



HAL
open science

Etude du rôle des altérations des cycles éveil/sommeil dans la progression de la maladie de Parkinson et de l'atrophie multisystématisée

Marine Persillet

► **To cite this version:**

Marine Persillet. Etude du rôle des altérations des cycles éveil/sommeil dans la progression de la maladie de Parkinson et de l'atrophie multisystématisée. Neurosciences. Université de Bordeaux, 2021. Français. NNT : 2021BORD0062 . tel-03283363

HAL Id: tel-03283363

<https://theses.hal.science/tel-03283363>

Submitted on 9 Jul 2021

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.

THÈSE PRÉSENTÉE POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE : Sciences de la vie et de la santé
SPÉCIALITÉ : Neurosciences

Par Marine PERSILLET

ÉTUDE DES ALTERATIONS DES CYCLES EVEIL/SOMMEIL
DANS DES MODELES DE LA MALADIE DE PARKINSON ET
DE L'ATROPHIE MULTISYSTEMATISEE

Sous la direction du Dr Erwan BEZARD

Soutenue le 04 mars 2021

Membres du Jury :

Mr Pierre-Hervé LUPPI
Directeur de recherche, CNRS

RAPPORTEUR

Mme Véronique FABRE
Chargée de recherche, INSERM

EXAMINATEUR

Mme Ana MARQUES
Praticien hospitalier, CHU de Clermont-Ferrand

MEMBRE INVITEE

Mme Agnès NADJAR
Professeure des universités, Université de Bordeaux

DIRECTEUR DE THESE

M. Erwan BEZARD
Directeur de recherche, INSERM

RAPPORTEUR

université
de BORDEAUX



THÈSE PRÉSENTÉE POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE : Sciences de la vie et de la santé
SPÉCIALITÉ : Neurosciences

Par Marine PERSILLET

ÉTUDE DES ALTERATIONS DES CYCLES EVEIL/SOMMEIL
DANS DES MODELES DE LA MALADIE DE PARKINSON ET
DE L'ATROPHIE MULTISYSTEMATISEE

Sous la direction du Dr Erwan BEZARD

Soutenue le 04 mars 2021

Membres du Jury :

Mr Pierre-Hervé LUPPI
Directeur de recherche, CNRS

RAPPORTEUR

Mme Véronique FABRE
Chargée de recherche, INSERM

RAPPORTEUR

Mme Ana MARQUES
Praticien hospitalier, CHU de Clermont-Ferrand

EXAMINATEUR

Mme Agnès NADJAR
Professeure des universités, Université de Bordeaux

MEMBRE INVITEE

M. Erwan BEZARD
Directeur de recherche, INSERM

DIRECTEUR DE THESE

université
de BORDEAUX



« Ce sont nos choix qui montrent ce que nous sommes vraiment, beaucoup plus que nos aptitudes. »

J. K. Rowling

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres de mon jury, le Dr Pierre-Hervé Luppi, le Dr Véronique Fabre et le Dr Ana Marques pour l'honneur qu'ils m'ont fait d'accepter d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie tout particulièrement le Dr Pierre-Herve Luppi et le Dr Véronique Fabre d'avoir accepté de tenir le rôle de rapporteur de ce manuscrit. Je vous remercie pour votre expertise et pour le temps que vous m'avez consacré.

Je remercie mon directeur de thèse Erwan Bézard pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire et de m'avoir permis de travailler avec des gens aussi intéressants que passionnés. Merci de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce projet de recherche particulièrement intéressant. Merci également pour les différentes opportunités, notamment la possibilité de présenter mon travail en France et à l'étranger ainsi que la possibilité de rencontrer les collaborateurs étrangers dans leur laboratoire. Merci enfin de m'avoir permis d'appréhender le monde de la recherche dans toute sa complexité. Cette thèse a été très enrichissante pour moi et m'a l'occasion de grandir aussi bien personnellement que professionnellement.

Je remercie le Dr Agnès Nadjar d'avoir secondé Erwan dans mon encadrement. Merci également de m'avoir accueillie au sein de ton laboratoire et de m'avoir permis de faire partie de la formidable Team Sleep. Merci pour ta bonne humeur, pour tes conseils, pour m'avoir permis de relativiser quand je ne voyais que les problèmes, et pour m'avoir écoutée et avoir cru en moi.

Je voudrais remercier toutes les personnes qui m'ont formée dans les différentes techniques nécessaires dans le cadre de ma thèse. Tout d'abord, un immense merci à Gregory Porras. Cette thèse n'aurait pas été la même sans vous. Merci pour votre aide à chaque fois que j'en ai eu besoin, pour vos réponses aux milliers de questions que j'ai pu me poser. Surtout merci d'avoir toujours été bienveillant à mon égard, vous avez été d'un grand soutien et grâce à vous j'ai beaucoup moins peur toute seule !

Merci plus généralement à tous les membres de MOTAC, Emilie, Elsa, Amélie, Virginie et Leslie.

Merci à Sandra et Nathalie B d'avoir pris le temps de me montrer tout ce dont j'ai eu besoin pour mener à bien les études histologiques. Merci d'avoir rendu les très nombreuses heures passées en salle de manip moins longues grâce à vos bavardages et votre bonne humeur.

Merci à Christian pour m'avoir transmis les connaissances nécessaires pour appréhender le sommeil. Merci pour votre expertise, votre temps, votre bienveillance. Travailler avec vous a été vraiment stimulant et enrichissant.

Merci à Sylvie de m'avoir aidée pour l'étude de microdialyse. Même si cette dernière n'a pu être menée dans des conditions optimales, j'ai beaucoup apprécié de travailler avec toi. Merci pour ton temps, ta patience et ta gentillesse.

Merci à Audrey, Marie-Hélène, Evelyne, Leslie-Ann, Fredo, Nathalie D et Marie-Laure. J'ai vraiment apprécié de travailler avec vous, de près ou de loin. Merci pour votre gentillesse, un simple sourire ou un petit mot peuvent suffire à faire la différence dans une mauvaise journée. Un merci particulier à Alain, un maillon discret mais tellement essentiel à tout le laboratoire.

Un très grand merci à l'équipe 3. Merci à vous tout d'abord Jérôme de m'avoir fait confiance il y a maintenant 4 ans. Toute cette aventure n'aurait pas été possible sans vous. Vous avez été un maître de stage à l'écoute, patient et indulgent. Je ne sais pas si vos leçons d'électrophysiologie me serviront à l'avenir, mais j'ai adoré apprendre à vos côtés. De même, merci à Anne, François, Morgane et Giulia. J'ai eu énormément de chance que ma première grande expérience dans le monde de la recherche ait été au sein d'une équipe aussi bienveillante.

Merci aussi à Éric et Audrey, anciens collègues de la zone Nord. Merci pour votre bonne humeur contagieuse, et pour avoir pris régulièrement le temps de me demander comment j'allais.

Merci aux chercheurs de l'équipe 1, François, Francesca, Ben et Vincent. Travailler à vos côtés a été particulièrement formateur. Merci d'avoir pris du temps pour moi quand j'en ai eu besoin, et merci de m'avoir apporté un regard neuf sur les problèmes que j'ai pu rencontrer.

Merci à Emilie, Florent, Federico et Ludivine de m'avoir accompagnée, de m'avoir fait profiter de vos différentes expériences et de vos conseils, et merci également d'avoir pris le temps de m'écouter. Votre aide au niveau professionnel mais aussi personnel a été très précieuse.

Merci aux chercheurs, ingénieurs et techniciens de NutriNeuro, Sophie, Nathalie, Serge, Pierre, Clémentine, Sylvie, Xavier, Guillaume, Alexandra et Claudine. Merci de m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire, merci pour votre gentillesse et votre aide quand j'en ai eu besoin.

Merci à la très grande famille des animaliers, Ben, Floriane, Marine, Eva, Gregory, Julien. Vous avez pris grand soin de mes animaux et pour ça vous avez toute ma gratitude. Vous avoir comme collègue a vraiment été un plaisir. Pouvoir échanger avec vous a été très enrichissant sur le plan professionnel, mais plus encore sur le plan personnel. Merci de m'avoir accompagnée chacun votre tour au cours de ces 3 années et demi.

Merci également à Elisabeth et Guillaume de l'autre équipe animalière. Merci pour votre gentillesse et vos conseils qui m'ont été d'une grande aide.

Merci à tous les agents des équipes administratives des deux laboratoires, Éric, Christophe, Chantal, Sonia et Myriam à l'IMN, et Marie-Pierre, Flavie et Isabelle à NutriNeuro. Merci pour votre travail de l'ombre qui permet au laboratoire de fonctionner et qui nous permet de mener à bien tous nos travaux de recherche.

Merci à tous les nombreux étudiants de l'aquarium. Merci à Marie-Laure, Margaux, Alexia, Sophie, Eléonore, Miguel, Federica, Mathilde et Loïc. L'ambiance de travail est très importante pour se sentir bien et s'épanouir dans son travail. Au-delà de l'entraide sur le plan professionnel, j'ai eu la chance de rencontrer des personnes extraordinaires que je peux désormais compter parmi mes amis. Merci Margaux pour ta bonne humeur communicative et pour me faire rire en comptant mes atchoums avec tes hochements de tête. Merci Alexia pour toutes tes questions de statistiques en fin de journée mais surtout pour nos parties de baby-foot endiablées. Merci Sophie pour ton incroyable gentillesse et ta bienveillance, j'admire ta persévérance et je te laisse la place de celle qui part toujours en dernier, bien que la bataille fût ardue entre nous. Merci Federica pour avoir amené un peu de ta Sicile natale avec toi, et merci pour tous tes bons petits plats. Merci également aux autres étudiants de l'IMN, Bastien, Jérémy et Morgane.

Merci aux étudiants et post-doc de NutriNeuro, Fanny, Katherine, Camille, Mathilde C, Anaïs, Maud, John, Hugo, Anna, Roman, Andrea, Mathieu, Mathilde H, Eva. Merci de m'avoir accueillie parmi vous, de m'avoir aidée à m'intégrer dans le laboratoire. Merci pour votre bonne humeur légendaire qui rend les longues journées passées à l'animalerie plus facile à supporter. Un merci particulier à Fanny et Katherine, je suis très fière d'avoir fait partie de la team sleep avec vous.

Merci à ma famille, ma mère, mon frère, ma sœur et mes grands-parents.

Merci maman de m'avoir donné le goût d'apprendre, de m'avoir montré qu'il ne fallait pas se contenter d'un je ne sais pas, et de m'avoir toujours poussée à donner le meilleur de moi-même. Merci de m'avoir toujours soutenue quelque soit les challenges, mes réussites sont aussi les tiennes.

Merci à Alexia et Abel. Avoir grandi avec vous m'a permis de développer tellement de qualités essentielles, notamment la patience n'est-ce pas. Ma vie serait tellement fade sans vous. J'espère vous avoir rendu fière de votre grande sœur.

Merci à vous papi et mamie pour m'avoir accompagnée de là où vous étiez.

Merci à mes amis angevins, Amaury, Amélie, Nolwenn, Simon, Maëva, Arnaud, Alexis, Corentin et Laurianne. Je sais que je suis particulièrement chanceuse de vous avoir. Merci d'avoir été à mes côtés quand ça allait bien, et encore plus quand ça n'allait pas. Merci pour vos encouragements, et surtout pour avoir cru en moi quand moi-même je ne croyais plus en grand chose. Vous êtes une source de réconfort inépuisable.

Merci Amaury pour ton insouciance apaisante, Amélie pour me permettre de rêver, Nolwenn pour tout ce qu'on a partagé, Simon pour ta bonne humeur communicative, Maëva pour ta bienveillance et ton soutien sans faille, Arnaud pour nos si longues années d'amitié, Alexis pour ta folie légendaire, Corentin pour me donner le sentiment que toutes les aventures méritent d'être vécues, et Laurianne pour ton incroyable gentillesse.

Merci à mes amis bordelais, Domitille, Ludivine, Lucas, Eléonore, Jérôme, Bastien, Camille, Mathilde, Nico, Fanny, Sophie, Grégoire, Solène, Mélanie, Adrien, Andy, Laurent et Martin.

Merci Domi, ma première amie bordelaise, d'avoir été là à toutes les étapes de mon parcours. Le sens de la fête avec toi et Camille a pris un tout nouveau sens pour moi. Je suis sûre que cette ville n'aurait pas eu la même saveur sans vous.

Merci Ludivine et Eléonore. Il n'y a personne d'autre avec qui j'aurais voulu partager cette aventure qu'est la thèse. Vous avez été d'un soutien sans faille et je ne vous en remercierai jamais assez. Vous avez été ma bouffée d'oxygène ces dernières années. Je ne pensais pas que c'était possible de créer des liens d'amitié aussi forts, et je sais que la distance n'aura pas raison de ça.

Merci Bastien d'avoir été le Jerry dont toutes les Totally spies rêvent. Tu fais partie de mes héros du quotidien. Tu es une personne tellement généreuse, je suis vraiment heureuse de te compter parmi mes amis.

Merci Fanny, ma Fanny, ma femme du travail. Merci d'avoir partagé mes joies et mes déceptions. Merci de m'avoir aidée au quotidien, grâce à toi la thèse a été tellement plus facile à vivre. Comme tu le sais, nous deux c'est pour le meilleur et pour le pire. Le pire est passé, place au meilleur !

Merci Andy pour toutes ces discussions où on refait le monde, pour toutes ces théories et ces rêves plus fous et farfelus les uns que les autres. Merci de me faire rire et merci d'arriver à me changer les idées. Merci surtout de partager avec moi ton regard sur le monde.

Je voudrais plus généralement remercier toutes mes rencontres bordelaises, de celles éphémères à celles d'une vie, de celles que je n'aurais pas imaginées à celles qui ont toujours été une évidence. J'étais terrifiée à l'idée d'arriver dans une nouvelle ville où je ne connaissais personne, mais grâce à vous, ça a été une magnifique expérience et ça restera un merveilleux souvenir.

Résumé

Titre : ETUDE DES ALTERATIONS DES CYCLES EVEIL/SOMMEIL DANS DES MODELES DE LA MALADIE DE PARKINSON ET DE L'ATROPHIE MULTISYSTEMATISEE

La maladie de Parkinson (MP) et l'atrophie multisystématisée (AMS) sont des synucléinopathies caractérisées par la perte des neurones dopaminergiques (DA) dans la substance noire pars compacta (SNpc) et par la présence d'inclusions cytoplasmiques, appelés corps de Lewy (LB) et inclusions cytoplasmiques gliales (GCI) respectivement et constitués notamment d'alpha-synucléine (α -syn) mal conformée. En plus des troubles moteurs, les patients MP et AMS présentent de nombreux symptômes non-moteurs dont les altérations des cycles éveil/sommeil qui peuvent apparaître de manière précoce et qui sont même considérées comme prédictifs du développement de synucléinopathies. Le but de ma thèse est donc d'étudier le possible lien entre la progression de la neurodégénérescence, la progression de la pathologie liée à l' α -syn et l'apparition d'altérations des cycles éveil/sommeil.

Dans un premier temps, comme la perte des neurones DA est une caractéristique des synucléinopathies nous avons étudié l'impact d'une déplétion en dopamine sur le sommeil. Cette étude tend à montrer que la dopamine aurait un rôle dans la maintenance des phases d'éveil.

Nous avons ensuite utilisé un modèle murin de la MP qui consiste en l'injection intracérébrale de fractions LB contenant de l' α -syn pathologique pour étudier de possibles altérations des cycles éveil/sommeil. Quelques mois après l'injection de ces fractions, plusieurs paramètres du sommeil apparaissent altérés dont le temps total passé éveillé ou endormi. Ce modèle paraît donc adéquat pour l'étude ultérieure de l'impact des altérations du cycle éveil/sommeil sur le développement de la pathologie. En revanche, aucune altération n'est observée dans le modèle AMS étudié, à savoir les souris PLP-syn. D'autres études vont donc être nécessaires sur d'autres modèles de la maladie.

Enfin, comme le sommeil a un rôle connu dans l'élimination protéique, nous avons étudié son impact sur la pathologie liée à l' α -syn.

Le travail réalisé est particulièrement pertinent car comprendre si les altérations des cycles éveil/sommeil peuvent servir au niveau expérimental de marqueur de la progression de la pathologie pourrait permettre une détection précoce et amener à de nouvelles stratégies thérapeutiques pour ralentir sa progression.

Mots-clés : sommeil ; modélisation animale, synucléine, pathologies humaines

Abstract

TITLE : STUDY OF SLEEP/WAKE ALTERATIONS IN MOUSE MODELS OF PARKINSON'S DISEASE ET MULTIPLE SYSTEM ATROPHY

Parkinson's disease (PD) and Multiple System Atrophy are both synucleinopathies. These diseases are characterized by the loss of dopaminergic neurons of the substantia nigra pars compacta (SNpc) and the presence of cytoplasmic inclusions. These inclusions are named Lewy Bodies (LB) in PD and glial cytoplasmic inclusions (GCI) in MSA and contain notably misfolded alpha-synuclein (α -syn). In addition to movement disorders, PD and MSA patients exhibit a myriad of non-motor symptoms including sleep/wake alterations that may occur early in the course of the diseases and that are even considered as predictors of synucleinopathies. The aim of my thesis is thus to investigate the likelihood of a relationship between the progression of neurodegeneration, the progression of the α -syn pathology, and the occurrence of sleep/wake issues.

First, as the loss of DA neurons is a characteristic of synucleinopathies, we studied the impact of dopamine depletion on sleep. This study tends to show that dopamine has a role in the maintenance of arousal phases.

We then used a mouse model of PD which consists of the intracerebral injection of LB fractions containing pathological α -syn to study possible alterations of the wake/sleep cycles. A few months after the injection of these fractions, several sleep parameters appear altered, including the total time spent awake or asleep. This model, therefore, appears adequate for the subsequent study of the impact of alterations in the wake/sleep cycle on the development of the pathology. In contrast, no alteration was observed in the AMS model studied, namely the PLP-syn mice. More studies are therefore needed on other models of the disease.

Finally, since sleep has a known role in protein elimination, we have studied its impact on the pathology associated with α -syn.

The work carried out is particularly relevant because understanding whether alterations in the wake/sleep cycles can be used at the experimental level as a marker of the progression of the pathology could allow early detection and lead to new therapeutic strategies to slow down its progression. This work is of particular relevance as understanding if sleep disorders may serve experimentally as a surrogate marker of neurodegeneration or pathology progression could provide an early way detection and lead to new therapeutic strategies to slow down its progression.

Keywords: sleep; animal modeling; synuclein; human pathology

Liste des publications et communications

Publication

Yu X.^o, **Persillet M.**^o, Zhang L., Zhang Y., Xiuping S., Li X., Ran G., S. Breger L.S., Dovero S., Porras G., Dehay D., Bezard E., Qin C. (2021), Evaluation of blood flow as a route for propagation in experimental Synucleinopathy, *Neurobiology of disease*

Decoeur F., Benmamar-Badel A., Leyrolle Q., **Persillet M.**, Layé S., Nadjar A. (2020) Dietary N-3 PUFA deficiency affects sleep-wake activity in basal condition and in response to an inflammatory challenge in mice, *Brain, Behavior, and Immunity*

Communication affichée

Sleep/wake activity in the Lewy bodies models of Parkinson's disease. **Persillet M.**, Decoeur F., Zhu T., Zhang L., Li X., Dou C.⁵, Xiuping S., Zhang Y., Yu X., Zhou L., Ran G., Breger L. S., Dovero S., Qin C., Porras G., Gross C., Dehay B., Nadjar A., Bézard E. Physiopathology of Parkinson's disease. Paris. January 2020

Sleep/wake activity in the Lewy bodies models of Parkinson's disease. **Persillet M.**, Decoeur F., Zhu T., Zhang L., Li X., Dou C.⁵, Xiuping S., Zhang Y., Yu X., Zhou L., Ran G., Breger L. S., Dovero S., Qin C., Porras G., Gross C., Dehay B., Nadjar A., Bézard E. Annual meeting of the society of neurosciences. Chicago. November 2019

Sleep/wake activity in the Lewy bodies mouse model of Parkinson's disease. **Persillet M.**, Decoeur F., Dovero S., Porras G., Dehay B., Nadjar A., Bézard E. NeuroFrance. Marseille. May 2020

Persillet M., Barresi M., Dutheil N., Fioramonti S., Baufreton J. Functional characterization of the GABAergic arky pallido-striatal pathway. NeuroFrance. Bordeaux. May 2017

Table des matières

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES	12
LISTE DES ABREVIATIONS	14
INTRODUCTION	11
I. SYNUCLEINOPATHIES	12
A. Généralités	12
B. Alpha-synucléine	12
1. Alpha-synucléine physiologique	13
2. Agrégation de l'alpha-synucléine	14
3. Propagation de l'alpha-synucléine	14
C. Etiologie	16
D. Symptômes.....	16
1. Maladie de Parkinson	17
2. Démence à corps de Lewy	18
3. Atrophie multisystématisée	18
E. Anato-pathologie.....	19
1. Maladie de Parkinson	19
2. Démence à corps de Lewy	20
3. Atrophie multisystématisée	20
II. PHYSIOLOGIE DU SOMMEIL.....	20
A. Généralités.....	20
B. Rôles du sommeil	21
C. Phases du cycle éveil/sommeil.....	22
D. Circuits neuronaux impliqués dans la régulation de l'éveil et du sommeil.....	23
1. Éveil	23
2. Sommeil NREM.....	28
3. Sommeil REM	32
III. SOMMEIL PATHOLOGIQUE DANS LES SYNUCLEINOPATHIES.....	34
A. Généralités.....	34
B. Troubles comportementaux du sommeil paradoxal	35
1. Diagnostic	35
2. Causes et mécanismes.....	36
3. Troubles comportementaux du sommeil REM et synucleinopathies	37
C. Architecture des cycles éveil/sommeil : sommeil diurne excessif et insomnie	38
1. Sommeil diurne excessif	38
2. Insomnie	39

3.	Maladie de Parkinson	40
4.	Démence à corps de Lewy	41
5.	Atrophie multisystématisée	41
D.	<i>Troubles respiratoires du sommeil</i>	42
1.	Sommeil et respiration	42
2.	Diagnostic	43
3.	Causes.....	44
4.	Maladie de Parkinson	44
5.	Démence à corps de Lewy	45
6.	Atrophie multisystématisée	45
E.	<i>Syndrome des jambes sans repos</i>	45
1.	Diagnostic	46
2.	Causes.....	46
3.	Maladie de Parkinson	47
4.	Démence à corps de Lewy	47
5.	Atrophie multisystématisée	47
IV.	MODELES ANIMAUX DE SYNUCLEINOPATHIES	47
A.	<i>Différences des cycles éveil/sommeil entre humains et rongeurs</i>	48
B.	<i>Altérations des cycles éveil/sommeil dans les modèles animaux de synucléinopathies</i>	48
	OBJECTIF	61
A.	<i>Objectif</i>	61
B.	<i>Choix des modèles</i>	61
	MATERIELS ET METHODES.....	62
	RESULTATS	68
	PARTIE 1 : VALIDATION DU MODELE LB DE LA MALADIE DE PARKINSON	68
	PARTIE 2 : ROLE DE LA DOPAMINE DANS LE CYCLE EVEIL/SOMMEIL	69
	PARTIE 3 : CYCLE EVEIL/SOMMEIL CHEZ DES MODELES MURINS DE LA MALADIE DE PARKINSON ET DE L'ATROPHIE MULTISYSTEMATISEE.....	74
A.	<i>Modèle murin de la maladie de Parkinson</i>	74
B.	<i>Modèle murin de l'atrophie multisystématisée</i>	83
	PARTIE 4 : IMPACT DU SOMMEIL DANS L'ELIMINATION DE L' α -SYNUCLEINE	90
	DISCUSSION	92
I.	SYNTHESE DES RESULTATS	92
II.	LIMITATIONS	94
	BIBLIOGRAPHIE	96
	ANNEXE.....	123

Liste des tableaux et figures

TABLEAU 1. DIFFERENCE DANS L'ORGANISATION DU CYCLE EVEIL/SOMMEIL CHEZ L'HOMME, LE SINGE ET LA SOURIS

TABLEAU 2. MODELES DE LA MALADIE DE PARKINSON

TABLEAU 3. MODELES DE LA DEMENCE A CORPS DE LEWY

TABLEAU 4. MODELES DE L'ATROPHIE MULTISYSTEMATISEE

TABLEAU 5 : DISTRIBUTION QUANTITATIVE DE DA, 5-HT, ET NA ET DE LEURS METABOLITES DANS LE STRIATUM DES SOURIS AVANT ET APRES INJECTION DE RESERPINE

FIGURE 1. EXEMPLE DE TRACES EEG, EMG ET EOG ENREGISTREES AU COURS DES DIFFERENTES PHASES DU CYCLE EVEIL/SOMMEIL CHEZ L'HOMME

FIGURE 2. ORGANISATION PHYSIOLOGIQUE DU CYCLE EVEIL/SOMMEIL CHEZ L'HOMME

FIGURE 3. DEGENERESCENCE NEURONALE ET SYNUCLEINOPATHIE DANS LE MODELE LB

FIGURE 4. SCHEMA DE SYNTHESE DES CATECHOLAMIES

FIGURE 5. PROTOCOLE EXPERIMENTAL DE RECUPERATION DU CERVEAU POUR ANALYSES DES NEUROTRANSMETTEURS

FIGURE 6. PROTOCOLE EXPERIMENTAL DE L'ENREGISTREMENT DU CYCLE EVEIL/SOMMEIL AVANT ET APRES INJECTION DE RESERPINE

FIGURE 7. CARACTERISTIQUES DE LA PHASE D'EVEIL AVANT ET APRES INJECTION DE RESERPINE

FIGURE 8. CARACTERISTIQUES DE LA PHASE DE SOMMEIL REM AVANT ET APRES INJECTION DE RESERPINE

FIGURE 9. CARACTERISTIQUES DE LA PHASE DE SOMMEIL NREM AVANT ET APRES INJECTION DE RESERPINE

FIGURE 10. PROTOCOLE EXPERIMENTAL DE L'ENREGISTREMENT DU CYCLE EVEIL/SOMMEIL DE 0 A 4 MOIS APRES INJECTION DE LB

FIGURE 11. CARACTERISTIQUES DES PHASES DU CYCLE EVEIL/SOMMEIL DE 0 A 4 MOIS APRES L'INJECTION DE LB

FIGURE 12. PROTOCOLE EXPERIMENTAL DE L'ENREGISTREMENT DU CYCLE EVEIL/SOMMEIL A 4 ET 6 MOIS APRES INJECTION DE LB

FIGURE 13. CARACTERISTIQUES DE LA PHASE D'EVEIL A 4 ET 6 MOIS APRES INJECTION DE LB.

FIGURE 14. CARACTERISTIQUES DE LA PHASE DE SOMMEIL REM A 4 ET 6 MOIS APRES INJECTION DE LB.

FIGURE 15. CARACTERISTIQUES DE LA PHASE DE SOMMEIL NREM A 4 ET 6 MOIS APRES INJECTION DE LB.

FIGURE 16. CARACTERISTIQUES DU SPECTRE DU SIGNAL EEG A 4 ET 6 MOIS APRES INJECTION DE LB

FIGURE 17. MARQUAGE IMMUNOLOGIQUE DES SOURIS LB ET DES SOURIS SUCROSE ET CORRELATION.

FIGURE 18. PROTOCOLE EXPERIMENTAL DE L'ENREGISTREMENT DU CYCLE EVEIL/SOMMEIL DES SOURIS PLP-SYN AGEES DE 6, 8 ET 9 MOIS

FIGURE 19. CARACTERISTIQUES DE LA PHASE D'EVEIL DES SOURIS PLP-SYN AGEES DE 6, 8 ET 9 MOIS.

FIGURE 20. CARACTERISTIQUES DE LA PHASE DE SOMMEIL REM DES SOURIS PLP-SYN AGEES DE 6, 8 ET 9 MOIS.

FIGURE 21. CARACTERISTIQUES DE LA PHASE DE SOMMEIL NREM DES SOURIS PLP-SYN AGEES DE 6, 8 ET 9 MOIS.

FIGURE 22. CARACTERISTIQUES DU SPECTRE DE L'ANALYSE DU SIGNAL EEG A L'AGE DE 8 ET 9 MOIS.

FIGURE 23. MARQUAGE IMMUNOLOGIQUE DES SOURIS PLP-SYN ET DES SOURIS WT.

FIGURE 24. PROTOCOLE EXPERIMENTAL DE L'EXPERIENCE DE MICRODIALYSE ET DE PRIVATION DE SOMMEIL DES SOURIS LB.

FIGURE 25. MARQUAGE IMMUNOLOGIQUE DES SOURIS LB ET DES SOURIS SUCROSE.

FIGURE 26. CONCENTRATION D' α -SYNUCLEINE DANS LES PRELEVEMENTS DE MICRODIALYSE EN FONCTION DU MOMENT DU PRELEVEMENT.

Liste des abréviations

5-HT : sérotonine	PB : noyau parabrachial médial
α -MT : α -méthyltyrosine	PPT/LDT : noyaux pédonculopontins et tegmentaux latéral
α -syn : α -synucléine	PSG : Polysomnographie
AMS : atrophie multisystématisée	PZ : zone parafaciale
ARAS : système d'activation réticulaire ascendant	REM : mouvements oculaires rapides
BF : cerveau antérieur basal	RT : neurones thalamiques réticulaire
DA : dopamine	SDE : sommeil diurne excessif
DAT : protéine transportant la dopamine	SJSR : syndrome des jambes sans repos
DCL : démence à corps de Lewy	SLD : noyau sublatérodorsal
DRN : noyau du raphé dorsal	SNC : système nerveux central
EEG : électroencéphalogramme	SNpc : substance noire pars compacta
EMG : électromyogramme	SPSA : Sommeil paradoxal sans atonie
EOG : électro-oculogramme	SWS : slow wave sleep ou sommeil lent
LB : corps de Lewy	TCSP : troubles comportementaux du sommeil paradoxal
LC : locus coeruleus	TH : tyrosine hydroxylase
LH : hypothalamus latéral	TMN : noyau tubéromammillaire
MnPn : noyau préoptique médian	TRS : trouble respiratoire du sommeil
MP : maladie de Parkinson	VLPO : aire ventrolatérale préoptique
NA : noradrénaline	VTA : aire tegmentale ventrale
NREM : absence de mouvements oculaires rapides	

Introduction

Les trois synucléinopathies majeures sont la maladie de Parkinson (MP), la démence à corps de Lewy (DCL) et l'atrophie multisystématisée (AMS). La MP seule affecte plus de 6 millions de personnes dans le monde¹ et les prévisions atteignent 12 millions d'ici 2042² dû à l'augmentation de la durée de vie, alors que 1,4 million de personnes sont atteintes de la DCL³ et que l'AMS est une maladie orpheline⁴. Une fois le diagnostic établi, la durée de vie est d'environ 7,4 à 14,6 ans en fonction de la maladie⁵⁻⁷. Il paraît donc essentiel de trouver des thérapies qui ne traitent pas seulement les symptômes mais les causes de la maladie.

La MP a une longue histoire depuis qu'elle a été décrite pour la première fois en 1817 par James Parkinson sous le nom de « paralysie agitante »⁸. Des décennies plus tard, Jean Martin Charcot a été le premier à utiliser le terme de maladie de Parkinson pour désigner cette maladie. Charcot a aussi décrit quelques cas qui variaient de la maladie initialement décrite. En 1969, Graham et Oppenheimer regroupent ces variants, appelés dégénérescence nigrostriée, atrophie olicopontocerebelleuse ou syndrome de Shy-Drager, sous le terme d'atrophie multisystématisée comme la dégénérescence est observée dans plusieurs structures cérébrales. En 1912, les corps de Lewy, Lewy bodies en anglais (LB), un marqueur intracellulaire anatomopathologique de la MP ont été décrit par Friedrich Lewy⁹. Les mêmes inclusions sont observées par Okazaki et ses collègues dans le cerveau de patients atteints de démences^{10,11} amenant la première description de la démence à corps de Lewy en 1988¹². La découverte du composant majeur de ces inclusions, l' α -synucléine (α -syn), est plus récente^{13,14}. Cette protéine, qui adopte une mauvaise conformation et qui s'agrège de manière anormale dans la MP, la DCL et l'AMS, donne son nom à cette catégorie de maladies. L'autre caractéristique majeure de ces maladies est la dégénérescence de la voie nigrostriée¹⁵⁻¹⁸.

Les synucléinopathies partagent des symptômes moteurs (bradykinésie, tremblements au repos...) ¹⁹⁻²¹ appelé Parkinsonisme, et des symptômes non-moteurs (dysfonctions autonomiques, altérations du sommeil...) ²²⁻²⁴. Parmi la variété de symptômes, les symptômes non-moteurs sont particulièrement importants compte tenu de leur survenue précoce dans le développement de la maladie, parfois jusqu'à plusieurs décennies avant les symptômes moteurs²⁵. Les altérations du sommeil, un de ces symptômes non-moteurs, est particulièrement intéressant en considérant la découverte du rôle du sommeil dans l'élimination de métabolites et de protéines solubles²⁶. De plus, certaines de ces altérations sont fortement prédictives pour les synucléinopathies. Plus de 80% des patients affectés par des troubles comportementaux du sommeil paradoxal (TCSP) développeront plus

tard des maladies neurodégénératives^{27,28}, dont plus de 90% de synucléinopathies²⁹. Les autres principales altérations du sommeil ont une désorganisation du cycle éveil/sommeil, caractérisée par un sommeil diurne excessif (SDE) et des insomnies, ainsi que des troubles respiratoires du sommeil (TRS) et le syndrome des jambes sans repos (SJSR).

En considérant ces éléments, l'hypothèse selon laquelle les altérations du sommeil sont un mécanisme physiopathologique qui participe au développement de ces maladies est particulièrement pertinente. Le délai entre la survenue de ces altérations et le début des symptômes moteurs, qui traduit d'un état déjà avancé de la maladie, donne une fenêtre importante pour la mise en place de stratégies neuroprotectives, c'est-à-dire avant le début de symptômes visibles ou de symptômes cognitifs. L'étude de ces symptômes dans les synucléinopathies est donc crucial pour mieux comprendre la progression de ces maladies pour mieux la retarder, voire la stopper.

I. Synucléinopathies

A. Généralités

La maladie de Parkinson, la démence à corps de Lewy et l'atrophie multisystématisée appartiennent à la catégorie des synucléinopathies. Ces maladies affectent plus les hommes que les femmes (avec un ratio de 1,5 à 2:1)^{30,31} dans le cas de la MP et de la DCL, et autant les hommes que les femmes pour l'AMS³². Les synucléinopathies sont associées au vieillissement comme l'âge est le principal facteur de risque. L'âge du diagnostic se situe entre 50 et 70 ans. La prévalence augmente de manière logique avec l'augmentation de l'espérance de vie. En moyenne, la durée de vie une fois le diagnostic posé est de 14,6 ans ($\pm 7,7$) pour la MP⁵, 7,4 ans ($\pm 0,7$) pour la DCL⁶ et 8,5 ans ($\pm 4,7$) pour l'AMS⁷.

B. Alpha-synucléine

Les synucléinopathies partagent une caractéristique commune, à savoir des inclusions cytoplasmiques contenant de l' α -synucléine (α -syn), donnant son nom à cette catégorie de maladie^{13,14}. Cette protéine abondante au niveau synaptique est impliquée dans la modulation des vésicules synaptiques et dans la libération des neurotransmetteurs^{33,34} mais via des mécanismes qui restent à élucider. En conditions pathologiques, l' α -syn est malconformée et s'agrège^{35,36} ce qui conduit à la formation d'inclusions qui participent à la mort neuronale¹⁵⁻¹⁷.

1. Alpha-synucléine physiologique

L' α -synucléine a été découverte en 1985 chez la raie électrique³⁷ avant qu'un homologue ne soit découvert chez le rat³⁸ puis chez l'Homme³⁹. Cette protéine a été nommée d'après sa localisation, à la fois au niveau cytoplasmique et nucléaire. Deux autres isoformes de l' α -syn ont été identifiés : la β -synucléine et la γ -synucléine.

L' α -syn est une protéine de 140 acides aminés qui est codée par le gène SNCA chez l'homme. Sa séquence est divisée en 3 grands domaines :

- Le domaine N-terminal (acides aminés 1-60) est un domaine très conservé au niveau phylogénétique. Il est composé de motifs de répétition hexamériques qui forment des hélices α permettant la liaison aux lipides ;
- Le domaine central (acides aminés 61-85) qui contient le domaine NAC (non-A β Component of amyloid plaque). Ce domaine a la capacité de former des structures en feuillets β ⁴⁰ et porte la responsabilité d'agrégation de la protéine.
- Le domaine C-terminal (acides aminés 96-140) contient des sites de modifications post-traductionnelles, et en particulier le site de phosphorylation au niveau de la sérine 129 qui est supposé pathogénique.

La protéine d' α -syn se lie de manière préférentielle aux lipides membranaires via les structures en hélice α du domaine N-ter⁴¹, mais elle peut également être retrouvée sous forme d'un monomère déplié ou d'un tétramère stable^{42,43}. Elle est exprimée dans le système nerveux central et périphérique ainsi que dans des cellules non nerveuses, notamment dans les hématies⁴⁴.

Le rôle physiologique de l' α -syn n'est pas encore complètement élucidé, mais des travaux montrent des rôles très divers au niveau cellulaire. Le premier d'entre eux se rapporte à l'exocytose des neurotransmetteurs via sa localisation au niveau présynaptique où elle interagit avec le complexe SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein REceptor) et les membranes présynaptiques grâce au domaine N-ter. L' α -syn permet l'attachement du complexe SNARE pour faciliter la libération des neurotransmetteurs au niveau de la synapse³³.

L' α -syn montre une homologie fonctionnelle et structurelle avec les protéines chaperonnes⁴⁵, et notamment avec les protéines 14-3-3, ce qui lui permet de jouer un rôle dans l'activation de la protéine Ras et donc d'activer la voie de signalisation ERK/MAPK impliquée dans la différenciation neuronale⁴⁶⁻⁴⁸. Un rôle dans le développement et la maturation des oligodendrocytes a également été suggéré^{49,50}.

L' α -syn est également impliquée dans l'homéostasie cellulaire. Elle module notamment de nombreux processus via l'activation de la calmoduline, une protéine capable de se lier aux ions calcium. La calmoduline intervient dans de nombreuses voies de signalisation en régulant l'activation de kinases

qui vont cibler des récepteurs couplés aux protéines G⁵¹. L' α -syn intervient dans la maintenance des niveaux d'acides gras polyinsaturés, essentiels au bon fonctionnement cérébral, en agissant sur l'enzyme Acetyl-coA qui permet la synthèse de ces derniers^{52,53}. L' α -syn va aussi permettre de réguler les niveaux de glucose en augmentant son assimilation par les tissus, et de moduler la réponse à l'insuline en inhibant sa sécrétion⁵⁴⁻⁵⁷. Cette protéine a par ailleurs un rôle dans la régulation des niveaux de dopamine via la protéine phosphatase 2A qui va inhiber de manière indirecte la tyrosine hydroxylase, enzyme clé de la synthèse de dopamine^{58,59}.

Enfin, l' α -syn a un effet neuroprotecteur notamment vis-à-vis des neurones dopaminergiques d'une part en participant à la suppression des processus apoptotiques en réduisant l'activité de la protéine kinase C⁶⁰, et d'autre part par son action antioxydante sur les membranes lipidiques par la prévention de l'activation des caspases et l'inhibition de la voie de signalisation du stress impliquant la protéine JNK^{61,62}.

2. Agrégation de l'alpha-synucléine

Comme mentionné précédemment, les inclusions cytoplasmiques, dont un composant majoritaire est la protéine d' α -syn, sont une des caractéristiques communes des synucléinopathies. L' α -syn recombinante a montré sa capacité naturelle à s'agréger en solution *in vitro*⁴⁰. Différentes conformations intermédiaires, adoptées à partir de sa forme monomérique, représentent les différentes étapes du phénomène agrégatif⁶³. La première étape de l'agrégation semble être une nucléation, soit une association des monomères par les résidus hydrophobes contenus dans la région centrale de leur séquence, qui permet la formation de dimères, de tétramères puis d'oligomères qui vont eux-mêmes s'assembler sous forme de protofibres qui polymérisent ensuite en fibres. Les fibres constituées de feuillet β sont l'entité thermodynamiquement stable du phénomène agrégatif avec une structure amyloïde. La dynamique d'agrégation de l' α -syn implique aussi des phénomènes de fragmentation des oligomères ou des fibres, et des processus de nucléation secondaire qui entraîne la multiplication du nombre de fibres en solution⁶⁴.

3. Propagation de l'alpha-synucléine

Des études post-mortem de cerveaux de patients parkinsoniens par l'équipe de Braak en 2002 ont suggéré que la pathologie se propageait de manière caudo-rostrale dans différentes structures cérébrales à partir d'une zone située au niveau du noyau dorsal moteur IX et X⁶⁵. Une propagation similaire a été mise en évidence par l'équipe de Jellinger chez des patients atteints de l'AMS⁶⁶. Bien que le pattern soit différent, cette propagation est également retrouvée chez des souris ayant reçues des injections de fibres préformées d' α -syn synthétique dans le striatum. Chez ces souris, on retrouve des inclusions positives pour l' α -syn dans des régions interconnectées à la zone d'injection,

notamment la SNpc, ce qui entraîne une neurodégénérescence d'environ 30% et des altérations motrices⁶⁷. Pour aller plus loin et pour se rapprocher de la pathologie humaine, Recasens et *al.* ont injecté des fractions contenant des inclusions protéiques issus du cerveau de patients parkinsoniens dans la SNpc de souris⁶⁸. On retrouve là aussi une atteinte de structures interconnectées, à savoir le striatum. La même expérience a été réalisée chez le singe avec la SNpc ou le striatum comme site d'injection des inclusions pathologiques d'origine humaine et là encore, une propagation liée à l' α -syn a pu être observée aux régions interconnectées. Concernant le mécanisme de propagation, il reste encore à élucider mais il pourrait s'agir soit d'une transmission directe de cellule à cellule, ou bien indirecte avec l'implication de messagers cellulaires sécrétés et/ou de facteurs de stress exogènes.

D'autre part, une nouvelle stratégie thérapeutique a été mise au point avec pour objectif le remplacement des neurones dégénérés grâce à la greffe de neurones dopaminergiques embryonnaires⁶⁹. Des études post-mortem ont été réalisées chez ces patients décédés entre 9 et 16 ans après avoir été greffé dans le but d'évaluer la survie à long terme des neurones greffés et leur éventuelle atteinte pathologique⁷⁰⁻⁷². Ces études ont mis en évidence une propagation de la pathologie liée à l' α -syn de cellule à cellule. Une autre étude a ensuite montré le transfert de la protéine d'une cellule porteuse de la pathologie à une cellule hôte dans des systèmes *in vitro* et *in vivo*⁷³. Cette équipe a utilisé des co-cultures de cellules de neuroblastomes humains ce qui leur a permis de démontrer que l' α -syn marquée issue des cellules donneuses était retrouvée dans les cellules receveuses. Des études de transplantation de cellules souches chez la souris et le rat ont également montré la présence d'inclusions positives à l' α -syn dans les neurones greffés^{70,73}. L'ensemble de ces résultats étayent l'hypothèse d'une transmission de l' α -syn entre cellules.

Cette transmission a été démontrée entre les neurones^{67,73}, des neurones aux astrocytes^{74,75} et aux oligodendrocytes⁷⁶, et des oligodendrocytes aux astrocytes⁷⁷. Le mode de propagation est encore débattu mais l'absence de séquence d'adressage au réticulum endoplasmique sur la séquence de l' α -syn écarte la voie de sécrétion classique. D'autres voies sont donc envisagées, telles que la formation de nanotube ou la voie exosomale^{78,79}.

Comprendre les mécanismes impliqués dans la transmission de l' α -syn est d'autant plus important que c'est cette protéine qui est certainement responsable de la transmission de l'information pathogénique. L'équipe de Baron a été la première à mettre en évidence cette responsabilité de l' α -syn en injectant des homogénats de cerveaux de souris transgéniques âgées de 12 à 18 mois, portant une mutation de l' α -syn humaine en A53T, à des souris transgéniques issues de la même lignée mais plus jeunes ayant comme effet chez ces dernières une accélération de la pathologie liée à l' α -syn⁸⁰. Une autre étude consistant en l'ajout de fibres préformées synthétiques d' α -syn humaine à des

cultures neuronales a montré l'internalisation de ces fibres par les neurones préalablement à la formation des inclusions cytoplasmiques⁸¹. Enfin, une autre étude réalisée *in vivo* montre la formation d'inclusions positives à l' α -syn murine après injection de fibres préformées synthétiques d' α -syn humaine dans le striatum de souris⁶⁷. Pour se rapprocher au plus de la pathologie humaine, Recasens et *al.* dans leur étude d'injection de fractions contenant des inclusions protéiques issus du cerveau de patients parkinsoniens ont démontré que (i) l' α -syn humaine contenue dans les fractions injectées n'est plus détectable après 24h dans le cerveau murin, (ii) une accumulation cytoplasmique d' α -syn endogène murine est observée dans les neurones dopaminergiques dès 4 mois post-injection, (iii) ce processus n'a pas lieu lorsque les fractions injectées sont préalablement immunodéplétées en α -syn, et (iv) ni lorsque l'injection est réalisée chez des souris transgénique n'exprimant pas l' α -syn murine⁶⁸.

Tous ces résultats attestent d'une transmission de l'information pathogénique contenue dans l' α -syn pathologique à une protéine α -syn naïve dans une cellule nouvellement infectée. Cependant, le mécanisme impliqué dans la transmission de l'information pathogène reste à élucider.

C. Etiologie

Les causes de l'apparition des synucléinopathies sont inconnues mais des facteurs environnementaux ou des événements aléatoires semblent être les raisons les plus probables. En ce qui concerne la MP, l'exposition à des pesticides, la vie rurale, l'utilisation de bêta bloquant, l'activité agricole augmentent le risque de développer la maladie²⁵. Par ailleurs, 10 à 20% des cas sont liés à des facteurs génétiques³¹ parmi lesquels des mutations du gène SNCA codant pour l' α -syn, ou d'autres gènes (PINK1, PARK2, LRRK2, GBA...) ⁸²⁻⁸⁶. Ces mutations peuvent soit mener au développement d'une forme familiale de la maladie ou représenter un facteur de risque lorsqu'elles sont combinées à d'autres facteurs.

En ce qui concerne la DCL, le plus important facteur de risque au niveau génétique concerne APOE^{87,88} et GBA⁸⁹, mais d'autres gènes semblent aussi être impliqués dans cette pathologie (SNCA, LRRK2, PSEN1, APP...) ²¹. Toutefois, la DCL n'est pas considérée comme une maladie génétique comme la majorité des cas est de cause inconnue.

Enfin, bien que des mutations du gène COQ2 ait été décrit dans deux cas familiaux de l'AMS⁹⁰ et que des mutations du gène GBA semble être associées à la maladie⁹¹, les plus grandes études d'association pangénomiques n'ont pas mis en évidence d'association génétique⁹².

D. Symptômes

Les symptômes moteurs altèrent de manière significative la vie quotidienne des patients et permettent généralement de poser le diagnostic. Les traitements disponibles et efficaces de la MP sont purement symptomatiques avec des stratégies de remplacement de la dopamine (lévodopa, agonistes dopaminergiques) et des traitements chirurgicaux (stimulation cérébrale profonde). Aucun traitement spécifique de l'AMS ou de la DCL n'a été mis au point comme les patients répondent généralement peu ou pas aux thérapies de remplacement de la dopamine. Jusqu'à présent, aucun traitement neuroprotecteur n'a été développé de manière satisfaisante bien que de tels traitements soient tout à fait pertinents pour ces maladies étant donné que les symptômes moteurs apparaissent quand une large proportion de neurones a déjà dégénéré.

La majorité des travaux de recherche sur les synucleinopathies a été réalisée dans le but de comprendre et de traiter les symptômes moteurs. Cependant, les patients doivent faire face à un large panel d'autres symptômes appelés symptômes non-moteurs : des dysfonctions autonomiques (avec implication des systèmes cardiovasculaires, urinaires et digestifs)^{93,94}, une hypo/anosmia^{95,96}, des désordres psychiatriques (principalement de l'anxiété et de la dépression)^{92,97,98}, des altérations du sommeil (altérations des cycles éveil/sommeil, troubles respiratoires du sommeil, troubles comportementaux du sommeil paradoxal...) ⁹⁹⁻¹⁰¹, des altérations cognitives, etc. Traiter la totalité du spectre des symptômes non-moteurs est limité à des thérapies symptomatiques mais cela reste important pour améliorer la qualité de vie des patients.

Des analyses *post-mortem* restent nécessaires pour confirmer le diagnostic de ces maladies, mais des différences dans les symptômes moteurs, la réactivité à la dopathérapie, le spectre des symptômes non-moteurs et le délai entre leur apparition et les symptômes moteurs, l'évolution dans le temps ainsi que des données paracliniques aident cependant les cliniciens à différencier les synucléinopathies.

1. Maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est la deuxième maladie neurodégénérative la plus commune et est de loin la plus étudiée des maladies parmi les synucléinopathies. Pour la plupart des patients, la maladie débute autour de 65 ans¹⁰². Entre 5 et 10% des patients développent la maladie de manière précoce, c'est-à-dire entre 21 et 40 ans¹⁰³, et dans certains cas, la survenue des premiers symptômes se fait avant l'âge de 20 ans¹⁰⁴.

La MP est caractérisée par des symptômes moteurs, ou parkinsonisme, défini par une bradykinésie/akinésie, une hypertonie musculaire, une instabilité posturale et des tremblements au repos^{21,89,91}. La bradykinésie, qui correspond à un ralentissement des mouvements, associée à une akinésie, soit une difficulté à initier le mouvement, sont les deux caractéristiques les plus largement rencontrées chez les patients atteints de parkinsonisme. Cela peut engendrer une perte de l'expression

faciale, une diminution du clignement des yeux, et plus tardivement des difficultés à avaler. La rigidité musculaire est caractérisée par une raideur des membres et du tronc, en particulier le cou. L'instabilité posturale apparaît souvent à un stade plus tardif et mène à une augmentation du nombre de chute. Enfin, bien que les tremblements au repos soit le symptôme le plus communément associé à la MP, seulement 60% des patients en sont affectés. Dans la majorité des cas, les tremblements sont asymétriques et apparaissent aux extrémités distales (main, doigt, pied, menton).

Les patients souffrants de la MP présentent aussi des symptômes neuropsychiatriques (dépression, anxiété, hallucinations visuelles), des dysfonctions cognitives (troubles exécutifs, démence), des altérations du sommeil (TCSP, SDE), des dysfonctions autonomiques (hypotension orthostatique, troubles de la vessie, impotence érectile, troubles respiratoires) dysfonctions gastro-intestinales (constipation, dysphagie, nausées) et des symptômes sensoriels (douleur, anosmie)^{23,105}. Parmi ces symptômes non-moteurs, les altérations du sommeil, l'hyposmie et la constipation apparaissent fréquemment avant les symptômes moteurs alors que la dysautonomie survient plus tardivement dans le développement de la maladie.

2. Démence à corps de Lewy

La démence à corps de Lewy est la seconde forme la plus commune de démence après la maladie d'Alzheimer (MA), et il peut même être difficile de différencier ces deux maladies. L'âge moyen du début de la DCL est de 70 ans²¹ et il existe une forme plus précoce avec une survenue avant 65 ans¹⁰⁶. La prévalence est difficile à estimer car les symptômes moteurs peuvent survenir plus tardivement, amenant dans un premier lieu à poser un autre diagnostic pour ces patients.

Cette maladie doit être différenciée de la maladie de Parkinson avec démence dans laquelle la démence survient plus d'un an après le parkinsonisme²¹. A cause d'une possible confusion avec d'autres types de démences, la DCL est souvent sous-diagnostiquée¹⁰⁷. La fluctuation de la déficience cognitive, les hallucinations visuelles récurrentes et un historique familial de TCSP sont les symptômes clés de la DCL et peuvent apparaître de manière précoce dans le développement de la maladie. L'association de ces symptômes et du parkinsonisme est considérée comme suffisante pour diagnostiquer un probable cas de DCL^{21,107}.

3. Atrophie multisystématisée

L'atrophie multisystématisée est une maladie orpheline qui débute généralement après 50 ans¹⁰⁸. Comparée à d'autres synucléinopathies, l'évolution de l'AMS est plus rapide et la réponse aux traitements administrés aux patients parkinsoniens, principalement la lévodopa, est faible¹⁰⁹.

Selon les symptômes prédominants et la région la plus affectée, l'AMS est divisée en deux sous-catégories : l'AMS-P présentant principalement un parkinsonisme et des lésions dans la région du mésencéphale, et l'AMS-C qui présente majoritairement une ataxie cérébelleuse et des lésions du cervelet. Les patients affectés par l'AMS présentent aussi des symptômes non-moteurs similaires à ceux de la MP mais à un degré plus important. Les dysfonctions autonomiques sont le critère clé de l'AMS, ils surviennent de manière précoce dans le développement de la maladie et sont beaucoup plus sévère que dans le cas de la MP.

E. Anatomicopathologie

Comme mentionné précédemment, les synucléinopathies partagent une caractéristique anatomicopathologique commune, à savoir des inclusions cytoplasmiques dont la présence est liée à la mort neuronale, particulièrement celle des neurones dopaminergiques localisés dans la substance noire *pars compacta* (SNpc)¹⁵⁻¹⁷. Cette neurodégénérescence, qui représente la seconde caractéristique commune aux synucléinopathies, est visible par une perte de la pigmentation noire caractéristique de cette région à cause de la neuromélanine contenue dans le cytoplasme des neurones¹¹⁰. La SNpc envoie des projections dans le striatum qui est impliqué dans le contrôle du mouvement, ce qui explique que la dégénérescence de cette structure engendre un parkinsonisme. Au-delà du système dopaminergique, d'autres systèmes de neuromodulateurs sont impactés, tels que les systèmes noradrénergiques et sérotoninergiques.

