émotions et cataplexies a suscité de nombreuses interrogations au sein de la communauté scientifique. L'implication de structures cérébrales où régissent le traitement des informations émotionnelles, dites « structures limbiques », a notamment été très étudiée. Les cataplexies sont-elles causées par un trouble des processus émotionnels chez les NC ? Le réseau limbique est-il réellement impliqué dans le déclenchement de ces crises ?

a) L'amygdale

L'amygdale, considérée comme le noyau du système limbique, est une région dont les circuits et la fonction sont très conservés à travers l'évolution. Elle joue un rôle majeur dans les processus émotionnels et notamment dans la réponse émotionnelle à divers stimuli sensoriels. Cette structure située dans le lobe temporal comprend une multitude de noyaux interconnectés : les principaux étant le complexe basolatéral (BLA) et l'amygdale centrale (CeA). La BLA est constituée de neurones Glutamatergiques et d'interneurones inhibiteurs GABA ; la CeA est majoritairement GABAergique et contient également quelques neurones glutamatergiques (Marek et al., 2013). D'autres neurones GABAergiques sont intercalés entre la BLA et la CeA, fournissant une

importante source d'inhibition au sein de ces sous-structures. Le neuropeptide CRF (*corticotropin-releasing-factor* ou corticolibérine en français) est également très exprimé dans la CeA et serait coexprimé par les neurones GABA (Veinante et al., 1997).

Le traitement de l'information émotionnelle peut être simplifié de la manière suivante. Tout d'abord la BLA va recevoir des informations de l'environnement extérieur via le thalamus et les cortex sensoriels (Janak and Tye, 2015). La BLA est réciproquement connectée aux régions corticales - en particulier au cortex préfrontal (PFC), à l'hippocampe, et aux aires associatives - et va transmettre l'information de façon diffuse à ces régions. Des projections excitatrices en provenance de ces mêmes régions vont également affecter l'activité neuronale dans la BLA. Les projections unidirectionnelles de la BLA incluent quant à elles le striatum (surtout le NAc), le BNST et la CeA. Ces trois dernières structures sont considérées comme les médiateurs qui vont permettre la traduction des signaux en provenance de la BLA en « signaux comportementaux » (Janak and Tye, 2015). D'autre part, les neurones GABAergiques de la CeA constituent la principale voie de sortie de l'amygdale et innervent fortement des régions impliquées dans le tonus musculaire (Burgess et al., 2013).

De très nombreuses études ont démontré l'importance cruciale de l'amygdale dans les émotions négatives (telles que la peur ou l'anxiété). Chez l'homme notamment, la perception et le jugement de la peur (Adolphs et al., 1994; Morris et al., 1996) ou encore la tristesse (Fusar-Poli et al., 2009) engagent l'amygdale. Mais cette structure est également impliquée dans les réponses émotionnelles à des stimuli positifs (Holland and Gallagher, 1999; Tye et al., 2008). Notamment, l'activité de l'amygdale augmente à la vue de photos de visages heureux (Canli et al., 2002; Killgore and Yurgelun-Todd, 2004; Sergerie et al., 2008). Chez le singe, certains neurones de l'amygdale augmentent leur taux de décharge lorsqu'un stimulus à valence positive est présenté (Paton et al., 2006; Belova et al., 2007; Zhang et al., 2013). L'amygdale est donc à la fois réactive aux stimuli positifs et négatifs ce qui peut s'expliquer par le mélange au sein de cette structure de distinctes populations neuronales aux connectivités spécifiques (Janak and Tye, 2015; Namburi et al., 2015). En effet, l'étude de Namburi a récemment montré que la photo-stimulation des projections de la BLA vers le NAc renforçait la réponse de récompense, et celle des projections vers l'amygdale centromédiale (CeM; sous-structure de CeA) augmentait la réponse conditionnée à la peur des souris (Namburi et al., 2015). Différentes voies neuronales de l'amygdale pourraient ainsi encoder différentes valences: plus spécifiquement, les mécanismes d'affect positif pourraient inhiber les circuits de l'anxiété ou de la peur.

Amygdale et NT1

La question du rôle de l'amygdale dans le déclenchement des cataplexies a souvent été posée. Des résultats de spectroscopie par résonance magnétique nucléaire ont suggéré un dysfonctionnement possible de la région amygdalienne chez le sujet narcoleptique (Poryazova et al., 2009). De plus, à l'image des patients souffrants de lésions de l'amygdale, les narcoleptiques ont un défaut de réaction à la présentation d'un stimulus déplaisant lors du test de reflexe de sursaut acoustique (Khatami et al., 2007). Une étude psychophysiological a aussi montré une réaction atténuée des patients NT1 aux images déplaisantes (Tucci et al., 2003). Il a été aussi montré en imagerie fonctionnelle (IRMf) que la présentation d'images humoristiques engendrait une réponse réduite de l'hypothalamus et une réponse accrue de l'amygdale chez les NT1 (Schwartz et al., 2008) (Fig.IV-10). Ce même groupe de recherche a rapporté chez ces mêmes sujets une activité de l'amygdale réduite dans un conditionnement aversif et augmentée lors d'un stimulus émotionnel positif par rapport à des sujets contrôles (Ponz et al., 2010). Lors d'une récente étude de reconnaissance des émotions faciales connue pour impliquer l'amygdale, les sujets narcoleptiques n'ont en revanche présenté aucun déficit des performances (Bayard et al., 2013). L'ensemble de ces études semble suggérer une intensité de réponse de l'amygdale anormalement haute chez les narcoleptiques lors de la présentation de stimuli positifs. Néanmoins la perturbation ou non de la perception émotionnelle de ces sujets est encore discutée.

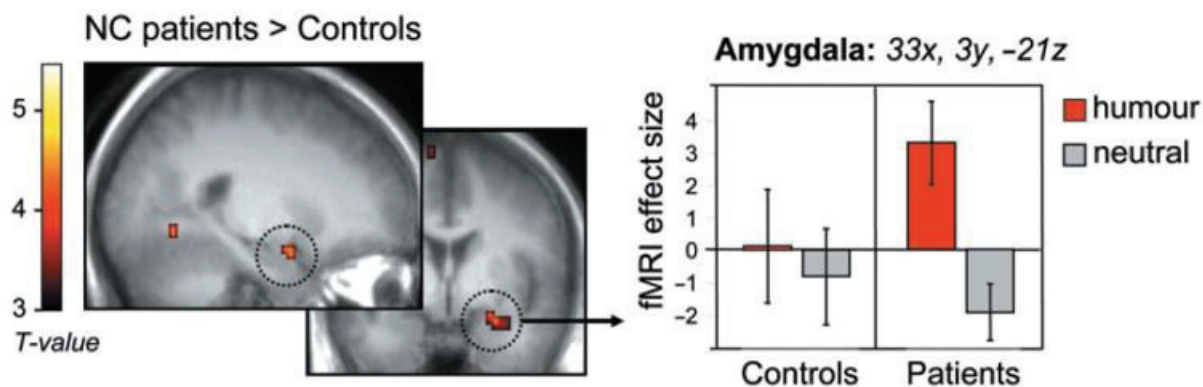


Figure IV-10 Les patients narcoleptiques ont une réponse augmentée dans l'amygdale à la suite d'un stimulus humoristique par rapport à des sujets sains. Une séquence humoristique était présentée à des sujets contrôles et narcoleptiques avec cataplexie (NC) pendant une session d'IRMf. Le signal mesuré dans l'amygdale est augmenté chez les patients NC mais pas chez les contrôles. (Schwartz et al., 2008)

La difficulté d'induire une cataplexie en condition clinique sous contrôle expérimental (par exemple en IRMf) explique le peu de résultats chez l'homme concernant ce symptôme. La plupart des études évoquent des cas anecdotiques de cataplexies (Chabas et al., 2007; Reiss et al., 2008). Cependant, une étude de tomographie par émission monophotonique a pu montrer une augmentation de l'activité amygdalienne pendant un épisode de cataplexie (Hong et al., 2006). De

plus l'équipe du Dr Plazzi a pu récemment étudier chez l'enfant narcoleptique des épisodes de cataplexies en IRMf, EEG et EMG. Durant les 77 épisodes observés, induits par des films humoristiques, l'activité cérébrale fut notamment augmentée dans l'amygdale et dans le NAc (Meletti et al., 2015). Cette étude a mis en évidence une modification de l'activité cérébrale spécifiquement induite par la cataplexie par contraste avec les aires actives pendant le rire sans cataplexie, et s'affranchit donc du biais expérimental du rire existant dans les autres études. Au vu de ces deux différentes études réalisées chez l'homme, il semble que l'amygdale soit une structure active pendant les épisodes de cataplexies.

Le rôle de l'amygdale dans la cataplexie a également été établi par de nombreuses études sur l'animal. En 2002, Gulyani et ses collaborateurs ont enregistré l'amygdale de chiens narcoleptiques en liberté de mouvements. Dans l'amygdale centrale et basale, sur les 42 cellules enregistrées au cours d'une cataplexie, 20 (47,6%) ont augmenté leur taux de décharge pendant la cataplexie (Gulyani et al., 2002). Ces cellules montraient le plus souvent une augmentation d'activité dès le début de l'épisode et un retour à l'activité basale une fois le tonus musculaire restauré (Fig.IV-11).

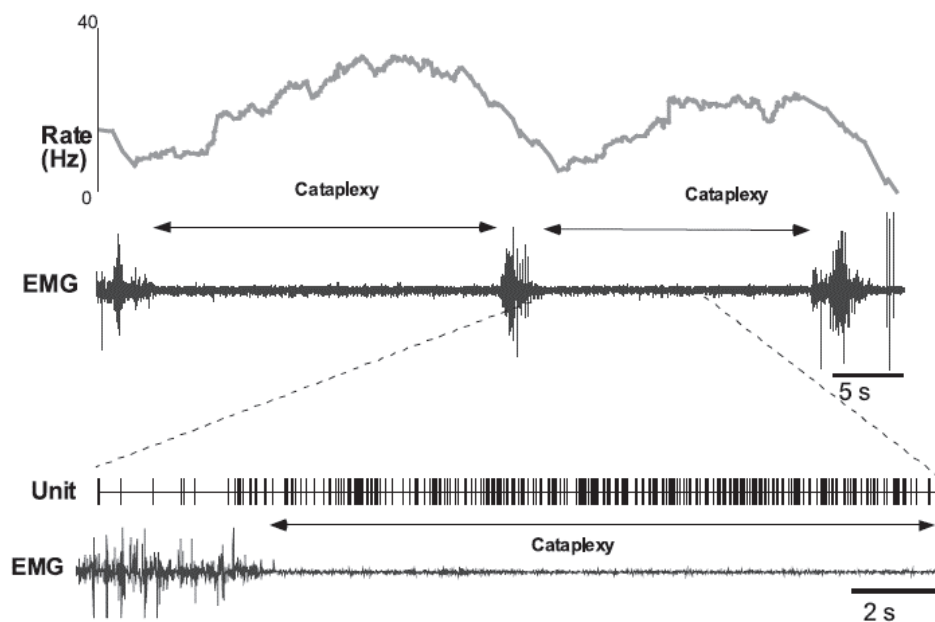


Figure IV-11 : Représentation du taux de décharge d'un neurone cataplexie-on de l'amygdale au cours d'une cataplexie chez le chien narcoleptique. Les tracés du bas représentent l'élargissement de l'intervalle comprenant le début de l'épisode de cataplexie et montre une augmentation du taux de décharge au sein d'un neurone et une diminution du tonus musculaire sur l'EMG. (D'après Gulyani et al., 2002).

De plus, chez la souris Orex-KO, des lésions à l'acide iboténique comprenant la BLA et la CeA diminuent la quantité de cataplexies basales et induites par la roue ou le chocolat (Burgess et al., 2013). Cette réduction de près de 50% de la quantité totale de cataplexie n'affecte pas les quantités de sommeil. Après une induction forte de cataplexies par le chocolat, l'étude du marqueur d'activité neuronal c-Fos a également mis en évidence une forte activation de la BLA et de

l'amygdale basomédiale postérieure. Le niveau d'activation dans ces structures était corrélé positivement au nombre de cataplexies observées durant les 4h qui précèdent la perfusion (Oishi et al., 2013). En 2017, deux indépendantes études de chémogénétique s'intéressaient au rôle spécifique des neurones GABAergiques de la CeA (voie de sortie de l'amygdale) dans les cataplexies. Il a été mis en évidence que l'activation spécifique de ces neurones augmentait la quantité et le nombre d'épisodes de cataplexies en proportions similaires dans les deux études (Mahoney et al., 2017; Snow et al., 2017) (Fig.IV-12). De façon intéressante, lorsque les cataplexies étaient induites par l'administration de chocolat, l'activation des neurones GABA de la CeA n'a pas montré d'effet additionnel en revanche leur inhibition a fortement diminué le nombre de cataplexies induites (Mahoney et al., 2017). Sans induction de cataplexies par chocolat, l'inhibition n'a en revanche aucun effet sur les cataplexies dans les deux études. Toutefois, aucune des deux études n'a contrôlé l'efficacité de la chémo-inhibition de ces neurones.

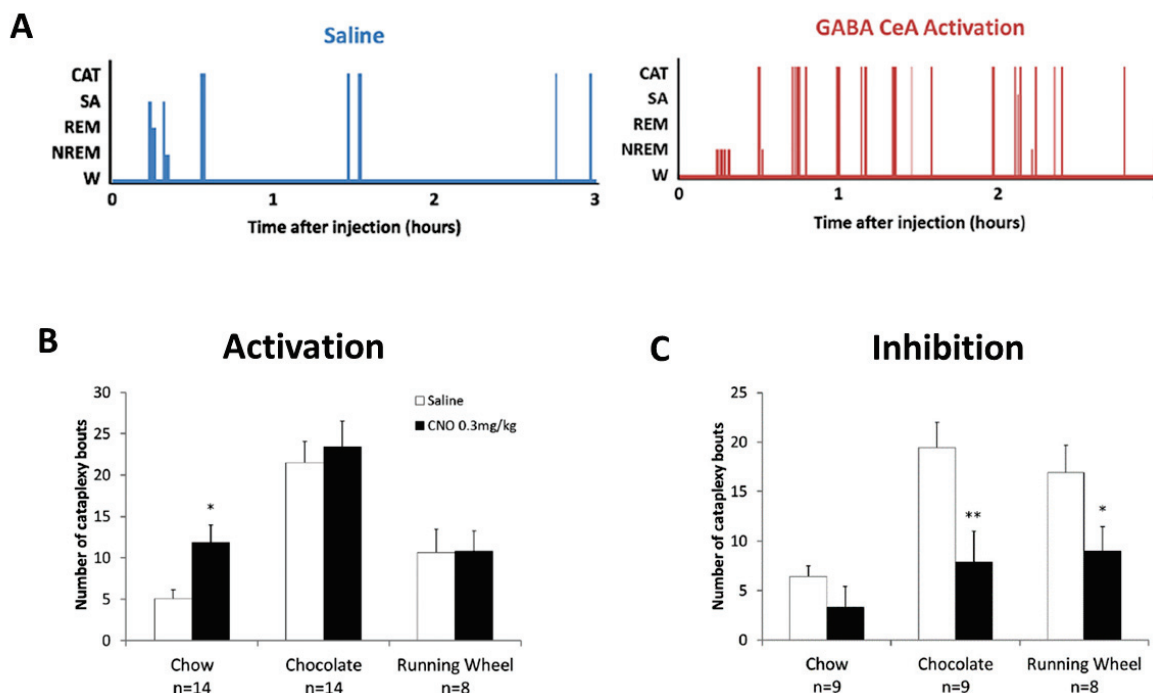


Figure IV-12 : Modulations chémo-génétique des neurones GABAergiques de l'amygdale centrale chez la souris Orex-KO. A : L'activation de ces neurones par l'administration i.p. de CNO induit une augmentation du nombre de cataplexies visible sur l'hypnogramme. (SA : attaques de sommeil) (Snow et al., 2017)

B : L'activation chémogénétique des neurones GABA de l'amygdale induit une augmentation des cataplexies non induites par le chocolat ou la roue (running wheel). C : L'inhibition induit une diminution significative des cataplexies induites par le chocolat et la roue, mais pas en condition basale (Chow = nourriture habituelle) (d'après Mahoney et al., 2017)

Une autre récente étude a montré que l'inhibition chémogénétique de l'ensemble des neurones de la CeA ne diminuait pas la fréquence et la les cataplexies non induites (Hasegawa et al., 2017). Ensemble ces données peuvent suggérer une implication de la CeA – plus particulièrement des neurones GABA- dans les cataplexies à forte valence émotionnelle (chocolat).

On peut supposer qu'un stimulus à forte valence émotionnelle engendre une activation de ces neurones et ainsi une augmentation de la fréquence des cataplexies. Cependant, leur inhibition ne permettrait pas d'empêcher la survenue de cataplexies non induites. Dans cette même étude, l'inhibition chimogénétique des neurones de la BLA et CeA diminuait en revanche fortement les cataplexies non-induites (Hasegawa et al, 2017). Ainsi la BLA pourrait jouer un rôle clé dans le déclenchement des cataplexies, toutefois son implication reste à étudier plus en détails.

La voie neuronale par laquelle l'activation des neurones GABA de la CeA pourrait potentialiser l'apparition des cataplexies a été étudiée. Comme mentionné précédemment, l'hypothèse dominante place le réseau de l'atonie musculaire du SP comme substrat anatomique des cataplexies. Ainsi le lien entre les neurones GABA de la CeA et les neurones du SLD a été étudié. Tout d'abord, le CeA projette fortement sur la vIPAG/dDpMe une région impliquée dans la suppression de l'atonie du SP (Burgess et al., 2013). Plus spécifiquement les terminaisons axonales en provenance des neurones GABAergiques de la CeA sont en apposition des neurones GABA de la vIPAG/dDpMe qui envoient des projections sur les neurones du SLD (Snow et al, 2017) (Fig.IV-13). Cependant, il n'a pas été montré si les neurones GABAergiques du vIPAG recevant les axones GABAergiques de la CeA sont les neurones SP-off qui inhibent le SLD pendant l'éveil et le SL. Toutefois, sur la base des données actuelles, il peut être fait l'hypothèse que l'activation de neurones GABAergiques de la CeA lors d'une émotion positive pourrait conduire à l'inhibition des neurones GABAergiques de la vIPAG/dDpMe. L'inhibition de ces derniers conduirait à arrêter l'inhibition tonique des neurones glutamatergiques du SLD et permettre ainsi la mise en place d'une atonie musculaire.

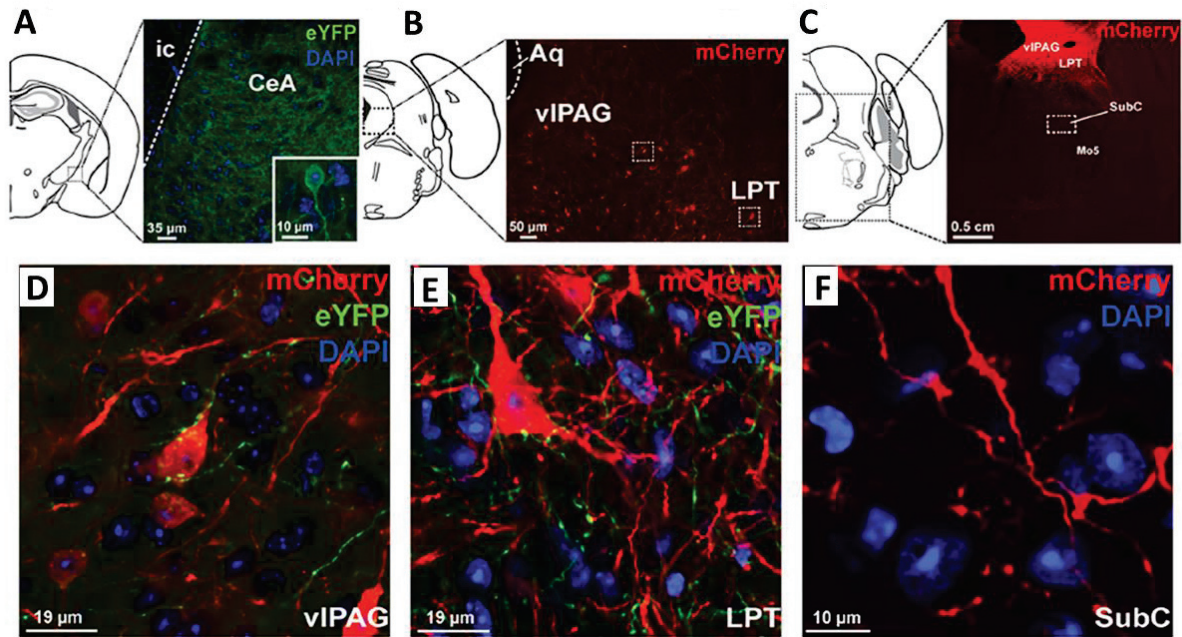


Figure IV-13 : Voie de projection des neurones GABAergiques de la CeA au SLD. A : Les neurones GABA de la CeA expriment la protéine de fluorescence eYFP. B : Les neurones GABA de la vIPAG/dDpMe (ou vIPAG/LPT) expriment la protéine de fluorescence mCherry. C : Les neurones GABA de la vIPAG/dDpMe envoient des projections sur le SLD (SubC). D-E : Les fibres GABAergiques de la CeA exprimant eYFP sont localisées aux environs des corps cellulaires des neurones GABAergique de la vIPAG (D) et du dDpMe (E). F : Les projections GABA de la vIPAG/dDpMe sont localisées dans la région du SLD (d'après Snow et al., 2017)

b) Le cortex préfrontal

Le cortex préfrontal médian (mPFC) semble être une structure essentielle dans la gestion des émotions positives chez l'humain et l'animal. Chez l'homme, l'activité dans le mPFC par TEP est corrélée avec le sentiment subjectif de bonheur ressenti par les sujets (Damasio et al., 2000). L'étude de l'activité par IRMf montre une activation sélective du mPFC lors de la présentation d'un stimulus visuel plaisant (Sabatinelli et al., 2007) ou d'une récompense (Knutson et al., 2003; Rogers et al., 2004). Ces observations cliniques ont amené certaines équipes de recherche à étudier les mécanismes neuronaux des émotions positives chez l'animal. Ainsi, il a été démontré que l'administration de chocolat et de sucre augmentait l'expression du c-Fos dans le mPFC chez le rat (Schroeder et al., 2001; Mitra et al., 2011). D'autre part, lors d'une stimulation électrique dans le mPFC, le rat émet des vocalisations ultrasoniques, supposées être le reflet d'un plaisir ou d'une émotion positive chez cet animal (Burgdorf et al., 2007). Chez le rat également, l'injection d'agonistes GABA_A et GABA_B au niveau du mPFC diminue la réponse comportementale de renforcement positif (Ishikawa et al., 2008a, 2008b). L'ensemble de ces résultats traduit du rôle du mPFC dans les processus d'émotion positive.

Cortex préfrontal et la NT1

Chez les sujets narcoleptiques et contrôles, la mesure de l'activité cérébrale par IRMf montre une activation du mPFC lors d'un protocole de récompense (Ponz et al., 2010). Une seule étude menée en 2013 par l'équipe de Thomas E. Scammell s'est focalisée sur le rôle potentiel du mPFC dans la cataplexie chez la souris (Oishi et al., 2013). Les auteurs ont tout d'abord identifié par l'immunomarquage du c-Fos, les régions cérébrales actives après une période de cataplexies induites par le chocolat. Parmi elles, deux sous-structures du mPFC ont montré une forte corrélation entre le nombre de cataplexies et le nombre de neurones marqués Fos+ : le cortex cingulaire antérieur (ACC) et le cortex prélimbique (PLC). L'expression dans ces régions d'un canal chlore modifié et activé par la drogue exogène IVM, a permis l'inhibition réversible et de longue durée de ces neurones. Cette inhibition a diminué de moitié le nombre de cataplexie induite par le chocolat, en revanche elle ne diminuait pas les cataplexies basales. La même équipe a récemment obtenu des données assez similaires par inhibition des neurones GABA de la CeA (Mahoney et al., 2017). L'amygdale et le mPFC sont deux structures anatomiquement et fonctionnellement liées, et ont ainsi des effets assez similaires dans l'apparition des cataplexies.

Il a été montré que l'ACC/PLC du mPFC innervait la BLA chez le rat et la souris (Vertes, 2004; Oishi et al., 2013). Les synapses au contact des neurones de la BLA sont asymétriques ce qui suggère que celles-ci seraient excitatrices (BrinleyReed et al., 1995). Par ailleurs, les neurones de la BLA sont également actifs pendant les cataplexies. Il est probable que le rôle du mPFC sur les cataplexies passe par son interaction avec les neurones de l'amygdale et notamment de la BLA. Elle pourrait relayer l'information via ses projections vers la CeA (Savander et al., 1995) qui elle-même jouerait un rôle dans l'apparition des cataplexies. L'ACC/PLC envoie également des projections sur les neurones MCH de l'hypothalamus latéral (Oishi et al., 2013). Or, les neurones MCH, actifs pendant le SP, envoient des projections inhibitrices sur une région impliquée dans la suppression du SP : la vlPAG/dDpMe (Verret et al., 2003; Clement et al., 2012). Ainsi, en parallèle à l'action de la CeA, le mPFC pourrait activer les neurones MCH et, en absence d'orexine, engendrer la désinhibition de la vlPAG et ainsi l'activation du réseau de l'atonie du SP pour induire une cataplexie.

II. Modèle du réseau

1. Hypersomnolence diurne

Bien que ces données soient complexes et parfois contradictoires, l'hypothèse générale pour expliquer l'hypersomnolence serait la suivante :

Chez un sujet sain, les neurones à orexines maintiennent un tonus éveillant sur les noyaux monoaminergiques du LC et du TMN pendant les phases d'éveil. Ce tonus permet à ces derniers de

maintenir une activité soutenue suffisamment longue pour garantir un éveil prolongé. Chez le sujet narcoleptique, la perte des neurones à orexine diminuerait le tonus sur les neurones de l'éveil. Selon cette hypothèse, lors de phases d'éveil prolongées ou de périodes d'inactivité, les neurones NA du LC et His du TMN ne sont plus soutenus par la voie Orex et tendent à diminuer leur taux de décharge. Cette baisse de régime permettrait la survenue de phases de sommeil par le biais de mécanismes encore méconnus.

2. Cataplexie

Les données actuelles sont insuffisantes pour comprendre quels sont les mécanismes neurobiologiques à l'origine des cataplexies. Toutefois, l'hypothèse actuelle selon laquelle la cataplexie emprunterait la voie neuronale de l'atonie musculaire spécifique du SP propose le modèle suivant.

La cataplexie serait provoquée par l'activation pendant l'éveil des neurones glutamatergiques du SLD - responsables de l'atonie musculaire du SP - consécutive à une émotion forte. La survenue d'une émotion forte va activer les aires limbiques (cortex préfrontal, amygdale). Le signal « de sortie » des aires limbiques serait généré dans les neurones GABAergiques de la CeA. Les neurones de la CeA inhiberaient alors les neurones de la vlPAG/dDpMe responsables du tonus inhibiteur sur le SLD. L'inhibition étant levée, le SLD va pouvoir s'activer et provoquer l'inhibition des MTN- α spinaux par l'intermédiaire des prémotoneurones glycinergiques de la VMM. De plus, le signal inhibiteur en provenance de l'amygdale pourrait engendrer la diminution de l'activité du DR et l'arrêt d'activité du LC. Il est à noter que le LC est impliqué dans la potentialisation de l'activité des MTN, son arrêt d'activité pourrait participer à la perte de tonus musculaire.

Chez le sujet sain, également soumis à des émotions positives, la présence des neurones à Orex empêcherait l'activation du SLD via différentes voies neuronales (Fig IV.14). (1) Les neurones à Orex stimulent les neurones 5-HT du DR et permettent le maintien de leur activité soutenue pendant l'éveil. Les neurones 5-HT favoriseraient l'inhibition de l'amygdale. L'activité importante des neurones 5-HT pendant l'éveil empêcherait donc l'amygdale d'inhiber la vlPAG/dDpMe, et les neurones glutamatergiques du SLD seraient maintenus inactifs. (2) Il a été proposé que les neurones à Orex stimulent directement la vlPAG/dDpMe GABAergique au cours de l'éveil. Le tonus inhibiteur sur le SLD serait alors renforcé. Lors d'une émotion positive, la vlPAG/dDpMe serait soumise à une compétition entre le signal excitateur des Orex et le signal inhibiteur en provenance de l'amygdale. Ainsi la vlPAG/dDpMe ne serait pas suffisamment inhibée et maintiendrait le SLD éteint.

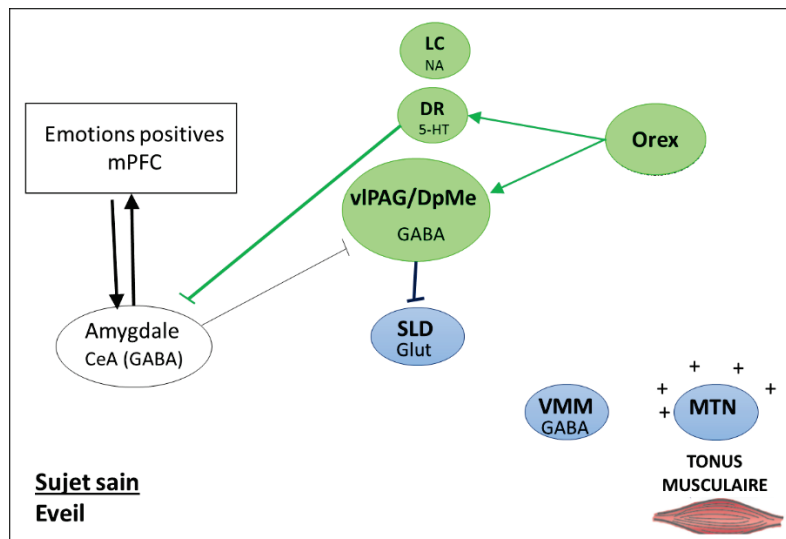


Figure IV-14: Représentation schématique du réseau neuronal recruté lors de la survenue d’une forte émotion chez un sujet sain.

Chez le sujet narcoleptique, la perte des neurones à Orex aurait deux conséquences majeures (Fig.IV-15). (1) Les neurones 5-HT du DR ne maintiennent plus une activité soutenue pendant l’éveil, l’amygdale n’est donc plus suffisamment inhibée. Ceci provoquerait l’augmentation d’activité du système amygdalien observable chez les sujets NT1. Lors d’une forte émotion positive, la trop forte activation de l’amygdale engendrerait l’inhibition de la vIPAG/dDpMe et la levée d’inhibition sur le SLD. (2) La vIPAG/dDpMe ne serait plus directement stimulée par les Orex et serait alors plus susceptible d’être inhibée par l’amygdale.

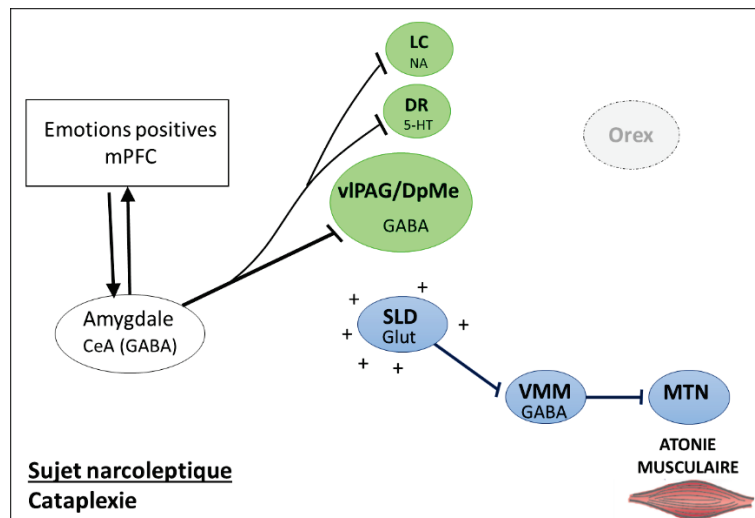


Figure IV-15 : Représentation schématique du réseau neuronal recruté lors de la survenue d’une émotion chez un sujet narcoleptique et du déclenchement d’une cataplexie.

OBJECTIFS HYPOTHESES

L'ensemble des données exposées ci-dessus montre à quel point la régulation du sommeil paradoxal a été mise en cause dans la narcolepsie, bien que les données soient encore peu nombreuses et parfois contradictoires. Dans ce contexte scientifique, nous avons voulu répondre à deux questions nous ont semblé essentielles :

- Est-ce que la narcolepsie est une pathologie de l'éveil ou une dys-régulation de l'éveil et du SP ?
- Est-ce que la cataplexie est un état dissocié du SP pendant l'éveil ?

1) LA NARCOLEPSIE EST-ELLE SEULEMENT UNE PATHOLOGIE DE L'EVEIL OU EGALEMENT DU SOMMEIL PARADOXAL ?

L'apparition inappropriée du SP pendant la phase active et la latence raccourcie ainsi que les symptômes comme la cataplexie, les hallucinations hypnagogiques et paralysies du sommeil, ont soutenue l'hypothèse selon laquelle la NT1 serait une pathologie du SP. La découverte des neurones à Orex, leur rôle dans la promotion de l'éveil et leur absence dans la NT1 ont suggéré une dérégulation spécifique de l'éveil dans cette pathologie. Ainsi la NT1 serait une pathologie de l'éveil avec un dérèglement du SP consécutive à un tonus éveillant affaibli. Cependant, le SL n'est pas modifié chez les narcoleptiques et les souris Orex-KO. Il est donc possible que la narcolepsie soit une pathologie de l'éveil et du SP.

Les mécanismes de régulation du SP, que sont l'homéostasie et la régulation circadienne, pourraient ainsi être spécifiquement altérés. Le patient narcoleptique présente une régulation circadienne intacte des différentes variables physiologiques comme la température corporelle, la sécrétion hormonale etc. Le rythme circadien du SP pourrait être altéré chez le patient NT1, comme le suggère la survenue d'ESP au cours des TILE. Chez la souris Orex-KO, une variation circadienne du SP plus ou moins ample selon les études a été rapportée et suggère également une perturbation circadienne du SP. En revanche la régulation homéostatique du SP dans la narcolepsie n'a été que très peu étudiée. Une seule étude menée sur 6 sujets NT1 a rapporté un nombre augmenté d'interventions médicales pour priver spécifiquement de SP les patients NT1 (Vu et al., 2011) suggérant ainsi une propension élevée à entrer en SP. Toutefois, les contraintes cliniques ne permettent pas dans cette étude, de conclure sur la qualité de la régulation homéostatique du SP dans la narcolepsie. De plus, elle n'a jamais été étudiée chez la souris narcoleptique.

Pour répondre à notre première question, nous nous intéresserons aux processus homéostatiques de régulation du SP chez la souris narcoleptique Orex-KO. L'étude de ce modèle particulier de souris narcoleptique nous permettra d'évaluer le rôle du neuropeptide Orex dans l'homéostasie du SP. L'homéostasie du SP peut être estimée par la privation spécifique de SP. Dans

un premier temps les souris Orex-KO et leur contrôles (WT) seront privés de SP pendant 48hrs par une méthode standard de privation dite des plateformes au-dessus de l'eau. Ainsi, nous évaluerons si les souris compensent leur dette de SP durant la phase de récupération. Cette méthode étant une source de stress pour les animaux, nous procéderons à des tests comportementaux et biologiques (dosage de corticostérone) afin de s'assurer qu'une gestion différente de l'anxiété entre Orex-KO et WT ne masque les éventuels effets. Dans une deuxième partie nous priverons de SP les souris Orex-KO et WT durant 48hrs par une nouvelle méthode automatisée et développée au laboratoire. Nous estimerons ainsi la propension du SP au cours de la privation en évaluant le nombre de stimulations nécessaires pour priver les souris.

2) LA CATAPLEXIE EST-ELLE UN ETAT DISSOCIÉ DU SOMMEIL PARADOXAL ?

Le lien entre cataplexies et SP a longtemps été suggéré par la similitude physiologique entre les deux phénotypes : la perte de tonus musculaire. Des études ont pu observer d'autres points de convergence. Tout d'abord, les antidépresseurs tricycliques ont un effet réducteur sur les cataplexies et le SP (Akimoto et al., 1960; Scammell, 2003). De plus, le reflexe monosynaptique de Hoffman et l'activité du tendon profond sont absents pendant le SP et les épisodes de cataplexies (Dauvilliers et al., 2003; Overeem et al., 2004). Enfin, des études électrophysiologiques menées chez le chien narcoleptique ont identifiés des neurones de l'amygdale ou de la medulla ayant des patterns d'activité similaire au cours du SP et des cataplexies (Siegel et al., 1991; Gulyani et al., 2002) suggérant que des structures neuronales sont activées au cours des deux phénotypes.

Toutefois les cataplexies et le SP sont physiologiquement distincts. Tout d'abord, la cataplexie se distingue par une conscience préservée et une induction émotionnelle (Dauvilliers et al., 2007). Au cours du SP la pression sanguine et rythme cardiaque sont instables ; pendant les cataplexies la fréquence cardiaque est diminuée et la pression sanguine stable. De plus des études d'imagerie cérébrale ont mis en évidence des structures neuronales spécifiquement actives pendant la cataplexie ou le SP mais pas les deux. Chez l'animal, certains neurones comme les neurones à Histamine du TMN ont également des patterns de décharge différents pendant SP et cataplexies (John et al., 2004). Ces données suggèrent que la cataplexie et le SP sont deux états distincts.

La cataplexie est alors décrite comme un état dissocié du SP. Cette dissociation est définie comme l'intrusion de l'atonie musculaire spécifique du SP au cours de l'éveil et sous-tend l'existence d'un réseau neuronal commun entre l'atonie du SP et la cataplexie. Toutefois cela n'a jamais été démontré.

Comme décrit précédemment, l'atonie musculaire du SP est généré dans les neurones glutamatergiques du SLD. Aussi, dans une 2^{ème} étude, nous tenterons de déterminer si la cataplexie est due à l'activation inopportune des neurones glutamatergiques du SLD. Pour cela nous

bloquerons de façon permanente la transmission glutamatergique dans les neurones du SLD par la méthode d'ARN interférent dite *short-hairpin RNA* (shRNA). Cette méthode repose sur l'abolition spécifique de l'expression du transporteur vésiculaire 2 du glutamate (vGlut2) par l'injection locale d'un ARN interférent : le shGLUT. L'efficacité de cette technique sur les neurones glutamatergiques du SLD a récemment été mise en évidence chez le rat au sein de l'équipe (Valencia-Garcia et al., 2017). L'utilisation du shRNA sur notre modèle de souris narcoleptiques Orex-KO devrait nous permettre (1) d'induire des épisodes de SP sans atonie musculaire (2) d'évaluer l'implication de cette voie neuronale dans la cataplexie. Les cataplexies murines étant peu nombreuses en condition basales, les souris Orex-KO seront soumises à des protocoles d'induction de cataplexie pour répliquer nos observations sur un grand nombre d'épisode.

MATERIEL ET METHODES

I. ANIMAUX

L'ensemble des expérimentations a été réalisé sur des souris mâles sauvages, dites wild-type (WT) et narcoleptiques de type orexine knock-out (Orex-KO) (Chemelli et al., 1999). Ces deux types de souris sont de fond génétique C57Bl6 et sont obtenues par croisements entre individus hétérozygotes (ALECS-SPF, Lyon). Les souris sont au minimum âgées de 8 semaines au début des expérimentations. Elles sont logées en stabulation dans des cages avec enrichissement (Envirodry) et accès ad libitum à l'eau et à la nourriture, dans une pièce de stabulation maintenue à $23\pm 1^\circ\text{C}$. La lumière est cyclée selon un rythme lumière/obscurité de 12h (lumière allumée à 8h).

La souris Orex-KO a été générée en remplaçant l'exon 1 du gène codant pour la prépro-hypocrétine par un vecteur contenant une cassette néo et un gène rapporteur lacZ. Ce vecteur a été introduit dans des cellules souches embryonnaires de souris. Il s'est inséré par recombinaison homologue à la place de l'exon 1. Ainsi, le gène de la prépro-hypocrétine est délété. Ces souris ont un phénotype narcoleptique reconnu (Chemelli et al., 1999).

II. POLYSOMNOGRAPHIE

La polysomnographie est l'enregistrement de différentes variables physiologiques permettant de déterminer l'état de vigilance d'un individu ou d'un animal. Il regroupe classiquement l'enregistrement de l'activité corticale (EEG) du tonus musculaire (EMG) et peut également comprendre l'enregistrement des mouvements oculaires (EOG). Dans nos études, nous avons uniquement utilisé l'EEG et l'EMG pour distinguer les différents états de vigilance. L'activité EEG est mesurée par une différence de potentiel électrique entre une électrode corticale positionnée au-dessus du cortex et une électrode de référence fixée au-dessus du cervelet - on parle de signal référentiel ou d'enregistrement unipolaire. L'activité électrique enregistrée reflète essentiellement l'activité des neurones corticaux proches de l'électrode. L'amplitude des ondes de l'EEG et leur fréquence s'expliquent par des phénomènes de synchronisation de populations de neurones qui varient en fonction des états de vigilance. Le signal frontal, collecté par l'électrode située au-dessus du cortex frontal, permet de distinguer nettement les ondes delta caractéristiques du SL, tandis que les ondes thêta générées dans l'hippocampe sont plus facilement visibles sur l'EEG collecté par l'électrode pariétal. L'électrode de référence est placée au-dessus du cervelet car les ondes delta et thêta sont quasiment inexistantes dans cette région de l'encéphale.

1. Electrodes

Les électrodes EEG sont constituées d'une vis de 1 mm de diamètre (Plastic One, USA) reliée à une pinuche aurifiée (Plastics One, USA) par un fil d'acier multibrin fin et souple (Medwire, USA). L'électrode EMG est formée d'une pinuche aurifiée, et d'un fil d'acier multibrin avec à son extrémité une petite boule d'étain aurifiée, qui sera insérée entre 2 couches des muscles posturaux de la nuque.

2. Chirurgie : Implantation EEG/EMG

La souris est tout d'abord anesthésiée par injection intra-péritonéale (i.p.) d'un mélange d'anesthésique, la Kétamine (100mg/Kg, Bayer Health Care) et d'analgésique, la Xylazine (10mg/Kg, Virbac France). Au cours de la chirurgie, la profondeur de l'anesthésie est contrôlée en testant la réactivité de l'animal à un pincement de la pâte arrière. Si un complément d'anesthésique est nécessaire : on injecte d'abord une demi-dose de kétamine (50 mg/kg) à l'animal. Puis si l'animal se réveille à nouveau, on injecte une demi-dose du mélange de kétamine:xylazine (50:5 mg/kg) et on réitère ces injections si nécessaire.

Une fois la souris profondément endormie, la peau de son crâne est rasée. Puis la tête de l'animal est fixée dans l'appareil stéréotaxique (David Kopf Instruments, CA, USA) grâce aux barres d'oreilles et au support de gueule qui bloque ses incisives. La peau est alors recouverte d'une solution iodée (Bétadine) pour désinfecter avant l'incision, et un gel ophtalmique est appliqué sur les yeux pour éviter leur dessèchement. Une incision est effectuée au scalpel selon l'axe antéropostérieur sur toute la longueur du crâne. L'os du crâne est décapé à l'aide d'un tampon stérile imbibé d'eau oxygénée (H₂O₂, 30%). Des trépanations sont effectuées afin de permettre la mise en place des électrodes EEG. Les trois électrodes EEG en acier inoxydable sont vissées dans l'épaisseur du crâne de l'animal au-dessus du cortex frontal (1,5 mm antérieur au Bregma, 1,7mm latéral à la ligne médiale), pariétal (2,5 mm postérieur au Bregma, 1,7mm latéral à la ligne médiale) et cérébelleux (6 mm postérieur au Bregma). Les deux électrodes EMG sont ensuite glissées entre les couches musculaires de la nuque. Préalablement à l'insertion des EMG, l'anesthésique local, la lidocaïne (Xylovet, Ceva Santé) est appliqué au niveau des tissus musculaires afin de réduire la gêne de l'animal. Le crâne est ensuite recouvert de ciment acrylique (Superbond, Henri Schein) afin de fixer solidement les électrodes à l'os. Les pinuches aurifiées des électrodes EEG et EMG sont ensuite introduites dans un connecteur à 6 branches (Plastics One, Bilaney, Düsseldorf, Germany) placé le plus près possible du crâne, pour minimiser la gêne de l'animal. L'ensemble est fixé à l'aide de ciment dentaire (Paladur, Heraeus Kulzer, Allemagne) puis la plaie est suturée à l'arrière de l'implant et une solution iodée est appliquée pour nettoyer la plaie.

Si la chirurgie a été longue ou que l'animal a du mal à récupérer, il reçoit une injection sous-cutanée d'un mélange de l'anti-inflammatoire et analgésique Rimadyl (Pfizer, France), de glucose à 5% (Lavoisier, France) et de NaCl afin de le réhydrater et de faciliter l'élimination de l'anesthésique. Les souris implantées sont ensuite laissées pour récupération dans des cages individuelles dans la pièce de stabulation du laboratoire pendant au moins une semaine.

3. Enregistrements polysomnographiques

Après la période de récupération, les animaux sont placés dans un baril en plexiglas transparent de 30 cm de diamètre contenant un milieu enrichi. Le fond du baril d'enregistrement est recouvert de sciure, et on dispose un lego et des lamelles de papier (Envirodry) afin d'enrichir le

milieu environnant, ainsi qu'un petit bol dans lequel l'animal fait généralement son nid. L'eau et la nourriture sont en accès ad libitum. Les barils sont introduits dans un caisson d'enregistrement par séries de 4. Le connecteur sur la tête de la souris est relié au système d'amplification du signal par un câble flexible de 60 cm (Plastics One, Bilaney, Düsseldorf, Germany). Ce dispositif permet à l'animal de se déplacer librement à l'intérieur du baril. Le caisson d'enregistrement est ventilé, isolé phoniquement et électriquement et présente le même cycle lumière/obscurité et la même température que dans les conditions de stabulation. Les signaux polysomnographiques sont ensuite amplifiés (2000 fois pour les EEG et 5000 fois pour les EMG) puis filtrés (EEG : 0,3Hz-100Hz; EMG : 1Hz-100Hz) à l'aide d'un amplificateur 16-canaux model 3500 AM System (US). Les signaux sont ensuite numérisés à 512 Hz par une carte d'acquisition de données NI Usb 6343 (National Instrument, Austin, US) et récupérés grâce au logiciel Sleepscore (Viewpoint, Lyon, France) développé au sein de l'équipe SLEEP (Libourel et al., 2015).

L'analyse des arrêts comportementaux et des mouvements pendant le SP chez la souris narcoleptique nécessite un dispositif d'enregistrement vidéo. Une caméra (Point Grey firefly MV) est placée au-dessus de chaque baril et permet l'enregistrement d'une vidéo en noir et blanc à 15 images/sec à la résolution de 640x480 pixels. Des lampes infrarouges (Viewpoint, Lyon, France) sont disposées à l'intérieur du caisson au-dessus de chaque baril afin de garantir un enregistrement vidéo de qualité, avec des paramètres stables de jour comme de nuit. Enfin, les données vidéo sont acquises et synchronisées aux enregistrements EEG et EMG grâce au logiciel SleepScore.

III. ANALYSES

1. Etats de vigilance et des arrêts comportementaux

L'analyse des états de vigilance s'effectue a posteriori sur la base des enregistrements polysomnographiques et vidéos à l'aide du logiciel d'analyse Sleepscore. Le scoring se fait manuellement sur toute la durée de la période à analyser, par l'attribution d'un état de vigilance (éveil, SL, SP, cataplexie, attaques de sommeil) à chaque fenêtre de 5 secondes. Ceci permet de créer un « Hypnogramme ». L'affichage du spectre de fréquence par fenêtres de 5 sec évalué par FFT (transformation de Fourier) peut aider à discriminer les états. La vidéo synchronisée à la polysomnographie est également essentielle dans l'analyse du phénotype narcoleptique, notamment pour discriminer sans ambiguïté les arrêts comportementaux. Les critères suivants nous ont permis de distinguer 3 états de vigilance et 2 types d'arrêts comportementaux :

A. **L'éveil** est caractérisé par une activité corticale désynchronisée et de faible amplitude comportant des ondes EEG de hautes fréquences (40Hz) ainsi que des ondes thêta (5-9Hz). L'EMG varie suivant l'activité motrice de l'animal : on observe une activité musculaire tonique ample avec de nombreux événements phasiques au cours de l'éveil actif et un tonus

musculaire plus faible pendant l'éveil calme. Sur la vidéo, l'animal montre un comportement actif (locomotion, toilettage) ou peu actif au cours de l'éveil calme.

B. **Le sommeil lent (SL)** se définit par une activité corticale synchronisée caractérisée par des ondes EEG de forte amplitude et de basse fréquence dites ondes delta (0-4 Hz). L'activité EEG au cours du SL révèle également la présence de fuseaux (ou spindles en anglais), des ondes rapides 10-14Hz qui se manifestent par bouffées. L'activité musculaire EMG est très réduite, et ne montre aucun événement phasique. Les épisodes de SL ont lieu dans le nid, et la souris est dans une position assez spécifique, généralement enroulée sur elle-même.

C. **Le sommeil paradoxal (SP)** présente une activité corticale désynchronisée (comme au cours de l'éveil). L'EEG montre une prédominance du rythme thêta (5-9 Hz) de faible amplitude. L'activité musculaire diminue par rapport au SL, reflétant l'atonie spécifique de cet état. La présence de secousses musculaires peut également être visible mais rare et se manifeste par des événements phasiques sur l'EMG. Il est important de noter que dans l'étude 2 l'objectif était d'induire une perte d'atonie musculaire pendant le SP. Le critère « atonie musculaire » dans l'identification du SP a donc été ignoré dans cette étude. L'enregistrement vidéo a alors été essentiel pour déterminer sans ambiguïté que la souris était bien en SP sur la base de la position d'endormissement bien spécifique conservée au cours de l'épisode et de sa présence dans le nid. De plus, le retour à l'éveil est également marqué par un changement d'activité cérébrale bien visible sur les signaux EEG.

D. **Les cataplexies** ont été définies selon les critères consensuels internationaux suivants (Scammell et al., 2009) : (1) l'épisode de cataplexie est toujours précédé d'au moins 40 sec d'éveil, (2) l'EMG montre une atonie soudaine d'au moins 10 sec (3) l'animal est immobile durant l'épisode, (4) l'EEG est dominé par un rythme thêta (5) la fin de l'épisode est marqué par un retour brusque de l'activité comportementale. Ces épisodes ont toujours lieu en dehors du nid et font généralement suite à un éveil très actif avec un comportement orienté comme le toilettage, l'exploration, le fait de creuser dans la sciure. Nous avons pu déterminer au cours de cette étude que parfois, la perte de tonus musculaire n'est pas maximale. Aussi, l'analyse concomitante de l'EEG et de la vidéo est essentielle à la détection de ces épisodes.

2. Analyse de l'EMG

Le tonus musculaire est un phénotype complexe contenant deux composantes : l'une tonique et l'autre phasique (mouvements, twitches). Afin d'analyser de façon objective si le tonus musculaire est altéré pendant le SP, nous avons étudié indépendamment les deux composantes musculaires du SP. Les tracés EMG ont été analysés grâce à un script développé au sein de notre laboratoire (PSquantif, MatLab).

Pendant le SP

Tout d'abord, pour chaque épisode de SP nous avons supprimé les 5 premières et 5 dernières secondes de l'épisode afin de s'affranchir des phases de transition et nous n'avons sélectionné que les épisodes de SP d'au moins 20 sec. Les signaux EMG sont recentrés sur zéro puis rectifiés : c'est-à-dire que les valeurs absolues sont calculées en chaque point du signal. Puis un filtre d'une résolution de 0.2 sec va permettre de « lisser » le signal afin de s'affranchir des variations artéfactuelles de faibles fréquences comme les battements du cœur captés par l'EMG. Pour chaque épisode de SP, un seuil de détection des événements phasiques est ensuite évalué à partir de l'amplitude moyenne du tonus musculaire au cours des 30 sec de SL qui précède. En effet, il est défini par la valeur quantile 95% des valeurs du SL. Ce seuil est calculé pour chaque épisode parce qu'il peut être modulé par la position de l'animal. Ainsi, toutes les valeurs qui dépassent ce seuil au cours du SP sont comptabilisées comme événements phasiques (Fig.1). Puis, les événements phasiques sont ôtés des analyses en ne comptabilisant que les valeurs au-dessous du seuil et les moyennant, permettant ainsi d'évaluer la composante tonique du SP. A partir des valeurs de l'amplitude moyenne de chaque épisode de SP et des 30 secondes de SL qui le précède, un ratio SP/SL est calculé. Les ratios de chaque épisode sont ensuite moyennés.

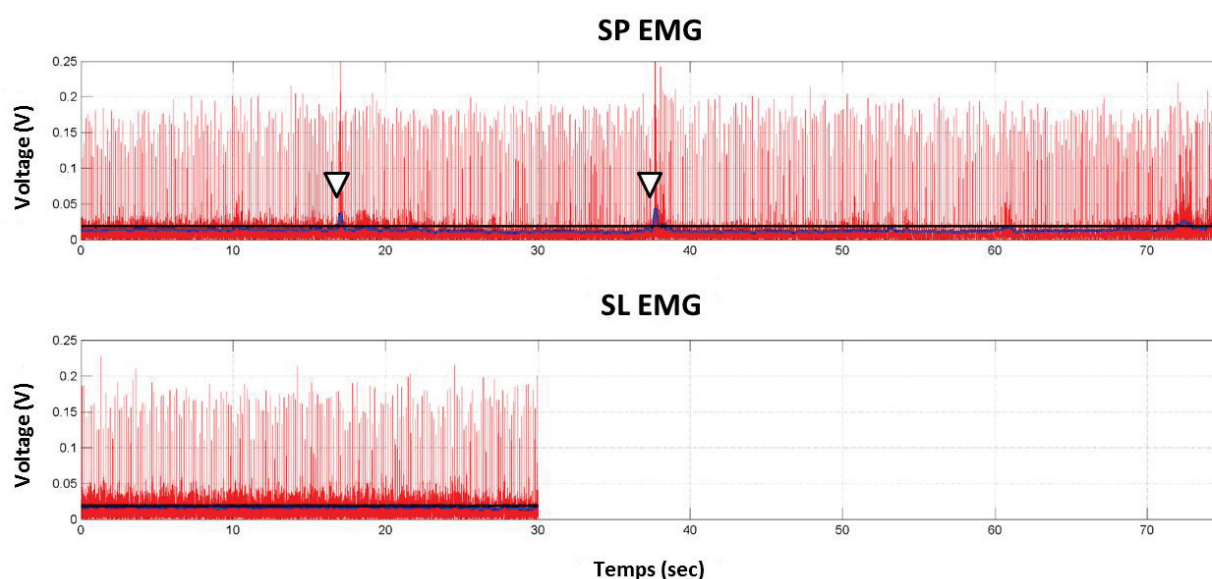


Figure 1: Tracés représentatifs de l'analyse EMG pendant un épisode de SP et les 30 sec de SL qui le précède. Le seuil (barre noire) est évalué à partir du voltage de l'EMG du SL et sert ensuite de référence pour distinguer les événements musculaires phasiques (flèches blanches) pendant le SP. Les valeurs d'EMG au-dessus du seuil sont ensuite ôtés des analyses pour évaluer la composante tonique du SP.

EMG_{NORM} des cataplexies et états de vigilances

Un épisode de cataplexie a lieu durant une période d'éveil actif, il n'est pas précédé de SL. Aussi, nous avons utilisé un autre mode d'analyse pour quantifier le tonus musculaire durant la cataplexie et les états de vigilance. De la même manière que pour le SP, les signaux EMG sont centrés, rectifiés et filtrés. Puis le signal EMG est moyenné par fenêtre de 5 sec sur l'ensemble du fichier d'analyse. Une normalisation du tonus musculaire de tous les états, entre 0 (amplitude minimale) et 1 (amplitude maximale), est ensuite effectuée pour pallier à la variabilité interindividuelle. Puis la valeur du tonus musculaire est moyennée pour l'éveil, le SL, le SP et la cataplexie sur tous les épisodes et pour chaque souris. La valeur obtenue est appelée EMG_{NORM}.

3. Analyse spectrale EEG

Le spectre de fréquences d'ondes EEG au cours du SP et des cataplexies a été caractérisé afin de rendre compte de l'activité corticale au cours de ces états. Cette analyse a été effectuée grâce à un script développé par P-A Libourel sur le logiciel MatLab. Pour chacun des états, les 5 premières et dernières secondes de chaque épisode ont été éliminées pour ne pas compter les phases de transitions entre les états. Un spectre de fréquence a ensuite été généré par la Transformée Rapide de Fourier (FFT) par fenêtres d'analyses de 5 sec. Cette méthode consiste à décomposer le signal EEG en un spectre de fréquences comprises entre 0 et 40 Hz avec une résolution de 0,2 Hz. Ensuite, la somme de ces spectres de fréquence est calculée pour chaque état de vigilance. Enfin la densité spectrale de chaque bande de fréquence est calculée est définie comme la puissance relative normalisée par rapport à la puissance totale du spectre et exprimé en pourcentage. Ces densités spectrales sont ensuite moyennées pour tous les animaux d'un même groupe, ce qui permet la comparaison entre les différentes conditions expérimentales.

4. Actimétrie

La quantification des mouvements observés au cours des épisodes de cataplexies a été également analysée à partir des enregistrements vidéo. Chaque valeur d'actimétrie représente un nombre de pixels dont le niveau de gris est modifié entre deux images successives (20ms), lorsque l'animal bouge. L'analyse de l'actimétrie a été effectuée à l'aide d'un script MatLab développé au laboratoire (EMGActiMap). Les 2 premières et dernières secondes de chaque épisode de cataplexie ont été supprimées afin d'exclure les transitions de l'analyse. De plus, seuls les épisodes d'une durée minimum de 15 secondes ont été traités. Pour chaque épisode de cataplexie, une aire d'analyse ne comprenant que le corps de la souris a été manuellement définie afin de s'affranchir des mouvements du câble dus à la respiration de l'animal. Chaque valeur d'actimétrie dépassant le seuil de 800 pixels/sec est comptabilisée comme un mouvement significatif de l'animal (Fig.2).

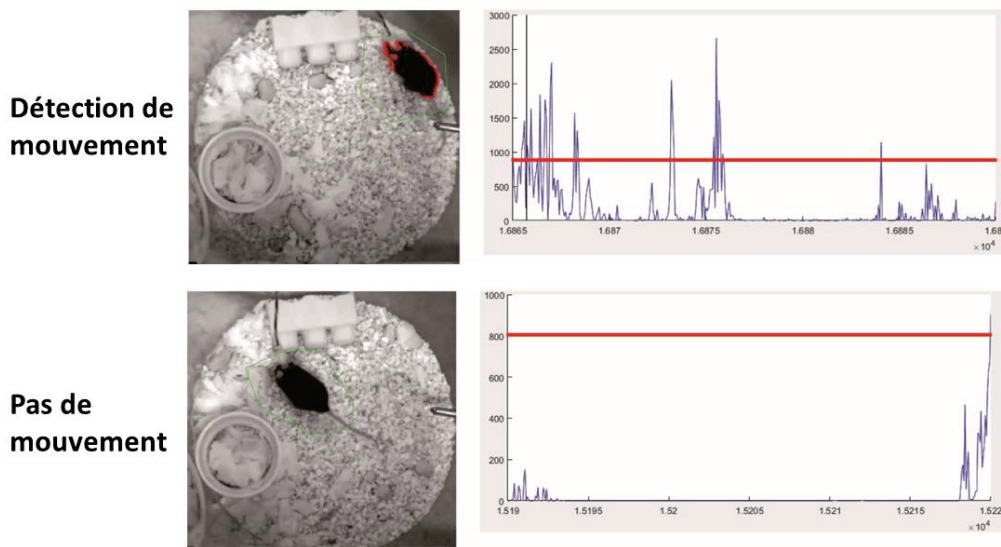


Figure 2 : Tracés représentatifs de l'analyse actimétrique de la vidéo. Le seuil (barre rouge) a été défini à 800 pixels/ secondes. A chaque fois que la différence entre deux images successives dépasse ce seuil, on considère que le mouvement de l'animal est significatif.

IV. PRIVATION DE SOMMEIL PARADOXAL

1. Privation par la méthode piscine (small-platforms-over-water)

Les souris sont placées individuellement dans un baril en plexiglas dont le fond est recouvert d'1cm d'eau tiède ne dépassant pas 1 cm de profondeur, contenant deux plots surélevés, une mangeoire et un accès à l'eau de boisson (Fig.3). La privation débute à 10H, heure de la journée durant laquelle les souris font naturellement une grande quantité de SP. Grâce aux deux plots, les souris peuvent se déplacer, se nourrir et boire, tout en restant hors de l'eau. La taille des plots (2,5cm de diamètre) est suffisamment grande pour que la souris puisse se tenir assise et faire du sommeil lent ou de l'éveil calme mais trop petite pour que la souris se maintienne sur le plot lorsqu'elle entre en SP. En effet, l'atonie musculaire spécifique des phases de SP va dans un premier temps provoquer leur chute dans l'eau et les réveiller, puis elles vont éviter d'entrer en SP afin de rester hors de l'eau. Suite aux 48 hrs de privation, les animaux sont réintroduits dans leurs barils d'habitude où ils peuvent rembourser la dette de SP accumulée lors de la privation. Ainsi, la phase de récupération débute à 10H afin d'optimiser l'hypersomnie de SP. Une étude du laboratoire a validé cette méthode chez la souris, montrant que la privation est spécifique du SP et qu'elle induit un rebond de SP dans les premières heures de la période de récupération (Arthaud et al., 2015). Cette même méthode a par ailleurs été largement utilisée et validée chez le rat au sein de l'équipe (Boissard et al., 2003 ; Clement et al., 2011). Les souris sont dans les conditions d'enregistrements polysomnographiques classiques décrites précédemment, et l'acquisition se fait tout au long de

l'expérience : 24hrs de condition basale, 48hrs de privation et 10hrs de récupération (de 10H à 20H soit ZT2 – ZT12).

2. Privation automatique

Les privations automatiques sont réalisées dans des caissons individuels non-équipés en enregistrement vidéo (Fig.3). Les souris sont manipulées en parallèle par séries de 2 (une souris WT, une souris KO au minimum). Chaque souris est placée dans un baril cylindrique contenant une plateforme posée sur un ressort pneumatique, lui-même actionné par un électro-aimant, et recouverte de sciure. Les signaux EEG et EMG sont collectés comme décrit précédemment (voir Polysomnographie) et enregistrés en continu pendant toute la durée de l'expérience. Durant 5 jours, les souris sont habituées aux conditions expérimentales et à ce nouvel environnement. Les données polysomnographiques en condition basale sont ensuite acquises pendant 24 heures. Enfin, la privation automatique de SP débute à 10H pour une durée de 48H. Durant la période de privation, les tracés EEG/EMG de chaque souris sont analysés en temps réel grâce à un algorithme. Dès la détection d'une seconde SP (selon les critères décrits chapitre Polysomnographie), le logiciel envoie un signal électrique TTL vers l'électroaimant situé sous la plateforme pour la soulever. La souris reçoit une stimulation par seconde et les secousses de la plateforme s'arrêtent dès lors que la souris se réveille. Ce système automatisé a été développé par PA Libourel et D Gervasoni au sein de notre équipe ([Libourel et al., 2015](#)).

Préalablement aux enregistrements en condition basale, les tracés sont analysés à l'aide du logiciel Sleepscore afin de créer un fichier de référence calibré finement aux spécificités de chaque souris. Ceci permet d'adapter à chaque animal, l'algorithme permettant l'analyse des signaux et ainsi d'optimiser la reconnaissance en temps réel des états de vigilance pendant la privation. Une fois le fichier de référence créé, nous avons vérifié que l'analyse en temps réel était fiable et conforme aux critères d'analyses. La privation automatique peut alors débuter. Suite à la privation, les données polysomnographiques des 48 heures de privation sont analysées off-line. Il est important de noter que l'absence de vidéo dans les caissons de privation automatique exclut l'analyse des arrêts comportementaux chez les souris narcoleptiques. Le nombre de stimulations nécessaires pour réveiller l'animal est également enregistré et analysé via le logiciel Hypnopack développé par P-A Libourel et D Gervasoni.

V. TESTS COMPORTEMENTAUX

Les souris ayant passé les tests comportementaux d'anxiété n'ont pas été implantées. Elles sont hébergées par fratries dans une armoire ventilée dans laquelle la température et le cycle lumière/obscurité sont identiques aux conditions classiques de stabulation. Cependant, l'intensité lumineuse pendant la période éclairée est maintenue à 80 lux dans l'armoire ventilée. Durant la

semaine qui précède les tests, l'expérimentateur procède à une manipulation quotidienne des souris pendant 10 minutes, sauf les jours de tests, permettant l'habituation des souris à l'expérimentateur. Trente minutes avant chaque test, les souris sont isolées dans des cages individuelles conservées dans l'armoire ventilée, dans le but de les habituer aux conditions de séparation du groupe pendant l'expérience. Le test de l'openfield (OF) est réalisé en premier car il est le moins stressant pour la souris, et celui du double compartiment (ou light-dark box, LDB) trois jours plus tard. Tous les tests ont été réalisés entre 14H et 16H en conditions basales ou à 10H après privation de SP par la méthode de la piscine.

1. Test de l'Openfield

Le test consiste à placer une souris dans une large arène (50cm x 50cm x 45 cm) qui lui est inconnue, afin d'observer son comportement (Fig.3). Il permet d'évaluer l'activité locomotrice de l'animal et son anxiété basale. Le test dure 45min et s'effectue dans le noir. Il est basé sur le postulat que la zone centrale est plus anxiogène que la zone périphérique pour la souris. Ainsi, plus une souris est anxieuse, moins elle explorera la zone centrale. Nous avons testé les souris 4 par 4 (2 KO et 2 WT). Les arènes sont nettoyées avec de l'eau après chaque animal. Le déplacement des animaux est traqué grâce à une caméra infrarouge située au-dessus des 4 arènes et reliée au système VIDEOTRACK (Viewpoint, Lyon, France). Le logiciel d'analyse d'actimétrie permet de définir une zone centrale (40cm x 40cm), et quantifie sur des fenêtres de 5 minutes, la distance parcourue dans l'arène ainsi que la distance parcourue, la durée passée, et le nombre d'entrée réalisé dans la zone centrale. A la fin du test, les souris sont réintroduites dans leurs cages respectives avec leur fratrie.

2. Test du double compartiment ou Light Dark Box (LDB)

L'objectif du LDB est d'évaluer l'état d'anxiété des souris induit par un environnement anxiogène. Ce test est basé sur la compétition entre deux comportements spontanés chez la souris : l'aversion à la lumière vive, et l'attrait à explorer un nouvel environnement. Le LDB est une arène en plexiglas opaque divisée en deux compartiments (20cm x 20cm x 30 cm) reliés entre eux par une ouverture de 6cm de hauteur et 6cm de large (Fig.3). Le premier compartiment est noir et maintenu à l'obscurité totale, tandis que le deuxième compartiment est blanc et exposé à une source lumineuse intense d'environ 250 lux. La souris étant un animal nocturne et photophobe, le compartiment lumineux constitue un environnement aversif, alors que le compartiment sombre est plus sécurisant. L'activité locomotrice est détectée à l'aide du dispositif de vidéo-tracking (Viewpoint, Lyon, France). Le test dure 5min et débute lorsque la souris est déposée dans le compartiment sombre, la tête face à un coin dos à l'ouverture. Deux souris sont testées simultanément, une WT et une KO. Les différents paramètres évalués sont la distance totale parcourue pendant les 5 minutes ainsi que la distance parcourue, le temps passé, le nombre d'entrée et la latence de la première entrée dans la zone éclairée. Les souris anxieuses iront moins rapidement, moins longtemps et moins souvent dans

la zone éclairée. Les compartiments sont nettoyés entre chaque passage avec de l'eau et les souris sont réintroduites dans leurs cages initiales.

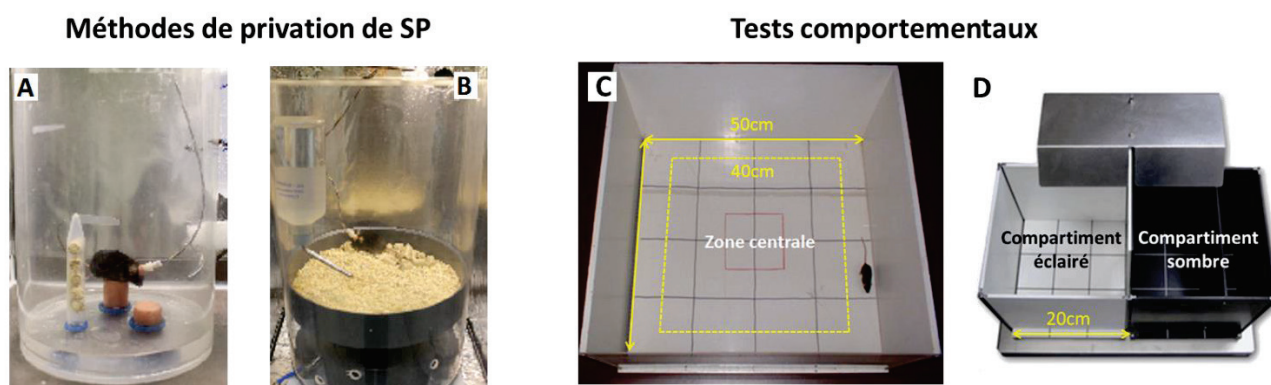


Figure 3 : Photographies de souris dans leur environnement de privation de SP par la méthode piscine (A) et automatique (B). Photographie d'une arène d'openfield (C) 50cm x 50cm x 45cm et d'une arène de light-dark box (D) 20cm x 20cm x 30cm

VI. DOSAGE DE CORTICOSTERONE PLASMATIQUE

Le taux de corticostérone plasmatique a été mesuré par dosage immuno-enzymatique (ELISA) afin d'évaluer le stress induit par la privation de SP par la méthode de la piscine. Ainsi, après 3 jours d'habituation dans des caissons individuels, et 48 heures d'expérimentation (privation de SP par la méthode piscine ou baril d'habituation), les souris sont anesthésiées profondément avec une dose létale (200mg/kg) de pentobarbital monosodique (CEVA Santé Animale, Libourne, France), administrée en intra-péritonéal. La cage thoracique est ouverte, le cœur dégagé puis le sang est ponctionné à l'aide d'une seringue héparinée introduite à l'apex du cœur. Environ 500 μ L de sang sont collectés et centrifugés à 4°C durant 5min (5000 tours/min) pour chaque souris. Ensuite, le plasma est divisé en aliquots de 40 μ L, rapidement congelés et conservés à -20°C.

Le dosage est effectué simultanément pour tous les animaux à l'aide d'un kit ELISA selon le protocole proposé par le fabricant (DetectX_Corticosterone Immunoassay kit; Arbor Assays, Ann Arbor, MI, USA). Il est basé sur une réaction immunoenzymatique compétitive. Le dosage est fait à partir de 25 μ l de plasma dilué 100 fois dans des puits d'un volume de 300 μ l chacun. Les parois des puits sont recouvertes de molécules d'IgG dirigées contre les IgG de mouton. Successivement sont ajoutés 25 μ l d'échantillon de plasma, 25 μ l de corticostérone de synthèse conjuguée à la peroxydase et 25 μ l d'anticorps de mouton dirigé contre la corticostérone. La corticostérone présente dans l'échantillon plasmatique entre en compétition avec la corticostérone conjuguée pour se lier aux IgG de mouton. La compétition se produit pendant une heure sous agitation. Après 4 rinçages permettant d'éliminer les molécules non fixées, la peroxydase conjuguée fixée va créer sous réaction d'oxydation d'un substrat, le TMB, l'apparition d'une coloration bleu-turquoise. La

réaction est arrêtée par ajout de 50µl d'acide phosphorique. La coloration bleue devient jaune. L'intensité de la coloration est évaluée par densité optique grâce à un lecteur de plaque à la longueur d'ondes de 450nm. La corticostérone conjuguée sera d'autant plus fixée et présente dans le puits, et la densité optique sera d'autant plus intense que le taux de corticostérone plasmatique sera faible. En d'autre terme, la concentration en corticostérone plasmatique est inversement proportionnelle à la densité optique mesurée. Elle est évaluée en comparaison à une courbe « étalon » élaborée en parallèle par l'ajout de quantités connues de corticostérone de synthèse fournie dans le kit.

VII. INDUCTION DES CATAPLEXIES

1. Méthode Chocolat

Le nombre de cataplexies est très faible en condition basale (1 à 2 cataplexies par heure en moyenne pendant la période d'obscurité) et variable d'un individu à l'autre (8 à 27/4h) chez la souris narcoleptique (Chemelli et al., 1999; Mahoney et al., 2017). Dans ces conditions, il est difficile de démontrer de façon certaine si le traitement permet de réduire ou d'abolir le nombre de cataplexies. Aussi, il est nécessaire d'utiliser un protocole permettant d'induire un grand nombre de cataplexies. Dans ce but, nous avons utilisé celui développé par Clark et al., (2009) qui consiste à donner une nourriture palatable comme le chocolat pendant la phase active. Chaque animal reçoit un demi carreau (environ 2g) de chocolat à 19h30 dans une petite coupelle qui est laissée dans le baril jusqu'au lendemain. Les souris sont enregistrées en polysomnographie et vidéo pendant les 12h de la phase active.

2. Méthode Piscine

Selon le postulat que la cataplexie serait un état dissocié du SP pendant l'éveil, nous avons soumis les souris au protocole de privation piscine selon la méthode précédemment décrite (chapitre Matériel & Méthodes IV.1) et quantifié les cataplexies pendant la période de récupération en terme de nombre, durée moyenne d'épisode et quantité totale.

VIII. TECHNIQUE D'ARN INTERFERENT

1. Principe

Cette technique dite d'ARN interférence est basée sur l'utilisation d'un ARN synthétique de petite taille en forme d'épingle à cheveux (short-hairpin RNA ou shRNA) conçu pour s'hybrider avec un ARN messager (ARNm) de façon complémentaire et spécifique à ce dernier. Cette interférence va donc empêcher de façon durable la traduction de l'ARNm en protéine. Dans notre étude, nous utilisons deux types de shRNA. Le premier est un shRNA ciblant l'ARNm du transporteur vésiculaire de type 2 du glutamate (vGlut2). Le blocage de l'expression du vGlut2 dans ces neurones va empêcher le glutamate d'être transporté dans les vésicules synaptiques et ainsi

inactiver de façon sélective la transmission glutamatergique excitatrice. Le deuxième est un shRNA contrôle dont la séquence est aléatoire mais ne se fixe sur aucun ARNm de souris. Le plasmide codant le shRNA a un faible taux de dégradation et une bonne stabilité, le gène ciblé est donc rendu silencieux de façon efficace pendant plusieurs mois, sans détruire la cellule infectée.

2. Mode d'action

La séquence codante pour le shRNA ainsi que la protéine fluorescente mCherry est comprise dans un brin d'ADN circulaire appelé plasmide. Ce plasmide est lui-même contenu dans un AAV, un petit virus qui a un grand tropisme pour les neurones, ne provoque pas de dégénérescence neuronale, ne s'intègre pas au génome de la cellule et ne se réplique pas. Les AAV contenant le plasmide shRNA sont injectés dans la région cérébrale d'intérêt, le SLD, et transfectent les neurones. Ce contact AAV-neurone se fait notamment entre la capsid de l'AAV et les chaînes de polysaccharides des membranes plasmiques, et le type d'interaction dépend grandement du sérotype d'AAV utilisé. Ainsi le sérotype joue un rôle déterminant dans la qualité et l'efficacité de la transfection virale. Nous utilisons dans notre étude l'AAV sérotype 10. L'AAV est ensuite endocyté dans le cytoplasme neuronal et perd sa capsid dans l'endosome. Son contenu est ensuite transmis au noyau du neurone dans lequel il va pouvoir être lu et produire les shRNA et l'ARNm du mCherry.



Figure 4 : Schéma d'un shRNA. Les deux brins complémentaires (rouge et noir) sont séparés par une boucle de paires de bases non appariés. (Illustration issue de la thèse de Valencia-Garcia 2017)

La séquence shRNA présente la particularité d'être un ARN simple brin replié sur lui-même formant ainsi deux brins complémentaires séparés d'une boucle contenant des paires de bases non appariées (Fig.4). Le shRNA synthétisé est ensuite transporté vers le cytoplasme via la protéine Exportine 5, avant d'être reconnu par la protéine Dicer qui va couper la boucle et ainsi former un ARN double brin (Fig.5). Cet ARN est ensuite reconnu et séparé par le complexe protéique RISC (RNA-induced silencing complex) : un brin est alors libéré dans le cytoplasme tandis que l'autre est incorporé de façon stable au complexe RISC. Ce dernier brin s'hybride par complémentarité à l'ARNm cible vGlut2. L'ARNm du vGlut2 n'étant plus en simple brin, le complexe est reconnu comme néfaste par la cellule et dégradé. La traduction du transporteur vGlut2 est alors durablement inactivée. L'ARNm du mCherry va quant à lui être transporté en dehors du noyau par les pores nucléaires et être traduit par les ribosomes en une protéine fluorescente mCherry. Cette protéine, exprimée dans l'ensemble du cytoplasme, le soma, les axones et dendrites du neurone. Elle émet un signal lumineux d'une longueur d'onde de 615nm (rouge) lorsqu'elle est excitée à 593nm,

permettant ainsi la localisation du site d'injection et les voies de projections des neurones transfectés.

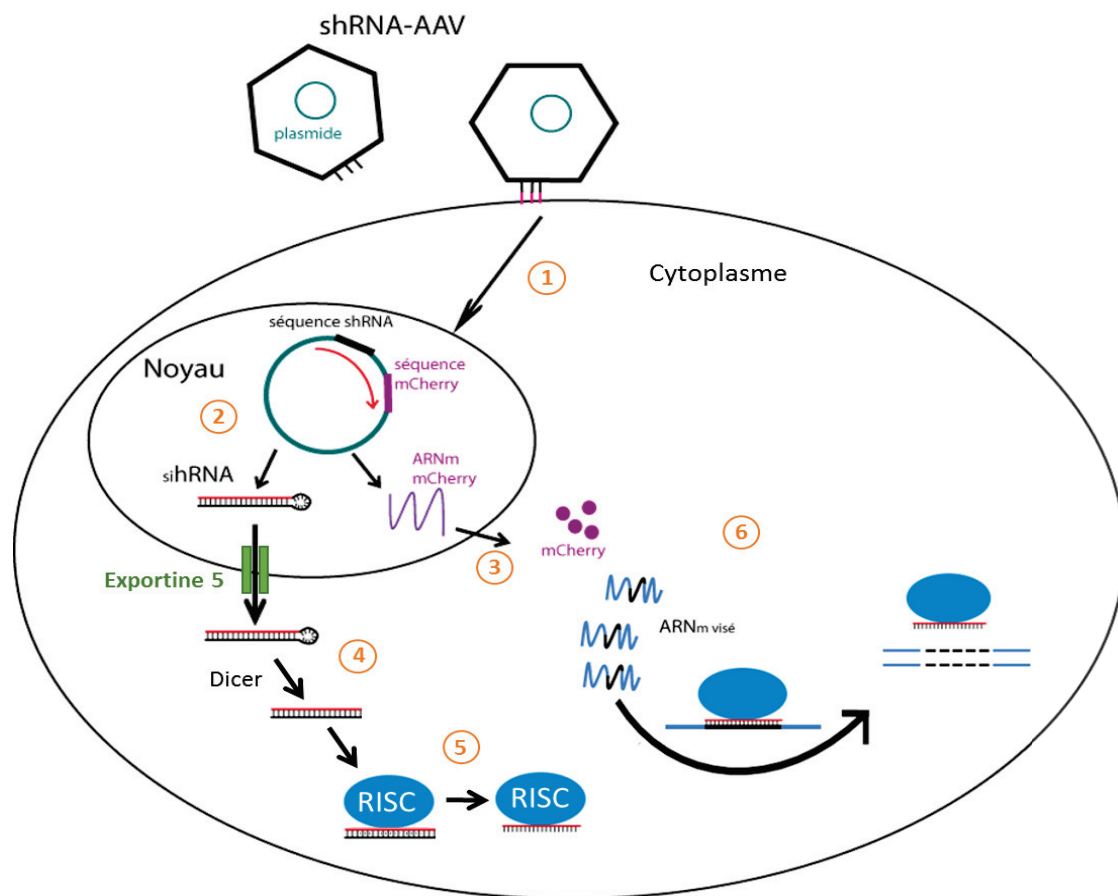


Figure 5 : Mécanismes d'action des AAV-shRNA. (1) les AAVs sont internalisés dans le neurone par endocytose (2) Le plasmide est transcrit dans le noyau donnant le shRNA et l'ARNm de mCherry. (3) L'ARNm de mCherry sort par les pores nucléaires et est traduit par les ribosomes. (4) Le shRNA est transporté par l'Exportine 5 et la boucle est coupée par la protéine Dicer. (5) l'ARN double brin est ensuite séparé par le complexe RISC. (6) RISC est activé et s'hybride à l'ARNm cible et le détruit. (Illustration issue de la thèse de Valencia-Garcia 2017)

3. Structure des AAV-shRNA

Les plasmides sont synthétisés selon le modèle suivant. Tout d'abord les ITR (répétitions terminales inversées) sont des séquences permettant de former la structure en épingle à cheveux et sont nécessaires à la synthèse du plasmide dont elles font partie. Le promoteur HI (humane promoter 1), naturellement exprimé dans les cellules de mammifères contrôle l'expression des shRNA. Le gène de la molécule rapportrice mCherry est sous contrôle d'un autre promoteur ubiquitaire, le CMV (cytomegalovirus immediate-early promoter). Par ailleurs ce gène est délimité par deux séquences (intron beta-globuline et hGH poly A) afin d'assurer le bon épissage (fusion des exons et suppression des introns) du gène rapporteur. L'utilisation de deux promoteurs différents optimise l'expression de mCherry et du shRNA dans les neurones. En effet la co-

expression du gène rapporteur et shRNA forme une structure protéique fusionnant à un microRNA pouvant diminuer l'efficacité du shRNA.

Dans cette étude, les vecteurs viraux adéno-associés (AAV) de sérotype rh10 utilisés sont synthétisés à l'Osaka Bioscience Institute, (Osaka, Japon), sous la supervision du Dr. Michael Lazarus. La composition des plasmides shCtrl et shRNA est exactement la même à l'exception de la séquence codante pour le shRNA de l'ARNm du transporteur vGlut2 (5'-TGAAACCAGAGATAGCAAATC) qui est remplacé dans le plasmide contrôle par une séquence (5'-GTCAGGCTATCGCGTATCG) ne codant pour aucun ARNm de mammifère. Le nombre de copies d'AAV du virus contrôle (shCtrl : AAV10-shControle-mCherry) et du virus interférent (shvGAT : AAV10-shvGAT-mCherry), est de respectivement 4.5×10^{12} copies/mL et 5.6×10^{12} copies/mL.

4. Injection de l'AAV, Chirurgie

Lors des chirurgies, nous procédons à l'injection d'AAV préalablement à l'implantation EEG/EMG. Les animaux opérés sont âgés de 8 à 10 semaines. La procédure d'anesthésie reste identique, l'animal est fixé à l'appareil stéréotaxique et la peau de son crâne incisée. La tête de l'animal est ensuite positionnée de façon à ce que les points de références bregma et lambda sur le crâne soient alignés sur le même plan horizontal. L'injection locale du virus est faite grâce à une micropipette de quartz de 20 μ m de diamètre à la pointe (Sutter Instrument). La micropipette est insérée dans une seringue Hamilton, puis remplie d'huile minérale. La seringue est alors placée sur une micropompe reliée à l'appareil stéréotaxique.

Les coordonnées du SLD ont préalablement été déterminées à partir de l'atlas de souris (Paxinos and Franklin, 2001). Etant donné que le SLD est ventral au sinus veineux, nous avons ajouté un angle de 20° antéro-postérieur pour la descente de la micropipette. Les coordonnées stéréotaxiques du SLD définies par rapport au bregma sont alors : -6,27 mm sur l'axe antéro-postérieur (AP), $\pm 0,85$ mm sur l'axe médio-latéral (ML) et -4.45 mm sur l'axe dorso-ventral (DV).

Un volume de 500 nL d'AAV est prélevé dans la micropipette de quartz. Le bras stéréotaxique est ensuite orienté à 20° puis les coordonnées zéro du Bregma sont redéfinies avec la pointe de la micropipette. Deux trépanations sont alors effectuées bilatéralement aux coordonnées AP et ML du SLD à l'aide d'une fraise dentaire et la dure-mère est percé. Puis la micropipette est descendue tout doucement aux coordonnées DV du SLD. Durant la descente dans le tissu cérébral, une pression positive de 5 nL/min est appliquée par la micropompe afin d'éviter que la pipette se bouche, puis 80 nL de virus sont injectés à la vitesse de 60 nL/min. A la fin de l'injection, la micropipette est laissée en place 5 minutes pour permettre au virus de pénétrer dans le tissu et d'éviter que le virus injecté ne remonte par aspiration lors du retrait de la micropipette. Une fois retirée, la procédure est réitérée dans le SLD controlatéral pour une deuxième injection.

IX. CONTROLES HISTOLOGIQUES

1. Perfusion et préparation des coupes

Les souris sont profondément anesthésiées par une injection i.p. de 0.2 mL de pentobarbital (150mg/kg, Ceva Santé Animale, Libourne, France). La cage thoracique est ensuite ouverte, le cœur est dégagé et une incision est effectuée à l'apex du ventricule gauche et à l'oreillette gauche. Les souris sont immédiatement perfusées en intracardiaque avec 10 mL de solution de Ringer-Lactate hépariné à 0.1% (Virbac, France) afin d'éliminer le sang. L'héparine est un anticoagulant qui va empêcher des caillots de sang de se former et ainsi favoriser l'évacuation du sang. Les souris sont ensuite perfusées avec 40 mL d'une solution de tampon phosphate (PB) à 0.1M contenant 4% de paraformaldéhyde (PFA) pH 7.4 (Carlo Erba) pour fixer les tissus. Le cerveau est prélevé puis post-fixés pendant 48h à 4°C dans environ 10 mL de la même solution de PFA 4%. Il est ensuite placé dans une solution cryoprotectrice de PB à 0.02M pH 7.4 contenant 30% de sucrose (Sigma Aldrich, France) durant au moins 24h. Puis il est instantanément congelé dans une solution de méthylbutane (Sigma Aldrich, France) refroidie entre -30 et -40°C à l'aide de carboglace. Enfin, il est conservé à -20°C jusqu'à sa découpe. Le cerveau est sectionné au cryostat (Microm, France) à -20°C en coupes frontales sériées de 30µm d'épaisseur.

Le milieu dans lequel les coupes sont recueillies dépend des projets. Si des études d'hybridation *in situ* doivent être réalisées alors les coupes sont collectées en condition stérile dans une solution cryoprotectrice dépourvue de RNase (DEPC 0.05%, Glycerol 20%, Ethylène Glycol 30% dans du tampon K_2HPO_4 / KH_2PO_4 50mM pH 7,4) et conservées à -20°C. Lorsque les cerveaux sont destinés à être analysés uniquement par immunohistochimie, alors, les coupes sont collectées et rincées dans 3 bains successifs de PBST (PB 0.1M pH7,4, NaCl 0,9%, Triton-X 100 0,3%) puis stockées à +4°C dans du PBST-azide (PBST ; 0,1% Azide).

2. Hybridation *in situ* de vGAT et de vGluT2

Cette technique nous permet de révéler sur le tissu cérébral (*in situ*) la présence d'ARNm cibles dans le corps cellulaire. Dans notre étude nous avons détecté les ARNm codant pour les transporteurs vésiculaires vGluT2 et vGAT (transporteur vésiculaire du GABA), respectivement nécessaires aux transmissions synaptiques glutamatergiques et GABAergiques. Ainsi, la présence ou absence d'ARNm, permet d'évaluer l'état de ces deux voies de signalisation au sein du tissu.

Principe

L'hybridation *in situ* consiste en l'utilisation de sondes marquées complémentaires (antisens) à l'ARNm endogène que l'on veut détecter. L'hybridation de ces deux séquences sur une coupe de tissu, forme une molécule double brin stable. Les sondes utilisées sont de type ARN (ribosonde) et ont pour avantage d'être très spécifiques. La ribosonde est marquée à l'aide de la dioxigénine.

Protocole

Les sondes de vGluT2 et vGAT, antisens et sens marquées à la digoxigénine, ont été synthétisées. Leur préparation, utilisation et stockage doivent respecter des conditions stériles sans RNase. Le plasmide contenant l'ADNc de vGluT2 ou celui de vGAT est d'abord linéarisé par digestion grâce à Hind III (sens) et Xba I (antisens) puis les sondes sont synthétisées par rétrotranscription in vitro à partir de l'ADN linéaire grâce à l'enzyme RNA polymerase T7 (sens) et SP6 (antisens). Cette rétrotranscription est réalisée à l'aide d'un kit de marquage d'ARN non radioactif, selon le protocole du fabricant (Roche Diagnostic; Clément et al., 2011).

Les coupes sont rincées 3 fois 10 min dans une solution de citrate de sodium standard (SSC2x) avec 2 µL de RNaseI/mL (ProtectRNATM, Sigma-Aldrich). Elles sont ensuite incubées sous agitation pendant une nuit à 55°C dans le tampon d'hybridation (pour 100 mL : 10 mL de tampon PB, 10 mL d'ARNt, 10g de dextran, 1mL de Denhart 100x, 50 mL de formamide et 29 mL d'eau) contenant 0,5 mg / mL de la sonde marquée à la digoxigénine. Puis, les coupes sont lavées 2 fois 20 min sous agitation à 55°C dans une solution de SSCx1 contenant 50% de formamide et de 0,1% de Tween 20. Ensuite, les coupes sont incubées 15 min à 37°C dans du tampon Tris 10mM, contenant 1mM d'EDTA, 500mM de NaCl et 10µL de RNAase A (USB Corporation). Cette étape permet d'éliminer les sondes simple brin, et donc non hybridées à l'ARNm vGluT2 et vGAT et ainsi de réduire le bruit de fond. Après cette étape, il n'est plus nécessaire d'être en condition stérile sans RNase.

Puis, elles sont rincées 3 fois 10 min dans du PBST, et incubées pendant une nuit à 4°C dans une solution d'IgG de mouton anti-digoxigénine conjuguée à la phosphatase alcaline (1/2000, Roche Diagnostic). Les coupes sont rincées 2 fois 10 min dans du PBST puis une fois 10 min dans du PBS 10mM. La coloration est révélée sous agitation en utilisant du nitrobluetetrazolium et du 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (Roche Diagnostic) dans du tampon Tris HCl 100mM, à 37°C et à l'abri de la lumière pendant environ 2h. L'intensité du marquage et le ratio signal/bruit sont vérifiés toutes les 30 minutes lors de la révélation. Enfin, les coupes sont montées sur des lames. Une fois les coupes séchées, une lamelle est collée avec du VectaMountT (VectorLabs) pour protéger les échantillons et qui permet de bien préserver l'intensité et la coloration du marquage.

3. Immunomarquages

Principe

L'immunomarquage permet de localiser un ou plusieurs antigènes dans un échantillon de tissu post-mortem. Pour cela, on utilise les propriétés de liaison entre antigène et anticorps. L'antigène ciblé peut être un neurotransmetteur, récepteur, enzyme de synthèse ou une protéine rapportrice. Le principe consiste à fixer un anticorps primaire (monoclonal dirigé contre un seul épitope de l'antigène ou polyclonal, reconnaissant plusieurs épitopes de l'antigène) sur un antigène d'intérêt puis, à révéler la présence de cet anticorps par un système de marquage utilisant des

composés (fluorochromes, éléments radioactifs ou enzymes) détectables en microscopie. Nous avons utilisé deux types d'immunomarquage : l'immunohistochimie indirecte en 3 étapes et l'immunofluorescence.

- L'**immunohistochimie** est colorimétrique. Elle exploite les propriétés de la peroxydase de raifort ou Horse Radish Peroxydase (HRP). Elle transforme son substrat (l'eau oxygénée) en eau (H_2O_2 et en protons (H^+) qui vont alors oxyder la molécule de révélation, la 3,3' diaminobenzidine tétrahydrochloride (DAB), et la transformer en un précipité marron insoluble. L'ajout de sulfate de Nickel lors de la révélation rend le précipité bleu-noir, et ainsi plus visible. Afin d'amplifier le marquage immunohistochimique, les anticorps secondaires sont biotinylés. La biotine est alors détectée au moyen d'avidine (complexe avidine/biotine) couplée à la HRP. L'avidine peut lier quatre molécules de biotine, ce qui permet un effet d'amplification encore plus prononcé. Cette technique présente trois intérêts majeurs : (1) l'amplification est très sensible (2) elle est colorimétrique et permet donc une contre coloration et donc une précision anatomique (3) elle reste stable pendant des années.

- L'**immunofluorescence** bien que moins sensible que l'immunohistochimie indirecte, permet d'obtenir un contraste élevé et rend possible l'analyse confocale. Le marqueur est alors un fluorophore au sein duquel un photon « excitateur » provenant d'une source lumineuse, provoque le passage d'un électron d'une orbite stable à une orbite instable. Pendant cet état instable, l'électron perd de l'énergie par interaction avec l'environnement. Il retourne à son orbite stable en émettant un photon de fluorescence. La lumière émise est observable au microscope à fluorescence ou confocal à travers un système de filtre.

• **Révélation de la présence de protéine mCherry par immunohistochimie**

Nous avons évalué la taille et la localisation de nos sites d'injection par la technique de coloration à la DAB dirigé contre la protéine mCherry. Cette technique confère une meilleure sensibilité et stabilité que la fluorescence endogène précédemment décrite, et nous a donc permis d'être confiant sur nos observations.

Les coupes sont tout d'abord incubées dans une solution de PBST contenant un anticorps primaire dirigé contre la protéine mCherry (1/1000, ThermoFisher) et fabriqué chez le rat pendant une nuit à température ambiante. Puis, on procède à trois rinçages successifs de 10 min dans du PBST et on incube les coupes dans une solution de PBST contenant l'anticorps secondaire anti-IgG de rat (1/1000, Vector Laboratories Inc) durant 90 min. Les coupes sont ensuite incubées à température ambiante dans une solution contenant le complexe Avidine-Biotine-Horse Radish Peroxydase (1 :1000, Elite kit, Vector Laboratories) dans du PBST. Après trois rinçages de 10 min dans du PBST, les coupes sont incubées dans une solution de Tris-HCl 0.05M à pH 7,6 contenant 2% de 3,3'-diaminobenzidine tétrahydrochloride (DAB, Sigma-Aldrich, st. Louis, MO, USA)

0,01% de H₂O₂ et 6mg/mL de sulfate d'ammonium de nickel (NiCl₂). La réaction est contrôlée régulièrement sous le microscope jusqu'à l'obtention d'un signal fort avec un minimum de bruit de fond. Pour stopper la réaction, les coupes sont transférées dans une solution de PBST-Azide puis montées sur des lames histologiques de verres gélatinées.

Les coupes sont contre-colorées au rouge neutre pour mettre en évidence les différentes structures cérébrales puis après séchage, les lames sont montées sous lamelles avec le milieu de montage Depex (VWR, France).

- **Double immunofluorescence mCherry et vGlut 2**

Pendant une nuit à température ambiante, les coupes sont incubées dans une solution de PBST contenant simultanément : un anticorps dirigé contre la protéine vGlut2 (1/1000, Synaptic Systems) et fabriqué chez le lapin ; un anticorps dirigé contre la protéine mCherry (1/50 000, SynapticSystems) fabriquée chez le rat. Après trois rinçages de 10 min dans du PBST 0,02M, elles sont ensuite incubées dans une solution de PBST contenant les anticorps secondaires Alexa Fluor 488 anti-IgG de lapin (1/500) et 594 anti-IgG de rat (1/500) (Thermo Fisher) pendant 3h à température ambiante. Les coupes sont alors rincées trois fois dix minutes dans la solution de PBST 0,02M. Puis, elles sont montées sur lames gélatinées et une lamelle est collée avec un milieu de montage (Fluoromount DAPI ; VectorLaboratories, USA). Les coupes sont analysées au microscope confocal à fluorescence SP5 (Leica) à la résolution de 1024x1024 pixels/frame avec un objectif 63x (0.5µm d'épaisseur d'image) à la plateforme CIQLE de la SFR Lyon-Est.

4. Analyse histologique

- **Etendue des sites de transfection des virus AAV**

Les photographies sont réalisées à l'aide d'une caméra et du système morphostrider (Explora Nova, France) connecté à un microscope Zeiss dont la platine est motorisée en X et Y. Elles sont ensuite analysées sur Adobe Photoshop pour travailler le contraste, la luminosité et dessiner les différentes régions cérébrales.

- **Cartographie des sites d'injection**

La cartographie des sites d'injection est réalisée grâce au logiciel Mercator (Explora Nova, France). L'étendue des sites est définie puis reportée sur une coupe représentative de l'atlas de souris ([Paxinos and Franklin, 2001](#)) grâce au logiciel Illustrator (Adobe).

- **Analyse en microscopie confocale**

Les coupes traitées pour la microscopie confocale sont préalablement triées, afin de ne sélectionner que les coupes à hauteur de la medulla ventrale (VMM) contenant les fibres de projections des neurones du SLD. Les photographies réalisées sont de taille 1024 x 1024 pixels, à un grossissement 63x. Elles ont été prises à l'aide d'un microscope LEICA TCS-SP5X qui possède

un laser blanc connecté à une caméra avec deux détecteurs hybrides. Une photographie est prise par bandes de longueur d'onde pour révéler séparément le marquage DAPI, vGlut2 et mCherry. Les photographies sont ensuite traitées avec Image J afin d'ajuster les contrastes et la luminosité, et superposer les photographies prises aux différentes longueurs d'ondes.

X. STATISTIQUES

Les analyses statistiques de la première étude ont été réalisées à l'aide de routines Excel (www.anastats.com) et celles de la deuxième étude avec le logiciel GraphPad PRISM. Etant donné la faible taille des échantillons d'animaux dont nous disposons, nous avons utilisé des tests non-paramétriques (test Mann & Whitney pour comparer des échantillons appariés ; Wilcoxon pour appariés ; Kruskal-Wallis pour les mesures répétées). Nous avons procédé à des comparaisons multiples par des tests Mann & Whitney avec correction de Holm. Le test utilisé est précisé pour chaque analyse. Enfin, nous avons défini un seuil de 5 % comme acceptable pour décrire une différence significative entre différentes populations.

RESULTATS

CHAPITRE 1

ETUDE 1

La survenue inappropriée du SP dans la narcolepsie n'est pas due à une perturbation de la régulation homeostatique du SP. Une nouvelle fonction pour le neuropeptide orexine/hypocretine ?

Résumé

La narcolepsie avec cataplexie, également appelée narcolepsie de type 1, est une maladie neurologique rare caractérisée par une tétrade de symptômes : une somnolence diurne excessive, des épisodes de cataplexie, des hallucinations hypnagogiques et des paralysies du sommeil. Ces trois derniers symptômes ainsi qu'une apparition précoce du sommeil paradoxal (SP) au cours de la nuit des narcoleptiques suggèrent une perturbation de la régulation du SP dans cette pathologie. Pour tester cette hypothèse, nous avons étudié la régulation homéostatique du SP chez un modèle reconnu de souris narcoleptique : la souris invalidée pour le gène orexine (Orex-KO) et chez des souris contrôles (WT). Tout d'abord, nous les avons privées spécifiquement de SP durant 48hrs par la méthode des plateformes au-dessus de l'eau. La privation de SP a été efficace chez les souris Orex-KO comme chez les souris WT. Durant les 10hrs de récupération post-privation, les souris Orex-KO ont montré un rebond de SP similaire à celui des souris WT malgré une latence raccourcie d'entrée en SP, suggérant des processus homéostatiques intacts. La tendance des animaux à entrer en SP a ensuite été évalué à l'aide d'une nouvelle méthode de privation automatisée, permettant une la privation sélective et efficace de SP. Le nombre de tentative d'entrée en SP est similaire chez les souris Orex-KO et WT au cours de leur phase de repos (lumineuse), en revanche il est augmenté pendant la phase active (obscur) des souris narcoleptiques. Ces données suggèrent un défaut d'inhibition du SP chez les souris Orex-KO au cours de la phase active, lorsque le neuropeptide orexine est normalement libéré. En plus de son implication bien connue dans la promotion d'éveil, le neuropeptide orexine pourrait donc jouer un rôle direct d'inhibition du SP. Aussi, une déficience en orexine engendrerait l'apparition inappropriée de SP ou états dissociés du SP pendant la journée, comme observée dans la narcolepsie.

ARTICLE 1

The inappropriate occurrence of REM sleep in narcolepsy is not due to a defect in homeostatic regulation of REM sleep. A new function for the hypocretin/orexin neuropeptide ?

Alexis Roman¹, Soraya Meftah¹, Sébastien Arthaud¹, Pierre-Hervé Luppi¹, Christelle Peyron^{1*}

1. Center for Research in Neuroscience of Lyon (CRNL), SLEEP team, CNRS UMR5292, INSERM U1028, Université Claude Bernard-Lyon1, 69372 LYON, France

*Corresponding author :

Christelle Peyron, PhD

Center for Research in Neuroscience of Lyon (CRNL), SLEEP team, CNRS UMR5292, INSERM U1028, Université Claude Bernard - Lyon1, 7 rue Paradin, 69372 LYON cedex 08 – France.

peyron@sommeil.univ-lyon1.fr

Abstract

Narcolepsy type 1 is a disabling disorder with four primary symptoms: excessive-daytime-sleepiness, cataplexy, hypnagogic hallucinations and sleep paralysis. The three latter symptoms together with a short REM sleep latency have suggested impairment in REM sleep homeostatic regulation with an enhanced propensity for (i.e. tendency to enter) REM sleep. To test this hypothesis, we challenged REM sleep homeostatic regulation in a recognized model of narcolepsy, the orexin knock-out (Orex-KO) mice and their wild-type (WT) littermates. We first performed 48hrs of REM sleep deprivation using the classic small-platforms-over-water method. We found that narcoleptic mice are similarly REM sleep deprived to WT mice. Although they had shorter sleep latency, Orex-KO mice recovered similarly to WT during the following 10hrs of recovery. Interestingly, Orex-KO mice also had cataplexy episodes immediately after REM sleep deprivation, anticipating REM sleep rebound, at a time of day when cataplexy does not occur in baseline conditions. We then evaluated REM sleep propensity using our new automated method of deprivation that performs a specific and efficient REM sleep deprivation. We showed that REM sleep propensity is similar during light phase in Orex-KO and WT mice. However, during the dark phase REM sleep propensity was not suppressed in Orex-KO mice when hypocretin/orexin neuropeptides are normally released. Altogether our data suggests that in addition to the well-known wake-promoting role of hypocretin/orexin, these neuropeptides would also suppress REM sleep. Therefore, hypocretin/orexin deficiency would facilitate the occurrence of REM sleep at any time of day in an opportunistic manner as seen in human narcolepsy.