1. Maladie de Parkinson

Chez les patients parkinsoniens, les inclusions contenant l' α -syn sont appelés corps de Lewy, Lewy bodies en anglais (LB), lorsqu'elles sont localisées dans le cytoplasme des neurones, et neurites de Lewy lorsqu'elles sont dans les extensions neuronales¹³.

En 2002, l'équipe de Braak a décrit la progression des régions affectées par la MP en se basant sur la présence des LB⁶⁵. Selon cette hypothèse, six stades sont définis :

- Les stades 1 et 2 correspondent au stade pré-symptomatique avec des LB localisés dans le bulbe rachidien (les noyaux dorsaux moteur du nerf glosso-pharyngien et du nerf pneumogastrique) et dans l'aire tegmentale (noyau raphé et locus coeruleus) respectivement ;

- Les stades 3 et 4 correspondent au moment où la plupart des patients développent des symptômes moteurs, les LB sont alors localisés dans l'aire mésencéphalique (SNpc) et les aires corticales primaires (cortex temporal) respectivement ;

- Les stades 5 et 6 traduisent un état avancé de la maladie avec des LB dans le néocortex et le cortex préfrontal au stade 5, et dans les aires sensorimotrices au stade 6.

Cette hypothèse reste controversée étant donné qu'elle ne prend pas en compte la dégénérescence des régions affectées.

2. Démence à corps de Lewy

La DCL, de même que la MP, est caractérisée par la présence de LB et de neurites de Lewy, et de même que la MA, par la présence de plaques d'amyloïdes dans le cortex¹¹¹, ainsi qu'une réduction du cortex frontal et du cortex temporal ce qui explique le déficit cognitif. Néanmoins, les patients souffrant de la DCL peuvent être distingués des patients souffrant de la MA par une certaine préservation de l'hippocampe et du lobe temporal médial¹¹².

3. Atrophie multisystématisée

Comme mentionné précédemment, les patients AMS présentent une dégénérescence de la voie nigrostriée, des neurones de la SNpc et/ou du système olivopontocerebelleux, ainsi qu'une atrophie cortical dans les lobes frontaux¹¹³. Contrairement à la MP ou la DCL où les filaments d' α -syn sont principalement dans les neurones, les inclusions sont principalement situées dans le cytoplasme des cellules oligodendrogiales (ICG)¹¹⁶ mais elles peuvent également être trouvées dans le noyau des cellules gliales, dans le cytoplasme et le noyau des neurones. Néanmoins, les ICG représentent le marqueur biologique de l'AMS¹¹⁷.

Puisque rien ne permet actuellement de retarder, de stopper ou *a minima* de ralentir la progression des synucléinopathies, l'étude des symptômes non-moteurs, et en particulier les altérations du sommeil, apparaît essentielle comme ces dernières peuvent survenir jusqu'à plusieurs décennies avant les symptômes moteurs.

II. Physiologie du sommeil

A. Généralités

Le sommeil est défini comme un «*état comportemental réversible de désengagement perceptif et de non-réponse à l'environnement*» qui est déclenché par un «*amalgame de processus physiologiques et comportementaux*»¹¹⁴. L'organisation, ou architecture, du sommeil chez l'Homme est basée sur la succession de quatre à six cycles de sommeil d'environ 90 minutes sur 8 heures. Chaque cycle comprend le sommeil paradoxal, ou sommeil REM pour Rapid Eye Movement, et le sommeil non-REM (NREM), lui-même divisé en stade 1 (N1) qui correspond à l'endormissement, stade 2 (N2) appelé sommeil léger, et stade 3 (N3) appelé sommeil profond. Dans un cycle de sommeil normal, le sommeil

NREM est prédominant durant les premières heures suivant l'endormissement, tandis que le temps passé en sommeil paradoxal augmente avec le temps.

B. Rôles du sommeil

Bien que le rôle du sommeil soit encore l'objet d'intenses recherches, il est connu pour être impliqué dans de nombreux processus, notamment l'apprentissage et la consolidation de la mémoire¹¹⁵⁻¹¹⁷, les économies d'énergie^{118,119}, la libération d'hormones (e.g. augmentation de la libération de facteurs de croissance, inhibition de la libération de cortisol)^{120,121}. De plus, le sommeil et le système immunitaire exercent une forte régulation l'un sur l'autre, le sommeil ayant un rôle spécifique dans la formation de la mémoire immunologique^{122,123}, et l'inflammation induisant une diminution de la qualité du sommeil, de la fatigue et une somnolence diurne excessive¹²⁴.

Outre toutes ces fonctions, un nouveau rôle du sommeil a été récemment mis en évidence. En utilisant l'imagerie à deux photons, Xie et al. ont montré que durant le sommeil, la fraction volumique du liquide interstitiel (ISF) augmentait de plus de 60%²⁶. Ils ont également montré que le ¹²⁵-A β ₁₋₄₀ radiomarqué, ou l'inuline ¹⁴C, un traceur inerte, injectés dans le cortex des souris étaient éliminés beaucoup plus rapidement de l'ISF (par plus de deux fois) pendant le sommeil. Les mêmes résultats ont été obtenus avec des souris anesthésiées avec un mélange de kétamine/xylazine (KX). Ces résultats sont en faveur du système glymphatique récemment découvert¹²⁵. Ce système permet une élimination efficace des protéines solubles et des métabolites du système nerveux central et participe à la distribution des composés (glucose, lipides, acides aminés et neurotransmetteurs) dans tout le cerveau à l'aide de canaux périvasculaires formés par les astrocytes conduisant à des échanges entre le LCR et l'ISF¹²⁶. Ce système glymphatique est plus efficace pendant le sommeil comparé à l'éveil. Certaines preuves suggèrent que l'activité glymphatique pourrait être régulée par la noradrénaline, un neurotransmetteur favorisant l'éveil, car l'application d'antagonistes des récepteurs de la noradrénaline chez des souris éveillées augmente l'espace interstitiel permettant les échanges CSF-ISF^{26,126}. Inversement, l'application de noradrénaline diminue la fraction volumique interstitielle entraînant la suppression des flux glymphatiques¹²⁶. Bien que de nouvelles études remettent en question les mécanismes exacts impliqués dans ce système^{127,128}, le sommeil semble jouer un rôle dans la clairance des métabolites. Ce rôle est étayé par l'observation de l'augmentation de la charge de A β chez les sujets sains après seulement une nuit de privation de sommeil¹²⁹ et par la privation de sommeil chronique dans les modèles de la maladie d'Alzheimer qui entraîne une augmentation de l'accumulation de A β ^{130,131}. Une étude récente de grande cohorte rapporte une augmentation de la mortalité chez les infirmières travaillant de nuit et de soir, y compris suite au développement de la

maladie d'Alzheimer¹³². Cependant, une autre étude montre que le travail de nuit ne semble pas être associé au développement de la MP¹³³.

C. Phases du cycle éveil/sommeil

Le cycle éveil/sommeil peut être divisé en plusieurs phases (éveil, sommeil NREM (N1, N2, N3) et sommeil REM) en fonction de l'activité corticale, de l'activité oculomotrice et de l'activité musculaire. La détermination des phases du cycle est permise par l'analyse de ces différentes variables physiologiques enregistrées lors de l'examen polysomnographique (PSG) : électroencéphalographie (EEG), électro-oculographie (EOG) et électromyographie (EMG) (Fig. 1). En effet, chaque étape a sa signature.

Pour le stade 1 du sommeil NREM, l'activité EEG dominante, reflétant l'activité corticale, se situe dans la gamme 4-7 Hz, correspondant aux ondes thêta (4-9 Hz). Le stade N2 comprend également des ondes thêta mais avec deux caractéristiques distinctives¹³⁴ : des complexes K, de brefs pics de forte amplitude, et des fuseaux, de brefs sursauts d'ondes plus rapides (12-14 Hz) inclus dans les oscillations de la gamme bêta inférieure (12 à 30 Hz). Le stade N3 est caractérisé par des oscillations delta (1-4 Hz) sur l'EEG et des oscillations lentes (<1 Hz) et est ainsi appelé sommeil lent (SWS). L'amplitude du signal EEG, qui donne la synchronisation neuronale, est à son niveau le plus élevé pendant cette étape. Inversement, le signal EEG est désynchronisé pendant la phase d'éveil et le sommeil paradoxal. Le sommeil REM est même appelé sommeil paradoxal car, d'après les enregistrements, il ressemble plus à une phase d'éveil qu'aux autres phases de sommeil. Le sommeil paradoxal est associé au rythme de la gamme thêta et aux rythmes du stade d'éveil avec des oscillations alpha (9-12 Hz), bêta (12-30 Hz) et gamma (> 30 Hz).

En sommeil paradoxal, l'activité EOG traduisant l'activité des muscles oculaires est également plus proche de celle enregistrée pendant la phase de d'éveil que de celle du sommeil. Le sommeil REM tire d'ailleurs son nom des mouvements oculaires rapides enregistrés à ce stade qui ne sont pas observés pendant le sommeil NREM.

Enfin, le signal EMG est enregistré au niveau des muscles squelettiques antigravitaires (généralement les muscles du menton ou du cou) qui sont sous contrôle volontaire. À mesure que l'état de sommeil NREM s'approfondit, l'activité musculaire diminue par rapport à la phase d'éveil. Cette diminution atteint son maximum pendant le sommeil paradoxal, une phase de sommeil caractérisée par une perte totale d'activité musculaire (atonie).

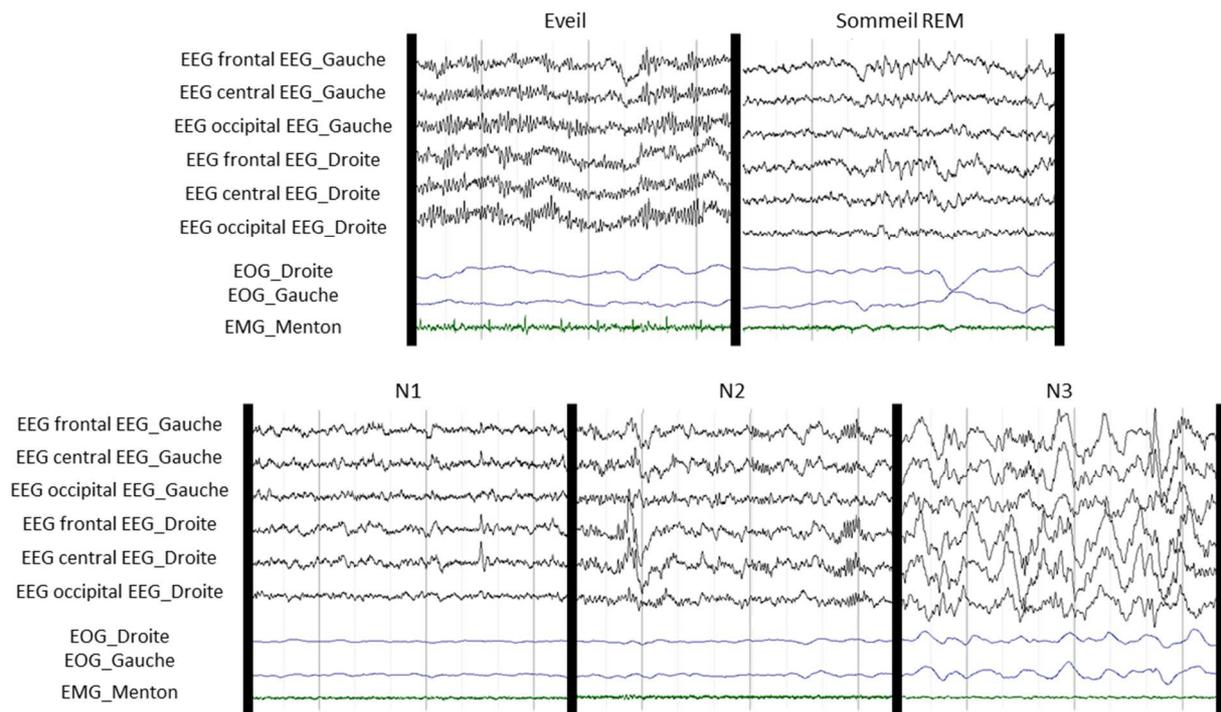


FIGURE 1. EXEMPLE DE TRACES EEG, EMG ET EOG ENREGISTREES AU COURS DES DIFFERENTES PHASES DU CYCLE EVEIL/SOMMEIL CHEZ L'HOMME

EEG : électroencéphalogramme ; EMG : électromyogramme ; EOG : électro-oculogramme ; N1 : stade 1 du sommeil NREM ; N2 : stade 2 du sommeil NREM ; N3 : stade 3 du sommeil NREM

D. Circuits neuronaux impliqués dans la régulation de l'éveil et du sommeil

Alors que le sommeil apparaît comme un comportement simple, la régulation des phases d'éveil et de sommeil, tant l'initiation que le maintien, impliquent de nombreuses structures localisées principalement dans le tronc cérébral et le cerveau antérieur.

1. Eveil

Le système d'activation réticulaire ascendant (ARAS) favorisant l'éveil a été découvert par le laboratoire d'Horace Magoun¹³⁵ et comprend de nombreuses structures: les neurones sérotoninergiques du noyau du raphé dorsal (DRN), les neurones noradrénergiques du locus coeruleus (LC), les neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale (VTA), les neurones cholinergiques des noyaux pédonculopontins et tegmentaux latérodorsal (PPT/LDT), et les neurones glutamatergiques du noyau parabrachial médial (PB)¹³⁶. En plus de l'ARAS, d'autres structures sont impliquées dans l'éveil, notamment les neurones cholinergiques dans le cerveau antérieur basal (BF), les neurones histaminergiques dans le noyau tubéromammillaire (TMN) et les neurones GABAergiques et orexinergiques dans l'hypothalamus latéral (LH)^{137,138}.

Le noyau du raphé dorsal dans le mésencéphale et le pont cérébral contient la plus grande quantité de neurones sérotoninergiques (5-HT)¹³⁹ et représente l'une des principales sources d'innervation sérotoninergique dans le cerveau antérieur¹⁴⁰. Ces neurones reçoivent des apports de diverses régions, notamment le cortex, le thalamus, l'aire préoptique ventrolatérale (VLPO) et le LH¹⁴¹. Leur rôle dans la régulation du cycle éveil/sommeil a été présumé car une forte diminution d'5-HT conduit à l'insomnie chez les chats et les rongeurs^{142,143} suggérant que les neurones DRN permettent l'initiation du sommeil, mais de nouvelles preuves montrent que l'insomnie induite par la diminution d'5-HT ne se produit pas dans un environnement chaud¹⁴⁴ comme les neurones du DRN sont également impliqués dans les mécanismes de thermorégulation¹⁴⁵. D'autres expériences ont mis en évidence que la 5-HT favorise l'excitation. En effet, les enregistrements électriques montrent que les neurones 5-HT dans les noyaux du raphé déchargent au maximum pendant l'éveil chez les chats^{146,147}, la stimulation optogénétique des neurones 5-HT dans le DRN entraîne une augmentation par deux du temps passé éveillé chez la souris¹⁴⁸, les agonistes des récepteurs 5-HT augmentent le temps passé en éveil^{149,150} et les antagonistes le diminuent chez les rats^{151,152}.

Le locus coeruleus (LC) est la principale source de noradrénaline (NA) dans le cerveau. Cette structure située dans le pont envoie des projections dans tout le système nerveux central (SNC), y compris aux structures impliquées dans la régulation éveil/sommeil comme le cortex^{107,153}, le BF^{136,154}, le thalamus^{145,155}, le VLPO^{156,157}, le LH^{158,159}, le DRN^{160,161} et le PPT/LDT^{162,163}, et reçoit des afférences des systèmes d'excitation, du tronc cérébral et du cortex préfrontal¹⁶⁴. Le LC est donc un système de diffusion qui participe largement à favoriser l'éveil. En effet, des études pharmacologiques montrent que les antagonistes de la noradrénaline (NA) (récepteurs $\alpha 1$ et β) et la libération réduite de NA (en utilisant des agonistes des récepteurs $\alpha 2$) diminuent l'activation corticale^{165,166}. Les enregistrements électrophysiologiques montrent que l'activité des neurones NA du LC est très élevée pendant l'éveil actif, élevée pendant l'éveil calme, plus faible pendant le SWS et presque absente pendant le sommeil paradoxal^{167,168}, et des expériences optogénétiques démontrent que l'inhibition de la LC pendant la phase active conduit à une réduction de la durée des épisodes d'éveil, et une augmentation du nombre de transitions éveil/SWS¹⁶⁹. A l'inverse, la photoactivation des neurones du LC conduit à une transition immédiate du sommeil (SWS ou sommeil paradoxal) au stade d'éveil¹⁶⁹. De plus, l'activité des neurones noradrénergiques est particulièrement importante dans les réponses environnementales (stress, nouveaux stimuli ou stimuli indiquant une récompense ou une menace)¹⁷⁰⁻¹⁷². Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent fortement que les neurones du LC sont le support principal de l'éveil nécessitant une vigilance soutenue^{167,170}.

Le rôle de la transmission dopaminergique dans la régulation du cycle éveil/sommeil est mis en évidence par le puissant effet des médicaments augmentant la transmission dopaminergique (e.g. les

amphétamines, le modafinil, la vanoxérine) qui favorisent fortement l'éveil^{173,174}. Un résultat similaire est observé chez les souris knock-out pour le transporteur de la dopamine (DAT)¹⁷⁴. Inversement, chez ces souris, l'effet des médicaments favorisant l'éveil est aboli¹⁷⁴. Par ailleurs, une diminution du temps passé éveillé est observée chez les souris KO du récepteur de la dopamine D2 (D2R)¹⁷⁵, et l'éveil suite à l'administration de modafinil est empêchée lorsque ces souris sont prétraitées avec l'antagoniste du récepteur D1 (D1R)¹⁷⁶. Enfin, les antagonistes des récepteurs à la dopamine (DA) (e.g. les antipsychotiques) induisent une sédation¹⁷⁷. De nombreuses régions cérébrales produisent de la DA, mais l'aire tegmentale ventrale (VTA) et la substance noire (SN) dans le mésencéphale sont les deux principales zones dopaminergiques. Bien que les activités de décharge des neurones VTA et SN ne changent pas de manière significative au cours du cycle éveil/sommeil^{178,179}, une augmentation du niveau de dopamine est enregistrée dans leurs champs terminaux (noyau accumbens (NAc), cortex préfrontal et striatum) pendant l'éveil par rapport au sommeil^{180,181}. Cela est probablement dû à des changements d'activité de la DAT car cette variation ne se produit plus chez les souris DAT KO¹⁸². Le rôle de la VTA dans la régulation éveil/sommeil est démontré par l'inhibition chimio génétique des neurones dopaminergiques de la VTA qui conduit à une diminution de la phase d'éveil, en particulier dans des conditions de forte motivation (e.g. proposition alimentaire, compagnon potentiel)¹⁸³. De plus, la stimulation optogénétique de ces neurones ou de leurs terminaisons (NAc et amygdale) pendant le SWS induit l'éveil presque immédiatement¹⁸³. Les neurones dopaminergiques de la VTA favoriseraient ainsi l'éveil notamment dans un contexte de forte motivation. Par ailleurs, Lu et al. ont constaté qu'un petit assemblage de neurones DA localisés dans la substance grise périaqueducal ventral (vPAG) exprimait le c-Fos pendant les phases d'éveil et que les lésions induites par la 6-hydroxydopamine (6-OHDA) entraînaient une diminution de la durée totale de la phase d'éveil¹⁸⁴. D'autres études sont encore nécessaires pour identifier dans quelles conditions ces neurones sont impliqués pour favoriser l'éveil. Par ailleurs, le système dopaminergique semble également favoriser le sommeil. En effet, une récente étude montre qu'une lésion sélective des neurones dopaminergiques de la SN et de leurs terminaisons dans le striatum conduit à une augmentation de la durée totale de l'éveil et à une diminution de la durée totale du sommeil NREM¹⁸⁵. Dans l'ensemble, ces résultats impliquent que la dopamine pourrait jouer des rôles opposés dans la régulation éveil/sommeil en fonction des régions et des voies impliquées.

Le noyau tubéromammillaire (TMN) situé dans l'hypothalamus postérieur est la seule source d'histamine (HA) dans le cerveau^{186,187}, et certains d'entre eux colibèrent du GABA^{188,189}. Les neurones du TMN innervent le cortex, le DRN, le LC, le VLPO et d'autres structures favorisant l'éveil¹⁹⁰⁻¹⁹². L'effet des neurones HA du TMN pour favoriser l'éveil est tout d'abord suggéré par les antihistaminiques bien connus pour induire somnolence et sédation¹⁹³. En outre, les neurones du TMN déchargent au

maximum pendant l'éveil actif et sont silencieux pendant le sommeil¹⁹⁴, et le niveau d'histamine est augmenté pendant la période d'éveil et est positivement corrélé avec le temps passé éveillé¹⁹⁵. De plus, les souris KO pour le gène de l'histidine décarboxylase, codant pour l'enzyme responsable de la synthèse de l'histamine, les souris dépourvues du récepteur H1 (récepteur de l'histamine), ou les souris injectées avec un antagoniste du récepteur H3 sont moins éveillées au début de la phase d'éveil¹⁹⁶ et ont latence réduite pour s'endormir en réponse à un nouvel environnement^{197,198}. L'effet des neurones HA du TMN sur l'éveil est également mis en évidence par l'extinction optogénétique de ces neurones pendant l'éveil, plus précisément à la fin de la phase inactive, qui induit le SWS, bien que le besoin de sommeil à ce moment soit relativement faible. Enfin, la stimulation optogénétique des axones du TMN induit l'inhibition des neurones VLPO qui favorisent largement le sommeil, par la libération de GABA, et suppriment l'entrée inhibitrice du GABA vers le TMN via les autorécepteurs H3¹⁹⁹.

Les noyaux pédonculopontins et tegmentaux latérodorsal (PPT/LDT), situés à la jonction du mésencéphale et du pont, sont des amas de neurones cholinergiques (ACh)^{200,201} qui contiennent également des neurones glutamatergiques et GABAergiques^{202,203}. Les neurones du PPT/LDT reçoivent l'innervation de nombreuses structures favorisant l'éveil comme le BF, le cortex, la LH et le PAG, le DRN^{204,205}, et envoient des projections notamment vers le VTA, la LH, le BF, le cortex et le thalamus²⁰⁶⁻²⁰⁹. La stimulation électrique de la région cholinergique du PPT entraîne un réveil rapide chez les chats endormis et anesthésiés en raison de la suppression des oscillations lentes (< 6 Hz) et de l'amélioration des ondes plus rapides (20-35 Hz)^{210,211}. De plus, après l'activation chimiogénétique des neurones ACh du PPT, les souris passent moins de temps en SWS, et l'amplitude des oscillations de la gamme delta, qui sont caractéristiques du SWS, est réduite, se traduisant par une diminution de la synchronisation corticale²¹². En effet, sans apport thalamique, les neurones corticaux ont une activité synchronisée. De plus, l'acétylcholine favorise l'éveil par l'excitation des noyaux thalamiques intralaminaires et l'inhibition du noyau réticulaire inhibiteur du thalamus, les deux conduisant à une activation corticale. Bien que la manière dont les neurones du PPT induisent l'éveil reste à élucider, les noyaux ACh du pont et leurs projections thalamiques²¹³ pourraient agir en utilisant cette voie²¹⁴. De plus, les neurones PPT glutamatergiques semblent participer à l'effet de promotion de l'éveil car leur activation chimiogénétique conduit à une activation corticale prolongée, et mène principalement à un éveil calme, et inversement, l'inhibition chimiogénétique augmente le temps passé en SWS au détriment du temps passé éveillé²¹².

Le cerveau antérieur basal, une région située à l'avant et au-dessous du striatum, contient des neurones produisant de l'acétylcholine, largement impliqués dans la régulation de l'éveil comme vu ci-dessus, mais aussi du GABA et du glutamate^{215,216}. Ces différentes populations envoient des projections au cortex et entre elles via des réseaux locaux^{154,217}, et dans son ensemble, le BF semble favoriser l'éveil

car la stimulation de cette région améliore l'éveil, et la lésion réduit les oscillations lentes de l'EEG et conduit même à un état de coma avec suppression des ondes EEG lentes²¹⁸⁻²²⁰. Les neurones ACh du BF déchargent davantage aux stades de rythmes corticaux rapides, c'est-à-dire aux stades d'éveil et de sommeil paradoxal, par rapport au stade de sommeil NREM^{160,221}. Ces neurones agissent sur l'activation corticale mais leur rôle dans l'initiation des phases d'éveil n'est pas clairement établi. En effet, les lésions sélectives ou l'inhibition chimiogénétique et optogénétique augmentent les oscillations lentes de l'EEG, diminuent le nombre de réveil du sommeil NREM et induisent un SWS prolongé^{222,223}. L'activation chimiogénétique ou optique des neurones ACh du BF suppriment l'activité delta du signal EEG, mais alors que la première technique déstabilise le sommeil NREM pendant quelques heures sans effet majeur sur la quantité d'éveil^{197,222}, la seconde mène les souris à se réveiller du sommeil NREM et augmente la durée de la période d'éveil^{221,224}. Ces différences concernant les résultats peuvent être dues aux techniques utilisées, à la signalisation intracellulaire et aux caractéristiques électrophysiologiques des neurones ciblés, ou au nombre et à la localisation des neurones activés²²⁵. Les neurones GABAergiques améliorent l'activation corticale notamment par leur projection sur les interneurones corticaux^{226,227}. L'activation chimiogénétique des neurones GABA du BF favorise l'EEG cortical dans la bande gamma et augmente le temps passé éveillé, tandis que l'inhibition chimiogénétique induit une augmentation de la puissance des ondes lentes et une augmentation transitoire du sommeil NREM¹⁹⁷. De plus, les neurones GABAergiques du BF sont connus pour être fonctionnellement hétérogènes²²⁸ et les sous-populations, en fonction des marqueurs exprimés²²¹, n'ont pas la même fonction sur la régulation éveil/sommeil. En effet, la photostimulation des neurones GABA exprimant la parvalbumine favorise fortement le réveil et l'activité corticale rapide, tandis que la photostimulation de ceux exprimant la somatostatine induit une légère augmentation du sommeil NREM^{221,229}. D'autres expériences sont encore nécessaires pour étudier le rôle spécifique des différentes populations GABAergiques de neurones dans le BF. Enfin, les neurones glutamatergiques du BF semblent également favoriser le stade d'éveil car la stimulation optogénétique réveille immédiatement les souris du sommeil NREM, ce qui suggère qu'ils jouent un rôle majeur dans l'initiation de l'éveil²²¹. Cependant, l'activation chimiogénétique réduit les ondes corticales lentes (delta) et rapides (bêta) pendant le sommeil NREM, et aucun effet sur le temps passé en phase d'éveil ou de sommeil n'est observé¹⁹⁷. Comme pour les neurones cholinergiques du BF, les différences peuvent provenir des méthodes utilisées.

Le noyau parabrachial (PB) dans le pont envoie principalement des projections ascendantes glutamatergiques vers le cortex, le thalamus, la LH, le DRN, le VLPO^{156,230,231} et représente un apport glutamatergique substantiel au BF²²⁰. Le PB envoie également des projections descendantes vers la région médullaire à travers laquelle il régule la respiration^{232,233}. Combinée à son rôle de relais des

informations chimiosensorielles du CO₂²³⁴⁻²³⁸, la signalisation glutamatergique des neurones du PB semble essentielle pour sortir du sommeil avec une respiration insuffisante²³⁹⁻²⁴². Au-delà du contexte des troubles respiratoires, l'implication des neurones du PB apparaît essentielle pour réguler l'éveil car une blessure dans la région du PB conduit à un coma ou à un état végétatif chez l'homme comme chez les rongeurs^{220,243,244}. En effet, une lésion spécifique au niveau du complexe parabrachial-précoeruleus chez le rat induit une insensibilité comportementale, avec une amplitude maximale du signal EEG majoritairement dans la gamme de fréquence inférieure à 1 Hz, et une faible expression corticale c-Fos après une manipulation douce des rongeurs²²⁰. A l'inverse, la stimulation chimiogénétique des neurones du PB pendant la phase inactive entraîne une longue phase d'éveil²⁴⁵. En tant que plaque tournante pour relayer les informations sensorielles²⁴⁶, les neurones du PB pourrait favoriser l'éveil en réponse à divers stimuli intéroceptifs, en particulier à travers des projections efférentes sur le BF.

L'hypothalamus latéral (LH) est une structure hétérogène qui contient des neurones orexine-A et -B (ou hypocréatine-1 et -2), un type de cellule clé favorisant l'éveil²⁴⁷ et permettant surtout le maintien de longues périodes d'état d'éveil. Le rôle de ces neurones est mis en évidence car leur absence est un marqueur de narcolepsie avec cataplexie, un trouble du sommeil caractérisé par une somnolence diurne excessive chronique avec une perte soudaine de tonus musculaire lors de l'éveil²⁴⁸. Des effets similaires sont observés chez les souris orexine KO qui présentent des épisodes plus courts d'état d'éveil pendant leur période active avec un arrêt soudain et brusque de l'activité motrice se terminant par une reprise complète des mouvements²⁴⁹. De plus, l'injection intracérébroventriculaire d'orexine-A augmente le temps d'éveil total²⁵⁰, l'activation optogénétique des neurones orexine chez les souris endormies diminue considérablement la latence de la transition à l'éveil²⁵¹, et l'activation chimiogénétique de ces neurones augmente le temps passé éveillé, en particulier pendant la période d'inactivité²⁵². En plus de maintenir l'éveil dans des conditions calmes, la signalisation orexinergique joue également un rôle dans le maintien de l'éveil en réponse au stress, aux défis homéostatiques ou lors de la recherche de récompenses^{253,254}. Par exemple, la privation de nourriture qui augmente largement l'éveil chez les souris dite sauvage n'a que peu d'effets chez les souris dépourvues de neurones orexinergiques¹⁵⁹.

2. Sommeil NREM

Contrairement aux structures qui sont impliquées dans la régulation de la phase d'éveil et qui présentent une grande redondance, seules quelques structures ont été identifiées comme étant actives durant le sommeil.

En 1917, le neuropathologiste Von Economo décrit l'encéphalite léthargique, aussi connu sous le nom de maladie de Von Economo-Cruchet, comme « *une sorte de maladie du sommeil, les premiers*

symptômes étant des maux de tête et des nausées, puis un état de somnolence, souvent accompagné de délires »²⁵⁵. Il identifie chez ces patients des lésions inflammatoires dans l'hypothalamus antérieure qui induisent une insomnie et émet donc l'hypothèse que cette région ait un rôle majeur dans l'initiation du sommeil²⁵⁵. Cette région est plus tard plus précisément localisée dans les aires préoptiques ventrolatérale (VLPO) et médiane (MnP). L'hypothèse de Von Economo a ensuite été confirmée par des études chez le singe, le chat et le rat chez lesquels des lésions de l'aire préoptique induisent de manière systématique une insomnie profonde et persistante²⁵⁶⁻²⁵⁸. Ces résultats montrent que la stimulation électrique de l'aire préoptique entraîne une activité corticale à ondes lentes de l'EEG et le sommeil (SWS)¹³⁷. Les neurones du VLPO et du MnPn, neurones GABAergiques, sont activés pendant le sommeil de récupération ou la sédation induite par le récepteur α 2-adrénergique (A2R), et leur réactivation sélective induit le SWS²⁵⁹. Durant le sommeil, l'expression de c-fos dans les neurones est répartie dans l'aire préoptique, et plus densément dans le VLPO et le MnPn GABA. Le nombre de neurones c-fos dans ces régions est positivement corrélé avec la quantité de sommeil et la consolidation du sommeil au cours de la dernière heure précédant le sacrifice²⁶⁰. Des expériences réalisées avec des rats privés de sommeil montrent que les neurones GABAergiques du MnPn sont plus fortement activés en réponse à une augmentation de la pression de sommeil (i.e. le besoin de dormir), et que les neurones GABAergiques du VLPO sont plus fortement activés durant le sommeil de récupération^{261,262}. D'autres expériences de stimulation électriques chez des rats ont montré que les neurones enregistrés dans ces deux structures étaient actifs avant et après le début du SWS, et que leur fréquence de décharge était positivement corrélé avec la profondeur et la durée du sommeil²⁶³. Certains de ces neurones sont également actifs pendant le sommeil paradoxal avec une fréquence de décharge plus élevée que pendant le SWS précédent. Ces résultats suggèrent que les neurones du VLPO et du MnPn participent à l'induction et à la stabilité du SWS. Par ailleurs, il a été démontré que le VLPO et le noyau suprachiasmatique (SCN), structure située dans l'hypothalamus responsable du contrôle des rythmes circadiens, avaient des activités synchronisées²⁶⁴. Ces deux régions sont interconnectées et reçoivent toutes les deux des projections des cellules ganglionnaires rétinienne, il est donc possible que des informations circadiennes puissent être transmises au VLPO pour moduler son activité^{156,265-267}.

Par ailleurs, la transition de l'éveil au sommeil semble résulter de l'inhibition soutenue et coordonnée des systèmes d'excitation de l'ARAS par les centres hypnogènes. Des études permettant d'identifier les voies rétrogrades et antérogrades des neurones du VLPO et du MnPn montrent qu'ils sont réciproquement liés à des neurones actifs pendant l'éveil (neurones HA du TMN, neurones orexinergiques du LH, neurones 5-HT du DRN, neurones NA du LC, neurones ACh du LDT/PPT)^{156,164,261,268,269}. Durant le SWS, les niveaux extracellulaires de GABA augmentent dans ces

neurones par rapport à l'éveil²⁷⁰⁻²⁷². De plus, 90% des neurones positifs au c-fos dans le VLPO expriment l'ARNm de la galanine, et 80% des neurones VLPO ayant des projections vers le TMN contiennent à la fois de la galanine et le glutamate carboxylase (GAD), l'enzyme de synthèse du GABA^{273,274}. Enfin, la stimulation électrique du VLPO montre une inhibition des neurones du TMN médiée par le GABA²⁷⁵. Pris ensemble, ces résultats appuient le fait que les projections du VLPO et de la MnPn vers les systèmes favorisant l'éveil ont un rôle inhibiteur.

Les neurones actifs durant le sommeil qui expriment le GABA et la galanine sont inhibés par le NA via les récepteurs $\alpha 2$ -adrénergiques post-synaptiques, et par l'ACh via les récepteurs muscariniques post-synaptiques et des récepteurs nicotiques présynaptiques situés sur les terminaisons noradrénergiques²⁷⁶. Leur activité n'est cependant pas modulée par la HA ou l'orexine²⁷³. Enfin, la sérotonine induit soit une inhibition (50%, type 1), soit une activation (50%, type 2) des neurones du VLPO²⁷³.

Des facteurs hypnogènes naturels, tels que l'adénosine et la prostaglandine D2, s'accumulent lors de l'éveil et jouent un rôle crucial dans l'initiation du sommeil. En effet, l'application d'un agoniste du récepteur A2A (A2AR) activent les mêmes neurones du VLPO que ceux activés par la sérotonine²⁷⁷. De plus, il semble que l'adénosine puisse activer directement les neurones du VLPO au moment de l'initiation du sommeil via une action sur les A2AR post-synaptique car l'infusion d'un agoniste du A2R dans l'espace sous-arachnoïdien rostral du VLPO augmente le SWS et induit l'expression de c-fos dans les neurones du VLPO²⁷⁸. Par ailleurs, l'injection de glucose dans le VLPO favorise le SWS et augmente l'expression de c-fos dans le VLPO²⁷⁹. Cela suggère que le glucose favorise l'endormissement en augmentant l'excitabilité des neurones du VLPO. Les récepteurs A1 (A1R) vont eux favoriser le sommeil via l'inhibition des neurones activés durant l'éveil, en particulier les neurones ACh et orexinergiques²⁸⁰. Alors que les souris KO pour l'A1R ne présentent pas d'altération dans la régulation du homéostatique du sommeil²⁸¹, le manque d'expression du A2AR empêche une régulation normale du sommeil et bloque l'effet stimulant de la caféine, indiquant un rôle crucial de l'activation de ces récepteurs dans le SWS²⁸².

De nombreuses études montrent l'implication des neurones du VLPO et du MnPn dans l'induction et la maintenance du sommeil. Par ailleurs, de nouvelles structures et voies impliquées dans la régulation du sommeil ont été découvertes, telles que le noyau accumbens, le noyau réticulaire thalamique, les neurones GABAergiques du cortex qui expriment l'oxyde nitrique synthase et la zone parafaciale.

L'effet stimulant de la caféine semble être médié par les neurones GABAergiques localisés au niveau du noyau accumbens (NAc) et qui expriment les A2AR et les D2R, plutôt que par les neurones

du VLPO. En effet, cet effet est aboli chez les rats n'exprimant pas le A2AR dans l'enveloppe du NAc²⁷⁸. Les neurones GABAergiques du NAc peuvent induire le sommeil via leurs projections sur les systèmes favorisant l'éveil tels que le système orexinergique du LH, le système HA, le système dopaminergique de la VTA et le système noradrénergique du LC²⁸³. Cependant, des études sont encore nécessaires pour démontrer que ces neurones sont spécifiquement actifs durant le sommeil.

Les neurones réticulaires thalamiques (RT) GABAergiques sont responsables de la génération des fuseaux (12-14 Hz) observés durant le sommeil²⁸⁴. En effet, une forte stimulation optogénétique phasique des neurones de la RT induit des fuseaux au cours du sommeil contrairement à l'éveil^{285,286}. A l'inverse, l'activation tonique et à faible puissance de ces neurones produit des ondes lentes (ondes delta), et induit du sommeil chez les souris éveillées sans affecter la puissance dans la bande de fréquence des fuseaux²⁸⁷. Enfin, l'inhibition des neurones RT induit des ondes lentes pendant le SWS. Par ailleurs, l'inhibition optogénétique des neurones de la RT pendant le SWS provoque des transitions rapides du sommeil à l'éveil¹³⁸. Ces résultats montrent bien que les neurones GABAergiques de la RT sont nécessaires à la régulation du sommeil, ainsi qu'à la génération des fuseaux et de l'activité delta. Lors de l'éveil, ces neurones sont inhibés par les neurones GABAergiques de la LH, ainsi que par des projections inhibitrices des systèmes cholinergiques, sérotoninergiques, noradrénergiques et histaminergiques¹³⁸. Comme pour les neurones du NAc, des études optogénétiques et pharmacologiques sont encore nécessaires pour comprendre les mécanismes responsables de l'activation des neurones de la RT pendant le sommeil.

L'expression de c-fos pendant le SWS a permis d'identifier une sous population d'interneurones corticaux exprimant l'oxyde nitrique synthase (nNOS) et le récepteur de la neurokinine-1. L'activation de ces neurones est proportionnelle au temps total passé en SWS, à la durée de sommeil SWS et à la puissance des ondes delta, qui donne un indice sur la pression de sommeil^{288,289}. Les souris KO pour le gène nNOS passent moins de temps endormis, présentent des durées de sommeil SWS réduites et une diminution de la puissance des ondes delta^{289,290}. Ces résultats suggèrent bien un rôle des neurones GABAergiques nNOS dans la régulation du sommeil mais d'autres expériences optogénétiques et pharmacologiques doivent être réalisées pour le confirmer.

Les neurones GABAergiques et glycinergiques situés dans la branche descendante du nerf facial, région appelée zone parafaciale (PZ) expriment c-fos après le sommeil mais par l'éveil, et des lésions spécifiques de ces neurones entraînent une augmentation de l'éveil au dépend du SWS²⁹¹. Leur activation pharmacogénétique induit le SWS et inhibe l'éveil et le sommeil paradoxal pendant quelques heures²⁹². Au contraire, leur inhibition diminue fortement le SWS et le sommeil paradoxal. Les neurones du PZ agissent en inhibant directement les neurones glutamatergiques du noyau brachial médial pontin²⁹², qui eux excitent les neurones du cerveau antérieur basal magnocellulaires qui

projetent sur le cortex. Les lésions de ces deux zones induisant un coma, il est probable que les neurones de la PZ induisent le sommeil en inhibant la voie entre le pont et le cerveau antérieur²⁹². Ces résultats suggèrent un rôle des neurones GABAergiques et glycinergiques de la PZ dans la régulation du sommeil. Des études sont encore nécessaires pour déterminer le rôle précis de ces neurones et leurs mécanismes d'action.

3. Sommeil REM

Des travaux expérimentaux initiés par Michel Jouvet en 1960, poursuivis par d'autres dans les années 60 et 70, ont mis en évidence chez le chat et le rongeur une structure dans le pont rostral dorsal lié à la génération du sommeil paradoxal nommé subcoeruleus, péri-locus coeruleus alpha, ou noyau sublatérodorsal (SLD)²⁹³⁻²⁹⁶. La stimulation électrique des régions pontomédullaires²⁹⁷ et l'activation pharmacologique des récepteurs du glutamate des neurones du SLD^{298,299} produisent une atonie musculaire. De plus, des études histologiques ont montré que l'immunomarquage c-Fos dans les neurones SLD était largement augmenté au cours de l'hypersomnie induite du sommeil paradoxal^{300,301}. Enfin, les enregistrements électrophysiologiques démontrent l'activation spécifique de ces neurones dans le sommeil paradoxal: décharge maximale pendant le sommeil paradoxal, maintien d'une décharge soutenue tout au long de leurs occurrences, et absence de décharge lors des transitions du sommeil paradoxal au sommeil NREM ou à l'éveil^{302,303}. Les neurones du SLD, principalement des cellules glutamatergiques³⁰⁴, sont ainsi appelés neurones REM-ON et s'opposent aux neurones REM-OFF, silencieux pendant le sommeil paradoxal.

Bien que le SLD ait été considéré comme suffisant pour initier et maintenir le sommeil paradoxal, certaines études démontrent que l'ensemble de la structure SLD n'est pas essentielle à toutes les caractéristiques du sommeil paradoxal. En effet, des lésions très localisées du SLD préviennent l'atonie du sommeil paradoxal sans changements majeurs du temps total de sommeil paradoxal^{300,305} tandis que des lésions plus importantes ont un impact à la fois sur l'atonie et le temps passé en sommeil paradoxal (quantité et durée des épisodes de sommeil paradoxal)³⁰⁰. Par ailleurs, l'inactivation spécifique des neurones glutamatergiques du SLD chez le rat³⁰⁶ conduit à une augmentation des valeurs EMG moyennes mais pas de changements significatifs ni du nombre ni de la durée des épisodes de sommeil paradoxal. Deux populations différentes de neurones glutamatergiques SLD semblent contrôler d'une part l'atonie du sommeil paradoxal, et d'autre part le sommeil paradoxal lui-même.

Les neurones contenant l'hormone de concentration de mélanine (MCH), situés dans la zone de l'hypothalamus latéral (LH), qui contient également des neurones orexine/hypocrétine, déchargent au maximum pendant le sommeil paradoxal^{307,308} et expriment c-Fos après une hypersomnie induite du sommeil REM³⁰⁹. Ce rôle de promotion de l'état de sommeil paradoxal a également été montré par

l'application de brèves stimulations optogénétiques des neurones MCH qui induisent durant le sommeil NREM, une augmentation du nombre de transitions vers le sommeil paradoxal, et durant le sommeil paradoxal, une augmentation de la durée des épisodes de sommeil paradoxal³¹⁰. De plus, l'activation chimio-génétique des neurones MCH conduit à une augmentation de la durée totale passée en sommeil paradoxal³¹¹ (augmentation du nombre d'épisodes)³¹² et à une augmentation du nombre de transition entre le sommeil NREM et le sommeil paradoxal³¹².

Les neurones MCH libèrent principalement des peptides inhibiteurs^{313,314}. Des récentes expériences suggèrent que l'effet des neurones MCH sur les neurones du SLD est médié par l'inhibition des neurones GABAergiques situés dans le vPAG et le LPT adjacent. En effet, une projection directe des neurones MCH dans le SLD ne semble pas impliquée dans l'initiation du sommeil paradoxal car la microinjection de MCH dans le SLD diminue le nombre d'épisodes de sommeil paradoxal¹⁵⁰. Inversement, l'inhibition pharmacologique de la LH conduit à une augmentation de l'expression des neurones GABAergiques du vPAG/LPT et à une suppression complète du sommeil paradoxal³¹⁵. Des expériences optogénétiques montrent par ailleurs que l'inhibition des terminaisons des neurones MCH du vPAG/LPT empêche à elle seule l'augmentation des transitions du sommeil NREM en sommeil paradoxal induite par l'activation chimio-génétique³¹². Les neurones GABAergiques situés dans le vPAG/LPT exercent eux une inhibition tonique sur les neurones du SLD comme le montrent des études pharmacologiques et neuroanatomiques^{298,316,317} ce qui en fait des neurones REM-OFF. Cette inhibition qui se produit pendant les phases d'éveil et de sommeil NREM empêche l'initiation du sommeil paradoxal^{317,318}. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que les neurones MCH inhibent les neurones GABAergiques dans le vPAG/LPT, supprimant l'inhibition tonique sur les neurones glutamatergiques SLD et permettant l'initiation du sommeil. Par ailleurs, l'augmentation du temps de sommeil paradoxal total suite à la microinjection de MCH dans le LC³¹⁹ et le DRN³²⁰, et l'augmentation de la durée des épisodes de sommeil paradoxal après stimulation optogénétique des terminaisons des neurones MCH dans le TMN³¹⁰ suggèrent que les projections des neurones MCH sur ces structures qui favorise l'éveil jouent un rôle dans le maintien du sommeil paradoxal plutôt que dans son initiation.

Les neurones du SLD envoient des projections vers deux cibles principales: le thalamus intralaminaire (la voie ascendante) et la moelle ventromédiale (la voie descendante)²⁹⁸. La voie ascendante conduit à une activation corticale traduite par la désynchronisation du signal l'EEG et l'activité thêta. La voie descendante mène à l'atonie³²¹ à travers des circuits inhibant les motoneurones squelettiques de la moelle épinière. Ces circuits impliquent des projections des neurones du SLD vers des structures médullaires, y compris le noyau réticulaire gigantocellulaire ventral et alpha (GiV et Gi α) qui libèrent du GABA et de la glycine^{298,306}. Ces deux neurotransmetteurs sont nécessaires pour induire l'atonie. En effet, dans le sommeil paradoxal induit, la glycine et le GABA sont fortement libérés sur les

motoneurones³²², et pour prévenir l'atonie, des antagonistes des récepteurs GABA_A/GABA_B/glycine sont tous nécessaires³²³. Le GiV et le GiX envoient des projections aux motoneurones de la moelle épinière^{324,325}, conduisant à leur hyperpolarisation³²⁶, et donc à leur inhibition.

En plus des projections sur les neurones du SLD, une autre population de neurones GABAergiques situés dans le vPAG projette sur des structures favorisant l'éveil. Il a été démontré que le vPAG, ainsi que les noyaux paragigantocellulaires dorsaux et latéraux (DPGi et LPGi), contenaient des neurones GABAergiques se projetant vers le DRN et le LC²⁶⁸, et que la libération de GABA dans ces deux structures était augmentée pendant le sommeil paradoxal par rapport aux stades de sommeil NREM et d'éveil^{270,271}. D'autres expériences ont montré que les neurones du DPGi et les neurones projetant sur le LC étaient activés de manière sélective pendant le sommeil paradoxal^{327,328}. Ces résultats suggèrent que les neurones GABAergiques contenus dans le vPAG, le DPGi et le LPGi sont responsables de l'inhibition des neurones NA du LC et des neurones 5-HT du DRN pendant le sommeil paradoxal³²⁹.

Outre l'inhibition des motoneurones, l'atonie du sommeil paradoxal semble être renforcée par une diminution concomitante de l'excitation des motoneurones. L'inactivation des structures favorisant l'éveil participe à cette diminution car la libération des apports de sérotonine et de noradrénaline sur les motoneurones est réduite pendant l'atonie du sommeil paradoxal^{330,331}.

III. Sommeil pathologique dans les synucleinopathies

A. Généralités

Le vieillissement va généralement de pair avec des changements concernant le sommeil : la structure, la qualité et la distribution générale au cours du temps sont affectées. Pendant la période de sommeil chez les personnes âgées, le temps passé dans les différentes phases de sommeil est modifié par rapport aux personnes plus jeunes avec plus de temps en N1 et N2, et moins de temps en sommeil N3 et en sommeil REM³³². De plus, la fréquence de réveil est augmentée, le tout conduisant à une détérioration de la consolidation du sommeil³³³. Les personnes âgées présentent également une diminution de l'efficacité du sommeil, c'est-à-dire le pourcentage du temps total de sommeil divisé par le temps total au lit³³². Enfin, elles présentent un décalage de la phase d'éveil, avec des heures de coucher et des heures de réveil plus précoces^{334,335}, et un changement de la répartition du sommeil paradoxal pendant la nuit³³⁵. Cependant, les changements de sommeil ne sont pas équivalents à des troubles du sommeil même s'ils pourraient être une conséquence de ces changements.

Outre ce qui se produit habituellement chez les personnes âgées en bonne santé, les patients qui souffrent de synucleinopathies sont particulièrement touchés par les altérations du sommeil. Jusqu'à

90% des patients atteints de MP présentent de tels troubles^{102,336,337}, 90% pour les patients DCL³³⁸ et entre 90 et 100% pour les patients AMS³³⁹. Le plus courant est ce que l'on appelle un trouble du comportement du sommeil paradoxal (TCSP), mais ces patients présentent également une somnolence diurne excessive (SDE), des insomnies, des troubles respiratoires du sommeil (TRS) et le syndrome des jambes sans repos (SJSR). Chacun d'eux et leurs implications avec les différentes synucléinopathies seront présentés ci-dessous. Comme ces symptômes apparaissent de façon précoce dans le développement des synucléinopathies, la compréhension des altérations du sommeil apparaît cruciale pour mieux appréhender le développement de ces maladies.

B. Troubles comportementaux du sommeil paradoxal

Décrit pour la première fois en 1986 par Schenk et Mahowald³⁴⁰, le trouble du comportement en sommeil paradoxal est une parasomnie du sommeil paradoxal caractérisée d'abord par une augmentation de l'activité musculaire enregistrée par l'EMG pendant la PSG, c'est-à-dire une perte d'atonie musculaire normale et donc un sommeil paradoxal sans atonie (SPSA), et d'autre part par l'émergence de comportements moteurs anormaux, appelés comportement de mise en acte du rêve³⁴¹. Le TCSP est complètement différent du somnambulisme, une parasomnie du sommeil NREM2³⁴². Le somnambulisme est plus susceptible d'affecter les enfants et disparaît souvent à l'âge adulte tandis que la prévalence du TCSP augmente largement après 50 ans. Contrairement au TCSP, les somnambules interagissent souvent avec leur environnement. Ils peuvent ouvrir les yeux, marcher et avoir une conversation. Le somnambulisme ne semble pas être lié à une lésion cérébrale, mais plus probablement au stress.

La survenue du TCSP altère la qualité de vie car les patients sont plus enclins à se blesser eux-mêmes et/ou à blesser leur partenaire de lit, conduisant dans certains cas extrêmes à des comportements mortels³⁴³.

1. Diagnostic

Bien qu'absolument nécessaire pour assurer le diagnostic du TCSP, la PSG est coûteuse et prend du temps, ce qui entraîne des difficultés dans la mise en place d'enquêtes à grande échelle. Les questionnaires, comme le REM Sleep Behavior Disorder Single-Question Screen (RBDSQ)³⁴⁴, ont donc été conçus pour établir un diagnostic de possible TCSP (pTCSP) pour permettre des études à long terme et à grande échelle sur le TCSP. Dans la population générale, entre 0,38 et 0,5% des personnes sont touchées par un pTCSP³⁴⁵, et cette prévalence augmente avec l'âge (jusqu'à 6% à 70 ans)³⁴⁶.

2. Causes et mécanismes

Le TCSP a été classé en deux catégories : idiopathique ou secondaire. Le TCSP idiopathique (iTCSPI) n'est pas associée à une maladie. Le TCSP secondaire (ou TCSP symptomatique) peut être associée au sevrage alcoolique, aux agents sédatifs ou à la prise de médicaments (comme des antidépresseurs), mais dans la plupart des cas, elle est liée à des troubles neurologiques, y compris les maladies neurodégénératives, les tumeurs et les accidents vasculaires cérébraux³⁴⁷. Comme décrit précédemment, les neurones glutamatergiques du SLD jouent un rôle important dans le sommeil paradoxal. Dans les études cliniques, une forte corrélation a été établie entre le TCSP et une lésion de la région où se situe le SLD³⁴⁸⁻³⁵⁰. Chez les rongeurs, l'inactivation de VGLUT2, nécessaire à la transmission glutamatergique, dans les neurones du SLD entraîne un SPSA et un TCSP, et diminue de 30% le temps passé en sommeil paradoxal^{306,351}. Cependant, le TCSP n'affecte pas le temps passé en sommeil paradoxal³⁵²⁻³⁵⁴, ce qui suggère qu'un autre mécanisme pourrait être responsable de ce trouble³⁰⁶. Les neurones du SLD ont des projections directes vers les neurones GABAergiques et glycinergiques de la surface ventrale de la moelle^{298,306} qui se projettent vers les motoneurones spinaux³¹⁷ pour participer à l'atonie du sommeil paradoxal^{323,355}. Les lésions de la moelle ventrale chez le chat conduisent au SPSA³⁵⁶, et l'inactivation spécifique du vGAT dans cette zone chez le rat³²¹, qui est nécessaire à la transmission du GABA et de la glycine, induit un SPSA et un TCSP sans diminution significative des temps de sommeil paradoxal. Des résultats similaires sont obtenus chez des souris transgéniques dont la fonction des récepteurs de la glycine et du GABA sont altérées³⁵⁷. En outre, un TCSP est observée chez les patients présentant des lésions inflammatoires de la moelle ventrale³⁵⁸. Dans l'ensemble, cela suggère que la neurodégénérescence des neurones GABAergiques et glycinergiques situés dans la moelle ventrale entraîne un TCSP³⁴⁷.

Bien que le sommeil paradoxal soit caractérisé par une atonie musculaire, des contractions musculaires physiologiques se produisent toujours et le TCSP pourrait être en partie une exagération de cette activité motrice phasique. Des expériences d'enregistrement intracellulaire montrent d'une part que l'excitation des motoneurones médiée par le glutamate induit des contractions musculaires pendant le sommeil paradoxal³⁵⁹, et d'autre part que les antagonistes des récepteurs glutamatergiques sur les motoneurones les empêchent³⁶⁰. La commande du glutamate qui participe aux contractions musculaires pendant le sommeil paradoxal est normalement régulée à la fois par le GABA et par l'inhibition de la glycine, leur blocage pharmacologique augmentant ces épisodes phasiques^{323,361}. Pris ensemble, cela confirme l'hypothèse que le TCSP résulte de la rupture des circuits du GABA et de la glycine.

3. Troubles comportementaux du sommeil REM et synucleinopathies

Jusqu'à 82% des patients, principalement des hommes, atteints de TCSP développeront des maladies neurodégénératives avec un intervalle moyen de 14 ans^{27,28}, voire jusqu'à 50 ans chez certains patients³⁶². Considérant que presque tous les patients seront finalement affectés par d'autres maladies, certains auteurs suggèrent de ne plus utiliser le terme d'iTCSP^{27,339}. Parmi les maladies neurodégénératives développées, 93% sont des synucléinopathies²⁹. Le TCSP a également été décrit dans certaines tauopathies (MA^{363,364}, paralysie supranucléaire progressive^{365,366}, parkinsonisme guadeloupéen et dégénérescence corticobasale^{367,368}) et certaines maladies polyglutaminiques (maladie de Huntington (MH)³⁶⁹, atrophie spinocérébelleuse de type²⁷). Cependant, l'apparition d'un TCSP dans la MA³⁷⁰ ou la MH³⁷¹ est toujours controversée. En effet, un diagnostic précis de ces maladies peut être difficile à poser, la DCL pouvant être par exemple d'abord diagnostiquée comme la MA. Dans l'ensemble, le TCSP apparaît tout à fait spécifiquement prédictif des synucléinopathies. Son identification précoce serait d'une grande importance lorsque des agents neuroprotecteurs seront disponibles ou pour développer de tels agents neuroprotecteurs.

a. Maladie de Parkinson

Parmi les patients atteints de MP, entre 27 et 61% développent un TCSP avant l'apparition des symptômes moteurs³⁷²⁻³⁷⁴, tandis que d'autres le développent en même temps ou après les symptômes moteurs³⁷². Les patients atteints de la MP avec un TCSP ont une durée de vie plus longue^{338,374,375}, chutent plus^{376,377}, ont une cognition plus mauvaise³⁷⁸⁻³⁸⁰, font face à plus de fluctuations motrices (changements de la performance motrice généralement associés à la prise de lévodopa)³⁷² et présentent une réponse plus faible à la lévodopa^{182,375,376}. Par ailleurs, les patients atteints de la MP présentant une atonie musculaire altérée pendant le sommeil paradoxal ont une progression de l'atteinte motrice plus rapide, ce qui suggère que la présence d'un TCSP pourrait être un marqueur de la progression des symptômes moteurs³⁸¹.

b. Démence à corps de Lewy

Comme mentionné précédemment, la DCL est parfois confondue avec la MA car les symptômes sont similaires dans les deux maladies. Cependant, comme le TCSP est plus associé à la DCL qu'à la MA, sa présence pourrait être utilisée pour améliorer la précision du diagnostic du DCL^{382,383}. De plus, la présence de pTCSP chez les patients est associée à une probabilité plus élevée de DCL et une atrophie de type MA moins sévère dans les lobes temporaux médiaux dans les études d'IRM³⁸⁴. Inversement, l'absence de pTCSP est associée à un modèle d'atrophie de type MA, avec une augmentation de la charge de tau phosphorylée³⁸⁴. En outre, comparés aux patients atteints de MP qui ne présentent pas de démence, les patients DCL ont plus de troubles du comportement moteur pendant le sommeil, non

seulement le TCSP, mais aussi les événements liés à l'éveil imitant le TCSP qui surviennent pendant le sommeil NREM³⁸⁵.

c. *Atrophie multisystématisée*

Le TCSP est le trouble lié au sommeil le plus courant dans l'AMS³⁸⁶. Une étude multicentrique a révélé que jusqu'à 88% des patients atteints de l'AMS ont un TCSP confirmé par le PSG, et la moitié d'entre eux signalent un TCSP avant l'apparition des symptômes moteurs de l'AMS³⁸⁷. Cependant, selon une autre étude, le TCSP apparaît juste avant ou au début des symptômes moteurs, et disparaît en peu de temps³⁸⁸. Le PSG ne met pas en évidence les différences entre les deux sous-types d'AMS³⁸⁹, suggérant des mécanismes similaires concernant les altérations du sommeil. Par rapport aux patients atteints de la MP avec un TCSP, les patients AMS ont une durée de vie plus courte, plus d'événements de SPSA et moins de temps de sommeil total³⁹⁰, ce qui implique une perturbation plus grave des structures régulant le sommeil paradoxal, ce qui est en accord avec la localisation des structures dégénérées chez les patients AMS.

C. Architecture des cycles éveil/sommeil : sommeil diurne excessif et insomnie

Comme décrit précédemment, certains changements dans l'architecture éveil/sommeil se produisent naturellement chez les personnes âgées. Chez les patients souffrant de synucléinopathies, elle entraîne de profondes perturbations de l'organisation du sommeil. En effet, ces patients souffrent d'insomnie (difficultés à démarrer et/ou à maintenir le sommeil pendant la période nocturne) et ils dorment plus qu'ils ne le faisaient habituellement pendant la période diurne, ce qui correspond à une somnolence diurne excessive (SED).

1. Sommeil diurne excessif

La somnolence correspond à *«l'incapacité de rester éveillé et alerte pendant les principaux épisodes d'éveil de la journée, entraînant des périodes de besoin irrépressible de sommeil ou des sautes involontaires dans la somnolence ou le sommeil»* selon l'American Academy of Sleep Medicine³⁹¹. Cette somnolence est considérée comme excessive lorsque la quantité de sommeil, ou la tendance à dormir, est augmentée pendant les heures normales d'éveil. La plupart du temps, la somnolence survient lors d'activités passives (lire, regarder la télévision), mais dans les cas les plus graves, elle peut survenir lorsque la vigilance est requise (manger, parler, conduire)³⁹². Le SDE, dont la prévalence varie entre 18 à 27% dans la population générale³⁹³⁻³⁹⁵, entraîne une altération majeure de la vie lorsque les épisodes de sommeil augmentent en quantité et en gravité avec le temps.

a. Diagnostic

Le test itératif de latence d'endormissement (TILE)¹¹⁴ est utilisé pour mesurer le temps nécessaire pour s'endormir dans des conditions calmes pendant la journée. Il consiste en quatre à cinq occasions de brèves siestes (20 min) avec des intervalles de deux heures entre chacune, la première se produisant entre 1,5 et 3 h après le réveil de la période de sommeil principale. Une latence moyenne du sommeil est donnée par la durée moyenne entre l'extinction de l'éclairage et la première période considérée comme étant du sommeil. Une durée inférieure à 5min révèle un niveau pathologique de somnolence diurne. D'autres tests ont ainsi été développés comme l'échelle de somnolence d'Epworth³⁹⁶, l'un des questionnaires sur le sommeil les plus largement utilisés. Cet outil de dépistage auto-administré permet une évaluation rapide et facile de la survenue et de la gravité de la somnolence diurne excessive subjective. Les questions portent sur la chance de s'endormir en donnant un score de 0 à 3 (0 : aucune chance ; 3 : chance élevée) dans huit situations quotidiennes typiques. Un score égal ou supérieur à 10 indique une somnolence diurne anormale, et un score supérieur à 15 met en évidence un SED sévère.

b. Causes

Les principales causes du SED sont (i) un déficit de sommeil, en quantité et en qualité, et un sommeil fragmenté, (ii) des anomalies pathologiques du SNC, y compris des maladies neurodégénératives, (iii) un désalignement entre le stimulateur circadien du corps et l'environnement (décalage horaire, horaires de travail décalés), (iv) des médicaments augmentant la somnolence sur le plan thérapeutique ou comme effet secondaire, et (v) des troubles psychiatriques ou primaires du sommeil comme la narcolepsie^{397,398}.

Parmi les autres troubles, le SED est largement rencontré chez les patients présentant des troubles respiratoires du sommeil et en particulier une apnée obstructive du sommeil (AOS) (voir la section des troubles respiratoires du sommeil) bien qu'aucune corrélation entre la gravité de l'AOS et le degré du SED n'ait été identifiée^{399,400}.

2. Insomnie

Dans la population adulte, 10 à 15% des gens sont touchés par une insomnie chronique⁴⁰¹. L'insomnie, telle que définie par le Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux, 5e édition⁴⁰², est une «*insatisfaction signalée quant à la quantité ou à la qualité du sommeil et associée à des difficultés d'initiation, de maintien du sommeil ou de réveil tôt le matin, et qui provoque une détresse ou une déficience cliniquement significative, qui survient au moins 3 nuits par semaine pendant au moins 3 mois, malgré des possibilités de sommeil adéquates et qui ne s'explique pas mieux par un autre trouble ou une toxicomanie*»⁴⁰².

a. Diagnostic

Le diagnostic du syndrome d'insomnie nécessite les critères suivants: (i) difficulté à démarrer ou à maintenir le sommeil ou à se réveiller tôt (ii) qui survient malgré des opportunités et des circonstances adéquates au sommeil, (iii) et qui conduisent à des troubles diurnes⁴⁰³. Contrairement à d'autres troubles du sommeil, les examens PSG ne sont pas la méthode standard pour étudier l'insomnie car il existe un écart important entre l'insomnie auto-déclarée et les valeurs de sommeil PSG qui ne montrent pas de différences prononcées avec les bons dormeurs^{404,405}.

L'index de qualité du sommeil de Pittsburg (PSQI) est un test générique qui détecte de manière fiable les problèmes de sommeil⁴⁰⁶. Ce questionnaire est composé de 19 items sur le sommeil au cours du mois précédant le test, organisés en sept composantes : qualité subjective du sommeil, latence du sommeil, durée du sommeil, efficacité habituelle du sommeil, troubles du sommeil, utilisation de somnifères et dysfonctionnement diurne. Sur un score final allant de 0 à 21 (0 : pas de problèmes de sommeil ; 21 : graves problèmes de sommeil), un score de 5 ou plus indique une mauvaise qualité du sommeil.

b. Causes

L'explication intuitive selon laquelle l'insomnie résulte d'une augmentation physiologique, cognitive et/ou émotionnelle de l'éveil conduisant au concept d'hyperexcitation^{405,407} décrit comme une activité qui «*interfère avec le désengagement de l'environnement et diminue la probabilité de dormir*»⁴⁰⁸. Par rapport aux bons dormeurs, les patients présentant une insomnie primaire ont en effet des marqueurs soutenant cette explication comme une température corporelle plus élevée⁴⁰⁹, un taux métabolique plus élevé sur 24h⁴⁰⁷, une fréquence cardiaque plus élevée⁴⁰⁷ et une augmentation du taux de cortisol pendant le sommeil⁴¹⁰. Cependant, dans les synucléinopathies, l'insomnie est considérée comme un symptôme plus probablement lié à la survenue de symptômes moteurs, de douleurs, de nycturie (miction excessive la nuit) et d'autres altérations du sommeil, telles que l'apnée du sommeil ou les mouvements périodiques des membres qui rendent le sommeil difficile à initier et/ou à maintenir^{411,412}. De plus, la dépression est courante dans ces maladies et contribue probablement à l'insomnie^{98,411,412}.

3. Maladie de Parkinson

Le SED affecte entre 20% et 30% des patients atteints de la MP⁴¹³. En ce qui concerne les mécanismes physiopathologiques, le SED est très probablement lié à une perte d'hypocrétine (orexine), une substance favorisant l'éveil. En effet, chez les patients atteints de la MP, les taux d'hypocrétine dans le LCR sont significativement réduits⁴¹⁴ ainsi que l'hypocrétine dans les tissus cérébraux en *post-mortem* et les neurones hypocrétines⁴¹⁵. De plus, une étude a montré une

corrélation entre la perte de neurones hypocrétines et le stade clinique de la maladie⁴¹⁶. Par ailleurs, au-delà des zones dopaminergiques, d'autres systèmes, y compris les structures noradrénergiques et sérotoninergiques dans le pont, sont altérés avec la progression de la MP⁴¹⁷. Comme ces systèmes sont impliqués dans la régulation du sommeil et de l'éveil, leur dégénérescence est probablement impliquée dans les troubles du sommeil comme le SED. De plus, des études longitudinales mettent en évidence que la présence de SED augmente par 3 fois le risque de développer la MP avec l'âge⁴¹⁸, et qu'une somnolence diurne élevée est associée à une probabilité plus élevée de développer la maladie⁴¹⁹. Cela peut amener à considérer le SED comme un marqueur prédictif de la MP. Cependant, le SED peut être secondaire à des traitements médicaux comme les antipsychotiques, les benzodiazépines, les antidépresseurs⁴²⁰, mais surtout la thérapie dopaminergique, les agents dopaminergiques (e.g. lévodopa) et les agonistes de la dopamine (e.g. ropinirole, pramipexole) induisant une somnolence^{421,422}.

L'insomnie est l'altération du cycle éveil/sommeil la plus courante chez les patients atteints de la MP, en particulier l'insomnie liée au maintien du sommeil⁴²³. Parmi les causes exposées ci-dessus, la nycturie affecte jusqu'à 80% des patients atteints de la MP³³⁶, et leur fréquence augmente avec la gravité et la durée de la maladie. Les hallucinations nocturnes ressenties par 20% des patients atteints sont une autre cause de fragmentation du sommeil⁴²⁴. En outre, des symptômes moteurs peuvent apparaître lors de l'éveil et aboutir à des réveils prolongés⁴²⁵. De manière surprenante, les études publiées n'ont pas démontré de corrélation directe entre un mauvais sommeil nocturne et un SED chez les patients parkinsoniens⁴²⁶⁻⁴²⁸.

4. Démence à corps de Lewy

Le pourcentage de patients atteints de DCL présentant un SED est similaire à celui des patients parkinsoniens et beaucoup plus élevé que celui des patients atteints de la MA⁴²⁹. Comme pour les patients atteints de la MP, une grave perte de neurones hypocrétines est observée dans l'hypothalamus latéral⁴³⁰, et les taux d'hypocrétine néocorticale sont réduits⁴³¹. Cette perte est corrélée à la présence d'enchevêtrements neurofibrillaires, mais pas à la pathologie de Lewy⁴³⁰. Cependant, des taux normaux d'hypocrétine dans le LCR des patients atteints de DCL sont rapportés⁴³². Pour ces patients, l'efficacité du sommeil nocturne n'est pas non plus associée à la somnolence diurne⁴³³.

5. Atrophie multisystématisée

Dans l'AMS, le lien entre la perte d'hypocrétine et le SED est moins clair que dans la MP. En effet, même si une perte de neurones hypocrétines a été rapportée dans le cerveau de patients atteints de l'AMS⁴³⁴, les taux d'hypocrétine dans le LCR sont normaux^{435,436}. Dans cette maladie,

la dégénérescence neuronale se produit dans les structures du pont, une caractéristique utilisée en *post-mortem* pour attester du diagnostic⁴³⁷. Ainsi, comme pour la MP, l'altération des structures régulant le sommeil et l'éveil peut être responsable de troubles du sommeil comme le SED. Chez les patients atteints de l'AMS, le SED semble être prédictif de l'efficacité du sommeil et des troubles respiratoires du sommeil⁴³³.

L'insomnie est fréquemment rapportée par les patients atteints de l'AMS, encore plus fréquemment que par les patients atteints de la MP⁴¹³. La réduction totale du temps de sommeil et l'augmentation de la latence du sommeil sont corrélées à la durée de la maladie⁴³⁸. Pour les patients atteints de l'AMS, l'insomnie est liée à des dysfonctionnements moteurs, à la dépression, à l'anxiété⁹⁹ et à l'incontinence urinaire⁴³⁹.

D. Troubles respiratoires du sommeil

Les troubles respiratoires du sommeil comprennent l'apnée obstructive du sommeil (AOS), l'apnée centrale du sommeil (ACS), le trouble d'hypoventilation lié au sommeil et le trouble d'hypoxémie lié au sommeil³⁹¹. Dans les synucléinopathies, l'AOS est le trouble respiratoire le plus courant, mais les patients peuvent également souffrir d'ACS. L'AOS se caractérise par une difficulté à respirer due à des épisodes répétés d'obstruction complète ou partielle des voies supérieures et associée à des périodes d'éveil⁴⁴⁰. L'ACS est, elle, caractérisée par un manque de stimulation de la respiration spontanée⁴⁴¹ induisant une absence de mouvements musculaires inspiratoires pour des épisodes d'une durée d'au moins 10sec⁴⁴². Le seuil apnéique représente le niveau artériel minimum de PCO₂ (pression artérielle de gaz carbonique) nécessaire à la respiration spontanée. Du point de vue des neurocircuits, lorsque ce seuil est atteint, le générateur de rythme respiratoire pontomédullaire cesse d'agir. Cela entraîne le silence des nerfs moteurs qui innervent le muscle de la pompe thoracique inspiratoire et conduisent à l'ACS. Une période d'éveil transitoire ou un soupir induit un dépassement ventilatoire qui induit souvent une hypocapnie (faible niveau artériel de PCO₂) suffisante pour provoquer une telle apnée. Cette apnée persiste jusqu'à ce que la PCO₂ dépasse le seuil apnéique⁴⁴³.

Les apnées du sommeil doivent être prises au sérieux car elles sont très répandues chez les patients ayant un diagnostic établi de maladie cardiovasculaire⁴⁴³.

1. Sommeil et respiration

Le sommeil est un état de vulnérabilité du système respiratoire. En effet, par rapport à l'éveil, certains changements physiologiques de la respiration surviennent durant le sommeil, ce qui la rend plus vulnérable⁴⁴⁴. En raison d'un arrêt de l'excitation tonique sur les muscles des voies respiratoires supérieures, une résistance normale au passage de l'air est observée⁴⁴⁵, notamment au niveau du

pharynx, un conduit musculo-membraneux. Lors de l'inspiration, une pression négative, induite par une contraction du diaphragme, permet à l'air de pénétrer dans les poumons mais peut déclencher un collapsus pharyngé. Pour éviter l'obstruction de ce conduit souple, le muscle dilatateur pharyngé se contracte avant le début de l'inspiration. Ce mécanisme de protection intervient dans une moindre mesure pendant le sommeil, conduisant à une diminution physiologique du diamètre du pharynx. Cela peut expliquer l'apparition d'apnées du sommeil chez les personnes sensibles, par exemple ceux ayant des voies respiratoires supérieures anatomiquement plus étroites. De plus, des différences de respiration entre les stades de sommeil sont observées. Pendant le sommeil NREM, la ventilation, c'est-à-dire la capacité à renouveler l'air des poumons, est totalement sous contrôle métabolique⁴⁴⁶, ce qui rend la respiration plus régulière que lors de l'éveil sans réduction significative de sa fréquence moyenne^{447,448}. Durant ce stade, il y a une diminution de l'activité sympathique et une augmentation concomitante de l'activité parasympathique conduisant à une baisse de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque⁴⁴³. Pendant le sommeil paradoxal, en raison de l'inhibition des motoneurones respiratoires, le diaphragme agit comme le principal muscle respiratoire actif, expliquant que les événements respiratoires anormaux sont plus graves à ce stade. Contrairement au sommeil NREM, la respiration en sommeil paradoxal est irrégulière avec une augmentation de sa fréquence^{447,448}.

2. Diagnostic

Plusieurs critères sont nécessaires pour diagnostiquer l'AOS⁴⁰² : (i) un ou plusieurs signes de (a) somnolence excessive, sommeil non réparateur, fatigue ou insomnie, (b) apnée, halètement ou suffocation au réveil, (c) ronflement et/ou interruptions respiratoires pendant le sommeil, (d) diagnostic d'hypertension, de maladie coronarienne, d'accident vasculaire cérébral, d'insuffisance cardiaque, de fibrillation artérielle, de diabète de type 2, de trouble de l'humeur ou de déficience cognitive, et soit (ii) une PSG ou un test d'apnée du sommeil à domicile, en utilisant un kit de surveillance respiratoire à domicile, démontrant au moins 5 événements respiratoires obstructifs par heure de sommeil dans le cas du PSG ou par heure de surveillance dans le cas du test, ou (iii) uniquement un PSG ou un test d'apnée du sommeil démontrant 15 événements respiratoires obstructifs ou plus par heure de sommeil dans le cas du PSG, ou par heure de surveillance dans le cas du test quels que soient les symptômes.

En ce qui concerne l'ACS, au moins un des critères suivants doit être rempli: somnolence diurne (généralement moins sévère que dans l'AOS)⁴⁴⁵, difficulté à démarrer ou à maintenir le sommeil, sommeil fragmenté, sommeil non réparateur, ronflement ou apnée, ou réveil essoufflé.

Le questionnaire du Wisconsin sur le sommeil est le test le plus utilisé pour évaluer l'apnée du sommeil et les problèmes de sommeil en général⁴⁴⁹ mais n'a pas été utilisé chez les patients souffrant

de troubles du mouvement⁴⁵⁰ contrairement au questionnaire de Berlin⁴⁵¹. Ce test à choix multiple est composé de 10 items regroupés en 3 catégories : sévérité du ronflement, SED et comorbidités (hypertension et obésité). Les deux premières catégories sont positives lorsque le patient donne au moins deux réponses positives aux questions ouvertes. La troisième catégorie est positive en cas de diagnostic d'hypertension artérielle, ou si l'indice de masse corporelle est supérieur à 30kg/m². Si au moins deux catégories sont positives, la probabilité d'apnée du sommeil est élevée. Pendant les épisodes d'AOS, la pression œsophagienne (Pes) augmente pour atteindre une valeur maximale avant le redémarrage du flux d'air, et au contraire, disparaît pendant les épisodes d'ACS^{452,453}. Le type d'apnée du sommeil (AOS versus ACS) pouvant ne pas être facilement différencié par les symptômes, la surveillance de la Pes permet donc de distinguer les deux apnées du sommeil.

3. Causes

L'AOS est corrélée à l'obésité et au sexe masculin⁴⁵⁴ et est associée à de multiples comorbidités parmi lesquelles l'hypertension, l'insuffisance cardiaque, les arythmies, les accidents vasculaires cérébraux et les maladies coronariennes⁴⁴³. Comme pour les synucléinopathies, l'âge est un facteur de risque de développer l'AOS⁴⁵⁵, probablement dû à une réduction du sommeil N3 chez les personnes âgées, qui semble avoir un effet protecteur contre les troubles respiratoires du sommeil⁴⁵⁶. La principale cause de l'AOS est l'effondrement des voies respiratoires pharyngées et rétrolinguales, ce qui explique que l'obésité soit un facteur de risque important⁴⁵⁷. L'ACS peut survenir chez des sujets sains, en particulier à haute altitude, mais dans un contexte pathologique, de tels événements se produisent plus souvent chez les patients souffrant d'insuffisance cardiaque⁴⁵⁸ et sont associés à l'utilisation d'opioïdes⁴⁵⁹.

4. Maladie de Parkinson

L'apnée obstructive du sommeil est le trouble respiratoire du sommeil le plus courant chez les patients atteints de la MP, avec une fréquence allant de 27 à 60%⁴⁶⁰⁻⁴⁶². Certaines études rapportent une prévalence plus élevée de l'AOS chez les patients atteints de la MP que dans la population générale^{426,463,464}, tandis que d'autres non^{460,462,465}. Par ailleurs, il n'y a pas de lien clair entre la prévalence de l'AOS chez les patients atteints de la MP et la durée, la gravité ou la médication utilisée pour traiter la maladie^{461,466}. Dans la MP, les apnées du sommeil ne semblent pas être associées à une somnolence accrue⁴⁶⁰.

5. Démence à corps de Lewy

La littérature disponible sur les troubles respiratoires du sommeil chez les patients DCL est très limitée. Entre 35 et 60% des patients atteints de probable DLC pourraient être affectés par des TRS^{385,467}. Pour ces patients, les TRS semblent jouer un rôle dans la fragmentation du sommeil⁴⁶⁷.

6. Atrophie multisystématisée

Parmi les TRS, l'OSA et l'ACS sont courants chez les patients AMS, et l'OSA peut devenir une ACS avec l'évolution de la maladie⁴⁶⁸. De plus, les patients dont l'indice d'apnée s'aggrave avec le temps ont une durée de la maladie courte, ce qui suggère que les patients atteints d'AMS développant des TRS à un stade précoce connaîtront une détérioration continue de leurs troubles respiratoires⁴⁶⁸. Les processus neurodégénératifs affectant le tronc cérébral, y compris les centres de régulation respiratoire, expliquent que les patients atteints d'AMS développent l'ACS et autres TRS⁴⁶⁹.

Le stridor est un bruit strident qui se produit pendant l'inspiration dû à une circulation de l'air anormale causée par une obstruction partielle du larynx ou de la trachée. Le stridor, affectant de 24 à 42% des patients atteints d'AMS⁴⁷⁰⁻⁴⁷², est un signal d'alarme pour le diagnostic de l'AMS car il n'est que rarement observé dans d'autres syndromes parkinsoniens⁹⁹. Le stridor au stade précoce de la maladie est un facteur de risque pour une durée de vie plus courte⁴⁷⁰. L'examen du larynx est utile pour diagnostiquer le stridor, et révèle une restriction de l'abduction des cordes vocales, le mouvement paradoxal des cordes vocales et une épiglotte molle qui bascule en arrière⁴⁷³.

La mort subite est une cause fréquente de décès chez les patients atteints de l'AMS. Bien que le mécanisme reste à élucider, les troubles respiratoires semblent être une hypothèse raisonnable car de rares cas de décès au cours de la PSG mettent en évidence des apnées prolongées. Cependant, les patients avec une trachéotomie ou sous ventilation expérimentent tout de même la mort subite nocturne⁴⁷⁴, ce que s'explique par l'implication d'autres mécanismes (dysfonctionnement autonome...).

E. Syndrome des jambes sans repos

Le syndrome des jambes sans repos (SJSR), également connu sous le nom de maladie de Willis-Ekbom, est un trouble neurologique affectant 3 à 19% de la population générale⁴⁷⁵. En raison de la propension à se produire à l'approche de l'heure du coucher, le SJSR interfère fortement avec le sommeil, en particulier lors de son apparition⁴¹². Parmi les patients atteints de SJSR, 85% présentent également des mouvements périodiques des membres lors du sommeil⁴⁷⁶, qui sont des mouvements stéréotypés liés au sommeil généralement caractérisés par une extension dorsale du gros orteil et une flexion de la cheville⁴⁷⁷.

1. Diagnostic

Les critères pour évaluer ce syndrome sont une envie de bouger les jambes, souvent associée à une sensation désagréable de «démangeaison» ou de «sensation de vers sous la peau», qui est temporairement soulagée par le mouvement, et qui s'aggrave le soir et la nuit et en période d'inactivité⁴⁷⁸. La PSG n'est pas nécessaire pour confirmer le diagnostic mais peut établir si les patients souffrent également de mouvements périodiques des membres lors du sommeil, bien qu'elle puisse survenir indépendamment du SJSR⁴⁷⁸.

2. Causes

La carence en fer du cerveau est une anomalie biologique majeure du SJSR. La prévalence du syndrome est augmentée par 9 dans en cas d'anémie par rapport à la population générale⁴⁷⁹. De plus, des troubles liés au fer, comme la grossesse ou une maladie rénale, ont été associés à un facteur de risque accru de SJSR⁴⁸⁰, et les traitements de la carence en fer en réduisent les symptômes⁴⁸¹. Les analyses du LCR ont rapporté une réduction du niveau de ferritine^{482,483}, et les études d'IRM ont montré une diminution du fer dans la substance noire⁴⁸⁴, une zone riche en fer, et dans une moindre mesure dans le striatum⁴⁸⁴⁻⁴⁸⁶ et le thalamus, une région pauvre en fer⁴⁸⁷. Comme certaines zones riches en fer (e.g. le noyau denté du cervelet) ne montrent pas une diminution similaire, la physiopathologie semble concerner une carence en fer régionale chez la plupart des patients atteints de SJSR⁴⁸⁸.

En dehors du fer, le SJSR semble être lié à la dopamine. En effet, le grand bénéfice du traitement à la lévodopa sur les symptômes⁴⁸⁹ mène à penser que le syndrome est dû à une carence en dopamine cérébrale. Cependant, des preuves récentes soulignent que le SJSR pourrait être dû à une augmentation du renouvellement de la dopamine. En effet, des niveaux élevés de 3-orthyméthyl dopamine (3-OMD), un produit du catabolisme de la lévodopa, dans le LCR des patients atteints de SJSR sont corrélés à une augmentation de l'acide homovanillique (HVA)⁴⁹⁰, un métabolite du catabolisme de la dopamine. Les deux augmentations résultent probablement d'une augmentation de l'activité de la tyrosine hydroxylase, la protéine responsable de la synthèse de la dopamine⁴⁸⁸. On pense que l'augmentation ultérieure de la production de dopamine conduit à une régulation négative post-synaptique du récepteur D2, comme le démontrent la tomographie par émission de positons et la tomographie par émission de photons uniques dans le striatum^{491,492}. En outre, les techniques de tomographie par émission de 11C-méthylphénidate et de positons ont démontré que dans le striatum, les niveaux de transporteur de dopamine lié à la membrane, responsable de la recapture de la dopamine au terminal présynaptique, étaient réduits⁴⁹³. Cela pourrait être une conséquence de l'augmentation de la production de dopamine pour se rapprocher de l'équilibre homéostatique de la dopamine intracellulaire dans les neurones dopaminergiques⁴⁹⁴.

3. Maladie de Parkinson

La prévalence du SJSR chez les patients atteints de la MP varie considérablement, de 0 à 50% selon les cohortes⁴⁹⁵, ce qui donne une prévalence moyenne de 16%⁴⁹⁶. Comme mentionné précédemment, les traitements dopaminergiques sont bénéfiques pour les symptômes du SJSR conduisant à une sous-estimation probable du nombre de cas. Dans une grande majorité, voire chez tous les patients parkinsoniens, l'apparition du SJSR survient avec ou après les symptômes moteurs⁴⁹⁷⁻⁴⁹⁹. Cependant, les patients atteints du SJSR présentant des symptômes plus de 15 fois par mois ont un risque accru de développer la MP^{500,501}. Une corrélation a été établie entre la durée de la maladie et la présence de SJSR⁵⁰² mais les analyses montrent que seule la durée du traitement est un prédicteur de ce syndrome. En effet, les traitements dopaminergiques prolongés chez les patients atteints de SJSR peuvent induire un phénomène appelé augmentation dans lequel la gravité des symptômes augmente⁵⁰³ et des mécanismes similaires pourraient conduire à une augmentation de la fréquence du SJSR chez les patients atteints de la MP⁴⁹⁵. Chez les patients parkinsoniens, la présence du SJSR ne semble pas influencer la qualité du sommeil⁴⁹⁸ ou la somnolence diurne^{497,504}. Enfin, l'occurrence de mouvements périodiques des membres lors du sommeil est similaire chez les patients parkinsoniens avec ou sans SJSR⁵⁰⁵.

4. Démence à corps de Lewy

Seules quelques études se concentrent sur le SJSR dans la démence à corps de Lewy, mais aucune donnée n'est établie sur la prévalence, sur le lien avec la gravité de la maladie, ou sur d'autres caractéristiques qui pourraient indiquer des différences avec d'autres synucléinopathies.

5. Atrophie multisystématisée

La prévalence du SJSR chez les patients AMS, tout comme chez les patients parkinsoniens, est difficile à estimer. Elle varie de 5 à 28% avec une prévalence moyenne de 17%^{433,496}. Les patients atteints de l'AMS-P semblent être plus affectés par les symptômes du SJSR que les patients atteints de l'AMS-C^{433,506}, mais des cohortes plus importantes sont nécessaires pour évaluer cette différence. Les SJSR ne sont pas associés à l'efficacité du sommeil, à la somnolence diurne ou à l'apparition de mouvements périodiques des membres lors du sommeil⁵⁰⁶.

IV. Modèles animaux de synucléinopathies

La compréhension des nombreux processus impliqués dans les symptômes non moteurs contraste avec les mécanismes relativement bien établis à la base des symptômes moteurs dans les

synucléinopathies, c'est-à-dire la dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques dans le SNpc qui se projettent vers le striatum. Les modèles animaux représentent ainsi un outil pour étudier les comorbidités non-motrices. Cependant, la complexité des troubles du sommeil, tant les manifestations comportementales que les cellules et les structures anatomiques impliquées, rendent les modèles difficiles à établir. Par ailleurs, la plupart des espèces modèles étant des rongeurs, les différences avec l'architecture du sommeil humain doivent être prises en compte pour l'interprétation des résultats.

A. Différences des cycles éveil/sommeil entre humains et rongeurs

Le sommeil chez l'Homme est qualifié de monophasique, c'est-à-dire qu'il n'y a qu'une période de sommeil qui dure entre 7 et 8h au cours de la nuit (Tableau 1). C'est également le cas du sommeil des primates. Au contraire, le sommeil des rongeurs est polyphasique. En effet, bien que la nuit soit associée à une période d'éveil et le jour à une période de sommeil, les rongeurs s'endorment et se réveillent plus ou moins tout au long des 24h d'un cycle éveil/sommeil complet (Fig. 2). De plus, les rongeurs ne présentent qu'un stade de sommeil, le sommeil profond ou SWS (slow wave sleep), contrairement à l'Homme et au primate qui en ont 3, à savoir stade 1 : endormissement ; stade 2 : sommeil léger ; stade 3 : sommeil profond. Ces différences sont à prendre en compte dans l'analyse du sommeil des rongeurs notamment concernant le caractère polyphasique du sommeil.

B. Altérations des cycles éveil/sommeil dans les modèles animaux de synucléinopathies

Les études du sommeil sur des modèles animaux sont relativement rares en comparaison de celles réalisées chez l'Homme puisque le sommeil peut être étudié chez l'humain via la polysomnographie qui est une technique non invasive. Cependant, pour comprendre l'impact des altérations des cycles éveil/sommeil sur le développement de maladies telles que les synucléinopathies, les modèles animaux restent nécessaires. Ces altérations, de même que d'autres symptômes non-moteurs comme les troubles gastriques et l'hyposmie surviennent en effet bien avant que le diagnostic soit posé, limitant par conséquent l'étude du sommeil chez les patients.

Plusieurs types de modèles de synucléinopathies existent : des modèles de synucléinopathie secondaire induits par des toxines comme la 6-OHDA ou le MPTP, des modèles dits primaires induits par des vecteurs viraux, modèles transgéniques ou des modèles basés sur la transmission de matériel pathologique comme de l' α -syn agrégée.

Les modèles induits par des toxines (MPTP⁵⁰⁷⁻⁵¹¹, 6-OHDA⁵¹²⁻⁵¹⁹, roténone⁵²⁰, cycade⁵²¹, saporine⁵²²) sont les premiers à avoir été étudiés. Ils sont dits secondaires car la synucléinopathie qu'ils présentent est partielle et présente en réaction à la mort neuronale induite directement le plus souvent par altérations de la chaîne mitochondriale respiratoire. L'injection de ces produits, en intrapéritonéale ou en intracérébral, induit directement la mort des neurones dopaminergiques, neurones cibles dans la maladie de Parkinson. De tels modèles peuvent présenter les altérations motrices typiques de la maladie et ont été très utiles pour en comprendre les mécanismes de base. Cependant, ils ne reproduisent pas son développement physiopathologique, et notamment concernant la pathogénicité de l' α -syn. Par ailleurs, la mort neuronale survient relativement rapidement, par exemple 7 jours après les injections de MPTP chez la souris⁵⁰⁸. Or, comme décrit précédemment, le développement des synucléinopathies chez l'Homme peut s'étendre sur plusieurs décennies en incluant les symptômes non moteurs.

Des études des cycles éveil/sommeil ont toutefois été menées chez ces modèles dans le contexte de l'étude de l'effet d'une déplétion dopaminergique sur ce même cycle. Aucun résultat clair n'en ressort en fonction de la dose administrée, de la structure visée et du protocole. En effet, les rats 6-OHDA injectés dans le ventricule latéral vont passer moins de temps éveillé et plus de temps en sommeil NREM en phase active⁵¹⁴ alors que ceux injectés dans le MFB passent moins de temps en sommeil NREM⁵¹⁶. De même, les souris MPTP ayant reçu plusieurs injections ne présentent pas d'altérations⁵⁰⁸, alors que d'autres n'en n'ayant reçu qu'une passent plus de temps éveillé et moins de temps en sommeil NREM dans la période associée au sommeil⁵⁰⁹.

Les modèles induits par des toxines n'apparaissent donc pas comme étant les plus adéquats pour l'étude des altérations du sommeil dans le cadre de la modélisation des synucléinopathies.

Les modèles transgéniques consistent pour une grande majorité à surexprimer la protéine d'intérêt des synucléinopathies, l' α -syn. Certains permettent de modéliser la maladie de Parkinson (Thy1 α -syn mouse⁵²³ ; α -syn BAC mouse⁵²⁴), d'autres la démence à corps de Lewy (PDGF promoter-driven h α -syn mouse⁵²⁵ ; tTA/ α -syn mouse⁵²⁶), et enfin d'autres l'atrophie multisystématisée (PLPh α -syn mouse⁵²⁷ ; CNPh α -syn mouse⁵²⁸ ; MBPh α -syn mouse⁵²⁹). Des modèles basés sur le même principe de surexpression nécessitent quant à eux l'inoculation de vecteurs viraux⁵³⁰⁻⁵³².

Chez certains de ces modèles, la surexpression de l' α -syn ou de sa forme phosphorylée est très importante au regard de ce qu'on peut observer chez les patients^{524,525,533}. Cette surexpression peut aussi ne pas être restreinte aux régions d'intérêt pour les synucléinopathies^{523,524,527}. Bien que des études du sommeil aient été réalisées avec ces modèles^{524,534,535}, ils ne semblent pas être les plus

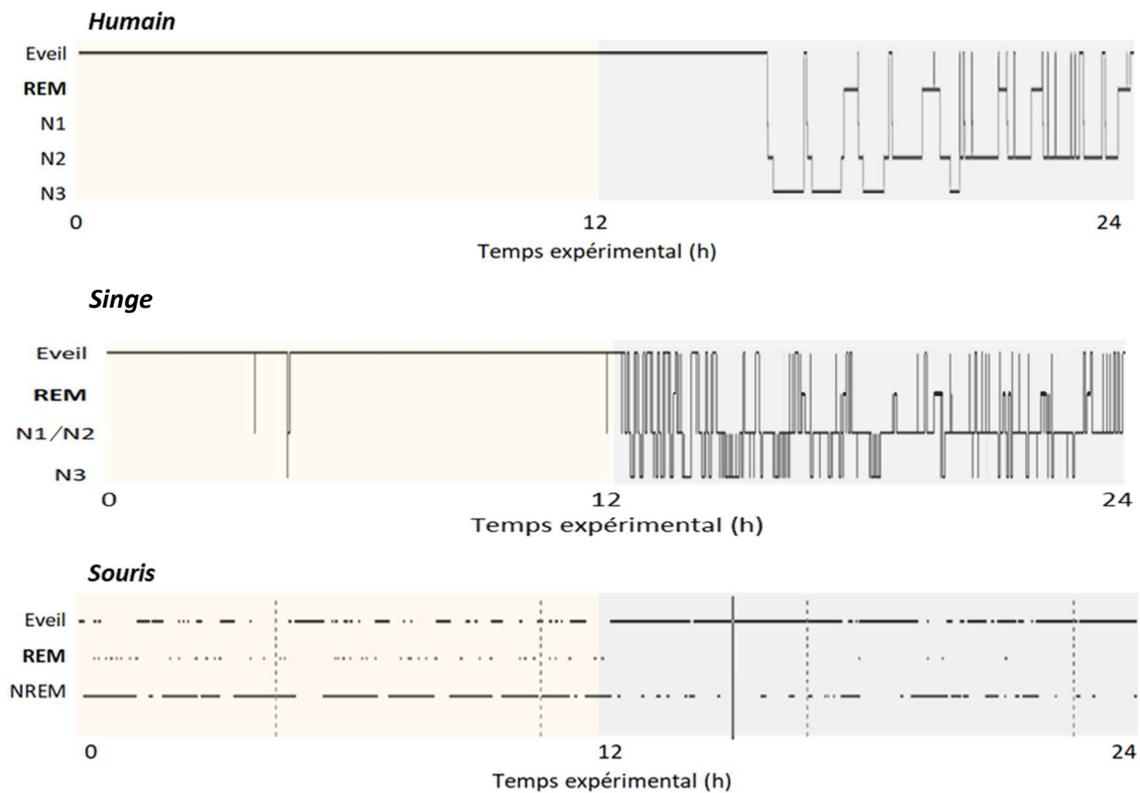


FIGURE 2. ORGANISATION PHYSIOLOGIQUE DU CYCLE EVEIL/SOMMEIL CHEZ L'HOMME, LE SINGE ET LA SOURIS. REM : RAPID EYE MOVEMENT ; N1 : STADE 1 DU SOMMEIL NON-REM (NREM) ; N2 : STADE 2 DU SOMMEIL NREM ; N3 : STADE 3 DU SOMMEIL NREM.

TABEAU 1. DIFFERENCE DANS L'ORGANISATION DU CYCLE EVEIL/SOMMEIL CHEZ L'HOMME, LE SINGE ET LA SOURIS

	Homme	Singe	Souris
Phase principale de sommeil	Nuit	Nuit	Jour
Modèle de sommeil	Monophasique	Monophasique	Polyphasique
Durée quotidienne de sommeil	7 - 8h	11 - 14h	12 - 15h
Durée moyenne d'un cycle de sommeil (NREM-REM) (min)	90 min	60 min	2 - 4min
Phases du cycle	Eveil Sommeil NREM (3 stades) Sommeil REM	Eveil Sommeil NREM (3 stades) Sommeil REM	Eveil Sommeil NREM (SWS) Sommeil REM
% d'éveil sur 24h	70	51	48
% de sommeil NREM sur 24h	17 (stade 1/2) 7 (stade 3)	34 (stade 1/2) 9 (stade 3)	47
% de sommeil REM sur 24h	5	6	4

Les données présentées sont basées sur l'espèce *Mus musculus* pour la souris et sur *Macaca Mulatta* pour le singe⁵³⁶⁻⁵³⁹. REM : mouvements oculaires rapides ; NREM : absence de mouvements oculaires rapides ; SWS : sommeil à ondes lentes.

adaptés compte tenu de l'implication de très nombreuses structures cérébrales dans la régulation des cycles éveil/sommeil.

D'autres modèles sont eux basés sur une mutation de la protéine LRKK2^{540,541}, la mutation G2019S, décrite dans des formes familiales de MP et dans certaines formes idiopathiques⁵⁴², ou encore sur une déficience d'un transporteur de la dopamine VMAT2⁵⁴³. Dans les modèles LRKK2, aucun changement d'expression d' α -syn n'est détecté, et la faible accumulation d' α -syn observée dans le modèle déficient en VMAT2 semble secondaire à l'oxydation des métabolites de la dopamine.

Dans l'ensemble, les modèles transgéniques ou basés sur l'inoculation de vecteurs viraux ne sont pas liés à une propagation de l' α -syn, pourtant caractéristique des synucléinopathies. C'est en revanche le cas des modèles dits de transmission.

Les modèles de transmission consistent en l'injection de fibrilles préformées d' α -syn (PFF) formées de monomères recombinants⁵⁴⁴⁻⁵⁴⁶, ou de matériel pathologique issus de patients atteints de synucléinopathies^{533,547,548}. Les modèles induits par des PFF montrent à la fois une dégénérescence de la voie nigrostriatale et une surexpression d' α -syn basée sur la propagation de la synucléinopathie, c'est bien l'injection du matériel pathologique qui engendre ces changements, et non pas seulement une surexpression de la protéine d'intérêt. Le modèle mis au point par l'équipe de Shen et al. est intéressant car les PFF injectés sont issus d' α -syn humaine⁵⁴⁵, mais la région localisée, à savoir le SLD qui est important dans la régulation du sommeil paradoxal, n'est pas forcément la plus pertinente dans le contexte des synucléinopathies, cette structure n'ayant pas été démontrée comme particulièrement affectée par ces maladies.

Pour être au plus proche de la pathologie telle qu'elle est observée chez l'Homme, il faut tenir compte du fait que les inclusions pathologiques ne sont pas seulement constituées d' α -syn mais de plusieurs centaines de protéines (Ubiquitin, Parkin ; PINK1 ; Synphilin-1 ; CaMKII)⁵⁴⁹. C'est pourquoi d'autres modèles de transmission ont été mis au point via l'injection de matériel pathologique directement issus de patients. Dans le cas de la maladie de Parkinson, le modèle LB, consistant en l'injection de fractions contenant des corps de Lewy et issus du cerveau de patients parkinsoniens⁵³³, montre une dégénérescence de la voie nigrostriée après 4 mois post-injection. Cette fenêtre de temps est un avantage pour l'étude des symptômes prodromaux. De plus, l'augmentation de l' α -syn observée dans la SNpc concerne la protéine murine, alors que le matériel injecté est d'origine humaine. Le fait que l'injection de LB dénué de la protéine d' α -syn n'induit pas cette augmentation confirme le fait que ce modèle soit basé sur la propagation de l' α -syn, contrairement aux autres types de modèles existants. Ce modèle apparaît donc être le plus pertinent pour étudier la maladie de Parkinson, y compris les altérations des cycles éveil/sommeil.

Concernant la démence à corps de Lewy et l'atrophie multisystématisée, des modèles similaires ont été mis au point, mais nécessitent d'autres analyses, notamment concernant la dégénérescence neuronale qui n'a pas été étudiée. Une bonne connaissance du modèle est requise avant de pouvoir étudier des symptômes non-moteurs, et notamment l'implication des altérations du sommeil dans le développement de la pathologie.

L'utilisation des modèles animaux pour étudier les cycles éveil/sommeil dans les synucléinopathies est encore à l'heure actuelle limitée. D'une part, comme la finalité concerne l'Homme et qu'il est possible via des enregistrements polysomnographiques d'étudier le sommeil de manière non invasive, les études cliniques sont largement majoritaires. D'autre part, il n'existe pas de modèle animal idéal de la maladie de Parkinson, de la démence à corps de Lewy ou de l'atrophie multisystématisée. Il faut donc déterminer celui qui sera le plus pertinent au regard de l'étude à réaliser. De nombreuses recherches sont encore nécessaires pour arriver à cette finalité et les travaux présentés ici ont pour but d'y participer.