Keywords : narcolepsy / orexin / cataplexy / neuropeptides / hypocretin / REM sleep homeostasis / sleep deprivation / hypersomnia / anxiety/

Significance Statement

This study shows that REM sleep dysregulation in narcolepsy is not due to an impairment of the homeostatic regulation of REM sleep. We show in mice rendered narcoleptic by genetically removing the gene encoding for hypocretin/orexin neuropeptides, that REM sleep need develops similarly in narcoleptic mice and their wild-type littermates, and that they similarly recover from specific REM sleep deprivation. However, REM sleep would occur throughout the day in an opportunistic manner with lack of inhibition due to the absence of the hypocretin/orexin neuropeptides, similar to human narcolepsy. Our data provides a better understanding of narcolepsy with new insights on its pathophysiology.

List of Abbreviations:

| | |
|---------|-----------------------------------|
| NT1 | Narcolepsy type 1 |
| Orex-KO | orexin knock-out |
| WT | wild-type |
| REM | rapid-eye-movement |
| EEG | electroencephalography |
| EMG | electromyography |
| CI | circadian index |
| ELISA | enzyme-linked-immunosorbent-assay |
| ZT | zeitgeber time |
| LMA | locomotor activity |
| vIPAG | ventrolateral periaqueductal gray |

INTRODUCTION

Narcolepsy type 1 (NT1) is an orphan neurological disorder that affects 0.002% of the population worldwide ¹. Patients experience excessive daytime sleepiness, cataplexy (a sudden loss of muscle tone during active wake triggered by positive emotions), hypnagogic hallucinations and sleep paralysis ¹. The later three symptoms share similarities with rapid-eye-movement (REM) sleep, also called paradoxical sleep, and together with the very short latency to enter REM sleep have supported the idea of an impairment of REM sleep regulation in narcolepsy.

It is well established that REM sleep is finely tuned in mammals ^{2 3 4}. REM sleep is under a strong circadian control occurring in the second half of the night in humans and in its majority during the light phase in nocturnal rodents. REM sleep is also homeostatically regulated so that any debt of REM sleep is precisely compensated for in a proportional manner by REM sleep hypersomnia (ie rebound) during the following recovery period ^{5 6} to maintain equilibrium.

In narcoleptic patients, the circadian time-keeping system is preserved ^{7 8}. However, in a 3-day nap protocol where subjects are on a 90min sleep/wake schedule, narcoleptic patients showed REM sleep throughout the day, in contrast to controls ². This observation may reflect a lack of circadian control over REM sleep or may be the consequence of a stronger homeostatic drive for REM sleep. To assess this question, Vu and colleagues ⁹ performed a selective REM sleep deprivation protocol on six narcoleptic patients and six control subjects. They found that the number of interventions per night required to selectively REM sleep deprive subjects was significantly higher in narcoleptic patients suggesting a stronger REM sleep propensity in narcolepsy. However, no REM sleep rebound was observed during the recovery night post two consecutive nights of deprivation. This observation may be due to impairment of homeostatic regulation or to the fact that the patients performed a multiple sleep latency test (five naps of 20 min scheduled at 2-hrs intervals) during the day, between the second night of REM sleep

deprivation and the recovery night. Due to the complexity of the REM sleep deprivation procedure in humans, animal models may be of help to provide additional insights.

NT1 is due to the specific loss of a small group of neurons located in the tuberal hypothalamus that produces orexin/hypocretin neuropeptides ^{10 11}. A well-recognized model of human NT1 known as the orexin Knock-Out mice (Orex-KO) ¹², was created by the genetic deletion of the preprohypocretin gene and displays highly fragmented sleep and behavioral arrests considered equivalent to human cataplexy. As the neurons are still present, this Orex-KO model provides an excellent tool to reveal the roles played by the orexin/hypocretin neuropeptides specifically, rather than the entire neuronal contribution, in REM sleep regulation.

Thus, to bring more light on the homeostatic regulation of REM sleep in narcolepsy as well as determining the role played by the orexin neuropeptides in this regulation, we specifically challenged REM sleep in Orex-KO mice and their wild-type (WT) littermates. We first used a standard method of 48hrs of selective REM sleep deprivation using the platforms-over-water method ⁴ and thoroughly investigated REM sleep during the following recovery period. Then, in order to objectively measure REM sleep propensity throughout deprivation, we used a newly developed innovative automatic deprivation method ¹³. Finally, we performed behavioral tests and corticosterone measurements in Orex-KO mice and controls to consider eventual differences in anxiety and mild stress coping between genotypes in our analyses.

MATERIALS AND METHODS

All experiments were conducted in accordance to the European Community guidelines for the use of animals for research and approved by the Ethics Research Committee of University-Lyon1 (DR2015-03). Experiments were conducted on a total of 46 male C57Bl/6J Orex-KO mice and 46 WT littermates¹². WT and Orex-KO mice weighed respectively 25-32g and 30-40g and were between 12 and 17 weeks of age at recordings. Animals were housed under constant 12:12 hrs light/dark cycle (lights on at 08:00 AM). Room temperature was maintained at $23 \pm 1^\circ\text{C}$ and food and water were available *ad libitum* throughout the experiments.

POLYSOMNOGRAPHY

Surgery. Sixteen WT and sixteen KO mice were implanted for electroencephalographic (EEG) and electromyographic (EMG) recordings. Mice were anesthetized by intraperitoneal (ip) administration of a ketamine:xylazine mixture (100:10mg/kg) and fixed in a stereotaxic frame (David Kopf Instruments). Following incision of the scalp, three stainless steel screws were inserted above the frontal (1.5mm anterior to Bregma, 1.7mm lateral to midline), parietal (2.5mm posterior to Bregma, 1.7 lateral to midline) and cerebellar (6mm posterior to Bregma) cortices. Two gold-coated electrodes were also slipped between the neck muscles to record EMG activity. All EMG and EEG electrodes were then fixed to the skull using acrylic cement (Superbond, C&B Sun Medical) and connected to a miniature plug (Plastics One, Bilaney, Germany) that was additionally fixed using dental cement (Paladur, Heraeus Kulzer). After surgery, mice were allowed to recover for at least one week during which they were weighed daily.

Recordings. Mice were placed in a Plexiglas recording barrel and connected to a cable plugged to a rotating connector (Plastics One, Bilaney, Germany) to allow free movements during the entire experiment. Each frontal and parietal EEG signal was referenced to the cerebellar EEG electrode, and muscle tone was assessed by a differential EMG signal. EEG and EMG signals were then

amplified (EEG: 2000 x ; EMG: 5000 x) with 16-Channel Model 3500 AM System (US). Signals were band filtered (EEG: 0.3Hz-100Hz; EMG: 1Hz-100Hz), digitalized at 512Hz with NI Usb 6343 card (National Instrument, Austin, US) and collected using Sleepscore software (Viewpoint, Lyon, France)¹⁴.

Quantification of the sleep–wake cycle. Vigilance states were scored using a 5-sec window frame according to standard criteria using Sleepscore as previously described^{4,14}. Wake, NREM and REM sleep were assigned using the standard mouse EEG/EMG scoring method, based on rules established in WT mice¹⁵. Each REM sleep episode recorded during the automatic deprivation protocol was re-scored using a 1-sec window frame to accurately evaluate residual amount of REM sleep, most of them lasting for less than 5 sec. Circadian distribution of REM sleep was measured by calculating the circadian index (CI) as previously proposed¹⁶, $CI = (\text{Mean quantity at night} - \text{Mean quantity at day}) / \text{Mean quantity in 24hrs}$.

Quantification of cataplexy. Cataplexy was scored according to the consensual definition¹⁷ using both EEG/EMG and simultaneous video recordings. It always occurred outside the nest, in a period of high motor activity, following already reported behaviors such as grooming or digging¹⁸. They were analyzed during baseline and the recovery period that follows the 48hrs of platforms-over-water REM sleep deprivation.

REM SLEEP DEPRIVATION WITH PLATFORMS-OVER-WATER

As previously reported⁴, mice were housed individually in a Plexiglas barrel (20cm in diameter) containing two small platforms (2.5 cm in diameter, 2 and 3 cm high) for habituation in the recording chamber. Mice were plugged to the recording system and were left for 3 days of habituation followed by 2 days of baseline recordings. During REM sleep deprivation, woodchips were replaced by 1 cm-deep of water (Fig. 1A). REM sleep deprivation was started when REM

sleep amount is high at 10:00 AM (ZT2) and lasted for 48 hrs. Then mice were returned to their habituation barrel, where they could sleep *ad libitum* for recovery.

AUTOMATIC REM SLEEP DEPRIVATION METHOD

Mice were housed individually in a 30cm Plexiglass diameter barrel (Fig. 1B). Each barrel contains a platform resting on an air piston that is set in motion by an electromagnet¹³. After 3 days of habituation, mice were recorded during 24 hrs of baseline and 48 hrs of REM sleep deprivation. As automatic analysis of vigilance states is required during REM sleep deprivation, an algorithm file was computed for each mouse by manual scoring based on the 48 hrs of baseline recordings. Then, during deprivation, when REM sleep was detected, a TTL signal was sent by the computer to an electromagnet to briefly move the platform up (25msec, 2cm of amplitude), once per sec, until the mouse woke up. Between stimulations, the platform gently returned to its initial position thanks to gravity and the presence of an air spring to break the platform fall. Each of the stimulation that occurred during a REM sleep episode was automatically considered in the offline analysis (Fig. 1C).

BEHAVIORAL TESTS

Mice were sibling groups housed in a ventilated chamber under a 12h:12 hrs light/dark cycle (80 lux ; light on at 08:00 AM). During the 7 day habituation period, mice were handled daily for 10 min by the experimenter. Thirty minutes before tests, mice were individually housed to familiarize to isolation conditions. The open-field and light-dark-box tests were conducted in this sequence, separated by 3 days of rest. All tests were performed between 2:00 PM and 5:00 PM. Mazes were cleaned with water after each trial.

Open-field test. The test was performed in a quiet dark room to assess animal coping to a non-anxiogenic novel environment using an open-field apparatus (50 x 50 x 45 cm; L, l, h) in which a 20 x 20 cm center space was numerically defined (Viewpoint, France). Two Orex-KO and two WT mice were recorded simultaneously for each trial. Each mouse was placed in the center of one of the four apparatus and locomotion was recorded for 45 min using a video-tracking system (Viewpoint, France). Time spent, distance traveled and latency to enter the center of the arena were measured and used as indexes of anxiety.

Light-dark box test. The test evaluates mouse behavior when confronted to a novel and aversive environment. The apparatus used is a box (20cm x 20cm x 30 cm) equally divided in two compartments separated by a black wall containing a small open door (6cm x 6cm) in its center (Viewpoint, France). One compartment is brightly illuminated (250 lux) whereas the other compartment is completely dark. This test is based on competition between two spontaneous behaviors in mice: an innate aversion to brightly illuminated areas, and a spontaneous inclination to explore a new environment. Mice were placed in the dark compartment with their back facing the open door and were video-tracked for 5 min. The total number of transitions between the 2 compartments, time spent in the brightly illuminated side and latency to the first entrance into the bright compartment were recorded.

MEASURE OF PLASMA CORTICOSTERONE LEVEL

After 3 days of habituation in the deprivation chambers and 48hrs of experimentation (REM sleep deprivation with the platforms-over-water method or home cage condition), mice were immediately and deeply anaesthetized (sodium pentobarbital, 150 mg/kg ip; Ceva Santé Animale, Libourne, France). Blood samples (>500 µL) were collected from heart ventricles. Samples were spun immediately (5000 g for 5 min at 4°C) and 40 µL aliquots of plasma were stored at -20°C until use. Quantitative measurement of plasma corticosterone levels was assessed simultaneously on

all samples using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit following manufacturer's instructions (DetectX_Corticosterone Immunoassay kit; Arbor Assays, Ann Arbor, MI, USA).

EXPERIMENTAL DESIGN AND STATISTICAL ANALYSIS

To align with the 3Rs, we minimized the number of mice per group (less than 15 per condition). After testing for normality using the Shapiro-Wilk test, we used non-parametric tests in our analyses when comparing two independent samples (Orex-KO versus WT mice). We thus used the Mann & Whitney test, with Holm's correction when multiple comparisons were done. Tests were performed using Excell routines (www.anastats.fr). All results are expressed as mean \pm sem. For all statistical procedures, significance was set at 0.05.

In the first experiment, 9 Orex-KO and 9 WT littermates were REM sleep deprived using the small-platforms-over-water technique. We used the Mann & Whitney test with Holm's correction to compare genotypes for quantities per hour of each vigilance state, number and mean duration of episodes per hour, latency to enter NREM and REM sleep after deprivation, number and duration of cataplexy episodes, and power spectra. To compare power spectra frequency and amplitude at peaks, we used the wilcoxon test for paired measures.

In a second experiment, corticosterone measurements were performed on 18 Orex-KO and 17 WT mice. Mice from each genotype were separate into two groups (n=8-9): a group REM sleep deprived with the small-platforms-over-water method and a control group. Four mice, one from each group per genotype were tested in parallel. Note that 10 of these 35 mice also performed the open-field and light-dark box tests at least 2 weeks before the current protocol. Corticosterone levels for those mice were in the same range as those of the naive mice ($p=0.21$). The 4 independent groups were analyzed using the Kruskal-Wallis test and groups were compared two by two using Dunn's procedure.

For the third set of experiments, 13 naïve Orex-KO and 13 WT mice without EEG/EMG implantation were tested in pairs (1 WT and 1 Orex-KO) in the open-field and light-dark box tests. An additional 7 WT and 8 Orex-KO mice were tested in light-dark box immediately after a 48hrs of REM sleep deprivation using the platforms-over-water method in order to evaluate their anxiety level after REM sleep deprivation. Comparisons were made between genotypes for locomotion, duration of stay and number of transitions between compartments or zones, and latency to enter the bright light compartment, using the Mann & Whitney test.

In the fourth experiment, 7 Orex-KO and 7 WT littermates underwent REM sleep deprivation using the automated method. Mice were recorded in pairs of one Orex-KO and one WT. Comparison of sleep quantities per hour, number and mean duration of episodes per hour and number of stimulation per hour between independent samples (genotypes) were performed using Mann & Whitney test with Holm's correction.

RESULTS

Baseline recordings

Quantitative analysis of sleep states and wakefulness assessed from simultaneous EEG/EMG polysomnography and video recordings is reported in Table 1. Briefly, Orex-KO and WT mice showed similar daily amounts of REM sleep, NREM sleep and wakefulness as previously described¹² (Table 1).

In the light phase, the so-called resting phase, sleep parameters were similar between genotypes except for REM sleep where total time and mean bouts duration were significantly shorter ($p=0.03$, $p=0.04$, respectively)(Table 1). In the dark (active) phase however, the number of REM sleep bouts was increased in Orex-KO mice resulting in a higher REM sleep quantity and a reduced circadian distribution of REM sleep (circadian index of 0.29 ± 0.04 vs 0.48 ± 0.29 in WT mice ; $p=0.0096$). NREM sleep and wake quantities were unchanged in Orex-KO mice despite a strong fragmentation (increased number of shorter NREM sleep and wake bouts) (Table 1).

We observed cataplexy episodes in Orex-KO mice only (Table 1). They mostly occurred during the dark phase with a few were observed around light-transitions. As cataplexy occurs during wakefulness, it contributed to the fragmentation of this latter state.

Challenging REM sleep regulation using the small-platforms-over water method

In agreement with previous data⁴, deprivation of REM sleep was efficient ($77 \pm 5.5\%$ and $68.9 \pm 3.8\%$ REM sleep loss over 48hrs in Orex-KO and WT respectively) (Table 2). The amount of REM sleep lost during the 48hrs of deprivation was similar between genotypes (118.2 ± 8.9 min in Orex-KO vs. 121.3 ± 10.3 min in WT mice, $p=0.35$) (Fig. 2; Table 2) indicating that REM sleep was suppressed with the same efficacy in all mice. Using this method, NREM sleep and wakefulness were fragmented with more bouts of shorter duration in both genotypes (Table 2).

Recovery from REM sleep deprivation was recorded for the following 10hrs (ZT2-ZT12) until lights-off. As previously reported⁴, WT mice spent 104.7 ± 14.1 min grooming, moving and digging before entering sleep after the end of REM sleep deprivation using this deprivation method. Interestingly,

REM sleep latency, calculated from the end of deprivation to the first episode of REM sleep, was much shorter in Orex-KO mice than in WT mice (Table 2; Fig. 3B). However, REM sleep latency calculated from the start of the first NREM sleep episode to the first REM sleep bout was the same in Orex-KO and WT mice (18.9 ± 4.4 min vs. 19.1 ± 5.2 min respectively; $p=0.08$).

Further, the overall amount of REM sleep recovered was the same in both genotypes ($p= 0.48$) following a similar profile between genotypes (Figs. 2, 3A). When REM sleep is evaluated setting analysis from the first REM sleep episode of the recovery period to overcome the difference in REM sleep latency, WT and Orex-KO mice showed respectively a REM sleep hypersomnia of $+46.6 \pm 6.3$ % ($p=1.5E-3$) and $+63.15 \pm 10.6$ % ($p=1.7E-4$) compare to their corresponding baseline (Figs. 3C-D). REM sleep rebounds followed a different profile with a lower peak of REM sleep hypersomnia in Orex-KO mice (17.0 ± 1.4 % vs. 21.7 ± 1.8 % in WT; $p=0.028$) that lasted longer (2hrs vs. 1hr in WT mice), possibly due to the difference in sleep latency and thus its occurrence at different circadian time. The REM sleep power spectrum was identical between Orex-KO and WT mice during the first 6hrs of the recovery period as well as during the corresponding baseline. However, the frequency at the peak was faster during recovery than baseline (Fig. 3E). We also looked at the NREM sleep power spectrum during the first 2 and 6 hrs of recovery and found no significant difference in peak frequency or amplitude between genotypes or conditions (baseline vs. recovery) (Fig. 3F). Altogether, this data indicates that REM sleep homeostatic regulation is intact in narcoleptic Orex-KO mice.

To our surprise, we also found that the REM sleep deprivation protocol induced an important peak of cataplexy in the first hour of the recovery period (4.7 ± 1.7 % of total time at ZT2), at a time of day when cataplexy does not occur in baseline conditions (Fig. 4). These induced episodes were seen in all Orex-KO mice with a maximal amount per hour reaching 2.8 ± 1.0 min (vs. 1.5 ± 0.7 min during the dark phase in baseline, $p=0.23$) (Fig. 4C). The mean duration of induced cataplexy episodes (Fig. 4C) was not significantly different to the mean duration of cataplexy episodes observed in baseline ($p=0.09$) (Tables 1-2). They occurred with a latency of 55.3 ± 26.6 min, foreseeing the first episode of sleep and contributing to the fragmentation of wakefulness (Table 2). Note that cataplexy episodes were seen during the first hour of recovery when mice are active with grooming and digging. After this

first hour, mice were less active as seen on the video recordings, entered sleep states as observed by polysomnography starting REM sleep rebound and stopping cataplexy (Fig. 4).

Evaluation of anxiety levels in Orex-KO narcoleptic and WT mice

The shortened sleep latency we observed after small-platforms-over-water REM sleep deprivation in Orex-KO mice may reflect a stronger sleep drive or a better coping with the mild chronic stress caused by the environmental challenges of the procedure. To determine the potential contribution of stress as a confounding factor, we measured plasma corticosterone levels after 48hrs of REM sleep deprivation or home-cage control conditions for both genotypes.

Orex-KO and WT mice had similar plasma corticosterone levels in the control condition (31.0 ± 7.2 ng/ml and 39.7 ± 12.3 ng/ml respectively; $p=0.46$). Both genotypes showed a significant increase in corticosterone levels after small-platforms-over-water REM sleep deprivation compared to the control conditions (Fig. 5A). However, there was a tendency towards a reduced increase in plasmatic corticosterone level in Orex-KO mice (WT: 121.7 ± 14.9 and Orex-KO: 92.2 ± 6.8 ng/mL; $p=0.055$), although it is not significant. To verify whether this observed tendency was physiologically relevant, we performed behavioral tests to explore this further.

Two behavioral tests were performed: the open-field and light-dark box, both used to evaluate anxiety and stress levels¹⁹. We first conducted the open-field test after home-cage control conditions. As previously reported¹², Orex-KO mice had a lowered locomotor activity (LMA) than WT ($p=1.8E-4$) (Fig. 5B1-B2). We then assessed the time spent (duration), the locomotion (distance traveled normalized to the total traveled distance) and the number of transitions in and out of the central area. None of these parameters were significantly different between genotypes (Figs. 5B3-B6). We then performed light/dark box tests after home-cage control condition (Fig. 5C) or after 48hrs of REM sleep deprivation (Fig. 5D) using the small-platforms-over-water set-up. All mice showed a preference for the dark chamber and no significant difference was found between

genotypes for all parameters measured (ie. time spent in the bright compartment, distance traveled, latency to enter the bright compartment, number of transitions) (Figs. 5C-D). When comparing between conditions, the latency to enter the bright compartment was highly increased after REM sleep deprivation compare to home-cage condition (WT: 124.1 ± 24.9 vs. 35.5 ± 9.4 sec respectively, $p=0.003$; KO : 117.2 ± 15.9 vs 39.2 ± 15.1 sec respectively, $p=6E-4$), signaling the suitability of the test to evaluate anxiety level in mice (Figs. 5C2, D2).

Altogether this data indicates that Orex-KO and WT mice have similar endogenous anxiety traits and behave similarly when challenged with a stressful environment. Thus, the difference in latency to enter sleep after REM sleep deprivation may rather be attributable to a difference in REM sleep propensity between genotypes.

REM sleep pressure in Orex-KO narcoleptic mice

To objectively measure REM sleep propensity, defined as the tendency to enter REM sleep, we utilised a new semi-automated REM sleep deprivation method developed in house ¹³. Another series of mice underwent REM sleep deprivation using this novel automated method, with the results shown in Table 3. Baseline data from this experiment (Table 3) was not significantly different to that obtained with the first series of experiments (Table 1). This new method of REM sleep deprivation was efficient at depriving mice of REM sleep, with REM sleep reductions of $68.7 \pm 3.8\%$ and $59.6 \pm 4.2\%$ seen compared to baseline in WT and Orex-KO mice respectively ($p=8,7E-4$ for both genotypes).

The efficiency of REM sleep deprivation was decreased when comparing Day 1 to Day 2 in both genotypes (WT: $p=9E-4$; Orex-KO: $p=0.013$; Fig. 6A) indicating that REM sleep pressure increased during deprivation. An increased residual amount of REM sleep was found in Orex-KO than WT mice during deprivation (66.7 ± 8.5 min vs. 43.5 ± 4.6 min respectively, $p=9E-3$), but this last observation is likely due to the higher number of attempts to enter REM sleep in Orex-KO than in

WT mice (988.1 ± 68.5 and 643.7 ± 76.0 respectively; $p=0.004$; Fig. 6B). Indeed, with this method of deprivation, the mouse has to enter REM sleep for one second before REM sleep is detected and stimulations sent (Fig. 1C). REM sleep episodes were abolished with the same number of stimulations in both genotypes (0.83 ± 0.02 vs. 0.89 ± 0.03 stimulations/REM sleep episode in WT and Orex-KO respectively, $p=0.11$; Fig. 6D) and attempts to enter REM sleep had the same mean duration (4.1 ± 1.0 sec vs. 4.0 ± 0.4 sec in WT and Orex-KO mice respectively; Fig. 6C). Altogether, this data indicates that Orex-KO mice show similar levels of REM sleep deprivation compared to WT mice, but interventions are more frequently needed throughout deprivation.

Moreover, REM sleep deprivation with this new method was selective for REM sleep. Total amounts and amounts per hour of NREM sleep and wake were unchanged in both genotypes compared to their corresponding baseline (except in the first hour of deprivation where wakefulness was highly increased), whereas REM sleep quantities were largely decreased (Fig. 7; Table 3). Wake and NREM sleep were significantly fragmented as indicated by the increased number of NREM and wake bouts compare to their corresponding baseline (Table 3).

Orex-KO and WT mice did not attempt to enter REM sleep at lights off. This lack of REM sleep attempts was associated with a peak of wakefulness (Fig. 7), possibly illustrating the well-known awakening effects of lights turning off¹⁵. This data further indicates that the orexin/hypocretin neuropeptide are not necessary to mediate this light effect.

Finally, REM sleep propensity can be evaluated by counting the number of attempts to enter REM sleep or of stimulations needed to suppress REM sleep. In WT mice, the number of stimulations per hour followed the circadian occurrence of REM sleep observed during baseline, with more stimulation during the light phase than the dark active phase (383.1 ± 59.3 vs 155.3 ± 21.8 stimulations respectively; $p=0.002$) (Fig. 8). Interestingly, both groups of mice received the same number of stimulations, with the same distribution over time during the light phases of day 1 and day 2, suggesting that REM sleep propensity is similar in Orex-KO mice and their WT

littermates (Fig. 8B). However, in contrary to WT mice, Orex-KO mice were equally stimulated during the light and dark phases (492.7 ± 45.8 vs. 389.9 ± 40.9 stimulations respectively, $p=0.112$) (Fig. 8B). This difference in number of stimulations during the dark phases between genotypes was particularly visible in day 1 (196.1 ± 26.6 in Orex-KO vs. 54.0 ± 8.9 in WT mice; $p=8.7E-4$) but was also seen in day 2 (194.7 ± 20.1 in Orex-KO vs. 101.3 ± 15.3 in WT; $p=0.01$ with a power of analysis $<50\%$ due to higher inter-individual variability). This could reflect the less pronounced circadian distribution of REM sleep in Orex-KO mice and/or a lack of REM sleep inhibition in absence of hypocretin/orexin signal.

DISCUSSION

This study is the first to challenge the homeostatic regulation of REM sleep in an animal model of narcolepsy by depriving mice specifically of REM sleep. We demonstrate that the homeostatic regulation of REM sleep is preserved in narcoleptic Orex-KO mice lacking hypocretin/orexin transmission, and in a same magnitude as their WT littermates. Indeed, the same quantity of REM sleep is lost over the two days of REM sleep deprivation in both genotypes. Orex-KO mice showed a similar rebound of REM sleep after deprivation compared to WT mice. However, sleep latency was shortened in Orex-KO mice. This difference between genotypes is not due to alterations in experienced stress levels as no difference was seen in response to the anxiogenic environment of REM sleep deprivation using the small-platforms-over water method. Looking at REM sleep propensity with our new automated deprivation method, REM sleep pressure built up similarly during the light resting-phase in both genotypes. However, we show that REM sleep propensity is not suppressed during the dark phase in Orex-KO mice.

Technical considerations

In agreement with all previous reports, we found a fragmentation of all vigilance states in Orex-KO mice compare to their WT littermates^{12 20 21 22 16}. In addition, we found an increased amount of REM sleep during the dark active phase in Orex-KO mice that translates to a decreased circadian index as previously described^{12 20 22}.

Remarkably, we were able to induce cataplexy during the first hour of recovery after the 48 hrs of REM sleep deprivation using the small-platforms-over-water method, before REM sleep rebound took place. Cataplexy is quite rare in baseline conditions. Triggering cataplexy in narcoleptic mice is a challenge of great value in order to study the neurobiological mechanisms of this symptom. Several emotional stimuli such as social interaction, palatable food or running wheel have been shown to induce cataplexy during the dark active phase^{20 23 24}. REM sleep deprivation is however the first stimulus that induces cataplexy during the light phase at a time of

day (ZT2) when no cataplexy occurs in other conditions. Patients report a tendency to have more cataplexy when tired or sleep deprived¹ but Vu et al⁹ did not observe cataplexy after two nights of REM sleep deprivation in patients. As cataplexy is difficult to induce during interviews at the clinics and that patients were tested for sleepiness with MSLT right after deprivation, it is difficult to objectively conclude whether REM sleep deprivation facilitates cataplexy or not in humans. We also noticed that right after REM sleep deprivation, mice showed increased motor activity, grooming and digging, and such behaviors have been described to induce cataplexy in mice²³. To this point, we cannot assert whether cataplexy is triggered by an increase of such motor activities or the increase of REM sleep pressure or both.

Another point to mention is that Orex-KO mice were possibly stimulated during cataplexy as well as REM sleep during the automated REM sleep deprivation protocol. As we had no video during these recordings, we could not reliably differentiate between the two. Nevertheless, it is to note that these mice only had 2.7 ± 1.1 episodes of cataplexy during the preceding 24hrs of baseline recordings and 108.1 ± 9.6 episodes of REM sleep (Table 3). We thus believe that the number of stimulations attributable to cataplexy is probably marginal compared to those clearly attributable to REM sleep episodes (ie always following NREM sleep) during REM sleep deprivation in Orex-KO mice.

Coping with REM sleep deprivation

One of the first studies on the hypocretin/orexin neuropeptides showed that icv injections of orexin-A provoked an increased release of corticosterone in a dose-dependent manner²⁵. In agreement with previous reports^{26 27}, we found no significant difference in corticosterone level and anxiety-like behaviors between genotypes in baseline conditions. Furthermore, sleep deprivation is seen as being stressful, with difference in stress levels depending on the method used. We thus evaluated stress-induction and stress-coping in Orex-KO mice and their WT littermates combining biochemical (corticosterone measurement) and behavioral (Light-Dark-box

test) approaches. In agreement with Emmerzaal and colleagues ²⁷ who reported that plasma corticosterone levels were similarly increased in Orex-KO mice and WT mice after an acute stress of 2hrs at 4°C, we show here that the mild chronic stress induced by REM sleep deprivation with small-platforms-over-water method ⁴ is dealt with in a similar manner by both genotypes as the tendency for a reduced increase in plasmatic corticosterone in Orex-KO mice compared to WT mice after REM sleep deprivation did not translate to the behavioral test.

REM sleep homeostasis

In this current study, the homeostatic regulation of REM sleep was found to be intact in our narcoleptic mice. Indeed, REM sleep loss due to our selective deprivation method was compensated for by a REM sleep hypersomnia in a similar proportion in both genotypes. Mochizuki and colleagues ²¹ had explored REM sleep rebound in Orex-KO mice but only following 8hrs of total sleep deprivation. Although of interest, such a protocol introduced a confounding factor of competition between NREM and REM sleep recovery, with the REM sleep rebound being delayed by several hours possibly due to NREM sleep recovery occurring first. Nevertheless, in agreement with our current data, the authors mentioned that WT and Orex-KO mice recovered their REM sleep deficits at the same rate and to the same extent when analyzed over the 16hrs of recovery period and normalized to baseline.

By challenging REM sleep homeostatic regulation using the automatic deprivation method, we were able to visualize REM sleep propensity as revealed by the number of attempts to enter REM sleep and see that it increased throughout the duration of the deprivation procedure. Interestingly, when focusing on the light phase of day 1 and day 2, REM sleep propensity increased at a similar and linear rate between genotypes indicating that REM sleep requirements are similar in Orex-KO and WT mice. However during the dark active phase, differences in REM sleep propensity were seen between Orex-KO and WT mice. In Orex-KO mice, REM sleep propensity increased with the same rate as during the light phase while REM sleep propensity was strongly

reduced in WT mice, indicating that in contrary to WT mice, Orex-KO mice were unable to suppress REM sleep during the active phase. Supporting our observations, Mochizuki and colleagues²¹ had mentioned that Orex-KO mice had slightly more REM sleep than WT mice during the few hours of recovery that took place during the dark period. The suppression of REM sleep during the active phase is further supported by REM sleep deprivation studies in rats showing that REM sleep rebound is displaced by several hours when rats were released from deprivation at mid-active phase but not when released at mid-resting phase although the amounts of REM sleep recovered over 24hrs was equal between groups³.

Hypocretin/orexin neuropeptides are mainly released during the dark phase when rodents are most active and awake^{28 29}. The wake-promoting role of hypocretin/orexin neuropeptides is now well established, thanks to the multiple pharmacological, electrophysiological, chemogenetic and optogenetic studies (see for review,³⁰). The higher amount of REM sleep during the dark phase seen in Orex-KO mice in the current study may thus reflect an opportunistic occurrence of REM sleep during the dark phase in absence of hypocretin/orexin neurotransmission rather than a higher need for REM sleep.

Finally, we found similar amounts of wakefulness between Orex-KO mice and WT littermates during the dark phase of REM sleep deprivation. Thus, the higher REM sleep propensity during the dark phase in Orex-KO mice cannot be attributed to a lack of wake drive. Furthermore, Hagan et al²⁵ showed that icv injection of Orexin-A in rats induces wakefulness during 2hrs and an inhibition of REM sleep for 8hrs even when long bouts of NREM sleep were taking place. Altogether our data evaluated with the literature indicates that the hypocretin/orexin neuropeptides play a key inhibitory role on REM sleep, independent of its wake-promoting function, repressing the occurrence REM sleep during the active phase when not appropriate. In absence of hypocretin/orexin neuropeptides, REM sleep would occur throughout the day in an opportunistic manner, as seen in narcoleptic patients.

Based on our knowledge of hypocretin/orexin neuropeptides connectomics³¹ and on the neuronal network controlling REM sleep³², we speculate that hypocretin/orexin would inhibit REM sleep by its excitatory projection onto the GABAergic neurons of the ventrolateral periaqueductal gray (vlPAG), those neurons being inhibitory of the sublaterodorsal nucleus generating REM sleep. This proposed mode of action is further supported by lesion studies of the GABAergic neurons of the vlPAG using microinjection of hypocretin 2 conjugated to saporin in Orex-KO and WT mice showing that such lesions induce a strong and specific increase in REM sleep quantity during the dark phase³³.

Acknowledgements:

Fundings : ARC2 région Rhône-Alpes, ANR optoREM (ANR-13-BSV4-0003-01), Société Française de Recherche et de Médecine du Sommeil (SFRMS), Centre National de Recherche Scientifique (CNRS). Soraya Meftah is now affiliated to the University of Exeter and Bristol funded by the MRC GW4 BioMed DTP. The authors thank Jean-Michel Vicat and Clémence Brando at Alecs-SPF platform-Lyon for taking good care of mice.

Disclose statements: Financial and non-financial disclosure: None.

REFERENCES

1. Dauvilliers Y, Arnulf I, Mignot E. Narcolepsy with cataplexy. *Lancet* 2007;369:499-511.
2. Dantz B, Edgar DM, Dement WC. Circadian rhythms in narcolepsy: studies on a 90 minute day. *Electroencephalography and clinical neurophysiology* 1994;90:24-35.
3. Wurts SW, Edgar DM. Circadian and homeostatic control of rapid eye movement (REM) sleep: promotion of REM tendency by the suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci* 2000;20:4300-10.

4. Arthaud S, Varin C, Gay N, 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* 2015;24:309
5. Shea JL, Mochizuki T, Sagvaag V, Aspevik T, Bjorkum AA, Datta S. Rapid eye movement (REM) sleep homeostatic regulatory processes in the rat: changes in the sleep-wake stages and electroencephalographic power spectra. *Brain Res* 2008;1213:48-56.
6. McCarthy A, Wafford K, Shanks E, Ligocki M, Edgar DM, Dijk DJ. REM sleep homeostasis in the absence of REM sleep: Effects of antidepressants. *Neuropharmacology* 2016;108:415-25.
7. Besset A, Bonardet A, Billiard M, Descomps B, de Paulet AC, Passouant P. Circadian patterns of growth hormone and cortisol secretions in narcoleptic patients. *Chronobiologia* 1979;6:19-31.
8. Mayer G, Hellmann F, Leonhard E, Meier-Ewert K. Circadian temperature and activity rhythms in unmedicated narcoleptic patients. *Pharmacol Biochem Behav* 1997;58:395-402.
9. Vu MH, Hurni C, Mathis J, Roth C, Bassetti CL. Selective REM sleep deprivation in narcolepsy. *J Sleep Res* 2011;20:50-6.
10. Peyron C, Faraco J, Rogers W, et al. A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nat Med* 2000;6:991-7.
11. Thannickal TC, Moore RY, Nienhuis R, et al. Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. *Neuron* 2000;27:469-74.
12. Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, et al. Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell* 1999;98:437-51.
13. Arthaud S, Varin C, Morel AL, Luppi PH, Libourel PA, Peyron C. New insights on paradoxical (REM) sleep homeostatic regulation in mice using an innovative, automated and stress-less deprivation method. in submission 2017.
14. Libourel PA, Corneyllie A, Luppi PH, Chouvet G, Gervasoni D. Unsupervised Online Classifier in Sleep Scoring for Sleep Deprivation Studies. *Sleep* 2014.
15. Franken P, Malafosse A, Tafti M. Genetic determinants of sleep regulation in inbred mice. *Sleep* 1999;22:155-69.

16. Kantor S, Mochizuki T, Janisiewicz AM, Clark E, Nishino S, Scammell TE. Orexin neurons are necessary for the circadian control of REM sleep. *Sleep* 2009;32:1127-34.
17. Scammell TE, Willie JT, Guilleminault C, Siegel JM. A consensus definition of cataplexy in mouse models of narcolepsy. *Sleep* 2009;32:111-6.
18. Leibiger J, Fendt M. Behavioral analysis of narcoleptic episodes in orexin-deficient mice. *Behavior genetics* 2014;44:136-43.
19. Sousa N, Almeida OF, Wotjak CT. A hitchhiker's guide to behavioral analysis in laboratory rodents. *Genes Brain Behav* 2006;5 Suppl 2:5-24.
20. Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, et al. Distinct narcolepsy syndromes in Orexin receptor-2 and Orexin null mice: molecular genetic dissection of Non-REM and REM sleep regulatory processes. *Neuron* 2003;38:715-30.
21. Mochizuki T, Crocker A, McCormack S, Yanagisawa M, Sakurai T, Scammell TE. Behavioral state instability in orexin knock-out mice. *J Neurosci* 2004;24:6291-300.
22. Anaclet C, Parmentier R, Ouk K, et al. Orexin/hypocretin and histamine: distinct roles in the control of wakefulness demonstrated using knock-out mouse models. *J Neurosci* 2009;29:14423-38.
23. Espana RA, McCormack SL, Mochizuki T, Scammell TE. Running promotes wakefulness and increases cataplexy in orexin knockout mice. *Sleep* 2007;30:1417-25.
24. Clark EL, Baumann CR, Cano G, Scammell TE, Mochizuki T. Feeding-elicited cataplexy in orexin knockout mice. *Neuroscience* 2009;161:970-7.
25. Hagan JJ, Leslie RA, Patel S, et al. Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:10911-6.
26. Scott MM, Marcus JN, Pettersen A, et al. Hcrtr1 and 2 signaling differentially regulates depression-like behaviors. *Behav Brain Res* 2011;222:289-94.
27. Emmerzaal TL, vd Doelen RH, Roubos EW, Kozicz T. Orexinergic innervation of urocortin1 and cocaine and amphetamine regulated transcript neurons in the midbrain centrally projecting Edinger-Westphal nucleus. *J Chem Neuroanat* 2013;54:34-41.

28. Yoshida Y, Fujiki N, Nakajima T, et al. Fluctuation of extracellular hypocretin-1 (orexin A) levels in the rat in relation to the light-dark cycle and sleep-wake activities. *Eur J Neurosci* 2001;14:1075-81.
29. Deboer T, Overeem S, Visser NA, et al. Convergence of circadian and sleep regulatory mechanisms on hypocretin-1. *Neuroscience* 2004;129:727-32.
30. Li SB, Giardino WJ, de Lecea L. Hypocretins and Arousal. *Current topics in behavioral neurosciences* 2016.
31. Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, et al. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci* 1998;18:9996-10015.
32. Luppi PH, Peyron C, Fort P. Not a single but multiple populations of GABAergic neurons control sleep. *Sleep Med Rev* 2016.
33. Kaur S, Thankachan S, Begum S, Liu M, Blanco-Centurion C, Shiromani PJ. Hypocretin-2 saporin lesions of the ventrolateral periaqueductal gray (vlPAG) increase REM sleep in hypocretin knockout mice. *PLoS One* 2009;4:e6346.

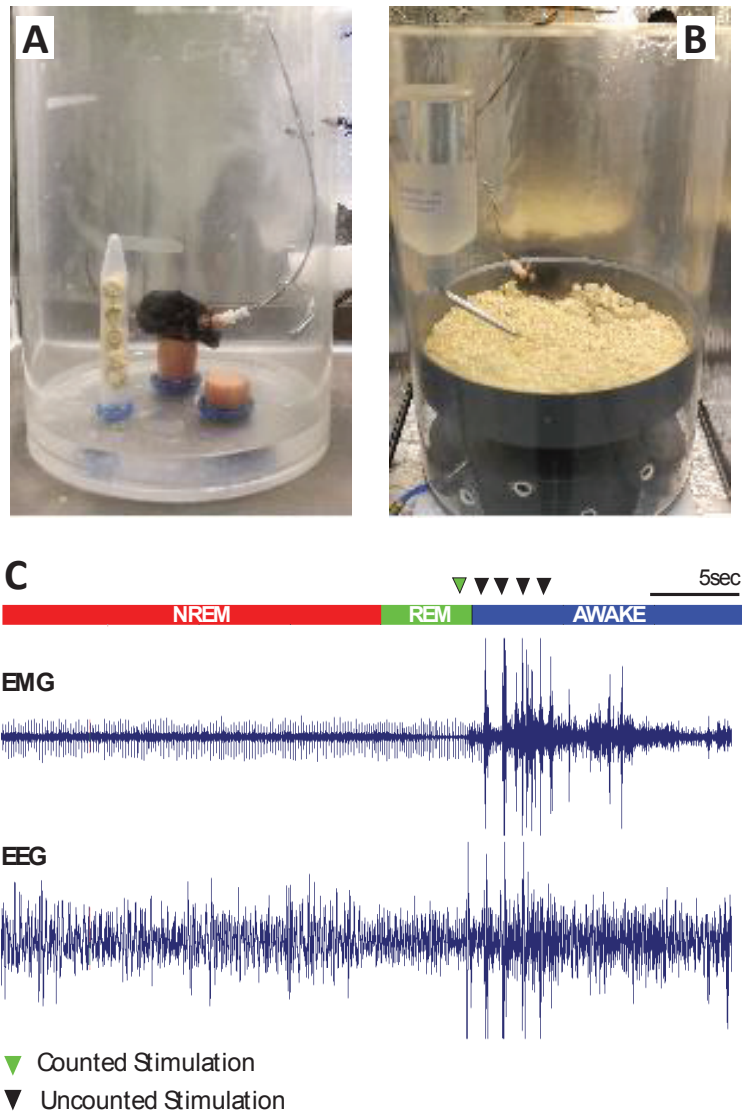


Figure 1. Illustration of REM sleep deprivation methodologies Photographs illustrating selective REM sleep deprivation set-ups for (A) small-platforms-over-water protocol, or (B) automatic deprivation method. (C) Illustration of the polysomnographic signals (EEG, EMG) at transition into REM sleep during automatic REM sleep deprivation. Only stimulations occurring during the REM sleep episodes are counted (green arrow). Those occurring during wakefulness are not considered (black arrows)

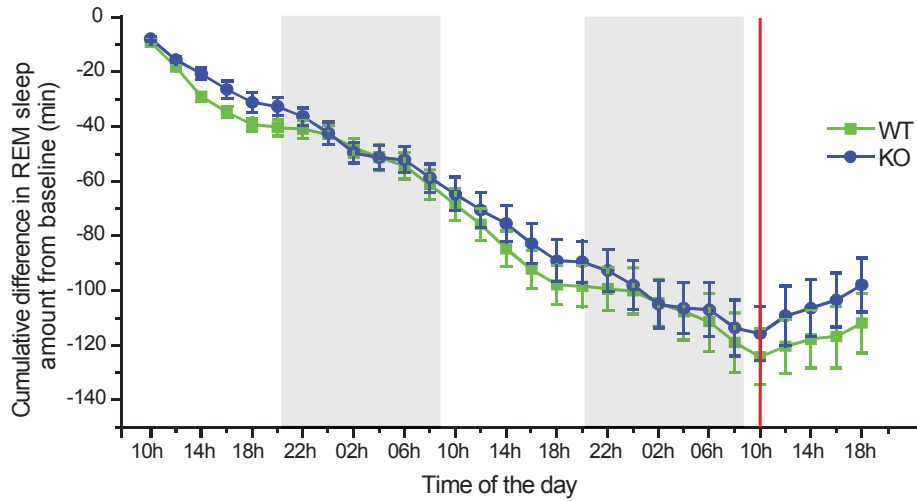


Figure 2. REM sleep debt accumulates similarly in wild-type (WT) and orexin knock-out (Orex-KO) mice. Graph illustrating the cumulative amount of REM sleep compared to baseline amounts all along the REM sleep deprivation using the small-platform-over-water method and the eight following hours of recovery period, in Orex-KO and WT mice. The inclination of the curves indicates a loss of REM sleep during deprivation and a gain of REM sleep during recovery. The gray shaded areas represent the dark phase. The red line indicates the time when animals were transferred to the recovery chamber to sleep *ad libitum*.

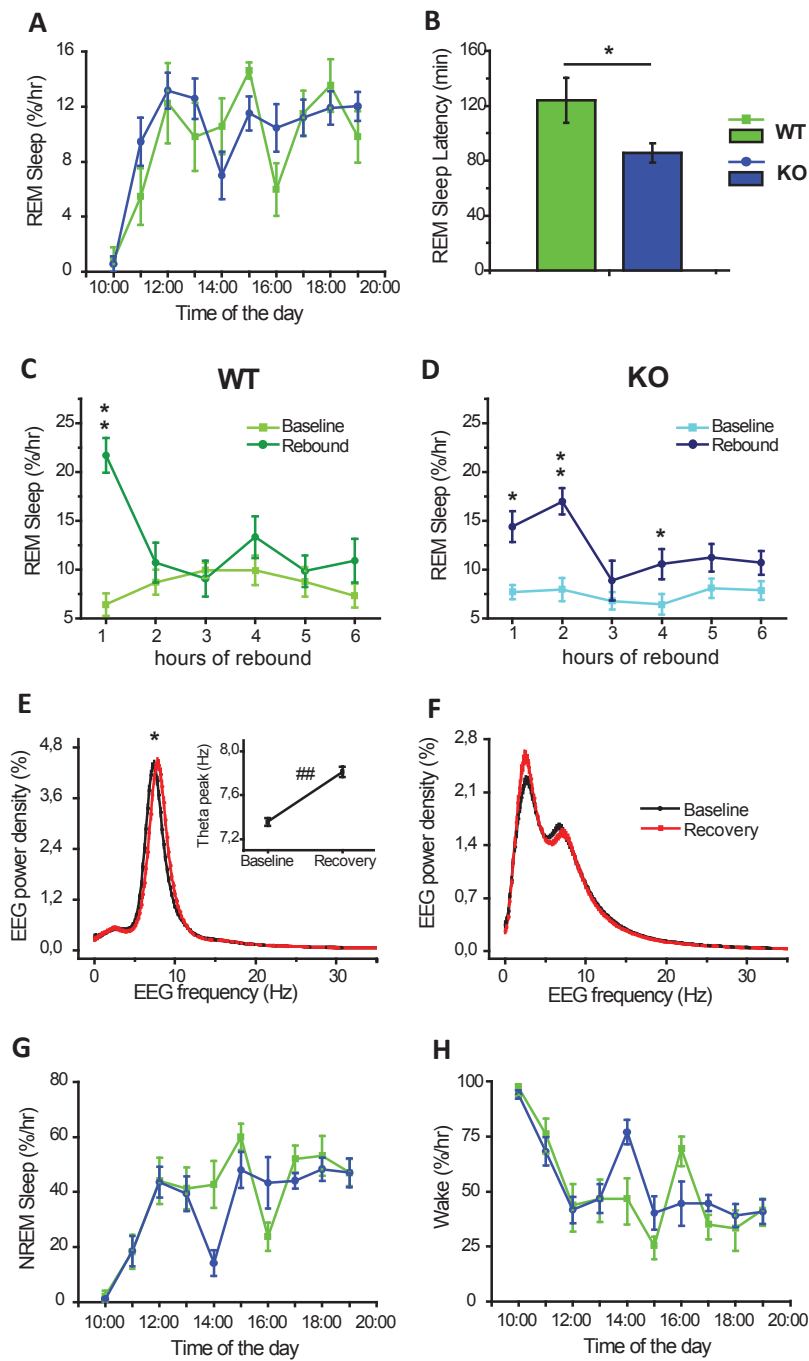


Figure 3. REM sleep rebound after small-platform-over-water REM sleep deprivation. Illustrations of sleep parameters during the recovery period in Orex-KO (blue) and WT (green) mice after 48hrs of REM sleep deprivation using the small-platform-over-water method. **A-** Graph representing the percentage of REM sleep per hour during the recovery period starting at 10AM (ZT2). **B-** Bar chart representing the mean REM sleep latency in Orex-KO and WT. It is calculated as the time spent between the end of REM sleep deprivation and the occurrence of the first REM sleep episode. **C-D-** Graphs illustrating the profile of REM sleep rebound reported as the percentage of REM sleep per hour in WT (C) and Orex-KO (D) mice when it is set to start from the first episode of REM sleep. **E-** REM sleep power spectra during the first 6 hrs of recovery (red line) and its corresponding baseline (black line). The power spectra being identical in WT and Orex-KO mice, there were merged to show differences between conditions. **F-** NREM sleep power spectra

from the pool of WT and Orex-KO mice during the first 2 hrs of recovery (red line) and its corresponding baseline (black line). **G-H-** Graph illustrating the percentage per hour of NREM (G) and wakefulness (H) during the 10 hrs of recovery period. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

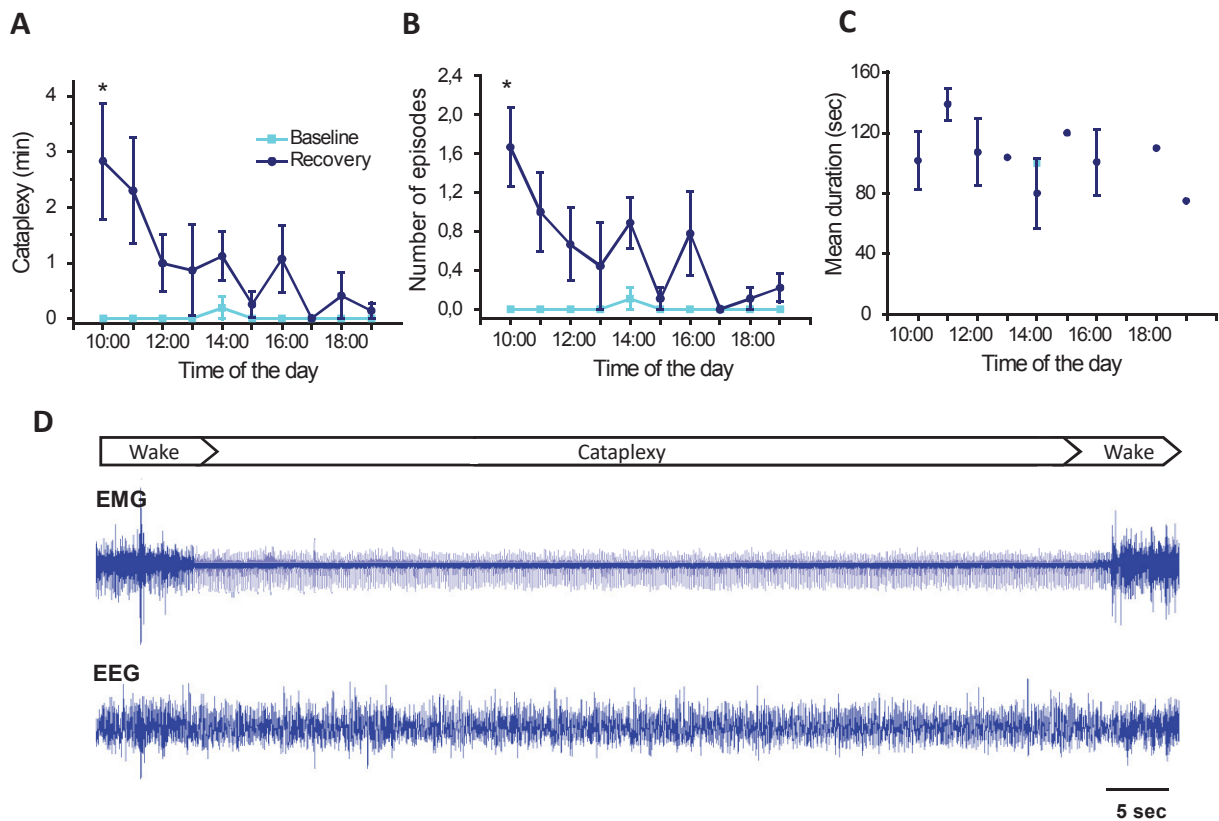


Figure 4. Cataplexy is induced in the first hour of recovery after REM sleep deprivation with small-platform-over-water method. A-B-C- Graphs representing the amount (A), the number (B) and the mean bouts duration (C) of cataplexy episodes per hour during the recovery period following 48hrs of REM sleep deprivation using the small-platform-over-water method. **D-** Illustration of polysomnographic signals (EEG and EMG) during cataplexy in Orex-KO mice. * $p < 0.05$.