Model	Species	Procedure	Degeneration	Synucleinopathy	Wake	NREM sleep	REM sleep	Ref.	
Neurotoxin and pharmacological-based model	6-OHDA model	Mouse ♂	Unilateral injection in the MFB (0.7; 1 and 3.6 µg/µL)	<p>↘ DA neurons in the SNpc (57.2% ; 55.5% and 90.5% respectively)</p> <p>↘ DA fibers in the striatum (89.3%; 48.2% and 45.0% respectively)</p>	NI	NI	NI	Boix 2015	
		Mouse ♂	Bilateral injection in the striatum (4 µg/µL) Activity recordings 4 weeks after toxin treatment	NI	NI	<p>↘ total active time/24h</p> <p>= active time in light</p> <p>↘ active time in dark</p>	NI	Masini 2017	
		Rat ♂	Unilateral Injection in the lateral ventricle (200 µg/20µL) Sleep recordings at D11 after toxin treatment	↘ DA levels in the striatum (20%)	NI	↘ in light	↗ in light	= in light	Monti 1999
		Rat ♂	Bilateral injection in the VTA (10 mg/2 mL) + desipramine (25 mg/kg) Sleep recordings 4 weeks after toxin treatment	↘ DA neurons in the VTA = DA neurons in the SNpc	NI	<p>↘ in dark</p> <p>= in light</p>	↗ in dark = in light	↗ in dark ↘ in light	Sakata 2002
		Rat ♀	Unilateral injection in the MFB (12 mg/4 mL) + desipramine Sleep recordings 2 weeks after toxin treatment	↘ DA neurons in the SNpc (≥95%)	NI	<p>↗ /24h</p> <p>(↗ bout number)</p> <p>↗ muscle activity/24h</p>	<p>↘ /24h</p> <p>(↘ bout number)</p> <p>↘ in light</p>	<p>↘ /24h</p> <p>(= bout number)</p> <p>↘ in light</p>	Vo 2014
		Rat ♂	Bilateral injections in the striatum (12 µg/0.5 µL) Sleep recordings 8 weeks after toxin treatment	<p>↘ DA neurons in the SNpc (~75%)</p> <p>↘ orexin neurons in the LH (27 to 39%)</p>	NI	= /24h or /12h	= /24h or /12h	= /24h or /12h	Oliveira 2018

TABLEAU 2. MODELES DE LA MALADIE DE PARKINSON

TABEAU 2. MODELES DE LA MALADIE DE PARKINSON (SUITE)

Model	Species	Procedure	Degeneration	Synucleinopathy	Wake	NREM sleep	REM sleep	Ref.	
Neurotoxin and pharmacological-based model	6-OHDA model	Rat ♂	Unilateral injection in the SNpc (24 µg/µL) Sleep recordings 2 weeks after toxin treatment	↘ DA neurons along the SNpc rostro-caudal axis (56 to ≥92%)	NI	↗ in light (/6h) (↗ bout number and duration)	= in light	= in light	Ciric 2019
		Mouse ♂	Five daily systemic injections (i.p. ; 25 mg/kg) Sleep recordings from D20 after toxin treatment	↘ DA neurons in the SNpc (~30%)	NI	= /24h (↗ bout duration ; ↘ bout number)	= /24h (= bout number and duration)	↗ in light and dark (↗ bout duration ; = bout number)	Monaca 2004
	MPTP model	Mouse ♂	Five daily systemic injections (i.p. ; 25 mg/kg) Sleep recordings 20 days and D40 after toxin treatment	From D7 and up to D60 after toxin treatment: ↘ DA neurons in the SNpc (~25%) ↘ DA fibers in the striatum (<50%) = DA neurons in the VTA	NI	= /24h or /12h	= /24h or /12h	↗ in dark (↗ bout number) at D20, not at D40	Laloux 2008
		Mouse	One systemic injection (s.c. ; 40 mg/kg) Sleep recordings at D7 and D14 after toxin treatment	After 17 days: ↘ DA neurons in the SNpc (78%) ↘ DA neurons in the VTA (54%)	NI	↗ in dark at D14 = in light	↘ in dark at D14 = in light	= in light and dark	Revishchin 2016
		Rat ♂	Bilateral microinjections in the SNpc (200 µg/2 µL) Sleep recordings for 5 days after toxin treatment	↘ DA neurons in the SNpc (50%)	NI	NI	↘ of latency in light and dark up to D5 after lesion ↗ in dark at D2 and D3 = in light	↗ of latency in light and dark only at D1 ↘ in light and dark at D1 ↘ in light at D2	Lima 2007
		Monkey ♂	Four daily systemic injections (i.v. ; 0.5 mg/kg) Sleep recordings for 35 days with injections from D15 to D19	↘ DA + metabolites (DOPAC; HVA) levels in putamen (>95%) 90 days after the end of chronic injections	NI	NI	↗ in light	↘ over TST	Barraud 2009

Model	Species	Procedure	Degeneration	Synucleinopathy	Wake	NREM sleep	REM sleep	Ref.
Neurotoxin and pharmacological-based model	Rotenone model	Rat ♂ Infusion 3 mg/kg/day (pump under the back skin) for 28 days	↓ DA neurons in the SNpc (70%)	NI	↓ in dark (= bout number and duration) ↗ in light (= bout number and duration)	↗ in dark (↗ bout duration ; = bout number) ↓ in light (↓ bout number ; = bout duration)	↗ in dark (↗ bout number ; = bout duration)	Yi 2007
	Cycad model	Rat ♂ Feeding with pellet (1.25 g) for 22 weeks Sleep recordings 7 days after toxin treatment	↓ DA neurons in the SNpc and DA fibers in the striatum at 16 weeks ↓ DA + metabolites (DOPAC; HVA) levels in the striatum at 18 weeks ↓ orexin neurons in the LH at 22 weeks	α-syn aggregation in the striatum at 22 weeks	↓ in light (↗ bout number ; ↓ bout duration) = in dark (= bout number and duration)	↗ in dark (↗ bout duration ; = bout number) = in light (= bout number and duration)	↗ in dark (↗ bout number ; = bout duration) = in light (= bout number and duration)	McDowell 2010 Shen 2010
	Hypocretin2-saporin model	Rat ♂ Bilateral injection in the SNpc (184 ng/μL) and/or in the VTA (184 ng/μL) Sleep recordings at D2, D4, D6, D14 after toxin treatment	Non selective neuronal depletion in both regions	NI	↗ in light at D4 and D6 in SN+VTA-lesion and SN-lesion rats ↗ in dark at D4 in SN-lesion rats; at D2 and D4 in SN+VTA-lesion rats	↓ in light at D4 and D6 in SN+VTA-lesion and SN-lesion rats ↓ in dark at D4 in SN+VTA-lesion and SN-lesion rats	↓ in light at D4 and D6 in SN+VTA-lesion and SN-lesion rats ↓ in dark at D4 in SN+VTA-lesion and SN-lesion rats	Gerashchenko 2006
Transgenic model	Thy1-α-syn model	Mouse ♂ Transgenic mouse Sleep recordings at 9-10 mo	At 14 mo: ↓ DA levels in the striatum (40%) ↓ DA fibers in the striatum (~20%) At 22 mo : = DA neurons in the SNpc	At 5 mo : ↗ α-syn in the SNpc (x3.4) ↗ pS129 α-syn in numerous brain regions	↗ active time in dark (= bout number and duration) = in light (= bout number and duration)	= in dark (↗ bout duration; = bout number) ↗ in light (↗ bout duration ; = bout number)	↓ in dark (↓ bout number; = bout duration) ↗ in light (= bout number and duration)	Chesselet 2012 McDowell 2014

TABLEAU 2. MODELES DE LA MALADIE DE PARKINSON (SUITE)

TABEAU 2. MODELES DE LA MALADIE DE PARKINSON (SUITE)

Model	Species	Procedure	Degeneration	Synucleinopathy	Wake	NREM sleep	REM sleep	Ref.	
Transgenic model	VMAT2-deficiency model	Mouse ♂/♀	Transgenic mouse Only behavioral sleep evaluated	Progressive ↓ DA levels in the striatum (85% at 2 mo; 98% at 12 mo) ↓ DA fibers in the striatum at 18 mo (25%) Progressive ↓ DA neurons in the SNpc (12% at 18 mo; 26% at 26 mo)	↗ α-syn accumulation at 22 mo	NI	↓ Sleep latency from 2 mo	NI	Caudle 2007 Taylor 2009
	α-syn BAC model	Mouse ♂	Transgenic mouse Sleep recordings from 20 to 55 mo	Progressive ↓ DA neurons from 9 mo (17.1% at 18 mo)	At 18 mo, in the whole brain: ↗ α-syn (x2.5) ↗ pS129 α-syn (x5.5)	= /24h	= /24h	= /24h ↗ EMG variances at 11 and 13 mo (tendency from 5 mo)	Taguchi 2020
	LRRK2-G2019S model	Mouse ♂	Transgenic mouse Sleep recordings at 8-10 mo	= DA neurons in the SNpc ↓ DA metabolites level (ratio HVA/DA) at 18 mo	NI	NI	= /24h (↗ bout duration ; ↓ bout number)	NI	Yue 2015 Crown 2020
Viral vector-based model	AAV2/9-p.A53T-hα-syn model	Mouse ♂	Unilateral injection in the SNpc (120 nL - 7×10 ¹² vg/mL)	↓ DA neurons in the SNpc (30%) ↓ DA fibers in the striatum	↗ hα-syn in the SNpc and the striatum	NI	NI	NI	Bourdenx 2015

TABEAU 2. MODELES DE LA MALADIE DE PARKINSON (SUITE)

Model	Species	Procedure	Degeneration	Synucleinopathy	Wake	NREM sleep	REM sleep	Ref.
Viral vector-based model	Rat ♂	Unilateral injection in the SNpc (2 µL - 7×10 ¹² vg/mL)	Progressive ↘ DA neurons in the SNpc (50% at 1 weeks; 80% at 16 weeks) Progressive ↘ DA fibers in the striatum	Progressive ↗ hα-syn in the SNpc and the striatum	NI	NI	NI	Bourdenx 2015
	Monkey ♂	Unilateral injection in the SNpc (4 µL - 7×10 ¹² vg/mL) Young: 1-2 yo Old: 6 yo	<ul style="list-style-type: none"> Young: = DA neurons in the SNpc (13%) = DA fibers in the striatum (caudate 8% ; putamen 23%) Old: ↘ DA neurons in the SNpc (20%) ↘ DA fibers in the striatum (caudate 11% ; putamen 15%) 	<ul style="list-style-type: none"> Young: ↗ hα-syn in the SNpc and the striatum Old: ↗ hα-syn in the SNpc and the striatum 	NI	NI	NI	Bourdenx 2015
	Rat ♂	Unilateral injection in the striatum (2µL - 2.3×10 ⁹ vp/µL)	Progressive ↘ DA neurons in the SNpc (~10% at D10; ~20% at D42) ↘ DA fibers in the striatum (~10% at D21)	= α-syn accumulation and aggregation in the SNpc at D42	NI	NI	NI	Dusonchet 2011
Transmission model	Mouse ♂	Unilateral injection in the SNpc (2µL) Purification by a sucrose gradient fractionation	Progressive ↘ DA neurons in the SNpc (~30% at 4 mpi; ~40% at 17 mpi) Progressive ↘ DA fibers in the striatum (~25% at 4 mpi; ~30% at 17 mpi) No changes with LB depleted in α-syn	At 4 mpi: ↗ mα-syn in the SNpc (x1.4) ↗ pSyn in the SNpc (x7) and the striatum (x1.3) No changes with LB depleted in α-syn	NI	NI	NI	Recasens 2014

TABEAU 2. MODELES DE LA MALADIE DE PARKINSON (SUITE ET FIN)

Model	Species	Procedure	Degeneration	Synucleinopathy	Wake	NREM sleep	REM sleep	Ref.	
Transmission model	LB model	Monkey  Unilateral injection in the striatum (100 µL) Unilateral injection in the SNpc (10µL; 2 sites) Purification by a sucrose gradient fractionation	<ul style="list-style-type: none"> • Striatal injection; at 14 mpi: <ul style="list-style-type: none"> ↳ DA fibers in the striatum (caudate: 45%; putamen: 25%) ↳ DA neurons in the SNpc (40%) • Nigral injection; at 14 mpi: <ul style="list-style-type: none"> ↳ DA fibers in the striatum (caudate: 50%; putamen: 50%) ↳ DA neurons in the SNpc (15%) 	<ul style="list-style-type: none"> • Striatal injection: <ul style="list-style-type: none"> at 14 mpi: <ul style="list-style-type: none"> ↗ α-syn in numerous brain region (caudate : x1.1; putamen : x1.3) 	NI	NI	NI	Recasens 2014	
	PFF-induced model	Mouse 	Unilateral injection in the striatum (1 µg/µL)	Progressive ↳ DA neurons in the SNpc (15% at 3 mpi; 35% at 6 mpi) ↳ DA fibers in the striatum (~30% at 6 mpi) Progressive ↳ DA level in the striatum (40% at 3 mpi; 55% at 6 mpi)	Progressive ↗ α-syn and pS129 α-syn in the striatum from 1 mpi	NI	NI	NI	Luk 2012
		Mouse 	Bilateral injection of hα-syn PFF in the SLD (200µL ; 5mg/mL) Sleep recording after 7 days of recovery and for 3 months	Progressive ↳ DA neurons in the SNpc (~18% at 3 mpi; ~50% at 8 mpi) Progressive ↳ DA fibers in the striatum (~14% at 1 mpi; ~35% 8 mpi) Progressive ↳ DA level in the striatum (~30% at 3 mpi; ~60% 8 mpi)	Progressive ↗ pS129 α-syn in the striatum (x2 at 1 mpi; x4 at 3 mpi)	NI	NI	↗ motor events (x6 at 1 mpi; x10 at 3 mpi)	Shen 2020
		Rat 	Unilateral injection of mα-Syn PFFs in the striatum (2 µg/µL)	Bilateral ↳ DA neurons in the SNpc (ipsi : 33% at 2 mpi; 26% at 4 mpi; 23% at 6 mpi; contra: 40% at 2 mpi; 20% at 4 and 6 mpi) Bilateral ↳ DA fibers in the striatum (ipsi: 80% at 2 mpi; 49% at 6 mpi; contra: 71% at 2 mpi; 46% at 6 mpi)	Progressive ↗ α-syn and pS129 α-syn in the striatum and the SNpc from 1 mpi and up to 6 mpi	NI	NI	NI	Paumier 2015

NI: not investigated; mo: month-old; mpi: month post-injection; SNpc: substantia nigra pars compacta; SLD: sublaterodorsal nucleus; ipsi: ipsilateral; contra: contralateral; PFF: preformed fibrils; NREM: Non Rapid Eye Movement; REM: Rapid Eye Movement; DA : dopaminergic; hα-syn: human α-syn; mα-syn: murine α-syn; LB: lewy bodies.

TABIEAU 3. MODELES DE LA DEMENCE A CORPS DE LEWY

Model	Species	Procedure	Degeneration	Synucleinopathy	Wake	NREM sleep	REM sleep	Ref.	
Transgenic model	D-line PDGF promoter-driven h α -syn model	Mouse ♂/♀	Transgenic mouse	NI	Progressive \nearrow h α -syn in the cortex (x25 at 3 mo; x45 at 12 mo), in the hippocampus (x20 at 3 mo; x40 at 12 mo), in the striatum (x10 at 3 mo; x20 at 12 mo), In the SNpc (x5 at 3 mo; x10 at 12 mo)	NI	NI	NI	Amschl 2013
	tTA/ α -syn model	Mouse ♂/♀	Transgenic mouse	\searrow NeuN+ neurons in the cortex, the DG and the hippocampus CA1 at 20 mo	Progressive \nearrow α -syn in limbic areas (cingulate cortex, hippocampus, DG) from 4 mo	NI	NI	NI	Lim 2011
Viral mediated model	rAAV-h α -syn model	Rat ♂	Unilateral injection in the lateral cerebral ventricle (10 μ g/10 μ L) Bilateral injection of A β ₁₋₄₂ solution in the prefrontal cortex (5 μ g/2.5 μ L; 2 sites)	\searrow neuronal density in the hippocampal CA1 (~14% at 1 mpi)	\nearrow α -syn in the DG (x6 at 1 mpi)	NI	NI	NI	Ho 2018
Transmission model	Brain-derived exosomes from DLB patients	Mouse ♂	Unilateral injection in the hippocampus (~2 μ L)	NI	\nearrow α -syn (x3.5 at 1 mpi) \nearrow pS129 α -syn (x4 at 1 mpi)	NI	NI	NI	Ngolab 2017

NI: not investigated; mo: month-old; mpi: month post-injection; SNpc: substantia nigra pars compacta; DG: dentate gyrus; NREM: Non Rapid Eye Movement; REM: Rapid Eye Movement; DA : dopaminergic; h α -syn: human α -syn; m α -syn: murine α -syn.

TABEAU 4. MODELES DE L'ATROPHIE MULTISYSTEMATISEE

Model	Species	Procedure	Degeneration	Synucleinopathy	Wake	NREM sleep	REM sleep	Ref.
Neurotoxin-based model 6OHDA model	Rat ☞	Unilateral Injection in the left MFB (8µg) + QA (75nmol) in the dorsal striatum after 2 weeks	<ul style="list-style-type: none"> ↘ DA neurons in the SNpc (96% at 5 mpi) ↘ DARPP-32+ neurons in the striatum (64% at 5 mpi) 	NI	NI	NI	NI	Puschban 2005
Transgenic models	Mouse ☞	Transgenic mouse Sleep recordings at 13-20 weeks (young mice) or at 40-51 weeks (adult mice)	<ul style="list-style-type: none"> ↘ DA neurons in the SNpc (~25% at 6 mo) ↘ DA fibers in the striatum (~45% at 12 mo) ↘ neurons in the inferior olives (~15% at 12 mo) 	↗ α-syn in the whole brain (x8 at 2 mo)	Young mice: = in light and dark Adult mice: = in light and dark	Young mice: = in light and dark Adult mice: = in light and dark	Young mice: ↗ in light and = in dark Adult mice: = in light and dark ↗ motor events in young PLP-syn mice	Hartner 2017 Refolo 2018
	Mouse ☞/☞	Transgenic mouse	<ul style="list-style-type: none"> = DA neurons (at 24 mo) ↘ neurons in the spinal cord (~25% at 24 mo) ↘ oligodendrocytes in the spinal cord (~40% at 24 mo) 	↗ hα-syn in oligodendrocytes in cerebellum and in the spinal cord (at 18 mo)	NI	NI	NI	Yazawa 2005
	Mouse	Transgenic mouse	<ul style="list-style-type: none"> = DA neurons in the SNpc (at 4mo) ↘ DA fibers in the basal ganglia (line 29: ~55% at 4 mo) 	↗ hα-syn in oligodendrocytes in cortical and subcortical regions (at 4 mo)	NI	NI	NI	Shults 2005
Viral vector-based model AAV-MBP-hα-syn model	Rat ☞	Bilateral injection in the striatum (10µL - 2.33x10 ¹³ vg/mL)	<ul style="list-style-type: none"> Progressive ↘ DA neurons (~42% at 3mpi; ~66% at 6 mpi) ↘ NeuN+ neurons in the striatum (~23% at 6 mpi) 	<ul style="list-style-type: none"> ↗ hα-syn expression and accumulation in the SNpc ↗ pS129 α-syn in the SNpc and the striatum from 3 mpi 	NI	NI	NI	Bassil 2017
Transmission model BG-extracted from MSA patients	Mouse	Unilateral injection in the right parietal lobe (30 µL 1% homogenate) in TgM83+/- mouse	NI	↗ pS129α-syn in the SNpc, the BG, and the pons (5% in average)	NI	NI	NI	Prusiner 2015

NI: not investigated; mo: month-old; mpi: month post-injection; SNpc: substantia nigra pars compacta; MFB: medial forebrain bundle; BG: basal ganglia; NREM: Non Rapid Eye Movement; REM: Rapid Eye Movement; DA: dopaminergic; hα-syn: human α-syn; mα-syn: murine α-syn; QA: quinolinic acid.

Objectif

A. Objectif

L'objectif de ce projet est de trouver un modèle permettant d'étudier les altérations du sommeil telles qu'elles sont décrites dans la maladie de Parkinson et de l'atrophie multisystématisée. Il faut pour cela caractériser les cycles éveil/sommeil dans les modèles utilisés et déterminer s'ils présentent des altérations de ces cycles.

B. Choix des modèles

Les critères sélectionnés pour déterminer les modèles les plus adéquats sont les suivants :

- une progression dans le temps lente pour mimer au mieux la maladie et pour permettre d'avoir la fenêtre temporelle la plus large pour agir sur les altérations du sommeil
- une neurodégénérescence nigrostriatale
- des changements d'expression de l' α -synucléine
- une propagation de la synucléinopathie
- et dernier critère qui a son importance, la disponibilité du modèle et du matériel pour enregistrer le sommeil.

Pour l'étude de la maladie de Parkinson chez le rongeur, le modèle utilisé est la souris injectée avec fractions contenant des LB. Ce modèle présente une lésion faible mais significative au niveau de la substance noire à 4 mois post-injection tout à fait adapté pour étudier des symptômes prodromaux tels que les troubles du sommeil. Ce modèle montre aussi des changements dans l'expression de l' α -syn dans les structures affectées par la maladie de Parkinson, et une progression de la maladie liée à l' α -syn. De plus, concernant l'aspect plus pratique, on dispose de ce modèle au laboratoire et le matériel qui permet l'étude du sommeil est disponible pour la souris et non pour le rat.

Pour l'étude de l'atrophie multisystématisée chez le rongeur, le modèle utilisé est la souris PLP-syn. C'est une souris transgénique qui surexprime l' α -syn humaine sous le contrôle d'un promoteur PLP oligodendrogial, PLP pour proteolipid protein. Parmi les modèles existants, ce modèle est celui qui mime au mieux l'AMS. Il présente une lésion au niveau de la substance noire qui est significative à l'âge de 6 mois, des troubles moteurs à 1 an ainsi que des troubles du système végétatif notamment des troubles respiratoires. De plus ce modèle était disponible au laboratoire où il faisait déjà l'objet de projets de recherche.

Matériels et méthodes

Animaux

Des mâles C57bl/6 (WT) ont été maintenus dans des conditions d'hébergement standard avec un cycle lumière obscurité de 12h/12h avec un accès ad libitum à l'eau et la nourriture à une température d'environ 21°C. Pour tous les différents projets, les souris sont habituées pendant une semaine à l'animalerie avant toute manipulation.

Des mâles PLP-syn ou sauvages issues de la même lignée (WT) ont été maintenus dans les mêmes conditions d'hébergement. La reproduction étant assurée au laboratoire, les souris ont été habituées à une semaine d'habitué dans la zone d'hébergement avant toute manipulation.

Les procédures expérimentales ont été réalisées conformément à la directive européenne 2010/63 / UE et approuvées par le comité d'éthique national pour le soin et l'utilisation des animaux (#14366 ; #22418 ; #24088).

Réserpine

Des souris WT âgées de 9 semaines ont reçues une injection de réserpine (5mg/kg ; i.p. ; Sigma R0875) diluée dans de l'acide glacial acétique et de l'eau stérile dont le pH a été ajusté entre 4 et 5, nécessaire pour éviter une précipitation de la solution, puis 17h plus tard une injection d' α -méthyltyrosine (200mg/kg ; i.p. ; Sigma M3281) dilué dans de l'eau distillée⁵⁵⁰. A partir de la première injection, les cages des souris sont placés sur des tapis chauffants pour palier l'hypothermie induite par la réserpine⁵⁵¹.

Analyse chromatographique

Les niveaux tissulaires de NA, DA, 5-HT et leurs métabolites ont été mesurés par un système HPLC-ECD au sein de l'INICIA à Bordeaux. Des échantillons (placés sur de la glace après la centrifugation) ont été injectés à l'aide d'un injecteur manuel (Rheodyne 7725i, CIL-Cluzeau, Sainte-Foy-La-Grande, France) équipé d'une boucle de 10 ou 20 μ l dans la colonne HPLC (Hypersyl C18, 150 \times 4,6 mm, 5 μ m ; CIL-Cluzeau) précédée d'une précolonne Brownlee – Newgard (RP-8, 15 \times 3,2 mm, 7 μ m ; CIL-Cluzeau). La détection de NA, DA et de ses métabolites, l'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique (DOPAC) et l'acide homovanillique (HVA), 5-HT et son métabolite l'acide 5-hydroxyindole-3-acétique (5-HIAA) a été réalisée avec une cellule coulométrique (Cellule coulométrique 5011, ESA, Paris, France) couplée à un détecteur programmable (Coulochem II, ESA). Les courbes d'étalonnage ont été réalisées en utilisant

une plage de concentrations d'éluants compatibles avec les quantités attendues (plage ng pour DA dans le striatum). Des solutions standards contenant tous les composés d'intérêt à des concentrations connues ont été systématiquement injectées chaque jour avant et après une série d'échantillons. Les niveaux tissulaires de monoamines et de métabolites ont été exprimés en pg/mg de poids tissulaire. L'indice du chiffre d'affaires correspondant au rapport entre le métabolite et le neurotransmetteur (DOPAC+HVA/DA et 5-HIAA/5-HT) a également été calculé.

Purification des corps de Lewy

Les fractions contenant les LB ont été purifiées à partir d'échantillons post-mortem frais congelés de patients atteints de PD sporadiques (Netherlands Brain Bank) par un gradient d'étape de saccharose⁶⁸. . Brièvement, les tissus sont homogénéisés dans 9 fois le volume de tampon froid MSE (10mM MOPS/KOH, pH 7,4, 1M sucrose, 1mM acide tétrahydrique d'éthylène glycol, 1mM éthylène diamine tétraacétique) supplémenté en cocktail d'inhibiteurs de protéases (Complete mini ; Boehringer Mannheim, Mannheim, Allemagne) à l'aide d'un potter en verre. Pour la purification des corps de Lewy, un gradient étagé de sucrose est préparé avec une couche de 2,2M au fond puis une couche de 1,4M puis une couche de 1,2M de sucrose en ratio volumétrique de 3,5:8:8. L'homogénat de tissu est déposé à la surface du gradient puis est soumis à une étape de centrifugation à 4°C à 160 000g pendant 3 heures dans un rotor SW32.1 (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Vingt-six fractions de 500µL sont ensuite collectées pour chaque gradient du haut vers le bas et la présence d'agrégats d'α-syn est analysée à l'aide d'un Dot-Blot en biochimie. Les fractions contenant l'α-syn agrégée provenant des corps de Lewy de patients parkinsoniens se situent entre les fractions 21 et 23 et sont celles appelées « fractions LB ». Les fractions recueillies sont soniquées pendant 5 min pour rompre les agrégats de α -synucléine en fragments oligomères et fibrillaires, puis aliquotées et congelées à -80°C jusqu'au jour de l'injection.

Injection des corps de Lewy

Des souris mâles WT ont été injectées bilatéralement avec 2µL de fractions LB ou 2µL de sucrose dans la substance noire. Ces injections sont réalisées par chirurgie stéréotaxiques (AP : -2,9 mm ; ML : ±1,3 mm ; DV : -4,5 mm) sous anesthésie à l'isoflurane (4% pour l'induction, 1-2% pour la maintenance), à un débit de 0,4 µL/min avec une seringue Hamilton de 33 G couplée à une pompe de microinjection (World Precision Instruments). Une fois que la totalité du volume a été injecté, la seringue est laissée encore 5 min puis doucement retiré du cerveau.

Pose de l'implant EEG/EMG

Des souris mâles ont été anesthésiées à l'isoflurane (4% pour l'induction, 1-2% pour la maintenance) pour la pose d'implant EEG/EMG. A l'aide d'une aiguille de 23 G, 4 trous sont forés à travers le crâne, 4 vis en acier inoxydable y sont vissées pour maintenir l'implant au crâne. Ces vis serviront d'électrodes pour l'enregistrement EEG, deux vis en avant du bregma et deux en arrière chacune étant placée de part et d'autre de la suture sagittale. Le signal enregistré par les vis est généré principalement par les potentiels post-synaptiques des neurones corticaux. Les électrodes EMG ont été insérées dans les muscles du cou et permettront de mesurer le niveau d'activité musculaire de l'animal. Du ciment dentaire (Lang Dental Manufacturing Co) a été appliqué afin de maintenir les vis et l'implant sur le crâne. Après 7 jours de récupération post-chirurgie, les souris sont branchées au système d'enregistrement du sommeil pour deux jours d'habitation avant de commencer les chirurgies⁵⁵².

Etude du sommeil

Les signaux EEG et EMG ont été enregistrés en continu jusqu'à la fin de l'expérience en utilisant le système d'enregistrement 8400 de chez Pinnacle Technology Inc. Les oscillations EEG et EMG ont été amplifiées et filtrées par un préamplificateur. Ce dernier effectue une pré-amplification (x100) des mesures différentielles entre deux électrodes. Les signaux sont ensuite transmis vers le système d'acquisition pour l'amplification et le filtrage final de l'information électrique.

Les signaux EEG/EMG ont été analysés par périodes de 4 secondes en mode semi-automatique par un expérimentateur aveugle en utilisant le logiciel SleepSign (KISSEI COMTEC CO., LTD, Matsumoto, Japon). Les analyses ont été faites automatiquement par le logiciel puis vérifiées manuellement par l'expérimentateur afin de supprimer tout signal artéfactuel ou erreur d'interprétation du logiciel. A partir de ces analyses, nous avons quantifié le pourcentage de temps passé dans chaque phase du cycle éveil/sommeil (éveil, sommeil NREM et sommeil REM), le nombre et la durée des épisodes de chacune des phases. Nous avons calculé le temps passé dans les différents stades de sommeil et d'éveil sur plusieurs intervalles de temps : 24 heures, 12 heures et heure par heure.

L'analyse spectrale est une méthode utilisée pour évaluer la contribution des différentes fréquences constituant le signal EEG. Une méthode couramment utilisée est la transformation de Fourier (« Fast Fourier Transformation » ou FFT). Pour chaque animal et chaque phase du cycle un spectrogramme a été obtenu et les valeurs des spectres des amplitudes ont été divisées en 5 bandes de fréquences (delta, 0,5-4 Hz ; thêta, 4-9 Hz ; alpha, 9-12 Hz ; bêta, 12-30 Hz).

Nous nous sommes ensuite intéressés à la pression de sommeil. Nous avons pour cela quantifié l'amplitude des oscillations delta (appelées activité d'onde lente ou SWA, 0.5 à 4 Hz) durant les phases de NREM comme cela se fait classiquement dans la littérature^{553,554}.

Etude histologique

Des sections coronales de 50 μm d'épaisseur ont été réalisées au cryostat sur la région entière du striatum, le mésencéphale et le tronc cérébral pour chaque animal afin de réaliser des immunomarquages sur le striatum, la substance noire et le locus coeruleus. Brièvement, 3 sections consécutives du striatum, 5 sections sériées (1 sur 4) couvrant la SN en entier, et 3 sections sériées (1 sur 4) couvrant le LC ont été incubées sur la nuit à température ambiante avec un anticorps primaire dirigé contre la tyrosine hydroxylase (TH) (1:5.000 clone EP1532Y, ab137869 Abcam). De même, 3 sections consécutives du striatum, 1 section contenant la SN et 1 section contenant le LC ont été incubées sur la nuit à température ambiante avec un anticorps primaire dirigé contre l' α -syn monomérique (1:10.000 clone D37A6, Cell Signalling), contre l' α -syn phosphorylée au niveau de la Sérine 129 (1:5000 clone EP1536Y, ab51253 Abcam) ou l' α -syn agrégé (1:2000, clone Syn F1, BioLegend). Les réactions immunologiques sont révélées par une peroxydase en fonction de l'espèce de l'anticorps primaire (DAKO) et visualisées avec du 3,3'-diaminobenzidine (DAB). Pour les marquages contre l' α -syn (monomérique, phosphorylée ou agrégée) toutes les sections sont préalablement identifiées et incubées en même temps dans les mêmes solutions pour permettre une comparaison directe de l'intensité entre les coupes. Après les immunomarquages, les coupes sont montées sur des coupes gélatinées et contremarquées avec une solution de crésyl violet 0,1% si nécessaire

Quantification des immunomarquages

Le marquage TH des coupes du striatum sont quantifiées par densité optique. Les sections sont scannées avec un scanner haute résolution (Epson expression 10000XL) et les images sont analysées avec le logiciel ImageJ. Les cellules positives à la TH dans la SN et le LC sont comptabilisées par stéréologie à l'aide d'un microscope (Leica DM-6000B) et du logiciel Mercator (Explora Nova). La région de la SN et du LC ont été cartographiées pour chaque coupe et les zones de comptage (SN : 50*40 espacées par 150*120 μm ; LC : 60*70 espacées par 60*100 μm) ont été appliquées à la maquette obtenue. Seules les cellules positives avec leur noyau inclut dans la zone ou croisant la ligne verte ont été comptabilisées. La quantité totale de cellules positives à la TH pour chaque structure est estimée en utilisant la méthode du fractionnement optique.

Pour les marquages α -syn, les coupes ont été scannées en haute résolution au grossissement x20 (3DHitech Panoramic Scanner). Chaque image a été ouverte dans le logiciel Mercator (Explora Nova)

et la cartographie de toutes les zones d'intérêt a été réalisée. Après application de règles de luminosité et de contraste pour optimiser les détails, l'outil de seuillage de couleur a été utilisé pour sélectionner le seuil correspondant spécifiquement à la couleur brune révélée par la coloration DAB. Dans chaque région et pour chaque marquage, le logiciel a extrait la surface correspondant au seuil défini. L'étendu du marquage a ensuite été exprimée par un rapport de la surface totale de la région d'intérêt et le seuil de détection de la coloration.

Pose du guide canule

Des souris mâles ont été anesthésiées à l'isoflurane (4% pour l'induction, 1-2% pour la maintenance) pour implanter un guide canule nécessaire à la microdialyse. Le crâ a été perforé au-dessus du striatum droit (AP : +0,5 mm ; ML : -2 mm ; DV : -2 mm). Des guides canules CMA 8 ont été insérés et fixés avec du ciment dentaire (Lang Dental Manufacturing Co).

Microdialyse et privation de sommeil

Après une semaine de récupération, les souris sont placées dans les cages pour la microdialyse. Une sonde CMA 8 est insérée dans le guide canule et connectée à une pompe à perfusion avec un débit constant de 0,6µL/min. Après le branchement, un groupe de souris est privé de sommeil durant 5h par l'ajout régulier d'enrichissement et par de légers stimuli visuels. Le prélèvement des échantillons a commencé après ces 5h, ce qui a laissé assez de temps pour permettre l'équilibration. Les échantillons ont été collectés sur glace une fois par heure pour un volume final de 36µL par échantillon, et stockées à -80°C jusqu'à l'analyse par ELISA.

Analyse des prélèvements de microdialyse

Les prélèvements obtenus par microdialyse ont été analysés à la fondation pour la recherche médicale de l'académie d'Athènes. Pour l'ELISA sandwich, l'anticorps monoclonal Syn-1 (BD Biosciences), dirigé contre les acides aminés 15 à 123 de la séquence β -synucléine humaine, de souris ou de rat, a été utilisé comme anticorps de capture. L'anticorps polyclonal C-20 (Santa Cruz), dirigé contre un peptide C-terminal de l' α -syn humaine, a été utilisé pour la détection d'antigène par conjugaison directe avec HRP (Pierce). Chaque plaque ELISA (Corning Costar) a été recouverte pendant 24 heures à température ambiante avec 0,5 mg/mL de Syn-1 (50 µl par puits) dans 100 mM de NaHCO₃, pH 9,3. Après le revêtement, les plaques ont été stockées à 4°C pendant 2 à 3 semaines. Les plaques ont été lavées trois fois dans du tampon de lavage (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl et 0,04% Tween-20) et 10 mL d'échantillon de microdialyse ou d' α -syn recombinante (comme standard), dilués de manière appropriée dans TBST / BSA (10 Tris-Cl mM, pH 7,6, NaCl 100 mM, 0,1% de Tween-20 et 1% de BSA) a été ajouté. Pour permettre la liaison à l'antigène, les plaques ont été incubées à 37°C

pendant 2 ½ heures. Après trois lavages dans du tampon de lavage, 50 ml d'anticorps C-20 conjugué à HRP (dilué 2500x dans TBST / BSA) ont été ajoutés à chaque puits et incubés pendant 1 heure à température ambiante. Les puits ont été lavés et 50 ml de substrat chimioluminescent HRP (réactif luminol ultrasensible, BioFX Laboratories) ont été ajoutés à chaque puits. Les puits ont été incubés pendant 15 min à température ambiante et la chimioluminescence a été intégrée pendant 1 s. Chaque prélèvement de microdialyse contenant 36 µL, les analyses sont réalisées en triplicata.

Perfusion intracardiaque

Les souris ont reçu une injection d'anesthésique avant d'être perfusées au niveau intracardiaque avec du NaCl. Les cerveaux ont ensuite été post-fixés dans du paraformaldéhyde 10% pendant 2 jours, placés dans une solution de sucrose pendant une journée puis congelés au Snapfrost. Ils ont finalement été stockés à -80°C jusqu'au moment de la coupe.

Statistiques

Des tests statistiques ont été réalisés avec le logiciel GraphPad v.7. Les données ont été considérées comme significatives lorsque $p < 0,05$. Les résultats sont représentés par la moyenne \pm SEM. Pour toutes les évaluations statistiques, les données ont d'abord été évaluées pour la normalité (tests paramétriques si normalité, tests non paramétriques si non). Pour les analyses paramétriques, une ANOVA a été appliquée en utilisant le temps et le groupe, suivie d'un test post hoc de Tukey le cas échéant. Des tests non paramétriques (analyses de Wilcoxon et Mann Whitney) ont été utilisés lorsque la normalité n'était pas respectée. Des animaux ont été exclus lorsque la qualité des signaux EEG était mauvaise et ne permettait pas leur analyse.

Résultats

Partie 1 : Validation du modèle LB de la maladie de Parkinson

Le modèle LB de la maladie de Parkinson apparaissait au début de mon travail de thèse comme le plus adapté pour l'étude de l'implication des altérations des cycles éveil/sommeil. Dans ce modèle, la perte de neurones dopaminergiques, médiée par l' α -syn, est induite par l'injection unilatérale dans la substance noire de souris adultes de fractions de corps de Lewy extraits de cerveaux de patients atteints de la maladie de Parkinson. Après 4 mois, le comptage stéréologique des cellules positives à la présence de tyrosine hydroxylase (TH) montrent une perte des neurones dopaminergiques (~15%) dans l'hémisphère injecté comparé à celui non-injecté (Fig. 3). De plus, une augmentation de la forme phosphorylée de l' α -syn (pS129 α -syn), forme pathogénique de la protéine, dans la substance noire est observée. Ces résultats confirment de précédents travaux⁵³³, et viennent valider l'utilisation de ce modèle pour notre étude.

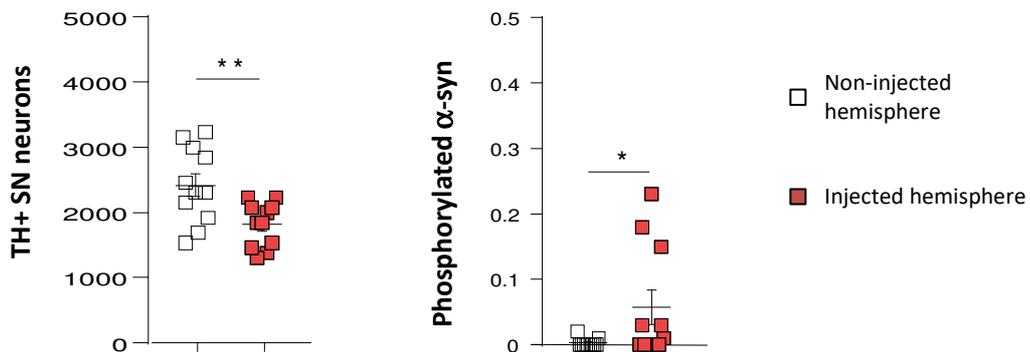


FIGURE 3. DEGENERESCENCE NEURONALE ET SYNUCLEINOPATHIE DANS LE MODELE LB⁵⁵⁵.

Partie 2 : Rôle de la dopamine dans le cycle éveil/sommeil

L'implication de la dopamine dans la régulation des phases du cycle éveil/sommeil est établit mais comme mentionné ci-dessus (voir Circuits neuronaux impliqués dans l'éveil), le rôle précis de la dopamine semble dépendre de la région et des voies impliquées. Nous avons donc cherché à savoir ce que pouvait engendrer une perte importante de dopamine sur le cycle éveil/sommeil.

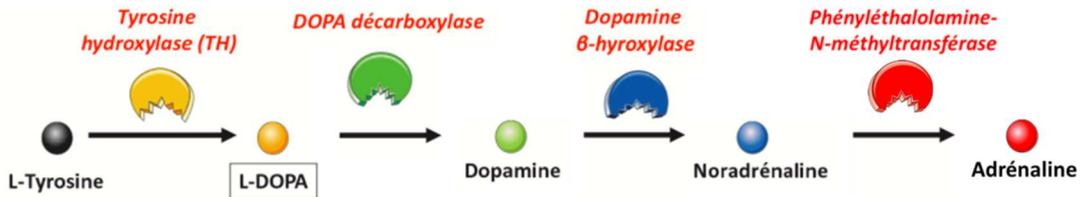


FIGURE 4. SCHEMA DE SYNTHÈSE DES CATECHOLAMINES⁵⁵⁶

Pour répondre à cette question, de la réserpine a été injectée en combinaison avec de l'α-méthyltyrosine (α-MT). La réserpine entraîne une déplétion transitoire des stocks de catécholamine (dopamine, noradrénaline, adrénaline) et l'α-MT est un inhibiteur transitoire de la tyrosine hydroxylase, l'enzyme impliquée dans la voie de synthèse des catécholamines (Fig. 4), empêchant donc la resynthèse de la dopamine.

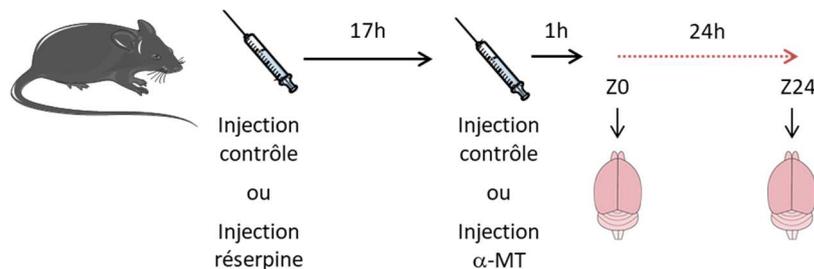


FIGURE 5. PROTOCOLE EXPERIMENTAL DE RECUPERATION DU CERVEAU POUR ANALYSES DES NEUROTRANSMETTEURS

Les souris réparties en 4 groupes : injection contrôlée et récupération du cerveau à Z0, injection contrôlée et récupération du cerveau à Z24, injection réserpine/α-MT et récupération du cerveau à Z0 et injection réserpine/α-MT et récupération du cerveau à Z24.

Z0 : début de la période d'enregistrement du cycle éveil/sommeil dans l'expérience suivante ; Z24 : fin de la période d'enregistrement.

Pour s'assurer de la durabilité de l'effet de la réserpine au cours du temps, différents neurotransmetteurs (dopamine, sérotonine et noradrénaline) et leurs métabolites (DOPAC et HVA pour la dopamine, 5-HIAA pour la sérotonine) ont été quantifiée au niveau du striatum par chromatographie aux temps qui correspondent à ce qui sera le début (Z0) et la fin (Z24) de la période d'enregistrement d'un cycle éveil/sommeil (Fig. 5). L'analyse montre bien une importante déplétion de la dopamine après injection de la réserpine à Z0 (*p=0.009) qui dure jusqu'à Z24 (*p=0.027). Une diminution de la quantité des métabolites de la dopamine est observée à Z24

(*p=0.039) mais pas à Z0, ce qui peut être expliqué par le fait qu'il puisse rester de la dopamine à métaboliser comme l'inhibition de la resynthèse de la dopamine est plus récente. La concentration en sérotonine dans n'est pas affectée par la réserpine et la noradrénaline n'est pas détectée au niveau du striatum.

TABEAU 5 : DISTRIBUTION QUANTITATIVE DE DA, 5-HT, ET NA ET DE LEURS METABOLITES DANS LE STRIATUM DES SOURIS AVANT ET APRES INJECTION DE RESERPINE

	Contrôle – Z0	Contrôle – Z24	Réserpine – Z0	Réserpine – Z24
Striatum				
DA	9546 ± 1594	10809 ± 2492	3832 ± 616*	4010 ± 951*
DOPAC	1681 ± 252	2941 ± 649	2387 ± 237	1560 ± 262#
HVA	769 ± 185	1084 ± 178	788 ± 117	590 ± 104*
DOPAC+HVA/DA	0.22 ± 0.01	0.34 ± 0.03	0.90 ± 0.2*	0.66 ± 0.2*
5-HT	564 ± 124	889 ± 187	683 ± 70	758 ± 145
5-HIAA	418 ± 74	578 ± 92	558 ± 85	621 ± 108
5-HIAA/5-HT	0.78 ± 0.08	0.79 ± 0.1	0.86 ± 0.1	0.86 ± 0.08
NA	0	0	0	0

Les résultats sont exprimés par la moyenne ± SEM (pg/mg de tissu) dans le striatum à Z0 qui correspond au début de la période l'enregistrement d'un cycle éveil/sommeil, et à Z24 qui correspond à la fin de la période l'enregistrement. Groupe contrôle, n=4 ; groupe réserpine, n=5. Comparaison avec un t-test (ou test de Mann Whitney). *p<0.05 comparé au contrôle ; #p<0.05 comparé à Z24.

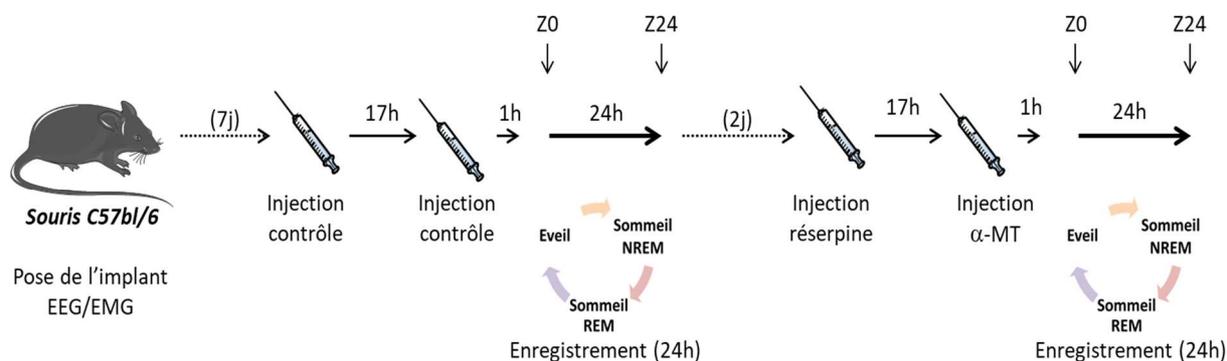


FIGURE 6. PROTOCOLE EXPERIMENTAL DE L'ENREGISTREMENT DU CYCLE EVEIL/SOMMEIL AVANT ET APRES INJECTION DE RESERPINE

Suite à la pose d'un implant EEG/EMG pour permettre l'analyse des différentes phases d'éveil et de sommeil, les souris (n=6) sont branchées au système d'enregistrement pour 48h d'habituation. Une fois ce délai passé, elles reçoivent dans un premier temps une injection d'acide glaciale acétique puis après 17h⁵⁵⁷ d'eau distillée avant une première session d'enregistrement (de Z0 à Z24) (Fig. 6). Dans un second temps, elles reçoivent une injection de réserpine (5 mg/kg, i.p.) et 17h plus tard d'alpha-MT (200 mg/kg, i.p.) avant l'enregistrement d'un second cycle. Les souris ont été placées sur des tapis chauffants pour pallier l'hypothermie induite par la réserpine⁵⁵¹. Les injections d'eau distillée et d'alpha-MT sont faites sous lumière rouge comme elles doivent être réalisées une heure avant le début de la période de lumière.

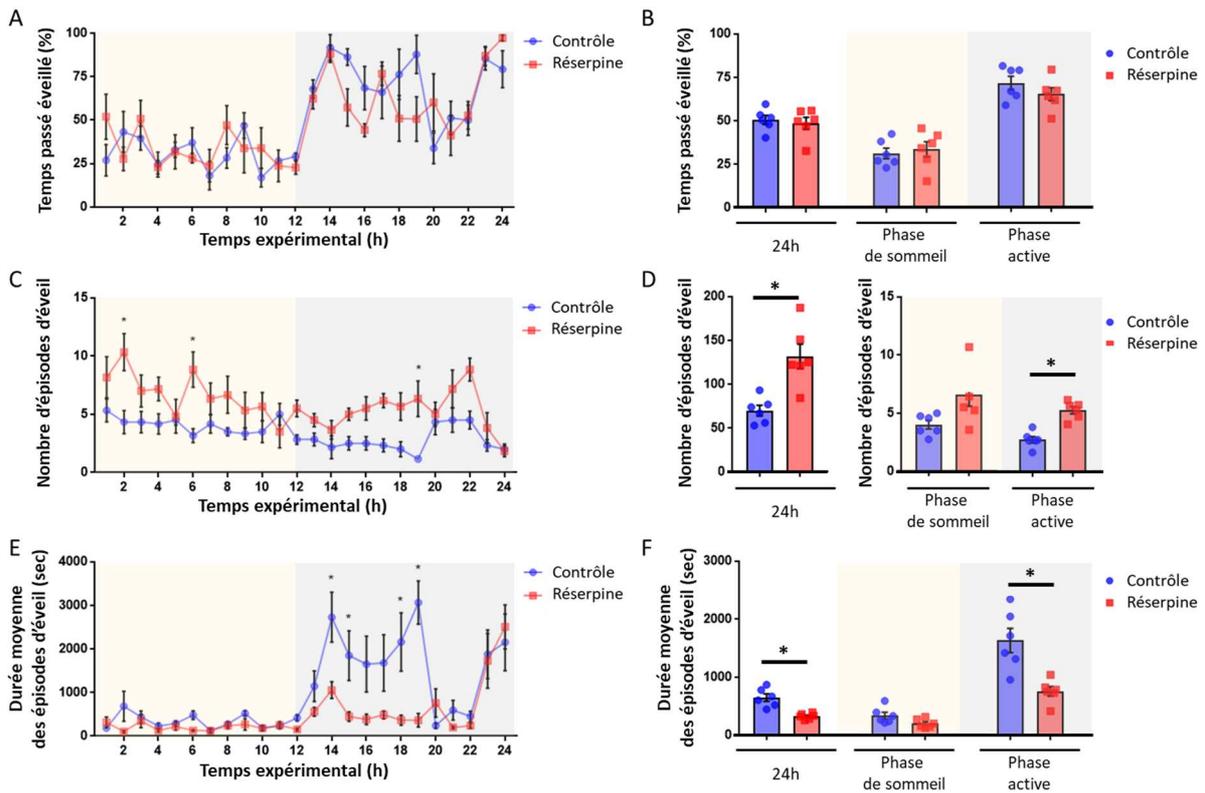


FIGURE 7. CARACTERISTIQUES DE LA PHASE D'VEIL AVANT ET APRES INJECTION DE RESERPINE

A. Temps passé éveillé en fonction du temps expérimental. **B.** Temps passé éveillé sur 24h, durant la phase de sommeil et durant la phase active. **C.** Nombre d'épisodes d'éveil en fonction du temps expérimental. **D.** Nombre d'épisodes d'éveil sur 24h, durant la phase de sommeil et durant la phase active. **E.** Durée moyenne des épisodes d'éveil en fonction du temps expérimental. **F.** Durée moyenne des épisodes d'éveil sur 24h, durant la phase de sommeil et durant la phase active. Comparaison au cours du temps expérimental avec un 2way ANOVA, et un test post hoc de Tukey le cas échéant. Comparaison sur 24h, sur la période de sommeil ou la période d'éveil avec un t-test (ou test de Mann Whitney). * $p < 0.05$ comparé au groupe contrôle.

La déplétion en dopamine induite par la réserpine entraîne une diminution de la durée moyenne des épisodes d'éveil (Fig. 7D ; * $p = 0.008$), principalement pendant la phase active des souris (* $p = 0.02$), ainsi qu'une augmentation du nombre de ces épisodes (Fig. 7F ; * $p = 0.01$), là aussi principalement pendant la phase active (* $p = 0.001$). Cette déplétion a aussi pour effet d'augmenter le nombre d'épisodes de sommeil NREM (Fig. 9D ; * $p = 0.04$), principalement pendant la phase de sommeil (* $p = 0.04$), et d'augmenter la durée moyenne des épisodes de sommeil REM en phase active (Fig. 8F ; * $p = 0.08$).

Ces résultats suggèrent que la dopamine est impliquée dans la maintenance de l'éveil ce qui entrainerait dans un second temps une augmentation du nombre d'épisodes d'éveil par compensation pour aboutir au même temps total d'éveil.

De plus, les mêmes tendances concernant la diminution de la durée et l'augmentation du nombre épisodes d'éveil sont observées en période de sommeil (Fig. 7D ; Fig. 7F ; $p = 0.6$), période physiologiquement plus propice à l'induction du sommeil. L'implication de la dopamine dans

la maintenance de l'éveil d'éveil expliquerait donc également l'augmentation du nombre d'épisodes de sommeil NREM en période inactive.

Il faut noter ici que comme la noradrénaline inclut la dopamine dans sa voie de synthèse (Fig. 4), une partie des effets observés pourrait donc être dû à sa déplétion.

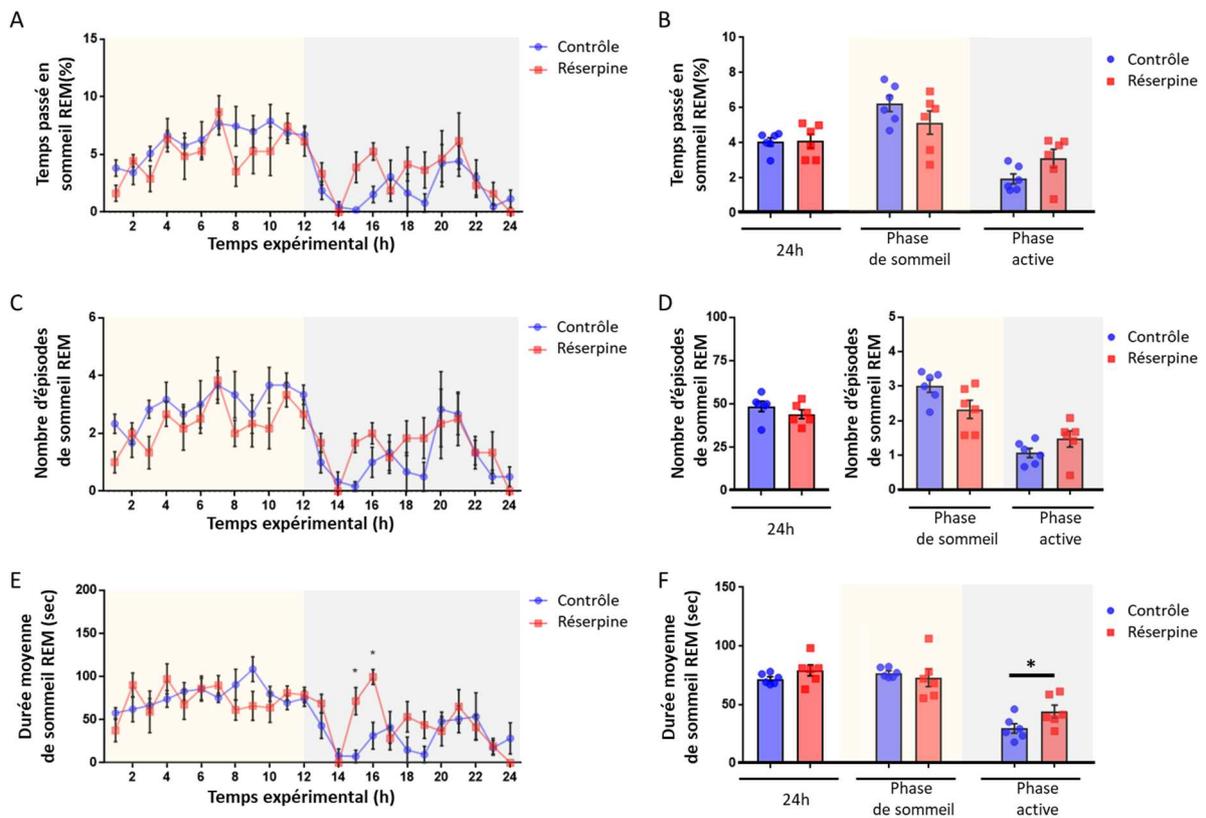


FIGURE 8. CARACTERISTIQUES DE LA PHASE DE SOMMEIL REM AVANT ET APRES INJECTION DE RESERPINE

A. Temps passé en sommeil REM en fonction du temps expérimental. **B.** Temps passé en sommeil REM sur 24h, durant la phase de sommeil et durant la phase active. **C.** Nombre d'épisodes de sommeil REM en fonction du temps expérimental. **D.** Nombre d'épisodes de sommeil REM sur 24h, durant la phase de sommeil et durant la phase active. **E.** Durée moyenne des épisodes de sommeil REM en fonction du temps expérimental. **F.** Durée moyenne des épisodes de sommeil REM sur 24h, durant la phase de sommeil et durant la phase active. Comparaison au cours du temps expérimental avec un 2way ANOVA, et un test post hoc de Tukey le cas échéant. Comparaison sur 24h, sur la période de sommeil ou la période d'éveil avec un t-test (ou test de Mann Whitney). * $p < 0.05$ comparé au groupe contrôle.

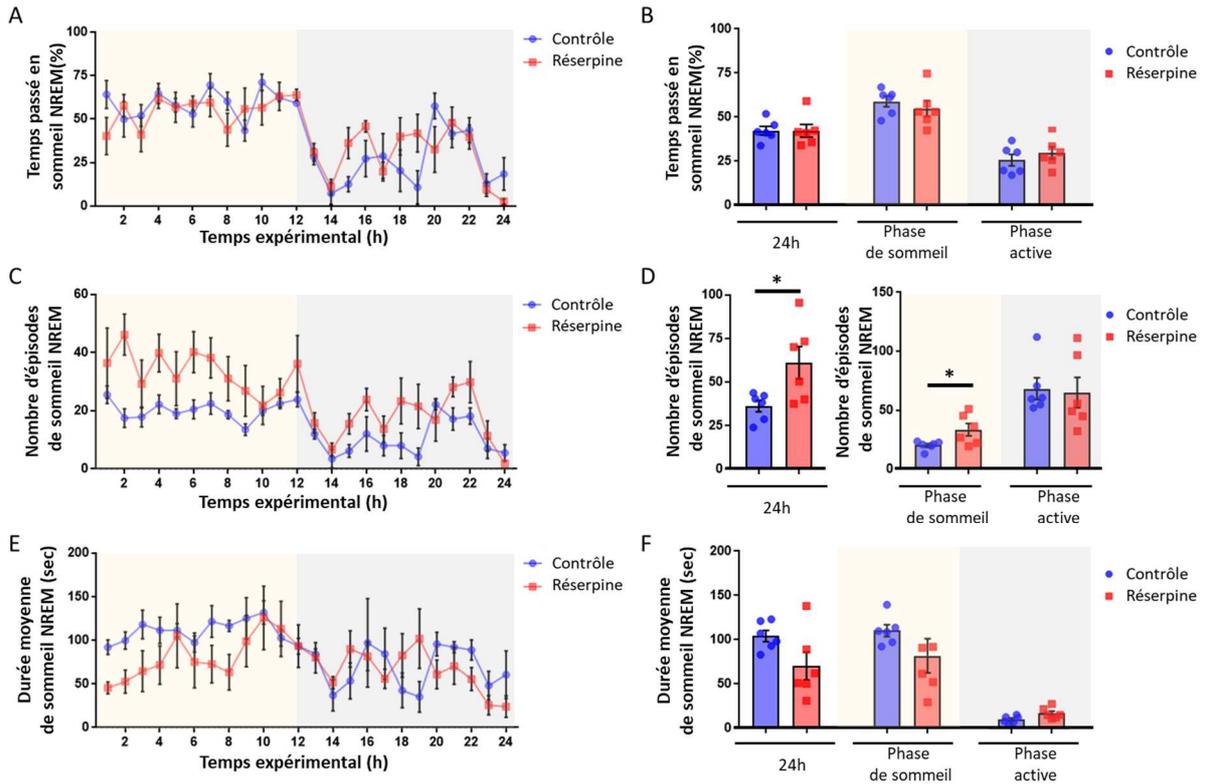


FIGURE 9. CARACTERISTIQUES DE LA PHASE DE SOMMEIL NREM AVANT ET APRES INJECTION DE RESERPINE

A. Temps passé en sommeil NREM en fonction du temps expérimental. **B.** Temps passé en sommeil NREM sur 24h, durant la phase de sommeil et durant la phase active. **C.** Nombre d'épisodes de sommeil NREM en fonction du temps expérimental. **D.** Nombre d'épisodes de sommeil NREM sur 24h, durant la phase de sommeil et durant la phase active. **E.** Durée moyenne des épisodes de sommeil NREM en fonction du temps expérimental. **F.** Durée moyenne des épisodes de sommeil NREM sur 24h, durant la phase de sommeil et durant la phase active. Comparaison au cours du temps expérimental avec un 2way ANOVA, et un test post hoc de Tukey le cas échéant. Comparaison sur 24h, sur la période de sommeil ou la période d'éveil avec un t-test (ou test de Mann Whitney). * $p < 0.05$ comparé au groupe contrôle.

Partie 3 : Cycle éveil/sommeil chez des modèles murins de la maladie de Parkinson et de l'atrophie multisystématisée

Les patients atteints de la maladie de Parkinson (MP) et de l'atrophie multisystématisée (AMS) doivent pour une grande majorité faire face à des altérations du sommeil. Ces derniers sont notamment un temps de sommeil diurne excessif, des insomnies, des troubles du comportement du sommeil paradoxal, des troubles respiratoires du sommeil et un syndrome des jambes sans repos. Dans la progression des synucléinopathies, ces altérations peuvent survenir très tôt, jusqu'à plusieurs décennies avant les symptômes moteurs.

Il est donc logique de formuler l'hypothèse que le dérèglement des cycles éveil/sommeil pourrait avoir un rôle dans le développement de ces maladies. Pour tester cette hypothèse, il est d'abord nécessaire de trouver le modèle adéquat, à savoir des modèles qui reproduisent les altérations des cycles éveil/sommeil telles qu'elles sont retrouvées chez les patients.

A. Modèle murin de la maladie de Parkinson

Dans un premier temps, pour déterminer si les souris LB présentaient des altérations du sommeil et si oui à quel moment ces altérations survenaient, des souris ont reçu une injection bilatérale de 2 μ L de factions LB par stéréotaxie dans la SN (AP : -2,9 mm ; ML : \pm 1,3 mm ; DV : -4,5 mm)⁶⁸ (Fig. 10). La pose de l'implant EEG/EMG permettant l'analyse des phases d'éveil et de sommeil a été réalisée lors de la même chirurgie. Après 7 jours de récupération, les souris (n=6) ont été branchées au système d'enregistrement pour 48h afin de s'habituer à leur nouvel environnement puis pour 24h d'enregistrement d'un cycle éveil/sommeil. Elles ont été de nouveau branchées une fois par mois jusqu'à 4 mois post-injection, ce qui correspond au temps nécessaire pour avoir une lésion significative de la SN dans ce modèle⁶⁸.

Les résultats obtenus lors de cette étude montrent une évolution au cours du temps des paramètres des phases d'éveil, de sommeil REM et de sommeil NREM. Comparé aux autres mois d'enregistrement, à 4 mois les souris présentent une diminution du temps total d'éveil (Fig. 11A ; 0-4 mois *p=0.005 ; 1-4 mois *p=0.002 ; 2-4 mois *p=0.01 ; 3-4 mois *p=0.03), avec une tendance à une augmentation du nombre d'épisodes et une diminution de la durée de ces épisodes. De façon concomitante, le temps total passé en sommeil NREM augmente (Fig. 11C ; 0-4 mois *p=0.012 ; 0-4 mois *p=0.005 ; 1-4 mois *p=0.002 ; 2-4 mois *p=0.01 ; 3-4 mois *p=0.03). Enfin, la durée moyenne des épisodes de sommeil paradoxal augmente (Fig. 11H ; 0- 4 mois *p=0.02).

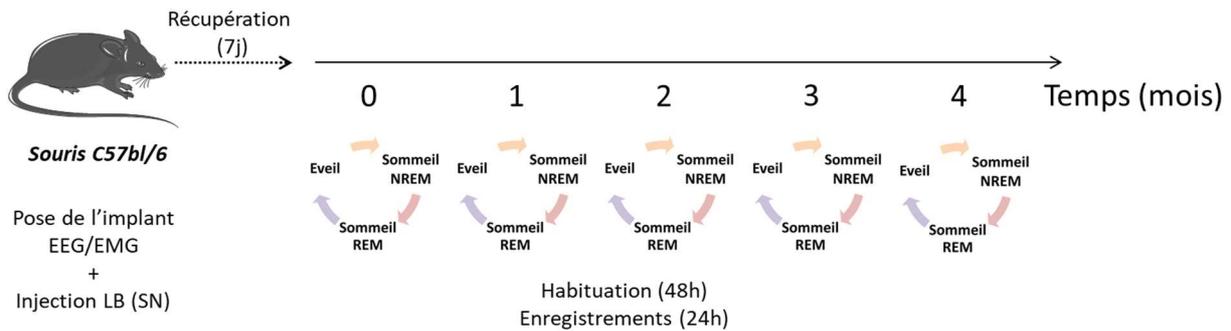


FIGURE 10. PROTOCOLE EXPERIMENTAL DE L'ENREGISTREMENT DU CYCLE EVEIL/SOMMEIL DE 0 A 4 MOIS APRES INJECTION DE LB

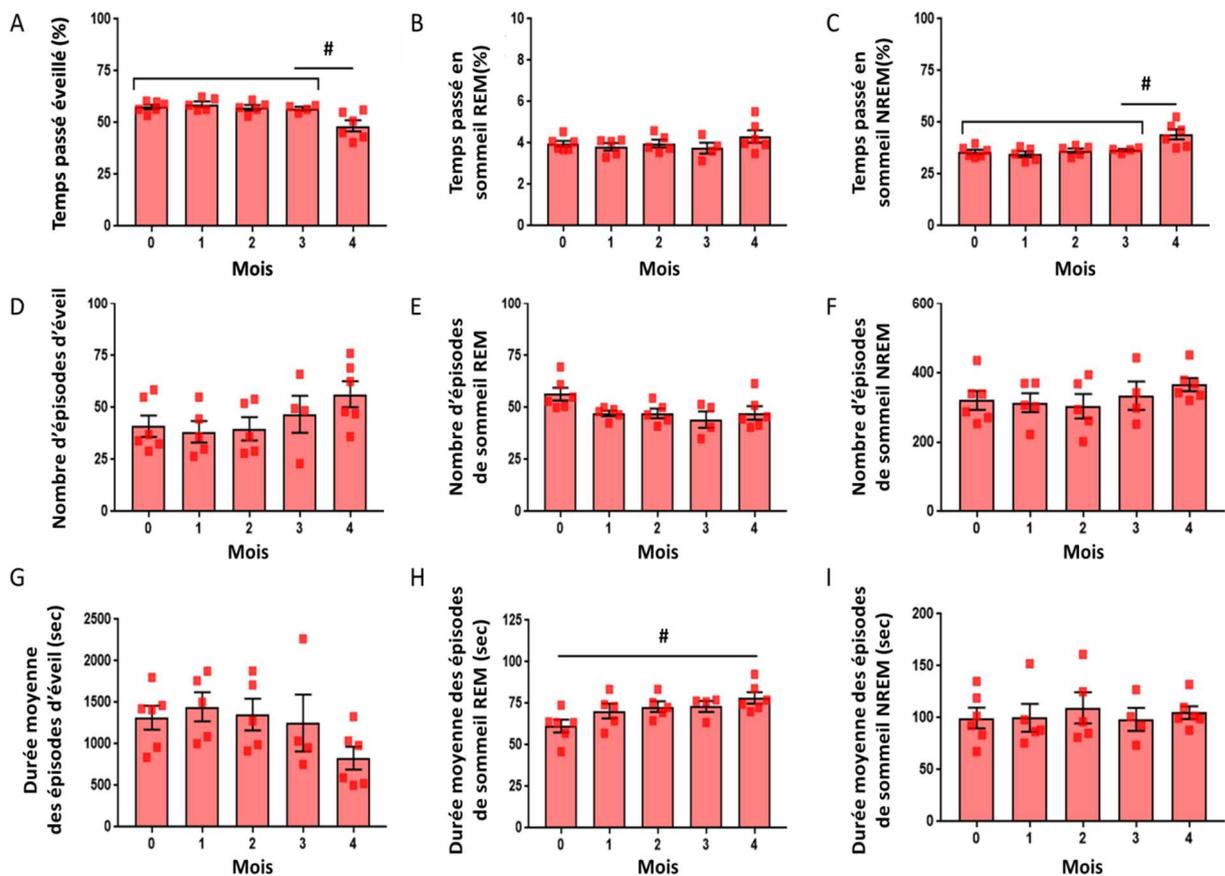


FIGURE 11. CARACTERISTIQUES DES PHASES DU CYCLE EVEIL/SOMMEIL DE 0 A 4 MOIS APRES L'INJECTION DE LB.

Temps passé éveillé (A.), en sommeil REM (B.) et en sommeil NREM (C.) à 0, 1, 2, 3 et 4 mois post-injection. Nombre d'épisodes d'éveil (D.), de sommeil REM (E.) et de sommeil NREM (F.) à 0, 1, 2, 3 et 4 mois post-injection. Durée moyenne des épisodes d'éveil (G.), de sommeil REM (H.) et de sommeil NREM (I.) à 0, 1, 2, 3 et 4 mois post-injection. Comparaison avec un test One-way ANOVA. # $p < 0.05$ comparé aux autres mois d'enregistrement.

Un nouveau groupe de souris a été injecté avec des fractions LB ou sucrose (Fig. 12). La pose de l'implant EEG/EMG a été réalisée 3 mois ½ plus tard, notamment pour éviter une perte du signal au cours du temps comme cela a été constaté avec l'expérience précédente. Les enregistrements des cycles éveil/sommeil ont été réalisés à 4 et 6 mois post-injection (sucrose 4 mois $n=9$; LB 4 mois $n=11$; sucrose 6 mois $n=7$; LB 6 mois $n=8$).

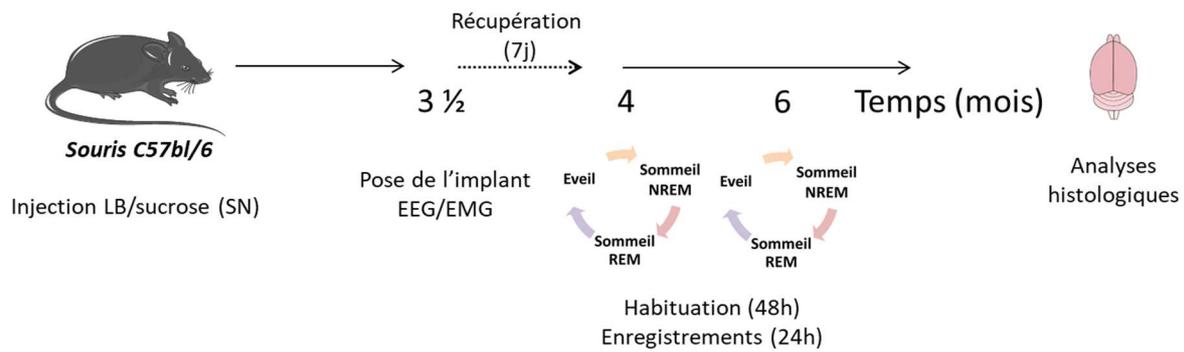


FIGURE 12. PROTOCOLE EXPERIMENTAL DE L'ENREGISTREMENT DU CYCLE EVEIL/SOMMEIL A 4 ET 6 MOIS APRES INJECTION DE LB

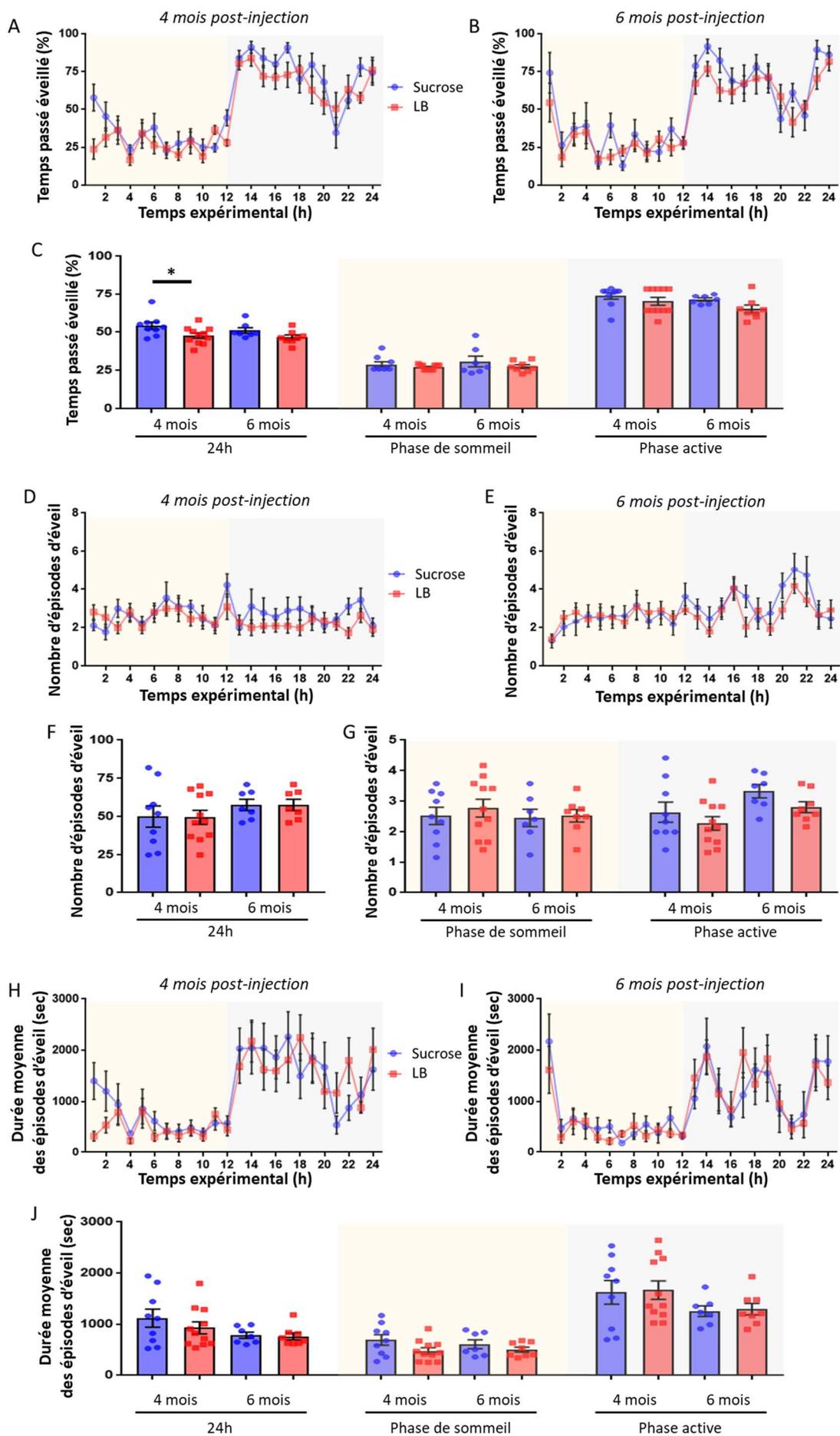
L'analyse des cycles éveil/sommeil chez les souris LB comparé aux souris sucrose montrent une diminution du temps total passé éveillé sur 24h à 4 mois post-injection (* $p=0.04$) et une tendance à la même diminution à 6 mois ($p=0.08$) (Fig. 13C, panel de gauche). Ce changement va de pair avec une augmentation du temps total passé en sommeil NREM sur 24h à 4 mois (* $p=0.03$) et une tendance à la même diminution à 6 mois ($p=0.08$) (Fig. 15C, panel de gauche).

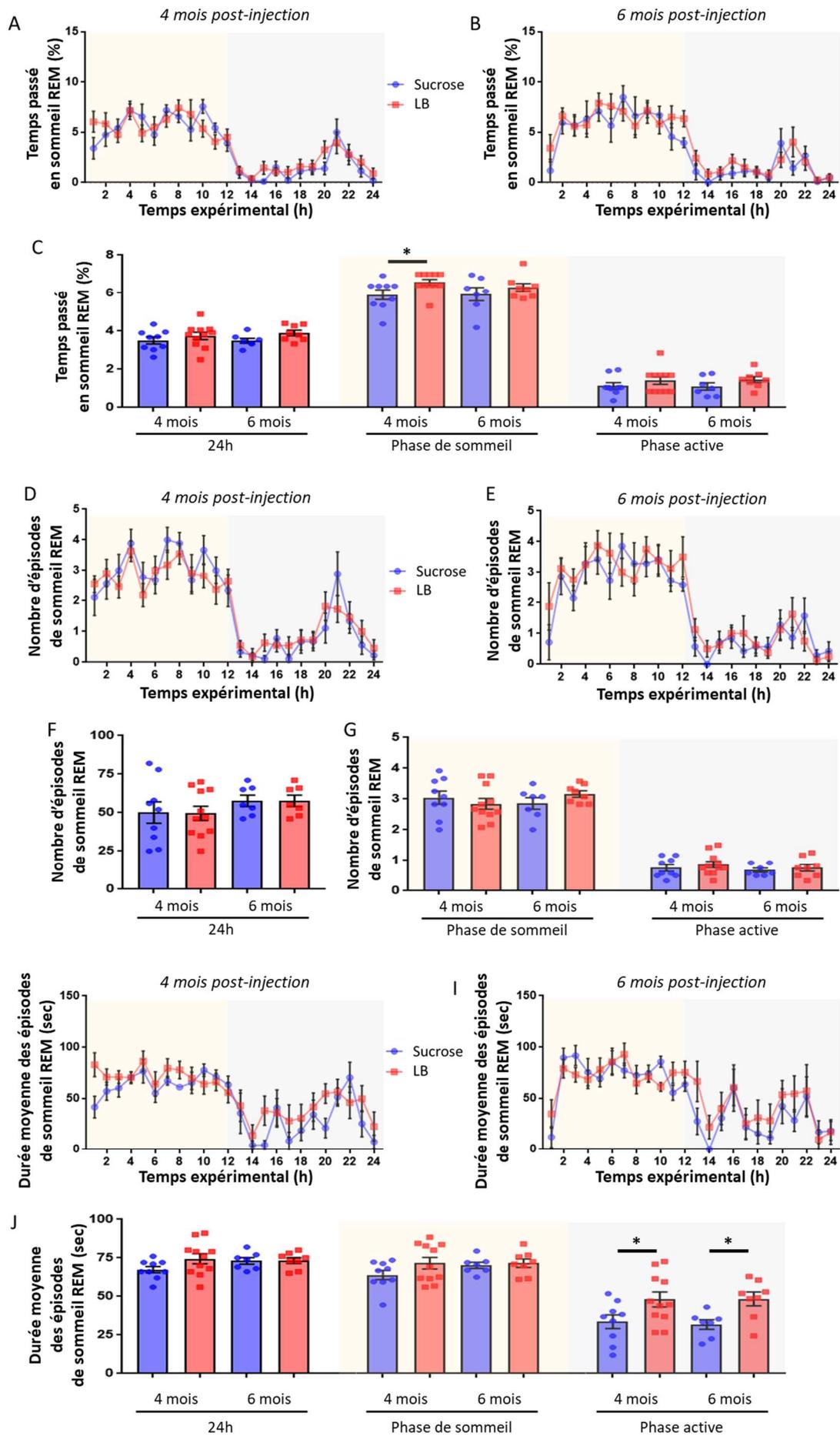
Concernant le sommeil NREM, en comparaison des souris sucrose la durée moyenne des épisodes en phase active augmente à 4 mois (* $p=0.03$), à tendance à augmenter à 6 mois ($p=0.08$) (Fig. 15J, panel de droite) et le nombre d'épisodes augmente en phase active entre 4 et 6 mois post-injection (* $p=0.02$). Pour le sommeil REM, le temps total sur 24h augmente durant la phase de sommeil à 4 mois (* $p=0.03$), et la durée moyenne des épisodes augmentent en phase active à 4 (* $p=0.045$) et 6 mois (* $p=0.01$) en comparaison des souris sucrose.

Le fait que certains changements soient significatifs à 4 mois et non à 6 peut s'expliquer par le fait que le signal de certains animaux s'est dégradé au cours du temps rendant leur analyse impossible et diminuant donc le nombre de souris dans le groupe.

La répartition du temps total des phases d'éveil et de sommeil est donc altérée dans le modèle LB comparé au groupe contrôle. Bien qu'on puisse définir une période de sommeil et une période d'activité, il faut rappeler que le modèle de sommeil des souris est polyphasique contrairement à l'Homme pour lequel il est monophasique. L'augmentation du temps passé en sommeil NREM pourrait donc être assimilée au SED dont souffrent les patients parkinsoniens qui comme mentionné plus haut (voir Architecture des cycles éveil/sommeil : sommeil diurne excessif et insomnie) pourrait être considéré comme prédictif de la MP.

D'autre part, on retrouve dans ce modèle l'augmentation de la durée moyenne des épisodes de sommeil REM en phase active observée après l'injection de réserpine.





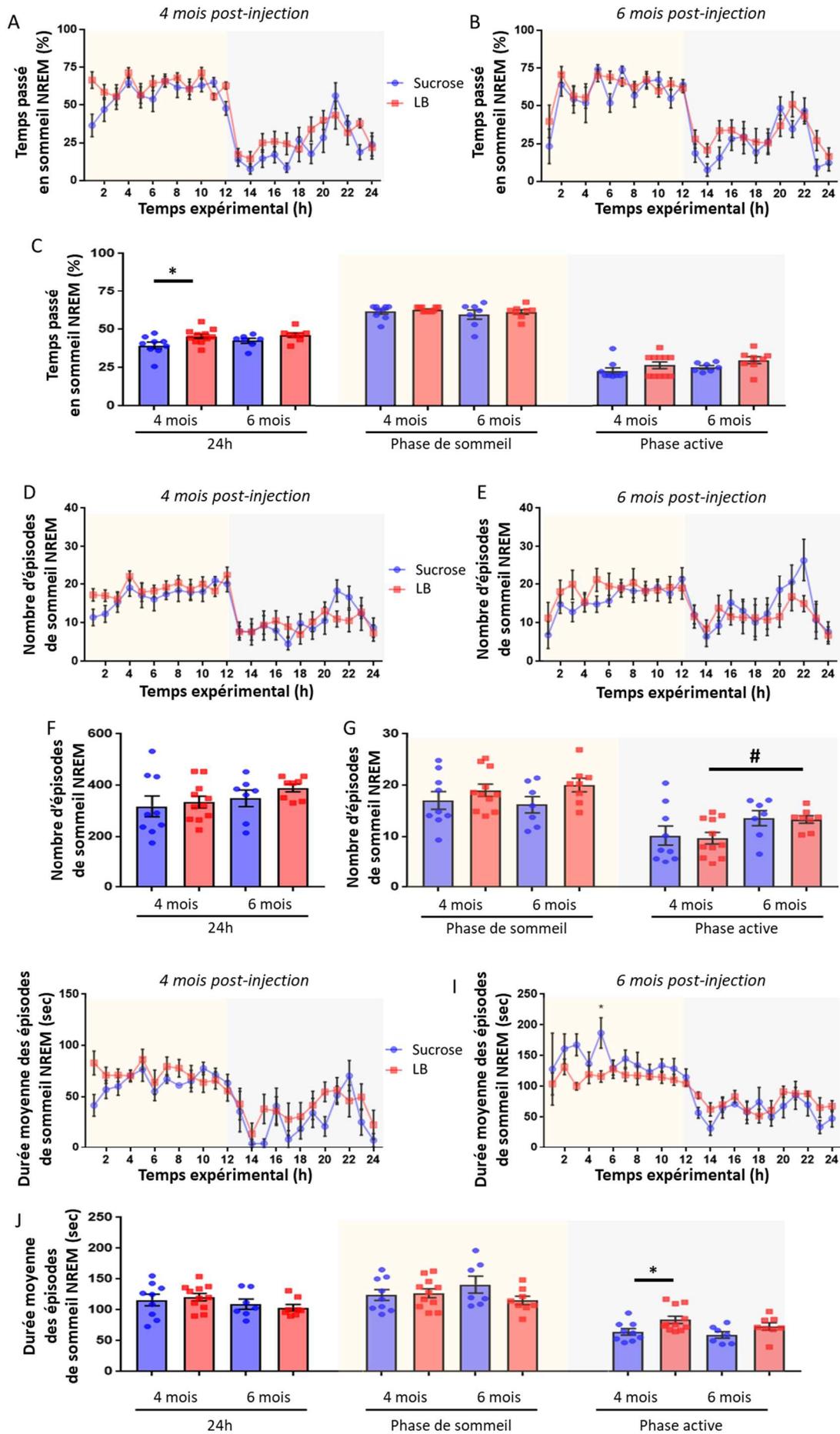


FIGURE 13. CARACTERISTIQUES DE LA PHASE D'ÉVEIL A 4 ET 6 MOIS APRES INJECTION DE LB.

Temps passé éveillé à 4 (A.) et 6 mois (B.) post-injection en fonction du temps expérimental. C. Temps passé éveillé sur 24h, durant la phase de sommeil et durant la phase active. Nombre d'épisodes d'éveil à 4 (D.) et 6 mois (E.) post-injection d'éveil en fonction du temps expérimental. Nombre d'épisodes d'éveil sur 24h (F.), durant la phase de sommeil et durant la phase active (G.). Durée moyenne des épisodes d'éveil (H.) et 6 mois (I.) post-injection en fonction du temps expérimental. J. Durée moyenne des épisodes d'éveil sur 24h, durant la phase de sommeil et durant la phase active. Comparaison au cours du temps expérimental avec 2way ANOVA, et un test post hoc de Tukey le cas échéant. Comparaison sur 24h, sur la période de sommeil ou la période d'éveil avec un t-test (ou test de Mann Whitney). * $p < 0.05$ comparé au groupe sucrose.

FIGURE 14. CARACTERISTIQUES DE LA PHASE DE SOMMEIL REM A 4 ET 6 MOIS APRES INJECTION DE LB.

Temps passé en sommeil REM à 4 (A.) et 6 mois (B.) post-injection en fonction du temps expérimental. C. Temps passé en sommeil REM sur 24h, durant la phase de sommeil et durant la phase active. Nombre d'épisodes de sommeil REM à 4 (D.) et 6 mois (E.) post-injection en fonction du temps expérimental. Nombre d'épisodes de sommeil REM sur 24h (F.), durant la phase de sommeil et durant la phase active (G.). Durée moyenne des épisodes de sommeil REM à 4 (H.) et 6 mois (I.) en fonction du temps expérimental. J. Durée moyenne des épisodes de sommeil REM sur 24h, durant la phase de sommeil et durant la phase active. Comparaison au cours du temps expérimental avec 2way ANOVA, et un test post hoc de Tukey le cas échéant. Comparaison sur 24h, sur la période de sommeil ou la période d'éveil avec un t-test (ou test de Mann Whitney). * $p < 0.05$ comparé au groupe sucrose.

FIGURE 15. CARACTERISTIQUES DE LA PHASE DE SOMMEIL NREM A 4 ET 6 MOIS APRES INJECTION DE LB.

Temps passé en sommeil NREM à 4 (A.) et 6 mois (B.) post-injection en fonction du temps expérimental. C. Temps passé en sommeil NREM sur 24h, durant la phase de sommeil et durant la phase active. Nombre d'épisodes de sommeil NREM à 4 (D.) et 6 mois (E.) post-injection en fonction du temps expérimental. Nombre d'épisodes de sommeil NREM sur 24h (F.), durant la phase de sommeil et durant la phase active (G.). Durée moyenne des épisodes de sommeil NREM à 4 (H.) et 6 mois (I.) post-injection en fonction du temps expérimental. J. Durée moyenne des épisodes de sommeil NREM sur 24h, durant la phase de sommeil et durant la phase active. Comparaison au cours du temps expérimental avec 2way ANOVA, et un test post hoc de Tukey le cas échéant. Comparaison sur 24h, sur la période de sommeil ou la période d'éveil avec un t-test (ou test de Mann Whitney). * $p < 0.05$ comparé au groupe sucrose. # $p < 0.05$ comparé à 4 mois post-injection

L'analyse du spectre du signal EEG permet grâce à la transformation de Fourier de décomposer le signal EEG pour montrer la puissance des ondes en fonction de leur fréquence. Ces fréquences sont regroupées en différentes bandes, à savoir les ondes delta : 0,5-4Hz ; les ondes thêta : 4-9Hz ; les ondes alpha : 9-12Hz ; les ondes bêta : 12-30Hz ; les ondes gamma : 30-100Hz. La puissance des ondes donne une information sur la synchronisation neuronale. Plus la puissance est importante plus les neurones ont une activité synchronisée.

Le spectre du signal EEG durant le sommeil NREM, caractérisée par des ondes delta, ne diffère pas entre les groupes LB et sucrose à 4 et 6 mois post-injection (Fig. 16A et B). En revanche pour le sommeil REM, la synchronisation neuronale est plus importante chez les souris LB comparée au groupe sucrose à 4 et 6 mois post-injection dans la bande de fréquence des ondes thêta (Fig. 16C et D). Le sommeil paradoxal est normalement caractérisé par une désynchronisation du signal EEG. Cela pourrait expliquer l'augmentation de la durée moyenne des épisodes de cette phase du cycle pour compenser la diminution désynchronisation neuronale.

L'analyse du spectre permet aussi d'étudier la pression de sommeil, l'amplitude du signal EEG dans les ondes delta reflétant le besoin de dormir. Plus l'amplitude est grande, plus le besoin de dormir est important. La pression de sommeil est déterminée par le pourcentage de la puissance des ondes delta lors des premières heures de la phase de sommeil par rapport aux dernières heures de cette même phase. Le besoin de dormir doit normalement diminuer avec le temps passé endormi. On constate ici que la pression de sommeil n'est pas altérée entre les groupes LB et sucrose, ni au cours du temps (Fig. 16E, F et G).

Une fois les enregistrements des cycles éveil/sommeil terminés, les cerveaux ont été récupérés pour des analyses histologiques. Pour chaque animal, des immunomarquages de la tyrosine hydroxylase et de l' α -syn soluble, phosphorylée et agrégée ont été réalisés dans le striatum, la SN et le LC, les deux premières structures étant les régions principalement dégénérées dans la MP, la dernière étant une des premières structures dans laquelle on retrouve des LB (stade 2) mais aussi une structure clé dans la régulation de l'éveil.

Le nombre de neurones TH-positifs est bien diminué dans la SN (perte moyenne de 10%) (Fig. 17B) bien que cette diminution ne soit pas aussi importante que prévu dans ce modèle et à ce stade. Les souris ne présentant pas assez de dégénérescence sont toutefois incluses dans l'étude compte tenu du faible nombre d'animaux. Au contraire, des altérations des paramètres des différentes phases du cycle éveil/sommeil sont observées malgré cette faible lésion neuronale. On observe également une diminution significative du nombre de neurones TH-positifs dans le LC (Fig. 17C ; * $p=0.04$).

Les marquages de l' α -syn réalisés dans les mêmes structures montrent une tendance à une augmentation de l' α -syn dans le striatum (Fig. 17D), la SN (Fig. 17E), et le LC (Fig. 17F). Les marquages de l' α -syn phosphorylée et agrégée ne sont pas présentés comme moins de 0,5% de la zone est marquée.

Enfin de possibles corrélations ont été étudiées entre les paramètres des phases d'éveil et de sommeil d'une part, et les résultats immunologiques d'autre part. On peut noter une corrélation négative entre le nombre de neurones TH-positifs de la SN et la durée des épisodes d'éveil en période de sommeil (Fig. 17G ; * $p=0.02$) et une corrélation positive avec le nombre d'épisodes de sommeil NREM dans cette même période (Fig. 17H ; * $p=0.03$). Ces résultats associés à ceux de l'enregistrement du sommeil en condition d'une déplétion de la dopamine, sont en faveur de l'hypothèse d'un rôle des neurones DA de la SN dans le maintien des phases d'éveil. Par ailleurs, on observe une corrélation négative entre les neurones TH-positifs dans le LC et la durée moyenne des épisodes de sommeil REM en période active (Fig. 17I ; * $p=0.03$) et une corrélation positive avec la durée du sommeil NREM en période de sommeil (Fig. 17J ; * $p=0.04$). Il apparaît probable que l'augmentation de ce dernier paramètre après injection de la réserpine soit due donc à une perte de la NA. Compte tenu des

précédents résultats, on peut émettre l'hypothèse que la perte des neurones du LC induit un défaut de désynchronisation neuronale durant le sommeil REM ce qui entraîne une augmentation de la durée de ces épisodes.

On observe également une corrélation positive entre la présence d' α -syn monomérique dans la SN et la durée des épisodes de sommeil NREM en période active, et une corrélation négative avec le nombre d'épisodes d'éveil durant cette même période.

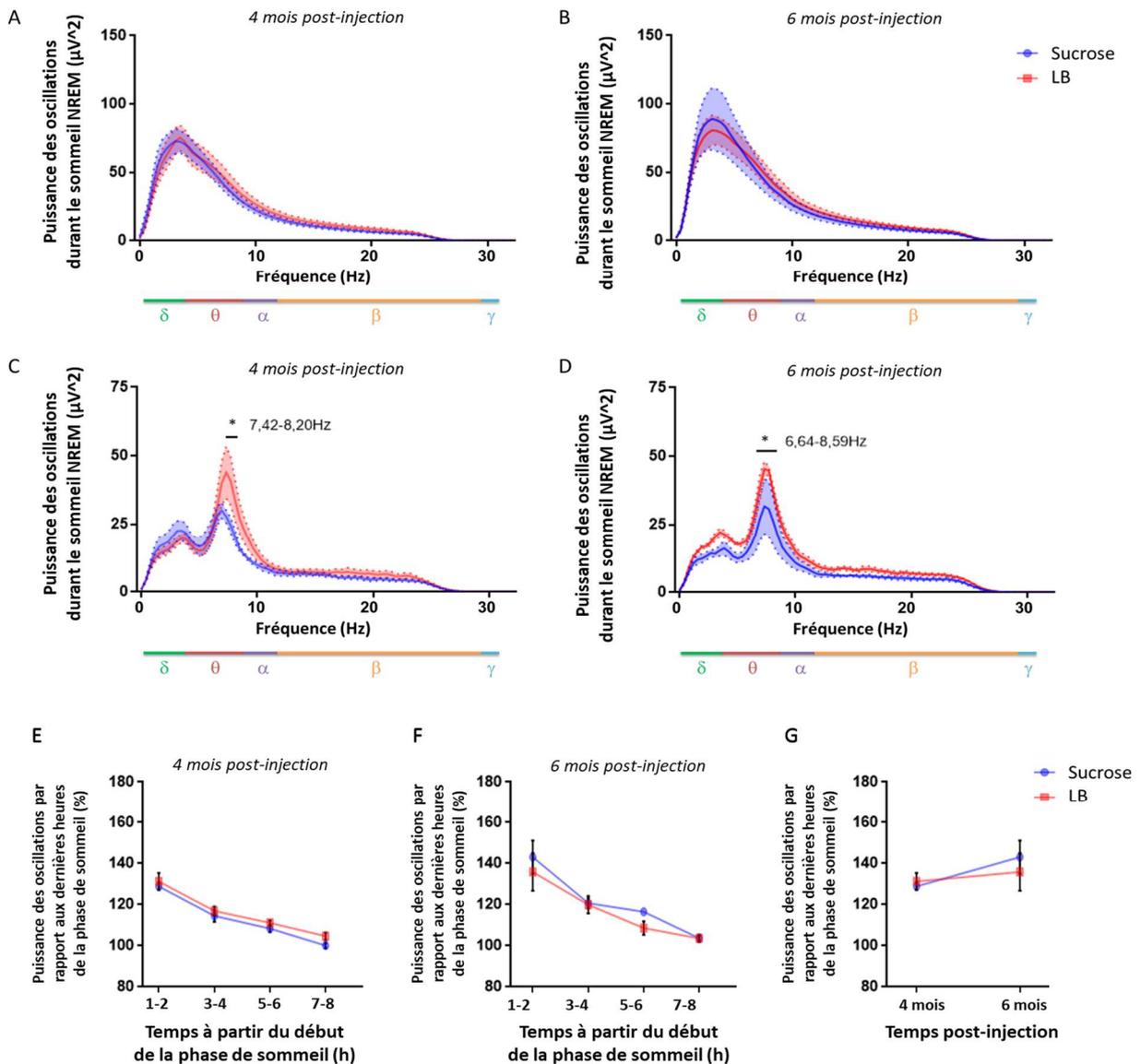


FIGURE 16. CARACTERISTIQUES DU SPECTRE DU SIGNAL EEG A 4 ET 6 MOIS APRES INJECTION DE LB.

Synchronisation neuronale donnée par la puissance des oscillations en fonction des bandes de fréquence (delta : 0,5-4Hz ; thêta : 4-9Hz ; alpha : 9-12Hz ; bêta : 12-30Hz ; gamma : 30-100Hz) pour le sommeil NREM à 4 (A.) et 6 mois (B.) post-injection ; pour le sommeil REM 4 (C.) et 6 mois (D.) post-injection. Pression de sommeil, traduisant le besoin de dormir, donnée par la puissance des ondes delta des premières heures de la phase de sommeil comparée aux dernières heures de la même phase à 4 (E.) et 6 mois (F.) post-injection. G. Evolution de la pression de sommeil au cours des deux premières heures de la phase de sommeil. Comparaison avec un test 2way ANOVA, et un test post hoc de Tukey le cas échéant. * $p < 0.05$ comparé au souris sucrose.

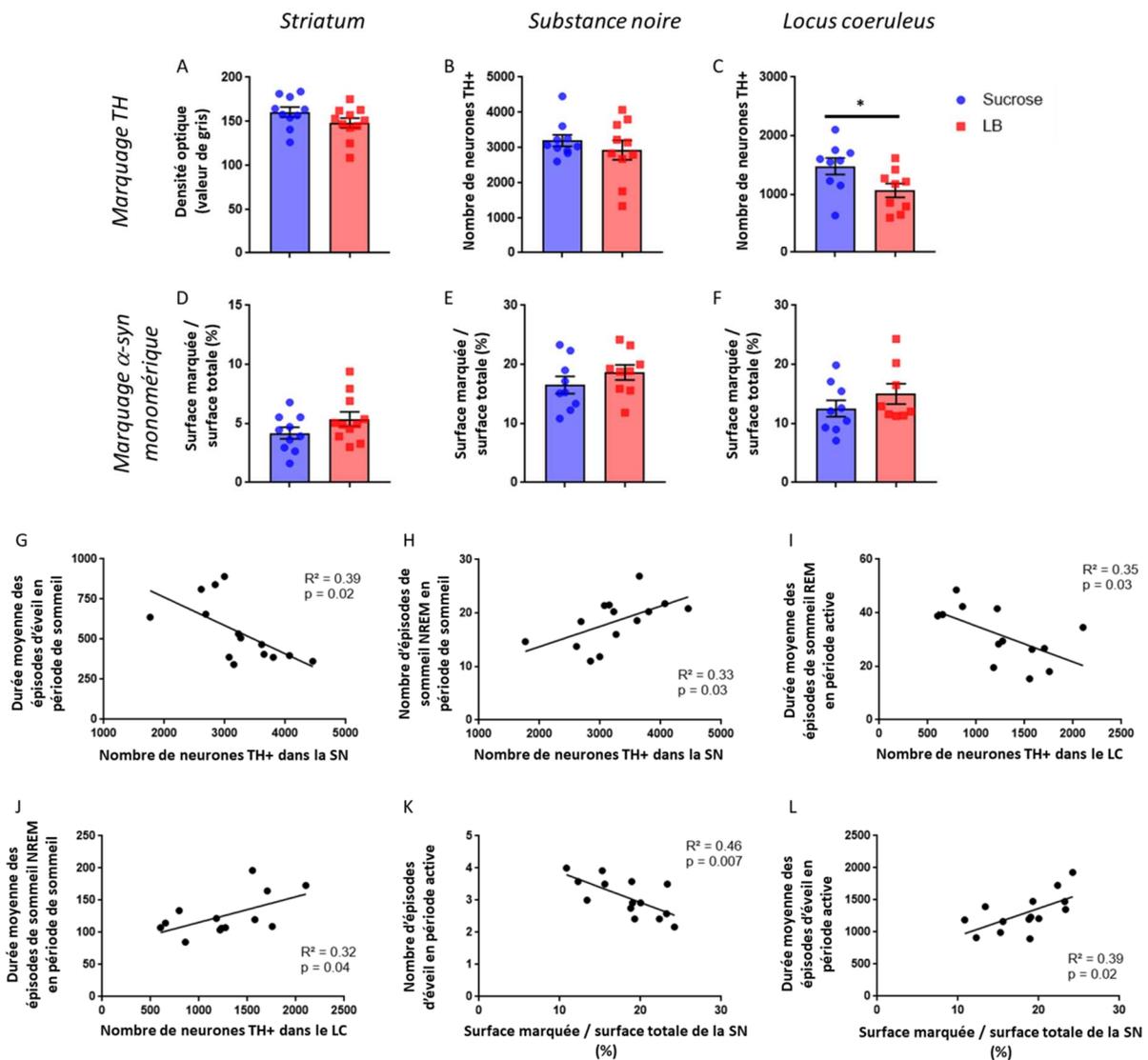


FIGURE 17. MARQUAGE IMMUNOLOGIQUE DES SOURIS LB ET DES SOURIS SUCROSE ET CORRELATION.

Marquage immunologique de la tyrosine hydroxylase (TH) dans le striatum (A.), la SN (B.) et le LC (C.). Marquage immunologique de l' α -syn monomérique dans le striatum (D.), la SN (E.) et le LC (F.). Corrélation entre les données histologiques et les données sommeil (G.-L.). Comparaison avec un t-test (ou test de Mann Whitney). * $p < 0.05$ comparé au groupe sucrose.

B. Modèle murin de l'atrophie multisystématisée

Le modèle PLP-syn a été selon les mêmes critères que ceux choisis pour le modèle MP comme modèle de la MP. Ce modèle était également utilisé au laboratoire.

Le début des enregistrements a été fixé à 6 mois comme les souris PLP-syn présentent déjà une perte neuronale. Les souris sont donc implantées avec l'implant EEG/EMG à cet âge (Fig. 18). Après 7 jours de récupération, les souris ont été branchées au système d'enregistrement pour 48h afin de s'habituer à leur nouvel environnement puis pour 24h d'enregistrement d'un cycle éveil/sommeil.

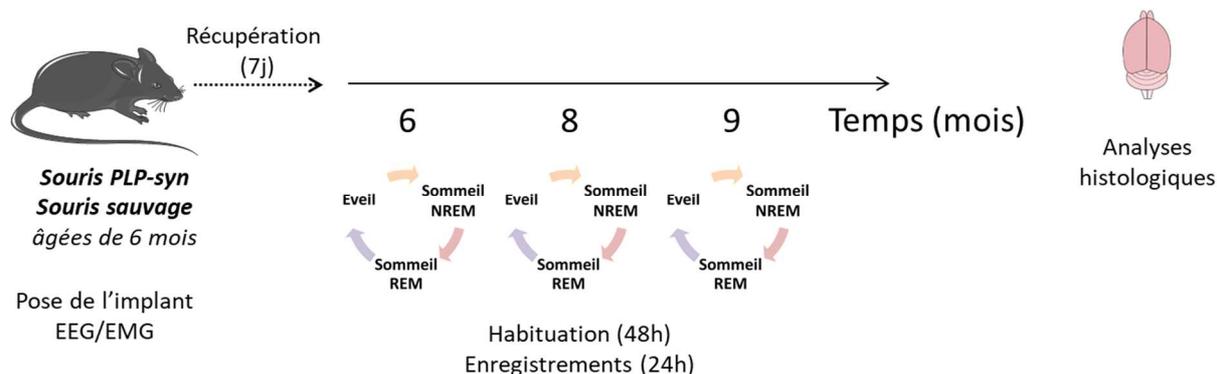


FIGURE 18. PROTOCOLE EXPERIMENTAL DE L'ENREGISTREMENT DU CYCLE EVEIL/SOMMEIL DES SOURIS PLP-SYN AGEES DE 6, 8 ET 9 MOIS.

Les résultats obtenus avec le modèle PLP ne montre aucune différence avec le groupe contrôle (Fig. 19, 20 et 21). Cependant, au cours du temps et au sein du groupe PLP-syn, on note quand même une diminution de la durée moyenne des épisodes de sommeil REM (Fig. 20L ; 6-8 mois $*p=0.02$; 6-9 mois $*p=0.02$), et une augmentation du nombre d'épisodes de sommeil NREM sur 24h (Fig. 21H panel de gauche ; 6-8 mois $*p=0.009$; 6-9 mois $*p=0.009$) et pendant la phase active de la souris (Fig. 21H panel de droite ; 6-8 mois $*p=0.008$; 6-9 mois $*p=0.008$).

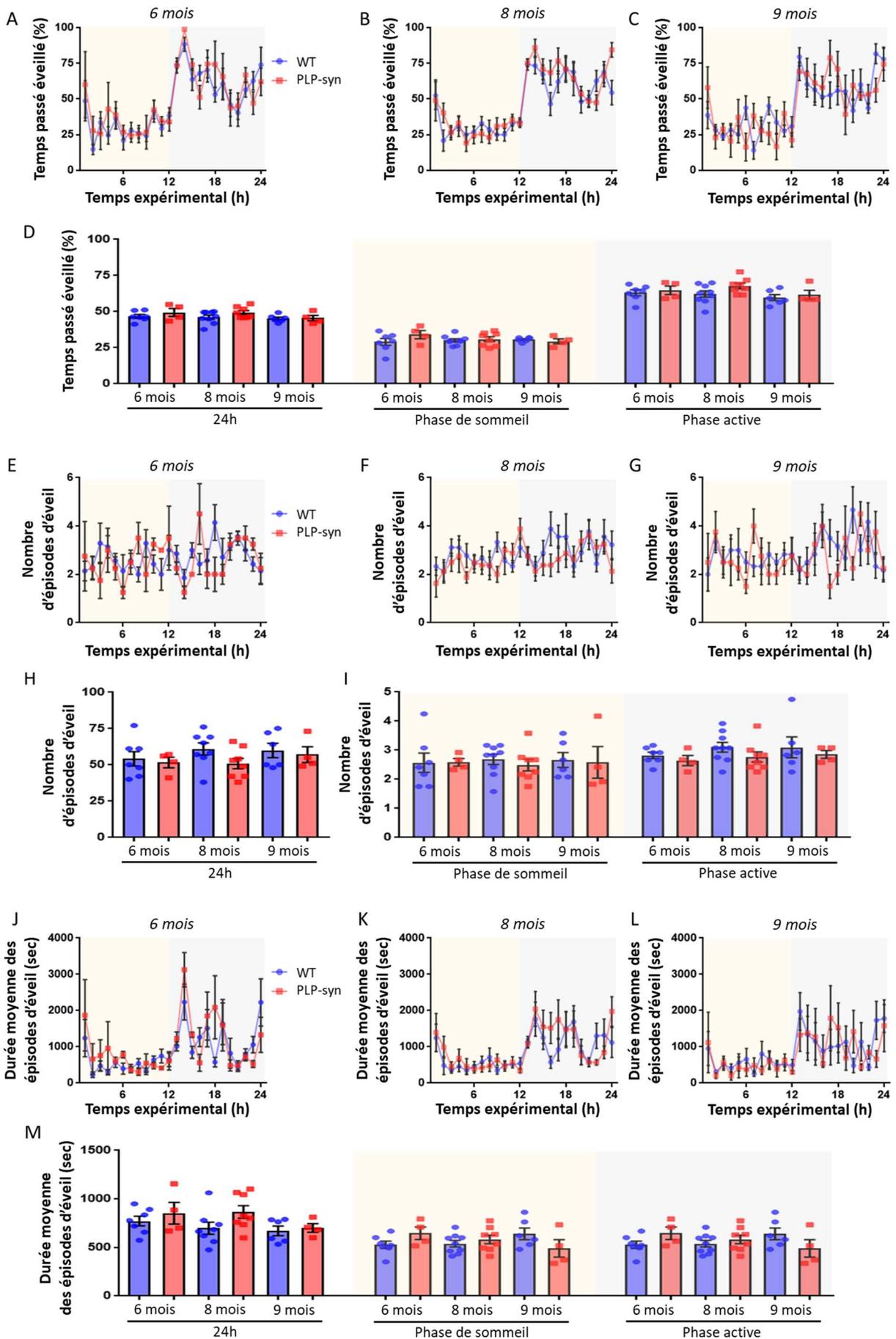
L'analyse du spectre du signal EEG ne montre pas non plus de différence entre les deux groupes au niveau de la synchronisation neuronale au cours du sommeil NREM et du sommeil REM, ni concernant la pression de sommeil (Fig. 22).

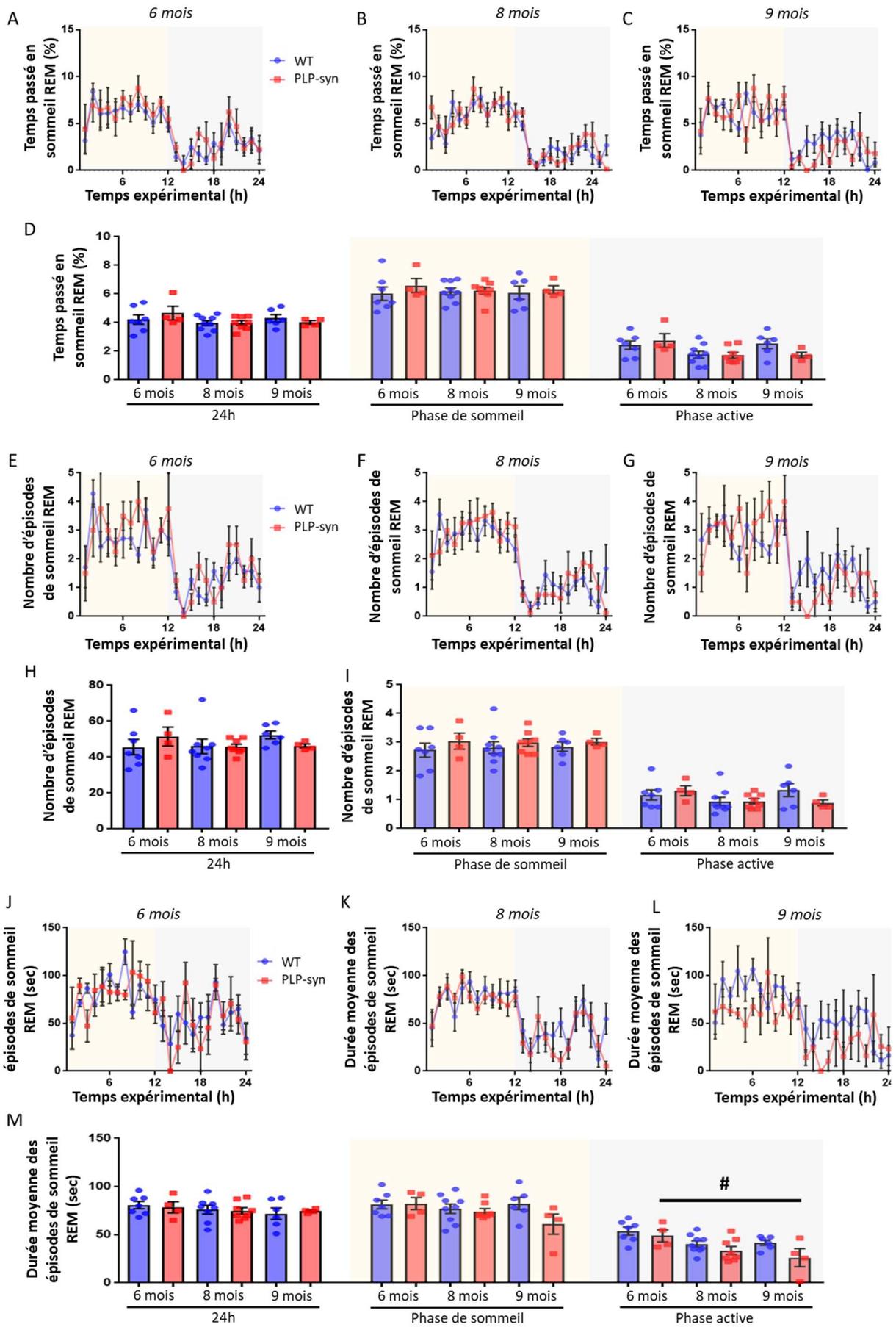
Les résultats présentés ici sont issus de deux sessions d'enregistrement dont aucune n'a pu être analysés au-delà de 9 mois à cause de la perte de qualité du signal pour la première, et du confinement pour la seconde. Comme les enregistrements devaient se déroulés jusqu'à ce que les souris atteignent l'âge de 10 mois, c'est à cet âge-là que les cerveaux ont été récupérés pour les analyses histologiques.