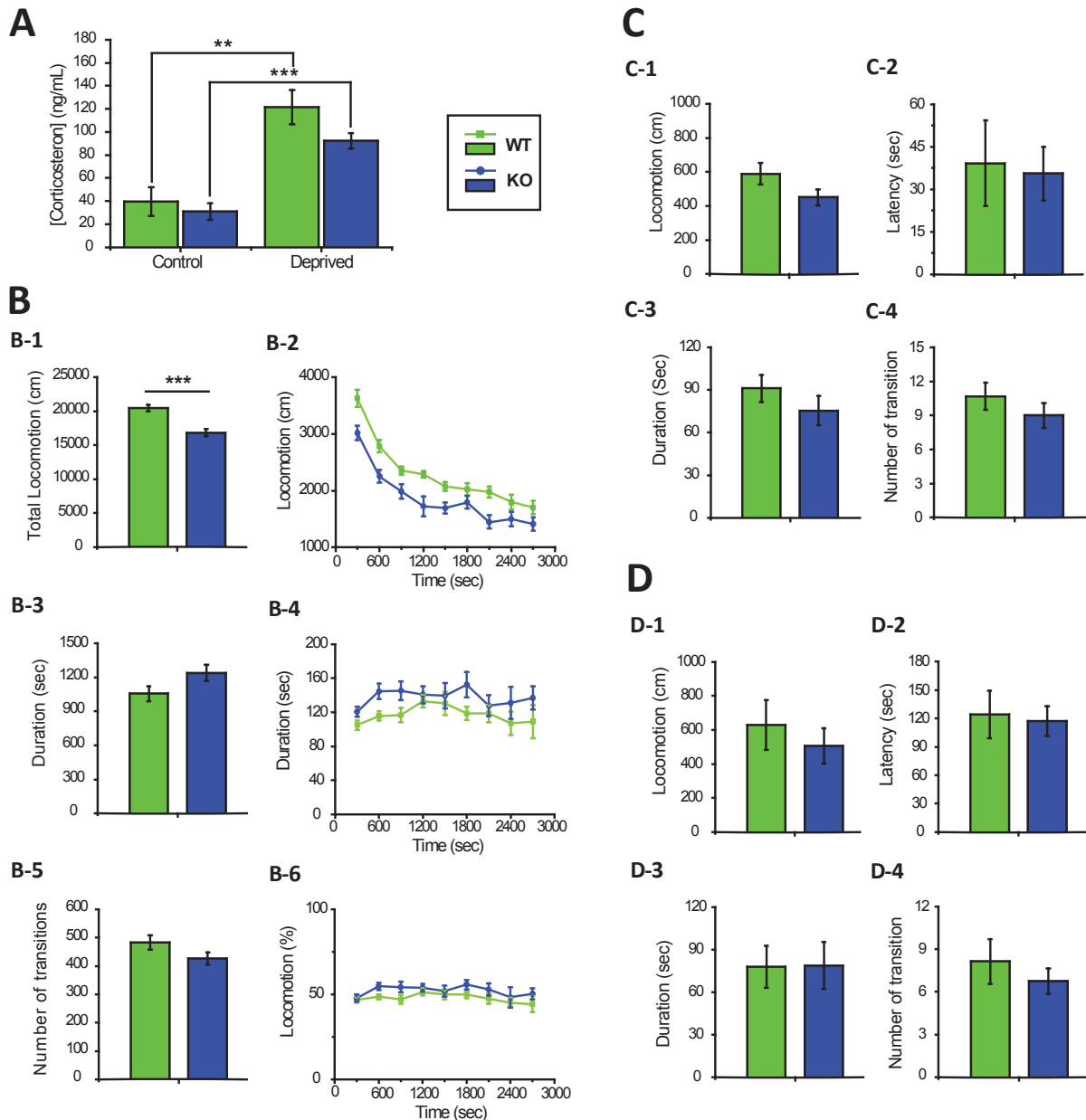


Figure 5. Level of anxiety and mild-stress coping are similar between narcoleptic and WT mice. **A-** The level of plasmatic corticosterone is increased in WT and Orex-KO mice after REM sleep deprivation using the small-platform-over-water method. **B-** Orex-KO and WT mice behavior in the open-field apparatus presented over the 45min of the test (B1, B3, B5) or by bins of 5 min (B2, B4, B6). WT mice have more locomotor activity in the open-field than Orex-KO mice all along the test (B1-B2) but mice of both genotypes spend the same amount of time in the center part of the open-field (B3-B4). They similarly enter and exit the center part of the apparatus (B5-B6). **C-D-** Orex-KO and WT mice behavior during the 5 min light-dark box test in basal condition (C) and after REM sleep deprivation using the small-platform-over-water method (D). Bar charts represent the total traveled distance (C-1, D-1), the latency to first entrance into the light compartment (C-2, D-2), the time spent in the light compartment (C-3, D-3) and the number of transition in and out the light compartment (C-4, D-4). ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

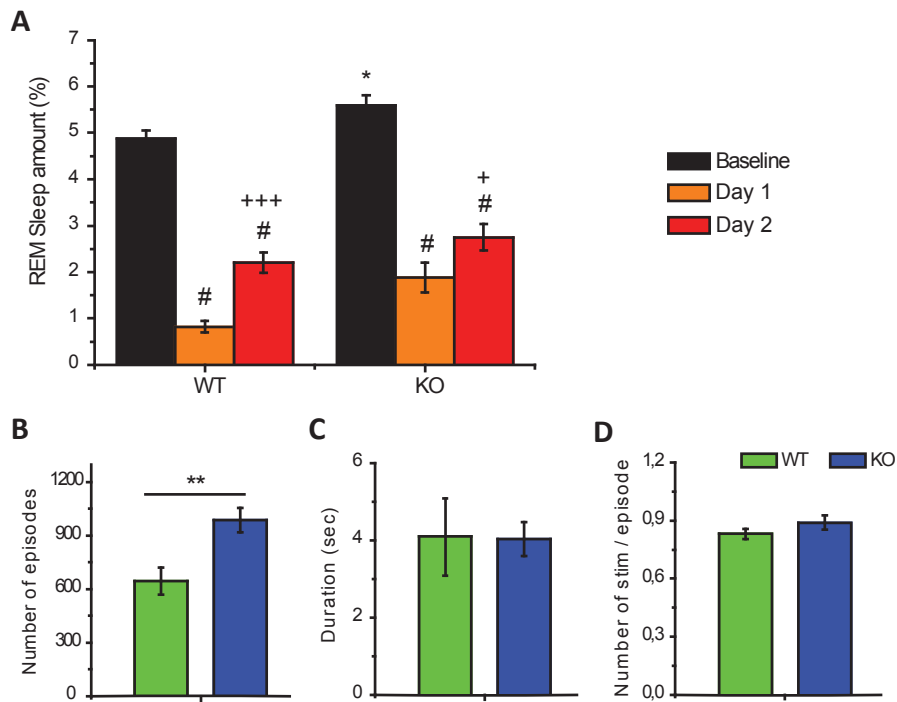


Figure 6. REM sleep deprivation using the automated deprivation method is efficient in Orex-KO and WT mice. **A-** Amount of REM sleep during 24hrs of baseline, the first and the second day of REM sleep deprivation. **B-** Number of REM sleep episodes during the entire 48hrs of REM sleep deprivation in both genotypes. **C-** Mean duration of residual REM sleep bouts during deprivation. **D-** Mean number of stimulation needed to wake the mice. Note that the mean number is inferior to one stimulation per REM sleep episode because some entrances into REM sleep do not stabilize and mice come out of REM sleep before any stimulation is sent. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ in Orex-KO versus WT mice; # $p < 0.05$ in Day 1 versus baseline; + $p < 0.05$ and +++ $p < 0.0001$ in Day 2 versus Day 1.

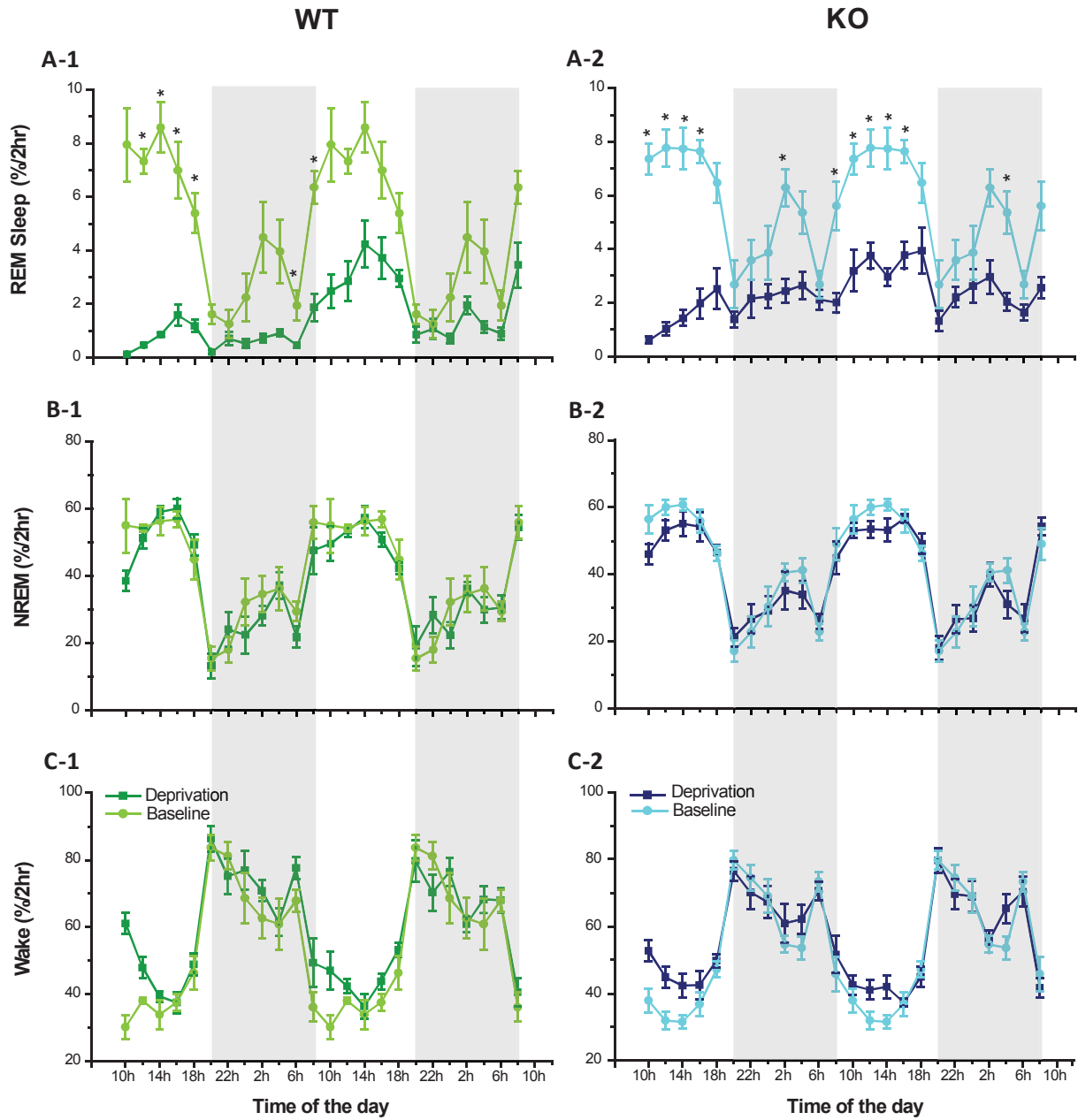


Figure 7. Deprivation using our automatic deprivation method is selectively of REM sleep.

REM sleep (A-1, A-2), NREM (B-1, B-2) and Wake (C-1, C-2) amounts in 2 hours bins across the 48hrs of deprivation using the automated method of deprivation. * $p < 0.05$ versus baseline.

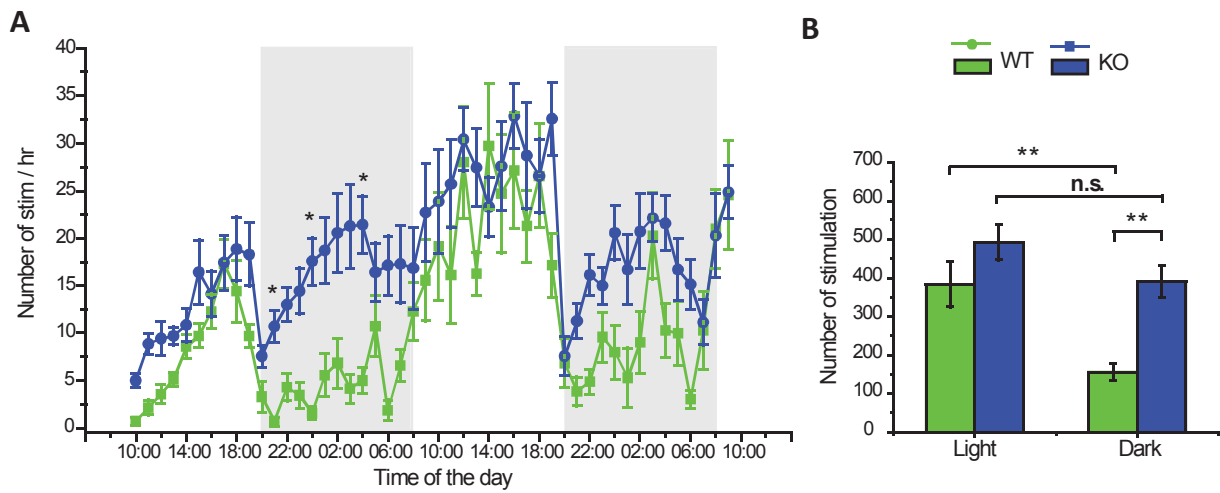


Figure 8. Illustration of REM sleep propensity during the 48hrs of REM sleep deprivation using the automated method. **A-** Graph reporting the number of stimulations per hour needed all along the deprivation procedure **B-** Bar chart of the mean number of stimulations made during REM sleep attempts during the light phases (Day 1 + Day 2) and the dark phases (Day 1 + Day 2). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, n.s. not significant.

Table 1. Sleep data during baseline period combining polysomnography and video recordings.

| | REM | | NREM | | AWAKE | | CATAPLEXY |
|------------------------|------------|---------------|--------------|---------------|--------------|-----------------|-------------|
| | + / + | - / - | + / + | - / - | + / + | - / - | |
| Baseline 24 hrs | | | | | | | |
| Total time (min) | 78.7 ± 2.5 | 81.3 ± 3.5 | 590.7 ± 22.1 | 625.4 ± 16.1 | 770.5 ± 23.5 | 724.2 ± 16.8 | 8.2 ± 2.3 |
| Number of bouts | 85.4 ± 3.2 | 97.0 ± 7.6 | 355.4 ± 21.8 | 408.9 ± 35.5 | 357.9 ± 21.1 | 418.6 ± 35.9 | 7.1 ± 1.5 |
| Mean Duration (sec) | 55.5 ± 1.1 | 52.3 ± 2.8 * | 101.4 ± 3.5 | 97.6 ± 6.3 | 134.1 ± 9.1 | 109.9 ± 6.7 | 76.1 ± 18.8 |
| Light Period | | | | | | | |
| Total time (min) | 57.9 ± 1.3 | 52.2 ± 2.0 * | 397.9 ± 9.9 | 401.8 ± 8.0 | 264.1 ± 10.1 | 265.2 ± 7.8 | 0.4 ± 0.3 |
| Number of bouts | 61.2 ± 1.4 | 62.7 ± 4.9 | 245.8 ± 11.6 | 236.9 ± 18.9 | 242.9 ± 11.8 | 235.1 ± 19.3 | 0.3 ± 0.2 |
| Mean Duration (sec) | 56.9 ± 0.7 | 52.7 ± 3.8 * | 98.5 ± 3.2 | 108.7 ± 7.5 | 67.3 ± 4.2 | 71.2 ± 4.4 | 68.8 ± 8.8 |
| Dark Period | | | | | | | |
| Total time (min) | 20.8 ± 2.0 | 29.1 ± 2.4 * | 192.8 ± 18.0 | 223.5 ± 10.9 | 506.4 ± 19.5 | 459 ± 11.8 * | 7.8 ± 2.1 |
| Number of bouts | 24.2 ± 2.6 | 34.3 ± 3.5 ** | 109.7 ± 12.9 | 172 ± 17.7 ** | 115 ± 11.9 | 183.4 ± 17.9 ** | 6.8 ± 1.3 |
| Mean Duration (sec) | 52.7 ± 2.4 | 52.2 ± 2.3 | 108.7 ± 5.2 | 82.8 ± 5.5 ** | 299.8 ± 35.5 | 161.0 ± 11.0 ** | 76.3 ± 18.9 |

Table 2. Sleep data during and after REM sleep deprivation using the small-platforms-over water method.

| | REM | | NREM | | AWAKE | | CATAPLEXY | |
|--|--------------|-----------------|---------------|------------------|---------------|------------------|--------------|-------|
| | + / + | - / - | + / + | - / - | + / + | - / - | + / + | - / - |
| SMALL-PLATFORM-OVER-WATER DEPRIVATION | | | | | | | | |
| 48 hrs | | | | | | | | |
| Total time (min) | 35.9 ± 8.6 | 49.0 ± 4.8 | 932.7 ± 80.6 | 1048.1 ± 79.0 | 1891.2 ± 89.7 | 1781.8 ± 83.3 | | |
| Number of bouts | 110.9 ± 21.6 | 208.7 ± 19.7 ** | 1167.6 ± 99.2 | 1594.4 ± 90.6 ** | 1185.2 ± 97.7 | 1608.9 ± 87.8 ** | | |
| Mean Duration (sec) | 17.7 ± 1.8 | 14.3 ± 1.0 | 48.4 ± 3.2 | 39.6 ± 2.6 * | 102.7 ± 11.8 | 68.9 ± 6.5 * | | |
| 1st 24hrs | | | | | | | | |
| Total time (min) | 16.2 ± 4.1 | 22.6 ± 3.1 | 429.1 ± 56.2 | 570.1 ± 34.8 * | 994.6 ± 58.4 | 846.5 ± 37.1 * | | |
| Number of bouts | 43.3 ± 11.0 | 96.9 ± 14.0 ** | 526.6 ± 85.1 | 793.0 ± 49.2 ** | 535.4 ± 83.7 | 798.4 ± 48.8 ** | | |
| Mean Duration (sec) | 19.0 ± 3.5 | 14.3 ± 1.4 | 50.6 ± 4.0 | 44.0 ± 3.4 | 147.1 ± 33.1 | 65.7 ± 5.3 ** | | |
| 2nd 24hrs | | | | | | | | |
| Total time (min) | 19.7 ± 5.0 | 26.4 ± 2.6 | 503.6 ± 35.6 | 478.0 ± 51.4 | 896.6 ± 41.1 | 935.2 ± 52.9 | | |
| Number of bouts | 67.6 ± 12.5 | 111.8 ± 11.3 ** | 641 ± 32.8 | 801.4 ± 65.8 * | 649.8 ± 32.3 | 810.4 ± 63.7 * | | |
| Mean Duration (sec) | 16.2 ± 1.9 | 14.7 ± 1.4 | 47.7 ± 3.6 | 35.6 ± 2.4 ** | 84.9 ± 6.2 | 76.5 ± 12.6 | | |
| Light Period | | | | | | | | |
| Total time (min) | 24.0 ± 4.9 | 29.8 ± 3.6 | 556.2 ± 46.5 | 592.6 ± 39.7 | 859.6 ± 50.4 | 817.3 ± 42.0 | | |
| Number of bouts | 74.0 ± 13.3 | 117.7 ± 10.3 ** | 679.1 ± 53 | 816.7 ± 49.7 | 685.1 ± 52.0 | 820.6 ± 48.9 | | |
| Mean Duration (sec) | 19.0 ± 2.1 | 15.0 ± 1.2 | 49.7 ± 3.5 | 43.9 ± 2.8 | 80.6 ± 9.7 | 62.4 ± 6.7 | | |
| Dark Period | | | | | | | | |
| Total time (min) | 12.9 ± 4.4 | 20.7 ± 3.4 | 418.6 ± 42.1 | 497.4 ± 48.8 | 1108.3 ± 49.2 | 1041.0 ± 51.2 | | |
| Number of bouts | 41.0 ± 10.2 | 99.0 ± 17.1 ** | 538.4 ± 59.1 | 851.0 ± 72.9 ** | 550.9 ± 58 | 862.4 ± 71.5 ** | | |
| Mean Duration (sec) | 14.6 ± 2.6 | 12.3 ± 1.1 | 47.2 ± 2.8 | 35.4 ± 2.5 ** | 133.9 ± 17.6 | 78.1 ± 9.4 ** | | |
| RECOVERY | | | | | | | | |
| 10 hrs | | | | | | | | |
| Total time (min) | 60.2 ± 3.5 | 59.9 ± 2.6 | 230.6 ± 15.0 | 208.4 ± 11.1 | 309.2 ± 17.0 | 322.0 ± 10.6 | 9.7 ± 2.9 | |
| Number of bouts | 44.2 ± 3.6 | 43.7 ± 2.9 | 126.4 ± 16.9 | 121.1 ± 13.7 | 131.6 ± 16.1 | 131.4 ± 13.7 | 5.3 ± 1.6 | |
| Mean Duration (sec) | 83.4 ± 4.2 | 84.1 ± 4.4 | 118.4 ± 9.5 | 113.1 ± 15.0 | 162.7 ± 24.8 | 160.0 ± 16.2 | 101.5 ± 14.0 | |
| Latency (min) | 123.8 ± 16.3 | 85.7 ± 7.1 * | 104.7 ± 14.1 | 66.8 ± 6.8 * | 0 | 0 | 55.3 ± 26.6 | |
| Rebound 150 min | | | | | | | | |
| Total time (min) | 22.4 ± 1.5 | 20.8 ± 1.2 | 74.7 ± 6.1 | 57.5 ± 5.2 * | 53.0 ± 6.9 | 70.1 ± 5.0 * | 1.6 ± 0.9 | |
| Number of bouts | 15.7 ± 0.9 | 15.0 ± 1.0 | 39.9 ± 5.9 | 37.4 ± 3.7 | 40.4 ± 5.5 | 39.4 ± 4.0 | 1.1 ± 0.6 | |
| Mean Duration (sec) | 87.1 ± 7.1 | 85.1 ± 5.4 | 125.1 ± 12.7 | 103.4 ± 19.4 | 97.0 ± 20.5 | 112.8 ± 10.2 | 74.4 ± 9.8 | |
| Rebound 360 min | | | | | | | | |
| Total time (min) | 44.8 ± 2.1 | 42.2 ± 2.4 | 164.4 ± 10.1 | 133.4 ± 11.5 * | 150.8 ± 10.5 | 180.1 ± 12.1 | 4.2 ± 1.6 | |
| Number of bouts | 32.2 ± 2.2 | 32.0 ± 2.5 | 88.6 ± 11.3 | 80.9 ± 9.4 | 91.1 ± 10.4 | 86.3 ± 9.4 | 2.8 ± 1.1 | |
| Mean Duration (sec) | 85.0 ± 4.5 | 81.3 ± 4.7 | 120.6 ± 10.3 | 108.5 ± 16.0 | 112.9 ± 16.8 | 140.6 ± 19.4 | 102.3 ± 23.3 | |

Table 3. Sleep data during automated REM sleep deprivation.

| | REM | | NREM | | AWAKE | | CATAPLEXY | |
|---|--------------|------------------|---------------|------------------|---------------|------------------|--------------|-------|
| | + / + | - / - | + / + | - / - | + / + | - / - | - / - | - / - |
| BASELINE (without Video Recording) | | | | | | | | |
| 24 hrs | | | | | | | | |
| Total time (min) | 70.2 ± 1.9 | 82.3 ± 4.0 ** | 575.5 ± 35.4 | 612.2 ± 27.6 | 792.9 ± 36.2 | 739.4 ± 26.6 | 4.5 ± 1.8 | |
| Number of bouts | 86.1 ± 7.7 | 108.1 ± 9.6 * | 356.0 ± 34.6 | 448.4 ± 52.1 | 362.1 ± 34.8 | 452.3 ± 52.6 | 2.7 ± 1.1 | |
| Mean Duration (sec) | 51.0 ± 4.2 | 47.4 ± 3.9 | 104.1 ± 15.6 | 87.7 ± 9.2 | 140.4 ± 16.3 | 106.3 ± 12.6 | 102.6 ± 17.1 | |
| Light Period | | | | | | | | |
| Total time (min) | 51.4 ± 1.4 | 53.1 ± 2.8 | 377.4 ± 22.3 | 402.2 ± 11.3 | 290.5 ± 23.3 | 263.9 ± 10.3 | 0.1 ± 0.1 | |
| Number of bouts | 63.0 ± 5.5 | 69.7 ± 5.2 | 232.4 ± 22.6 | 245.7 ± 28 | 232.6 ± 22.6 | 243.1 ± 28.3 | 0.1 ± 0.1 | |
| Mean Duration (sec) | 51.0 ± 4.2 | 46.7 ± 3.2 | 103.4 ± 13.7 | 107.1 ± 13.6 | 80.5 ± 12.2 | 70.0 ± 7.4 | 40.0 | |
| Dark Period | | | | | | | | |
| Total time (min) | 18.8 ± 1.4 | 29.2 ± 1.4 ** | 198.0 ± 21.5 | 210 ± 19.3 | 502.4 ± 22.3 | 475.5 ± 19.7 | 4.4 ± 1.8 | |
| Number of bouts | 23.1 ± 3.4 | 38.4 ± 5.0 * | 123.6 ± 17.2 | 202.7 ± 25.5 * | 129.6 ± 17.3 | 209.1 ± 25.7 * | 2.6 ± 1.0 | |
| Mean Duration (sec) | 52.8 ± 5.2 | 49.2 ± 5.4 | 106.9 ± 19.8 | 65.0 ± 6.0 ** | 274.0 ± 54.0 | 149.7 ± 19.9 * | 105.7 ± 17.1 | |
| AUTOMATED DEPRIVATION | | | | | | | | |
| 48 hrs | | | | | | | | |
| Total time (min) | 43.5 ± 4.6 | 66.7 ± 8.5 ** | 1131.6 ± 64.5 | 1192.4 ± 49.3 | 1702.0 ± 65.8 | 1618.2 ± 49.9 | - | |
| Number of bouts | 643.7 ± 76.0 | 988 ± 68.5 ** | 1120.6 ± 85.8 | 1531.9 ± 83.5 ** | 1127.3 ± 85.1 | 1551.6 ± 85.7 ** | - | |
| Mean Duration (sec) | 4.1 ± 1.0 | 4.0 ± 0.4 | 61.9 ± 4.5 | 47.5 ± 3.3 ** | 94.2 ± 8.4 | 63.9 ± 4.4 * | - | |
| Day 1 | | | | | | | | |
| Total time (min) | 11.7 ± 1.8 | 27.1 ± 4.7 ** | 546.7 ± 30.6 | 580.5 ± 28.1 | 880.2 ± 31.5 | 831.0 ± 27.9 | - | |
| Number of bouts | 188.7 ± 18.0 | 408.6 ± 30.6 *** | 440.6 ± 25.6 | 680.4 ± 39.7 *** | 444.4 ± 24.6 | 684.9 ± 39.7 *** | - | |
| Mean Duration (sec) | 3.8 ± 0.5 | 4.0 ± 0.6 | 75.8 ± 5.8 | 52.3 ± 4.3 ** | 121.5 ± 9.1 | 74.4 ± 5.1 ** | - | |
| Day 2 | | | | | | | | |
| Total time (min) | 31.8 ± 3.2 | 39.6 ± 4.0 | 584.9 ± 35.1 | 611.9 ± 25.0 | 821.9 ± 35.4 | 787.2 ± 25.4 | - | |
| Number of bouts | 455.0 ± 64.5 | 579.4 ± 43.9 | 680.0 ± 68.0 | 851.4 ± 52.5 * | 682.9 ± 68.8 | 866.7 ± 52.9 * | - | |
| Mean Duration (sec) | 5.3 ± 1.7 | 4.2 ± 0.4 | 53.9 ± 5.3 | 43.9 ± 2.7 | 77.8 ± 9.7 | 56.0 ± 4.4 | - | |
| Light Period | | | | | | | | |
| Total time (min) | 31.1 ± 5.2 | 35.8 ± 4.7 | 752.3 ± 32.2 | 766.1 ± 24.1 | 655.2 ± 33.7 | 636.7 ± 23.2 | - | |
| Number of bouts | 444.9 ± 66.9 | 544.4 ± 42.1 | 744.0 ± 55.1 | 838.0 ± 38.7 | 742.0 ± 56.6 | 835.9 ± 40.5 | - | |
| Mean Duration (sec) | 5.0 ± 1.5 | 3.9 ± 0.4 | 62.1 ± 4.1 | 55.7 ± 3.5 | 55.3 ± 5.5 | 46.3 ± 2.6 | - | |
| Dark Period | | | | | | | | |
| Total time (min) | 12.4 ± 1.3 | 31.0 ± 4.7 *** | 379.3 ± 38.8 | 426.3 ± 41.9 | 1046.9 ± 39.8 | 981.4 ± 44.4 | - | |
| Number of bouts | 198.9 ± 22.9 | 443.6 ± 43.0 *** | 376.6 ± 47.8 | 693.9 ± 62.9 ** | 385.3 ± 45.1 | 715.7 ± 61.0 ** | - | |
| Mean Duration (sec) | 3.8 ± 0.2 | 4.2 ± 0.4 | 62.7 ± 6.0 | 37.5 ± 3.2 ** | 181.5 ± 28.3 | 87.3 ± 10.1 ** | - | |

CHAPITRE 2

ETUDE 2

La cataplexie est-elle un état dissocié du sommeil paradoxal? Rôle des neurones glutamatergiques du sublatérodorsal chez un modèle murin de narcolepsie.

Résumé

La narcolepsie de type 1 est une maladie neurologique rare caractérisée par une hypersomnolence diurne et des cataplexies. La cataplexie est une perte de tonus musculaire, pendant l'éveil, déclenchée par une émotion forte généralement positive. Elle est considérée comme un état dissocié du sommeil paradoxal (SP) pendant l'éveil. Cette hypothèse sous-entend que le réseau neuronal de l'atonie musculaire du SP serait également recruté pendant la cataplexie. Toutefois, cela n'a jamais été démontré. Afin de tester cette hypothèse nous avons aboli la transmission glutamatergique des neurones du noyau sublateralodorsal (SLD), responsable de la mise en place de l'atonie musculaire pendant le SP par la méthode d'ARN interférence dans un modèle de souris narcoleptiques délétées du gène de la préprohypocrétine. Puis, nous avons soumis nos souris expérimentales (shGlut; n=9) et contrôles (shCtrl; n=5) à des protocoles d'induction comportementales de cataplexies. Comme attendu, l'inactivation des neurones glutamatergiques du SLD (shGLUT) a engendré une perte d'atonie musculaire majeure pendant le SP. En revanche elle n'a pas aboli l'apparition des cataplexies ni en condition basale et ni après protocole d'induction comportementale suggérant que les neurones glutamatergiques du SLD ne sont pas nécessaire à l'apparition des cataplexies. De façon intéressante, les souris shGlut ont montré des formes incomplètes de cataplexies caractérisées par une immobilité réduite. Ainsi, les neurones glutamate du SLD seraient partiellement impliqués dans les cataplexies mais non essentiels à leur mise en place contrairement à ce qui est décrit dans la littérature.

ARTICLE 2

IS CATAPLEXY A DISSOCIATED STATE OF REM SLEEP ? ROLE OF THE GLUTAMATERGIC NEURONS OF THE SUBLATERODORSAL NUCLEUS IN A MOUSE MODEL OF NARCOLEPSY

Roman Alexis^{1,2}, Villalba Manon^{1,2}, Morel Anne-Laure^{1,2}, Yoann Cherasse³, Michael Lazarus³,
Luppi Pierre-Hervé^{1,2}, Libourel Paul-Antoine^{1,2}, Peyron Christelle^{1,2}

1. CRNL, CNRS UMR5292, INSERM U1028, Lyon, France

2. University Lyon1, Lyon, France

3. International Institute for Integrative Sleep Medicine, University of Tsukuba, Tsukuba, Japan

Corresponding author :

Dr. Christelle Peyron

CRNL, UMR5292 CNRS, Faculté de Médecine Laennec

7 rue Paradin, 69372 Lyon cedex 08, France

peyron@sommeil.univ-lyon1.fr

ABSTRACT

Narcolepsy type 1 is a chronic neurologic disorder characterized by an excessive daytime sleepiness and episodes of cataplexy. Cataplexy is a bilateral loss of muscle tone during wakefulness, and triggered by a strong and generally positive emotion. This symptom has long been described as a REM sleep dissociated state because of the specific muscle atonia observed during this sleep stage. It would suppose a common neuronal network underlying REM sleep and cataplexy muscle atonia, however it has never been demonstrated. To test this hypothesis, we proposed to abolish with short-hairpin RNA method (shRNA) the glutamatergic transmission in the sublaterodorsal tegmentum nucleus (SLD) -responsible for REMS atonia- in narcoleptic Orex-KO mice. Mice were first injected with the experimental (shGlut; n=9) or control AAV (shCtrl; n=5), then after 8 weeks necessary for an efficient expression, cataplexy were triggered. As expected, the inactive glutamate transmission in SLD neurons induced episodes of REM sleep without atonia in shGlut mice. Interestingly, cataplexy amounts were not reduced in shGlut mice during baseline condition or after cataplexy-induced protocols suggesting that glutamate SLD neurons are not necessary to generate cataplexy. However, we notice the occurrence of incomplete forms of cataplexy characterized by a reduced paralysis. Thus, SLD glutamate neurons would be partially involved in cataplexy but are not crucial in their occurrence in contrary to the major hypothesis described in the literature.

INTRODUCTION

Narcolepsy type 1 (NT1) is a rare neurologic disorder classically characterized by a tetrad of symptoms: excessive daytime sleepiness (EDS), cataplexy, hypnagogic hallucinations and sleep paralysis (Dauvilliers et al 2007; Scammell et al, 2015). NT1 is associated with an orexin/hypocretin deficiency caused by the severe postnatal loss of hypothalamic neurons producing the orexin/hypocretin neuropeptides (Peyron et al, 2000; Thannickal et al, 2000). Narcoleptic patients suffer from a wake-drive impairment that manifests itself by the incapacity to maintain wakefulness, termed EDS and highlights the wake-promoting effect of orexin neuropeptides (Sakurai 2007). Clinical observations have also suggested an impairment of REM sleep regulation in NT1. First, night-time sleep in narcoleptics is characterized by the premature occurrence of REM sleep episodes (Dauvilliers et al, 2007). Second, cataplexy, hypnagogic hallucinations and sleep paralysis have been described as dissociated states of REM sleep since they share phenotypic similarities with REM sleep. Finally, we recently showed that the inappropriate occurrence of REM sleep in narcoleptic mice is not due to an impairment of the homeostatic regulation of REM sleep. It is rather attributable to the lack orexin neuropeptides (Roman et al, 2017).

Cataplexy, the most specific symptom of NT1, is characterized by a bilateral loss of postural muscle tone during wakefulness that is triggered by a strong, generally positive emotion such as laughing excitedly or surprise (Dauvilliers et al, 2014; Overeem et al, 2011). The severity of cataplexy vary among patients in its frequency – from several a day to once per month – and its intensity - from partial muscle atonia involving only selected muscles, generally face or neck muscles, to a complete muscle atonia leading to a postural collapse (Khoury and Doghramji 2015, Dauvilliers et al, 2017). During those episodes, patients are unable to move but preserve consciousness. Cataplexy has long been thought to be an inappropriate intrusion of the REM sleep muscle atonia into wakefulness, but its underlying mechanisms remain poorly understood. Based on this hypothesis, it is suggested that cataplexy is using the same brainstem neuronal network than REM sleep muscle atonia, although it has never been demonstrated.

The neuronal network responsible for REM sleep muscle atonia is now well described. Its core, termed sublateralodorsal tegmentum nucleus (SLD, equivalent to the sub coeruleus area or peri locus coeruleus alpha in cats), is localized at the mesopontine junction (Boissard et al, 2002, 2003; Valencia-Garcia et al, 2017; Fraigne et al, 2015; Luppi et al, 2012). Electrolytic or neurochemical lesions of SLD in cats and rodents produced REM sleep episodes without muscle atonia composed of twitches, jerkings and jumpings that are interpreted as explicit manifestations of dream behaviors (Sastre and Jouvet, 1979; Lu et al., 20

06). Unit recording studies have reported that SLD neurons are essentially active during REM sleep and cease firing in NREM and wakefulness (REM-on neurons) (Sakai and Koyama, 1996; Sakai et al, 2015). More, c-fos labelling after induced REM sleep hypersomnia revealed that most of the SLD neurons are REM-active neurons (c-Fos+) and most of them (84%) are glutamatergic (Verret et al, 2005; Sapin et al, 2009; Clement et al, 2011). Recently, it has been shown that selective inactivation of the glutamatergic neurotransmission in the SLD induces REM sleep without muscle atonia in rats and mice (Valencia-Garcia et al., 2017; Krenzer et al., 2011). Moreover, those glutamate SLD neurons send descending projections to the ventromedial medulla (VMM), a region involved in the inhibition of spinal motoneurons that results in muscle atonia during REM sleep (Valencia-Garcia et al., 2017; Luppi et al., 2012). Altogether, these data indicate that glutamatergic SLD neurons are critical to maintain muscle atonia during REM sleep.

In this context, we propose that, in narcoleptic patients, an inappropriate activation of the glutamatergic neurons of the SLD during wakefulness would lead to a loss of muscular tone manifesting as cataplexy. To test this hypothesis, we specifically blocked the glutamate neurotransmission of the SLD in a well-recognized mouse model of narcolepsy: the orexin knockout mice (Orx-KO; Chemelli et al, 1999). Just as in humans, those mice lacking orexin neuropeptides have a global instability of vigilance states and show episodes of cataplexy triggered by rewarding stimuli such as palatable food or REM sleep deprivation (Mochizuki et al, 2004; Scammell et al, 2009; Roman et al, 2017). The infusion of an adeno-associated-viral vector (AAV) carrying short hairpin (sh)RNA against the glutamate vesicular transporter 2 (vGluT2), locally in the SLD, would produce a complete and chronic inactivation of glutamate neurotransmission of those neurons. This method already showed its efficiency suppressing REM sleep muscle atonia in rats (Valencia Garcia et al., 2017). Here, we look at the effect of the inactivation of the SLD glutamate neurotransmission on the expression of cataplexy in baseline condition and after protocols of emotional trigger of cataplexy in Orex-KO mice.

MATERIALS AND METHOD

VIRAL VECTORS

The adeno-associated viral vectors (AAV) were synthesized in the Osaka Bioscience Institute (Japan) (for detailed procedure see [Valencia-Garcia et al, 2017](#)). Two serotypes rh10 AAVs were used: the AAV-shGLUT containing a complementary mRNA sequence of the vesicular Glutamate transporter vGluT2 (5'-TGAAACCAGAGATAGCAAATC) that leads to the inactivation of glutamate transmission; the AAV-sh-CTRL that contain a control shGLUT sequence (5'-GTCAGGCTATCGCGTATCG). Each sequence was co-expressed with mCherry fluorescent protein under CMV ubiquitous promoter. The titer of the viral solution was of 4.5×10^{12} particles/mL for AAV-shCTRL-mCherry and 5.6×10^{12} particles/mL for AAV-shvGluT2-mCherry.

ANIMALS

Protocols were approved by the Ethics Research Committee of University-Lyon1 (DR2015-03) and conducted in accordance to the European Community guidelines for the use of animals for research. In this study, we used a mouse model of narcolepsy known to consistently exhibit cataplexy: the prepro-orexin knockout (Orex-KO) mice. All experiments were conducted on male Orex-KO mice with a C57Bl/6J genetic background, 6-8 weeks of age and weighing 21-28g at the time of surgery. Animals were housed under 12-h light dark cycle (08:00 am/pm) with constant temperature ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) and *ad libitum* access to regular chow and water.

EXPERIMENTAL DESIGN (Fig 1)

Fourteen mice were bilaterally injected with AAV-shGLUT (n=9) or AAV-shCTRL (n=5) into the SLD, and implanted the same day with EEG/EMG electrodes. After 5-7 days of recovery from surgery, they were placed in their recording barrel and connected for polysomnography recordings. Then, after 3 days of habituation, mice were recorded in baseline condition at three different time points: week 1 (B1), week 4 (B4) and week 8 (B8) after surgery. One or two days after B8 (in the 9th week), cataplexies were triggered using the chocolate protocol (see below). Then, 3 days later a protocol of REM sleep deprivation using the small-platforms-over-water method ([Arthaud et al, 2015](#)) was conducted. Following this protocol, mice show a strong increase of cataplexy in the first hour of recovery period at a time of day when mice do not have cataplexy in baseline condition ([Roman et al, 2017](#)). Finally, mice were deeply anesthetized and sacrifice for histological procedures.

SURGICAL PROCEDURES

Fourteen mice were deeply anesthetized with a ketamine:xylazine mixture (100:10 mg/kg, intraperitoneally; Virbac) and placed on a stereotaxic frame (David Kopf Instruments). We bilaterally injected experimental and control mice with 80 nL of AAV-shGLUT (n=9) or AAV-shCTRL (n=5) respectively delivered at 60nL/min. Microinjections targeted the SLD [anterior-posterior (AP) -6.27 mm from Bregma; medial-lateral (ML), ± 0.85 mm; dorsal-ventral (DV), -4.45 mm from the skull surface; 20° posterior angle) using a quartz micropipette (20 μ m of tip diameter) fixed on a 10 μ L Hamilton syringe and placed into an UltraMicroPump (UMP3 Ultra Micro Pump, WPI). At the end of the injection, pipette was left in place for 10 min before being removed in order to allow AAV tissue absorption and avoid AAV aspiration by the movement of the micropipette. Then, mice were implanted with EEG and EMG electrodes for polysomnographic recordings as previously reported ([Roman et al., 2017](#)). Briefly, three stainless-steel screws were insert above the frontal (1.5 mm anterior to Bregma, 1.7 mm lateral to midline), parietal (2.5 mm posterior to Bregma, 1.7 lateral to midline) and cerebellar (6 mm posterior to Bregma) cortices. Two gold-coated electrodes were placed between the right and left neck muscles for differential EMG recording. Electrodes were then fixed to the skull using acrylic cement (Superbond, C&B Sun Medical) and connected to a miniature plug (Plastics One, Bilaney, Germany) that was further fixed using dental cement (Paladur, Heraeus Kulzer). Animals were weighed daily during the week of recovery.

POLYSOMNOGRAPHIC RECORDINGS

Mice were placed in a Plexiglas recording barrel (30-cm diameter) and were connected to a cable plugged to a rotating connector (Plastics One, Bilaney, Germany) that allow free movements during the entire experiment. As a positive emotional state promotes the occurrence of cataplexy, recording barrels were enriched with a plastic piece (Lego, Danemark), a small bowl and slices of paper for nest building. Polysomnographic and video recordings were collected and synchronized using Sleepscore software (Viewpoint, Lyon, France) ([Libourel et al., 2015](#)). Each frontal and parietal EEG signal was referenced to the cerebellar EEG electrode, and muscle tone was assessed by a differential EMG signal. EEG and EMG signals were then amplified (EEG: 2000 x; EMG: 5000 x) (16-Channel Model 3500, AM System; US). Signals were band filtered (EEG: 0.3Hz-100Hz; EMG: 1Hz-100Hz) and digitalized at 512Hz (NI Usb 6343 card, National Instrument, Austin, US). Video recordings were continuously collected with a camera fixed above each barrel (Point Grey firefly MV, Black & White, 640x480, 15 fps).

INDUCTION OF CATAPLEXY

Chocolate condition (Choc)

Chocolate has been described to be a good trigger of cataplexy in Orex-KO mice ([Oishi et al., 2013](#)). Thus, 1-2 days after B8 (in the 9th week), a piece of milk chocolate (4.5g, Super U) was given to each mouse at 7:30 pm in addition to regular food. Mice were recorded for the entire dark period (ZT-12 to ZT-24).

REM sleep deprivation with platform over water method:

We recently reported that in the first hour of recovery from 48hrs of REM sleep deprivation using small-platforms-over-water method, mice underwent numerous cataplexy, before the occurrence of the REM sleep rebound, and at a time of day when they do not occur in baseline condition ([Roman et al., 2017](#)). REM sleep deprivation was started at 10:00 AM (ZT2) when REM sleep amount is high and lasted for 48 hrs ([for detailed procedures see Arthaud et al., 2015](#)). Briefly, during deprivation, mice were placed in a Plexiglas barrel containing two small platforms peaking above 1cm of water. Mice self-suppressed entrance in REM sleep to avoid falling in the water. Two days later, at ZT2, mice were returned to their habituation barrel where they could sleep *ad libitum*. The first 6 hours of recovering were analyzed offline.

HISTOLOGICAL PROCEDURES

Brain Preparation

Mice were deeply anesthetized with a lethal dose of pentobarbital (150 mg/kg, intraperitoneally, Ceva Santé Animale) and transcardially perfused with Ringer's lactate solution containing 0.1% heparin, followed by 50mL of a 4% paraformaldehyde (PFA) solution. Brains were post-fixed in the same fixative solution at 4°C for 48hrs and deeped in a sterile 30% sucrose solution during 48hrs. They were then rapidly frozen in a -30°C methylbutane solution and cut in serial coronal sections with a cryostat (30µm thick, Microm, HM 5500). Free-floating sections were collected in RNase free cryoprotectant solution (DEPC 0.05%, Glycerol 20%, Ethylene Glycol 30% in K₂HPO₄ / KH₂PO₄ 50mM buffer pH 7,4) and stored at -20°C until use.

In situ hybridation vGlut2/vGat

Antisense and sense digoxigenin-labeled probes against vGlut2 and the vesicular transporter for GABA (vGat) were synthesized from a recombinant linearized plasmid containing vGlut2 or vGat cDNA, and using a non-radioactive RNA labelling kit (Roche Diagnostic; [Clément et al., 2011](#)). Briefly, brain sections were rinsed in a PBST containing a standard saline citrate solution (SSC2x) and 0.2% of RNase inhibitor (ProtectRNATM, Sigma-Aldrich) for 10 min twice. Then, they were

incubated overnight at 55°C in the hybridization buffer containing 0.5mg/mL of the dioxigenin-labeled probe. Sections were washed in SSCx1 50% formamide and 0.1% Tween 20, treated at 37°C in a buffer solution containing RNase A (USB Corporation), and finally incubated in a solution of anti-dioxigenin IgG conjugated to alkaline phosphatase (1/2000, Roche Diagnostic). Free-floating sections were rinsed twice in PBST and once in PBS (10mM). Staining was revealed using nitroblue tetrazolium and 5'-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (Roche Diagnostic) in a 100mM Tris-HCl buffer at 37°C for 2hrs. Sections were then mounted on slides and coverslipped using VectaMount™ (VectorLabs).

Double immunofluorescence mcherry/vGlut2

Coronal sections of the ventromedial medulla (VMM) nucleus (including the gigantocellular reticular nucleus alpha part : GiA ; ventral part : GiV; raphe magnus nucleus : RMg) were isolated and incubated for 3 nights at 4°C in a PBST-Az containing both rabbit IgG against vGlut2 (1/1000 SynapticSystems) and rat IgG against mCherry (1/50 000, SynapticSystems). They were rinsed in PBST 0.02M for 10 min three times and incubated overnight at 4°C in PBST-Az containing a mixture of secondary antibodies: Alexa Fluor 488 anti-rabbit IgG and Alexa-fluor 594 anti-rat IgG both made in donkey (1/500, ThermoFisher). After 3 x 10min rinses in PBST, sections were mounted on slides, and coverslipped using Fluoromount DAPI™ (Vector Laboratories).

ANALYSES

Polysomnography and video Analysis

Vigilance states were scored by 5-sec epochs using Sleepscore software, and according to standard criteria (Franken, 1999). The visual observation of EEG/EMG signals was sufficient to characterize wake, NREM and REM sleep whereas simultaneous video recordings was necessary to distinguish cataplexy. To characterize the cataplexy episodes, we first based our scoring on the consensus definition (Scammell et al., 2009) that describe the four following criteria (1) an abrupt episode of nuchal muscle atonia lasting for at least 10 sec (2) the immobility of the animal during the entire episode (3) an EEG signal with high theta and low delta activities and (4) at least 40 sec of wakefulness preceding the episode. We also considered as cataplexy an episode where the atonia on the nuchal EMG took place progressively, showed a complete behavioral arrest on the video recordings and a theta activity on the EEG. In a second time, since it appeared that some cataplexy contained muscular phasic events on the nuchal EMG recordings, we re-scored them as 'cataplexy

with twitches'. Total amount, bouts number and mean bouts duration were evaluated for waking, NREM, REM and both types of cataplexy during Baselines, Choc and Rebound conditions.

Spectral Analysis

The spectral analysis was performed by a Fast Fourier Transformation (FFT) on the parietal EEG (MatLab) for REM sleep and cataplexy. All episodes with artifacts defined as brief or sustained disturbance of the EEG voltage, were excluded from the analysis. A power spectrum was evaluated for each 5-sec epoch (bin size 0.1Hz; 0-25Hz). Each power value of a frequency band was then expressed as a percentage of the total power spectrum.