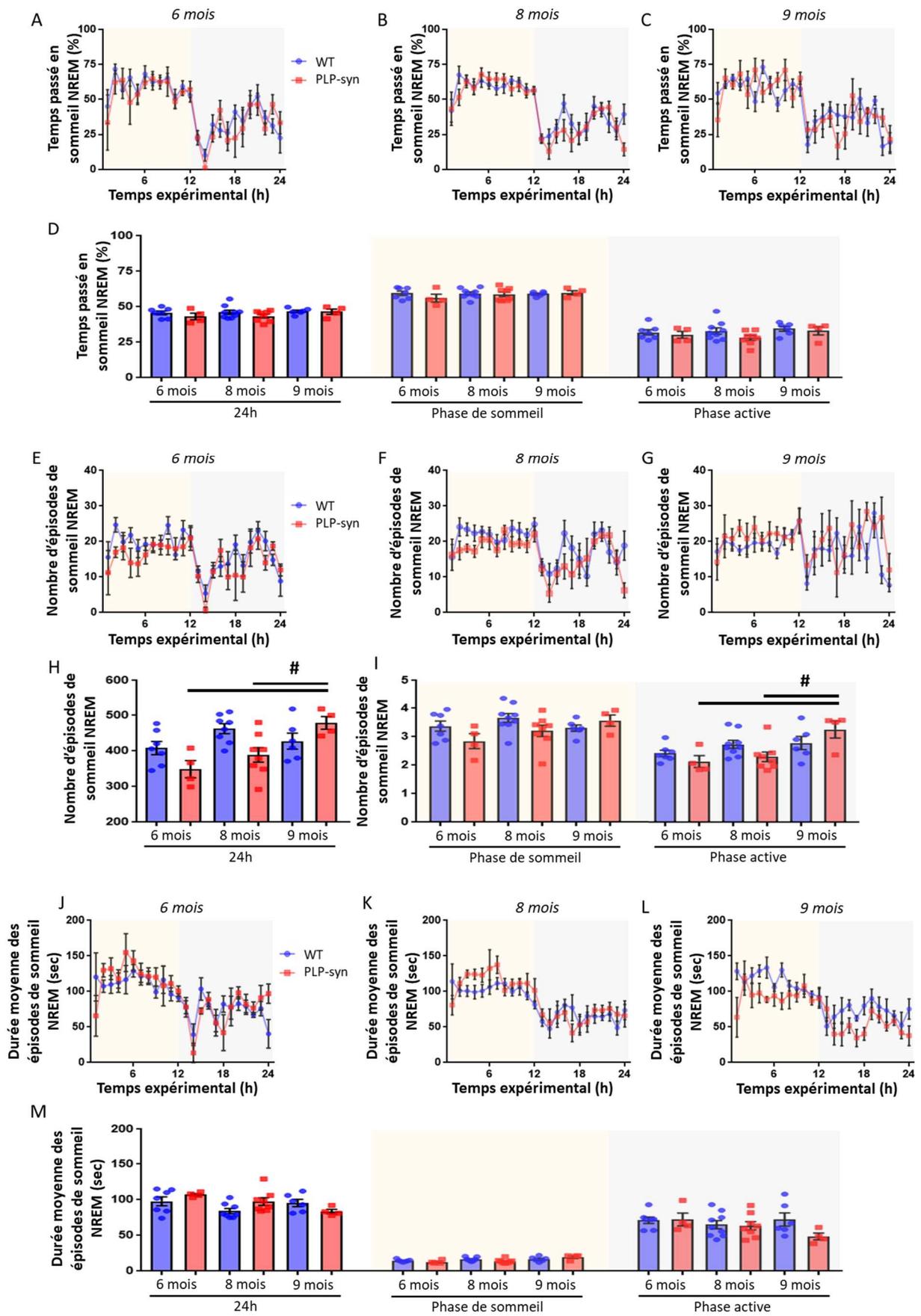
Comme pour le modèle de la MP, des immunomarquages de la tyrosine hydroxylase et de l' α -syn soluble, phosphorylée et agrégée ont été réalisés dans le striatum, la SN et le LC.

On constate bien une perte des neurones TH-positifs dans la SN (Fig. 23B ; $*p=0.005$) comme attendu dans ce modèle à cet âge. On observe également une diminution de l' α -syn soluble dans la SN (Fig.23E) au profit d'une augmentation importante de l' α -syn phosphorylée (Fig. 23H ; $*p<0.0001$). La même augmentation est observée dans le striatum (Fig. 23G ; $*p<0.0001$) et dans le LC (Fig. 23I $*p<0.0001$).

La pathologie au niveau histologique est donc clairement établie sans que cela n'entraîne d'altérations du cycle éveil/sommeil.







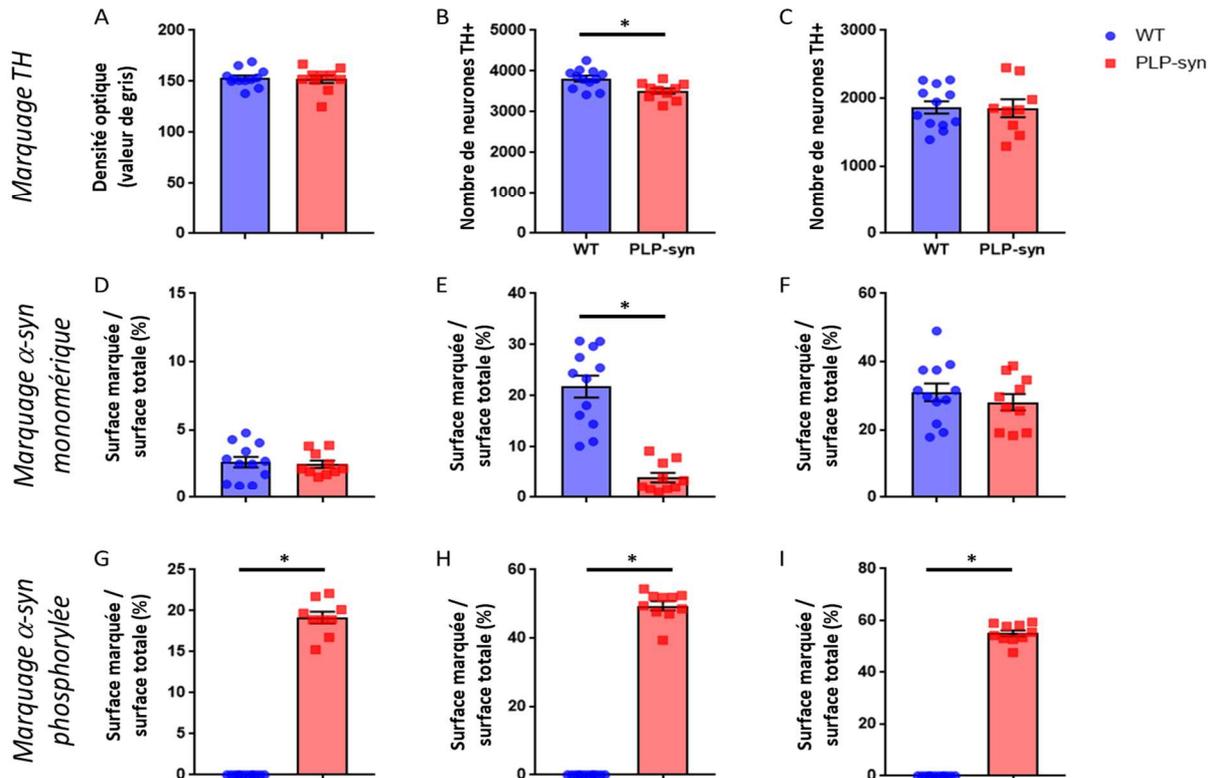
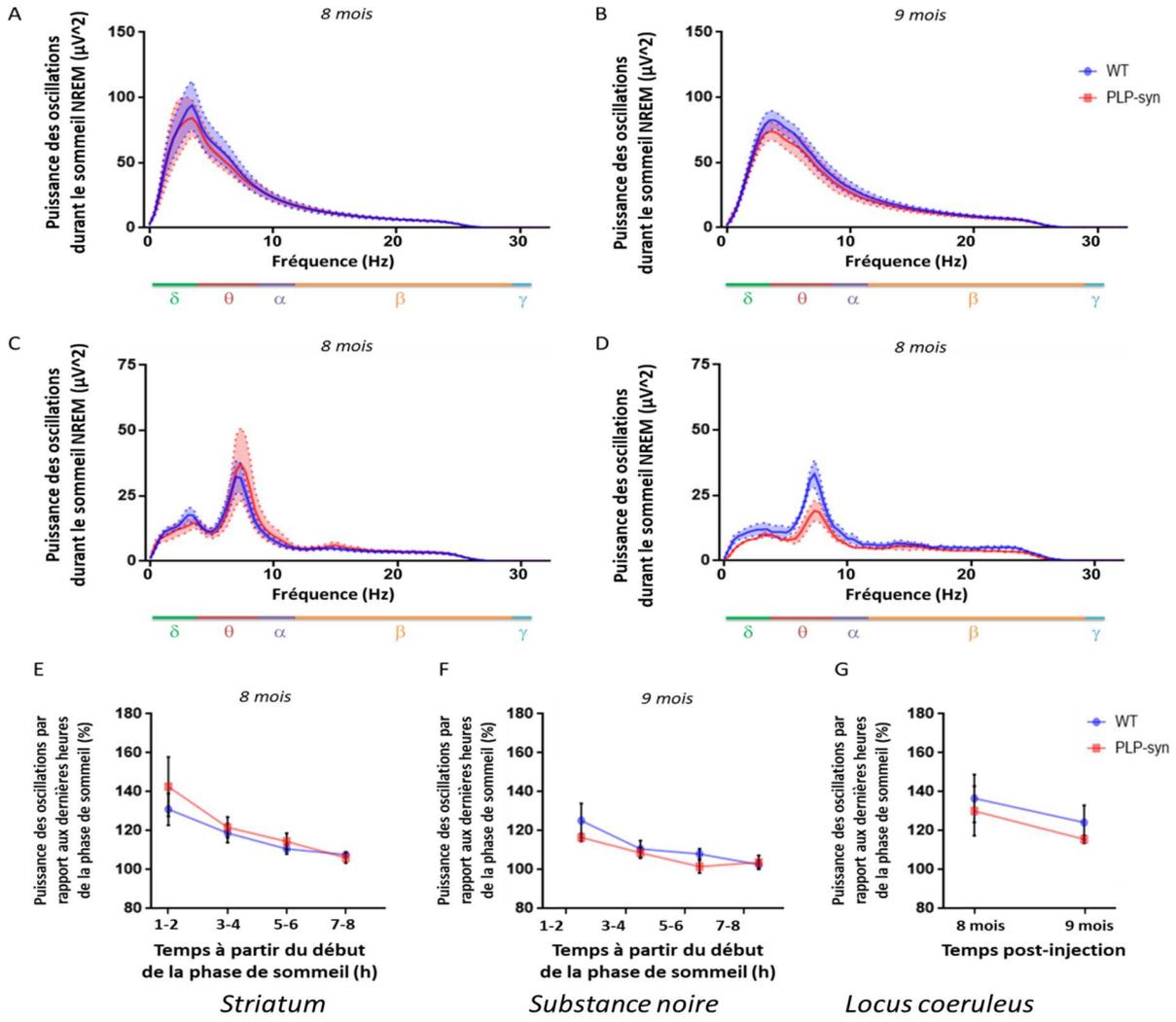


FIGURE 19. CARACTERISTIQUES DE LA PHASE D'ÉVEIL DES SOURIS PLP-SYN AGÉES DE 6, 8 ET 9 MOIS.

Temps passé éveillé à 6 (A.), 8 mois (B.) et 9 mois (C.) en fonction du temps expérimental. D. Temps passé éveillé sur 24h, durant la phase de sommeil et durant la phase active. Nombre d'épisodes d'éveil à 6 (E.), 8 mois (F.) et 9 mois (G.) en fonction du temps expérimental. Nombre d'épisodes d'éveil sur 24h (H.), durant la phase de sommeil et durant la phase active (I.). Durée moyenne des épisodes d'éveil à 6 (J.), 8 mois (K.) et 9 mois (L.) en fonction du temps expérimental. M. Durée moyenne des épisodes d'éveil sur 24h, durant la phase de sommeil et durant la phase active. Comparaison au cours du temps expérimental avec un 2way ANOVA, et un test post hoc de Tukey le cas échéant. Comparaison sur 24h, sur la période de sommeil ou la période d'éveil avec un t-test (ou test de Mann Whitney).

FIGURE 20. CARACTERISTIQUES DE LA PHASE DE SOMMEIL REM DES SOURIS PLP-SYN AGÉES DE 6, 8 ET 9 MOIS.

Temps passé en sommeil REM à 6 (A.), 8 mois (B.) et 9 mois (C.) en fonction du temps expérimental. D. Temps passé en sommeil REM sur 24h, durant la phase de sommeil et durant la phase active. Nombre d'épisodes de sommeil REM à 6 (E.), 8 mois (F.) et 9 mois (G.) en fonction du temps expérimental. Nombre d'épisodes de sommeil REM sur 24h (H.), durant la phase de sommeil et durant la phase active (I.). Durée moyenne des épisodes de sommeil REM à 6 (J.), 8 mois (K.) et 9 mois (L.) en fonction du temps expérimental. M. Durée moyenne des épisodes de sommeil REM sur 24h, durant la phase de sommeil et durant la phase active. Comparaison au cours du temps expérimental avec un 2way ANOVA, et un test post hoc de Tukey le cas échéant. Comparaison sur 24h, sur la période de sommeil ou la période d'éveil avec un t-test (ou test de Mann Whitney). #p<0.05 comparé à l'âge de 6 mois.

FIGURE 21. CARACTERISTIQUES DE LA PHASE DE SOMMEIL NREM DES SOURIS PLP-SYN AGÉES DE 6, 8 ET 9 MOIS.

Temps passé en sommeil NREM à 6 (A.), 8 mois (B.) et 9 mois (C.) en fonction du temps expérimental. D. Temps passé en sommeil NREM sur 24h, durant la phase de sommeil et durant la phase active. Nombre d'épisodes de sommeil NREM à 6 (E.), 8 mois (F.) et 9 mois (G.) en fonction du temps expérimental. Nombre d'épisodes de sommeil NREM sur 24h (H.), durant la phase de sommeil et durant la phase active (I.). Durée moyenne des épisodes de sommeil NREM à 6 (J.), 8 mois (K.) et 9 mois (L.) en fonction du temps expérimental. M. Durée moyenne des épisodes de sommeil NREM sur 24h, durant la phase de sommeil et durant la phase active. Comparaison au cours du temps expérimental avec un 2way ANOVA, et un test post hoc de Tukey le cas échéant. Comparaison sur 24h, sur la période de sommeil ou la période d'éveil avec un t-test (ou test de Mann Whitney). *p<0.05 comparé au groupe WT. #p<0.05 comparé à l'âge de 6 mois.

FIGURE 22. CARACTERISTIQUES DU SPECTRE DE L'ANALYSE DU SIGNAL EEG A L'ÂGE DE 8 ET 9 MOIS.

Synchronisation neuronale donnée par la puissance des oscillations en fonction des bandes de fréquence (delta : 0,5-4Hz ; thêta : 4-9Hz ; alpha : 9-12Hz ; bêta : 12-30Hz ; gamma : 30-100Hz) pour le sommeil NREM à 8 (A.) et 9 mois (B.) post-injection ; pour le sommeil REM 8 (C.) et 9 mois (D.). Pression de sommeil, traduisant le besoin de dormir, donnée par la puissance des ondes delta des premières heures de la phase de sommeil comparée aux dernières heures de la même phase à 8 (E.) et 9 mois (F.). G. Evolution de la pression de sommeil au cours des deux premières heures de la phase de sommeil. Comparaison avec un 2way ANOVA, et un test post hoc de Tukey le cas échéant.

FIGURE 23. MARQUAGE IMMUNOLOGIQUE DES SOURIS PLP-SYN ET DES SOURIS WT.

Marquage immunologique de la tyrosine hydroxylase (TH) dans le striatum (A.), la SN (B.) et le LC (C.). Marquage immunologique de l' α -syn monomérique dans le striatum (D.), la SN (E.) et le LC (F.). Marquage immunologique de l' α -syn phosphorylée dans le striatum (G.), la SN (H.) et le LC (I.). Comparaison avec un t-test (ou test de Mann Whitney). *p<0.05 comparé au groupe sucrose.

Partie 4 : Impact du sommeil dans l'élimination de l' α -synucléine

Les patients atteints de la maladie de Parkinson et de l'atrophie multisystématisée doivent pour une grande majorité faire face à des altérations du sommeil qui surviennent de manière relativement précoce dans le développement de la maladie. L'une des caractéristiques de ces maladies est la présence d'agrégats protéiques pathologiques composés d' α -synucléine malconformée.

Xie et al. ont montré en 2013 que la bêta-amyloïde physiologique était éliminée deux fois plus rapidement chez des souris endormies que chez des souris éveillées. Dans le contexte des protéinopathies, l'étude de la bêta-amyloïde est intéressante car elle s'agrège lorsqu'elle est malconformée pour former des inclusions qui sont caractéristiques de la maladie d'Alzheimer.

Ces éléments mènent à l'hypothèse que le sommeil pourrait intervenir dans l'élimination d'autres protéines impliquées dans des protéinopathies, et notamment l' α -synucléine.

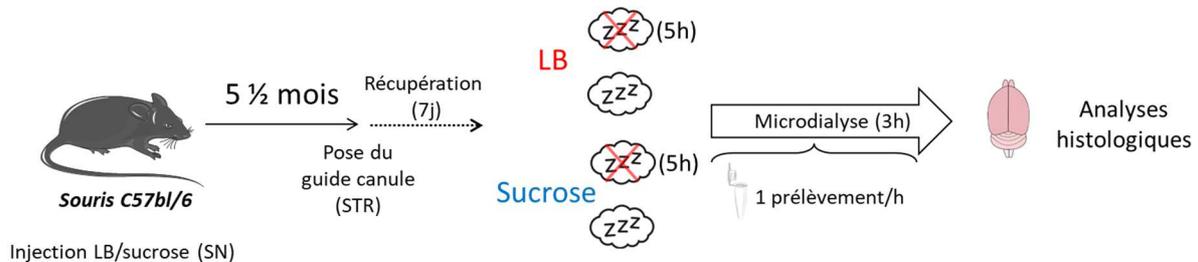


FIGURE 24. PROTOCOLE EXPERIMENTAL DE L'EXPERIENCE DE MICRODIALYSE ET DE PRIVATION DE SOMMEIL DES SOURIS LB.

Pour tester cette hypothèse, nous avons cherché à savoir si l'augmentation induite du sommeil permettant d'augmenter l'élimination de l' α -syn. Nous avons utilisé des souris préalablement injectées avec des fractions LB qui présentent une augmentation de l' α -syn dans différentes structures dont le striatum. Un groupe de souris est a été privé de sommeil durant 5h à partir du début de la phase de sommeil grâce à l'enrichissement régulier des cages et avec de légers stimuli visuels, puis des prélèvements de CSF au niveau du striatum ont été réalisés grâce à la technique de microdialyse (Fig. 24). Un échantillon a été prélevé toutes les heures pendant 3h. Enfin, le cerveau des souris a été extrait pour vérifier le placement de la sonde et pour des analyses histologiques.

L'analyse histologique des cerveaux de souris a permis d'attester le bon placement de la sonde de microdialyse dans le striatum pour la totalité des souris de l'expérience. De plus, comme attendu dans ce modèle, on retrouve bien une perte des neurones positifs à la TH dans la SN (Fig. 25B ; *p=0.002) et le LC (Fig. 25C ; *p=0.004), ainsi qu'une augmentation de l' α -syn dans le striatum (Fig. 25D ; *p=0.001) et la SN (Fig. 25E ; *p=0.002).

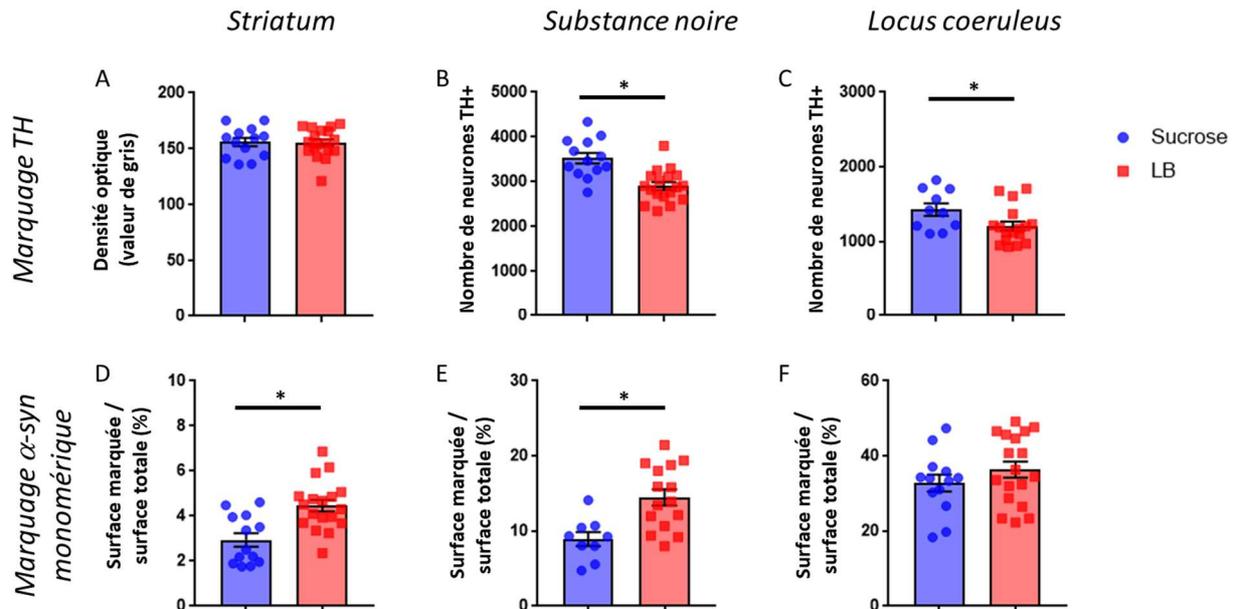


FIGURE 25. MARQUAGE IMMUNOLOGIQUE DES SOURIS LB ET DES SOURIS SUCROSE.

Marquage immunologique de la tyrosine hydroxylase (TH) dans le striatum (A.), la SN (B.) et le LC (C.). Marquage immunologique de l'α-syn monomérique dans le striatum (D.), la SN (E.) et le LC (F.). Comparaison avec un t-test (ou test de Mann Whitney). *p<0.05 comparé au groupe sucrose.

Compte tenu des problèmes rencontrés durant la réalisation de cette expérience, notamment à cause du contexte sanitaire, il n'est pas possible d'apporter une interprétation claire à ces résultats due à un trop faible nombre d'échantillon analysé. Cependant, il semble y avoir une diminution de l'α-syn dans le striatum des souris injectées avec du sucrose qui ont été privées de sommeil. Cette diminution n'apparaît pas pour les souris injectées avec des fractions LB, qu'elles aient été ou non privées de sommeil. Ces éléments pourraient étayer notre hypothèse en montrant que l'augmentation de la pression de sommeil induite par la privation de sommeil permet une élimination plus importante de l'α-syn ce qui n'est pas retrouvé dans le modèle de la maladie de Parkinson. Des mécanismes pathologiques induisant un défaut de l'élimination de l'α-syn pourraient donc déjà être en œuvre à un stade aussi précoce du développement de la maladie. Encore une fois, l'étude d'une nouvelle cohorte est nécessaire pour confirmer les tendances observées.

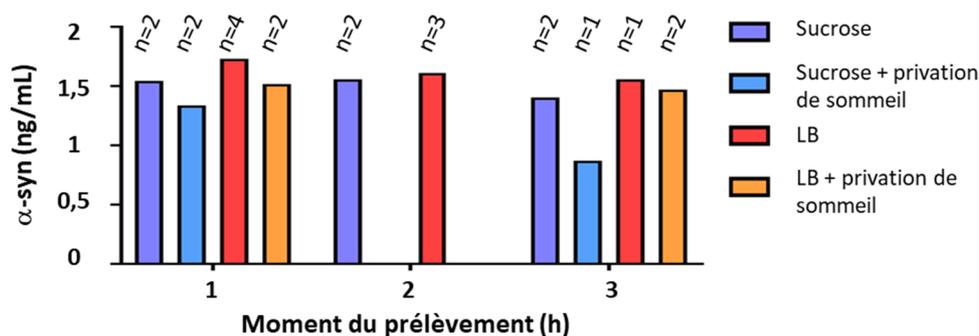


FIGURE 26. CONCENTRATION D'α-SYNUCLEINE DANS LES PRELEVEMENTS DE MICRODIALYSE EN FONCTION DU MOMENT DU PRELEVEMENT.

Discussion

I. Synthèse des résultats

La dopamine a un rôle connu dans la régulation du cycle éveil/sommeil, mais son mode d'action précis reste à établir comme il apparaît qu'elle puisse jouer des rôles opposés en fonction des régions et des voies impliquées. Notre étude portant sur les synucléinopathies qui ont pour caractéristique communes une dégénérescence de la substance noire, qui s'avère être une des principales sources de dopamine, il semble important de mieux établir le rôle de la dopamine vis-à-vis du sommeil et de l'éveil.

Pour se faire, nous avons décidé d'induire une déplétion en dopamine via l'injection de réserpine et de voir l'impact sur l'enregistrement d'un cycle éveil/sommeil. Les résultats obtenus suggèrent que la dopamine est impliquée dans la maintenance de l'éveil. En effet, on constate une diminution de la durée des phases d'éveil, une augmentation du nombre d'épisodes d'éveil en période active et une augmentation du nombre d'épisodes de sommeil NREM en période inactive. Les mêmes résultats sont obtenus chez les souris KO pour le récepteur D2 de la dopamine¹⁷⁵ qui est largement retrouvé au niveau du striatum⁵⁵⁸. L'augmentation du nombre d'épisodes de sommeil NREM pourrait faire penser que la dopamine a un rôle dans la promotion du sommeil mais il apparaît plus probable que lorsqu'une phase d'éveil se termine durant la phase de sommeil, il n'y ait pas de compensation avec une augmentation du nombre de phase d'éveil, qui se produirait plutôt durant la phase d'éveil, ce qui est d'ailleurs le cas.

La déplétion des stocks de dopamine étant couplé à l'injection d'un inhibiteur de la tyrosine hydroxylase qui permet la synthèse de la dopamine, il faut tenir compte dans les résultats de l'implication de la noradrénaline, dont la voie de synthèse comprend la TH. Par ailleurs, il est intéressant d'étudier le système noradrénergique comme ce système est aussi atteint chez les patients parkinsoniens comme le LC, qui est la principale source de noradrénaline, fait partie des premières structures dans laquelle on trouve des corps de Lewy⁶⁵.

Une corrélation négative est observée dans le modèle LB entre la quantité de neurones TH+ et la durée moyenne des épisodes de sommeil REM dans la phase active de la souris. L'augmentation de ce paramètre fait justement partie des résultats obtenus dans notre expérience de déplétion. Par ailleurs, le LC est impliqué dans l'activation corticale^{165,166}, qui se traduit par une désynchronisation des neurones corticaux et qui est visible par l'étude du spectre du signal. Plus l'amplitude du signal EEG enregistré au niveau du cortex est importante, plus les neurones corticaux sont synchronisés.

Justement, dans le modèle LB, on retrouve une augmentation de cette amplitude durant le sommeil paradoxal, or cette phase est normalement caractérisée par une désynchronisation neuronale similaire à ce qui peut être observé durant l'éveil, et qui donne justement ce nom de paradoxal. On peut donc supposer que la diminution du nombre de neurones dans le LC empêche l'activation corticale, ce qui engendre une augmentation de la durée des phases de sommeil REM pour essayer de compenser car certains mécanismes doivent nécessiter cette désynchronisation neuronale durant cette phase.

L'étude du lien entre les altérations du sommeil et le développement des synucléinopathies nécessite un modèle animal qui remplit les critères suivants :

- Une progression dans le temps qui soit lente pour mimer au mieux la maladie et pour permettre d'avoir la fenêtre temporelle la plus large possible entre le début des altérations du sommeil et la survenue des symptômes moteurs
- une altération du sommeil qui se rapproche autant que possible de ce qui est observable chez les patients
- une neurodégénérescence nigrostriatale qui est caractéristique des synucléinopathies
- des changements dans l'expression de l' α -syn
- une propagation de la synucléinopathie
- et la disponibilité du modèle et du matériel pour enregistrer le sommeil.

Pour la maladie de Parkinson, le modèle choisi est la souris dite LB qui consiste en l'injection de fractions LB contenant des agrégats pathologiques issus du cerveau de patients atteints de la MP. Ce modèle présente une lésion significative de la substance noire 4 mois après l'injection de LB⁶⁸ qui n'augmente pas de manière significative au cours du temps, pas de différence à 17 mois post-injection, et qui ne présente pas d'anomalie motrice majeur, même à 17 mois. La lésion observée est dépendante de la présence d' α -syn et il y a bien une progression de la synucléinopathie comme c'est de l' α -syn humaine qui est injectée et que l'augmentation de l' α -syn observée concerne l' α -syn murine. Enfin ce modèle est déjà étudié au sein du laboratoire. Il reste donc à déterminer si ce modèle présente des altérations du cycle éveil/sommeil.

L'analyse du sommeil montre qu'à 4 mois post-injection il y a une diminution du temps totale passé éveillé qui va de pair avec une augmentation du temps total passé en sommeil NREM. On retrouve les mêmes tendances à 6 mois, la perte de significativité était certainement due à réduction du nombre d'animaux à cause de la perte de la qualité du signal.

De même, on observe une augmentation de la durée moyenne des épisodes et du nombre d'épisodes de sommeil NREM en phase active. On observe enfin une augmentation du temps total passé en sommeil REM sur 24h et une augmentation de la durée moyenne de ces épisodes en phase active.

On peut donc conclure que le modèle LB présente des altérations des cycles éveil/sommeil comparé aux souris contrôle.

En ce qui concerne l'AMS, le modèle retenu est le modèle PLP-syn. Ce modèle est basé sur la surexpression de l' α -syn humaine sous le contrôle d'un promoteur oligodendroglial, à savoir le PLP. Parmi les modèles existants, ce modèle est celui qui mime au mieux l'AMS. Il présente une lésion au niveau de la substance noire qui est significative à l'âge de 6 mois, des troubles moteurs à 1 an qui sont déjà légèrement détectable à 10mois, ainsi que des troubles du système végétatif notamment des troubles respiratoires. De plus ce modèle était là aussi disponible au laboratoire où il faisait déjà l'objet de projets de recherche.

Malgré une pathologie clairement établie au niveau histologique, le modèle PLP de l'AMS ne présente pas d'altération significative du cycle éveil/sommeil à l'âge de 9 mois. Ces résultats sont en accord avec des travaux réalisés précédemment sur ce modèle⁵³⁵. De plus, comme l'objectif final est de pouvoir agir pendant la période de temps entre le développement des altérations du sommeil et le début des troubles moteurs et que les souris PLP-syn présentent déjà de légers troubles moteurs à 10 mois, ce modèle ne semble pas être adapté à notre étude.

Enfin, compte tenu du rôle du sommeil démontrée dans l'élimination de protéine telle que l'amyloïde β ²⁶, nous nous sommes demandé si le sommeil pouvait avoir un impact sur l'élimination de l' α -syn. Pour cela une expérience de microdialyse a été réalisée sur des souris LB en condition de sommeil normal ou de privation de sommeil qui a pour effet d'augmenter le sommeil durant les heures suivants la fin de cette privation. Il serait donc logique de penser que l'élimination de l' α -syn est plus importante lors du sommeil induit. Compte tenu de problème divers, il n'est pas possible de conclure de façon précise sur les résultats apportés, mais il semble qu'une tendance à ce que l'élimination de l' α -syn soit plus importante chez les souris contrôle après la privation de sommeil. Cette même tendance n'est pas retrouvée dans le modèle LB, ce qui pourrait indiquer qu'il y a déjà un défaut d'élimination à un stade aussi précoce du développement de la maladie.

II. Limitations

Une des limitations techniques rencontrées durant cette thèse est le fait qu'il n'y avait que 3 systèmes d'enregistrement qu'il fallait partager avec les autres étudiants dont les projets portaient sur le sommeil. De plus, comme il s'agit de projets s'étalant sur plusieurs mois, la perte de la qualité du signal au cours du temps a été un problème pour garder un nombre correct de souris par groupe tout au long des expériences. L'installation de caméra aurait certainement été un plus pour déterminer l'architecture lorsqu'un doute persistait sur une phase. De même, cela aurait été utile pour déterminer

la présence d'un trouble moteur durant le sommeil paradoxal qu'il est autrement plus difficile à identifier.

Concernant les résultats présentés pour les souris PLP-syn, ils sont issus de deux sessions d'enregistrement. Au cours de la première session d'enregistrement (groupe contrôle n=7, groupe PLP-syn n=4 (initialement n=6)), il y a eu très rapidement une perte de la qualité du signal et peu de souris ont pu être enregistrée au-delà de 8 mois. Une deuxième session (groupe contrôle n=6 ; groupe PLP-syn n=5) a été programmé en débutant à 8 mois. En effet, la première session n'avait montré aucune différence à 6 mois, mais on observait une tendance à ce que le temps total passé éveillé soit plus important. Les enregistrements ont cependant été arrêtés en raison du confinement. Une nouvelle session a été lancée à la reprise des activités, mais encore une fois, la qualité du signal n'a pas permis l'analyse de ce groupe.

Pour l'expérience de microdialyse, le contexte sanitaire a conduit à l'euthanasie d'un tiers des souris, celles ayant tout juste été implantées avec le guide canule et dont le suivi ne pouvait être assuré à cause du confinement. De plus le protocole expérimental a dû être adapté lors de la reprise des activités compte tenu de la plage horaire restreinte. La privation de sommeil devait être initialement de 6h, et la période de prélèvement devait également être de 6h. Enfin, le manque d'expérience pour réaliser la microdialyse devait être pallié par l'assistance de personnes plus expérimentées mais la restriction du personnel ne l'a pas permis.

Enfin, il faut noter que l'utilisation de modèle rongeurs a aussi ses limites pour l'étude du sommeil compte tenu des différences avec le sommeil humain, dont la plus importante est le modèle de sommeil polyphasique chez la souris. Il ne faut donc pas s'attendre à retrouver exactement les mêmes altérations que chez l'Homme, mais bien limiter l'utilisation du modèle animal à la compréhension des mécanismes liant le développement de la pathologie et les altérations des cycles éveil/sommeil

Bibliographie

1. Dorsey, E. R. *et al.* Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* **17**, 939–953 (2018).
2. Dorsey, E. R., Sherer, T., Okun, M. & Bloem, B. The Emerging Evidence of the Parkinson Pandemic. *J. Park. Dis.* S3–S8 (2018).
3. Sanford, A. M. Lewy Body Dementia. *Clin. Geriatr. Med.* **34**, 603–615 (2018).
4. Krismer, F. & Wenning, G. K. Multiple system atrophy: insights into a rare and debilitating movement disorder. *Nat. Rev. Neurol.* **13**, 232–243 (2017).
5. De Pablo-Fernandez, E. *et al.* Association of Autonomic Dysfunction With Disease Progression and Survival in Parkinson Disease. *JAMA Neurol.* **74**, 970–976 (2017).
6. Williams, M. M., Xiong, C., Morris, J. C. & Galvin, J. E. Survival and mortality differences between dementia with Lewy bodies vs Alzheimer disease. *Neurology* **67**, 1935–1941 (2006).
7. Papapetropoulos, S. *et al.* Causes of death in multiple system atrophy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **78**, 327–329 (2007).
8. Parkinson, J. An Essay on the Shaking Palsy. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* **14**, 223–236 (2002).
9. Holdorff, B. Friedrich Heinrich Lewy (1885–1950) and His Work. *J. Hist. Neurosci.* **11**, 19–28 (2002).
10. Kosaka, K., Oyanagi, S., Matsushita, M., Hori, A. & Iwase, S. Presenile dementia with Alzheimer-, Pick- and Lewy-body changes. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **36**, 221–233 (1976).
11. Okazaki, H., Lipkin, L. E. & Aronson, S. M. Diffuse Intracytoplasmic Ganglionic Inclusions (Lewy Type) Associated with Progressive Dementia and Quadriparesis in Flexion. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **20**, 237–244 (1961).
12. Burkhardt, C. R. *et al.* Diffuse Lewy body disease and progressive dementia. *Neurology* **38**, 1520–1528 (1988).
13. Spillantini, M. G. *et al.* Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* **388**, 839–840 (1997).
14. Grazia Spillantini, M. *et al.* Filamentous α -synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Neurosci. Lett.* **251**, 205–208 (1998).
15. Fearnley, J. M. & Lees, A. J. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain J. Neurol.* **114** (Pt 5), 2283–2301 (1991).
16. Papp, M. I., Kahn, J. E. & Lantos, P. L. Glial cytoplasmic inclusions in the CNS of patients with multiple system atrophy (striatonigral degeneration, olivopontocerebellar atrophy and Shy-Drager syndrome). *J. Neurol. Sci.* **94**, 79–100 (1989).
17. Wenning, G. K., Colosimo, C., Geser, F. & Poewe, W. Multiple system atrophy. *Lancet Neurol.* **3**, 93–103 (2004).
18. Wong, Y. C. *et al.* Neuronal vulnerability in Parkinson disease: Should the focus be on axons and synaptic terminals? *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* **34**, 1406–1422 (2019).
19. Gelb, D. J., Oliver, E. & Gilman, S. Diagnostic criteria for Parkinson disease. *Arch. Neurol.* **56**, 33–39 (1999).
20. Gilman, S. *et al.* Second consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy. *Neurology* **71**, 670–676 (2008).

21. Outeiro, T. F. *et al.* Dementia with Lewy bodies: an update and outlook. *Mol. Neurodegener.* **14**, (2019).
22. Aarsland, D. *et al.* Range of neuropsychiatric disturbances in patients with Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **67**, 492–496 (1999).
23. Chaudhuri, K., Odin, P., Antonini, A. & Martinez-Martin, P. Parkinson's disease: the non-motor issues. *Parkinsonism Relat. Disord.* 717–723 (2011).
24. Jecmenica-Lukic, M., Poewe, W., Tolosa, E. & Wenning, G. K. Premotor signs and symptoms of multiple system atrophy. *Lancet Neurol.* **11**, 361–368 (2012).
25. Kalia, L. V. & Lang, A. E. Parkinson's disease. *The Lancet* **386**, 896–912 (2015).
26. Xie, L. *et al.* Sleep drives metabolite clearance from the adult brain. *Science* **342**, 373–377 (2013).
27. Iranzo, A. *et al.* Neurodegenerative disease status and post-mortem pathology in idiopathic rapid-eye-movement sleep behaviour disorder: an observational cohort study. *Lancet Neurol.* **12**, 443–453 (2013).
28. Schenck, C. H., Boeve, B. F. & Mahowald, M. W. Delayed emergence of a parkinsonian disorder or dementia in 81% of older men initially diagnosed with idiopathic rapid eye movement sleep behavior disorder: a 16-year update on a previously reported series. *Sleep Med.* **14**, 744–748 (2013).
29. Boeve, B. F. REM sleep behavior disorder: Updated review of the core features, the REM sleep behavior disorder-neurodegenerative disease association, evolving concepts, controversies, and future directions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1184**, 15–54 (2010).
30. Goodman, R. A. *et al.* Prevalence of dementia subtypes in U.S. Medicare fee-for-service beneficiaries, 2011–2013. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* **13**, 28–37 (2017).
31. Poewe, W. *et al.* Parkinson disease. *Nat. Rev. Dis. Primer* **3**, 17013 (2017).
32. McKay, J. H. & Cheshire, W. P. First symptoms in multiple system atrophy. *Clin. Auton. Res.* **28**, 215–221 (2018).
33. Burré, J. *et al.* Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science* **329**, 1663–1667 (2010).
34. Zaltieri, M. *et al.* α -synuclein and synapsin III cooperatively regulate synaptic function in dopamine neurons. *J. Cell Sci.* **128**, 2231–2243 (2015).
35. Ghosh, D., Mehra, S., Sahay, S., Singh, P. K. & Maji, S. K. α -synuclein aggregation and its modulation. *Int. J. Biol. Macromol.* **100**, 37–54 (2017).
36. Mehra, S., Sahay, S. & Maji, S. K. α -Synuclein misfolding and aggregation: Implications in Parkinson's disease pathogenesis. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics* **1867**, 890–908 (2019).
37. Carlson, S. S. & Kelly, R. B. An antiserum specific for cholinergic synaptic vesicles from electric organ. *J. Cell Biol.* **87**, 98–103 (1980).
38. Maroteaux, L., Campanelli, J. & Scheller, R. Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J. Neurosci.* **8**, 2804–2815 (1988).
39. Jakes, R., Spillantini, M. G. & Goedert, M. Identification of two distinct synucleins from human brain. *FEBS Lett.* **345**, 27–32 (1994).
40. Giasson, B. I., Murray, I. V., Trojanowski, J. Q. & Lee, V. M. A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly. *J. Biol. Chem.* **276**, 2380–2386 (2001).
41. Wang, G.-F., Li, C. & Pielak, G. J. 19F NMR studies of α -synuclein-membrane interactions. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **19**, 1686–1691 (2010).
42. Bartels, T., Choi, J. G. & Selkoe, D. J. α -Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature* **477**, 107–110 (2011).

43. Gould, N. *et al.* Evidence of native α -synuclein conformers in the human brain. *J. Biol. Chem.* **289**, 7929–7934 (2014).
44. Barbour, R. *et al.* Red blood cells are the major source of alpha-synuclein in blood. *Neurodegener. Dis.* **5**, 55–59 (2008).
45. Park, S. M. *et al.* Evidence that alpha-synuclein functions as a negative regulator of Ca(++)-dependent alpha-granule release from human platelets. *Blood* **100**, 2506–2514 (2002).
46. Ostrerova, N. *et al.* alpha-Synuclein shares physical and functional homology with 14-3-3 proteins. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **19**, 5782–5791 (1999).
47. Fu, X., Inouye, M. & Shinde, U. Folding pathway mediated by an intramolecular chaperone. The inhibitory and chaperone functions of the subtilisin propeptide are not obligatorily linked. *J. Biol. Chem.* **275**, 16871–16878 (2000).
48. Chen, R. H. C. *et al.* α -Synuclein membrane association is regulated by the Rab3a recycling machinery and presynaptic activity. *J. Biol. Chem.* **288**, 7438–7449 (2013).
49. Djelloul, M. *et al.* Alpha-Synuclein Expression in the Oligodendrocyte Lineage: an In Vitro and In Vivo Study Using Rodent and Human Models. *Stem Cell Rep.* **5**, 174–184 (2015).
50. Li, N. *et al.* Immunoregulation of microglial polarization: an unrecognized physiological function of α -synuclein. *J. Neuroinflammation* **17**, 272 (2020).
51. Martinez, J., Moeller, I., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. & Luring, B. Parkinson's disease-associated alpha-synuclein is a calmodulin substrate. *J. Biol. Chem.* **278**, 17379–17387 (2003).
52. Witt, S. N. Molecular chaperones, α -synuclein, and neurodegeneration. *Mol. Neurobiol.* **47**, 552–560 (2013).
53. Ruipérez, V., Darios, F. & Davletov, B. Alpha-synuclein, lipids and Parkinson's disease. *Prog. Lipid Res.* **49**, 420–428 (2010).
54. Geng, X. *et al.* α -Synuclein binds the K(ATP) channel at insulin-secretory granules and inhibits insulin secretion. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **300**, E276–286 (2011).
55. Sharma, S. K., Chorell, E. & Wittung-Stafshede, P. Insulin-degrading enzyme is activated by the C-terminus of α -synuclein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **466**, 192–195 (2015).
56. Rodriguez-Araujo, G. *et al.* Low alpha-synuclein levels in the blood are associated with insulin resistance. *Sci. Rep.* **5**, 12081 (2015).
57. Rodriguez-Araujo, G. *et al.* Alpha-synuclein elicits glucose uptake and utilization in adipocytes through the Gab1/PI3K/Akt transduction pathway. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **70**, 1123–1133 (2013).
58. Peng, X. *et al.* Alpha-synuclein activation of protein phosphatase 2A reduces tyrosine hydroxylase phosphorylation in dopaminergic cells. *J. Cell Sci.* **118**, 3523–3530 (2005).
59. Yang, F. *et al.* Crosstalk between the proteasome system and autophagy in the clearance of α -synuclein. *Acta Pharmacol. Sin.* **34**, 674–680 (2013).
60. Jin, H. *et al.* α -Synuclein negatively regulates protein kinase C δ expression to suppress apoptosis in dopaminergic neurons by reducing p300 histone acetyltransferase activity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **31**, 2035–2051 (2011).
61. Zhu, M., Qin, Z.-J., Hu, D., Munishkina, L. A. & Fink, A. L. Alpha-synuclein can function as an antioxidant preventing oxidation of unsaturated lipid in vesicles. *Biochemistry* **45**, 8135–8142 (2006).
62. Hashimoto, M. *et al.* alpha-Synuclein protects against oxidative stress via inactivation of the c-Jun N-terminal kinase stress-signaling pathway in neuronal cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 11465–11472 (2002).
63. Dehay, B. *et al.* Targeting α -synuclein for treatment of Parkinson's disease: mechanistic and therapeutic considerations. *Lancet Neurol.* **14**, 855–866 (2015).

64. Galvagnion, C. *et al.* Lipid vesicles trigger α -synuclein aggregation by stimulating primary nucleation. *Nat. Chem. Biol.* **11**, 229–234 (2015).
65. Braak, H. *et al.* Staging of the intracerebral inclusion body pathology associated with idiopathic Parkinson's disease (preclinical and clinical stages). *J. Neurol.* **249 Suppl 3**, III/1-5 (2002).
66. Jellinger, K. A., Seppi, K. & Wenning, G. K. Grading of neuropathology in multiple system atrophy: proposal for a novel scale. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* **20 Suppl 12**, S29-36 (2005).
67. Luk, K. C. *et al.* Intracerebral inoculation of pathological α -synuclein initiates a rapidly progressive neurodegenerative α -synucleinopathy in mice. *J. Exp. Med.* **209**, 975–986 (2012).
68. Recasens, A. & Dehay, B. Alpha-synuclein spreading in Parkinson's disease. *Front. Neuroanat.* **8**, (2014).
69. Björklund, A. Dopaminergic transplants in experimental parkinsonism: cellular mechanisms of graft-induced functional recovery. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2**, 683–689 (1992).
70. Kordower, J. H., Chu, Y., Hauser, R. A., Freeman, T. B. & Olanow, C. W. Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nat. Med.* **14**, 504–506 (2008).
71. Li, J.-Y. *et al.* Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat. Med.* **14**, 501–503 (2008).
72. Mendez, I. *et al.* Dopamine neurons implanted into people with Parkinson's disease survive without pathology for 14 years. *Nat. Med.* **14**, 507–509 (2008).
73. Desplats, P. *et al.* Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 13010–13015 (2009).
74. Cavaliere, F. *et al.* In vitro α -synuclein neurotoxicity and spreading among neurons and astrocytes using Lewy body extracts from Parkinson disease brains. *Neurobiol. Dis.* **103**, 101–112 (2017).
75. Lee, S.-J., Desplats, P., Sigurdson, C., Tsigelny, I. & Masliah, E. Cell-to-cell transmission of non-prion protein aggregates. *Nat. Rev. Neurol.* **6**, 702–706 (2010).
76. Reyes, J. F. *et al.* Alpha-synuclein transfers from neurons to oligodendrocytes. *Glia* **62**, 387–398 (2014).
77. Valera, E., Ubhi, K., Mante, M., Rockenstein, E. & Masliah, E. Antidepressants reduce neuroinflammatory responses and astroglial alpha-synuclein accumulation in a transgenic mouse model of multiple system atrophy. *Glia* **62**, 317–337 (2014).
78. Bieri, G., Gitler, A. D. & Brahic, M. Internalization, axonal transport and release of fibrillar forms of alpha-synuclein. *Neurobiol. Dis.* **109**, 219–225 (2018).
79. Soria, F. N. *et al.* Exosomes, an Unmasked Culprit in Neurodegenerative Diseases. *Front. Neurosci.* **11**, 26 (2017).
80. Mougenot, A.-L. *et al.* Prion-like acceleration of a synucleinopathy in a transgenic mouse model. *Neurobiol. Aging* **33**, 2225–2228 (2012).
81. Volpicelli-Daley, L. A. *et al.* Exogenous α -synuclein fibrils induce Lewy body pathology leading to synaptic dysfunction and neuron death. *Neuron* **72**, 57–71 (2011).
82. Fornage, M. The genetic architecture of dementia with Lewy bodies is shaping up. *Lancet Neurol.* **17**, 25–26 (2018).
83. Klein, C. & Westenberger, A. Genetics of Parkinson's disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, a008888 (2012).
84. O'Regan, G., deSouza, R.-M., Balestrino, R. & Schapira, A. H. Glucocerebrosidase Mutations in Parkinson Disease. *J. Park. Dis.* **7**, 411–422 (2017).
85. Polymeropoulos, M. H. *et al.* Mutation in the α -Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease. *Science* **276**, 2045–2047 (1997).

86. Whittaker, H. T., Qui, Y., Bettencourt, C. & Houlden, H. Multiple system atrophy: genetic risks and alpha-synuclein mutations. *F1000Research* **6**, 2072 (2017).
87. Dickson, D. W. *et al.* APOE ϵ 4 is associated with severity of Lewy body pathology independent of Alzheimer pathology. *Neurology* **91**, e1182–e1195 (2018).
88. Singleton, A. B. *et al.* Clinical and Neuropathological Correlates of Apolipoprotein E Genotype in Dementia with Lewy Bodies. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **14**, 167–175 (2002).
89. Nalls, M. A. *et al.* A Multicenter Study of Glucocerebrosidase Mutations in Dementia With Lewy Bodies. *JAMA Neurol.* **70**, (2013).
90. The Multiple-System Atrophy Research Collaboration. Mutations in *COQ2* in Familial and Sporadic Multiple-System Atrophy. *N. Engl. J. Med.* **369**, 233–244 (2013).
91. Mitsui, J. *et al.* Variants associated with Gaucher disease in multiple system atrophy. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* **2**, 417–426 (2015).
92. Sailer, A. *et al.* A genome-wide association study in multiple system atrophy. *Neurology* **87**, 1591–1598 (2016).
93. Coon, E. A., Cutsforth-Gregory, J. K. & Benarroch, E. E. Neuropathology of autonomic dysfunction in synucleinopathies. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* **33**, 349–358 (2018).
94. Mendoza-Velásquez, J. J. *et al.* Autonomic Dysfunction in α -Synucleinopathies. *Front. Neurol.* **10**, 363 (2019).
95. Cersosimo, M. G. Propagation of alpha-synuclein pathology from the olfactory bulb: possible role in the pathogenesis of dementia with Lewy bodies. *Cell Tissue Res.* **373**, 233–243 (2018).
96. Doty, R. L. Olfaction in Parkinson's disease and related disorders. *Neurobiol. Dis.* **46**, 527–552 (2012).
97. Simard, M., van Reekum, R. & Cohen, T. A review of the cognitive and behavioral symptoms in dementia with Lewy bodies. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* **12**, 425–450 (2000).
98. Zhang, L.-Y. *et al.* Depression and anxiety in multiple system atrophy. *Acta Neurol. Scand.* **137**, 33–37 (2018).
99. Cochen De Cock, V. Sleep Abnormalities in Multiple System Atrophy. *Curr. Treat. Options Neurol.* **20**, 16 (2018).
100. Raggi, A., Neri, W. & Ferri, R. Sleep-related behaviors in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. *Rev. Neurosci.* **26**, 31–38 (2015).
101. Schrempf, W., Brandt, M. D., Storch, A. & Reichmann, H. Sleep disorders in Parkinson's disease. *J. Park. Dis.* **4**, 211–221 (2014).
102. Martino, R. *et al.* Onset and progression factors in Parkinson's disease: A systematic review. *NeuroToxicology* **61**, 132–141 (2017).
103. Golbe, L. I. Young-onset Parkinson's disease: A clinical review. *Neurology* **41**, 168–168 (1991).
104. Muthane, U. B. *et al.* Early onset Parkinson's disease: Are juvenile- and young-onset different? *Mov. Disord.* **9**, 539–544 (1994).
105. Torsney, K. & Forsyth, D. Respiratory dysfunction in Parkinson's disease. *J. R. Coll. Physicians Edinb.* **47**, 35–39 (2017).
106. Aiba, Y. *et al.* Young-Onset Dementia with Lewy Bodies. *Case Rep. Neurol.* **10**, 363–368 (2018).
107. Vann Jones, S. A. & O'Brien, J. T. The prevalence and incidence of dementia with Lewy bodies: a systematic review of population and clinical studies. *Psychol. Med.* **44**, 673–683 (2014).
108. Fanciulli, A. & Wenning, G. K. Multiple-System Atrophy. *N. Engl. J. Med.* **372**, 249–263 (2015).