Muscle tone quantification on nuchal EMG during REM sleep

Quantification was performed with software routines written in Matlab (the Mathworks, Natick,MA). Only REM sleep bouts of at least 20-sec duration were considered in our analysis. We extracted from nuchal EMG the mean muscle tone values of REM sleep episode and each of their preceding NREM sleep episode: EMG signals were first centered and rectified (negative EMG values were considered as positive). Then, we smoothed EMG with sliding average filter of a 0.2 sec resolution. First and last 5-seconds of each REM sleep episode were removed to exclude the transitions phases. Then, to quantify REM sleep phasic events, a threshold was defined for each REM sleep bouts, based on the 95% quantile of the EMG mean value voltage of its prior NREM episode. Every EMG event above threshold was considered as a phasic event. We assessed the number of phasic events per REM sleep episode and the proportion of REM sleep episodes containing at least one phasic event. Then, the tonic component of REM sleep was evaluated by removing the phasic events and average the voltage for each episodes.

It was expressed as a REM/NREM ratio of the mean voltage for each animal.

EMG in REM SLEEP AND CATAPLEXY NORMALIZED TO TOTAL EMG (EMG_{NORM})

EMG signals were centered, rectified and smoothed with a Matlab routine as described above. An absolute value of the EMG voltage was defined as the mean voltage for each 5 sec periods. Absolute values were then normalized between 0 (minimal value) and 100 (maximal value). Those relative EMG_{NORM} values were then averaged for each states of vigilance and cataplexy. EMG_{NORM} of cataplexy and REM sleep were assessed for all baseline periods.

Actimetry during Cataplexy

Quantification of body movements during cataplexy episodes of control and experimental mice was done using actimetry from video recordings. For each cataplexy episode we defined manually an area of analysis that exclude all except the mouse body. The actimetric value represents the number of pixels with modified grey value between two successive video frames (20ms interval) due to mouse movements. Episodes of at least 15 sec were considered for analysis. First and last 2-sec of each cataplexy episodes were removed from the analysis. We chose to remove only 2 sec because considered behavioral arrests were abrupt as seen on the video recording and transitions were short. A threshold of 800 pixels/sec was estimated as a good index for a large body movement. We then evaluated number of events and their duration and assessed the proportion of cataplexy episodes containing at least one event.

Histological analysis

Photomicrographs and mapping of injection sites and were realized from the endogenous fluorescence of mCherry using an Axioskop microscope (Zeiss) equipped with a motorized x-y-sensitive stage and a colour video camera connected to a computerized image analysis system (Mercator; Explora Nova). Photomicrographs of hybridization *in situ* were taken using the same system. Images of double of double immunofluorescence mCherry/vGlut2 were scanned and recorded using confocal fluorescence microscope SP5 (Leica) at a resolution of 1024x1024 pixels/frame with an objective 63x (0.5µm image thickness).

Statistics

To fit into the 3R rules, we minimized the number of mice per group (less than 10 per conditions). Therefore, we utilized non-parametric tests in our analyses. Mann & Whitney tests were used to compare shCTRL and shGLUT groups for the following parameters: vigilance states and cataplexy total amount, number of episodes and bouts duration; EMG quantification and actimetry. The time effect changes across different baseline periods was analyzed with Wilcoxon signed rank test. We used a two way anova to analyze the EEG power density (factor group & spectral band) and REM sleep circadian distribution in B8 (factor group & time). All statistics were performed using GraphPad Prism software and significance was set at $p = 0.05$.

RESULTS

Inactivation of glutamate neurotransmission

The efficiency of AAV-shCTRL and AAV-shGLUT transfection was evaluated thanks to the co-expression of the reporter protein mCherry. Numerous cell bodies were strongly labeled in SLD region of AAV-shCTRL mice (n=5; Fig 2-A) and AAV-shGLUT mice (n=9; Fig 2-B). All injection sites included the whole SLD in our both groups (Fig 2-C-D). mCherry fluorescent neurons were also observed in adjacent pontine regions such as the ventral part of the laterodorsal tegmental nucleus (LTD), the median parabrachial nucleus and in two shGLUT mice rare mCherry neurons were seen in the lateral parabrachial nucleus (LPB).

To further determine the efficacy and specificity of the blockage of the glutamatergic neurotransmission, we first performed *in situ* hybridization for vGluT2 and vGAT on SLD brain sections. As illustrated in Fig 3-A, no vGluT2 positive neurons were seen in the SLD after shGLUT treatment while the surrounding regions were unaffected. In both shCTRL and shGLUT mice, vGAT neurons were strongly labeled after vGAT *in situ* hybridization in SLD and surrounding regions suggesting that GABAergic transmission was preserved in all mice (Fig 3-C-D).

Secondly, we looked at the expression of vGluT2 within SLD axonal terminals in the VMM by confocal microscopy analysis in the VMM after double immunostaining of vGluT2 (vGluT2+; green) and mCherry (mCherry+; red). In shCTRL mice, axon terminals from SLD neurons (mCherry positive fibers) also contained vGluT2 staining (Fig. 3-L). In contrary, none of the mCherry axons were stained for vGluT2 (Fig-3-K). Thus, AAV-shGLUT neurons (mCherry+) still sent axons to the VMM, but did not express vGluT2 in their terminals. Altogether those data indirectly indicate that SLD glutamatergic neurotransmission was efficiently and specifically blocked.

Effect of the SLD inactivation on vigilance states

Mice were recorded in baseline condition (B) at 1, 4 and 8 weeks after AAV injections (Fig 1). Detailed quantification of vigilance states for B1, B4 and B8 are reported in Table 1. Daily amounts of wakefulness (Friedman test: shCTRL p = 0.57; shGLUT p = 0.15) and NREM (Friedman test: shCTRL p = 0.52; shGLUT p = 0.15) were unaffected by treatments and remained similar between groups for each time period (Mann & Whitney: Wake B1 p = 0.85; B4 p = 0.11; B8 p = 0.11; NREM B1 p = 0.57; B4 p = 0.06; B8 p = 0.27) (Fig 4A).

In B8, shGLUT mice had a significant $10,7 \pm 2.2$ % reduction of REM sleep amount compare to prior baseline periods (Friedman test $p=0.006$; Mann & Whitney B1 $p = 0.02$ and B4 $p=0.01$ respectively) but showed no difference in REM sleep quantity with the control group (Mann & Whitney $p = 0.28$). More, mean duration of REM sleep bouts was significantly reduced with time after treatment (Friedman test $p = 0.006$) that led to shorter episodes than control mice as early as B4 (Mann & Whitney B4 $p = 0.001$ & B8 $p = 0.008$ respectively; Fig 4-C). In addition, the number of REM sleep episodes increased in shGLUT mice (Friedman test $p = 0.001$), a difference that reached significance with shCTRL mice by B8 (Mann & Whitney $p = 0.036$; Fig 4-D). No difference in EEG power density spectrum was evidenced during REM sleep between the two groups (Fig 4-E) indicating that cortical activation is not mediated or influenced by glutamatergic SLD neurons, as already shown in rats (Valencia Garcia et al., 2017). Finally, the circadian distribution of REM sleep quantities at B8 was similar between groups (Two-way Anova $p=0.21$, Fig 4-B). REM sleep was progressively affected by the shGLUT with most of the effects at B8. To summarize, the genetic inactivation of glutamate neurotransmission of SLD neurons led to an increase in shorter REM sleep bouts although total amount and circadian distribution were maintained, and no modification of wake and NREM sleep.

Effect of glutamatergic SLD neurons inactivation on muscle atonia during REM sleep

In control mice, REM sleep followed the classic criteria described in the literature: a fast cortical activity on the EEG and a sustained reduction of muscle tone compared to the preceding NREM sleep episode that is indicating a complete atonia on the nuchal EMG recordings (Fig 5-A). In contrary, shGLUT mice showed REM sleep episodes with phasic events on the EMG signal (Fig 5-B). Phasic events were defined as irregular, fast, and sporadic increase of the EMG voltage and were considered as such when voltage exceeded the 95% quantile of the previous NREM sleep episode EMG value and were accompanied with simultaneous motor activity on the video recordings. Interestingly, number of phasic events per REM sleep episode remained stable throughout time in controls (Friedman $p=0.252$) while it increased in shGLUT mice (Friedman test $p=9.7E-5$). At week 1 after the injection (B1), the number of phasic events per REM sleep episode was similar in shGLUT and control mice (0.54 ± 0.11 and 0.51 ± 0.14 respectively; Mann & Whitney $p=0.88$; Fig 6-A) reflecting previously described muscle twitches occurring normally during REM sleep (Fraigne et al., 2011). The number of phasic events was already significantly higher in shGLUT mice at B4 compared to controls (1.14 ± 0.18 versus 0.41 ± 0.2 respectively; Mann & Whitney

p=0.023) and was further increased at B8 (1.49 ± 0.18 versus 0.51 ± 0.12 respectively; Mann & Whitney p=0.0016).

We then calculated the mean ratio of REM/NREM sleep EMG voltage to evaluate the tonic component of muscle activity (Fig 6-B). In control animals, this ratio remain the same in all baseline periods (0.76 ± 0.06 in B1; 0.8 ± 0.043 in B4 and 0.83 ± 0.035 in B8; Friedman test p=0.14). It reflects a 20% decrease in muscle tone between NREM and REM sleep. Ratio was found different between shGLUT and shCTRL mice at B8 where it reached 1.02 ± 0.03 for shGLUT mice (Mann & Whitney test p = 0.00098), indicating that mean EMG was no longer decrease in REM sleep.

Together these analyses demonstrate that the abolition of glutamate neurotransmission of SLD neurons conducts to the complete loss of muscle atonia during REM sleep as previously shown in rats ([Valencia Garcia et al., 2017](#)).

Effect of glutamatergic SLD neurons inactivation on the occurrence of Cataplexy

We then evaluated the number and duration of cataplexy during the dark phase at B1, B4, B8 and after induction by the chocolate protocol as illustrated and reported in Fig 7-A and Tab-1. As previously described ([Burgess et al., 2013](#); [Oishi et al., 2013](#)), the number and duration of cataplexy was limited during baseline recordings (Fig-7A, Tab-1) and was drastically increase after chocolate in shCTRL mice (Friedman test p = 0.001; Fig 7-A). Of great interest, impaired shGLUT also showed a strong increase in the amount of cataplexy after chocolate induction protocol (Friedman test p = 0.001; Fig 7-A). Control mice had a slight increase of cataplexy total duration from B1 to B8 (Friedman test p = 0.012; Wilcoxon B1 vs B8 p = 0.03) that was not observed in the shGLUT mice. In addition, no difference was found in total amount of cataplexy between shCTRL and shGLUT mice at baseline (Tab-1) or after chocolate induction protocol (55.35 ± 3.8 min versus 54.05 ± 8.9 min respectively; Mann & Whitney p = 0.82). The triggering effect of chocolate was mainly due to an increase in the number of cataplexy in AAV-shCTRL (3.5 fold increased: from 16.5 ± 4.9 in B3 to 52.83 ± 5.9 in Choc; Wilcoxon test p = 0.03) and AAV-shGLUT mice (3.4 fold increased: from 26.78 ± 7.1 in B3 to 84.34 ± 13.1 in Choc; Wilcoxon test p = 0.004; data not shown). However, from B8 to chocolate conditions, cataplexy bouts duration didn't changed (Wilcoxon test p = 0.84 in shCTRL p = 0.73 in shCTRL mice).

Interestingly, cataplexy episodes of shGLUT mice were found to be shorter in average than those of shCTRL mice at B8 (Mann & Whitney test p=0.005; Tab-1) and after chocolate induction (36.31 ± 2.9 min and 59.03 ± 6.1 min respectively; Mann and Whitney p = 0.003; Fig 7-B). This observation

was accompanied in B8 (Tab-1) and after chocolate (93.86 ± 16.13 in shGLUT mice and 56.5 ± 8.34 in shCTRL mice; Mann and Whitney $p = 0.08$; Fig 7-C) with a non-significant tendency for increase in number of cataplexy episode. Finally, the EEG spectral power of cataplexy episodes, as accessed after chocolate induction, was similar in both groups of mice, suggesting that glutamate SLD neurons are not involved in cortical activation during cataplexy (Fig 7-D).

We previously reported that specific REM sleep deprivation with the small-platforms-over-water method induces cataplexy episodes in the first 30 min of the recovery period in Orex-KO mice during the light period at the time of day when no cataplexy is usually seen (Roman et al., 2017). Using the same protocol of induction, we found the same number of cataplexy in shGLUT and shCTRL mice during the recovery period (9.81 ± 3.6 min vs. 11.19 ± 3.7 min, respectively; Mann & Whitney: $p = 0.63$) (Fig. 7A). Overall, these data showed that the inactivation of the SLD glutamatergic neurotransmission does not impair cataplexy generation.

Characterization of cataplexy in shGLUT mice

Whereas REM sleep occurs when mice are curled up in their nest and follows a NREM sleep episode showing low muscle tone on the EMG, cataplexy occurs during active wakefulness. As shown in Fig 8-A, typical cataplexy is characterized by a fast cortical activity on the EEG that is highly enriched in theta rhythms (Fig 7D) and a strongly decreased muscle tone on the nuchal EMG that is preceded and followed by high voltage EMG activity of variable amplitude reflecting the animal behavior. Therefore, EMG value during cataplexy cannot be normalized to EMG value of preceding NREM sleep as performed earlier on EMG analysis during REM sleep. For each mouse, EMG during cataplexy was thus normalized to the highest voltage EMG value over all vigilance states. Using this method of analysis, we confirmed a loss of muscle atonia in shGLUT mice during REM sleep with an EMG_{NORM} value significantly higher than in shCTRL mice (5.52 ± 0.4 versus 3.84 ± 0.6 respectively; Mann & Whitney $p = 0.043$). However, no difference in cataplexy EMG_{NORM} was observed across time in shCTRL and shGLUT mice (Friedman test: $p = 0.07$ and $p = 0.53$ respectively) and between groups of mice (6.33 ± 0.6 in shGLUT and 5.38 ± 0.6 in shCTRL; Mann & Whitney: $p = 0.47$) (Fig 9). These data suggest that the glutamatergic neurotransmission from the SLD is not involved in the muscle atonia observed during cataplexy.

Of interest, we notice that in some cataplexy show occurrence of brief muscular activity events named as “twitches” (Fig 8-B-C). Those events were observed in shCTRL and shGLUT mice. To determine if inactivation of glutamate SLD neurons could modulate their occurrence, every cataplexy containing at least one twitch was labeled as ‘cataplexy with twitches’. In B1, cataplexies

with twitches were observed in the same proportion in shCTRL and shGLUT mice (respectively $7.76 \pm 3.2\%$ versus $6.2 \pm 1.8\%$ of the total number of cataplexy; Mann & Whitney $p > 0.99$; Fig 10-A).

In chocolate conditions, the proportion of cataplexy with twitches was significantly higher in shGLUT than in shCTRL ($11.48 \pm 1.8\%$ versus $4.24 \pm 1.3\%$ respectively; Mann & Whitney $p = 0.012$; Fig 11-B). Interestingly this method of deprivation induced in both type of mice an increased proportion of cataplexy with twitches. Indeed, it reached $20.27 \pm 10.7\%$ in shCTRL and $47.14 \pm 14.8\%$ in shGLUT and was significantly higher in these last mice (Mann & Whitney $p = 0.024$; Fig 11-C). Cataplexy with twitches represent 9 of the 54 (16.7%) cataplexy observed in control group and 33 of the 84 (39.3%) cataplexy in the experimental group (Fig 11-F). Thus, glutamate inactivation in the SLD have increase the probability of cataplexy with twitches occurrence.

Further, we could observe in shGLUT mice only, the occurrence of cataplexy episodes containing strong phasic events (Fig 8-C). During those episodes, mice still have a reduced motor activity on the video recording and a particular posture while irregular and high voltage increase occurred on the nuchal EMG signals. Those episodes were analyzed as cataplexy with twitches

Observation of cataplexy with struggles

Immobility has been declared as one of the main feature in the consensual definition of murine cataplexy (Scammell et al, 2009). When looking carefully at video recordings, we found that despite a global immobility, mice had episodes of cataplexy where they seemed to struggle as if they fought to get out of it. During such episodes they globally had a postural collapse that was partially interrupted by short and intermittent body movements. We first classified two types of cataplexy: (1) 'typical cataplexy' when no struggle occurred during the episode (2) 'cataplexy with struggle' when at least one movement was detected during the episode in AAV-shCTRL and AAV-shGLUT mice (video supplementary). We also evaluated the number of movements (or struggle) for each episode using actimetry analysis. During the 12 hrs of dark phase in B1, struggles appeared only occasionally (1.0 ± 0.7 in shCTRL and 1.0 ± 1.0 in shGLUT mice; Fig 11-A), so the number of cataplexy episode with struggles was also very low in all mice and similar between groups (0.75 ± 0.5 in shCTRL and 0.67 ± 0.6 in shGLUT; Mann & Whitney $p > 0.99$; Fig 11-B). From B8, number of cataplexy with struggles were found to be significantly higher in shGLUT mice compared to shCTRL mice (4.17 ± 1.5 versus 0.67 ± 0.4 respectively; Mann & Whitney $p = 0.03$) and this difference was further increased when cataplexies were triggered by chocolate (17.83 ± 2.6 versus 5.33 ± 1.1 respectively; Mann & Whitney $p = 0.007$; Fig 11-B). It reflects a higher total number of struggles in AAV-shGLUT mice compared to AAV-shCTRL mice during B8 (10.83 ± 4.7

versus 2.5 ± 2.1 respectively; Mann & Whitney $p = 0.03$) and chocolate (34 ± 4.3 versus 10.83 ± 3.8 respectively; Mann & Whitney $p = 0.004$) conditions. Interestingly, chocolate elevated the number of cataplexy with struggles in both groups of mice as compared to B8 (Wilcoxon $p=0.03$ for both groups). Thus, chocolate condition represents the peak of struggles occurrence in both type of mice, with an average of 0.51 ± 0.1 movements per episodes in shGLUT mice versus 0.23 ± 0.1 in shCTRL mice (Mann and Whitney $p = 0.01$; Fig 11-C). More, the proportion of cataplexy with struggle reached 25.9 ± 1.82 % of cataplexy episodes in AAV-shGLUT and only 11.6 ± 2.05 % in AAV-shCTRL (Mann & Whitney $p = 0.002$; Fig 12-D). Thus, cataplexy observed in AAV-shGLUT mice has a different profile than cataplexy in controls. Together, the increased occurrence of twitches on the EMG and of struggle on the video recordings during cataplexy in shGLUT mice strongly suggest that motor control is affected in shGLUT mice.

DISCUSSION

With this study, we show that the genetic inactivation of glutamate transmission of SLD neurons in narcoleptic Orex-KO mice causes REM sleep without atonia as previously shown in wild-type mice and rats (Krenzer et al, 2011; Valencia-Garcia et al, 2017). More importantly, we show that in contrary to what was believed, cataplexy still occur when glutamatergic neurotransmission from the SLD is impaired. However, inactivation of the SLD provoked the appearance of motor twitches during cataplexy. Altogether these data indicate that SLD glutamatergic neurons are essential for muscle atonia during REM sleep but are only partially involved in the motor inhibition during cataplexy. Thus, cataplexy does not depend on the activation of glutamatergic neurons of the SLD.

Technical consideration

The complete abolition of glutamatergic neurotransmission of the SLD and the drastic impairment of muscle atonia during REM sleep were the absolute condition to demonstrate whether the glutamatergic neurons of the SLD, responsible for muscle atonia during REM sleep, are also necessary for the expression of cataplexy. The use of AAV-shRNAs specifically directed against vGlu2 mRNA and locally injected allowed us, as verified by in situ hybridization, to inactivate only the glutamatergic transmission of the SLD neurons. This same molecular tool was previously successfully used in mice (Silva et al., 2005) and rats (Valencia-Garcia et al, 2017). In our study, recordings were monitored at several time points during 8 weeks after viral injection and revealed a progressive loss of REM sleep atonia due to the vGlu2 gene inactivation with an incomplete effect on REM sleep muscle atonia at 4 weeks post-injection in contrast to what was seen in rats where the maximal effect was seen as early as 4 weeks post-injection (Valencia-Garcia et al, 2017). Nevertheless, we found a major impairment on muscle atonia in REM sleep at 8 weeks post-injection. We cannot assert that the effect is maximal since we did not record mice for a longer period of time but histological data clearly show that vGlu2 is no more expressed by SLD neurons and no vGlu2 proteins can be detected in SLD axonal terminals at 8 weeks post-injection. Altogether, the absence of vGlu2 detection with histology and the strong effect on REM sleep muscle atonia indicate that glutamatergic neurotransmission is likely to be sufficiently suppressed at this later time point.

Control of the loss of muscle atonia in REM sleep

As previously shown (Valencia-Garcia et al, 2017; Krenzer et al, 2011), we confirmed that glutamate SLD neurons are crucial for REM sleep atonia and provide an additional detailed analysis

of phasic and tonic components of the EMG during REM sleep episodes. Just as in [Valencia-Garcia's study \(2017\)](#), we found that the mean duration of REM sleep bouts was slightly but significantly reduced likely due to movements that ended prematurely those episodes. In contrast to rats, the total amount of REM sleep was unaffected by the treatment, possibly due to a compensatory effect of the large number of REM sleep episodes in narcoleptic mice ([Roman et al, 2017](#)).

Cataplexy

Although we obtained a strong impairment of muscle atonia during REM sleep, neither cataplexy in baseline condition nor those induced by chocolate or sleep deprivation were suppressed or even reduced by the treatment showing that triggering cataplexy does not rely on the glutamatergic neurons of the SLD. It also confirms that behavioral arrests in narcoleptic mice are cataplexy and not direct transition from waking to REM sleep ([Scammell et al, 2009](#); [Zhang et al, 2007](#)). Several prior studies have been successful in decreasing the amount of cataplexy (i.e. after lesions of the CeA or the prefrontal cortex, two limbic structures involved in the modulation and expression of emotions) ([Burgess et al, 2013](#); [Oishi et al, 2013](#)). More, the chemogenetic manipulation of GABAergic cells of central nucleus of amygdala (CeA) ([Mahoney et al, 2017](#); [Snow et al, 2017](#)) or the optogenetic activation of dorsal raphe nucleus (DRN) serotonergic neurons terminals in the amygdala ([Hasegawa et al, 2017](#)) strongly reduced the number and total amounts of cataplexy. Altogether, these data highlight the importance of the emotional component to trigger cataplexy but do not provide clues on the intrinsic network recruited to provoke muscle atonia. In these studies, the authors have proposed that limbic structures would trigger cataplexy through SLD disinhibition ([Mahoney et al 2017](#); [Snow et al, 2017](#)). Indeed, CeA neurons send direct inhibitory projections to the ventrolateral periaqueductal gray and lateral pontine tegmentum (vlPAG/LPT) a key region that inhibits SLD neurons during wakefulness and suppresses REM sleep ([Boissard et al, 2003](#) ; [Lu et al, 2006](#)). Here, we demonstrated that SLD disinhibition is not necessary to trigger cataplexy, suggesting a more complex and widespread underlying neuronal network.

Although total amount and number of cataplexy were maintained in the shGLUT group, we found a significant portion of cataplexy episodes enriched in motor events. Thanks to the protocols of cataplexy induction providing a large number of episodes, we were able to thoroughly analyze these motor events that were also present, in a smaller proportion, in baseline condition. Two abnormal features of cataplexy were seen, small muscle events on the EMG recordings (twitches) and movements that looked like struggles on the video recordings. Interestingly, the mean

duration of cataplexy bouts was reduced in shGLUT mice reflecting a possible impaired maintenance due to the increased motor activity.

Finally, Clinical and epidemiological reports on human cataplexy indicate that 30% of the patients have only partial paralysis affecting mainly facial and neck muscle (Overeem et al, 2011). More, cataplexy often takes place progressively following the antero-posterior gradient (face, then neck, then arms then legs) (Vetrugno et al., 2010). In agreement with the current data, those observations suggest the involvement of a widespread neuronal population in the control of muscle tone during cataplexy rather than a unique nucleus.

To conclude, our data indicate glutamatergic neurons on the SLD might participate to the maintenance of muscle atonia during cataplexy but that alone they are not sufficient. It is likely that another still-unknown neuronal network is recruited during cataplexy.

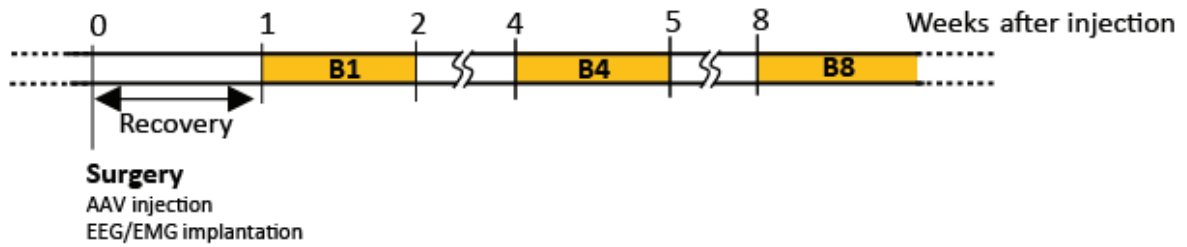
REFERENCES

- Arthaud S, Varin C, Gay N, Libourel P-A, Chauveau F, Fort P, Luppi P-H, 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.
- Boissard R, Fort P, Gervasoni D, Barbagli B, Luppi P-H (2003) Localization of the GABAergic and non-GABAergic neurons projecting to the sublaterodorsal nucleus and potentially gating paradoxical sleep onset. *Eur J Neurosci* 18:1627–1639.
- Boissard R, Gervasoni D, Schmidt MH, Barbagli B, Fort P, Luppi PH (2002) The rat ponto-medullary network responsible for paradoxical sleep onset and maintenance: a combined microinjection and functional neuroanatomical study. *Eur J Neurosci* 16:1959–1973.
- Burgess CR, Oishi Y, Mochizuki T, Peever JH, Scammell TE (2013) Amygdala Lesions Reduce Cataplexy in Orexin Knock-Out Mice. *J Neurosci* 33:9734–9742.
- Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, Elmquist JK, Scammell T, Lee C, Richardson JA, Williams SC, Xiong YM, Kisanuki Y, Fitch TE, Nakazato M, Hammer RE, Saper CB, Yanagisawa M (1999) Narcolepsy in orexin knockout mice: Molecular genetics of sleep regulation. *Cell* 98:437–451.
- Clement O, Sapin E, Berod A, Fort P, Luppi P-H (2011) Evidence that Neurons of the Sublaterodorsal Tegmental Nucleus Triggering Paradoxical (REM) Sleep Are Glutamatergic. *Sleep* 34:419–423.
- Dauvilliers Y, Amulfi I, Mignot E (2007) Narcolepsy with cataplexy. *Lancet* 369:499–511.
- Dauvilliers Y, Siegel JM, Lopez R, Torontali ZA, Peever JH (2014) Cataplexy--clinical aspects, pathophysiology and management strategy. *Nat Rev Neurol* 10:386–395.
- Fraigne JJ, Orem JM (2011) Phasic Motor Activity of Respiratory and Non-Respiratory Muscles in REM Sleep. *Sleep* 34:425–434.
- Fraigne JJ, Torontali ZA, Snow MB, Peever JH (2015) REM sleep at its core circuits, neurotransmitters, and pathophysiology. *Front Neurol* 6:UNSP 123.

- Hasegawa E, Maejima T, Yoshida T, Maseck OA, Herlitze S, Yoshioka M, Sakurai T, Mieda M (2017) Serotonin neurons in the dorsal raphe mediate the anticataplectic action of orexin neurons by reducing amygdala activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:E3526–E3535.
- Khoury J, Doghramji K (2015) Primary Sleep Disorders. *Psychiatr Clin North Amer* 38:683–+.
- Krenzer M, Anaclet C, Vetrivelan R, Wang N, Vong L, Lowell BB, Fuller PM, Lu J (2011) Brainstem and Spinal Cord Circuitry Regulating REM Sleep and Muscle Atonia. *PLoS One* 6:e24998.
- Libourel P-A, Corneyllie A, Luppi P-H, Chouvet G, Gervasoni D (2015) Unsupervised Online Classifier in Sleep Scoring for Sleep Deprivation Studies. *Sleep* 38:815–+.
- Lu J, Sherman D, Devor M, Saper CB (2006) A putative flip-flop switch for control of REM sleep. *Nature* 441:589–594.
- Luppi P-H, Clement O, Sapin E, Peyron C, Gervasoni D, Leger L, Fort P (2012) Brainstem mechanisms of paradoxical (REM) sleep generation. *Pflugers Arch* 463:43–52.
- Mahoney CE, Agostinelli LJ, Brooks JNK, Lowell BB, Scammell TE (2017) GABAergic Neurons of the Central Amygdala Promote Cataplexy. *J Neurosci* 37:3995–4006.
- Mochizuki T, Crocker A, McCormack S, Yanagisawa M, Sakurai T, Scammell TE (2004) Behavioral state instability in orexin knock-out mice. *J Neurosci* 24:6291–6300.
- Oishi Y, Williams RH, Agostinelli L, Arrigoni E, Fuller PM, Mochizuki T, Saper CB, Scammell TE (2013) Role of the Medial Prefrontal Cortex in Cataplexy. *J Neurosci* 33:9743–9751.
- Overeem S, van Nues SJ, van der Zande WL, Donjacour CE, van Mierlo P, Lammers GJ (2011) The clinical features of cataplexy: A questionnaire study in narcolepsy patients with and without hypocretin-1 deficiency. *Sleep Med* 12:12–18.
- Peyron C et al. (2000) A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nat Med* 6:991–997.
- Roman A, Meftah S, Arthaud S, Luppi P-H, Peyron C (2017) The inappropriate occurrence of REM sleep in narcolepsy is not due to a defect in homeostatic regulation of REM sleep. A new function for the hypocretin/orexin neuropeptide? *SLEEP* (en cours de publication)
- Sakai K (2015) Paradoxical (rapid Eye Movement) Sleep-on Neurons in the Laterodorsal Pontine Tegmentum in Mice. *Neuroscience* 310:455–471.
- Sakai K, Koyama Y (1996) Are there cholinergic and non-cholinergic paradoxical sleep-on neurones in the pons? *Neuroreport* 7:2449–2453.
- Sakurai T (2007) The neural circuit of orexin (hypocretin): maintaining sleep and wakefulness. *Nat Rev Neurosci* 8:171–181.
- Sapin E, Lapray D, Berod A, Goutagny R, Leger L, Ravassard P, Clement O, Hanriot L, Fort P, Luppi P-H (2009) Localization of the Brainstem GABAergic Neurons Controlling Paradoxical (REM) Sleep. *PLoS One* 4:e4272.
- Sastre J, Jouvet M (1979) Oneiric Behavior of the Cat. *Physiol Behav* 22:979–989.
- Scammell TE (2015) Narcolepsy. *N Engl J Med* 373:2654–2662.
- Scammell TE, Willie JT, Guilleminault C, Siegel JM (2009) A Consensus Definition of Cataplexy in Mouse Models of Narcolepsy. *Sleep* 32:111–116.

- Silva JM et al. (2005) Second-generation shRNA libraries covering the mouse and human genomes. *Nature Genet* 37:1281–1288.
- Snow MB, Fraigne JJ, Thibault-Messier G, Chuen VL, Thomasian A, Horner RL, Peever J (2017) GABA Cells in the Central Nucleus of the Amygdala Promote Cataplexy. *J Neurosci* 37:4007–4022.
- Thannickal TC, Moore RY, Nienhuis R, Ramanathan L, Gulyani S, Aldrich M, Cornford M, Siegel JM (2000) Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. *Neuron* 27:469–474.
- Valencia-Garcia S, Libourel P-A, Lazarus M, Grassi D, Luppi P-H, Fort P (2017) Genetic inactivation of glutamate neurons in the rat sublaterodorsal tegmental nucleus recapitulates REM sleep behaviour disorder. *Brain* 140:414–428.
- Verret L, Léger L, Fort P, Luppi P-H (2005) Cholinergic and noncholinergic brainstem neurons expressing Fos after paradoxical (REM) sleep deprivation and recovery. *Eur J Neurosci* 21:2488–2504.
- Vetrugno R, D’Angelo R, Moghadam KK, Vandi S, Franceschini C, Mignot E, Montagna P, Plazzi G (2010) Behavioural and neurophysiological correlates of human cataplexy: a video-polygraphic study. *Clin Neurophysiol* 121:153–162.
- Zhang S, Zeitzer JM, Sakurai T, Nishino S, Mignot E (2007) Sleep/wake fragmentation disrupts metabolism in a mouse model of narcolepsy. *J Physiol-London* 581:649–663.

BASELINE RECORDINGS



CATAPLEXY INDUCTION

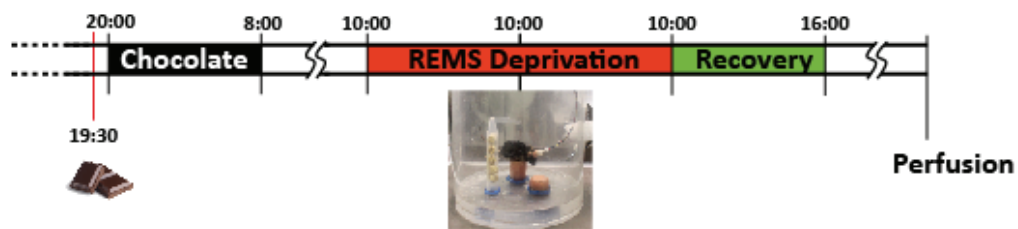


Figure 1. Schematic illustrating experimental protocol. Colored bars represent recording periods. Cataplexy induction protocols were conducted at the end of B8: first chocolate induction and then REM sleep deprivation and recovery protocol. B1, B4, B8 = baseline at 1, 4 and 8 weeks after AAV-shRNA injection.

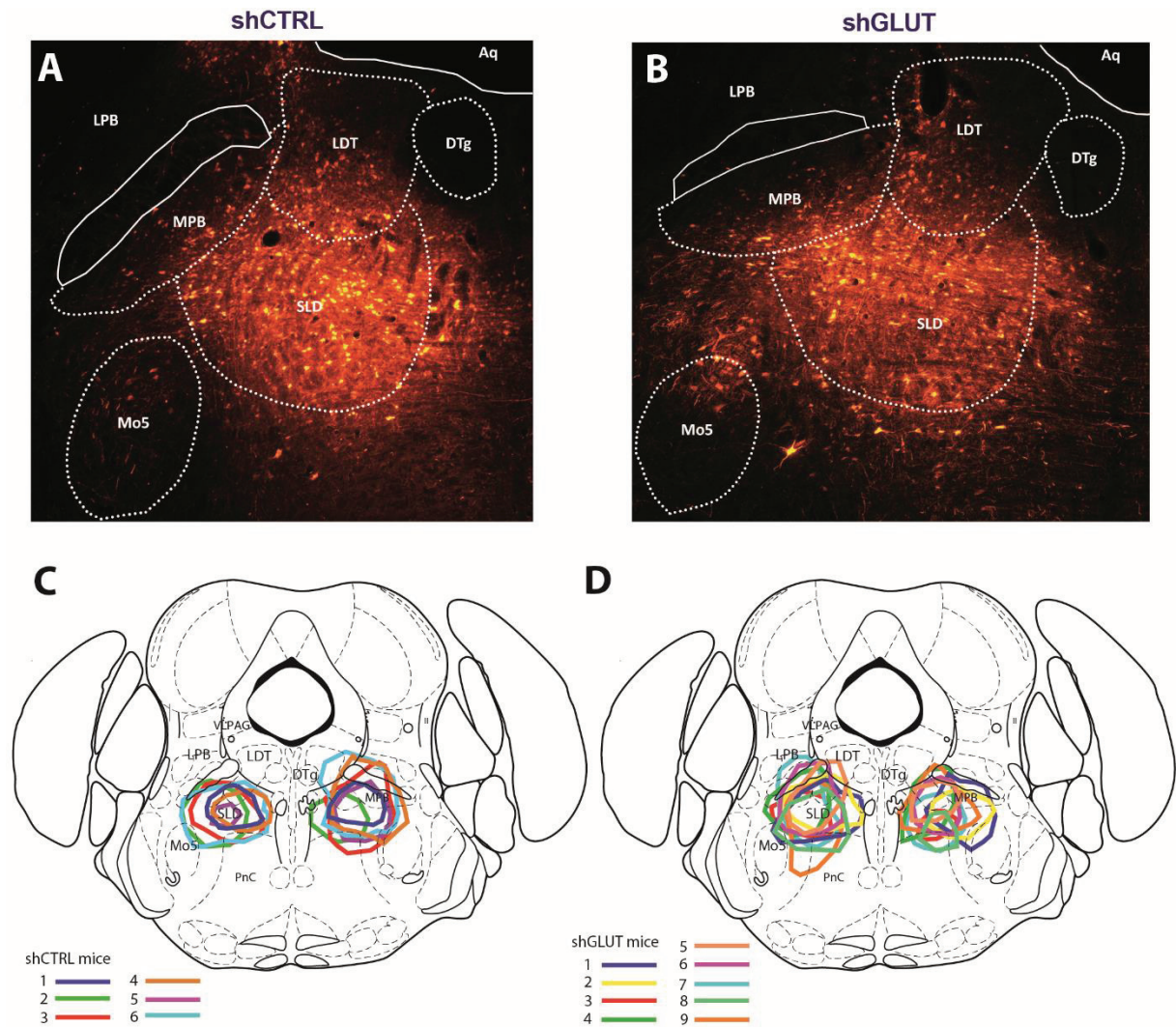


Figure 2. Illustration of the precise localization of AAV transfection sites. A-B- Low power photomicrographs of mCherry fluorescent signal in a representative shCTRL mouse (A ; shCTRL 3) and shGLUT mouse (B; shGlut 1). C-D- Schematic illustration of the AAV-transfected sites localization in coronal section of shCTRL (n=5) (C) and shGLUT mice (n=9) (D) based on the mCherry reporter fluorescent protein expression. All sites included the SLD nucleus. VLPAG = ventrolateral periaqueductal gray; LDT = laterodorsal tegmental nucleus; DTg = dorsal tegmental nucleus; MPB = medial parabrachial nucleus; LPB = lateral parabrachial nucleus; SLD = sublaterodorsal tegmentum nucleus; Mo5 = motor trigeminal nucleus; PnC= pontine reticular nucleus, caudal part.

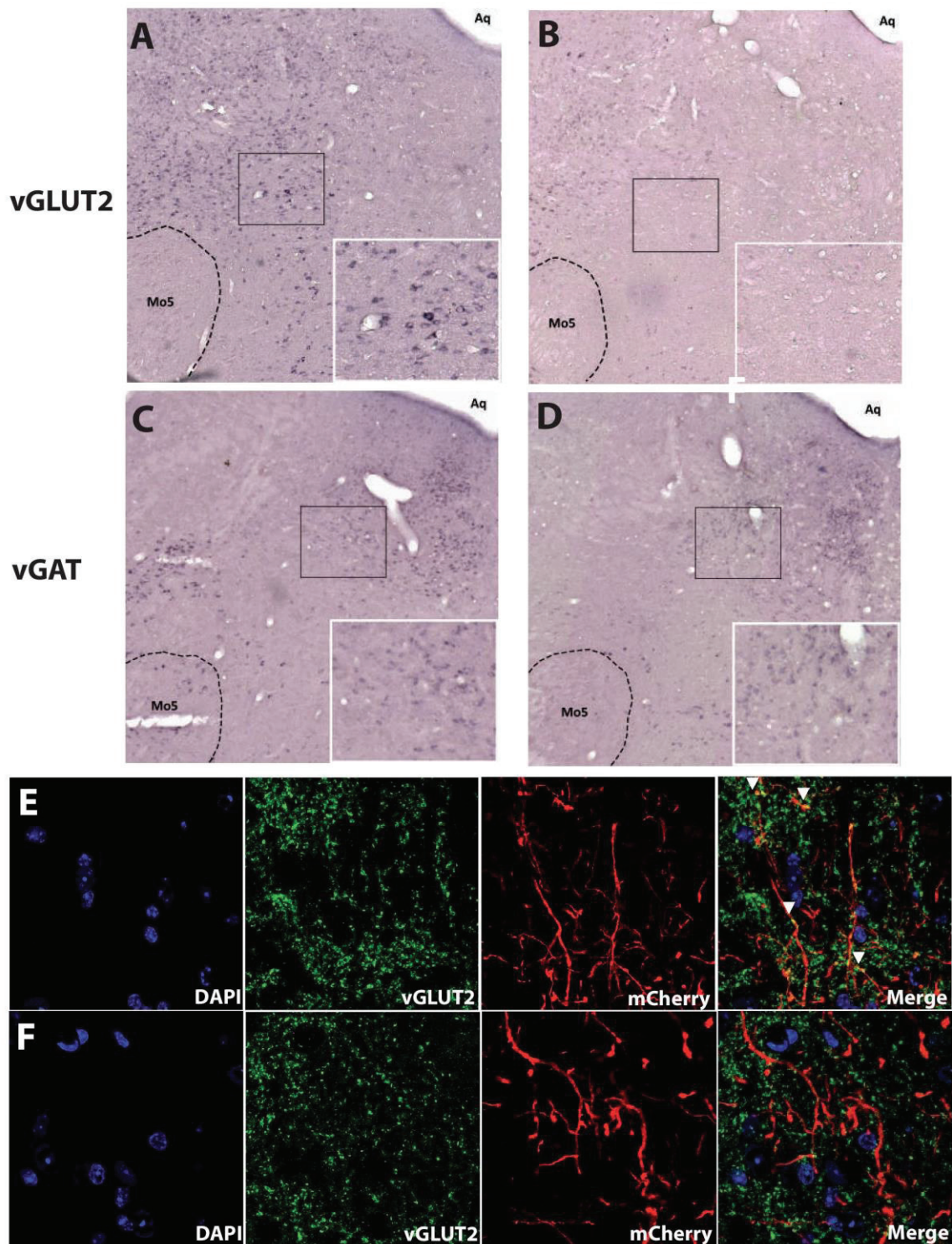


Figure 3. Evaluation of the efficacy and specificity of the glutamatergic neurotransmission impairment. A-B Low and higher (enlargement) power photomicrographs illustrating coronal sections treated with vGluT2 *in situ* hybridization of a representative AAV-shCTRL (A) and AAV-shGLUT (B) mice. Only mice injected with AAV-CTRL still contained vGluT2+ stained neurons in the SLD area whereas surrounding regions were not affected in both type of mice. C-D Photomicrographs of vGAT *in situ* hybridization in adjacent sections of the same AAV-shCTRL (B) and AAV-shGLUT (C) mice. Note that SLD nucleus and surrounding regions still contain vGAT stained neurons. E-F Confocal photomicrographs taken in the ventromedial medulla (VMM). The expression of native vGluT2 protein (green immunofluorescence) and SLD-transduced neurons

(mcherry fluorescence) were observed in synaptic terminals of VMM neurons in shCTRL and shGLUT mice. Note that vGluT2 protein and mcherry were co-expressed (yellow fluorescence; arrowhead) in synaptic terminals of shCTRL, but not in shGLUT mice. Aq= Aqueduct of sylvius; Mo5 = motor trigeminal nucleus.

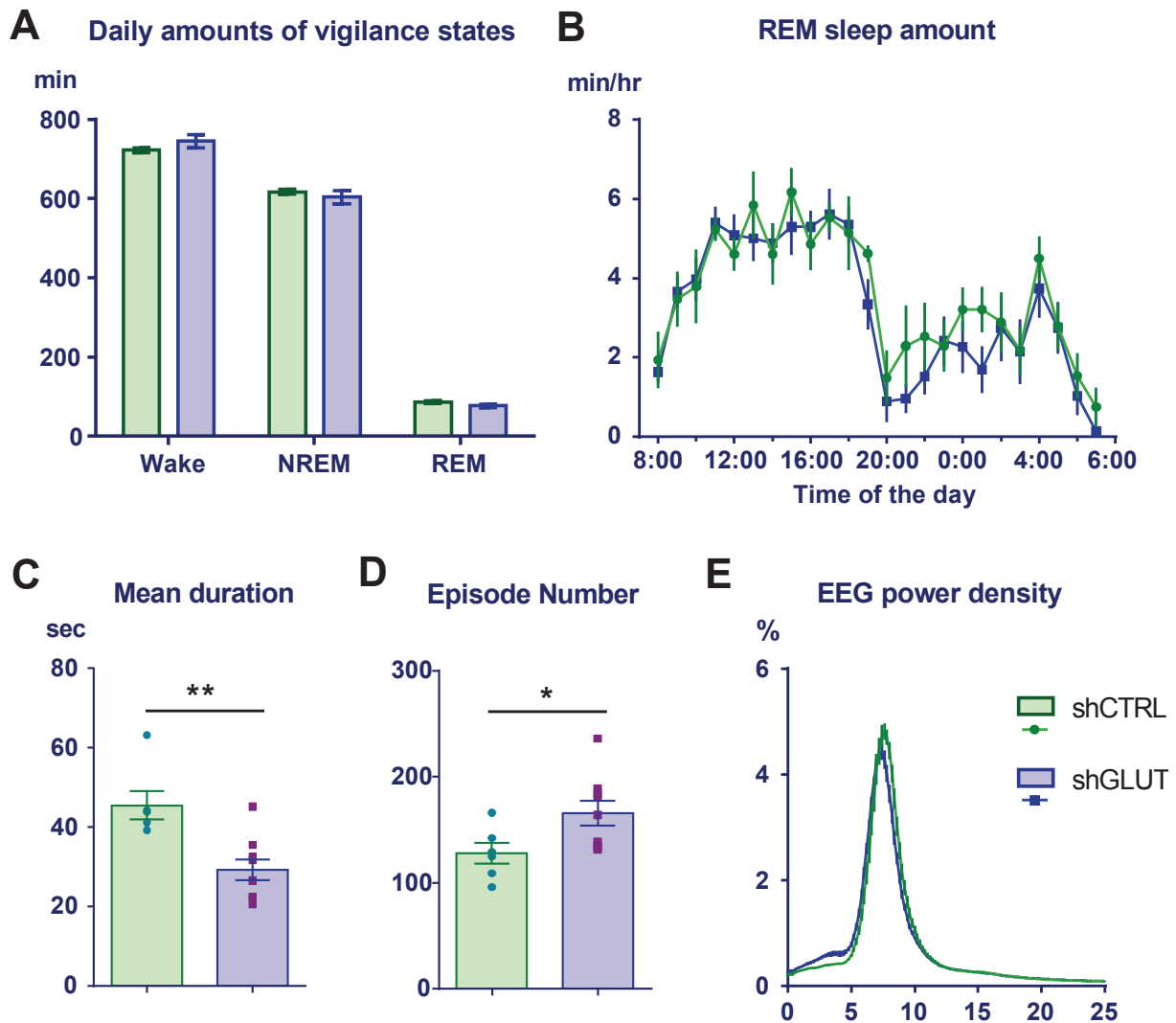


Figure 4. Graphs and histograms illustrating analyses of vigilance states at 8 weeks post injection (B8) in shCTRL (green) and shGLUT (blue) mice. **A-** Histogram illustrating the daily amount (min) of wake, NREM sleep and REM sleep. Note that no difference is seen between groups for each of the vigilance state. **B-** Circadian variation of REM sleep (min/hr) showed a similar profile in both type of mice. However, mean duration of REM sleep bouts (**C**) and number of REM sleep bouts (**D**) differed between shGLUT and shCTRL mice. **E-** REM sleep power spectrum density (% of total power spectrum) from parietal EEG is similar between groups of mice. Graph and Bar charts illustrate mean \pm sem and dots plots represent individual values for each animal. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ Mann & Whitney test.

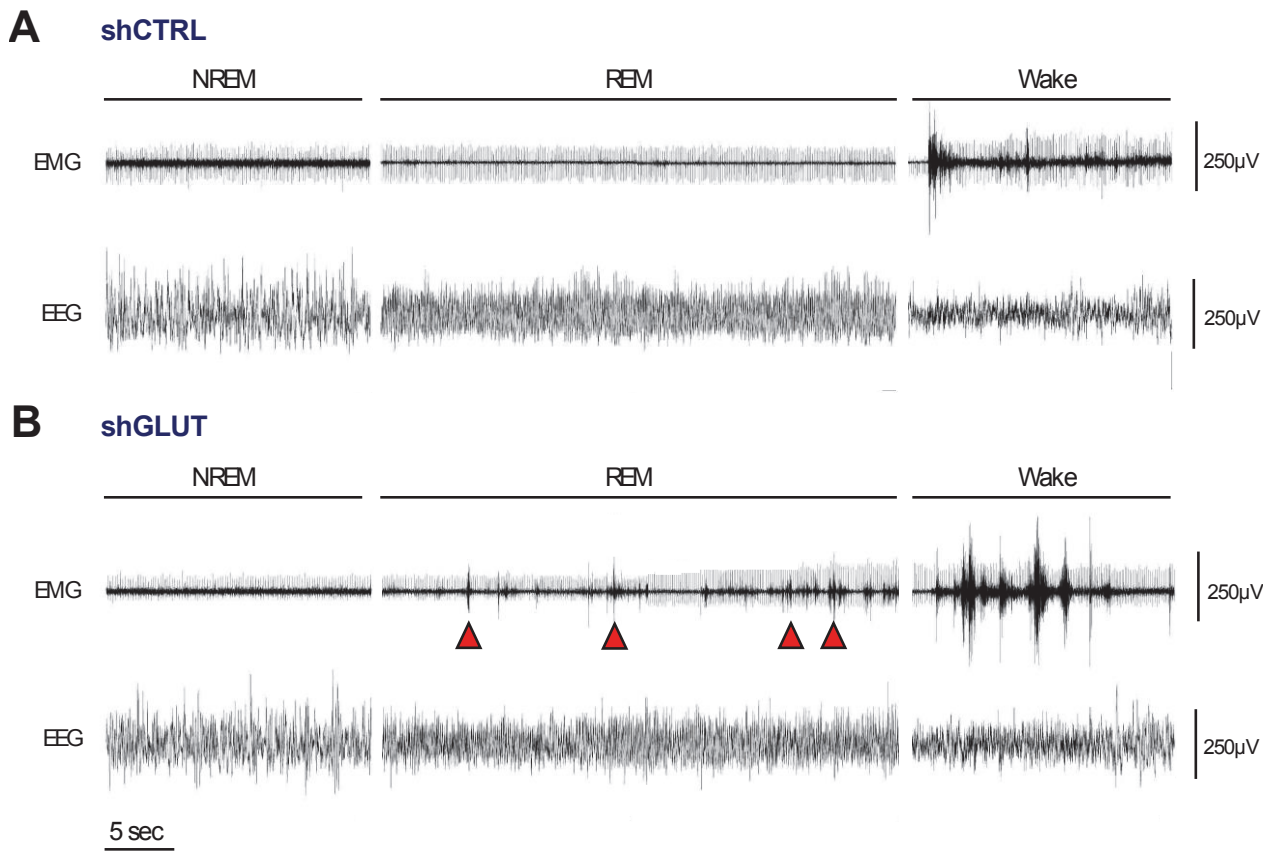


Figure 5. Typical polysomnographic recording of adjacent NREM, REM sleep and wake episodes during baseline 8 weeks after injection in representative shCTRL (**A**) and shGLUT (**B**) mice. Red arrows indicate EMG phasic events.

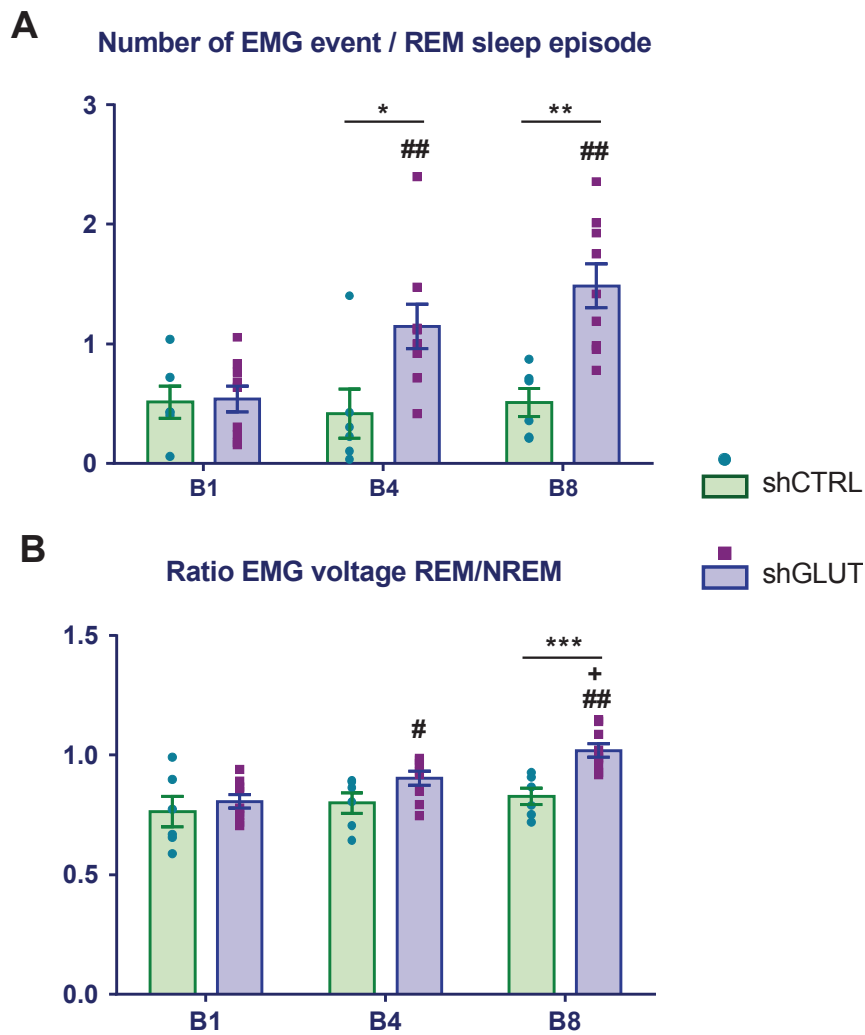


Figure 6. Progressive loss of REM sleep atonia due to genetic inactivation of glutamate SLD neurons **A-** Bar charts representing the number of EMG events / REM sleep episode evaluated during B1, B2 and B3 in AAV-shCTRL (n=5) and AAV-shGLUT (n=9) mice. This number increase throughout time in experimental group and is significantly higher than control group from B2. **B-** Bar charts illustrating the Ratio EMG voltage REM/NREM during B1, B2 and B3 in the same mice. Note that at B3, this ratio is clearly higher in experimental than in control mice. Bar charts illustrate mean \pm sem and dots plots represent individual values of each animal * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ Mann & Whitney test comparison between groups; # $p < 0.05$ ## $p < 0.01$ Mann & Whitney compared with B1; + $p < 0.01$ compared with B2

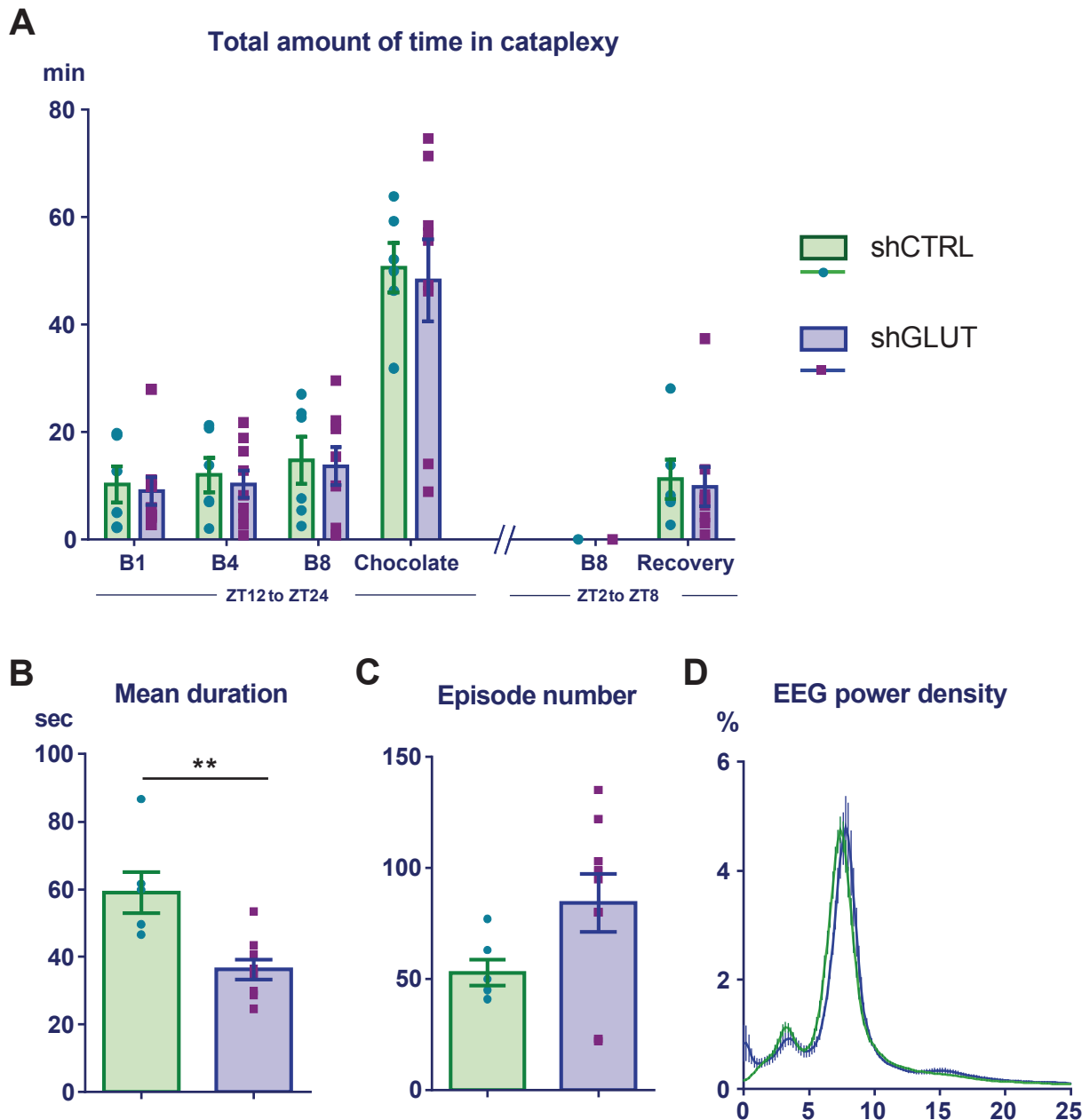


Figure 7. The total amount spent in cataplexy is unaffected by genetic inactivation of glutamate SLD neurons **A-** Bar charts representing the total amount of time spent in cataplexy (min) during the 12 hrs of dark phase (ZT12 to ZT24; 8:00 to 20:00) at B1, B4, B8, and after chocolate induction, and during the first 6 hrs of recovery from REM sleep deprivation and its corresponding baseline (B8 from ZT2 to ZT8; 10:00 to 16:00) in shCTRL (n=5) and shGLUT (n=9) mice. Note that the amount of cataplexy is the same in both groups for all conditions. However, when triggering cataplexy with chocolate the mean duration of cataplexy bouts (sec) (**B**) was significantly shorter and tended to be more frequent (**C**) although not significantly, in shGLUT mice. **D-** Power spectrum density (% of total power spectrum) of parietal EEG during cataplexy in chocolate condition revealed no difference. Bar charts illustrate mean \pm sem and dots plots represent individual values for each animal ** $p < 0.01$ Mann & Whitney test.

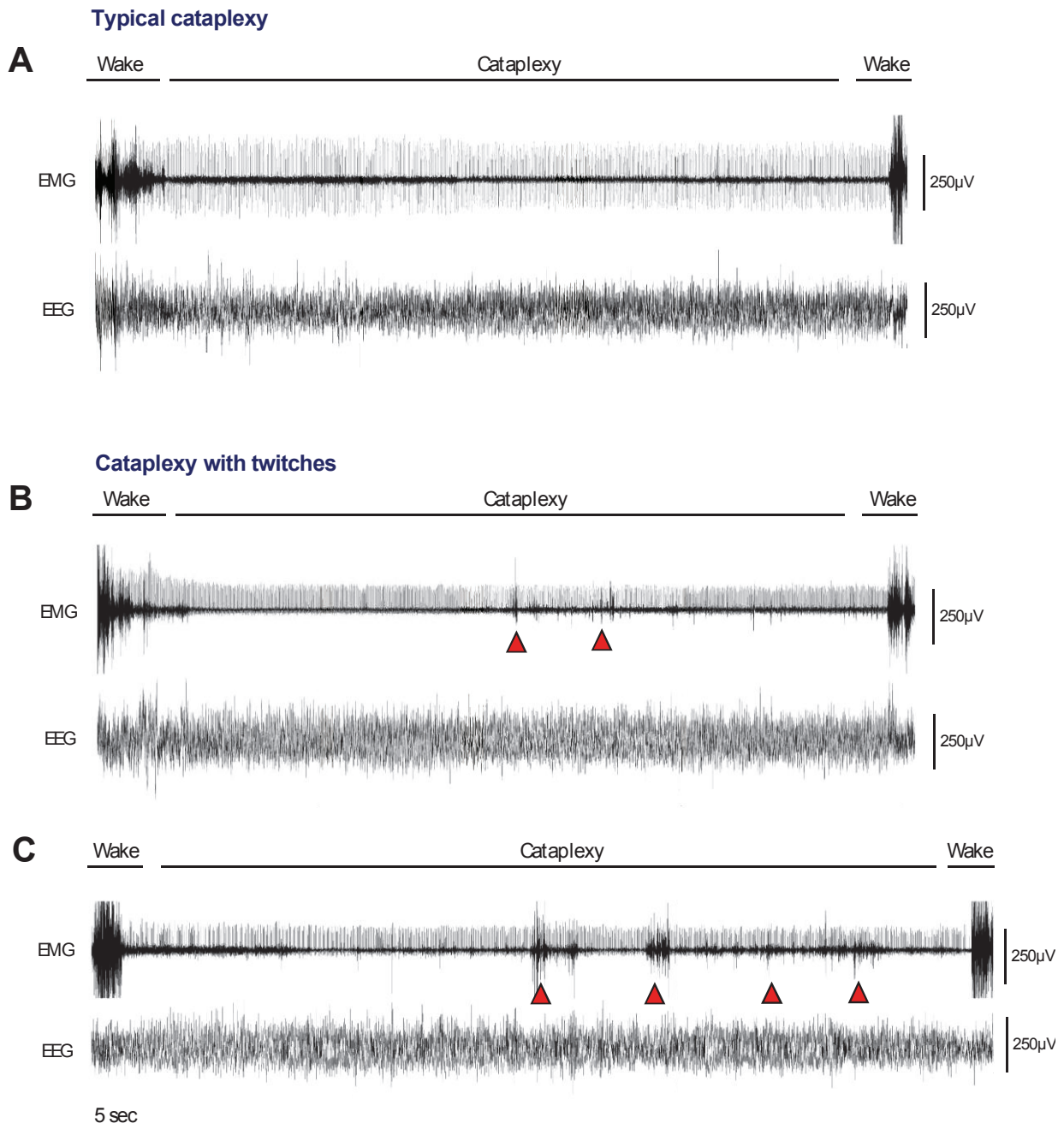


Figure 8. A- Illustration representing EEG/EMG traces of a typical cataplexy attack B- Polysomnography recording of a cataplexy with small EMG twitches (red arrows) observed in shGLUT and shCTRL mice in every conditions. C- Polysomnography recording of a cataplexy with strong phasic events (red arrows) on the EMG. Such episodes were only observed during rebound conditions in the experimental group.

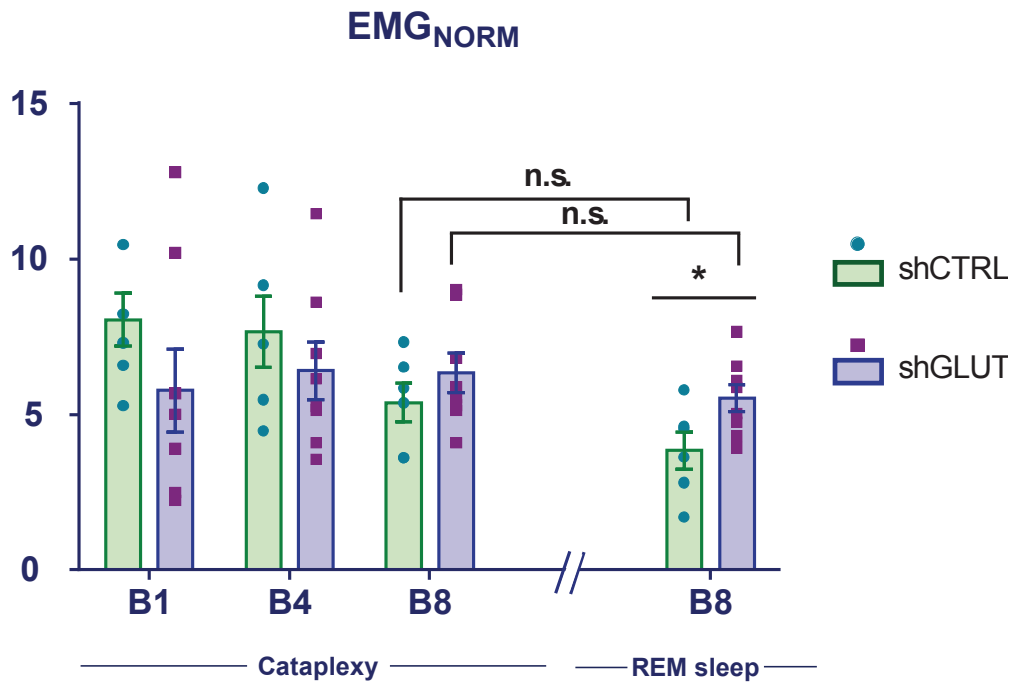


Figure 9. Bar charts representing EMG_{NORM} of cataplexy and REM sleep during baseline periods in shGLUT (n=9) and CTRL (n=5). EMG_{NORM} is the mean EMG voltage value of a state relative to the maximal value. Note that genetic inactivation of SLD neurons didn't induce any difference of cataplexy EMG_{NORM} between groups whereas in B8, the increased REM sleep EMG_{NORM} was apparent in shGLUT mice. Bar charts illustrate mean ± sem and dots plots represent individual values of each animal * p<0.05 Mann & Whitney test.

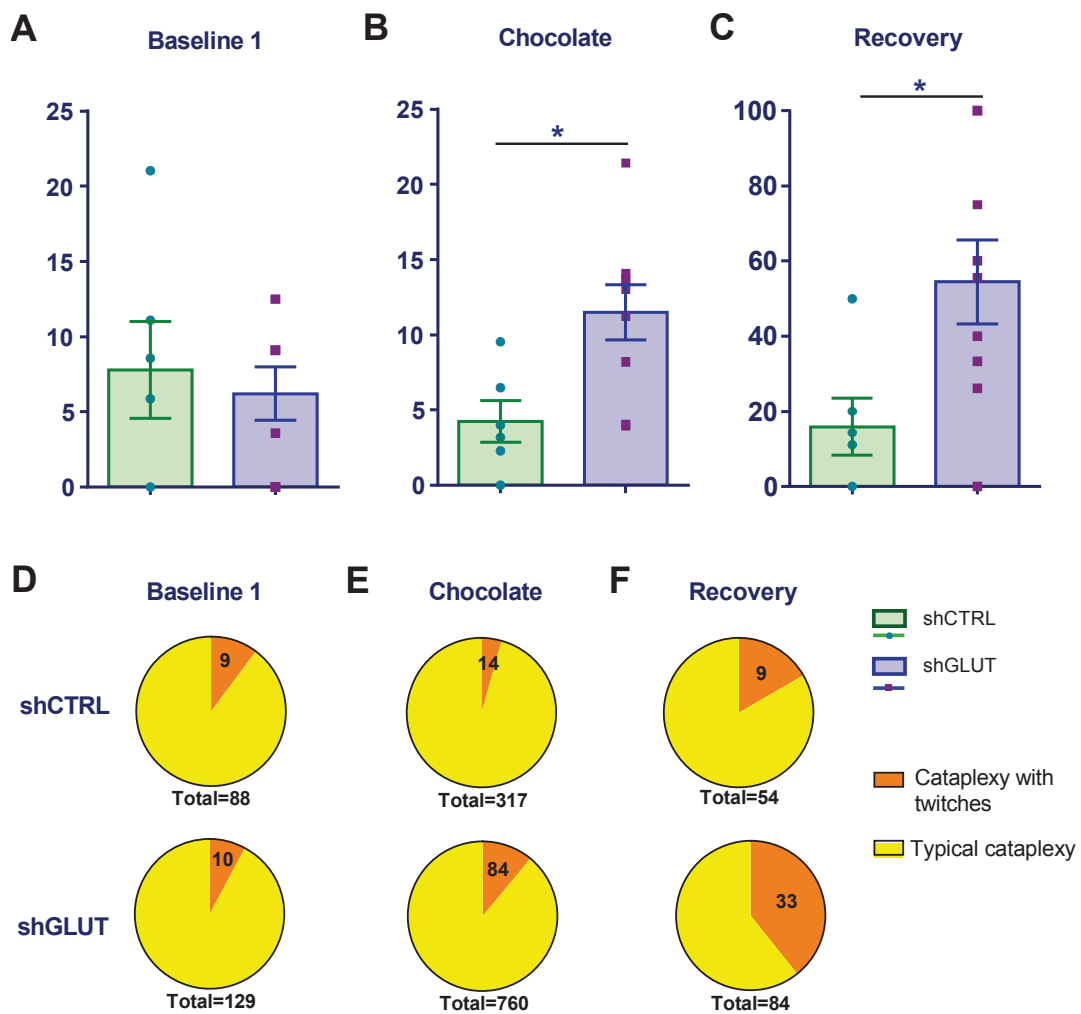


Figure 10. Cataplexy with twitches is increased in shGLUT mice. Bar charts illustrating the mean proportion of cataplexy with twitches in shGLUT (n=9) and shCTRL (n=5) mice during Baseline 1 (A) Chocolate (B) and recovery (C) conditions. Note that the experimental group had a higher proportion of cataplexy with twitches in chocolate and rebound condition. Pie chart representing the number of cataplexy with twitches among the total number of cataplexy for all mice of each condition: Baseline 1 (A) Chocolate (B) and Recovery conditions (C). Bar charts illustrate mean ± sem and dots plots represent individual values of each animal * p<0.05 Mann & Whitney test.

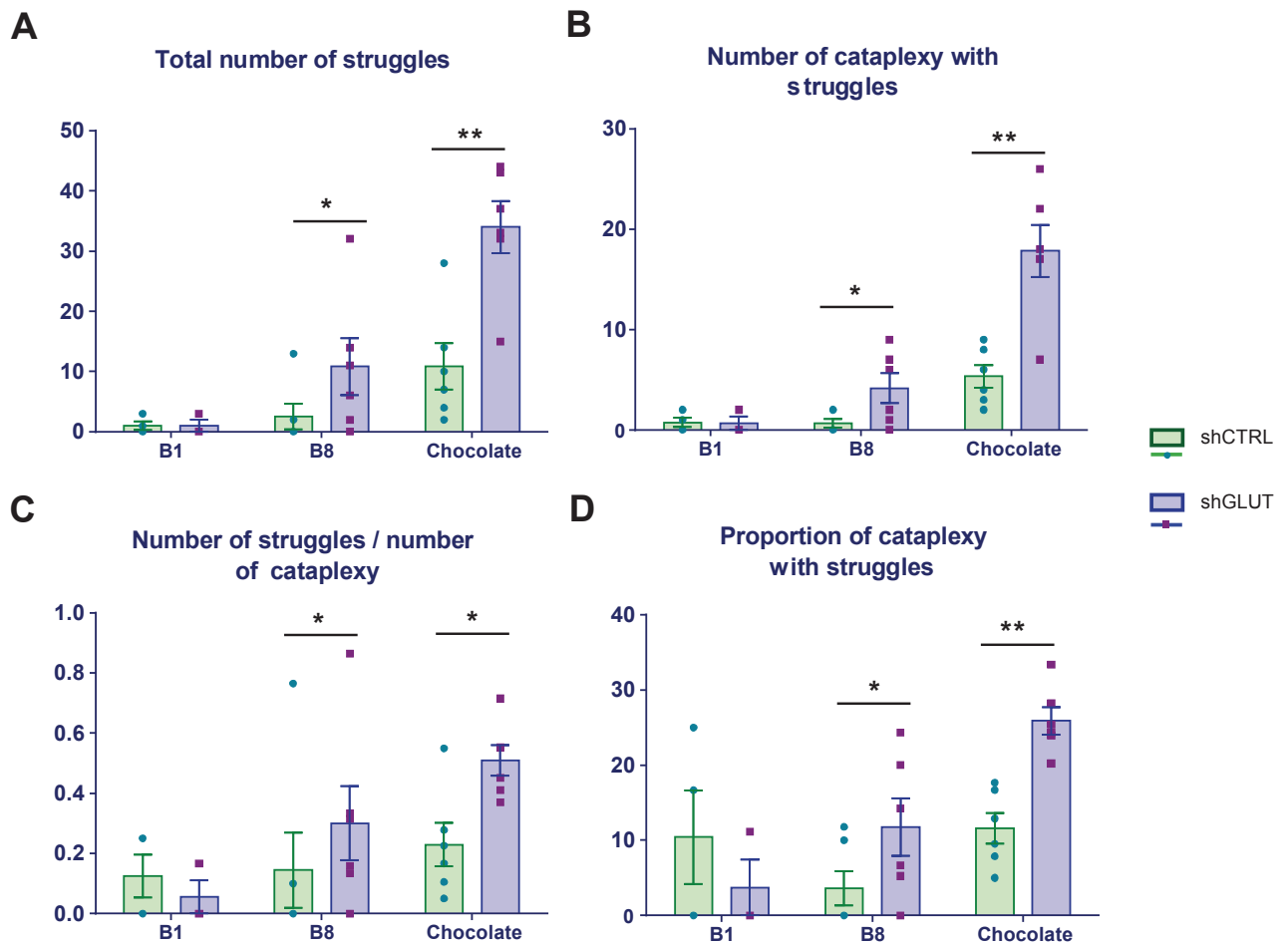


Figure 11. Cataplexy with struggles are increased after genetic inactivation of glutamate SLD neurons. Based on the actimetry video recording, phenomenon of struggling during cataplexy was objectively assessed in both groups during B1 (n=4 per groups), B8 and chocolate condition (n=6 per groups). Then, bar charts are illustrating the total number of struggles observed in cataplexy (A) the number of cataplexy during which mice are struggling (B) the number of struggles per episode of cataplexy (C) and the proportion of cataplexy with struggles in % (D). Every parameter showed no difference between groups in B1. However all those struggles parameters are increased in B3 and chocolate conditions. Bar charts illustrate mean \pm sem and dots plots represent individual values of each animal. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ Mann & Whitney test.

Table 1 Sleep Data during Baseline Periods

| | AWAKE | | NREM | | REM | | Cataplexy | |
|---------------------|----------------|--------------|--------------|--------------|----------------|----------------|--------------|--------------|
| | shCTRL | shRNA | shCTRL | shRNA | shCTRL | shRNA | shCTRL | shRNA |
| Baseline 1 | | | | | | | | |
| Total time (min) | 745,1 ± 15,8 | 736,4 ± 18,6 | 587,8 ± 11,9 | 607,8 ± 16,9 | 96,8 ± 3,3 | 86,6 ± 3,4 | 10,2 ± 3,3 | 9 ± 2,6 |
| Number of bouts | 583,2 ± 10,2 | 539,2 ± 15,2 | 563,5 ± 13,5 | 523,4 ± 15,5 | 150 ± 8,9 | 131,1 ± 9 | 15,3 ± 4,7 | 11,9 ± 2,7 |
| Mean Duration (sec) | 76,7 ± 1,6 | 82,8 ± 4,3 | 62,9 ± 2,6 | 69,9 ± 1,9 | 39,1 ± 1,9 | 40,7 ± 2,4 | 38,7 ± 6,0 | 48,8 ± 7,4 |
| Baseline 4 | | | | | | | | |
| Total time (min) | 747,6 ± 11,3 | 711,3 ± 15,4 | 598,5 ± 10,7 | 632,9 ± 15,6 | 81,7 ± 2,4 | 85,3 ± 5,3 | 12,0 ± 3,2 | 10,2 ± 2,5 |
| Number of bouts | 538,3 ± 16,4 † | 569,9 ± 20,9 | 522 ± 19,5 † | 550,4 ± 21,5 | 119,3 ± 5,0 † | 151,3 ± 13,1 † | 14,8 ± 3,8 | 16,9 ± 3,8 |
| Mean Duration (sec) | 83,6 ± 2,0 | 75,9 ± 3,8 | 69,4 ± 3,5 † | 69,6 ± 2,4 | 41,2 ± 0,9 | 34,6 ± 1,6 † | 47,0 ± 5,5 | 34,4 ± 2,2 |
| Baseline 8 | | | | | | | | |
| Total time (min) | 722,6 ± 5,7 | 744,9 ± 16,4 | 616,8 ± 6,2 | 603,8 ± 16,6 | 85,5 ± 3,6 | 76,8 ± 4,9 † # | 14,8 ± 4,4 † | 13,6 ± 3,5 |
| Number of bouts | 538 ± 20,6 | 573,0 ± 25,2 | 521,3 ± 21,3 | 542,3 ± 27,0 | 127,8 ± 10,1 † | 165,9 ± 11,7 † | 16,5 ± 5,0 | 26,8 ± 7,1 |
| Mean Duration (sec) | 81,1 ± 2,8 | 79,4 ± 4,2 | 71,6 ± 2,9 † | 67,7 ± 2,9 | 41,0 ± 2,8 | 28,4 ± 2,1 † # | 64,0 ± 10,9 | 36,2 ± 4,7 * |

* shCTRL vs shRNA

† vs B1

vs B2

DISCUSSION GENERALE

Principaux résultats obtenus

L'objectif de cette thèse a été de déterminer si la narcolepsie est une pathologie du sommeil paradoxal (SP) en plus d'être une pathologie de l'éveil. Pour cela nous avons abordé deux problématiques majeures : (1) la régulation homéostatique du SP est-elle altérée dans la narcolepsie ? (2) les cataplexies empruntent-elles le réseau neuronal de l'atonie musculaire spécifique du SP ? Les deux études menées ont apporté des éléments essentiels à la compréhension de cette pathologie. Nous avons pu proposer un rôle nouveau pour le neuropeptide Orex et identifier le rôle des neurones glutamatergiques du SLD dans les cataplexies. Les principaux résultats sont détaillés ci-dessous.

1/ La régulation homéostatique du SP n'est pas altérée chez la souris Orex-KO narcoleptique.

Les 48 heures de privation de SP par la méthode dite des 'plateformes au-dessus de l'eau' ont induit, dans la phase de récupération, une hypersomnie de SP équivalente chez les souris Orex-KO et contrôles. Cette hypersomnie - également appelée rebond de SP- reflète les processus homéostatiques mis en place pour compenser la dette de SP accumulée au cours de la privation.

2/ Le SP n'est pas réprimé pendant la phase active (obscurité) des souris Orex-KO. A l'aide d'une nouvelle méthode de privation automatique de SP développée au sein de notre équipe, nous avons quantifié objectivement chez les souris la propension à entrer en SP au cours des 48 heures de privation. Les résultats obtenus ont montré que les souris WT et Orex-KO ont la même propension à entrer en SP pendant la phase de repos indiquant que la pression de SP s'accumule de la même façon chez les WT et les Orex-KO. En revanche, la propension à entrer en SP est diminuée chez les souris contrôles pendant la phase active. Les Orex étant libérées pendant la phase active, nous avons attribué au neuropeptide Orex un rôle nouveau d'inhibition du SP en plus celui largement décrit de promotion de l'éveil.

3/ Un pic de cataplexie est induit après 48hrs de privation de SP par la méthode des plateformes au-dessus de l'eau. Les cataplexies apparaissent au cours de la phase de récupération, avant l'hypersomnie de SP, alors que les souris Orex-KO sont encore très actives. Ce résultat établit un potentiel lien entre pression de SP et cataplexies.

4/ Les neurones glutamatergiques du SLD sont responsables de l'atonie musculaire du SP. En accord avec les données de la littérature, l'inactivation de la transmission glutamatergique des neurones du SLD a engendré une perte d'atonie musculaire pendant le SP chez nos souris expérimentales. Le SP sans atonie est caractérisé par une augmentation du nombre d'évènements phasiques (twitches) et une hausse du tonus musculaire.

5/ Les neurones glutamatergiques du SLD ne sont pas suffisants à l'expression des cataplexies.

L'inactivation chronique de la transmission glutamatergique des neurones du SLD par la méthode d'ARN interférent (shRNA), n'a pas permis de supprimer ni de réduire la survenue des cataplexies en conditions basale ou d'induction, ce qui suggère que ces neurones ne sont pas nécessaires pour la mise en place des cataplexies.

6/ Les neurones glutamatergiques du SLD sont partiellement impliqués dans le contrôle moteur des cataplexies. Si l'inactivation de ces neurones n'a pas changé les cataplexies en quantité, elle a provoqué l'apparition de cataplexies instables avec des mouvements musculaires phasiques observables sur les tracés EMG et sur la vidéo. Ces données témoignent de la participation des neurones glutamatergiques du SLD dans le maintien de l'atonie musculaire pendant les cataplexies, même si celle-ci n'est pas suffisante à engendrer de tels épisodes.

Les derniers résultats sont inattendus et posent de nombreuses questions. Ils devront être confirmés par d'autres approches expérimentales, notamment par des enregistrements unitaires des neurones du SLD au cours des cataplexies et des états de vigilances.

Interprétation fonctionnelle des résultats

Notre modèle animal, la souris Orex-KO, présente une fragmentation des états de vigilance et des épisodes de cataplexies comme chez le patient narcoleptique (Scammell et al., 2009). Contrairement à la pathologie humaine, il n'y a pas de perte des neurones à Orex chez ces souris mais un arrêt de la synthèse du neuropeptide Orex. Certains modèles murins (Orexin-Ataxin3 ; orexin-DTA) se rapprochent plus de la pathologie humaine puisque la mort spécifique de ce groupe neurone est induite (Hara et al., 2001 ; Tabuchi et al., 2014). Cependant, la souris Orex-KO présente l'avantage de pouvoir évaluer le rôle spécifique du neuropeptide Orex sur le phénotype étudié.

Le neuropeptide orexine et l'inhibition du SP

Dans notre première étude, nous avons établi un lien fort entre la régulation du SP et le neuropeptide Orex. Afin d'identifier la nature de cette régulation, il est important de rappeler les mécanismes impliqués dans la genèse et le maintien de cet état. Le SP est sous le contrôle d'une composante circadienne, permettant les variations des quantités de SP au cours d'une journée. Les rythmes circadiens sont générés par le SCN qui synchronise son activité sur la lumière émise dans l'environnement, et sa lésion entraîne une perte des rythmes biologiques. Le SP est sous contrôle de processus homéostatiques qui garantissent au SP d'être compensé en cas de privation de sommeil. Ils se manifestent de deux façons : une hypersomnie (ou rebond) de SP à la suite d'une privation ; une récurrence des tentatives d'entrée en SP lors d'une privation spécifique (Shea et al., 2008). Dans notre protocole, nous n'avons pas étudié les processus de régulation circadienne : le SCN est intact et la lumière est cyclé sur un rythme classique 12h/12h. Nous avons centré notre étude sur la régulation homéostatique du SP.

Nous avons montré une hypersomnie de SP faisant suite à 48hrs de privation spécifique (méthode de plateformes au-dessus de l'eau) chez la souris Orex-KO comme chez les souris WT, suggérant une homéostasie intacte chez ces animaux. Le décours temporel des tentatives d'entrées en SP pendant les 48hrs de privation automatique a également rendu compte des processus homéostatiques. Le nombre de tentatives est croissant au sein d'une même période, reflétant l'accumulation de la pression de SP chez les souris Orex-KO et WT. De plus, de la 1^{ère} période lumineuse à la suivante, le nombre de tentative augmente de façon quasiment linéaire chez les deux groupes de souris. Une étude menée chez 6 patients narcoleptiques et un groupe contrôle a montré des résultats assez comparables (Vu et al., 2010). Dans cette étude, la privation spécifique de SP durant 2 nuits consécutives a révélé (1) une augmentation croissante des tentatives de SP au cours d'une nuit de privation (2) une hausse de 50% du nombre de tentatives de la nuit 1 à la nuit 2 de privation, chez les patients narcoleptiques comme chez les contrôles (Vu et al., 2010). Ainsi, les processus homéostatiques engagés sont intacts chez la souris comme chez l'homme narcoleptique.

Nos données confirment que le neuropeptide Orex n'est pas impliqué dans la régulation homéostatique du SP.

La privation sélective de SP a toutefois montré une différence entre groupes contrôle et narcoleptique. Chez l'homme, le nombre d'intervention du personnel médical pour priver spécifiquement de SP est au moins deux fois plus grand chez le groupe narcoleptique que contrôle (Vu et al., 2010). De façon similaire, la propension à entrer en SP est facilitée chez la souris narcoleptique Orex-KO pendant la phase d'obscurité, quand les orexines sont normalement libérées (chez les souris sauvages), nous amenant à considérer les Orex responsables de la répression du SP pendant la phase active.

Ainsi, le défaut d'inhibition durant la phase active chez la souris Orex-KO pourrait être le reflet d'une altération du contrôle circadien du SP, due à l'absence d'Orex. En effet, comme mentionné dans l'introduction, les neurones Orex reçoivent des projections en provenance du SCN, l'horloge biologique interne. Ils sont donc idéalement placés pour relayer l'information circadienne (Aston-Jones et al., 2001 ; Chou et al., 2003).

Les neurones Orex sont impliqués dans la promotion de l'éveil, notamment en stimulant par des projections directes les structures de l'éveil que sont les neurones noradrénergiques du LC ; histaminergiques du TMN ; et sérotoninergiques du DR (Horvath et al., 1999; Brown et al., 2002, 2008; Mochizuki et al., 2011). Ces populations neuronales monoaminergiques sont actives durant l'éveil et capable de jouer un rôle dans la suppression du SP. Ainsi, la question se pose : l'inhibition du SP se fait-elle de façon indirecte en promouvant l'éveil via les noyaux monoaminergiques ? L'hypothèse d'une inhibition indirecte sous-entend que les Orex engendreraient une augmentation des quantités d'éveil pour pouvoir supprimer le SP. Or nos résultats n'ont pas montré de différences significatives dans les quantités d'éveil entre les souris WT et Orex-KO durant la phase où le SP est inhibé (phase obscure). Ils semblent donc suggérer un rôle d'inhibition directe des Orex sur le SP. Les neurones Orex pourraient ainsi inhiber le SP en stimulant les neurones GABAergiques de la vPAG/dDpMe inhibiteurs du SP. En effet, la lésion spécifique des neurones de la vPAG/dDpMe possédant les récepteurs OXR1 et 2 - via l'injection du neurotoxique orexine-B saporine - induit une augmentation des quantités de SP pendant la phase active des souris (Kaur et al., 2001). La voie de projection des neurones Orex sur la vPAG/dDpMe (Peyron et al., 1998) pourrait ainsi jouer un rôle dans la suppression directe du SP. Toutefois, cette projection neuronale reste à étudier fonctionnellement.

Nos données suggèrent que les neurones Orex inhiberaient spécifiquement le SP pendant la phase active. Ceci concorde avec les données de la littérature puisque ces neurones sont surtout actifs pendant la phase active (obscurité) des rongeurs. Plus précisément ils montrent une activité de type Eveil-on (Yoshida et al., 2001; Lee et al., 2005; Mileykovskiy et al., 2005). Ainsi les Orex

pourraient maintenir une inhibition du SP au cours de l'éveil de façon directe ou bien indirecte par promotion de l'éveil. Cependant, il est possible que le neuropeptide Orex agisse avec une certaine inertie et ait un effet inhibiteur de longue durée, et ce même après la fin d'un épisode d'éveil. En effet, l'injection d'Orex-A (25pmol) dans le LC chez le rat montre un effet éveillant très important pendant les 2hrs post -injection, alors qu'elle supprime le SP pendant les 4hrs post-injections (Bourgin et al., 2000). Une récente étude sur tranches d'hypothalamus a montré que la stimulation des terminaisons à orexine au voisinage des neurones à histamine induit une activation de ces derniers de longue durée (plus de 60sec post-stimulation) (Schoene et al., 2014). Les orexines sont des neuropeptides et non pas des neurotransmetteurs classiques. Ainsi ils pourraient être libéré en grande quantité pendant l'éveil et inhiber de façon prolongée le SP en agissant à la fois sur le renforcement des neurones monoaminergiques de l'éveil et l'excitation des neurones de la vIPAG inhibiteurs du SP.

Pression de SP et cataplexies

La privation de SP par la méthode des 'plateformes au-dessus de l'eau' a induit un pic de cataplexies dès le début de la phase de récupération. Lors de cette phase, les souris Orex-KO ont une pression de SP augmentée, mais sont également très actives pendant la première heure. Cette étude ne nous a pas permis de déterminer si le déclenchement des cataplexies suite à la privation de SP était dû à l'augmentation de l'activité locomotrice (et des comportements favorisant les cataplexies comme le toilettage), à la pression de SP ou les deux. Toutefois, un lien entre pression de SP et cataplexie renforcerait grandement l'hypothèse selon laquelle ce symptôme serait un état dissocié du SP. Il a été rapporté par de nombreux patients narcoleptiques que la fatigue et le manque de sommeil favorise l'apparition des cataplexies. Cependant, l'équipe de T. Scammell a rapporté que 8hrs de privation totale de sommeil pendant la phase lumineuse (ZT0-ZT7) n'avait pas d'effet sur les cataplexies chez la souris Orex-KO (Mochizuki et al., 2004). En revanche, une nuit de privation spécifique de SP a provoqué une augmentation du nombre de cataplexie chez 2 patients narcoleptiques sur les 6 étudiés, dont une très importante (de 0 en condition basale à 10 après la nuit de privation) (Vu et al., 2011). Après une deuxième nuit de privation, le nombre de cataplexies n'est pas plus important qu'en condition basale, toutefois cela pourrait être attribué au protocole, puisque des TILE ont été effectués dans la journée qui a suivi la deuxième nuit de privation (Vu et al., 2011).

Suite à cette 1^{ière} étude, nous apportons des éléments nouveaux suggérant que la narcolepsie est une pathologie du SP et non pas seulement une pathologie de l'éveil, et que la cataplexie pourrait être augmentée par la pression de SP. Ces données vont dans le sens de l'hypothèse initiale selon laquelle la cataplexie serait un état dissocié du SP. Toutefois, il faut garder en mémoire que c'est

peut-être l'excitation motrice qui fait suite à la privation qui pourrait être responsable des cataplexies observées dans ce protocole expérimental.

Cataplexie et neurones glutamatergiques du SLD : réseau neuronal

L'hypothèse dominante définit la cataplexie comme un état dissocié du SP et suggère que la cataplexie emprunte le réseau de l'atonie musculaire du SP. Comme mentionné dans l'introduction, l'atonie musculaire du SP est générée par l'activation des neurones glutamatergiques du SLD. Conformément à la littérature ([Krenzer et al., 2011](#) ; [Valencia-Garcia et al., 2017](#)), le blocage de la voie glutamatergique dans le SLD a induit un SP sans atonie musculaire chez les souris Orex-KO (ie mise en évidence par une hausse des composantes phasique et tonique au cours du SP).

En revanche, l'inactivation des neurones glutamatergiques du SLD a montré des effets inattendus sur les cataplexies. Tout d'abord, nos résultats montrent que les neurones glutamatergiques du SLD ne sont pas nécessaires à la survenue des cataplexies que ce soit pour les cataplexies « spontanées » (en condition basale) ou les cataplexies induites par le chocolat et la privation spécifique de SP. Toutefois, le blocage des neurones glutamatergiques du SLD a engendré la survenue de cataplexies instables caractérisées par une paralysie incomplète, la présence de mouvements (apparentés à une lutte pour sortir de la cataplexie) ou des événements phasiques musculaire observables sur l'EMG dans 30% des épisodes. Les neurones glutamatergiques du SLD favoriseraient ainsi l'immobilité des souris Orex-KO et à l'inhibition du contrôle moteur pendant la cataplexie. De plus, la durée moyenne des épisodes de cataplexies et de SP est raccourcie suite à l'inactivation des neurones glutamatergiques du SLD. L'étude de [Valencia-Garcia et collègues \(2017\)](#) avait suggéré que les mouvements de l'animal pouvaient provoquer le réveil prématuré de l'animal pendant le SP diminuant ainsi la durée de l'épisode. De la même façon, les souris Orex-KO pourraient mettre fin à leur immobilité plus facilement lorsque les neurones glutamatergiques du SLD sont inactifs. Ces derniers favoriseraient le maintien de longs épisodes de cataplexies. La participation des neurones glutamatergiques du SLD dans les cataplexies n'est pas contestée par les résultats de notre étude. En revanche, nos données montrent qu'ils ne jouent pas le rôle central présumé dans la littérature puisque les cataplexies continuent à être générées dans la même proportion y compris lors des protocoles d'induction.

Nos résultats remettent donc en question les modèles expérimentaux proposés jusqu'à aujourd'hui. Selon nous, le réseau neuronal impliqué dans les cataplexies est à repenser. Toutefois, l'implication des structures limbiques et notamment de l'amygdale dans le déclenchement des cataplexies semble se confirmer. En effet, les études d'imagerie chez l'homme montrent une hyperactivation de l'amygdale dans un contexte humoristique ([Schwartz et al., 2008](#) ; [Ponz et al., 2010](#)) et pendant la cataplexie ([Meletti et al., 2015](#)). De même, les données fonctionnelles chez la souris Orex-KO montrent que les neurones GABAergiques de l'amygdale centrale jouent un rôle

majeur dans la survenue des cataplexies (Mahoney et al., 2017 ; Snow et al., 2017) et que la modulation de l'activité de l'amygdale par la 5-HT permet de réprimer l'expression de cataplexies (Hasegawa et al., 2017).

Mais par quelles structures relais, le complexe amygdalien provoque-t-il l'atonie musculaire ? L'hypothèse dominante est que la voie de sortie inhibitrice de l'amygdale (neurones GABA de CeA) engendrerait la perte de tonus musculaire via un premier relais sur la vIPAG/dDpMe, structure clé dans l'inhibition du SLD. Les neurones GABA de la CeA sont effectivement au contact de neurones GABAergiques de la vIPAG/dDpMe et des neurones GABA de la vIPAG projettent sur le SLD (Snow et al., 2017). Toutefois, il n'a pas été démontré si les neurones de la CeA projettent sur les neurones de la vIPAG qui inhibent le SLD ou sur d'autres neurones GABAergiques de la vIPAG. De toute façon, nos résultats montrent que le SLD n'est pas nécessaire à la survenue des cataplexies.

Il a été montré que la CeA projette fortement sur les neurones monoaminergiques du DR et du LC (Burgess et al., 2013). Ces deux groupes de neurones sont impliqués dans l'activité des MTN- α . Les neurones NA du LC sont notamment connus pour coupler leur activité avec des changements d'activité musculaire : ils renforceraient l'activité des MTN- α pour permettre le mouvement (Lai et al., 2001). De plus, d'après l'étude de Wu et al (1999) chez le chien narcoleptique, ces neurones sont inactifs pendant les cataplexies. L'arrêt de l'entrée noradrénergique sur les MTN- α ce qui contribuerait donc à la défacilitation des MTN- α au cours de ces épisodes (Wu et al., 1999). Le rôle du LC dans les cataplexies avait été mis de côté par plusieurs études. D'une part cette structure exprime uniquement le récepteur 1 de l'Orex (Bourgin et al., 2000; Mieda et al., 2011) et la souris muté pour l'OX1R n'a pas de cataplexie. Puis la restauration du signal orexinergique, inhibiteur des cataplexies, dans le LC par la restauration de l'expression du OXR1 chez une souris doublement muté OX1R/2R n'a pas supprimé l'expression des cataplexies (Hasegawa et al., 2014). L'orexine n'agirait donc pas via les neurones du LC pour inhiber la survenue des cataplexies. Toutefois, le LC pourrait être arrêté lors des cataplexies par l'amygdale, indépendamment du signal orexine. Enfin les neurones du DR participeraient également à une défacilitation des MTN- α (Lai et al., 2001) et ils diminuent leur activité par rapport à l'éveil pendant les cataplexies mais contrairement du LC ils ne sont pas silencieux (Wu et al., 2004). Le rôle de ces groupes de neurones dans la cataplexie reste à étudier mais ne semble pas majeur si l'on considère la cataplexie comme une atonie musculaire avec hyperpolarisation des MTN.

L'hypothèse actuelle selon laquelle la cataplexie est une atonie musculaire avec hyperpolarisation des MTN- α implique une activation des neurones de la VMM GABAergiques, et/ou des interneurons inhibiteurs de la moelle épinière au cours des cataplexies. Des enregistrements unitaires au sein des noyaux gigantocellulaires réticulés de la medulla chez le chien narcoleptique (muté pour OXR2) a révélé qu'une petite population de neurones déchargeraient

particulièrement pendant le SP et les cataplexies (Siegel et al., 1991). C'est à notre connaissance la seule étude à mettre en évidence une possible implication de la medulla dans les cataplexies.

Il est intéressant de noter que la similitude entre les phénotypes cataplexies et SP, et l'absence de réflexe monosynaptique de Hoffman (H) et l'activité du tendon profond pendant les cataplexies et le SP (Dauvilliers et al., 2003; Overeem et al., 2004) a contribué à décrire la cataplexie comme la résultante d'une inhibition active des MTN- α dans ce symptôme. Or à l'heure actuelle, aucune étude n'a montré une hyperpolarisation des motoneurones pendant les cataplexies. La cataplexie pourrait être un arrêt des entrées motrices stimulantes sur les MTN- α et/ou de l'hyperpolarisation active des MTN- α .

La cataplexie est-elle un état dissocié du SP ?

L'hypothèse des états dissociés du SP dans la narcolepsie décrivent la cataplexie comme la survenue de l'atonie du SP au cours de l'éveil ; les paralysies du sommeil comme la persistance de l'atonie du SP alors que le cerveau est en état d'éveil ; et les hallucinations hypnagogiques comme la survenue d'une activité onirique au cours de l'éveil. La dissociation entre éveil et SP suggère alors que la cataplexie partage des similitudes physiologiques avec l'éveil (comme la conscience préservée) et d'autres avec le SP (atonie musculaire). Qu'en est-il réellement ?

Comme mentionné précédemment, la conscience est préservée au cours des cataplexies et non pendant le SP. Chez le patient narcoleptique, l'activité cérébrale au cours des cataplexies montrent une désynchronisation corticale (Vetrugno et al., 2010) comme durant l'éveil ou le SP. Une seule étude menée sur l'enfant narcoleptique, a identifié la présence d'une signature EEG typique des cataplexies : une hyper-synchronie d'ondes thêta paroxysmal (Vassalli et al., 2013). Dans la même étude, l'analyse approfondie les caractéristiques EEG chez la souris Orex-KO pendant les cataplexies a mis en évidence (1) une dynamique de l'activité corticale au cours des cataplexies et notamment en début d'épisode (Vassalli et al., 2013). Ces données présentent la cataplexie comme un état instable d'un point de vue de l'activité corticale, contrairement au SP qui est très stable ; (2) Malgré cette dynamique en début d'épisode, la cataplexie murine se stabilise ensuite sur une activité EEG proche de celle du SP et de l'éveil exploratoire (riche en ondes theta) ; (3) la présence de bouffées d'activité thêta de haute amplitude nommées HSPT (bouffées de thêta paroxysmal et hypersynchronisé) d'une durée de 1 à 2 secondes. Ces HSPT sont également observés pendant le SP mais en moins grande quantité (Bastianini et al., 2012). Pour résumer, les données EEG chez l'homme et l'animal sont insuffisantes pour déterminer si les cataplexies ont une activité cérébrale typique du SP ou de l'éveil ou si elles ont une activité propre.

L'une des caractéristiques majeures du SP est la présence de mouvements oculaires rapides. Chez le patient narcoleptique, des bouffées de mouvements oculaires ont été enregistrés pendant les cataplexies totales (Vetrugno et al., 2010). En revanche, le chien narcoleptique ne semble pas présenter de mouvements des yeux pendant les cataplexies (Siegel et al., 1991). Au cours des cataplexies, la fréquence cardiaque diminue et la tension artérielle est stable, ce qui constitue une différence majeure avec le SP durant lequel ces paramètres sont instables (Rubboli et al., 2000; Donadio et al., 2007; Vetrugno et al., 2010). De plus, l'utilisation d'antidépresseurs tricycliques comme traitement des cataplexies diminue également les quantités de SP, et constitue donc un point commun important entre cataplexie et SP. Cependant, les antidépresseurs agissent aussi sur l'état émotionnel renforçant le tonus sérotoninergique et noradrénergiques. Il est possible que l'effet des antidépresseurs sur le SP et les cataplexies soient de nature différente. En revanche, l'administration de sulpiride (antagoniste dopaminergique D2/D3) chez le chien narcoleptique, réduit grandement les cataplexies sans diminuer les quantités de SP (Okura et al., 2000).

L'activité musculaire au cours des cataplexies est-elle identique à celle du SP ? La perte de tonus musculaire a longtemps été à la base de l'hypothèse de la cataplexie comme état dissocié du SP. Chez l'homme, les cataplexies partielles ou totales ont bien montré une perte d'activité des muscles concernés sur l'EMG (Vetrugno et al., 2010). Comme mentionné précédemment, la perte des réflexes osteotendineux pendant la cataplexie et absent au cours du SP, peut également survenir lors du rire chez des sujets sains, et ne serait donc pas spécifique des cataplexies (Overeem et al., 1999). La description clinique de la cataplexie semble également incompatible avec un rôle centralisé du SLD dans la cataplexie. En effet ce groupe de neurones est impliqué dans l'inhibition de l'ensemble des MTN- α des muscles squelettiques au cours du SP. Or beaucoup de patients narcoleptiques souffrent de cataplexies partielles n'affectant que les muscles de la nuque et de la mâchoire (Overeem et al., 2011). De plus l'apparition de ces pertes de tonus se fait généralement de façon graduelle sur l'axe antéropostérieur ce qui va à l'encontre d'une inhibition centralisé dans un groupe de neurone. Notre étude rapporte une donnée majeure : la cataplexie n'est pas uniquement de l'atonie musculaire du SP. Nos résultats suggèrent que d'autres commandes motrices que celle de l'atonie du SP soient touché dans la cataplexie. Toutefois, l'implication, même partielle, des neurones glutamatergiques du SLD suggère que ce réseau est actif pendant les cataplexies et constitue un point commun entre cataplexie et SP.

Comme l'ensemble des données le suggèrent, la définition de la cataplexie comme une activité corticale de l'éveil couplée à une atonie musculaire du SP paraît obsolète. Il semble que chaque caractéristique physiologique (cérébral, musculaire, mouvements des yeux etc.) partage des similitudes avec l'éveil ou le SP. Ainsi, la cataplexie serait un état bien particulier se situant entre l'éveil et le SP.