109. Calandra-Buonaura, G. *et al.* Pharmacodynamics of a low subacute levodopa dose helps distinguish between multiple system atrophy with predominant Parkinsonism and Parkinson's disease. *J. Neurol.* **263**, 250–256 (2016).
110. McCann, H., Stevens, C. H., Cartwright, H. & Halliday, G. M. α -Synucleinopathy phenotypes. *Parkinsonism Relat. Disord.* **20**, S62–S67 (2014).
111. McKeith, I. G. *et al.* Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies. *Neurology* **89**, 88–100 (2017).
112. Burton, E. J. *et al.* Patterns of Cerebral Atrophy in Dementia with Lewy Bodies Using Voxel-Based Morphometry. *NeuroImage* **17**, 618–630 (2002).
113. Jellinger, K. A. Multiple System Atrophy: An Oligodendroglioneural Synucleinopathy¹. *J. Alzheimers Dis.* **62**, 1141–1179 (2018).
114. Carskadon, M. A. Guidelines for the Multiple Sleep Latency Test (MSLT): A Standard Measure of Sleepiness. *Sleep* **9**, 519–524 (1986).
115. Ellenbogen, J. M., Hu, P. T., Payne, J. D., Titone, D. & Walker, M. P. Human relational memory requires time and sleep. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 7723–7728 (2007).
116. Marshall, L., Helgadóttir, H., Mölle, M. & Born, J. Boosting slow oscillations during sleep potentiates memory. *Nature* **444**, 610–613 (2006).
117. Wilson, M. A. & McNaughton, B. L. Reactivation of hippocampal ensemble memories during sleep. *Science* **265**, 676–679 (1994).
118. Dworak, M., McCarley, R. W., Kim, T., Kalinchuk, A. V. & Basheer, R. Sleep and brain energy levels: ATP changes during sleep. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **30**, 9007–9016 (2010).
119. Kong, J. *et al.* Brain glycogen decreases with increased periods of wakefulness: implications for homeostatic drive to sleep. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **22**, 5581–5587 (2002).
120. Sassin, J. F. *et al.* Human growth hormone release: relation to slow-wave sleep and sleep-walking cycles. *Science* **165**, 513–515 (1969).
121. Van Cauter, E. Age-Related Changes in Slow Wave Sleep and REM Sleep and Relationship With Growth Hormone and Cortisol Levels in Healthy Men. *JAMA* **284**, 861 (2000).
122. Besedovsky, L., Lange, T. & Born, J. Sleep and immune function. *Pflugers Arch.* **463**, 121–137 (2012).
123. Geiger, S. S., Fagundes, C. T. & Siegel, R. M. Chrono-immunology: progress and challenges in understanding links between the circadian and immune systems. *Immunology* **146**, 349–358 (2015).
124. Rohleder, N. Acute and chronic stress induced changes in sensitivity of peripheral inflammatory pathways to the signals of multiple stress systems – 2011 Curt Richter Award Winner. *Psychoneuroendocrinology* **37**, 307–316 (2012).
125. Iliff, J. J. *et al.* A Paravascular Pathway Facilitates CSF Flow Through the Brain Parenchyma and the Clearance of Interstitial Solutes, Including Amyloid. *Sci. Transl. Med.* **4**, 147ra111–147ra111 (2012).
126. Jessen, N. A., Munk, A. S. F., Lundgaard, I. & Nedergaard, M. The Glymphatic System – A Beginner's Guide. *Neurochem. Res.* **40**, 2583–2599 (2015).
127. Abbott, N. J., Pizzo, M. E., Preston, J. E., Janigro, D. & Thorne, R. G. The role of brain barriers in fluid movement in the CNS: is there a 'glymphatic' system? *Acta Neuropathol. (Berl.)* **135**, 387–407 (2018).
128. Hladky, S. B. & Barrand, M. A. Mechanisms of fluid movement into, through and out of the brain: evaluation of the evidence. *Fluids Barriers CNS* **11**, (2014).
129. Shokri-Kojori, E. *et al.* β -Amyloid accumulation in the human brain after one night of sleep deprivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, 4483–4488 (2018).

130. Kang, J.-E. *et al.* Amyloid- β Dynamics Are Regulated by Orexin and the Sleep-Wake Cycle. *Science* **326**, 1005–1007 (2009).
131. Tabuchi, M. *et al.* Sleep Interacts with A β to Modulate Intrinsic Neuronal Excitability. *Curr. Biol.* **25**, 702–712 (2015).
132. Jørgensen, J. T., Karlsen, S., Stayner, L., Andersen, J. & Andersen, Z. J. Shift work and overall and cause-specific mortality in the Danish nurse cohort. *Scand. J. Work. Environ. Health* **43**, 117–126 (2017).
133. Schernhammer, E. S. *et al.* Occupational history of night shift work and Parkinson's disease in Denmark. *Scand. J. Work. Environ. Health* **41**, 377–383 (2015).
134. Loomis, A. L., Harvey, E. N. & Hobart, G. Potential rhythms of the cerebral cortex during sleep. *Science* **81**, 597–598 (1935).
135. Wijdicks, E. F. M. The Ascending Reticular Activating System. *Neurocrit. Care* **31**, 419–422 (2019).
136. España, R. A. & Berridge, C. W. Organization of noradrenergic efferents to arousal-related basal forebrain structures. *J. Comp. Neurol.* **496**, 668–683 (2006).
137. Fort, P., Bassetti, C. L. & Luppi, P.-H. Alternating vigilance states: new insights regarding neuronal networks and mechanisms. *Eur. J. Neurosci.* **29**, 1741–1753 (2009).
138. Herrera, C. G. *et al.* Hypothalamic feed-forward inhibition of thalamocortical network controls arousal and consciousness. *Nat. Neurosci.* **19**, 290–298 (2016).
139. Descarries, L., Watkins, K. C., Garcia, S. & Beaudet, A. The serotonin neurons in nucleus raphe dorsalis of adult rat: A light and electron microscope radioautographic study. *J. Comp. Neurol.* **207**, 239–254 (1982).
140. Hornung, J.-P. The human raphe nuclei and the serotonergic system. *J. Chem. Neuroanat.* **26**, 331–343 (2003).
141. Pollak Dorocic, I. *et al.* A Whole-Brain Atlas of Inputs to Serotonergic Neurons of the Dorsal and Median Raphe Nuclei. *Neuron* **83**, 663–678 (2014).
142. Koella, W. P., Feldstein, A. & Czicman, J. S. The effect of para-chlorophenylalanine on the sleep of cats. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* **25**, 481–490 (1968).
143. Mouret, J., Bobillier, P. & Jouvet, M. Insomnia following parachlorophenylalanin in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* **5**, 17–22 (1968).
144. Murray, N. M., Buchanan, G. F. & Richerson, G. B. Insomnia Caused by Serotonin Depletion is Due to Hypothermia. *Sleep* **38**, 1985–1993 (2015).
145. Ishiwata, T. *et al.* Possible mechanisms of hypothermia after inhibition of the median or dorsal raphe nucleus of freely moving rats: *NeuroReport* **27**, 1287–1292 (2016).
146. McGinty, D. J. & Harper, R. M. Dorsal raphe neurons: depression of firing during sleep in cats. *Brain Res.* **101**, 569–575 (1976).
147. Trulson, M. E. & Jacobs, B. L. Raphe unit activity in freely moving cats: Correlation with level of behavioral arousal. *Brain Res.* **163**, 135–150 (1979).
148. Ito, H. *et al.* 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 (2013).
149. Dugovic, C., Wauquier, A., Leysen, J. E., Marrannes, R. & Janssen, P. A. J. Functional role of 5-HT₂ receptors in the regulation of sleep and wakefulness in the rat. *Psychopharmacology (Berl.)* **97**, 436–442 (1989).
150. Monti, J. M. & Jantos, H. Effects of the 5-HT_{1A} receptor ligands flesinoxan and WAY 100635 given systemically or microinjected into the laterodorsal tegmental nucleus on REM sleep in the rat. *Behav. Brain Res.* **151**, 159–166 (2004).

151. Dugovic, C. & Wauquier, A. 5-HT₂ receptors could be primarily involved in the regulation of slow-wave sleep in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* **137**, 145–146 (1987).
152. Kirov, R. & Moyanova, S. Age-dependent effect of ketanserin on the sleep-waking phases in rats. *Int. J. Neurosci.* **93**, 257–264 (1998).
153. Séguéla, P., Watkins, K. C., Geffard, M. & Descarries, L. Noradrenaline axon terminals in adult rat neocortex: An immunocytochemical analysis in serial thin sections. *Neuroscience* **35**, 249–264 (1990).
154. Zaborszky, L. & Duque, A. Local synaptic connections of basal forebrain neurons. *Behav. Brain Res.* **115**, 143–158 (2000).
155. Jones, B. E. & Yang, T.-Z. The efferent projections from the reticular formation and the locus coeruleus studied by anterograde and retrograde axonal transport in the rat. *J. Comp. Neurol.* **242**, 56–92 (1985).
156. Chou, T. C. *et al.* Afferents to the Ventrolateral Preoptic Nucleus. *J. Neurosci.* **22**, 977–990 (2002).
157. Modirrousta, M., Mainville, L. & Jones, B. E. Gabaergic neurons with α ₂-adrenergic receptors in basal forebrain and preoptic area express c-Fos during sleep. *Neuroscience* **129**, 803–810 (2004).
158. Li, Y. Direct and Indirect Inhibition by Catecholamines of Hypocretin/Orexin Neurons. *J. Neurosci.* **25**, 173–183 (2005).
159. Yamanaka, A. *et al.* Hypothalamic Orexin Neurons Regulate Arousal According to Energy Balance in Mice. *Neuron* **38**, 701–713 (2003).
160. Kim, M.-A., Lee, H. S., Lee, B. Y. & Waterhouse, B. D. Reciprocal connections between subdivisions of the dorsal raphe and the nuclear core of the locus coeruleus in the rat. *Brain Res.* **1026**, 56–67 (2004).
161. Sakai, K., Salvert, D., Touret, M. & Jouvet, M. Afferent connections of the nucleus raphe dorsalis in the cat as visualized by the horseradish peroxidase technique. *Brain Res.* **137**, 11–35 (1977).
162. Hou, Y. P., Manns, I. D. & Jones, B. E. Immunostaining of cholinergic pontomesencephalic neurons for α ₁ versus α ₂ adrenergic receptors suggests different sleep–wake state activities and roles. *Neuroscience* **114**, 517–521 (2002).
163. Hou, R. H., Freeman, C., Langley, R. W., Szabadi, E. & Bradshaw, C. M. Does modafinil activate the locus coeruleus in man? Comparison of modafinil and clonidine on arousal and autonomic functions in human volunteers. *Psychopharmacology (Berl.)* **181**, 537–549 (2005).
164. Luppi, P.-H., Aston-Jones, G., Akaoka, H., Chouvet, G. & Jouvet, M. Afferent projections to the rat locus coeruleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing with cholera-toxin B subunit and Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *Neuroscience* **65**, 119–160 (1995).
165. Berridge, C. W. & España, R. A. Synergistic sedative effects of noradrenergic α ₁- and β -receptor blockade on forebrain electroencephalographic and behavioral indices. *Neuroscience* **99**, 495–505 (2000).
166. De Sarro, G. B., Ascioti, C., Froio, F., Libri, V. & Nisticò, G. Evidence that locus coeruleus is the site where clonidine and drugs acting at alpha 1- and alpha 2-adrenoceptors affect sleep and arousal mechanisms. *Br. J. Pharmacol.* **90**, 675–685 (1987).
167. Aston-Jones, G. & Bloom, F. Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep-waking cycle. *J. Neurosci.* **1**, 876–886 (1981).
168. Rasmussen, K., Morilak, D. A. & Jacobs, B. L. Single unit activity of locus coeruleus neurons in the freely moving cat. *Brain Res.* **371**, 324–334 (1986).
169. Carter, M. E. *et al.* Tuning arousal with optogenetic modulation of locus coeruleus neurons. *Nat. Neurosci.* **13**, 1526–1533 (2010).
170. Gompf, H. S. *et al.* Locus Coeruleus and Anterior Cingulate Cortex Sustain Wakefulness in a Novel Environment. *J. Neurosci.* **30**, 14543–14551 (2010).

171. Rajkowski, J., Kubiak, P. & Aston-Jones, G. Locus coeruleus activity in monkey: Phasic and tonic changes are associated with altered vigilance. *Brain Res. Bull.* **35**, 607–616 (1994).
172. Vankov, A., Hervé-Minvielle, A. & Sara, S. J. Response to Novelty and its Rapid Habituation in Locus Coeruleus Neurons of the Freely Exploring Rat. *Eur. J. Neurosci.* **7**, 1180–1187 (1995).
173. Barateau, L., Lopez, R. & Dauvilliers, Y. Treatment Options for Narcolepsy. *CNS Drugs* **30**, 369–379 (2016).
174. Wisor, J. P. *et al.* Dopaminergic Role in Stimulant-Induced Wakefulness. *J. Neurosci.* **21**, 1787–1794 (2001).
175. Qu, W.-M. *et al.* Essential Role of Dopamine D2 Receptor in the Maintenance of Wakefulness, But Not in Homeostatic Regulation of Sleep, in Mice. *J. Neurosci.* **30**, 4382–4389 (2010).
176. Qu, W.-M., Huang, Z.-L., Xu, X.-H., Matsumoto, N. & Urade, Y. Dopaminergic D1 and D2 Receptors Are Essential for the Arousal Effect of Modafinil. *J. Neurosci.* **28**, 8462–8469 (2008).
177. Bianchi, M. T. Essentials of Sleep Neuropharmacology. in *Therapy in Sleep Medicine* 62–82 (Elsevier, 2012). doi:10.1016/B978-1-4377-1703-7.10005-2.
178. Miller, J. D., Farber, J., Gatz, P., Roffwarg, H. & German, D. C. Activity of mesencephalic dopamine and non-dopamine neurons across stages of sleep and waking in the rat. *Brain Res.* **273**, 133–141 (1983).
179. Trulsson, M. E., Preussler, D. W. & Howell, G. A. Activity of substantia nigra units across the sleep-waking cycle in freely moving cats. *Neurosci. Lett.* **26**, 183–188 (1981).
180. Léna, I. *et al.* Variations in extracellular levels of dopamine, noradrenaline, glutamate, and aspartate across the sleep-wake cycle in the medial prefrontal cortex and nucleus accumbens of freely moving rats. *J. Neurosci. Res.* **81**, 891–899 (2005).
181. Trulsson, M. E. Simultaneous recording of substantia nigra neurons and voltammetric release of dopamine in the caudate of behaving cats. *Brain Res. Bull.* **15**, 221–223 (1985).
182. Ferris, M. J. *et al.* Dopamine transporters govern diurnal variation in extracellular dopamine tone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, E2751–E2759 (2014).
183. Eban-Rothschild, A., Rothschild, G., Giardino, W. J., Jones, J. R. & de Lecea, L. VTA dopaminergic neurons regulate ethologically relevant sleep–wake behaviors. *Nat. Neurosci.* **19**, 1356–1366 (2016).
184. Lu, J., Zhou, T. C. & Saper, C. B. Identification of Wake-Active Dopaminergic Neurons in the Ventral Periaqueductal Gray Matter. *J. Neurosci.* **26**, 193–202 (2006).
185. Qiu, M.-H., Yao, Q.-L., Vetrivelan, R., Chen, M. C. & Lu, J. Nigrostriatal Dopamine Acting on Globus Pallidus Regulates Sleep. *Cereb. Cortex N. Y. NY* **26**, 1430–1439 (2016).
186. Ericson, H., Watanabe, T. & Köhler, C. Morphological analysis of the tuberomammillary nucleus in the rat brain: Delineation of subgroups with antibody against L-histidine decarboxylase as a marker: TUBEROMAMMILLARY NUCLEUS IN RAT BRAIN. *J. Comp. Neurol.* **263**, 1–24 (1987).
187. Watanabe, T. *et al.* Distribution of the histaminergic neuron system in the central nervous system of rats; a fluorescent immunohistochemical analysis with histidine decarboxylase as a marker. *Brain Res.* **295**, 13–25 (1984).
188. Airaksinen, M. S., Alanen, S., Szabat, E., Visser, T. J. & Panula, P. Multiple neurotransmitters in the tuberomammillary nucleus: Comparison of rat, mouse, and guinea pig. *J. Comp. Neurol.* **323**, 103–116 (1992).
189. Trottier, S. *et al.* Co-localization of histamine with GABA but not with galanin in the human tuberomammillary nucleus. *Brain Res.* **939**, 52–64 (2002).
190. Köhler, C., Swanson, L. W., Haglund, L. & Yen, W. The cytoarchitecture, histochemistry and projections of the tuberomammillary nucleus in the rat. *Neuroscience* **16**, 85–110 (1985).
191. Lee, H. S., Lee, B. Y. & Waterhouse, B. D. Retrograde study of projections from the tuberomammillary nucleus to the dorsal raphe and the locus coeruleus in the rat. *Brain Res.* **1043**, 65–75 (2005).

192. Vincent, Hokfelt, T., Skirboll, L. & Wu, J. Hypothalamic gamma-aminobutyric acid neurons project to the neocortex. *Science* **220**, 1309–1311 (1983).
193. Ozdemir, P. G. *et al.* Assessment of the effects of antihistamine drugs on mood, sleep quality, sleepiness, and dream anxiety. *Int. J. Psychiatry Clin. Pract.* **18**, 161–168 (2014).
194. Takahashi, K., Lin, J.-S. & Sakai, K. Neuronal Activity of Histaminergic Tubero-mammillary Neurons During Wake-Sleep States in the Mouse. *J. Neurosci.* **26**, 10292–10298 (2006).
195. Chu, M. *et al.* Extracellular histamine level in the frontal cortex is positively correlated with the amount of wakefulness in rats. *Neurosci. Res.* **49**, 417–420 (2004).
196. Parmentier, R. *et al.* Anatomical, Physiological, and Pharmacological Characteristics of Histidine Decarboxylase Knock-Out Mice: Evidence for the Role of Brain Histamine in Behavioral and Sleep–Wake Control. *J. Neurosci.* **22**, 7695–7711 (2002).
197. Anaclet, C. *et al.* Basal forebrain control of wakefulness and cortical rhythms. *Nat. Commun.* **6**, (2015).
198. Parmentier, R. *et al.* 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 (2016).
199. Williams, R. H. *et al.* Optogenetic-Mediated Release of Histamine Reveals Distal and Autoregulatory Mechanisms for Controlling Arousal. *J. Neurosci.* **34**, 6023–6029 (2014).
200. Armstrong, D. M., Saper, C. B., Levey, A. I., Wainer, B. H. & Terry, R. D. Distribution of cholinergic neurons in rat brain: Demonstrated by the immunocytochemical localization of choline acetyltransferase. *J. Comp. Neurol.* **216**, 53–68 (1983).
201. Saper, C. B. & Loewy, A. D. Projections of the pedunculopontine tegmental nucleus in the rat: evidence for additional extrapyramidal circuitry. *Brain Res.* **252**, 367–372 (1982).
202. Ford, B., Holmes, C. J., Mainville, L. & Jones, B. E. GABAergic neurons in the rat pontomesencephalic tegmentum: Codistribution with cholinergic and other tegmental neurons projecting to the posterior lateral hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* **363**, 177–196 (1995).
203. Mena-Segovia, J., Micklem, B. R., Nair-Roberts, R. G., Ungless, M. A. & Bolam, J. P. GABAergic neuron distribution in the pedunculopontine nucleus defines functional subterritories. *J. Comp. Neurol.* **515**, 397–408 (2009).
204. Semba, K. & Fibiger, H. C. Afferent connections of the laterodorsal and the pedunculopontine tegmental nuclei in the rat: A retro- and antero-grade transport and immunohistochemical study. *J. Comp. Neurol.* **323**, 387–410 (1992).
205. Steininger, T. L., Rye, D. B. & Wainer, B. H. Afferent projections to the cholinergic pedunculopontine tegmental nucleus and adjacent midbrain extrapyramidal area in the albino rat. I. Retrograde tracing studies. *J. Comp. Neurol.* **321**, 515–543 (1992).
206. Hallanger, A. E. & Wainer, B. H. Ascending projections from the pedunculopontine tegmental nucleus and the adjacent mesopontine tegmentum in the rat. *J. Comp. Neurol.* **274**, 483–515 (1988).
207. Oakman, S., Faris, P., Kerr, P., Cozzari, C. & Hartman, B. Distribution of pontomesencephalic cholinergic neurons projecting to substantia nigra differs significantly from those projecting to ventral tegmental area. *J. Neurosci.* **15**, 5859–5869 (1995).
208. Satoh, K. & Fibiger, H. C. Cholinergic neurons of the laterodorsal tegmental nucleus: Efferent and afferent connections. *J. Comp. Neurol.* **253**, 277–302 (1986).
209. Woolf, N. J. & Butcher, L. L. Cholinergic systems in the rat brain: III. Projections from the pontomesencephalic tegmentum to the thalamus, tectum, basal ganglia, and basal forebrain. *Brain Res. Bull.* **16**, 603–637 (1986).

210. Seigneur, J., Kroeger, D., Nita, D. A. & Amzica, F. Cholinergic Action on Cortical Glial Cells In Vivo. *Cereb. Cortex* **16**, 655–668 (2006).
211. Steriade, M., Amzica, F. & Nunez, A. Cholinergic and noradrenergic modulation of the slow (approximately 0.3 Hz) oscillation in neocortical cells. *J. Neurophysiol.* **70**, 1385–1400 (1993).
212. Kroeger, D. *et al.* Cholinergic, Glutamatergic, and GABAergic Neurons of the Pedunculopontine Tegmental Nucleus Have Distinct Effects on Sleep/Wake Behavior in Mice. *J. Neurosci.* **37**, 1352–1366 (2017).
213. Paré, D., Smith, Y., Parent, A. & Steriade, M. Projections of brainstem core cholinergic and non-cholinergic neurons of cat to intralaminar and reticular thalamic nuclei. *Neuroscience* **25**, 69–86 (1988).
214. Steriade, M., Datta, S., Pare, D., Oakson, G. & Curro Dossi, R. Neuronal activities in brain-stem cholinergic nuclei related to tonic activation processes in thalamocortical systems. *J. Neurosci.* **10**, 2541–2559 (1990).
215. Henny, P. & Jones, B. E. Vesicular glutamate (VGlut), GABA (VGAT), and acetylcholine (VACht) transporters in basal forebrain axon terminals innervating the lateral hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* **496**, 453–467 (2006).
216. Manns, I. D., Mainville, L. & Jones, B. E. Evidence for glutamate, in addition to acetylcholine and GABA, neurotransmitter synthesis in basal forebrain neurons projecting to the entorhinal cortex. *Neuroscience* **107**, 249–263 (2001).
217. Rye, D. B., Wainer, B. H., Mesulam, M.-M., Mufson, E. J. & Saper, C. B. Cortical projections arising from the basal forebrain: A study of cholinergic and noncholinergic components employing combined retrograde tracing and immunohistochemical localization of choline acetyltransferase. *Neuroscience* **13**, 627–643 (1984).
218. Berridge, C. W. & Foote, S. L. Enhancement of Behavioral and Electroencephalographic Indices of Waking following Stimulation of Noradrenergic β -Receptors within the Medial Septal Region of the Basal Forebrain. *J. Neurosci.* **16**, 6999–7009 (1996).
219. Buzsaki, G. *et al.* Nucleus basalis and thalamic control of neocortical activity in the freely moving rat. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **8**, 4007–4026 (1988).
220. Fuller, P., Sherman, D., Pedersen, N. P., Saper, C. B. & Lu, J. Reassessment of the structural basis of the ascending arousal system. *J. Comp. Neurol.* **519**, 933–956 (2011).
221. Xu, M. *et al.* Basal forebrain circuit for sleep-wake control. *Nat. Neurosci.* **18**, 1641–1647 (2015).
222. Chen, L. *et al.* Basal Forebrain Cholinergic Neurons Primarily Contribute to Inhibition of Electroencephalogram Delta Activity, Rather Than Inducing Behavioral Wakefulness in Mice. *Neuropsychopharmacology* **41**, 2133–2146 (2016).
223. Shi, Y.-F., Han, Y., Su, Y.-T., Yang, J.-H. & Yu, Y.-Q. Silencing of Cholinergic Basal Forebrain Neurons Using Archaelhodopsin Prolongs Slow-Wave Sleep in Mice. *PLoS ONE* **10**, (2015).
224. Ozen Irmak, S. & de Lecea, L. Basal Forebrain Cholinergic Modulation of Sleep Transitions. *Sleep* **37**, 1941–1951 (2014).
225. Scammell, T. E., Arrigoni, E. & Lipton, J. Neural Circuitry of Wakefulness and Sleep. *Neuron* **93**, 747–765 (2017).
226. Freund, T. F. & Meskenaite, V. gamma-Aminobutyric acid-containing basal forebrain neurons innervate inhibitory interneurons in the neocortex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 738–742 (1992).
227. Henny, P. & Jones, B. E. Projections from basal forebrain to prefrontal cortex comprise cholinergic, GABAergic and glutamatergic inputs to pyramidal cells or interneurons. *Eur. J. Neurosci.* **27**, 654–670 (2008).
228. Hassani, O. K., Lee, M. G., Henny, P. & Jones, B. E. Discharge Profiles of Identified GABAergic in Comparison to Cholinergic and Putative Glutamatergic Basal Forebrain Neurons across the Sleep–Wake Cycle. *J. Neurosci.* **29**, 11828–11840 (2009).

229. Kim, T. *et al.* Cortically projecting basal forebrain parvalbumin neurons regulate cortical gamma band oscillations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 3535–3540 (2015).
230. Fulwiler, C. E. & Saper, C. B. Subnuclear organization of the efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. *Brain Res. Rev.* **7**, 229–259 (1984).
231. Saper, C. B. & Loewy, A. D. Efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. *Brain Res.* **197**, 291–317 (1980).
232. Chamberlin, N. & Saper, C. Topographic organization of respiratory responses to glutamate microstimulation of the parabrachial nucleus in the rat. *J. Neurosci.* **14**, 6500–6510 (1994).
233. Mizusawa, A., Ogawa, H., Kikuchi, Y., Hida, W. & Shirato, K. Role of the parabrachial nucleus in ventilatory responses of awake rats. *J. Physiol.* **489**, 877–884 (1995).
234. Damasceno, R. S., Takakura, A. C. & Moreira, T. S. Regulation of the chemosensory control of breathing by Kölliker-Fuse neurons. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* **307**, R57–R67 (2014).
235. DePuy, S. D., Kanbar, R., Coates, M. B., Stornetta, R. L. & Guyenet, P. G. Control of Breathing by Raphe Obscure Serotonergic Neurons in Mice. *J. Neurosci.* **31**, 1981–1990 (2011).
236. Herbert, H., Moga, M. M. & Saper, C. B. Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat. *J. Comp. Neurol.* **293**, 540–580 (1990).
237. Miller, R. L., Stein, M. K. & Loewy, A. D. Serotonergic Inputs to the FoxP2 neurons of the Pre-Locus Coeruleus and Parabrachial Nuclei That Project to the Ventral Tegmental Area. *Neuroscience* **193**, 229–240 (2011).
238. Song, G., Xu, H., Wang, H., MacDonald, S. M. & Poon, C.-S. Hypoxia-excited neurons in NTS send axonal projections to Kölliker-Fuse/parabrachial complex in dorsolateral pons. *Neuroscience* **175**, 145–153 (2011).
239. Kaur, S. *et al.* Glutamatergic Signaling from the Parabrachial Nucleus Plays a Critical Role in Hypercapnic Arousal. *J. Neurosci.* **33**, 7627–7640 (2013).
240. Kaur, S. *et al.* A Genetically Defined Circuit for Arousal from Sleep during Hypercapnia. *Neuron* **96**, 1153–1167.e5 (2017).
241. Song, G. & Poon, C.-S. Lateral parabrachial nucleus mediates shortening of expiration and increase of inspiratory drive during hypercapnia. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **165**, 9–12 (2009).
242. Yokota, S., Kaur, S., VanderHorst, V. G., Saper, C. B. & Chamberlin, N. L. Respiratory-related Outputs of Glutamatergic, Hypercapnia-Responsive Parabrachial Neurons in Mice. *J. Comp. Neurol.* **523**, 907–920 (2015).
243. Fischer, D. B. *et al.* A human brain network derived from coma-causing brainstem lesions. *Neurology* **87**, 2427–2434 (2016).
244. Parvizi, J. Neuroanatomical correlates of brainstem coma. *Brain* **126**, 1524–1536 (2003).
245. Qiu, M. H., Chen, M. C., Fuller, P. M. & Lu, J. Stimulation of the Pontine Parabrachial Nucleus Promotes Wakefulness via Extra-thalamic Forebrain Circuit Nodes. *Curr. Biol. CB* **26**, 2301–2312 (2016).
246. Palmiter, R. D. The Parabrachial Nucleus: CGRP Neurons Function as a General Alarm. *Trends Neurosci.* **41**, 280–293 (2018).
247. Schwartz, M. D. & Kilduff, T. S. THE NEUROBIOLOGY OF SLEEP AND WAKEFULNESS. *Psychiatr. Clin. North Am.* **38**, 615–644 (2015).
248. Kornum, B. R. *et al.* Narcolepsy. *Nat. Rev. Dis. Primer* **3**, 16100 (2017).
249. Chemelli, R. M. *et al.* Narcolepsy in orexin Knockout Mice: Molecular Genetics of Sleep Regulation. 15.
250. Piper, D. C., Upton, N., Smith, M. I. & Hunter, A. J. The novel brain neuropeptide, orexin-A, modulates the sleep–wake cycle of rats. *Eur. J. Neurosci.* **12**, 726–730 (2000).

251. Adamantidis, A. R., Zhang, F., Aravanis, A. M., Deisseroth, K. & de Lecea, L. Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons. *Nature* **450**, 420–424 (2007).
252. Sasaki, K. *et al.* Pharmacogenetic Modulation of Orexin Neurons Alters Sleep/Wakefulness States in Mice. *PLoS ONE* **6**, (2011).
253. Bonnavion, P., Jackson, A. C., Carter, M. E. & de Lecea, L. Antagonistic interplay between hypocretin and leptin in the lateral hypothalamus regulates stress responses. *Nat. Commun.* **6**, (2015).
254. Mahler, S. V., Moorman, D. E., Smith, R. J., James, M. H. & Aston-Jones, G. Motivational activation: a unifying hypothesis of orexin/hypocretin function. *Nat. Neurosci.* **17**, 1298–1303 (2014).
255. Von Economo, C. Die Pathologie des Schlafes. *Handbuch des Normalen und Pathologischen Physiologie* (1926).
256. Ranson, S. W. Somnolence caused by hypothalamic lesions in the monkey. *Arch. Neurol. Psychiatry* **41**, 1–23 (1939).
257. Nauta, W. J. H. Hypothalamic regulation of sleep in rats; an experimental study. *J. Neurophysiol.* **9**, 285–316 (1946).
258. McGinty, D. J. & Serman, M. B. Sleep Suppression after Basal Forebrain Lesions in the Cat. *Science* **160**, 1253–1255 (1968).
259. Zhang, Z. *et al.* Neuronal ensembles sufficient for recovery sleep and the sedative actions of $\alpha 2$ adrenergic agonists. *Nat. Neurosci.* **18**, 553–561 (2015).
260. Hsieh, K.-C. *et al.* c-Fos expression in neurons projecting from the preoptic and lateral hypothalamic areas to the ventrolateral periaqueductal gray in relation to sleep states. *Neuroscience* **188**, 55–67 (2011).
261. Sherin, J. E., Shiromani, P. J., McCarley, R. W. & Saper, C. B. Activation of Ventrolateral Preoptic Neurons During Sleep. *Science* **271**, 216–219 (1996).
262. Gvilia, I. Homeostatic Regulation of Sleep: A Role for Preoptic Area Neurons. *J. Neurosci.* **26**, 9426–9433 (2006).
263. Suntsova, N., Szymusiak, R., Alam, Md. N., Guzman-Marin, R. & McGinty, D. Sleep-waking discharge patterns of median preoptic nucleus neurons in rats. *J. Physiol.* **543**, 665–677 (2002).
264. Novak, C. M. & Nunez, A. A. Daily rhythms in Fos activity in the rat ventrolateral preoptic area and midline thalamic nuclei. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* **275**, R1620–R1626 (1998).
265. Thompson, R. H., Canteras, N. S. & Swanson, L. W. Organization of projections from the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: a PHA-L study in the rat. *J. Comp. Neurol.* **376**, 143–173 (1996).
266. Lu, J., Shiromani, P. & Saper, C. B. Retinal input to the sleep-active ventrolateral preoptic nucleus in the rat. *Neuroscience* **93**, 209–214 (1999).
267. Saint-Mleux, B. *et al.* Suprachiasmatic Modulation of Noradrenaline Release in the Ventrolateral Preoptic Nucleus. *J. Neurosci.* **27**, 6412–6416 (2007).
268. Gervasoni, D. *et al.* Role and Origin of the GABAergic Innervation of Dorsal Raphe Serotonergic Neurons. *J. Neurosci.* **20**, 4217–4225 (2000).
269. Uschakov, A., Gong, H., McGinty, D. & Szymusiak, R. Efferent projections from the median preoptic nucleus to sleep- and arousal-regulatory nuclei in the rat brain. *Neuroscience* **150**, 104–120 (2007).
270. Nitz, D. & Siegel, J. GABA release in the dorsal raphe nucleus: role in the control of REM sleep. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* **273**, R451–R455 (1997).
271. Nitz, D. & Siegel, J. M. GABA release in the locus coeruleus as a function of sleep/wake state. *Neuroscience* **78**, 795–801 (1997).

272. Nitz, D. & Siegel, J. M. GABA release in posterior hypothalamus across sleep-wake cycle. *Am. J. Physiol.* **271**, R1707-1712 (1996).
273. Gallopin, T. *et al.* Identification of sleep-promoting neurons in vitro. *Nature* **404**, 992–995 (2000).
274. Sherin, J. E., Elmquist, J. K., Torrealba, F. & Saper, C. B. Innervation of histaminergic tuberomammillary neurons by GABAergic and galaninergic neurons in the ventrolateral preoptic nucleus of the rat. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **18**, 4705–4721 (1998).
275. Gaus, S. E., Strecker, R. E., Tate, B. A., Parker, R. A. & Saper, C. B. Ventrolateral preoptic nucleus contains sleep-active, galaninergic neurons in multiple mammalian species. *Neuroscience* **115**, 285–294 (2002).
276. Saint-Mleux, B. *et al.* Nicotinic enhancement of the noradrenergic inhibition of sleep-promoting neurons in the ventrolateral preoptic area. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **24**, 63–67 (2004).
277. Gallopin, T. *et al.* The endogenous somnogen adenosine excites a subset of sleep-promoting neurons via A2A receptors in the ventrolateral preoptic nucleus. *Neuroscience* **134**, 1377–1390 (2005).
278. Lazarus, M. *et al.* Arousal effect of caffeine depends on adenosine A2A receptors in the shell of the nucleus accumbens. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **31**, 10067–10075 (2011).
279. Varin, C. *et al.* Glucose Induces Slow-Wave Sleep by Exciting the Sleep-Promoting Neurons in the Ventrolateral Preoptic Nucleus: A New Link between Sleep and Metabolism. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **35**, 9900–9911 (2015).
280. Porkka-Heiskanen, T., Strecker, R. E. & McCarley, R. W. Brain site-specificity of extracellular adenosine concentration changes during sleep deprivation and spontaneous sleep: an in vivo microdialysis study. *Neuroscience* **99**, 507–517 (2000).
281. Stenberg, D. *et al.* Sleep and its homeostatic regulation in mice lacking the adenosine A1 receptor. *J. Sleep Res.* **12**, 283–290 (2003).
282. Huang, Z.-L. *et al.* Adenosine A2A, but not A1, receptors mediate the arousal effect of caffeine. *Nat. Neurosci.* **8**, 858–859 (2005).
283. Lazarus, M., Chen, J.-F., Urade, Y. & Huang, Z.-L. Role of the basal ganglia in the control of sleep and wakefulness. *Curr. Opin. Neurobiol.* **23**, 780–785 (2013).
284. Huguenard, J. R. & McCormick, D. A. Thalamic synchrony and dynamic regulation of global forebrain oscillations. *Trends Neurosci.* **30**, 350–356 (2007).
285. Halassa, M. M. Thalamocortical dynamics of sleep: roles of purinergic neuromodulation. *Semin. Cell Dev. Biol.* **22**, 245–251 (2011).
286. Halassa, M. M. *et al.* State-dependent architecture of thalamic reticular subnetworks. *Cell* **158**, 808–821 (2014).
287. Lewis, L. D. *et al.* Thalamic reticular nucleus induces fast and local modulation of arousal state. *eLife* **4**, e08760 (2015).
288. Gerashchenko, D. *et al.* Identification of a population of sleep-active cerebral cortex neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 10227–10232 (2008).
289. Morairty, S. R. *et al.* A role for cortical nNOS/NK1 neurons in coupling homeostatic sleep drive to EEG slow wave activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 20272–20277 (2013).
290. Chen, L., Majde, J. A. & Krueger, J. M. Spontaneous sleep in mice with targeted disruptions of neuronal or inducible nitric oxide synthase genes. *Brain Res.* **973**, 214–222 (2003).
291. Anaclet, C. *et al.* Identification and Characterization of a Sleep-Active Cell Group in the Rostral Medullary Brainstem. *J. Neurosci.* **32**, 17970–17976 (2012).
292. Anaclet, C. *et al.* The GABAergic parafacial zone is a medullary slow wave sleep-promoting center. *Nat. Neurosci.* **17**, 1217–1224 (2014).

293. Henley, K. & Morrison, A. A re-evaluation of the effects of lesions of the pontine tegmentum and locus coeruleus on phenomena of paradoxical sleep in the cat. *Acta Neurobiol. Exp. (Warsz.)* **34**, 215–232 (1974).
294. Jouvet, M. & Michel, F. New research on the structures responsible for the ‘paradoxical phase’ of sleep. *J. Physiol. Paris* **52**, 130–131 (1960).
295. Mouret, J., Delorme, F. & Jouvet, M. Lesions of the pontine tegmentum and sleep in rats. *C. r. Séances Société Biol. Ses Fil.* **161**, 1603–1606 (1967).
296. Sakai, K. *et al.* Tegmentoreticular projections with special reference to the muscular atonia during paradoxical sleep in the cat: An HRP study. *Brain Res.* **176**, 233–254 (1979).
297. Hajnik, T., Lai, Y. Y. & Siegel, J. M. Atonia-Related Regions in the Rodent Pons and Medulla. *J. Neurophysiol.* **84**, 1942–1948 (2000).
298. Boissard, R. *et al.* The rat ponto-medullary network responsible for paradoxical sleep onset and maintenance: a combined microinjection and functional neuroanatomical study: REM sleep brainstem structures in rats. *Eur. J. Neurosci.* **16**, 1959–1973 (2002).
299. Lai, Y. & Siegel, J. Pontomedullary glutamate receptors mediating locomotion and muscle tone suppression. *J. Neurosci.* **11**, 2931–2937 (1991).
300. Lu, J., Sherman, D., Devor, M. & Saper, C. B. A putative flip–flop switch for control of REM sleep. *Nature* **441**, 589–594 (2006).
301. Verret, L., Léger, L., Fort, P. & Luppi, P.-H. Cholinergic and noncholinergic brainstem neurons expressing Fos after paradoxical (REM) sleep deprivation and recovery. *Eur. J. Neurosci.* **21**, 2488–2504 (2005).
302. Sakai, K. Paradoxical (rapid eye movement) sleep-on neurons in the laterodorsal pontine tegmentum in mice. *Neuroscience* **310**, 455–471 (2015).
303. Sakai, K. & Koyama, Y. Are there cholinergic and non-cholinergic paradoxical sleep-on neurones in the pons?: *NeuroReport* **7**, 2449–2454 (1996).
304. Clément, O., Sapin, E., Bérod, A., Fort, P. & Luppi, P.-H. Evidence that Neurons of the Sublaterodorsal Tegmental Nucleus Triggering Paradoxical (REM) Sleep Are Glutamatergic. *Sleep* **34**, 419–423 (2011).
305. Hendricks, J. C., Morrison, A. R. & Mann, G. L. Different behaviors during paradoxical sleep without atonia depend on pontine lesion site. *Brain Res.* **239**, 81–105 (1982).
306. Valencia Garcia, S. *et al.* Genetic inactivation of glutamate neurons in the rat sublaterodorsal tegmental nucleus recapitulates REM sleep behaviour disorder. *Brain* **140**, 414–428 (2017).
307. Hassani, O. K., Lee, M. G. & Jones, B. E. Melanin-concentrating hormone neurons discharge in a reciprocal manner to orexin neurons across the sleep–wake cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 2418–2422 (2009).
308. Tsunematsu, T. *et al.* Optogenetic Manipulation of Activity and Temporally Controlled Cell-Specific Ablation Reveal a Role for MCH Neurons in Sleep/Wake Regulation. *J. Neurosci.* **34**, 6896–6909 (2014).
309. Verret, L. *et al.* A role of melanin-concentrating hormone producing neurons in the central regulation of paradoxical sleep. *BMC Neurosci.* **4**, 19 (2003).
310. Jégo, S. *et al.* Optogenetic identification of a rapid-eye-movement (REM) sleep modulatory circuit in the hypothalamus. *Nat. Neurosci.* **16**, 1637–1643 (2013).
311. Vetrivelan, R. *et al.* Melanin-concentrating hormone neurons specifically promote rapid eye movement sleep in mice. *Neuroscience* **336**, 102–113 (2016).
312. Kroeger, D., Bandaru, S. S., Madara, J. C. & Vetrivelan, R. Ventrolateral periaqueductal gray mediates rapid eye movement sleep regulation by melanin-concentrating hormone neurons. *Neuroscience* **406**, 314–324 (2019).

313. Brailoiu, G. C. *et al.* Nesfatin-1: Distribution and Interaction with a G Protein-Coupled Receptor in the Rat Brain. *Endocrinology* **148**, 5088–5094 (2007).
314. Broberger, C. Hypothalamic cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) neurons: histochemical relationship to thyrotropin-releasing hormone, melanin-concentrating hormone, orexin/hypocretin and neuropeptide Y. *Brain Res.* **848**, 101–113 (1999).
315. Clement, O. *et al.* The Lateral Hypothalamic Area Controls Paradoxical (REM) Sleep by Means of Descending Projections to Brainstem GABAergic Neurons. *J. Neurosci.* **32**, 16763–16774 (2012).
316. Boissard, R., Fort, P., Gervasoni, D., Barbagli, B. & Luppi, P.-H. Localization of the GABAergic and non-GABAergic neurons projecting to the sublateral dorsal nucleus and potentially gating paradoxical sleep onset. *Eur. J. Neurosci.* **18**, 1627–1639 (2003).
317. Sapin, E. *et al.* Localization of the Brainstem GABAergic Neurons Controlling Paradoxical (REM) Sleep. *PLoS ONE* **4**, (2009).
318. Hayashi, Y. *et al.* Cells of a common developmental origin regulate REM/non-REM sleep and wakefulness in mice. *Science* **350**, 957–961 (2015).
319. Monti, J. M., Lagos, P., Jantos, H. & Torterolo, P. Increased REM sleep after intra-locus coeruleus nucleus microinjection of melanin-concentrating hormone (MCH) in the rat. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **56**, 185–188 (2015).
320. Lagos, P., Torterolo, P., Jantos, H., Chase, M. H. & Monti, J. M. Effects on sleep of melanin-concentrating hormone (MCH) microinjections into the dorsal raphe nucleus. *Brain Res.* **1265**, 103–110 (2009).
321. Valencia Garcia, S. *et al.* Ventromedial medulla inhibitory neuron inactivation induces REM sleep without atonia and REM sleep behavior disorder. *Nat. Commun.* **9**, (2018).
322. Kodama, T., Lai, Y.-Y. & Siegel, J. M. Changes in Inhibitory Amino Acid Release Linked to Pontine-Induced Atonia: An In Vivo Microdialysis Study. *J. Neurosci.* **23**, 1548–1554 (2003).
323. Brooks, P. L. & Peever, J. H. Identification of the Transmitter and Receptor Mechanisms Responsible for REM Sleep Paralysis. *J. Neurosci.* **32**, 9785–9795 (2012).
324. Chase, M. H., Morales, F. R., Boxer, P. A., Fung, S. J. & Soja, P. J. Effect of stimulation of the nucleus reticularis gigantocellularis on the membrane potential of cat lumbar motoneurons during sleep and wakefulness. *Brain Res.* **386**, 237–244 (1986).
325. Holstege, J. C. & Bongers, C. M. A glycinergic projection from the ventromedial lower brainstem to spinal motoneurons. An ultrastructural double labeling study in rat. *Brain Res.* **566**, 308–315 (1991).
326. Nakamura, Y., Goldberg, L., Chandler, S. & Chase, M. Intracellular analysis of trigeminal motoneuron activity during sleep in the cat. *Science* **199**, 204–207 (1978).
327. Goutagny, R. *et al.* Role of the dorsal paragigantocellular reticular nucleus in paradoxical (rapid eye movement) sleep generation: a combined electrophysiological and anatomical study in the rat. *Neuroscience* **152**, 849–857 (2008).
328. Verret, L., Fort, P., Gervasoni, D., Léger, L. & Luppi, P.-H. Localization of the neurons active during paradoxical (REM) sleep and projecting to the locus coeruleus noradrenergic neurons in the rat. *J. Comp. Neurol.* **495**, 573–586 (2006).
329. Luppi, P.-H. *et al.* The neuronal network responsible for paradoxical sleep and its dysfunctions causing narcolepsy and rapid eye movement (REM) behavior disorder. *Sleep Med. Rev.* **15**, 153–163 (2011).
330. Fenik, V. B., Davies, R. O. & Kubin, L. 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 (2005).
331. Lai, Y.-Y., Kodama, T. & Siegel, J. M. 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 (2001).

332. Redline, S. *et al.* The effects of age, sex, ethnicity, and sleep-disordered breathing on sleep architecture. *Arch. Intern. Med.* **164**, 406–418 (2004).
333. Dijk, D.-J., Duffy, J. F. & Czeisler, C. A. Age-Related Increase in Awakenings: Impaired Consolidation of NonREM Sleep at All Circadian Phases. *Sleep* **24**, 565–577 (2001).
334. Monk, T. H., Buysse, D. J., Reynolds, C. F., Kupfer, D. J. & Houck, P. R. Subjective alertness rhythms in elderly people. *J. Biol. Rhythms* **11**, 268–276 (1996).
335. Weitzman, E. D., Moline, M. L., Czeisler, C. A. & Zimmerman, J. C. Chronobiology of aging: temperature, sleep-wake rhythms and entrainment. *Neurobiol. Aging* **3**, 299–309 (1982).
336. Lees, A. J., Blackburn, N. A. & Campbell, V. L. The nighttime problems of Parkinson's disease. *Clin. Neuropharmacol.* **11**, 512–519 (1988).
337. Tandberg, E., Larsen, J. P. & Karlsen, K. A community-based study of sleep disorders in patients with Parkinson's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* **13**, 895–899 (1998).
338. Guarnieri, B. *et al.* Prevalence of Sleep Disturbances in Mild Cognitive Impairment and Dementing Disorders: A Multicenter Italian Clinical Cross-Sectional Study on 431 Patients. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **33**, 50–58 (2012).
339. Ferini-Strambi, L. Does idiopathic REM sleep behavior disorder (iRBD) really exist? What are the potential markers of neurodegeneration in iRBD? *Sleep Med.* **12**, S43–S49 (2011).
340. Schenck, C. H., Bundlie, S. R., Ettinger, M. G. & Mahowald, M. W. Chronic behavioral disorders of human REM sleep: a new category of parasomnia. *Sleep* **9**, 293–308 (1986).
341. Chiaro, G. *et al.* REM sleep behavior disorder, autonomic dysfunction and synuclein-related neurodegeneration: where do we stand? *Clin. Auton. Res. Off. J. Clin. Auton. Res. Soc.* **28**, 519–533 (2018).
342. Zadra, A., Desautels, A., Petit, D. & Montplaisir, J. Somnambulism: clinical aspects and pathophysiological hypotheses. *Lancet Neurol.* **12**, 285–294 (2013).
343. Schenck, C. H., Lee, S. A., Bornemann, M. A. C. & Mahowald, M. W. Potentially Lethal Behaviors Associated With Rapid Eye Movement Sleep Behavior Disorder: Review of the Literature and Forensic Implications. *J. Forensic Sci.* **54**, 1475–1484 (2009).
344. Postuma, R. B. *et al.* A single-question screen for rapid eye movement sleep behavior disorder: A multicenter validation study. *Mov. Disord.* **27**, 913–916 (2012).
345. Ohayon, M. M. From wakefulness to excessive sleepiness: What we know and still need to know. *Sleep Med. Rev.* **12**, 129–141 (2008).
346. Boot, B. P. *et al.* Probable REM Sleep Behavior Disorder Increases Risk for Mild Cognitive Impairment and Parkinson's Disease: A Population-Based Study. *Ann. Neurol.* **71**, 49–56 (2012).
347. Dauvilliers, Y. *et al.* REM sleep behaviour disorder. *Nat. Rev. Dis. Primer* **4**, (2018).
348. Mathis, J., Hess, C. W. & Bassetti, C. 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 (2007).
349. St. Louis, E. K. *et al.* Lesional REM sleep behavior disorder localizes to the dorsomedial pons. *Neurology* **83**, 1871–1873 (2014).
350. Xi, Z. & Luning, W. REM sleep behavior disorder in a patient with pontine stroke. *Sleep Med.* **10**, 143–146 (2009).
351. Krenzer, M. *et al.* Brainstem and Spinal Cord Circuitry Regulating REM Sleep and Muscle Atonia. *PLoS ONE* **6**, (2011).
352. Fantini, M. L. *et al.* Longitudinal Study of Cognitive Function in Idiopathic REM Sleep Behavior Disorder. *Sleep* **34**, 619–625 (2011).

353. Haba-Rubio, J. *et al.* Prevalence and determinants of rapid eye movement sleep behavior disorder in the general population. *Sleep* **41**, (2018).
354. Zhang, X. *et al.* Polysomnographic and neuropsychological characteristics of rapid eye movement sleep behavior disorder patients. *Brain Behav.* **9**, (2019).
355. Chase, M., Soja, P. & Morales, F. Evidence that glycine mediates the postsynaptic potentials that inhibit lumbar motoneurons during the atonia of active sleep. *J. Neurosci.* **9**, 743–751 (1989).
356. Holmes, C. J. & Jones, B. E. Importance of cholinergic, GABAergic, serotonergic and other neurons in the medial medullary reticular formation for sleep-wake states studied by cytotoxic lesions in the cat. *Neuroscience* **62**, 1179–1200 (1994).
357. Brooks, P. L. & Peever, J. H. Impaired GABA and Glycine Transmission Triggers Cardinal Features of Rapid Eye Movement Sleep Behavior Disorder in Mice. *J. Neurosci.* **31**, 7111–7121 (2011).
358. Limousin, N. *et al.* A brainstem inflammatory lesion causing REM sleep behavior disorder and sleepwalking (parasomnia overlap disorder). *Sleep Med.* **10**, 1059–1062 (2009).
359. Soja, P., Lopez-Rodriguez, F., Morales, F. & Chase, M. 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 (1995).
360. Burgess, C., Lai, D., Siegel, J. & Peever, J. 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 (2008).
361. Brooks, P. L. & Peever, J. H. Unraveling the Mechanisms of REM Sleep Atonia. *Sleep* **31**, 1492–1497 (2008).
362. Claassen, D. O. *et al.* REM sleep behavior disorder preceding other aspects of synucleinopathies by up to half a century. *Neurology* **75**, 494–499 (2010).
363. Gagnon, J.-F. *et al.* REM sleep behavior disorder and REM sleep without atonia in probable Alzheimer disease. *Sleep* **29**, 1321–1325 (2006).
364. Wang, P. *et al.* Rapid eye movement sleep behavior disorder in patients with probable Alzheimer’s disease. *Aging Clin. Exp. Res.* **28**, 951–957 (2016).
365. Arnulf, I. *et al.* REM sleep behavior disorder and REM sleep without atonia in patients with progressive supranuclear palsy. *Sleep* **28**, 349–354 (2005).
366. Sixel-Döring, F., Schweitzer, M., Mollenhauer, B. & Trenkwalder, C. Polysomnographic findings, video-based sleep analysis and sleep perception in progressive supranuclear palsy. *Sleep Med.* **10**, 407–415 (2009).
367. Cooper, A. D. & Josephs, K. A. Photophobia, visual hallucinations, and REM sleep behavior disorder in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration: a prospective study. *Parkinsonism Relat. Disord.* **15**, 59–61 (2009).
368. Munhoz, R. P. & Teive, H. A. REM sleep behaviour disorder: how useful is it for the differential diagnosis of parkinsonism? *Clin. Neurol. Neurosurg.* **127**, 71–74 (2014).
369. Arnulf, I. *et al.* Rapid eye movement sleep disturbances in Huntington disease. *Arch. Neurol.* **65**, 482–488 (2008).
370. Galbiati, A., Carli, G., Hensley, M. & Ferini-Strambi, L. REM Sleep Behavior Disorder and Alzheimer’s Disease: Definitely No Relationship? *J. Alzheimers Dis. JAD* **63**, 1–11 (2018).
371. Piano, C. *et al.* Polysomnographic Findings and Clinical Correlates in Huntington Disease: A Cross-Sectional Cohort Study. *Sleep* **38**, 1489–1495 (2015).
372. Kim, Y. E. *et al.* REM sleep behavior disorder: association with motor complications and impulse control disorders in Parkinson’s disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* **20**, 1081–1084 (2014).