Les nombreuses différences entre cataplexie et SP ont fait émerger une hypothèse alternative à celle de l'état dissocié du SP, selon laquelle la cataplexie serait une immobilité tonique (Overeem et al., 2002). L'immobilité tonique est une réponse stéréotypée involontaire mise en place dans une situation de danger. Elle est très observable dans le règne animal, notamment chez le cochon, le poulet, le requin (Gallup, 1974) et aurait disparu au cours de l'évolution chez l'homme. Cette immobilité tonique est un réflexe qui diminuerait chez les espèces, parallèlement à l'augmentation de l'épaisseur du néocortex (Klemm et al, 1971). Elle présente de nombreuses similarités avec la cataplexie. Il existe bien un trigger émotionnel dans les deux phénomènes bien qu'il soit à connotation positive dans la cataplexie et négative dans l'immobilité tonique. Les émotions négatives ne déclenchent que rarement des cataplexies (Overeem et al., 2011), mais l'homme est l'une des rares espèces à expérimenter le rire, et l'amygdale est active lors d'émotions négatives et positives. L'injection de carbachol (agoniste cholinergique) provoque des cataplexies chez le chien narcoleptique et augmente la durée de l'immobilité chez le cochon d'Inde (Nishino et al., 1995; deOliveira et al., 1997), alors que l'imipramine antidépresseur tricyclique, antagoniste cholinergique, améliore les deux phénomènes (Liberson et al., 1962; Nishino et al., 1994). Ces épisodes montrent une diminution de la fréquence cardiaque comme pendant les cataplexies (Gallup, 1974). De plus, il semblerait que l'hypothalamus et notamment le HLA soit impliqué dans ce phénomène d'immobilité tonique (deOliveira et al., 1997). En effet, la stimulation cholinergique des régions antérieures de l'HL augmente chez les cochons d'Inde la durée de l'immobilité tonique. Enfin, à l'image des cataplexies, une activité EEG typique de l'éveil est observée au cours de cette immobilité tonique, et peut évoluer vers des patterns de sommeil lorsque celle-ci est trop longue (Klemm et al, 1971).

Perspectives

Ces travaux de thèse ont répondu à plusieurs questions majeures concernant la narcolepsie et l'un de ses symptômes principaux : la cataplexie. Toutefois, ces travaux soulèvent d'autres questions et hypothèses qui méritent d'être abordées dans le futur.

Voie anatomique de l'inhibition du SP

Nous avons émis l'hypothèse que les Orex puissent inhiber le SP par la stimulation directe des neurones SP-off de la vlPAG/dDpMe. La voie de projection des neurones à orexine sur la vlPAG a été montrée (Peyron et al., 1998) mais il n'a pas été démontré si les neurones à orexine contactent les neurones GABAergiques SP-off de la vlPAG. Nous proposons de priver nos souris spécifiquement de SP grâce à la méthode de privation automatique. Après 48hrs de privation, les animaux seront sacrifiés, puis nous marquerons par immunohistochimie (1) les neurones de la vlPAG/dDpMe, actifs pendant l'éveil et le SL à l'aide d'anticorps dirigés contre le marqueur d'activité c-Fos (2) les projections orexinergiques à l'aide d'anticorps dirigés contre l'Orex-A. Nous mettrons ainsi en évidence les projections des neurones Orex sur les neurones SP-off de la vlPAG/dDpMe.

Rôle des neurones de la medulla dans la cataplexie

Au vu des résultats de notre étude n°2, les neurones glutamatergiques du SLD ne jouent pas le rôle majeur dans les cataplexies décrit dans la littérature. En revanche rien n'indique que les neurones GABA/Gly de la VMM ne soient pas impliqués dans ce phénotype. Aussi, il sera primordial dans une prochaine étude de cibler les neurones GABAergiques de la VMM selon un protocole similaire à celui utilisé pour le SLD, et de déterminer l'implication de ces neurones dans les cataplexies. Ainsi nous inactiverons la transmission GABAergique dans la VMM, par injection locale d'un AAV-shRNA dirigé contre l'ARNm du transporteur vésiculaire GABAergique VGAT et observerons les effets sur les cataplexies et le SP. Aussi cette partie de l'étude pourra également trancher sur la question de l'hyperpolarisation des MTN- α dans la cataplexie. Un effet majeur de l'inactivation des neurones de la VMM sur les cataplexies signifierait que les MTN- α pourraient être inhibés au cours de tels arrêts comportementaux.

Rôle du SLD et LC dans les cataplexies

Dans une future étude il serait intéressant de procéder à des enregistrements unitaires au sein du SLD pour définitivement déterminer si le SLD joue un rôle même mineur dans la cataplexie. Selon nos données actuelles, les neurones du SLD ne devraient pas être très actifs au cours des cataplexies. Les souris Orex-KO seront implantées pour la polysomnographie classique

(EEG/EMG) et des peignes d'électrodes seront descendus dans le tronc cérébral afin de pouvoir enregistrer simultanément les neurones du LC et ceux du SLD. Les patterns de décharges au cours du cycle veille sommeil permettront de déterminer la nature de ces neurones. Typiquement les neurones du LC déchargent spécifiquement pendant l'éveil et sont inactifs pendant le SP. Le SLD est localisé rostroventralement au LC et sera identifié par son activité SP-on. Nous pourrons ensuite évaluer si les neurones SP-on du SLD déchargent pendant les cataplexies et vérifier si les neurones SP-off du LC sont silencieux pendant les cataplexies. Ces données nous semblent essentielles pour compléter l'article n°2.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abrahamson EE, Leak RK, Moore RY (2001) The suprachiasmatic nucleus projects to posterior hypothalamic arousal systems. *Neuroreport* 12:435–440.
- Achermann P, Borbely AA (2003) Mathematical models of sleep regulation. *Front Biosci-Landmark* 8:S683–S693.
- Adamantidis A, Salvert D, Goutagny R, Lakaye B, Gervasoni D, Grisar T, Luppi P-H, Fort P (2008) Sleep architecture of the melanin-concentrating hormone receptor 1-knockout mice. *Eur J Neurosci* 27:1793–1800.
- 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–U9.
- Adolphs R, Tranel D, Damasio H, Damasio A (1994) Impaired Recognition of Emotion in Facial Expressions Following Bilateral Damage to the Human Amygdala. *Nature* 372:669–672.
- Akimoto H, Honda Y, Takahashi Y (1960) Pharmacotherapy in Narcolepsy. *Dis Nerv Syst* 21:704–706.
- Al Rajeh, S. *et al.* (1993) A community survey of neurological disorders in Saudi Arabia: the Thugbah study. *Neuroepidemiology* 12, 164–178.
- Amatruda T, Black D, Mckenna T, Mccarley R, Hobson J (1975) Sleep Cycle Control and Cholinergic Mechanisms - Differential Effects of Carbachol Injections at Pontine Brain-Stem Sites. *Brain Res* 98:501–515.
- American Sleep Disorders Association, Diagnostic Classification Steering Committee (2005), *International Classification of Sleep Disorders: Diagnostic and Coding Manual, ICSD-R*, Westchester, IL, American Academy of Sleep Medicine
- American Academy of Sleep Medicine. International Classification of Sleep Disorders-Third Edition (ICSD-3) (2014). Darien, IL: American Academy of Sleep Medicine.
- Anaclet C, Parmentier R, Ouk K, Guidon G, Buda C, Sastre J-P, Akaoka H, Sergeeva OA, Yanagisawa M, Ohtsu H, Franco P, Haas HL, Lin J-S (2009) Orexin/Hypocretin and Histamine: Distinct Roles in the Control of Wakefulness Demonstrated Using Knock-Out Mouse Models. *J Neurosci* 29:14423–14438.
- Andlauer O, Moore H, Jouhier L, Drake C, Peppard PE, Han F, Hong S-C, Poli F, Plazzi G, O'Hara R, Haffen E, Roth T, Young T, Mignot E (2013) Nocturnal Rapid Eye Movement Sleep Latency for Identifying Patients With Narcolepsy/Hypocretin Deficiency. *Jama Neurol* 70:891–902.
- Antelmi E, Ferri R, Iranzo A, Arnulf I, Dauvilliers Y, Bhatia KP, Liguori R, Schenck CH, Plazzi G (2016) From state dissociation to status dissociatus. *Sleep Med Rev* 28:5–17.
- Apergis-Schoute J, Iordanidou P, Faure C, Jegu S, Schoene C, Aitta-Aho T, Adamantidis A, Burdakov D (2015) Optogenetic Evidence for Inhibitory Signaling from Orexin to MCH Neurons via Local Microcircuits. *J Neurosci* 35:5435–5441.
- Arthaud S, Varin C, Gay N, Libourel P-A, Chauveau F, Fort P, Luppi P-H, 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.

- Aserinski E, Kleitman N. (1953) Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep. *Science*;118:273–4.
- Aston-Jones G, Chen S, Zhu Y, Oshinsky ML (2001) A neural circuit for circadian regulation of arousal. *Nat Neurosci* 4:732–738.
- Aston-Jones G, Cohen JD (2005) An integrative theory of locus coeruleus-norepinephrine function: Adaptive gain and optimal performance. *Annu Rev Neurosci* 28:403–450.
- Astonjones G, Ennis M, Pieribone V, Nickell W, Shipley M (1986) The Brain Nucleus Locus-Coeruleus - Restricted Afferent Control of a Broad Efferent Network. *Science* 234:734–737.
- Babcock D, Narver E, Dement W, Mitler M (1976) Effects of Imipramine, Chlorimipramine, and Fluoxetine on Cataplexy in Dogs. *Pharmacol Biochem Behav* 5:599–602.
- Baghdoyan H, Rodrigoangulo M, Mccarley R, Hobson J (1987) A Neuroanatomical Gradient in the Pontine Tegmentum for the Cholinoceptive Induction of Desynchronized Sleep Signs. *Brain Res* 414:245–261.
- Baimel C, Bartlett SE, Chiou L-C, Lawrence AJ, Muschamp JW, Patkar O, Tung L-W, Borgland SL (2015) Orexin/hypocretin role in reward: implications for opioid and other addictions. *Br J Pharmacol* 172:334–348.
- Baker T, Foutz A, Mcnerney V, Mitler M, Dement W (1982) Canine Model of Narcolepsy - Genetic and Developmental Determinants. *Exp Neurol* 75:729–742.
- Balcita-Pedicino JJ, Sesack SR (2007) Orexin axons in the rat ventral tegmental area synapse infrequently onto dopamine and gamma-aminobutyric acid neurons. *J Comp Neurol* 503:668–684.
- Banerjee D, Vitiello MV, Grunstein RR (2004) Pharmacotherapy for excessive daytime sleepiness. *Sleep Med Rev* 8:339–354.
- Barateau L, Lopez R, Dauvilliers Y (2016) Treatment Options for Narcolepsy. *CNS Drugs* 30:369–379.
- Barnes AK, Koul-Tiwari R, Garner JM, Geist PA, Datta S (2017) Activation of brain-derived neurotrophic factor-tropomyosin receptor kinase B signaling in the pedunculopontine tegmental nucleus: a novel mechanism for the homeostatic regulation of rapid eye movement sleep. *J Neurochem* 141:111–123.
- Bassetti CL, Baumann CR, Dauvilliers Y, Croyal M, Robert P, Schwartz J-C (2010) Cerebrospinal fluid histamine levels are decreased in patients with narcolepsy and excessive daytime sleepiness of other origin. *J Sleep Res* 19:620–623.
- Bastianini S, Silvani A, Berteotti C, Lo Martire V, Cohen G, Ohtsu H, Lin J-S, Zoccoli G (2015) Histamine Transmission Modulates the Phenotype of Murine Narcolepsy Caused by Orexin Neuron Deficiency. *Plos One* 10:e0140520.
- Bastianini S, Silvani A, Berteotti C, Lo Martire V, Zoccoli G (2012) High-amplitude theta wave bursts during REM sleep and cataplexy in hypocretin-deficient narcoleptic mice. *J Sleep Res* 21:185–188.
- Bayard S, Croisier Langenier M, Dauvilliers Y (2013) Facial expression recognition and emotional regulation in narcolepsy with cataplexy. *J Sleep Res* 22:170–177.

- Bayer L, Mairet-Coello G, Risold PY, Griffond B (2002) Orexin/hypocretin neurons: chemical phenotype and possible interactions with melanin-concentrating hormone neurons. *Regul Pept* 104:33–39.
- Belova MA, Paton JJ, Morrison SE, Salzman CD (2007) Expectation modulates neural responses to pleasant and aversive stimuli in primate amygdala. *Neuron* 55:970–984.
- Billiard M, Bassetti C, Dauvilliers Y, Dolenc-Groselj L, Lammers GJ, Mayer G, Pollmacher T, Reading P, Sonka K (2006) EFNS guidelines on management of narcolepsy. *Eur J Neurol* 13:1035–1048.
- Bissonette GB, Roesch MR (2016) Development and function of the midbrain dopamine system: what we know and what we need to. *Genes Brain Behav* 15:62–73.
- Bittencourt J, Presse F, Arias C, Peto C, Vaughan J, Nahon J, Vale W, Sawchenko P (1992) The Melanin-Concentrating Hormone System of the Rat-Brain - an Immunization and Hybridization Histochemical Characterization. *J Comp Neurol* 319:218–245.
- Black J, Emsellem H, Chase C, Feldman N, Hagaman M, Hayduk R, Lankford D, Kathawalla S, Marmion L, Mitler M, Pascualy R, Sahota P, Scharf M, Scrima L, Swick T, Ware J (2004) Sodium oxybate demonstrates long-term efficacy for the treatment of cataplexy in patients with narcolepsy. *Sleep Med* 5:119–123.
- Black J, Houghton WC (2006) Sodium oxybate improves excessive daytime sleepiness in narcolepsy. *Sleep* 29:939–946.
- Boissard R, Fort P, Gervasoni D, Barbagli B, Luppi P-H (2003) Localization of the GABAergic and non-GABAergic neurons projecting to the sublaterodorsal nucleus and potentially gating paradoxical sleep onset. *Eur J Neurosci* 18:1627–1639.
- Boissard R, Gervasoni D, Schmidt MH, Barbagli B, Fort P, Luppi PH (2002) The rat ponto-medullary network responsible for paradoxical sleep onset and maintenance: a combined microinjection and functional neuroanatomical study. *Eur J Neurosci* 16:1959–1973.
- Borbély A, Baumann F, Brandeis D, Strauch I, Lehmann D (1981) Sleep-Deprivation - Effect on Sleep Stages and Eeg Power-Density in Man. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 51:483–493.
- Borbély, A. A. (1982) A two-process model of sleep regulation. *Hum. Neurobiol.*, **1**: 195–204.
- Boscolo-Berto R, Viel G, Montagnese S, Raduazzo DI, Ferrara SD, Dauvilliers Y (2012) Narcolepsy and effectiveness of gamma-hydroxybutyrate (GHB): A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Sleep Med Rev* 16:431–443.
- Boucetta S, Cisse Y, Mainville L, Morales M, Jones BE (2014) Discharge Profiles across the Sleep-Waking Cycle of Identified Cholinergic, GABAergic, and Glutamatergic Neurons in the Pontomesencephalic Tegmentum of the Rat. *J Neurosci* 34:4708–4727.
- Bourgin P, Huitron-Resendiz S, Spier AD, Fabre V, Morte B, Criado JR, Sutcliffe JG, Henriksen SJ, de Lecea L (2000) Hypocretin-1 modulates rapid eye movement sleep through activation of locus coeruleus neurons. *J Neurosci* 20:7760–7765.
- Boyce R, Williams S, Adamantidis A (2017) REM sleep and memory. *Curr Opin Neurobiol* 44:167–177.
- Branch AF, Navidi W, Tabuchi S, Terao A, Yamanaka A, Scammell TE, Behn CD (2016) Progressive Loss of the Orexin Neurons Reveals Dual Effects on Wakefulness. *Sleep* 39:369–377.
- BrinleyReed M, Mascagni F, McDonald AJ (1995) Synaptology of prefrontal cortical projections to the basolateral amygdala: An electron microscopic study in the rat. *Neurosci Lett* 202:45–48.

- Brooks PL, Peever JH (2011) Impaired GABA and Glycine Transmission Triggers Cardinal Features of Rapid Eye Movement Sleep Behavior Disorder in Mice. *J Neurosci* 31:7111–7121.
- Brooks PL, Peever JH (2012) Identification of the Transmitter and Receptor Mechanisms Responsible for REM Sleep Paralysis. *J Neurosci* 32:9785–9795.
- Broughton R, Guberman A, Roberts J (1984) Comparison of the Psychosocial Effects of Epilepsy and Narcolepsy Cataplexy - a Controlled-Study. *Epilepsia* 25:423–433.
- Brown RE, Sergeeva OA, Eriksson KS, Haas HL (2002) Convergent excitation of dorsal raphe serotonin neurons by multiple arousal systems (orexin/hypocretin, histamine and noradrenaline). *J Neurosci* 22:8850–8859.
- Brown RE, Winston S, Basheer R, Thakkar MM, McCarley RW (2006) Electrophysiological characterization of neurons in the dorsolateral pontine rapid-eye-movement sleep induction zone of the rat: Intrinsic membrane properties and responses to carbachol and orexins. *Neuroscience* 143:739–755.
- Brown TM, Coogan AN, Cutler DJ, Hughes AT, Piggins HD (2008) Electrophysiological actions of orexins on rat suprachiasmatic neurons in vitro. *Neurosci Lett* 448:273–278.
- Burgdorf J, Wood PL, Kroes RA, Moskal JR, Panksepp J (2007) Neurobiology of 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats: Electrode mapping, lesion, and pharmacology studies. *Behav Brain Res* 182:274–283.
- Burgess C, Lai D, Siegel J, Peever J (2008a) An endogenous glutamatergic drive onto somatic motoneurons contributes to the stereotypical pattern of muscle tone across the sleep-wake cycle. *J Neurosci* 28:4649–4660.
- Burgess C, Rudchenko A, Takkala P, Peever JH, Yeomans J. (2008b) Ultrasonic vocalizations promote cataplexy in hypocretin/orexin knockout mice. *Soc Neurosci Abstr*
- Burgess CR, Oishi Y, Mochizuki T, Peever JH, Scammell TE (2013) Amygdala Lesions Reduce Cataplexy in Orexin Knock-Out Mice. *J Neurosci* 33:9734–9742.
- Burgess CR, Tse G, Gillis L, Peever JH (2010) Dopaminergic Regulation of Sleep and Cataplexy in a Murine Model of Narcolepsy. *Sleep* 33:1295–1304.
- Burlet S, Tyler CJ, Leonard CS (2002) Direct and indirect excitation of laterodorsal tegmental neurons by hypocretin/orexin peptides: Implications for wakefulness and narcolepsy. *J Neurosci* 22:2862–2872.
- Canli T, Sivers H, Whitfield SL, Gotlib IH, Gabrieli JDE (2002) Amygdala response to happy faces as a function of extraversion. *Science* 296:2191–2191.
- Card JP, Sved JC, Craig B, Raizada M, Vazquez J, Sved AF (2006) Efferent projections of rat rostroventrolateral medulla C1 catecholamine neurons: Implications for the central control of cardiovascular regulation. *J Comp Neurol* 499:840–859.
- Carter ME, Adamantidis A, Ohtsu H, Deisseroth K, de Lecea L (2009) Sleep Homeostasis Modulates Hypocretin-Mediated Sleep-to-Wake Transitions. *J Neurosci* 29:10939–10949.
- Carter ME, Brill J, Bonnavion P, Huguenard JR, Huerta R, de Lecea L (2012) Mechanism for Hypocretin-mediated sleep-to-wake transitions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:E2635–E2644.
- Carter ME, Yizhar O, Chikahisa S, Nguyen H, Adamantidis A, Nishino S, Deisseroth K, de Lecea L (2010) Tuning arousal with optogenetic modulation of locus coeruleus neurons. *Nat Neurosci* 13:1526–U117.

- Chabas D, Habert M-O, Maksud P, Tourbah A, Minz M, Willer J-C, Arnulf I (2007) Functional imaging of cataplexy during status cataplecticus. *Sleep* 30:153–156.
- Chase M, Soja P, Morales F (1989) Evidence That Glycine Mediates the Postsynaptic Potentials That Inhibit Lumbar Motoneurons During the Atonia of Active Sleep. *J Neurosci* 9:743–751.
- Chee MJS, Arrigoni E, Maratos-Flier E (2015) Melanin-Concentrating Hormone Neurons Release Glutamate for Feedforward Inhibition of the Lateral Septum. *J Neurosci* 35:3644–3651.
- Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, Elmquist JK, Scammell T, Lee C, Richardson JA, Williams SC, Xiong YM, Kisanuki Y, Fitch TE, Nakazato M, Hammer RE, Saper CB, Yanagisawa M (1999) Narcolepsy in orexin knockout mice: Molecular genetics of sleep regulation. *Cell* 98:437–451.
- Chen MC, Vetrivelan R, Guo C-N, Chang C, Fuller PM, Lu J (2017) Ventral medullary control of rapid eye movement sleep and atonia. *Exp Neurol* 290:53–62.
- Chou TC, Bjorkum AA, Gaus SE, Lu J, Scammell TE, Saper CB (2002) Afferents to the ventrolateral preoptic nucleus. *J Neurosci* 22:977–990.
- Chou TC, Lee CE, Lu J, Elmquist JK, Hara J, Willie JT, Beuckmann CT, Chemelli RM, Sakurai T, Yanagisawa M, Saper CB, Scammell TE (2001) Orexin (hypocretin) neurons contain dynorphin. *J Neurosci* 21:art. no.-RC168.
- Chou TC, Scammell TE, Gooley JJ, Gaus SE, Saper CB, Lu J (2003) Critical role of dorsomedial hypothalamic nucleus in a wide range of behavioral circadian rhythms. *J Neurosci* 23:10691–10702.
- Christensen JAE, Carrillo O, Leary EB, Peppard PE, Young T, Sorensen HBD, Jennum P, Mignot E (2015) Sleep-stage transitions during polysomnographic recordings as diagnostic features of type 1 narcolepsy. *Sleep Med* 16:1558–1566.
- Clark EL, Baumann CR, Cano G, Scammell TE, Mochizuki T (2009) Feeding-Elicited Cataplexy in Orexin Knockout Mice. *Neuroscience* 161:970–977.
- Clement O, Garcia SV, Libourel P-A, Arthaud S, Fort P, Luppi P-H (2014) The Inhibition of the Dorsal Paragigantocellular Reticular Nucleus Induces Waking and the Activation of All Adrenergic and Noradrenergic Neurons: A Combined Pharmacological and Functional Neuroanatomical Study. *Plos One* 9:e96851.
- Clement O, Sapin E, Berod A, Fort P, Luppi P-H (2011) Evidence that Neurons of the Sublaterodorsal Tegmental Nucleus Triggering Paradoxical (REM) Sleep Are Glutamatergic. *Sleep* 34:419–423.
- Clement O, Sapin E, Libourel P-A, Arthaud S, Brischox F, Fort P, Luppi P-H (2012) The Lateral Hypothalamic Area Controls Paradoxical (REM) Sleep by Means of Descending Projections to Brainstem GABAergic Neurons. *J Neurosci* 32:16763–16774.
- Crocker A, Espana RA, Papadopoulou M, Saper CB, Faraco J, Sakurai T, Honda M, Mignot E, Scammell TE (2005) Concomitant loss of dynorphin, NARP, and orexin in narcolepsy. *Neurology* 65:1184–1188.
- Czeisler C, Zimmerman J, Ronda J, Moorede M, Weitzman E (1980) Timing of Rem-Sleep Is Coupled to the Circadian-Rhythm of Body-Temperature in Man. *Sleep* 2:329–346.
- Czeisler CA, Duffy JF, Shanahan TL, Brown EN, Mitchell JF, Rimmer DW, Ronda JM, Silva EJ, Allan JS, Emens JS, Dijk DJ, Kronauer RE (1999) Stability, precision, and near-24-hour period of the human circadian pacemaker. *Science* 284:2177–2181.

- Dahlitz M, Parkes J (1993) Sleep Paralysis. *Lancet* 341:406–407.
- Dahlstrom A, Fuxe K (1964) Evidence for Existence of Monoamine-Containing Neurons in Central Nervous System .i. Demonstration of Monoamines in Cell Bodies of Brain Stem Neurons. *Acta Physiol Scand* 62:1–55.
- Dahmen N, Kasten M, Muller MJ, Mittag K (2002) Frequency and dependence on body posture of hallucinations and sleep paralysis in a community sample. *J Sleep Res* 11:179–180.
- Damasio AR, Grabowski TJ, Bechara A, Damasio H, Ponto LLB, Parvizi J, Hichwa RD (2000) Subcortical and cortical brain activity during the feeling of self-generated emotions. *Nat Neurosci* 3:1049–1056.
- Dampney R (1994) Functional-Organization of Central Pathways Regulating the Cardiovascular-System. *Physiol Rev* 74:323–364.
- Daniels L. (1934) Narcolepsy. *Medicine*;13(1):1–122
- Date Y, Ueta Y, Yamashita H, Yamaguchi H, Matsukura S, Kangawa K, Sakurai T, Yanagisawa M, Nakazato M (1999) Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:748–753.
- Datta S, Knapp CM, Koul-Tiwari R, Barnes A (2015) The homeostatic regulation of REM sleep: A role for. localized expression of brain-derived neurotrophic factor in the brainstem. *Behav Brain Res* 292:381–392.
- Datta S, Spoley EE, Patterson EH (2001) Microinjection of glutamate into the pedunculopontine tegmentum induces REM sleep and wakefulness in the rat. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol* 280:R752–R759.
- Dauvilliers Y, Arnulf I, Mignot E (2007) Narcolepsy with cataplexy. *Lancet* 369:499–511.
- Dauvilliers Y, Arnulf I, Lecendreux M, Charley CM, Franco P, Drouot X, d’Ortho M-P, Launois S, Lignot S, Bourgin P, Nogues B, Rey M, Bayard S, Scholz S, Lavault S, Tubert-Bitter P, Saussier C, Pariente A (2013a) Increased risk of narcolepsy in children and adults after pandemic H1N1 vaccination in France. *Brain* 136:2486–2496.
- Dauvilliers Y, Bassetti C, Lammers GJ, Arnulf I, Mayer G, Rodenbeck A, Lehert P, Ding C-L, Lecomte J-M, Schwartz J-C (2013b) Pitolisant versus placebo or modafinil in patients with narcolepsy: a double-blind, randomised trial. *Lancet Neurol* 12:1068–1075.
- Dauvilliers Y, Billiard M, Montplaisir J (2003) Clinical aspects and pathophysiology of narcolepsy. *Clin Neurophysiol* 114:2000–2017.
- Dauvilliers Y, Delalée N, Jaussent I, Scholz S, Bayard S, Croyal M, Schwartz J-C, Robert P (2012) Normal cerebrospinal fluid histamine and tele-methylhistamine levels in hypersomnia conditions. *Sleep* 35:1359–1366.
- Dauvilliers Y, Jennum P, Plazzi G (2013c) Rapid eye movement sleep behavior disorder and rapid eye movement sleep without atonia in narcolepsy. *Sleep Med* 14:775–781.
- Dauvilliers Y, Montplaisir J, Molinari N, Carlander B, Ondze B, Besset A, Billiard M (2001) Age at onset of narcolepsy in two large populations of patients in France and Quebec. *Neurology* 57:2029–2033.
- Dauvilliers Y, Paquereau J, Bastuji H, Drouot X, Weil J-S, Viot-Blanc V (2009) Psychological health in central hypersomnias: the French Harmony study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 80:636–641.

- Dauvilliers Y, Siegel JM, Lopez R, Torontali ZA, Peever JH (2014) Cataplexy--clinical aspects, pathophysiology and management strategy. *Nat Rev Neurol* 10:386–395.
- De Cock VC, Arnulf I (2008) REM sleep behavior disorders and their characteristics in Parkinson's disease. *Rev Neurol (Paris)* 164:683–691.
- De Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao XB, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg ELF, Gautvik VT, Bartlett FS, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG (1998) The hypocretins: Hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:322–327.
- del Cid-Pellitero E, Jones BE (2012) Immunohistochemical Evidence for Synaptic Release of Gaba from Melanin-Concentrating Hormone Containing Varicosities in the Locus Coeruleus. *Neuroscience* 223:269–276.
- Dement W (1960) Studies in Dream Deprivation. *Arch Neurol* 3:332–333.
- Dement W, Kleitman N (1957) The Relation of Eye-Movements During Sleep to Dream Activity - an Objective Method for the Study of Dreaming. *J Exp Psychol* 53:339–346.
- deOliveira L, Hoffmann A, MescaldeOliveira L (1997) The lateral hypothalamus in the modulation of tonic immobility in guinea pigs. *Neuroreport* 8:3489–3493.
- Descarries L, Watkins K, Garcia S, Beaudet A (1982) The Serotonin Neurons in Nucleus Raphe Dorsalis of Adult-Rat - a Light and Electron-Microscope Autoradiographic Study. *J Comp Neurol* 207:239–254.
- Deurveilher S, Burns J, Semba K (2002) Indirect projections from the suprachiasmatic nucleus to the ventrolateral preoptic nucleus: a dual tract-tracing study in rat. *Eur J Neurosci* 16:1195–1213.
- Dijk D, Czeisler C (1995) Contribution of the Circadian Pacemaker and the Sleep Homeostat to Sleep Propensity, Sleep Structure, Electroencephalographic Slow Waves, and Sleep Spindle Activity in Humans. *J Neurosci* 15:3526–3538.
- Dimitrova A, Fronczek R, Van der Ploeg J, Scammell T, Gautam S, Pascual-Leone A, Lammers GJ (2011) Reward-Seeking Behavior in Human Narcolepsy. *J Clin Sleep Med* 7:293–301.
- Diniz BC, Brown EN, Scammell TE, Kopell N (2006) Mathematical modeling of fragmented sleepwake behavior in orexin knockout mice. *Sleep* 29:A225–A225.
- Dobbins E, Feldman J (1994) Brain-Stem Network Controlling Descending Drive to Phrenic Motoneurons. *J Comp Neurol* 347:64–86.
- Dodel R, Peter H, Spottke A, Noelker C, Althaus A, Siebert U, Walbert T, Kesper K, Becker HF, Mayer G (2007) Health-related quality of life in patients with narcolepsy. *Sleep Med* 8:733–741.
- Donadio V, Plazzi G, Franceschini C, Vandi S, Karlsson T, Montagna R, Vetrugno R, Mignot E, Liguori R (2007) Sympathetic and cardiovascular activity during cataplexy in narcolepsy. *J Neurol* 254:196–196.
- Eban-Rothschild A, Rothschild G, Giardino WJ, Jones JR, de Lecea L (2016) VTA dopaminergic neurons regulate ethologically relevant sleep-wake behaviors. *Nat Neurosci* 19:1356–+.
- Eisensehr I, Linke R, Tatsch K, von Lindeiner H, Kharraz B, Gildehaus FJ, Eberle R, Pollmacher T, Schuld A, Noachtar S (2003) Alteration of the striatal dopaminergic system in human narcolepsy. *Neurology* 60:1817–1819.

- Elias CF, Lee CE, Kelly JF, Ahima RS, Kuhar M, Saper CB, Elmquist JK (2001) Characterization of CART neurons in the rat and human hypothalamus. *J Comp Neurol* 432:1–19.
- Elias CF, Saper CB, Maratos-Flier E, Tritos NA, Lee C, Kelly J, Tatro JB, Hoffman GE, Ollmann MM, Barsh GS, Sakurai T, Yanagisawa M, Elmquist JK (1998) Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *J Comp Neurol* 402:442–459.
- Endo T, Schwierin B, Borbely AA, Tobler I (1997) Selective and total sleep deprivation: Effect on the sleep EEG in the rat. *Psychiatry Res* 66:97–110.
- Eriksson KS, Sergeeva O, Brown RE, Haas HL (2001) Orexin/hypocretin excites the histaminergic neurons of the tuberomammillary nucleus. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 21:9273–9279.
- Eriksson KS, Sergeeva OA, Selbach O, Haas HL (2004) Orexin (hypocretin)/dynorphin neurons control GABAergic inputs to tuberomammillary neurons. *Eur J Neurosci* 19:1278–1284.
- Espana RA, McCormack SL, Mochizuki T, Scammell TE (2007) Running promotes wakefulness and increases cataplexy in orexin knockout mice. *Sleep* 30:1417–1425.
- Estabrooke IV, McCarthy MT, Ko E, Chou TC, Chemelli RM, Yanagisawa M, Saper CB, Scammell TE (2001) Fos expression in orexin neurons varies with behavioral state. *J Neurosci* 21:1656–1662.
- Fenik VB, Davies RO, Kubin L (2005) REM sleep-like atonia of hypoglossal (XII) motoneurons is caused by loss of noradrenergic and serotonergic inputs. *Am J Respir Crit Care Med* 172:1322–1330.
- Fortuyn HAD, Lappenschaar GA, Nienhuis FJ, Furer JW, Hodiamont PP, Rijnders CA, Lammers GJ, Renier WO, Buitelaar JK, Overeem S (2009) Psychotic symptoms in narcolepsy: phenomenology and a comparison with schizophrenia. *Gen Hosp Psychiatry* 31:146–154.
- Franken P, Dijk D, Tobler I, Borbely A (1991) Sleep-Deprivation in Rats - Effects on Eeg Power Spectra, Vigilance States, and Cortical Temperature. *Am J Physiol* 261:R198–R208.
- Furutani N, Hondo M, Kageyama H, Tsujino N, Mieda M, Yanagisawa M, Shioda S, Sakurai T (2013) Neurotensin Co-Expressed in Orexin-Producing Neurons in the Lateral Hypothalamus Plays an Important Role in Regulation of Sleep/Wakefulness States. *Plos One* 8:e62391.
- Fusar-Poli P, Placentino A, Carletti F, Landi P, Allen P, Surguladze S, Benedetti F, Abbamonte M, Gasparotti R, Barale F, Perez J, McGuire P, Politi P (2009) Functional atlas of emotional faces processing: a voxel-based meta-analysis of 105 functional magnetic resonance imaging studies. *J Psychiatry Neurosci JPN* 34:418–432.
- Gallopín T, Fort P, Eggemann E, Cauli B, Luppi PH, Rossier J, Audinat E, Muhlethaler M, Serafin M (2000) Identification of sleep-promoting neurons in vitro. *Nature* 404:992–995.
- Gallup G (1974) Animal Hypnosis - Factual Status of a Fictional Concept. *Psychol Bull* 81:836–853.
- Gao H-R, Zhuang Q-X, Zhang Y-X, Chen Z-P, Li B, Zhang X-Y, Zhong Y-T, Wang J-J, Zhu J-N (2017) Orexin Directly Enhances the Excitability of Globus Pallidus Internus Neurons in Rat by Co-activating OX1 and OX2 Receptors. *Neurosci Bull* 33:365–372.
- Gao XB, van den Pol AN (2001) Melanin concentrating hormone depresses synaptic activity of glutamate and GABA neurons from rat lateral hypothalamus. *J Physiol-Lond* 533:237–252.
- Gélineau J. (1880) De la narcolepsie. *Gazette des Hôpitaux, Paris*, 53, 626-628, et 54, 635-637.

- Gervasoni D, Peyron C, Rampon C, Barbagli B, Chouvet G, Urbain N, Fort P, Luppi PH (2000) Role and origin of the GABAergic innervation of dorsal raphe serotonergic neurons. *J Neurosci* 20:4217–4225.
- Goutagny R, Luppi P-H, Salvert D, Lapray D, Gervasoni D, Fort P (2008) Role of the dorsal paragigantocellular reticular nucleus in paradoxical (rapid eye movement) sleep generation: A combined electrophysiological and anatomical study in the rat. *Neuroscience* 152:849–857.
- Grace KP, Vanstone LE, Horner RL (2014) Endogenous cholinergic input to the pontine REM sleep generator is not required for REM sleep to occur. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 34:14198–14209.
- Guan JL, Uehara K, Lu S, Wang QP, Funahashi H, Sakurai T, Yanagizawa M, 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* 26:1523–1532.
- Guilleminault C, Wilson RA, Dement WC. (1974) A study on cataplexy. *Arch Neurol*;31(4):255–261.
- Gulyani S, Wu MF, Nienhuis R, John J, Siegel JM (2002) Cataplexy-related neurons in the amygdala of the narcoleptic dog. *Neuroscience* 112:355–365.
- Guyenet P, Darnall R, Riley T (1990) Rostral Ventrolateral Medulla and Sympathorespiratory Integration in Rats. *Am J Physiol* 259:R1063–R1074.
- Guzman-Marin R, Suntsova N, Bashir T, Nienhuis R, Szymusiak R, McGinty D (2008) Rapid eye movement sleep deprivation contributes to reduction of neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus of the adult rat. *Sleep* 31:167–175.
- Gvilia I, Xu F, McGinty D, Szymusiak R (2006) Homeostatic regulation of sleep: A role for preoptic area neurons. *J Neurosci* 26:9426–9433.
- Hagan JJ et al. (1999) Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:10911–10916.
- Hajnik T, Lai YY, Siegel JM (2000) Atonia-related regions in the rodent pons and medulla. *J Neurophysiol* 84:1942–1948.
- Han F, Lin L, Li J, Dong XS, Mignot E (2013) Decreased incidence of childhood narcolepsy 2 years after the 2009 H1N1 winter flu pandemic. *Ann Neurol* 73:560–560.
- Han F, Lin L, Warby SC, Faraco J, Li J, Dong SX, An P, Zhao L, Wang LH, Li QY, Yan H, Gao ZC, Yuan Y, Strohl KP, Mignot E (2011) Narcolepsy onset is seasonal and increased following the 2009 H1N1 pandemic in China. *Ann Neurol* 70:410–417.
- Hara J, Beuckmann CT, Nambu T, Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Sugiyama F, Yagami K, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T (2001) Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron* 30:345–354.
- Harsh J, Peszka J, Hartwig G, Mitler M (2000) Night-time sleep and daytime sleepiness in narcolepsy. *J Sleep Res* 9:309–316.
- Harthoorn LF, Sane A, Nethe M, Van Heerikhuizen JJ (2005) Multi-transcriptional profiling of melanin-concentrating hormone and orexin-containing neurons. *Cell Mol Neurobiol* 25:1209–1223.

- Hasegawa E, Maejima T, Yoshida T, Maseck OA, Herlitze S, Yoshioka M, Sakurai T, Mieda M (2017) Serotonin neurons in the dorsal raphe mediate the anticataplectic action of orexin neurons by reducing amygdala activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:E3526–E3535.
- Hasegawa E, Yanagisawa M, Sakurai T, Mieda M (2014) Orexin neurons suppress narcolepsy via 2 distinct efferent pathways. *J Clin Invest* 124:604–616.
- Hassani OK, Lee MG, Jones BE (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.
- Hayashi Y, Kashiwagi M, Yasuda K, Ando R, Kanuka M, Sakai K, Itohara S (2015) Cells of a common developmental origin regulate REM/non-REM sleep and wakefulness in mice. *Science* 350:957–961.
- Heath A, Kendler K, Eaves L, Martin N (1990) Evidence for Genetic Influences on Sleep Disturbance and Sleep Pattern. *Sleep* 13:318–335.
- Heier MS, Evsiukova T, Wilson J, Abdelnoor M, Hublin C, Ervik S (2009) Prevalence of narcolepsy with cataplexy in Norway. *Acta Neurol Scand* 120:276–280.
- Heier MS, Gautvik KM, Wannag E, Bronder KH, Midtlyng E, Kamaleri Y, Storsaeter J (2013) Incidence of narcolepsy in Norwegian children and adolescents after vaccination against H1N1 influenza A. *Sleep Med* 14:867–871.
- Hirai N, Nishino S (2011) Recent Advances in the Treatment of Narcolepsy. *Curr Treat Options Neurol* 13:437–457.
- Hishikawa Y, Wakamatsu H, Furuya E, Sugita Y, Masaoka S, Kaneda H, Sato M, Nanno H, Kaneko Z (1976) Sleep Satiation in Narcoleptic Patients. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 41:1–18.
- Hobson J, Mccarley R, Wyzinski P (1975) Sleep Cycle Oscillation - Reciprocal Discharge by 2 Brain-Stem Neuronal Groups. *Science* 189:55–58.
- Hobson JA, Pace-Schott EF (2002) The cognitive neuroscience of sleep: Neuronal systems, consciousness and learning. *Nat Rev Neurosci* 3:679–693.
- Holland PC, Gallagher M (1999) Amygdala circuitry in attentional and representational processes. *Trends Cogn Sci* 3:65–73.
- Holmes C, Jones B (1994) Importance of Cholinergic, Gabaergic, Serotonergic and Other Neurons in the Medial Medullary Reticular-Formation for Sleep-Wake States Studied. *Neuroscience* 62:1179–1200.
- Holstege J, Bongers C (1991) A Glycinergic Projection from the Ventromedial Lower Brain-Stem to Spinal Motoneurons - an Ultrastructural Double Labeling Study in Rat. *Brain Res* 566:308–315.
- Holstege J, Calkoen F (1990) The Distribution of Gaba in Lumbar Motoneuronal Cell Groups - a Quantitative Ultrastructural-Study in Rat. *Brain Res* 530:130–137.
- Honda K, Riehl J, Mignot E, Nishino S (1999) Dopamine D-3 agonists into the substratia nigra aggravates cataplexy but does not modify sleep. *Neuroreport* 10:3111–3118.
- Honda M, Arai T, Fukazawa M, Honda Y, Tsuchiya K, Salehi A, Akiyama H, Mignot E (2009) Absence of ubiquitinated inclusions in hypocretin neurons of patients with narcolepsy. *Neurology* 73:511–517.

- Hong SB, Tae WS, Joo EY (2006) Cerebral perfusion changes during cataplexy in narcolepsy patients. *Neurology* 66:1747–1749.
- Horvath TL, Peyron C, Diano S, Ivanov A, Aston-Jones G, Kilduff TS, Van den Pol AN (1999) Hypocretin (Orexin) activation and synaptic innervation of the locus coeruleus noradrenergic system. *J Comp Neurol* 415:145–159.
- Howard SG, Feigenbaum JJ (1997) Effect of gamma-hydroxybutyrate on central dopamine release in vivo. *Biochem Pharmacol* 53:103–110.
- Hyland BI, Reynolds JNJ, Hay J, Perk CG, Miller R (2002) Firing modes of midbrain dopamine cells in the freely moving rat. *Neuroscience* 114:475–492.
- Ingravallo F, Gnucci V, Pizza F, Vignatelli L, Govi A, Dormi A, Pelotti S, Cicognani A, Dauvilliers Y, Plazzi G (2012) The burden of narcolepsy with cataplexy: How disease history and clinical features influence socio-economic outcomes. *Sleep Med* 13:1293–1300.
- Inocente CO, Gustin M-P, Lavault S, Guignard-Perret A, Raoux A, Christol N, Gerard D, Dauvilliers Y, Reimão R, Bat-Pitault F, Lin J-S, Arnulf I, Lecendreux M, Franco P (2014) Depressive feelings in children with narcolepsy. *Sleep Med* 15:309–314.
- Inocente CO, Lavault S, Lecendreux M, Dauvilliers Y, Reimao R, Gustin M-P, Castets S, Spiegel K, Lin J-S, Arnulf I, Franco P (2013) Impact of Obesity in Children with Narcolepsy. *Cns Neurosci Ther* 19:521–528.
- Iranzo A, Aparicio J (2009) A lesson from anatomy: Focal brain lesions causing REM sleep behavior disorder. *Sleep Med* 10:9–12.
- Iranzo A, Tolosa E, Gelpi E, Luis Molinuevo J, Valldeoriola F, Serradell M, Sanchez-Valle R, Vilaseca I, Lomena F, Vilas D, LLado A, Gaig C, Santamaria J (2013) Neurodegenerative disease status and post-mortem pathology in idiopathic rapid-eye-movement sleep behaviour disorder: an observational cohort study. *Lancet Neurol* 12:443–453.
- Irukayama-Tomobe Y, Ogawa Y, Tominaga H, Ishikawa Y, Hosokawa N, Ambai S, Kawabe Y, Uchida S, Nakajima R, Saitoh T, Kanda T, Vogt K, Sakurai T, Nagase H, Yanagisawa M (2017) Nonpeptide orexin type-2 receptor agonist ameliorates narcolepsy-cataplexy symptoms in mouse models. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:5731–5736.
- Ishibashi M, Gumenchuk I, Miyazaki K, Inoue T, Ross WN, Leonard CS (2016) Hypocretin/Orexin Peptides Alter Spike Encoding by Serotonergic Dorsal Raphe Neurons through Two Distinct Mechanisms That Increase the Late Afterhyperpolarization. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 36:10097–10115.
- Ishikawa A, Ambroggi F, Nicola SM, Fields HL (2008a) Dorsomedial prefrontal cortex contribution to behavioral and nucleus accumbens neuronal responses to incentive cues. *J Neurosci* 28:5088–5098.
- Ishikawa A, Ambroggi F, Nicola SM, Fields HL (2008b) Contributions of the amygdala and medial prefrontal cortex to incentive cue responding. *Neuroscience* 155:573–584.
- Ito H, Yanase M, Yamashita A, Kitabatake C, Hamada A, Suhara Y, Narita M, Ikegami D, Sakai H, Yamazaki M, Narita M (2013) Analysis of sleep disorders under pain using an optogenetic tool: possible involvement of the activation of dorsal raphe nucleus-serotonergic neurons. *Mol Brain* 6:59.
- Jacob L, Dauvilliers Y (2014) [Narcolepsy with cataplexy: an autoimmune disease?]. *Med Sci MS* 30:1136–1143.

- Janak PH, Tye KM (2015) From circuits to behaviour in the amygdala. *Nature* 517:284–292.
- Jego S, Glasgow SD, Herrera CG, Ekstrand M, Reed SJ, Boyce R, Friedman J, Burdakov D, Adamantidis AR (2013) Optogenetic identification of a rapid eye movement sleep modulatory circuit in the hypothalamus. *Nat Neurosci* 16:1637–1643.
- Jelev A, Sood S, Liu H, Nolan P, Horner RL (2001) Microdialysis perfusion of 5-HT into hypoglossal motor nucleus differentially modulates genioglossus activity across natural sleep-wake states in rats. *J Physiol-Lond* 532:467–481.
- Jennum P, Ibsen R, Knudsen S, Kjellberg J (2013) Comorbidity and Mortality of Narcolepsy: A Controlled Retro- and Prospective National Study. *Sleep* 36:835–840.
- Jimenez-Correa U, Haro R, Gonzaez RO, Velazquez-Moctezuma J (2009) Correlations Between Subjective and Objective Features of Nocturnal Sleep and Excessive Diurnal Sleepiness in Patients with Narcolepsy. *Arq Neuropsiquiatr* 67:995–1000.
- John J, Thannickal TC, McGregor R, Ramanathan L, Ohtsu H, Nishino S, Sakai N, Yamanaka A, Stone C, Cornford M, Siegel JM (2013) Greatly increased numbers of histamine cells in human narcolepsy with cataplexy. *Ann Neurol* 74:786–793.
- John J, Wu M-F, Boehmer LN, Siegel JM (2004) Cataplexy-active neurons in the hypothalamus: implications for the role of histamine in sleep and waking behavior. *Neuron* 42:619–634.
- Jones B (1991) Paradoxical Sleep and Its Chemical Structural Substrates in the Brain. *Neuroscience* 40:637–656.
- Jouvet D, Jouvet M, Vimont P, Delorme F (1964) Etude De La Privation Selective De La Phase Paradoxe De Sommeil Chez. *C R Seances Soc Biol Fil* 158:756-.
- Jouvet M (1972) Role of Monoamines and Acetylcholine-Containing Neurons in Regulation of Sleep-Waking Cycle. *Ergeb Physiol* 64:166-.
- Jouvet M (1988) The Regulation of Paradoxical Sleep by the Hypothalamo-Hypophysis. *Arch Ital Biol* 126:259–274.
- Jouvet M, Michel F (1960) Declenchement De La Phase Paradoxe Du Sommeil Par Stimulation Du Tronc Cerebral Chez Le Chat Intact Et Mesencephalique Chronique. *C R Seances Soc Biol Fil* 154:636–641.
- Jouvet M, Michel F (1960) [New research on the structures responsible for the "paradoxical phase" of sleep.]. *J Physiol (Paris)* 52:130-131.
- Jouvet M, Michel F, Courjon J (1959) Sur Un Stade D'activite Electrique Cerebrale Rapide Au Cours Du Sommeil Physiologique. *C R Seances Soc Biol Fil* 153:1024–1028.
- Jouvet M. (1962) Recherche sur les structures nerveuses et les mecanismes responsables des differentes phases du sommeil physiologique. *Arch Ital Biol.*;100:125–206
- Jovanovi.uj (1969) Periodicity of Erektion During Sleep in Healthy Men. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 27:626-.
- Juji T, Satake M, Honda Y, Doi Y (1984) Hla Antigens in Japanese Patients with Narcolepsy - All the Patients Were Dr2 Positive. *Tissue Antigens* 24:316–319.

- Kanbayashi T, Kodama T, Kondo H, Satoh S, Inoue Y, Chiba S, Shimizu T, Nishino S (2009) CSF Histamine Contents in Narcolepsy, Idiopathic Hypersomnia and Obstructive Sleep Apnea Syndrome. *Sleep* 32:181–187.
- Kantor S, Mochizuki T, Janisiewicz AM, Clark E, Nishino S, Scammell TE (2009) Orexin Neurons Are Necessary for the Circadian Control of REM Sleep. *Sleep* 32:1127–1134.
- Kaur S, Saxena RN, Mallick BN (2001) GABAergic neurons in prepositus hypoglossi regulate REM sleep by its action on locus coeruleus in freely moving rats. *Synapse* 42:141–150.
- Keay KA, Bandler R (2001) Parallel circuits mediating distinct emotional coping reactions to different types of stress. *Neurosci Biobehav Rev* 25:669–678.
- Khatami R, Birkmann S, Bassetti CL (2007) Amygdala dysfunction in narcolepsy-cataplexy. *J Sleep Res* 16:226–229.
- Killgore WDS, Yurgelun-Todd DA (2004) Activation of the amygdala and anterior cingulate during nonconscious processing of sad versus happy faces. *Neuroimage* 21:1215–1223.
- Kisanuki YY, Chemelli RM, Tokita S, Willie JT, Sinton CM, Yanagisawa M (2001) Behavioral and polysomnographic characterization of orexin-1 receptor and orexin-2 receptor double knockout mice. *Sleep* 24:A22–A22.
- Klemm WR. (1971) Neurophysiologic studies of the immobility reflex ("animal hypnosis"). *Neurosci Res (N Y)*. ;4 :165-212.
- Knutson B, Fong GW, Bennett SM, Adams CM, Homme D (2003) A region of mesial prefrontal cortex tracks monetarily rewarding outcomes: characterization with rapid event-related fMRI. *Neuroimage* 18:263–272.
- Kodama T, Lai YY, Siegel JM (2003) Changes in inhibitory amino acid release linked to pontine-induced atonia: An in vivo microdialysis study. *J Neurosci* 23:1548–1554.
- Kohyama J, Lai YY, Siegel JM (1998) Inactivation of the pons blocks medullary-induced muscle tone suppression in the decerebrate cat. *Sleep* 21:695–699.
- Konadhode RR, Pelluru D, Blanco-Centurion C, Zayachkivsky A, Liu M, Uhde T, Glen WB, van den Pol AN, Mulholland PJ, Shiromani PJ (2013) Optogenetic Stimulation of MCH Neurons Increases Sleep. *J Neurosci* 33:10257–10263.
- Kornum BR, Knudsen S, Ollila HM, Pizza F, Jennum PJ, Dauvilliers Y, Overeem S (2017) Narcolepsy. *Nat Rev Dis Primer* 3:16100.
- Kotagal S, Krahn LE, Slocumb N (2004) A putative link between childhood narcolepsy and obesity. *Sleep Med* 5:147–150.
- Krenzer M, Anacleit C, Vetrivelan R, Wang N, Vong L, Lowell BB, Fuller PM, Lu J (2011) Brainstem and Spinal Cord Circuitry Regulating REM Sleep and Muscle Atonia. *Plos One* 6:e24998.
- Lagos P, Torterolo P, Jantos H, Chase MH, Monti JM (2009) Effects on sleep of melanin-concentrating hormone (MCH) microinjections into the dorsal raphe nucleus. *Brain Res* 1265:103–110.
- Lai Y, Siegel J (1988) Medullary Regions Mediating Atonia. *J Neurosci* 8:4790–4796.
- Lai YY, Kodama T, Siegel JM (2001) Changes in monoamine release in the ventral horn and hypoglossal nucleus linked to pontine inhibition of muscle tone: An in vivo microdialysis study. *J Neurosci* 21:7384–7391.

- Lee MG, Hassani OK, Jones BE (2005) Discharge of identified orexin/hypocretin neurons across the sleep-waking cycle. *J Neurosci* 25:6716–6720.
- Lee ML, Swanson BE, de la Iglesia HO (2009) Circadian Timing of REM Sleep Is Coupled to an Oscillator within the Dorsomedial Suprachiasmatic Nucleus. *Curr Biol* 19:848–852.
- Leger L, Goutagny R, Sapin E, Salvert D, Fort P, Luppi P-H (2009) Noradrenergic neurons expressing Fos during waking and paradoxical sleep deprivation in the rat. *J Chem Neuroanat* 37:149–157.
- Leonard BE, McCartan D, White J, King DJ (2004) Methylphenidate: a review of its neuropharmacological, neuropsychological and adverse clinical effects. *Hum Psychopharmacol-Clin Exp* 19:151–180.
- Lett BT, Grant VL, Koh MT, Flynn G (2002) Prior experience with wheel running produces cross-tolerance to the rewarding effect of morphine. *Pharmacol Biochem Behav* 72:101–105.
- Leu-Semenescu S, De Cock VC, Le Masson VD, Debs R, Lavault S, Roze E, Vidailhet M, Arnulf I (2011) Hallucinations in narcolepsy with and without cataplexy: contrasts with Parkinson's disease. *Sleep Med* 12:497–504.
- Levine E, Jacobs B (1992) Neurochemical Afferents Controlling the Activity of Serotonergic Neurons. *J Neurosci* 12:4037–4044.
- Liberson W, Ellen P, Schwartz E, Wilson A, Gagnon V (1962) Further-Studies of the Effects of Psychotropic-Drugs on the Behavior of Guinea-Pigs and Rats. *J Neuropsychiatry* 3:298–303.
- Libourel P-A, Corneillie A, Luppi P-H, Chouvet G, Gervasoni D (2015) Unsupervised Online Classifier in Sleep Scoring for Sleep Deprivation Studies. *Sleep* 38:815–828.
- Lin J, Sakai K, Jouvet M (1988) Evidence for Histaminergic Arousal Mechanisms in the Hypothalamus of Cat. *Neuropharmacology* 27:111-.
- Lin J-S, Dauvilliers Y, Arnulf I, Bastuji H, Anaclet C, Parmentier R, Kocher L, Yanagisawa M, Leheret P, Ligneau X, Perrin D, Robert P, Roux M, Lecomte J-M, Schwartz J-C (2008) An inverse agonist of the histamine H(3) receptor improves wakefulness in narcolepsy: studies in orexin-/- mice and patients. *Neurobiol Dis* 30:74–83.
- Lin L, Faraco J, Li R, Kadotani H, Rogers W, Lin XY, Qiu XH, de Jong PJ, Nishino S, Mignot E (1999) The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell* 98:365–376.
- Liu R-J, van den Pol AN, Aghajanian GK (2002) Hypocretins (orexins) regulate serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus by excitatory direct and inhibitory indirect actions. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 22:9453–9464.
- Longstreth WT, Koepsell TD, Ton TG, Hendrickson AF, van Belle G (2007) The epidemiology of narcolepsy. *Sleep* 30:13–26.
- Löwenfeld L.(1902) Uber Narkolepsie. *Munch Med Wochenschr*;49:1041–5
- Lowry CA, Johnson PL, Hay-Schmidt A, Mikkelsen J, Shekhar A (2005) Modulation of anxiety circuits by serotonergic systems. *Stress Int J Biol Stress* 8:233–246.
- Lu J, Bjorkum AA, Xu M, Gaus SE, Shiromani PJ, Saper CB (2002) Selective activation of the extended ventrolateral preoptic nucleus during rapid eye movement sleep. *J Neurosci* 22:4568–4576.

- Lu J, Greco MA, Shiromani P, Saper CB (2000a) Effect of lesions of the ventrolateral preoptic nucleus on NREM and REM sleep. *J Neurosci* 20:3830–3842.
- Lu J, Sherman D, Devor M, Saper CB (2006) A putative flip-flop switch for control of REM sleep. *Nature* 441:589–594.
- Lu XY, Bagnol D, Burke S, Akil H, Watson SJ (2000b) Differential distribution and regulation of OX1 and OX2 orexin/hypocretin receptor messenger RNA in the brain upon fasting. *Horm Behav* 37:335–344.
- Luppi P, Astonjones G, Akaoka H, Chouvet G, Jouvet M (1995) Afferent-Projections to the Rat Locus-Coeruleus Demonstrated by Retrograde and Anterograde Tracing with Cholera-Toxin-B Subunit and Phaseolus-Vulgaris-Leukoagglutinin. *Neuroscience* 65:119–160.
- Luppi P-H, Clement O, Sapin E, Garcia SV, Peyron C, Fort P (2014) Animal models of REM dysfunctions: what they tell us about the cause of narcolepsy and RBD? *Arch Ital Biol* 152:118–128.
- Mahlis J, De la Herran-Arita AK, Mignot E (2013) The autoimmune basis of narcolepsy. *Curr Opin Neurobiol* 23:767–773.
- Mahoney CE, Agostinelli LJ, Brooks JNK, Lowell BB, Scammell TE (2017) GABAergic Neurons of the Central Amygdala Promote Cataplexy. *J Neurosci* 37:3995–4006.
- Maloney KJ, Mainville L, Jones BE (1999) Differential c-Fos expression in cholinergic, monoaminergic, and GABAergic cell groups of the pontomesencephalic tegmentum after paradoxical sleep deprivation and recovery. *J Neurosci* 19:3057–3072.
- Maloney KJ, Mainville L, Jones BE (2000) c-Fos expression in GABAergic, serotonergic, and other neurons of the pontomedullary reticular formation and raphe after paradoxical sleep deprivation and recovery. *J Neurosci* 20:4669–4679.
- Mamelak M (2009) Narcolepsy and depression and the neurobiology of gammahydroxybutyrate. *Prog Neurobiol* 89:193–219.
- Marcus JN, Aschkenasi CJ, Lee CE, Chemelli RM, Saper CB, Yanagisawa M, Elmquist JK (2001) Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *J Comp Neurol* 435:6–25.
- Marek R, Strobel C, Bredy TW, Sah P (2013) The amygdala and medial prefrontal cortex: partners in the fear circuit. *J Physiol-Lond* 591:2381–2391.
- Mathis J, Hess CW, Bassetti C (2007) Isolated mediotegmental lesion causing narcolepsy and rapid eye movement sleep behaviour disorder: a case evidencing a common pathway in narcolepsy and rapid eye movement sleep behaviour disorder. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 78:427–429.
- Mattarozzi K, Bellucci C, Campi C, Cipolli C, Ferri R, Franceschini C, Mazzetti M, Russo PM, Vandi S, Vignatelli L, Plazzi G (2008) Clinical, behavioural and polysomnographic correlates of cataplexy in patients with narcolepsy/cataplexy. *Sleep Med* 9:425–433.
- Mayer G (2005) The neurophysiology of cataplexy. *Nervenarzt* 76:1464–+.
- Mccarley R, Massaquoi S (1986) A Limit-Cycle Mathematical-Model of the Rem-Sleep Oscillator System. *Am J Physiol* 251:R1011–R1029.
- Mccarley R, Massaquoi S (1992) Neurobiological Structure of the Revised Limit-Cycle Reciprocal Interaction-Model of Rem Cycle Control. *J Sleep Res* 1:132–137.

- Mefford I, Baker T, Boehme R, Foutz A, Ciaranello R, Barchas J, Dement W (1983) Narcolepsy - Biogenic-Amine Deficits in an Animal-Model. *Science* 220:629–632.
- Meletti S, Vaudano AE, Pizza F, Ruggieri A, Vandi S, Teggi A, Franceschini C, Benuzzi F, Nichelli PF, Plazzi G (2015) The Brain Correlates of Laugh and Cataplexy in Childhood Narcolepsy. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 35:11583–11594.
- Mieda M, Hasegawa E, Kisanuki YY, Sinton CM, Yanagisawa M, Sakurai T (2011) Differential Roles of Orexin Receptor-1 and-2 in the Regulation of Non-REM and REM Sleep. *J Neurosci* 31:6518–6526.
- Mignot E (1997) Genetics of narcolepsy and other sleep disorders. *Am J Hum Genet* 60:1289–1302.
- Mignot E (1998) Genetic and familial aspects of narcolepsy. *Neurology* 50:S16-22.
- Mignot E, Lammers GJ, Ripley B, Okun M, Nevsimalova S, Overeem S, Vankova J, Black J, Harsh J, Bassetti C, Schrader H, Nishino S (2002) The role of cerebrospinal fluid hypocretin measurement in the diagnosis of narcolepsy and other hypersomnias. *Arch Neurol* 59:1553–1562.
- Mignot E, Lin L, Rogers W, Honda Y, Qiu XH, Lin XY, Okun M, Hohjoh H, Miki T, Hsu SH, Leffell MS, Grumet FC, Fernandez-Vina M, Honda M, Risch N (2001) Complex HLA-DR and -DQ interactions confer risk of narcolepsy-cataplexy in three ethnic groups. *Am J Hum Genet* 68:686–699.
- Mignot EJM (2012) A Practical Guide to the Therapy of Narcolepsy and Hypersomnia Syndromes. *Neurotherapeutics* 9:739–752.
- Mignot EJM (2014) History of narcolepsy at Stanford University. *Immunol Res* 58:315–339.
- Mileykovskiy BY, Kiyashchenko LI, Siegel JM (2005) Behavioral correlates of activity in identified hypocretin/orexin neurons. *Neuron* 46:787–798.
- Miller J, Faull K, Bowersox S, Dement W (1990) Cns Monoamines and Their Metabolites in Canine Narcolepsy - a Replication Study. *Brain Res* 509:169–171.
- Mistlberger R, Bergmann B, Waldenar W, Rechtschaffen A (1983) Recovery Sleep Following Sleep-Deprivation in Intact and Suprachiasmatic Nuclei-Lesioned Rats. *Sleep* 6:217–233.
- Mistlberger RE (2005) Circadian regulation of sleep in mammals: Role of the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res Rev* 49:429–454.
- Mitchell DJ, McNaughton N, Flanagan D, Kirk IJ (2008) Frontal-midline theta from the perspective of hippocampal “theta.” *Prog Neurobiol* 86:156–185.
- Mitra A, Lenglos C, Martin J, Mbende N, Gagne A, Timofeeva E (2011) SUCROSE MODIFIES c-fos mRNA EXPRESSION IN THE BRAIN OF RATS MAINTAINED. *Neuroscience* 192:459–474.
- Mochizuki T, Arrigoni E, Marcus JN, Clark EL, Yamamoto M, Honer M, Borroni E, Lowell BB, Elmquist JK, Scammell TE (2011) Orexin receptor 2 expression in the posterior hypothalamus rescues sleepiness in narcoleptic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:4471–4476.
- Mochizuki T, Crocker A, McCormack S, Yanagisawa M, Sakurai T, Scammell TE (2004) Behavioral state instability in orexin knock-out mice. *J Neurosci* 24:6291–6300.
- Morales F, Boxer P, Chase M (1987) Behavioral State-Specific Inhibitory Postsynaptic Potentials Impinge on Cat Lumbar Motoneurons During Active Sleep. *Exp Neurol* 98:418–435.

- Morales F, Chase M (1978) Intracellular-Recording of Lumbar Motoneuron Membrane-Potential During Sleep and Wakefulness. *Exp Neurol* 62:821–827.
- Morales FR, Sampogna S, Yamuy J, Chase MH (1999) c-fos Expression in brainstem premotor interneurons during cholinergically induced active sleep in the cat. *J Neurosci* 19:9508–9518.
- Mori T, Uzawa N, Iwase Y, Masukawa D, Rahmadi M, Hirayama S, Hokazono M, Higashiyama K, Shioda S, Suzuki T (2016) Narcolepsy-like sleep disturbance in orexin knockout mice are normalized by the 5-HT1A receptor agonist 8-OH-DPAT. *Psychopharmacology (Berl)* 233:2343–2353.
- Morris JS, Frith CD, Perrett DI, Rowland D, Young AW, Calder AJ, Dolan RJ (1996) A differential neural response in the human amygdala to fearful and happy facial expressions. *Nature* 383:812–815.
- Morrish E, King MA, Smith IE, Shneerson JM (2004) Factors associated with a delay in the diagnosis of narcolepsy. *Sleep Med* 5:37–41.
- Mouret J, Delorme F (1967) Lesions of Pontic Tegmentum and Sleep in Rats. *C R Seances Soc Biol Fil* 161:1603-.
- Murray NM, Buchanan GF, Richerson GB (2015) Insomnia Caused by Serotonin Depletion is Due to Hypothermia. *Sleep* 38:1985–1993.
- Nambu T, Sakurai T, Mizukami K, Hosoya Y, Yanagisawa M, Goto K (1999) Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Res* 827:243–260.
- Namburi P, Beyeler A, Yorozu S, Calhoun GG, Halbert SA, Wichmann R, Holden SS, Mertens KL, Anahtar M, Felix-Ortiz AC, Wickersham IR, Gray JM, Tye KM (2015) A circuit mechanism for differentiating positive and negative associations. *Nature* 520:675-U208.
- Neuzeret P-C, Sakai K, Gormand F, Petitjean T, Buda C, Sastre J-P, Parrot S, Guidon G, Lin J-S (2009) Application of histamine or serotonin to the hypoglossal nucleus increases genioglossus muscle activity across the wake-sleep cycle. *J Sleep Res* 18:113–121.
- Nightingale S, Orgill JC, Ebrahim IO, de Lacy SF, Agrawal S, Williams AJ (2005) The association between narcolepsy and REM Behavior Disorder (RBD). *Sleep Med* 6:253–258.
- Nishino S (2007) Clinical and neurobiological aspects of narcolepsy. *Sleep Med* 8:373–399.
- Nishino S, Mignot E (1997) Pharmacological aspects of human and canine narcolepsy. *Prog Neurobiol* 52:27–78.
- Nishino S, Reid M, Dement W, Mignot E (1994) Neuropharmacology and Neurochemistry of Canine Narcolepsy. *Sleep* 17:S84–S92.
- Nishino S, Ripley B, Overeem S, Lammers GJ, Mignot E (2000) Hypocretin (orexin) deficiency in human narcolepsy. *Lancet* 355:39–40.
- Nishino S, Ripley B, Overeem S, Nevsimalova S, Lammers GJ, Vankova J, Okun M, Rogers W, Brooks S, Mignot E (2001) Diagnostic value of low CSF hypocretin/orexin levels in human narcolepsy. *Sleep* 24:A95–A96.
- Nishino S, Sakurai E, Nevsimalova S, Yoshida Y, Watanabe T, Yanai K, Mignot E (2009) Decreased CSF histamine in narcolepsy with and without low CSF hypocretin-1 in comparison to healthy controls. *Sleep* 32:175–180.

- Nishino S, Tafti M, Reid M, Shelton J, Siegel J, Dement W, Mignot E (1995) Muscle Atonia Is Triggered by Cholinergic Stimulation of the Basal Forebrain - Implication for the Pathophysiology of Canine Narcolepsy. *J Neurosci* 15:4806–4814.
- Nygren L, Olson L (1977) New Major Projection from Locus Coeruleus - Main Source of Noradrenergic Nerve-Terminals in Ventral and Dorsal Columns of Spinal-Cord. *Brain Res* 132:85–93.
- O’Flanagan D, Barret AS, Foley M, Cotter S, Bonner C, Crowe C, Lynch B, Sweeney B, Johnson H, McCoy B, Purcell E (2014) Investigation of an association between onset of narcolepsy and vaccination with pandemic influenza vaccine, Ireland April 2009-December 2010. *Eurosurveillance* 19:15–25.
- Ohayon MM, Priest RG, Zulley J, Smirne S, Paiva T (2002) Prevalence of narcolepsy symptomatology and diagnosis in the European general population. *Neurology* 58:1826–1833.
- Ohayon MM, Schenck CH (2010) Violent behavior during sleep: Prevalence, comorbidity and consequences. *Sleep Med* 11:941–946.
- Oishi Y, Williams RH, Agostinelli L, Arrigoni E, Fuller PM, Mochizuki T, Saper CB, Scammell TE (2013) Role of the Medial Prefrontal Cortex in Cataplexy. *J Neurosci* 33:9743–9751.
- Okun ML, Lin L, Pelin Z, Hong SC, Mignot E (2002) Clinical aspects of narcolepsy-cataplexy across ethnic groups. *Sleep* 25:27–35.
- Okura M, Fujiki N, Kita L, Honda K, Yoshida Y, Mignot E, Nishino S (2004) The roles of midbrain and diencephalic dopamine cell groups in the regulation of cataplexy in narcoleptic Dobermans. *Neurobiol Dis* 16:274–282.
- Okura M, Riehl J, Mignot E, Nishino S (2000) Sulpiride, a D2/D3 blocker, reduces cataplexy but not REM sleep in canine narcolepsy. *Neuropsychopharmacology* 23:528–538.
- Orellana C, Villemin E, Tafti M, Carlander B, Besset A, Billiard M (1994) Life events in the year preceding the onset of narcolepsy. *Sleep* 17:S50-53.
- Overeem S, Lammers GJ, van Dijk JG (1999) Weak with laughter. *Lancet* 354:838–838.
- Overeem S, Lammers GJ, van Dijk JG (2002) Cataplexy: “tonic immobility” rather than “REM-sleep atonia”? *Sleep Med* 3:471–477.
- Overeem S, Mignot E, van Dijk JG, Lammers GJ (2001) Narcolepsy: Clinical features, new pathophysiologic insights, and future perspectives. *J Clin Neurophysiol* 18:78–105.
- Overeem S, Reijntjes R, Huyser W, Jan Lammers G, Gert van Dijk J (2004) Corticospinal excitability during laughter: implications for cataplexy and the comparison with REM sleep atonia. *J Sleep Res* 13:257–264.
- Overeem S, van Nues SJ, van der Zande WL, Donjacour CE, van Mierlo P, Lammers GJ (2011) The clinical features of cataplexy: A questionnaire study in narcolepsy patients with and without hypocretin-1 deficiency. *Sleep Med* 12:12–18.
- Pal D, Mallick BN (2004) GABA in pedunculo pontine tegmentum regulates spontaneous rapid eye movement sleep by acting on GABA(A) receptors in freely moving rats. *Neurosci Lett* 365:200–204.
- Pal D, Mallick BN (2009) GABA in pedunculopontine tegmentum increases rapid eye movement sleep in freely moving rats: possible role of GABA-ergic inputs from substantia nigra pars reticulata. *Neuroscience* 164:404–414.

- Panula P, Pirvola U, Auvinen S, Airaksinen M (1989) Histamine-Immunoreactive Nerve-Fibers in the Rat-Brain. *Neuroscience* 28:585–610.
- Parkes J, Fenton G, Struthers G, Curzon G, Kantamaneni B, Buxton B, Record C (1974) Narcolepsy and Cataplexy - Clinical Features, Treatment and Cerebrospinal-Fluid Findings. *Q J Med* 43:525–536.
- Parmentier R, Zhao Y, Perier M, Akaoka H, Lintunen M, Hou Y, Panula P, Watanabe T, Franco P, Lin J-S (2016) Role of histamine H1-receptor on behavioral states and wake maintenance during deficiency of a brain activating system: A study using a knockout mouse model. *Neuropharmacology* 106:20–34.
- Partinen M, Kaprio J, Koskenvuo M, Putkonen P, Langinvainio H (1983) Genetic and Environmental Determination of Human Sleep. *Sleep* 6:179–185.
- Passouant P. (1981) Doctor Gélinau (1828-1906): Narcolepsy centennial. *Sleep*;4:241-6.
- Paton JJ, Belova MA, Morrison SE, Salzman CD (2006) The primate amygdala represents the positive and negative value of visual stimuli during learning. *Nature* 439:865–870.
- Paxinos G, Franklin KBJ, (2001) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, Second Edition. Academic Press
- Pelin Z, Guilleminault C, Risch N, Grumet FC, Mignot E (1998) HLA-DQB1*0602 homozygosity increases relative risk for narcolepsy but not disease severity in two ethnic groups. *Tissue Antigens* 51:96–100.
- Petitjean F, Sakai K, Blondaux C, Jouvet M (1975) Hypersomnia by Isthmic Lesion in Cat .2. Neurophysiological and Pharmacological Study. *Brain Res* 88:439–453.
- Peyron C et al. (2000) A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nat Med* 6:991–997.
- Peyron C, Kilduff TS (2017) Mapping the Hypocretin/Orexin Neuronal System: An Unexpectedly Productive Journey. *J Neurosci* 37:2268–2272.
- Peyron C, Luppi PH, Fort P, Rampon C, Jouvet M (1996) Lower brainstem catecholamine afferents to the rat dorsal raphe nucleus. *J Comp Neurol* 364:402–413.
- Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, de Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, Kilduff TS (1998) Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci* 18:9996–10015.
- Plazzi G, Parmeggiani A, Mignot E, Lin L, Scano MC, Posar A, Bernardi F, Lodi R, Tonon C, Barbiroli B, Montagna P, Cicognani A (2006) Narcolepsy-cataplexy associated with precocious puberty. *Neurology* 66:1577–1579.
- Plazzi G, Serra L, Ferri R (2008) Nocturnal aspects of narcolepsy with cataplexy. *Sleep Med Rev* 12:109–128.
- Poli F, Pizza F, Mignot E, Ferri R, Pagotto U, Taheri S, Finotti E, Bernardi F, Pirazzoli P, Cicognani A, Balsamo A, Nobili L, Bruni O, Plazzi G (2013) High Prevalence of Precocious Puberty and Obesity in Childhood Narcolepsy with Cataplexy. *Sleep* 36:175–181.
- Pollock MS, Mistlberger RE (2003) Rapid Eye Movement Sleep induction by microinjection of the GABA-A antagonist bicuculline into the dorsal subcoeruleus area of the rat. *Brain Res* 962:68–77.

- Ponz A, Khatami R, Poryazova R, Werth E, Boesiger P, Schwartz S, Bassetti CL (2010) Reduced Amygdala Activity during Aversive Conditioning in Human Narcolepsy. *Ann Neurol* 67:394–398.
- Poryazova R, Schnepf B, Werth E, Khatami R, Dydak U, Meier D, Boesiger P, Bassetti CL (2009) Evidence for metabolic hypothalamo-amygdala dysfunction in narcolepsy. *Sleep* 32:607–613.
- Postuma R, and Montplaisir, J. (2009). Predicting Parkinson’s disease – why, when, and how? *Parkinsonism & related disorders* 15, S105-S109
- Rampon C, Luppi PH, Fort P, Peyron C, Jouvet M (1996a) Distribution of glycine-immunoreactive cell bodies and fibers in the rat brain. *Neuroscience* 75:737–755.
- Rampon C, Peyron C, Gervasoni D, Pow DV, Luppi PH, Fort P (1999) Origins of the glycinergic inputs to the rat locus coeruleus and dorsal raphe nuclei: a study combining retrograde tracing with glycine immunohistochemistry. *Eur J Neurosci* 11:1058–1066.
- Rampon C, Peyron C, Petit JM, Fort P, Gervasoni D, Luppi PH (1996b) Origin of the glycinergic innervation of the rat trigeminal motor nucleus. *Neuroreport* 7:3081–3085.
- Rao Y, Lu M, Ge F, Marsh DJ, Qian S, Wang AH, Picciotto MR, Gao X-B (2008) Regulation of synaptic efficacy in hypocretin/orexin-containing neurons by melanin concentrating hormone in the lateral hypothalamus. *J Neurosci* 28:9101–9110.
- Rechtschaffen A, Dement W. (1967) Studies on the relation of narcolepsy, cataplexy and sleep with low voltage random EEG activity. In: Kety S, Evarts E, Williams H, editors. *Sleep and altered states of consciousness*. Baltimore: Williams and Wilkins;. p. 488–505.
- Rechtschaffen A, Wolpert EA, Dement WC, Mitchell SA, Fisher C. (1963) Nocturnal sleep of narcoleptics. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.*;15:599–609.
- Rechtschaffen A, Bergmann B, Everson C, Kushida C, Gilliland M (1989) Sleep-Deprivation in the Rat .10. Integration and Discussion of the Findings. *Sleep* 12:68–87.
- Reid MS, Tafti M, Nishino S, Sampathkumaran R, Siegel JM, Mignot E (1996) Local administration of dopaminergic drugs into the ventral tegmental area modulates cataplexy in the narcoleptic canine. *Brain Res* 733:83–100.
- Reiss AL, Hoeft F, Tenforde AS, Chen W, Mobbs D, Mignot EJ (2008) Anomalous Hypothalamic Responses to Humor in Cataplexy. *Plos One* 3:e2225.
- Reiter J, Katz E, Scammell TE, Maski K (2015) Usefulness of a Nocturnal SOREMP for Diagnosing Narcolepsy with Cataplexy in a Pediatric Population. *Sleep* 38:859–865.
- Rogers RD, Ramnani N, Mackay C, Wilson JL, Jezzard P, Carter CS, Smith SM (2004) Distinct portions of anterior cingulate cortex and medial prefrontal cortex are activated by reward processing in separable phases of decision-making cognition. *Biol Psychiatry* 55:594–602.
- Rosin DL, Weston MC, Sevigny CP, Stornetta RL, Guyenet PG (2003) Hypothalamic orexin (Hypocretin) neurons express vesicular glutamate transporters VGLUT1 or VGLUT2. *J Comp Neurol* 465:593–603.
- Roth T, Dauvilliers Y, Mignot E, Montplaisir J, Paul J, Swick T, Zee P (2013) Disrupted Nighttime Sleep in Narcolepsy. *J Clin Sleep Med* 9:955–965.

- Roussel B, Pujol J, Jouvet M (1976a) Effects of Tegmentum Rhombencephali Lesions on States of Sleep of Rat. *Arch Ital Biol* 114:188–209.
- Roussel B, Pujol JF, Jouvet M (1976b) [Effects of lesions in the pontine tegmentum on the sleep stages in the rat]. *Arch Ital Biol* 114:188–209.
- Rubboli G, d’Orsi G, Zaniboni A, Gardella E, Zamagni M, Rizzi R, Meletti S, Valzania F, Tropeani A, Tassinari CA (2000) A video-polygraphic analysis of the cataplectic attack. *Clin Neurophysiol* 111:S120–S128.
- Ruoff CM, Reaven NL, Funk SE, McGaughey KJ, Ohayon MM, Guilleminault C, Black J (2017) High Rates of Psychiatric Comorbidity in Narcolepsy: Findings From the Burden of Narcolepsy Disease (BOND) Study of 9,312 Patients in the United States. *J Clin Psychiatry* 78:171–176.
- Sabatinelli D, Bradley MM, Lang PJ, Costa VD, Versace F (2007) Pleasure rather than salience activates human nucleus accumbens and medial prefrontal cortex. *J Neurophysiol* 98:1374–1379.
- Sakai K (2015) Paradoxical (rapid Eye Movement) Sleep-on Neurons in the Laterodorsal Pontine Tegmentum in Mice. *Neuroscience* 310:455–471.
- Sakai K, Crochet S, Onoe H (2001) Pontine structures and mechanisms involved in the generation of paradoxical (REM) sleep. *Arch Ital Biol* 139:93–107.
- Sakai K, Kanamori N, Jouvet M (1979) Neuronal-Activity Specific to Paradoxical Sleep in the Bulbar Reticular-Formation of Unrestrained Cats. *Comptes Rendus Hebd Seances Acad Sci Ser D* 289:557–561.
- Sakai K, Sastre JP, Kanamori N, Jouvet M (1981) State-specific neurones in the ponto-medullary reticular formation with specific reference to the postural atonia during paradoxical sleep in cat. In: *Brain Mechanisms of Perceptual Awareness and Purposeful Behavior* (Pompeiano, M. and Aimone Marsan, C., eds), pp 405–429 New York: Raven Press.
- Sakai K, Koyama Y (1996) Are there cholinergic and non-cholinergic paradoxical sleep-on neurones in the pons? *Neuroreport* 7:2449–2453.
- Sakai K, Takahashi K, Anacleit C, Lin J-S (2010) Sleep-waking discharge of ventral tuberomammillary neurons in wild-type and histidine decarboxylase knock-out mice. *Front Behav Neurosci* 4:53.
- Sakurai T et al. (1998) Orexins and orexin receptors: A family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92:573–585.
- Sakurai T (2007) The neural circuit of orexin (hypocretin): maintaining sleep and wakefulness. *Nat Rev Neurosci* 8:171–181.
- Sanford LD, Tang XD, Xiao JH, Ross RJ, Morrison AR (2003) GABAergic regulation of REM sleep in reticularis pontis oralis and caudalis in rats. *J Neurophysiol* 90:938–945.
- Sapin E, Berod A, Leger L, Herman PA, Luppi P-H, Peyron C (2010) A Very Large Number of GABAergic Neurons Are Activated in the Tuberal Hypothalamus during Paradoxical (REM) Sleep Hypersomnia. *Plos One* 5:e11766.
- Sapin E, Lapray D, Berod A, Goutagny R, Leger L, Ravassard P, Clement O, Hanriot L, Fort P, Luppi P-H (2009) Localization of the Brainstem GABAergic Neurons Controlling Paradoxical (REM) Sleep. *Plos One* 4:e4272.
- Sasaki K, Suzuki M, Mieda M, Tsujino N, Roth B, Sakurai T (2011) Pharmacogenetic Modulation of Orexin Neurons Alters Sleep/Wakefulness States in Mice. *Plos One* 6:e20360.

- Sastre J, Jouvet M (1979) Oneiric Behavior of the Cat. *Physiol Behav* 22:979–989.
- Sastre J, Sakai K, Jouvet M (1981) Are the Gigantocellular Tegmental Field Neurons Responsible for Paradoxical Sleep. *Brain Res* 229:147–161.
- Sastre JP, Buda C, Kitahama K, Jouvet M (1996) Importance of the ventrolateral region of the periaqueductal gray and adjacent tegmentum in the control of paradoxical sleep as studied by muscimol microinjections in the cat. *Neuroscience* 74:415–426.
- Savander V, Go C, Ledoux J, Pitkanen A (1995) Intrinsic Connections of the Rat Amygdaloid Complex - Projections Originating in the Basal Nucleus. *J Comp Neurol* 361:345–368.
- Scammell TE (2003) The neurobiology, diagnosis, and treatment of narcolepsy. *Ann Neurol* 53:154–166.
- Scammell TE (2015) Narcolepsy. *N Engl J Med* 373:2654–2662.
- Scammell TE, Willie JT, Guilleminault C, Siegel JM (2009) A Consensus Definition of Cataplexy in Mouse Models of Narcolepsy. *Sleep* 32:111–116.
- Schenck CH et al. (2013) Rapid eye movement sleep behavior disorder: devising controlled active treatment studies for symptomatic and neuroprotective therapy—a consensus statement from the International Rapid Eye Movement Sleep Behavior Disorder Study Group. *Sleep Med* 14:795–806.
- Schenck CH, Bassetti CL, Arnulf I, Mignot E (2007) English Translations Of The First Clinical Reports On Narcolepsy And Cataplexy By Westphal And Gelineau In The Late 19th Century, With Commentary. *J Clin Sleep Med* 3:301–311.
- Schenkel E, Siegel J (1989) Rem-Sleep Without Atonia After Lesions of the Medial Medulla. *Neurosci Lett* 98:159–165.
- Schmidt M, Valatx J, Schmidt H, Wauquier A, Jouvet M (1994) Experimental-Evidence of Penile Erections During Paradoxical Sleep in the Rat. *Neuroreport* 5:561–564.
- Schmidt-Mutter C, Muller C, Zwiller J, Gobaille S, Maitre M (1999) Gamma-hydroxybutyrate and cocaine administration increases mRNA expression of dopamine D-1 and D-2 receptors in rat brain. *Neuropsychopharmacology* 21:662–669.
- Schoene C, Apergis-Schoute J, Sakurai T, Adamantidis A, Burdakov D (2014) Coreleased Orexin and Glutamate Evoke Nonredundant Spike Outputs and Computations in Histamine Neurons. *Cell Rep* 7:697–704.
- Schroeder BE, Binzak JM, Kelley AE (2001) A common profile of prefrontal cortical activation following exposure to nicotine- or chocolate-associated contextual cues. *Neuroscience* 105:535–545.
- Schwartz S, Ponz A, Poryazova R, Werth E, Boesiger P, Khatami R, Bassetti CL (2008) Abnormal activity in hypothalamus and amygdala during humour processing in human narcolepsy with cataplexy. *Brain* 131:514–522.
- Seneviratne U, Puvanendran K (2005) Narcolepsy in Singapore: Is it an elusive disease? *Ann Acad Med Singap* 34:90–93.
- Sergerie K, Chochol C, Armony JL (2008) The role of the amygdala in emotional processing: A quantitative meta-analysis of functional neuroimaging studies. *Neurosci Biobehav Rev* 32:811–830.

- Shan L, Dauvilliers Y, Siegel JM (2015) Interactions of the histamine and hypocretin systems in CNS disorders. *Nat Rev Neurol* 11:401–413.
- Shea JL, Mochizuki T, Sagvaag V, Aspevik T, Bjorkum AA, Datta S (2008) Rapid eye movement (REM) sleep homeostatic regulatory processes in the rat: Changes in the sleep-wake stages and electroencephalographic power spectra. *Brain Res* 1213:48–56.
- Shin YK, Yoon IY, Han EK, No YM, Hong MC, Yun YD, Jung BK, Chung SH, Choi JB, Cyn JG, Lee YJ, Hong SC (2008) Prevalence of narcolepsy-cataplexy in Korean adolescents. *Acta Neurol Scand* 117:273–278.
- Siegel J, Gordon T (1965) Paradoxical Sleep - Deprivation in Cat. *Science* 148:978-.
- Siegel J, Nienhuis R, Fahringer H, Paul R, Shiromani P, Dement W, Mignot E, Chiu C (1991) Neuronal-Activity in Narcolepsy - Identification of Cataplexy-Related Cells in the Medial Medulla. *Science* 252:1315–1318.
- Silber MH, Krahn LE, Olson EJ, Pankratz VS (2002) The epidemiology of narcolepsy in Olmsted County, Minnesota: A population-based study. *Sleep* 25:197–202.
- Sirieix C, Gervasoni D, Luppi P-H, Leger L (2012) Role of the Lateral Paragigantocellular Nucleus in the Network of Paradoxical (REM) Sleep: An Electrophysiological and Anatomical Study in the Rat. *Plos One* 7:e28724.
- Snow MB, Fraigne JJ, Thibault-Messier G, Chuen VL, Thomasian A, Horner RL, Peever J (2017) GABA Cells in the Central Nucleus of the Amygdala Promote Cataplexy. *J Neurosci* 37:4007–4022.
- Soja P, Lopezrodriguez F, Morales F, Chase M (1991) The Postsynaptic Inhibitory Control of Lumbar Motoneurons During the Atonia of Active Sleep - Effect of Strychnine on Motoneuron Properties. *J Neurosci* 11:2804–2811.
- Soja P, Lopezrodriguez F, Morales F, Chase M (1995) Effects of Excitatory Amino-Acid Antagonists on the Phasic Depolarizing Events That Occur in Lumbar Motoneurons During Rem Periods of Active Sleep. *J Neurosci* 15:4068–4076.
- Soja P, Morales F, Baranyi A, Chase M (1987) Effect of Inhibitory Amino-Acid Antagonists on Ipsps Induced in Lumbar Motoneurons Upon Stimulation of the Nucleus Reticularis Gigantocellularis During Active Sleep. *Brain Res* 423:353–358.
- Symonds CP, (1922) Oxf MD, Lond FRCP. Narcolepsy as a symptom of encephalitis lethargica. *Lancet.*;173:1214–5.
- Szakacs Z, Dauvilliers Y, Mikhaylov V, Poverennova I, Krylov S, Jankovic S, Sonka K, Lehert P, Lecomte I, Lecomte J-M, Schwartz J-C, HARMONY-CTP study group (2017) Safety and efficacy of pitolisant on cataplexy in patients with narcolepsy: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol* 16:200–207.
- Tabuchi S, Tsunematsu T, Black SW, Tominaga M, Maruyama M, Takagi K, Minokoshi Y, Sakurai T, Kilduff TS, Yamanaka A (2014) Conditional Ablation of Orexin/Hypocretin Neurons: A New Mouse Model for the Study of Narcolepsy and Orexin System Function. *J Neurosci* 34:6495–6509.
- Taepavarapruk N, Taepavarapruk P, John J, Lai YY, Siegel JM, Phillips AG, McErlane SA, Soja PJ (2008) State-dependent changes in glutamate, glycine, GABA, and dopamine levels in cat lumbar spinal cord. *J Neurophysiol* 100:598–608.

- Tafti M et al. (2016) Narcolepsy-Associated HLA Class I Alleles Implicate Cell-Mediated Cytotoxicity. *Sleep* 39:581–587.
- Takahashi K, Lin J-S, Sakai K (2006) Neuronal activity of histaminergic tuberomammillary neurons during wake-sleep states in the mouse. *J Neurosci* 26:10292–10298.
- Takahashi K, Lin J-S, Sakai K (2008) Neuronal activity of orexin and non-orexin waking-active neurons during wake-sleep states in the mouse. *Neuroscience* 153:860–870.
- Thakkar M, Portas C, McCarley RW (1996) Chronic low-amplitude electrical stimulation of the laterodorsal tegmental nucleus of freely moving cats increases REM sleep. *Brain Res* 723:223–227.
- Thannickal TC, Moore RY, Nienhuis R, Ramanathan L, Gulyani S, Aldrich M, Cornford M, Siegel JM (2000) Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. *Neuron* 27:469–474.
- Thorpy M (2007) Therapeutic advances in narcolepsy. *Sleep Med* 8:427–440.
- Thorpy MJ, Dauvilliers Y (2015) Clinical and practical considerations in the pharmacologic management of narcolepsy. *Sleep Med* 16:9–18.
- Thorpy MJ, Krieger AC (2014) Delayed diagnosis of narcolepsy: characterization and impact. *Sleep Med* 15:502–507.
- Tobler I, Borbely A, Groos G (1983) The Effect of Sleep-Deprivation on Sleep in Rats with Suprachiasmatic Lesions. *Neurosci Lett* 42:49–54.
- Torrealba F, Yanagisawa M, Saper CB (2003) Colocalization of orexin and glutamate immunoreactivity in axon terminals in the tuberomammillary nucleus in rats. *Neuroscience* 119:1033–1044.
- Tortorella S, Rodrigo-Angulo ML, Nunez A, Garzon M (2013) Synaptic interactions between perifornical lateral hypothalamic area, locus coeruleus nucleus and the oral pontine reticular nucleus are implicated in the stage succession during sleep-wakefulness cycle. *Front Neurosci* 7:216.
- Trivedi P, Yu H, MacNeil DJ, Van der Ploeg LHT, Guan XM (1998) Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain. *Febs Lett* 438:71–75.
- Trulsson M, Jacobs B (1979) Raphe Unit-Activity in Freely Moving Cats - Correlation with Level of Behavioral Arousal. *Brain Res* 163:135–150.
- Tsujino N, Sakurai T (2009) Orexin/Hypocretin: A Neuropeptide at the Interface of Sleep, Energy Homeostasis, and Reward System. *Pharmacol Rev* 61:162–176.
- Tsunematsu T, Kilduff TS, Boyden ES, Takahashi S, Tominaga M, Yamanaka A (2011) Acute Optogenetic Silencing of Orexin/Hypocretin Neurons Induces Slow-Wave Sleep in Mice. *J Neurosci* 31:10529–10539.
- Tsunematsu T, Ueno T, Tabuchi S, Inutsuka A, Tanaka KF, Hasuwa H, Kilduff TS, Terao A, 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.
- Tucci V, Stegagno L, Vandi S, Ferrillo F, Palomba D, Vignatelli L, Ferini-Strambi L, Montagna P, Plazzi G (2003) Emotional information processing in patients with narcolepsy: A psychophysiological investigation. *Sleep* 26:558–564.

- Tye KM, Stuber GD, de Ridder B, Bonci A, Janak PH (2008) Rapid strengthening of thalamo-amygdala synapses mediates cue-reward learning. *Nature* 453:1253-U56.
- Valencia-Garcia S, Libourel P-A, Lazarus M, Grassi D, Luppi P-H, Fort P (2017) Genetic inactivation of glutamate neurons in the rat sublaterodorsal tegmental nucleus recapitulates REM sleep behaviour disorder. *Brain* 140:414–428.
- Valko PO, Gavrilov YV, Yamamoto M, Reddy H, Haybaeck J, Mignot E, Baumann CR, Scammell TE (2013) Increase of histaminergic tuberomammillary neurons in narcolepsy. *Ann Neurol* 74:794–804.
- Van Dort CJ, Zachs DP, Kenny JD, Zheng S, Goldblum RR, Gelwan NA, Ramos DM, Nolan MA, Wang K, Weng F-J, Lin Y, Wilson MA, Brown EN (2015) Optogenetic activation of cholinergic neurons in the PPT or LDT induces REM sleep. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:584–589.
- Vandeputte M, de Weerd A (2003) Sleep disorders and depressive feelings: a global survey with the Beck depression scale. *Sleep Med* 4:343–345.
- Vannimercier G, Sakai K, Lin J, Jouvet M (1989) Mapping of Cholinceptive Brain-Stem Structures Responsible for the Generation of Paradoxical Sleep in the Cat. *Arch Ital Biol* 127:133–164.
- Varin C, Arthaud S, Salvvert D, Gay N, Libourel P-A, Luppi P-H, Leger L, Fort P (2016) Sleep architecture and homeostasis in mice with partial ablation of melanin-concentrating hormone neurons. *Behav Brain Res* 298:100–110.
- Vassalli A, Dellepiane JM, Emmenegger Y, Jimenez S, Vandi S, Plazzi G, Franken P, Tafti M (2013) Electroencephalogram paroxysmal theta characterizes cataplexy in mice and children. *Brain* 136:1592–1608.
- Vasudeva RK, Lin RCS, Simpson KL, Waterhouse BD (2011) Functional organization of the dorsal raphe efferent system with special consideration of nitroergic cell groups. *J Chem Neuroanat* 41:281–293.
- Veinante P, Stoeckel ME, FreundMercier MJ (1997) GABA- and peptide-immunoreactivities colocalize in the rat central extended amygdala. *Neuroreport* 8:2985–2989.
- Verret L, Fort P, Gervasoni D, Leger L, Luppi PH (2006) Localization of the neurons active during paradoxical (REM) sleep and projecting to the locus coeruleus noradrenergic neurons in the rat. *J Comp Neurol* 495:573–586.
- Verret L, Goutagny R, Fort P, Cagnon L, Salvvert D, Leger L, Boissard R, Salin P, Peyron C, Luppi PH (2003) A role of melanin-concentrating hormone producing neurons in the central regulation of paradoxical sleep. *Bmc Neurosci* 4:19.
- Verret L, Léger L, Fort P, Luppi P-H (2005) Cholinergic and noncholinergic brainstem neurons expressing Fos after paradoxical (REM) sleep deprivation and recovery. *Eur J Neurosci* 21:2488–2504.
- Vertes RP (2004) Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse* 51:32–58.
- Vetrivelan R, Fuller PM, Tong Q, Lu J (2009) Medullary Circuitry Regulating Rapid Eye Movement Sleep and Motor Atonia. *J Neurosci* 29:9361–9369.
- Vetrivelan R, Kong D, Ferrari LL, Arrigoni E, Madara JC, Bandaru SS, Lowell BB, Lu J, Saper CB (2016) Melanin-Concentrating Hormone Neurons Specifically Promote Rapid Eye Movement Sleep in Mice. *Neuroscience* 336:102–113.

- Vetrugno R, D'Angelo R, Moghadam KK, Vandi S, Franceschini C, Mignot E, Montagna P, Plazzi G (2010) Behavioural and neurophysiological correlates of human cataplexy: a video-polygraphic study. *Clin Neurophysiol Off J Int Fed Clin Neurophysiol* 121:153–162.
- Von Economo C. (1931) *Encephalitis Lethargica*. London: Oxford Medical Publications, Humphrey Milford, Oxford University Press;.
- Vu MH, Hurni C, Mathis J, Roth C, Bassetti CL (2011) Selective REM sleep deprivation in narcolepsy. *J Sleep Res* 20:50–56.
- Wamsley E, Donjacour CEHM, Scammell TE, Lammers GJ, Stickgold R (2014) Delusional Confusion of Dreaming and Reality in Narcolepsy. *Sleep* 37:419–+.
- Weber F, Chung S, Beier KT, Xu M, Luo L, Dan Y (2015) Control of REM sleep by ventral medulla GABAergic neurons. *Nature* 526:435–+.
- Webster H, Jones B (1988) Neurotoxic Lesions of the Dorsolateral Pontomesencephalic Tegmentum Cholinergic Cell Area in the Cat .2. Effects Upon Sleep Waking States. *Brain Res* 458:285–302.
- Weinhold SL, Seeck-Hirschner M, Nowak A, Hallschmid M, Goeder R, Baier PC (2014) The effect of intranasal orexin-A (hypocretin-1) on sleep, wakefulness and attention in narcolepsy with cataplexy. *Behav Brain Res* 262:8–13.
- Weissbourd B, Ren J, DeLoach KE, Guenther CJ, Miyamichi K, Luo L (2014) Presynaptic Partners of Dorsal Raphe Serotonergic and GABAergic Neurons. *Neuron* 83:645–662.
- Weng FJ, Williams RH, Hawryluk JM, Lu J, Scammell TE, Saper CB, Arrigoni E (2014) Carbachol excites sublaterodorsal nucleus neurons projecting to the spinal cord. *J Physiol-Lond* 592:1601–1617.
- Westphal C. (1877) Eigenthunlich mit einschlafen verbundene anfälle. *Arch, für Psychatrie Nervenkr.*, 7, 631-635
- Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Tokita H, Williams SC, Kisanuki YY, Marcus JN, Lee C, Elmquist JK, Kohlmeier KA, Leonard CS, Richardson JA, Hammer RE, Yanagisawa M (2003) Distinct narcolepsy syndromes in Orexin receptor-2 and Orexin null mice: Molecular genetic dissection of non-REM and REM sleep regulatory processes. *Neuron* 38:715–730.
- Willie JT, Sinton CM, Yanagisawa M, Chemelli RM (2001) Narcoleptic behavioral arrests in orexin ligand and orexin-2 receptor knockout mice are neurophysiologically distinct. *Sleep* 24:A24–A24.
- Wilner A, Steinman L, Lavie P, Peled R, Friedmann A, Brautbar C (1988) Narcolepsy Cataplexy in Israeli Jews Is Associated Exclusively with the Hla Dr2 Haplotype - a Study at the Serological and Genomic Level. *Hum Immunol* 21:15–22.
- Wing YK, Li RHY, Lam CW, Ho CKW, Fong SYY, Leung T (2002) The prevalence of narcolepsy among Chinese in Hong Kong. *Ann Neurol* 51:578–584.
- Winstone AM, Stellitano L, Verity C, Andrews N, Miller E, Stowe J, Shneerson J (2014) Clinical features of narcolepsy in children vaccinated with AS03 adjuvanted pandemic A/H1N1 2009 influenza vaccine in England. *Dev Med Child Neurol* 56:1117–1123.
- Wisor JP, Nishino S, Sora I, Uhl GH, Mignot E, Edgar DM (2001) Dopaminergic role in stimulant-induced wakefulness. *J Neurosci* 21:1787–1794.

- Wu G-Y, Han X-H, Zhuang Q-X, Zhang J, Yung W-H, Chan Y-S, Zhu J-N, Wang J-J (2012) Excitatory effect of histamine on rat spinal motoneurons by activation of both H-1 and H-2 receptors in vitro. *J Neurosci Res* 90:132–142.
- Wu H, Zhuang J, Stone WS, Zhang L, Zhao Z, Wang Z, Yang Y, Li X, Zhao X, Zhao Z (2014) Symptoms and occurrences of narcolepsy: a retrospective study of 162 patients during a 10-year period in Eastern China. *Sleep Med* 15:607–613.
- Wu MF, Gulyani SA, Yau E, Mignot E, Phan B, Siegel JM (1999) Locus coeruleus neurons: Cessation of activity during cataplexy. *Neuroscience* 91:1389–1399.
- Wu M-F, John J, Boehmer LN, Yau D, Nguyen GB, Siegel JM (2004) Activity of dorsal raphe cells across the sleep-waking cycle and during cataplexy in narcoleptic dogs. *J Physiol* 554:202–215.
- Wurts SW, Edgar DM (2000) Circadian and homeostatic control of rapid eye movement (REM) sleep: Promotion of REM tendency by the suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci* 20:4300–4310.
- Xi Z, Luning W (2009) REM sleep behavior disorder in a patient with pontine stroke. *Sleep Med* 10:143–146.
- Yamanaka A, Tsujino N, Funahashi H, Honda K, Guan JL, Wang QP, Tominaga M, Goto K, Shioda S, Sakurai T (2002) Orexins activate histaminergic neurons via the orexin 2 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 290:1237–1245.
- Yoshida Y, Fujiki N, Nakajima T, Ripley B, Matsumura H, Yoneda H, Mignot E, Nishino S (2001) Fluctuation of extracellular hypocretin-1 (orexin A) levels in the rat in relation to the light-dark cycle and sleep-wake activities. *Eur J Neurosci* 14:1075–1081.
- Yoss R, Daly D (1960) Narcolepsy. *Med Clin North Am* 44:953–968.
- Zhang S, Zeitzer JM, Sakurai T, Nishino S, Mignot E (2007) Sleep/wake fragmentation disrupts metabolism in a mouse model of narcolepsy. *J Physiol-Lond* 581:649–663.
- Zhang W, Schneider DM, Belova MA, Morrison SE, Paton JJ, Salzman CD (2013) Functional Circuits and Anatomical Distribution of Response Properties in the Primate Amygdala. *J Neurosci* 33:722–733.
- Zhu Y, Miwa Y, Yamanaka A, Yada T, Shibahara M, Abe Y, Sakurai T, Goto K (2003) Orexin receptor type-1 couples exclusively to pertussis toxin-insensitive G-proteins, while orexin receptor type-2 couples to both pertussis toxin-sensitive and -insensitive G-proteins. *J Pharmacol Sci* 92:259–266.