373. Olson, E. J., Boeve, B. F. & Silber, M. H. Rapid eye movement sleep behaviour disorder: demographic, clinical and laboratory findings in 93 cases. *Brain* **123**, 331–339 (2000).
374. Scaglione, C. *et al.* REM sleep behaviour disorder in Parkinson's disease: a questionnaire-based study. *Neurol. Sci.* **25**, 316–321 (2005).
375. Sixel-Doring, F. Associated factors for REM sleep behavior disorder in Parkinson disease. *7* (2011).
376. Postuma, R. B., Gagnon, J. F., Vendette, M., Charland, K. & Montplaisir, J. REM sleep behaviour disorder in Parkinson's disease is associated with specific motor features. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **79**, 1117–1121 (2008).
377. Romenets, S. R. *et al.* Rapid eye movement sleep behavior disorder and subtypes of Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **27**, 996–1003 (2012).
378. Gagnon, J.-F. *et al.* Mild cognitive impairment in rapid eye movement sleep behavior disorder and Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* **66**, 39–47 (2009).
379. Gong, Y. *et al.* Clinical manifestations of Parkinson disease and the onset of rapid eye movement sleep behavior disorder. *Sleep Med.* **15**, 647–653 (2014).
380. Rolinski, M. *et al.* REM sleep behaviour disorder is associated with worse quality of life and other non-motor features in early Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **85**, 560–566 (2014).
381. Sommerauer, M. *et al.* Revisiting the impact of REM sleep behavior disorder on motor progression in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* **20**, 460–462 (2014).
382. Ferman, T. J. *et al.* Inclusion of RBD improves the diagnostic classification of dementia with Lewy bodies. *Neurology* **77**, 875–882 (2011).
383. Shea, Y. F., Ha, J. & Chu, L.-W. Comparisons of clinical symptoms in biomarker-confirmed Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies, and frontotemporal dementia patients in a local memory clinic. *Psychogeriatrics* **15**, 235–241 (2015).
384. Murray, M. E. *et al.* MRI and pathology of REM sleep behavior disorder in dementia with Lewy bodies. *Neurology* **81**, 1681–1689 (2013).
385. Terzaghi, M. *et al.* Analysis of video-polysomnographic sleep findings in dementia with Lewy bodies. *Mov. Disord.* **28**, 1416–1423 (2013).
386. Stanzani-Maserati, M. *et al.* Cognitive and Sleep Features of Multiple System Atrophy: Review and Prospective Study. *Eur. Neurol.* **72**, 349–359 (2014).
387. Palma, J.-A. *et al.* Prevalence of REM sleep behavior disorder in multiple system atrophy: a multicenter study and meta-analysis. *Clin. Auton. Res. Off. J. Clin. Auton. Res. Soc.* **25**, 69–75 (2015).
388. Nomura, T. *et al.* Comparison of the clinical features of rapid eye movement sleep behavior disorder in patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Psychiatry Clin. Neurosci.* **65**, 264–271 (2011).
389. Muntean, M.-L., Sixel-Döring, F. & Trenkwalder, C. No Difference in Sleep and RBD between Different Types of Patients with Multiple System Atrophy: A Pilot Video-Polysomnographical Study. *Sleep Disord.* **2013**, (2013).
390. Iranzo, A. *et al.* Characteristics of idiopathic REM sleep behavior disorder and that associated with MSA and PD. *Neurology* **65**, 247–252 (2005).
391. American Academy of Sleep Medicine. *International Classification of Sleep Disorders.* (2014).
392. Ahmed, I. & Thorpy, M. Determinants and Measures of Daytime Sleepiness. *Prim. Care Sleep Med.* 99–106 (2014).
393. Fatani, A. *et al.* Effect of age and gender in the prevalence of excessive daytime sleepiness among a sample of the Saudi population. *J. Epidemiol. Glob. Health* **5**, S59 (2015).

394. Hawley, C. J. *et al.* Excessive daytime sleepiness in psychiatric disorders: Prevalence, correlates and clinical significance. *Psychiatry Res.* **175**, 138–141 (2010).
395. Pallesen, S. *et al.* Prevalence and Risk Factors of Subjective Sleepiness in the General Adult Population. *Sleep* **30**, 619–624 (2007).
396. Johns, M. W. A New Method for Measuring Daytime Sleepiness: The Epworth Sleepiness Scale. *Sleep* **14**, 540–545 (1991).
397. Roth, T. & Roehrs, T. A. Etiologies and sequelae of excessive daytime sleepiness. *Clin. Ther.* **18**, 562–576 (1996).
398. Vgontzas, A. N., Bixler, E. O., Kales, A., Criley, C. & Vela-Bueno, A. Differences in Nocturnal and Daytime Sleep Between Primary and Psychiatric Hypersomnia: Diagnostic and Treatment Implications: *Psychosom. Med.* **62**, 220–226 (2000).
399. Bédard, M.-A., Montplaisir, J., Richer, F. & Malo, J. Nocturnal Hypoxemia as a Determinant of Vigilance Impairment in Sleep Apnea Syndrome. *Chest* **100**, 367–370 (1991).
400. Guilleminault, C. *et al.* Determinants of Daytime Sleepiness in Obstructive Sleep Apnea. *Chest* **94**, 32–37 (1988).
401. Roth, T. New Developments for Treating Sleep Disorders. *J. Clin. Psychiatry* **62(suppl)**, 3–4 (2001).
402. American Psychiatric Association. *Diagnosis and statistical manual of mental disorders.* (2013).
403. Buysse, D. J. Insomnia. *JAMA* **309**, 706 (2013).
404. Feige, B. *et al.* Does REM sleep contribute to subjective wake time in primary insomnia? A comparison of polysomnographic and subjective sleep in 100 patients. *J. Sleep Res.* **17**, 180–190 (2008).
405. Riemann, D. *et al.* The hyperarousal model of insomnia: A review of the concept and its evidence. *Sleep Med. Rev.* **14**, 19–31 (2010).
406. Buysse, D. J., Reynolds, C. F., Monk, T. H., Berman, S. R. & Kupfer, D. J. The Pittsburgh sleep quality index: A new instrument for psychiatric practice and research. *Psychiatr. Res.* **28**, 193–213.
407. Bonnet, M. H. & Arand, D. L. Heart rate variability in insomniacs and matched normal sleepers. *Psychosom. Med.* **60**, 610–615 (1998).
408. Levenson, J. C., Kay, D. B. & Buysse, D. J. The Pathophysiology of Insomnia. *Chest* **147**, 1179–1192 (2015).
409. Lushington, K., Dawson, D. & Lack, L. Core body temperature is elevated during constant wakefulness in elderly poor sleepers. *Sleep* **23**, 504–510 (2000).
410. Rodenbeck, A., Huether, G., Rüther, E. & Hajak, G. Interactions between evening and nocturnal cortisol secretion and sleep parameters in patients with severe chronic primary insomnia. *Neurosci. Lett.* **324**, 159–163 (2002).
411. Fujishiro, H. *et al.* Dementia with Lewy bodies: early diagnostic challenges. *Psychogeriatrics* **13**, 128–138 (2013).
412. Videnovic, A. & Golombek, D. Circadian and sleep disorders in Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* **243**, 45–56 (2013).
413. Ghorayeb, I. *et al.* Sleep disorders and their determinants in multiple system atrophy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **72**, 798–800 (2002).
414. Drouot, X. *et al.* Low levels of ventricular CSF orexin/hypocretin in advanced PD. *Neurology* **61**, 540–543 (2003).
415. Fronczek, R. *et al.* Hypocretin (orexin) loss in Parkinson's disease. *Brain* **130**, 1577–1585 (2007).

416. Thannickal, T. C., Lai, Y.-Y. & Siegel, J. M. Hypocretin (orexin) cell loss in Parkinson's disease. *Brain* **130**, 1586–1595 (2007).
417. Sulzer, D. & Surmeier, D. J. Neuronal vulnerability, pathogenesis, and Parkinson's disease: Neuronal Vulnerability, Pathogenesis, and PD. *Mov. Disord.* **28**, 715–724 (2013).
418. Abbott, R. D. *et al.* Excessive daytime sleepiness and subsequent development of Parkinson disease. *Neurology* **65**, 1442–1446 (2005).
419. Gao, J. *et al.* Daytime Napping, Nighttime Sleeping, and Parkinson Disease. *Am. J. Epidemiol.* **173**, 1032–1038 (2011).
420. Waters, F., Faulkner, D., Naik, N. & Rock, D. Effects of polypharmacy on sleep in psychiatric inpatients. *Schizophr. Res.* **139**, 225–228 (2012).
421. Comella, C. L. Daytime sleepiness, agonist therapy, and driving in Parkinson disease. *JAMA* **287**, 509–511 (2002).
422. Parkinson Study Group. Pramipexole vs levodopa as initial treatment for Parkinson disease: A randomized controlled trial. Parkinson Study Group. *JAMA* **284**, 1931–1938 (2000).
423. Factor, S. A., McAlarney, T., Sanchez-Ramos, J. R. & Weiner, W. J. Sleep disorders and sleep effect in Parkinson's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* **5**, 280–285 (1990).
424. Barnes, J., Connelly, V., Boubert, L. & Maravic, K. Behavioural coping patterns in Parkinson's patients with visual hallucinations. *J. Neuropsychol.* **7**, 326–334 (2013).
425. van Hilten, B. *et al.* Sleep disruption in Parkinson's disease. Assessment by continuous activity monitoring. *Arch. Neurol.* **51**, 922–928 (1994).
426. Arnulf, I. *et al.* Parkinson's disease and sleepiness: An integral part of PD. *Neurology* **58**, 1019–1024 (2002).
427. Roth, T. Assessment of sleepiness and unintended sleep in Parkinson's disease patients taking dopamine agonists. *Sleep Med.* **4**, 275–280 (2003).
428. Rye, D. B., Bliwise, D. L., Dihenia, B. & Gurecki, P. Daytime sleepiness in Parkinson's disease. *J. Sleep Res.* **9**, 63–69 (2000).
429. Ferman, T. J. *et al.* Abnormal daytime sleepiness in dementia with Lewy bodies compared to Alzheimer's disease using the Multiple Sleep Latency Test. *Alzheimer's Res. Ther.* **6**, 76 (2014).
430. Kasanuki, K. *et al.* Neuropathological investigation of hypocretin expression in brains of dementia with Lewy bodies. *Neurosci. Lett.* **569**, 68–73 (2014).
431. Lessig, S. *et al.* Reduced Hypocretin (orexin) Levels in Dementia with Lewy Bodies. *Neuroreport* **21**, 756–760 (2010).
432. Baumann, C. R., Dauvilliers, Y., Mignot, E. & Bassetti, C. L. Normal CSF hypocretin-1 (orexin A) levels in dementia with Lewy bodies associated with excessive daytime sleepiness. *Eur. Neurol.* **52**, 73–76 (2004).
433. Moreno-López, C. *et al.* Excessive daytime sleepiness in multiple system atrophy (SLEEMSA study). *Arch. Neurol.* **68**, 223–230 (2011).
434. Benarroch, E. E. Locus coeruleus. *Cell Tissue Res.* **373**, 221–232 (2018).
435. Abdo, W. F. *et al.* CSF hypocretin-1 levels are normal in multiple-system atrophy. *Parkinsonism Relat. Disord.* **14**, 342–344 (2008).
436. Martinez-Rodriguez, J. E. *et al.* Cerebrospinal fluid hypocretin-1 levels in multiple system atrophy. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* **22**, 1822–1824 (2007).
437. Damon-Perrière, N., Tison, F. & Meissner, W. G. [Multiple system atrophy]. *Psychol. Neuropsychiatr. Vieil.* **8**, 179–191 (2010).

438. Guo, X. Y. *et al.* Clinical and polysomnographic features of patients with multiple system atrophy in South-west China. *Sleep Breath.* **17**, 1301–1307 (2013).
439. Beck, R. O., Betts, C. D. & Fowler, C. J. Genitourinary dysfunction in multiple system atrophy: clinical features and treatment in 62 cases. *J. Urol.* **151**, 1336–1341 (1994).
440. Rundo, J. V. Obstructive sleep apnea basics. *Cleve. Clin. J. Med.* **86**, 2–9 (2019).
441. Eckert, D. J., Jordan, A. S., Merchia, P. & Malhotra, A. Central Sleep Apnea. *Chest* **131**, 595–607 (2007).
442. Muza, R. Normal Sleep. in *Sleep Disorders in Psychiatric Patients: A Practical Guide* (ed. Selsick, H.) 3–25 (Springer, 2018). doi:10.1007/978-3-642-54836-9_1.
443. Javaheri, S. *et al.* Types, Mechanisms, and Clinical Cardiovascular Consequences. *J. Am. Coll. Cardiol.* **69**, 841–858 (2017).
444. Arnulf, I. & Derenne, J. Le syndrome d'apnées du sommeil. *médecine/sciences* **15**, 807 (1999).
445. Muza, R. T. Central sleep apnoea—a clinical review. *J. Thorac. Dis.* **7**, 930–937 (2015).
446. Sullivan, C. E., Kozar, L. F., Murphy, E. & Phillipson, E. A. Primary role of respiratory afferents in sustaining breathing rhythm. *J. Appl. Physiol.* **45**, 11–17 (1978).
447. Malik, V., Smith, D. & Lee-Chiong, T. Respiratory Physiology During Sleep. *Sleep Med. Clin.* **7**, 497–505 (2012).
448. Meslier, N., Perrin, C., Orvoen-Frija, E. & Sattler, C. Physiologie de la respiration au cours du sommeil normal. *Rev. Mal. Respir. Actual.* **4**, 159–161 (2012).
449. Fedson, A. C., Pack, A. I. & Gislason, T. Frequently used sleep questionnaires in epidemiological and genetic research for obstructive sleep apnea: A review. *Sleep Med. Rev.* **16**, 529–537 (2012).
450. Kurtis, M. M., Balestrino, R., Rodriguez-Blazquez, C., Forjaz, M. J. & Martinez-Martin, P. A Review of Scales to Evaluate Sleep Disturbances in Movement Disorders. *Front. Neurol.* **9**, (2018).
451. Netzer, N. C., Stoohs, R. A., Netzer, C. M., Clark, K. & Strohl, K. P. Using the Berlin Questionnaire To Identify Patients at Risk for the Sleep Apnea Syndrome. *Ann. Intern. Med.* **131**, 485 (1999).
452. Argod, J., Pépin, J. L. & Lévy, P. Differentiating obstructive and central sleep respiratory events through pulse transit time. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **158**, 1778–1783 (1998).
453. Boudewyns, A. *et al.* Assessment of Respiratory Effort by Means of Strain Gauges and Esophageal Pressure Swings: A Comparative Study. *Sleep* **20**, 168–170 (1997).
454. Young, T. *et al.* Predictors of sleep-disordered breathing in community-dwelling adults: the Sleep Heart Health Study. *Arch. Intern. Med.* **162**, 893–900 (2002).
455. Mehra, R. *et al.* Prevalence and Correlates of Sleep-Disordered Breathing in Older Men: Osteoporotic Fractures in Men Sleep Study. *J. Am. Geriatr. Soc.* **55**, 1356–1364 (2007).
456. Foldvary-Schaefer, N. R. & Waters, T. E. Sleep-Disordered Breathing: *Contin. Lifelong Learn. Neurol.* **23**, 1093–1116 (2017).
457. Schäfer, H. *et al.* Body fat distribution, serum leptin, and cardiovascular risk factors in men with obstructive sleep apnea. *Chest* **122**, 829–839 (2002).
458. Somers, V. K. *et al.* Sleep Apnea and Cardiovascular Disease: An American Heart Association/American College of Cardiology Foundation Scientific Statement From the American Heart Association Council for High Blood Pressure Research Professional Education Committee, Council on Clinical Cardiology, Stroke Council, and Council on Cardiovascular Nursing *In Collaboration With the National Heart, Lung, and Blood Institute National Center on Sleep Disorders Research (National Institutes of Health).* *Circulation* **118**, 1080–1111 (2008).

459. Wang, D. *et al.* Central Sleep Apnea in Stable Methadone Maintenance Treatment Patients. *Chest* **128**, 1348–1356 (2005).
460. Cochen De Cock, V. *et al.* Is obstructive sleep apnea a problem in Parkinson's disease? *Sleep Med.* **11**, 247–252 (2010).
461. Maria, B. *et al.* Sleep breathing disorders in patients with idiopathic Parkinson's disease. *Respir. Med.* **97**, 1151–1157 (2003).
462. Trotti, L. M. & Bliwise, D. L. No increased risk of obstructive sleep apnea in Parkinson's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* **25**, 2246–2249 (2010).
463. Diederich, N. J. *et al.* Sleep apnea syndrome in Parkinson's disease. A case–control study in 49 patients. *Mov. Disord.* **20**, 1413–1418 (2005).
464. Norlinah, M. I. *et al.* Sleep disturbances in Malaysian patients with Parkinson's disease using polysomnography and PDSS. *Parkinsonism Relat. Disord.* **15**, 670–674 (2009).
465. Happe, S. *et al.* Sleep disorders and depression in patients with Parkinson's disease. *Acta Neurol. Scand.* **104**, 275–280 (2001).
466. Ferini-Strambi, L., Franceschi, M., Pinto, P., Zucconi, M. & Smirne, S. Respiration and Heart Rate Variability during Sleep in Untreated Parkinson Patients. *Gerontology* **38**, 92–98 (1992).
467. Pao, W. C. *et al.* Polysomnographic Findings in Dementia With Lewy Bodies. *The neurologist* **19**, 1–6 (2013).
468. Ohshima, Y. *et al.* Natural course and potential prognostic factors for sleep-disordered breathing in multiple system atrophy. *Sleep Med.* **34**, 13–17 (2017).
469. Videnovic, A. Management of sleep disorders in Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* **32**, 659–668 (2017).
470. Giannini, G. *et al.* Early stridor onset and stridor treatment predict survival in 136 patients with MSA. *Neurology* **87**, 1375–1383 (2016).
471. Shimohata, T. *et al.* Daytime Hypoxemia, Sleep-Disordered Breathing, and Laryngopharyngeal Findings in Multiple System Atrophy. *Arch. Neurol.* **64**, 856 (2007).
472. Vetrugno, R. *et al.* Sleep disorders in multiple system atrophy: a correlative video-polysomnographic study. *Sleep Med.* **5**, 21–30 (2004).
473. Isozaki, E. *et al.* Early diagnosis and stage classification of vocal cord abductor paralysis in patients with multiple system atrophy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **60**, 399–402 (1996).
474. Shimohata, T. *et al.* Mechanisms and prevention of sudden death in multiple system atrophy. *Parkinsonism Relat. Disord.* **30**, 1–6 (2016).
475. Patatanian, E. & Claborn, M. K. Drug-Induced Restless Legs Syndrome. *Ann. Pharmacother.* **52**, 662–672 (2018).
476. Trotti, L. M. *et al.* Correlates of PLMs variability over multiple nights and impact upon RLS diagnosis. *Sleep Med.* **10**, 668–671 (2009).
477. Chiaro, G. & Manconi, M. Restless legs syndrome, periodic limb movements during sleep and cardiovascular risk. *Auton. Neurosci.* **220**, 102554 (2019).
478. Trotti, L. marie & Rye, D. B. Restless legs syndrome. in *Handbook of Clinical Neurology* vol. 100 661–673 (Elsevier, 2011).
479. Allen, R. P., Auerbach, S., Bahrain, H., Auerbach, M. & Earley, C. J. The prevalence and impact of restless legs syndrome on patients with iron deficiency anemia. *Am. J. Hematol.* **88**, 261–264 (2013).
480. Allen, R. P. & Earley, C. J. The role of iron in restless legs syndrome. *Mov. Disord.* **22**, S440–S448 (2007).

481. Allen, R. P. *et al.* Clinical efficacy and safety of IV ferric carboxymaltose (FCM) treatment of RLS: a multi-centred, placebo-controlled preliminary clinical trial. *Sleep Med.* **12**, 906–913 (2011).
482. Earley, C. J. *et al.* Abnormalities in CSF concentrations of ferritin and transferrin in restless legs syndrome. *Neurology* **54**, 1698–1700 (2000).
483. Mizuno, S., Mihara, T., Miyaoka, T., Inagaki, T. & Horiguchi, J. CSF iron, ferritin and transferrin levels in restless legs syndrome. *J. Sleep Res.* **14**, 43–47 (2005).
484. Allen, R. P. *et al.* MRI measurement of brain iron in patients with restless legs syndrome. *Neurology* **56**, 263–265 (2001).
485. Earley, C. J., B. Barker, P., Horská, A. & Allen, R. P. MRI-determined regional brain iron concentrations in early- and late-onset restless legs syndrome. *Sleep Med.* **7**, 458–461 (2006).
486. Godau, J., Klose, U., Santo, A. D., Schweitzer, K. & Berg, D. Multiregional brain iron deficiency in restless legs syndrome. *Mov. Disord.* **23**, 1184–1187 (2008).
487. Rizzo, G. *et al.* Low brain iron content in idiopathic restless legs syndrome patients detected by phase imaging. *Mov. Disord.* **28**, 1886–1890 (2013).
488. Allen, R. P. Restless Leg Syndrome/Willis-Ekbom Disease Pathophysiology. *Sleep Med. Clin.* **10**, 207–214 (2015).
489. Scholz, H. *et al.* Levodopa for restless legs syndrome. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD005504 (2011) doi:10.1002/14651858.CD005504.pub2.
490. Allen, R. P., Connor, J. & Earley, C. J. Abnormally increased CSF 3-Ortho-methyldopa (3-OMD) in untreated restless legs syndrome (RLS) patients indicates more severe disease and possibly abnormally increased dopamine synthesis. *Sleep Med.* **10**, 123–128 (2009).
491. Michaud, M., Soucy, J.-P., Chabli, A., Lavigne, G. & Montplaisir, J. SPECT imaging of striatal pre- and post-synaptic dopaminergic status in restless legs syndrome with periodic leg movements in sleep. *J. Neurol.* **249**, 164–170 (2002).
492. Turjanski, N., Lees, A. J. & Brooks, D. J. Striatal dopaminergic function in restless legs syndrome: 18F-dopa and 11C-raclopride PET studies. *Neurology* **52**, 932–932 (1999).
493. Earley, C. J. *et al.* The Dopamine Transporter is Decreased in the Striatum of Subjects with Restless Legs Syndrome. *Sleep* **34**, 341–347 (2011).
494. Tipton, P. W. & Wszolek, Z. K. Restless legs syndrome and nocturnal leg cramps: a review and guide to diagnosis and treatment. *Pol. Arch. Intern. Med.* **8**.
495. Rijsman, R. M., Schoolderman, L. F., Rundervoort, R. S. & Louter, M. Restless legs syndrome in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* **20**, S5–S9 (2014).
496. Alonso-Navarro, H., García-Martín, E., Agúndez, J. A. G. & Jiménez-Jiménez, F. J. Association between restless legs syndrome and other movement disorders. *Neurology* **92**, 948–964 (2019).
497. Krishnan, P. R., Bhatia, M. & Behari, M. Restless legs syndrome in Parkinson's disease: a case-controlled study. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* **18**, 181–185 (2003).
498. Loo, H.-V. & Tan, E.-K. Case-control study of restless legs syndrome and quality of sleep in Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* **266**, 145–149 (2008).
499. Verbaan, D., van Rooden, S. M., van Hilten, J. J. & Rijsman, R. M. Prevalence and clinical profile of restless legs syndrome in Parkinson's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* **25**, 2142–2147 (2010).
500. Sztatmari, S. *et al.* Association of Restless Legs Syndrome With Incident Parkinson's Disease. *Sleep* **40**, (2017).
501. Wong, J. C., Li, Y., Schwarzschild, M. A., Ascherio, A. & Gao, X. Restless Legs Syndrome: An Early Clinical Feature of Parkinson Disease in Men. *Sleep* **37**, 369–372 (2014).

502. Lee, J. E., Shin, H.-W., Kim, K. S. & Sohn, Y. H. Factors contributing to the development of restless legs syndrome in patients with Parkinson disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* **24**, 579–582 (2009).
503. Trenkwalder, C., Winkelmann, J., Inoue, Y. & Paulus, W. Restless legs syndrome-current therapies and management of augmentation. *Nat. Rev. Neurol.* **11**, 434–445 (2015).
504. Ondo, W. G., Vuong, K. D. & Jankovic, J. Exploring the relationship between Parkinson disease and restless legs syndrome. *Arch. Neurol.* **59**, 421–424 (2002).
505. Hwang, S.-R., Hwang, S.-W., Chen, J.-C. & Hwang, J.-H. Association of periodic limb movements during sleep and Parkinson disease: A retrospective clinical study. *Medicine (Baltimore)* **98**, e18444 (2019).
506. Ghorayeb, I., Dupouy, S., Tison, F. & Meissner, W. G. Restless legs syndrome in multiple system atrophy. *J. Neural Transm.* **121**, 1523–1527 (2014).
507. Monaca, C. *et al.* Vigilance states in a parkinsonian model, the MPTP mouse. *Eur. J. Neurosci.* **20**, 2474–2478 (2004).
508. Laloux, C. *et al.* MPTP-treated mice: long-lasting loss of nigral TH-ir neurons but not paradoxical sleep alterations. *Exp. Brain Res.* **186**, 635–642 (2008).
509. Revishchin, A. *et al.* Effects of striatal transplantation of cells transfected with GDNF gene without pre- and pro-regions in mouse model of Parkinson's disease. *BMC Neurosci.* **17**, 34 (2016).
510. Lima, M. M. S., Andersen, M. L., Reksidler, A. B., Vital, M. A. B. F. & Tufik, S. The role of the substantia nigra pars compacta in regulating sleep patterns in rats. *PLoS One* **2**, e513 (2007).
511. Barraud, Q. *et al.* Sleep disorders in Parkinson's disease: the contribution of the MPTP non-human primate model. *Exp. Neurol.* **219**, 574–582 (2009).
512. Boix, J., Padel, T. & Paul, G. A partial lesion model of Parkinson's disease in mice--characterization of a 6-OHDA-induced medial forebrain bundle lesion. *Behav. Brain Res.* **284**, 196–206 (2015).
513. Masini, D. *et al.* The histamine H3 receptor antagonist thioperamide rescues circadian rhythm and memory function in experimental parkinsonism. *Transl. Psychiatry* **7**, e1088 (2017).
514. Monti, J. M. *et al.* Effects of accumbens m-chlorophenylbiguanide microinjections on sleep and waking in intact and 6-hydroxydopamine-treated rats. *Eur. J. Pharmacol.* **364**, 89–98 (1999).
515. Sakata, M. *et al.* Mesolimbic dopaminergic system is involved in diurnal blood pressure regulation. *Brain Res.* **928**, 194–201 (2002).
516. Vo, Q., Gilmour, T. P., Venkiteswaran, K., Fang, J. & Subramanian, T. Polysomnographic Features of Sleep Disturbances and REM Sleep Behavior Disorder in the Unilateral 6-OHDA Lesioned Hemiparkinsonian Rat. *Park. Dis.* **2014**, 852965 (2014).
517. Oliveira, L. M., Falquetto, B., Moreira, T. S. & Takakura, A. C. Orexinergic neurons are involved in the chemosensory control of breathing during the dark phase in a Parkinson's disease model. *Exp. Neurol.* **309**, 107–118 (2018).
518. Ciric, J., Kapor, S., Perovic, M. & Saponjic, J. Alterations of Sleep and Sleep Oscillations in the Hemiparkinsonian Rat. *Front. Neurosci.* **13**, 148 (2019).
519. Puschban, Z. *et al.* Evidence for dopaminergic re-innervation by embryonic allografts in an optimized rat model of the Parkinsonian variant of multiple system atrophy. *Brain Res. Bull.* **68**, 54–58 (2005).
520. Yi, P.-L. *et al.* Interleukin-1beta mediates sleep alteration in rats with rotenone-induced parkinsonism. *Sleep* **30**, 413–425 (2007).
521. Shen, W.-B. *et al.* Environmental neurotoxin-induced progressive model of parkinsonism in rats. *Ann. Neurol.* **68**, 70–80 (2010).
522. Gerashchenko, D., Blanco-Centurion, C. A., Miller, J. D. & Shiromani, P. J. Insomnia following hypocretin2-saporin lesions of the substantia nigra. *Neuroscience* **137**, 29–36 (2006).

523. Chesselet, M.-F. *et al.* A progressive mouse model of Parkinson's disease: the Thy1-aSyn ('Line 61') mice. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* **9**, 297–314 (2012).
524. Taguchi, T. *et al.* α -Synuclein BAC transgenic mice exhibit RBD-like behaviour and hyposmia: a prodromal Parkinson's disease model. *Brain J. Neurol.* **143**, 249–265 (2020).
525. Amschl, D. *et al.* Time course and progression of wild type α -synuclein accumulation in a transgenic mouse model. *BMC Neurosci.* **14**, 6 (2013).
526. Lim, Y. *et al.* α -Syn suppression reverses synaptic and memory defects in a mouse model of dementia with Lewy bodies. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **31**, 10076–10087 (2011).
527. Refolo, V. *et al.* Progressive striatonigral degeneration in a transgenic mouse model of multiple system atrophy: translational implications for interventional therapies. *Acta Neuropathol. Commun.* **6**, 2 (2018).
528. Yazawa, I. *et al.* Mouse model of multiple system atrophy alpha-synuclein expression in oligodendrocytes causes glial and neuronal degeneration. *Neuron* **45**, 847–859 (2005).
529. Shults, C. W. *et al.* Neurological and neurodegenerative alterations in a transgenic mouse model expressing human alpha-synuclein under oligodendrocyte promoter: implications for multiple system atrophy. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **25**, 10689–10699 (2005).
530. Bourdenx, M. *et al.* Lack of additive role of ageing in nigrostriatal neurodegeneration triggered by α -synuclein overexpression. *Acta Neuropathol. Commun.* **3**, 46 (2015).
531. Ho, Y.-J. *et al.* Ceftriaxone Treatment for Neuronal Deficits: A Histological and MEMRI Study in a Rat Model of Dementia with Lewy Bodies. *Behav. Neurol.* **2018**, 4618716 (2018).
532. Bassil, F. *et al.* Viral-mediated oligodendroglial alpha-synuclein expression models multiple system atrophy. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* **32**, 1230–1239 (2017).
533. Recasens, A. *et al.* Lewy body extracts from Parkinson disease brains trigger α -synuclein pathology and neurodegeneration in mice and monkeys. *Ann. Neurol.* **75**, 351–362 (2014).
534. McDowell, K. A., Shin, D., Roos, K. P. & Chesselet, M.-F. Sleep dysfunction and EEG alterations in mice overexpressing alpha-synuclein. *J. Park. Dis.* **4**, 531–539 (2014).
535. Härtner, L. *et al.* Distinct Parameters in the EEG of the PLP α -SYN Mouse Model for Multiple System Atrophy Reinforce Face Validity. *Front. Behav. Neurosci.* **10**, 252 (2016).
536. Toth, L. A. & Bhargava, P. Animal Models of Sleep Disorders. *Comp. Med.* **63**, 91–104 (2013).
537. Crispim, C. A. *et al.* Relationship between food intake and sleep pattern in healthy individuals. *J. Clin. Sleep Med. JCSM Off. Publ. Am. Acad. Sleep Med.* **7**, 659–664 (2011).
538. Crowley, T. J., Kripke, D. F., Halberg, F., Pegram, G. V. & Schildkraut, J. J. Circadian rhythms of Macaca mulatta: Sleep, EEG, body and eye movement, and temperature. *Primates* **13**, 149–167 (1972).
539. Valatx, J. L. & Bugat, R. [Genetic factors as determinants of the waking-sleep cycle in the mouse (author's transl)]. *Brain Res.* **69**, 315–330 (1974).
540. Yue, M. *et al.* Progressive dopaminergic alterations and mitochondrial abnormalities in LRRK2 G2019S knock-in mice. *Neurobiol. Dis.* **78**, 172–195 (2015).
541. Dusonchet, J. *et al.* A rat model of progressive nigral neurodegeneration induced by the Parkinson's disease-associated G2019S mutation in LRRK2. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **31**, 907–912 (2011).
542. Latourelle, J. C. *et al.* The Gly2019Ser mutation in LRRK2 is not fully penetrant in familial Parkinson's disease: the GenePD study. *BMC Med.* **6**, 32 (2008).
543. Caudle, W. M. *et al.* Reduced vesicular storage of dopamine causes progressive nigrostriatal neurodegeneration. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **27**, 8138–8148 (2007).

544. Luk, K. C. *et al.* Pathological α -Synuclein Transmission Initiates Parkinson-like Neurodegeneration in Non-transgenic Mice. *Science* **338**, 949–953 (2012).
545. Shen, Y. *et al.* Propagated α -synucleinopathy recapitulates REM sleep behaviour disorder followed by parkinsonian phenotypes in mice. *Brain J. Neurol.* **143**, 3374–3392 (2020).
546. Paumier, K. L. *et al.* Intrastratial injection of pre-formed mouse α -synuclein fibrils into rats triggers α -synuclein pathology and bilateral nigrostriatal degeneration. *Neurobiol. Dis.* **82**, 185–199 (2015).
547. Ngolab, J. *et al.* Brain-derived exosomes from dementia with Lewy bodies propagate α -synuclein pathology. *Acta Neuropathol. Commun.* **5**, 46 (2017).
548. Prusiner, S. B. *et al.* Evidence for α -synuclein prions causing multiple system atrophy in humans with parkinsonism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, E5308–E5317 (2015).
549. Wakabayashi, K., Tanji, K., Mori, F. & Takahashi, H. The Lewy body in Parkinson's disease: Molecules implicated in the formation and degradation of α -synuclein aggregates. *Neuropathology* **27**, 494–506 (2007).
550. Fisher, A., Biggs, C. S., Eradiri, O. & Starr, M. S. Dual effects of l-3,4-dihydroxyphenylalanine on aromatic l-amino acid decarboxylase, dopamine release and motor stimulation in the reserpine-treated rat: evidence that behaviour is dopamine independent. *Neuroscience* **95**, 97–111 (1999).
551. Lessin, A. W. & Parkes, M. W. The hypothermic and sedative action of reserpine in the mouse. *J. Pharm. Pharmacol.* **9**, 657–662 (1957).
552. Nadjar, A., Blutstein, T., Aubert, A., Laye, S. & Haydon, P. G. Astrocyte-derived adenosine modulates increased sleep pressure during inflammatory response. *Glia* **61**, 724–731 (2013).
553. Halassa, M. M. *et al.* Astrocytic modulation of sleep homeostasis and cognitive consequences of sleep loss. *Neuron* **61**, 213–219 (2009).
554. Decoeur, F. *et al.* Dietary N-3 PUFA deficiency affects sleep-wake activity in basal condition and in response to an inflammatory challenge in mice. *Brain. Behav. Immun.* **85**, 162–169 (2020).
555. Yu, X. *et al.* Evaluation of blood flow as a route for propagation in experimental synucleinopathy. *Neurobiol. Dis.* **150**, 105255 (2021).
556. Elsevier. Pharmacologie du système noradrénergique. *Elsevier Connect* <https://www.elsevier.com/fr-fr/connect/medecine/pharmacologie-du-systeme-noradrenergique>.
557. Bezard, E., Imbert, C. & Gross, C. E. Experimental models of Parkinson's disease: from the static to the dynamic. *Rev. Neurosci.* **9**, 71–90 (1998).
558. Fisher, R. S., Levine, M. S., Sibley, D. R. & Ariano, M. A. D2 dopamine receptor protein location: Golgi impregnation-gold toned and ultrastructural analysis of the rat neostriatum. *J. Neurosci. Res.* **38**, 551–564 (1994).

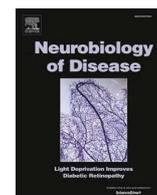
Annexe

Yu X.°, **Persillet M.°**, Zhang L., Zhang Y., Xiuping S., Li X., Ran G., S. Breger L.S., Dovero S., Porras G., Dehay D., Bezard E., Qin C. (2021), Evaluation of blood flow as a route for propagation in experimental Synucleinopathy, *Neurobiology of disease*



Contents lists available at ScienceDirect

Neurobiology of Disease

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ynbdi

Evaluation of blood flow as a route for propagation in experimental synucleinopathy

Xuan Yu^{a,1}, Marine Persillet^{b,1}, Ling Zhang^a, Yu Zhang^a, Sun Xiuping^a, Xianglei Li^a, Gao Ran^a,
Ludivine S. Breger^b, Sandra Dovero^b, Gregory Porras^b, Benjamin Dehay^b, Erwan Bezard^{a,b,*,1},
Chuan Qin^{a,*,1}

^a NHC Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Beijing Engineering Research Center for Experimental Animal Models of Human Critical Diseases, Peking Union Medical College (PUMC) & Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Science (CAMS), Beijing, China

^b Univ. Bordeaux, CNRS, IMN, UMR 5293, F-33000 Bordeaux, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Lewy body
α-Synuclein
Parabiosis
Pathology
Animal model

ABSTRACT

In Parkinson's disease, synucleinopathy is hypothesized to spread from the enteric nervous system, via the vagus nerve, to the central nervous system. Recent evidences collected in non-human primates challenge however the hypothesis of a transmission of α-synuclein (α-syn) pathology through the vagus nerve. Would the hypothesis whereby the bloodstream acts as a route for long-distance transmission of pathological α-syn hold true, an inter-individual transmission of synucleinopathy could occur via blood contact. Here, we used a parabiosis approach to join the circulatory systems of wild type and GFP transgenic C57BL/6 J mice, for which one of the partners parabiont received a stereotaxic intranigral injection of patient-derived α-syn aggregates. While the Lewy Body-receiving mice exhibited a loss of dopamine neurons and an increase in nigral S129 phosphorylated α-syn immunoreactivity, their parabiotic bloodstream-sharing partners did not show any trend for a lesion or change in S129 phosphorylated-α-syn levels. Altogether, our study suggests that, in the patient-derived α-synuclein aggregates-injected mouse model and within the selected time frame, the disease is not "transmitted" through the bloodstream.

1. Introduction

The seminal work of Braak and colleagues suggesting that Lewy body (LB) pathology follows a predictable pattern of progression within the brain in Parkinson's disease (PD) (Braak et al., 2003) as well as the 'host-to-graft' observation (Kordower et al., 2008; Li et al., 2008; Mendez et al., 2008) led to the development of experimental models based on injection with α-synuclein (α-syn – the main protein component of LB) assemblies (Dehay et al., 2016; Luk et al., 2012; Peelaerts et al., 2015; Volpicelli-Daley et al., 2014). These experimental models suggest that α-syn, in pathological conformations such as the one found in LBs, initiates a cascade of events leading to dopaminergic neuron degeneration as well as cell-to-cell propagation of α-syn pathology through a self-templating mechanism (Arotcarena et al., 2020; Bourdenx et al., 2020;

Soria et al., 2020).

Interestingly, patient-derived α-syn aggregates were able to induce nigrostriatal lesions and enteric nervous system pathology after either enteric or striatal injection in non-human primates (Arotcarena et al., 2020) supporting a gut-to-brain propagation but also a brain-to-gut route of transmission. α-Syn pathological lesions were however not found in the vagal nerve in any of the non-human primates (Arotcarena et al., 2020) therefore questioning the hypothesis of a transmission of α-syn pathology through the vagus nerve and the dorsal motor nucleus of the vagus.

Instead, the study suggested a possible systemic mechanism in which the bloodstream would act as a route for long-distance bidirectional transmission of pathological α-syn (Arotcarena et al., 2020). Would this hypothesis hold true, an inter-individual transmission of

Abbreviations: DAB, 3,3'-Diaminobenzidine; ELISA, Enzyme linked immunosorbent assay; FACS, Fluorescence activated cell sorting; GFP, Green fluorescence protein; LB, Lewy body; OD, Optical density; PBS, Phosphate buffer saline; PD, Parkinson's disease; PFA, Paraformaldehyde; SN, Substantia nigra; TH, Tyrosine hydroxylase; WT, Wild type.

* Corresponding authors.

E-mail addresses: erwan.bezard@u-bordeaux.fr (E. Bezard), chuanqin@vip.sina.com (C. Qin).

¹ Equal contribution.

<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105255>

Received 16 November 2020; Received in revised form 2 January 2021; Accepted 4 January 2021

Available online 7 January 2021

0969-9961/© 2021 The Author(s).

Published by Elsevier Inc.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

synucleinopathy could occur via blood contact? In order to test this hypothesis, we used a parabiosis approach to join the circulatory systems of wild type and GFP transgenic C57BL/6 J mice, for which one of the parabiont received a stereotactic intranigral injection of patient-derived α -syn aggregates, later subjected to an anatomic-pathological analysis.

2. Methods and materials

2.1. Animals

Male wild-type C57BL/6 J (WT) and C57BL/6-Tg(UBC-GFP)30Scha/J (GFP) transgenic mice (Charles Rivers, Beijing, China) were habituated to the animal facility for two weeks prior starting the experiments. Mice to be paired by parabiosis were placed together in a cage for an additional two weeks before stereotactic injection and parabiosis surgery to allow the mice to adapt to each other. All the animals were kept under standard housing conditions (22–25 °C with a 12 h/12 h light/dark cycle) and received standard food and tap water ad libitum. The study was approved by the ethical committee for the use of experimental animals of the Institute of Laboratory Animal Sciences (license number: QC18001).

2.2. Experimental design

The experimental design is depicted in Fig. 1. Pairs of WT and GFP mice were housed together for 2 weeks before one member of the pair undergoes a stereotactic unilateral intranigral administration. Immediately after the stereotactic surgery, the injected-mouse was associated via a parabiosis surgery to its paired partner (that received no stereotactic injection). Four months after surgeries, serum samples were first collected for measuring the levels of α -syn content by ELISA. No samples were excluded from analysis in this study. The parabionts were then euthanized (100 mg/kg i.p. of sodium pentobarbital) and intracardially perfused with 0.9% saline followed by ice-cold freshly prepared 4% paraformaldehyde (PFA). Their brains were then postfixed for 3 days in 10 ml of 4% PFA at 4 °C, cryoprotected in gradient 20% sucrose in phosphate buffer saline (PBS) before being frozen by immersion in a cold isopentane bath (–55 °C) for at least 2 min, and stored immediately at –80 °C until sectioning for immunohistochemical analysis.

2.3. LB extraction and characterization

LB fractions were purified from fresh frozen post-mortem samples of sporadic PD-patients (Netherlands Brain Bank) by a sucrose step gradient and sonicated for 5 min prior to in vivo inoculation to disrupt α -synuclein aggregates into oligomeric and fibrillary fragments (Recasens et al., 2014) (Fig. 3A) as previously described (Arotcarena et al., 2020; Bengoa-Vergniory et al., 2020; Bourdenx et al., 2020; Recasens et al., 2014; Soria et al., 2020). Briefly, Tissue was homogenized in 9 vol (wt/vol) ice-cold MSE buffer (10 mM MOPS/KOH, pH 7.4, 1 M sucrose, 1 mM ethylene glycol tetraacetic acid, and 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid) with protease inhibitor cocktail (Complete Mini; Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) with 12 strokes of a motor-driven glass/Teflon homogenizer. For LB purification, a sucrose step gradient was prepared by overlaying 2.2 M with 1.4 M and finally with 1.2 M sucrose in volume ratios of 3.5:8:8 (vol/vol). The homogenate was layered on the gradient and centrifuged at 160,000g for 3 h using a SW32.1 rotor (Beckman Coulter, Fullerton, CA). LB-containing fractions were at the 1.4/2.2 M interface (Fig. 2A). Twenty fractions of 500 μ l were collected from each gradient from top (fraction 1) to bottom (fraction 20), and analyzed for the presence of α -syn aggregates by filter retardation assay using the anti-human α -syn antibody (clone syn211, Thermo Scientific, MS1572, 1:1000), as previously described (Arotcarena et al., 2020; Bengoa-Vergniory et al., 2020; Bourdenx et al., 2020; Recasens et al., 2014; Soria et al., 2020). Insoluble α -syn aggregates were found in the fraction 15 (Fig. 2B) that was thus selected for the stereotactic intranigral injections.

2.4. Surgical procedures

Fifteen male 8-week-old mice (Charles River) were unilaterally injected with 2 μ l of either LB fractions containing aggregated α -syn, or vehicle control in the *substantia nigra* (SN) of the right hemisphere as previously described (Arotcarena et al., 2020; Bengoa-Vergniory et al., 2020; Bourdenx et al., 2020; Recasens et al., 2014; Soria et al., 2020). Briefly, intranigral inoculations were achieved by stereotactic surgery (coordinates from bregma: –2.9 mm anteroposterior, –1.3 lateral, and –4.5 dorsoventral) under deep isoflurane anesthesia at a flow rate of 0.4 μ l/min with a 30-gauge Hamilton syringe coupled to a microinjection pump (World Precision Instruments). After the injection, the needle was left in place for 5 min before being slowly withdrawn from the brain.

Parabiosis surgery was performed under aseptic conditions

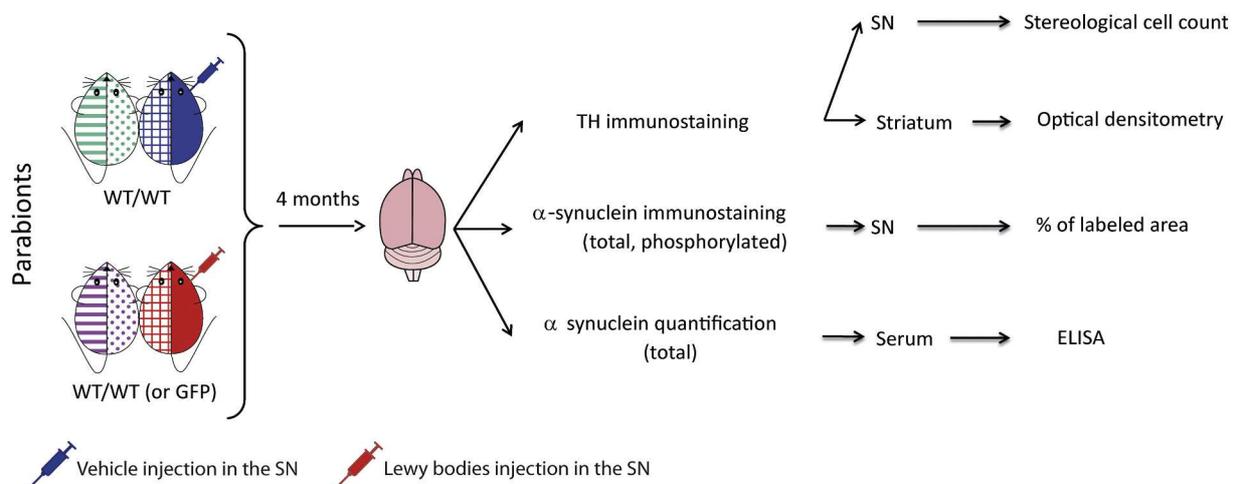


Fig. 1. Design of the experiment. Pairs of parabiotic mice (WT/WT or WT/GFP) were constituted of which the right member received into the right substantia nigra *pars compacta* (SNpc) either sucrose (blue mouse) ($n = 4$; wild-type – WT) or LB containing fractions (red mouse) ($n = 21$; WT or GFP). The left members of the parabiotic pairs received no injections. Four months later, mice were euthanised. Brains were processed for immunohistochemistry analysis including tyrosine hydroxylase (TH) of the SNpc (stereology) and striatum (densitometry), as well as endogenous α -synuclein, and phosphorylated α -synuclein (densitometry). Total levels of α -synuclein in the serum were also measured by ELISA assay.

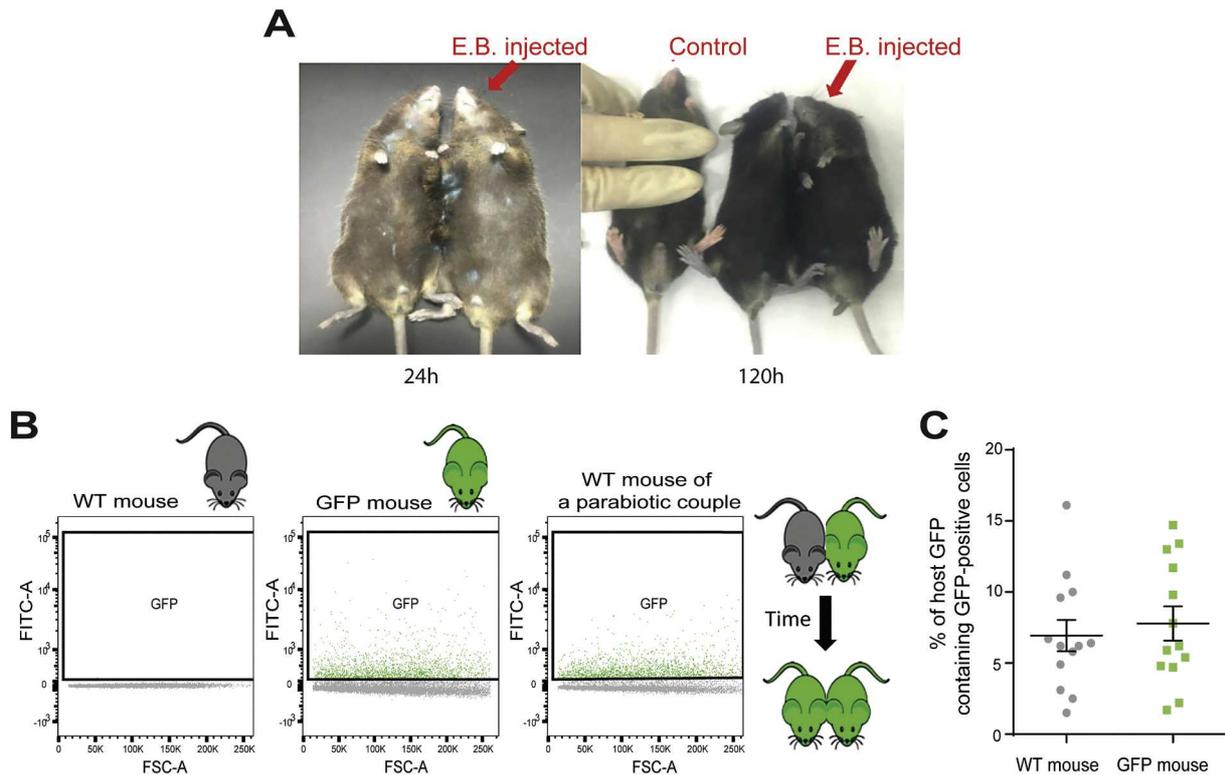


Fig. 2. Assessment of the efficacy of the parabiosis surgery. (A) After parabiosis procedure, the right mouse received a retro-orbital injection of Evans Blue (E.B.) to test the surgical connection between the two mice, as evidenced by a blue coloration of its paws and muzzle in case of success. The coloration on the left (parabiotic) mouse was evaluated 24 h and 120 h after the Evans Blue (E.B.) injection and compared with a non-injected control mouse (far left). (B) Flow cytometry analysis of blood sample collected from a WT mouse, a GFP mouse and a WT parabiotic partner one month following surgical joining. (C) Quantification of GFP containing-positive cells in WT and GFP parabiotic partner ($n = 13$).

according to previously published protocols (Kamran et al., 2013). Briefly, mice were anesthetized by 1% sodium pentobarbital (80 mg/kg i.p.) in the presence of 0.4 mg/ml meloxicam (2 mg/kg s.c.) and maintained on heating pads during the procedure and recovery to prevent loss of body heat. Mirror-image incisions at the flanks of parabiotic pairs were made through the skin and the muscle layer and peritoneum join in the ventral midline. Elbow and knee joints from each parabiotic were bound together using 3–0 silk sutures, while the skin was attached using 5–0 coated vicryl sutures (Duyverman et al., 2012; Hashimoto et al., 2013; Kamran et al., 2013). Mice received analgesic/anti-inflammatory treatment (Meloxicam 2 mg/kg) for a week. Mice were monitored daily to ensure good overall health and recovery.

2.5. Validation of the parabiosis procedure

Evans Blue injection: 8 pairs of mice were used for monitoring the effectiveness of parabiosis, i.e. a shared blood circulation. Mice were rapidly anesthetized by isoflurane (2%). The right mouse of each parabiotic received 0.2 ml of 1% Evans Blue in saline through retro-orbital administration. The colour of the skin of the parabiotics was then observed up to 120 h post injection (Fig. 2A).

Flow cytometric analysis of blood samples from the parabiotics: At time of euthanasia, blood was collected in the two mice of each parabiotic in 1.5 ml centrifuge tube which contained 50 μ l 1% heparin sodium. 1×10^4 cells of each sample was processed through FACS Aria I (Becton Dickinson) at excitation wavelength 525 nm as previously described (Bai et al., 2016). Blood of non-surgery WT and GFP mice was respectively used as negative and positive control of GFP cells.

2.6. Histopathological procedure

50- μ m thick cryostat coronal sections of the entire striatum and midbrain were collected for histological analysis. Immunohistochemistry was performed for each animal on striatal (STR) and substantia nigra (SN) sections, as previously described (Arotcarena et al., 2019; Bengoa-Vergniory et al., 2020; Bourdenx et al., 2020). Briefly, 3 consecutive sections of the striatum and 5 serial midbrain sections (1 of 4) spanning the entire rostro-caudal SN were selected to incubate overnight at room temperature with primary antibodies for tyrosine hydroxylase (TH) (1,5,000 clone EP1532Y, ab137869 Abcam), total α -synuclein (1,10,000 clone D37A6, Cell Signalling) or phosphorylated α -syn at Ser129 (15,000 clone EP1536Y, ab51253 Abcam). Immunoreactions were revealed by an anti-species dependent peroxidase EnVision™ system (DAKO) followed by 3,3'-diaminobenzidine (DAB) visualization. For the α -syn immunostainings, all sections were specifically identified and incubated in the same well to allow direct comparison of immunostaining intensity. After immunostaining, sections were mounted on gelatinised slides, air dried, counterstained with 0.1% cresyl violet solution if needed, dehydrated, and cover-slipped.

3. Histopathological analysis

3.1. Extent of lesion

TH staining in the striatum was quantified by optical density (OD) as previously described (Arotcarena et al., 2019). Sections were scanned in an Epson expression 10000XL high-resolution scanner, and images were analyzed in ImageJ open source software. For SN TH positive cell counts, 5 sections of the rostro-caudal SN were used per animal. TH-positive SN cells were counted by stereology, using a Leica DM-6000B

microscope coupled with the Mercator Pro software (Explora Nova) by experimenter blind with sample group. The SN was delineated for each section, and probes for stereological counting were applied to the map obtained (probe size was 50×40 spaced by $150 \times 120 \mu\text{m}$). Only TH-positive cells with its nucleus included in the probe or crossing the green line of the probe were counted. The total number of TH-positive cells within the whole nigra was estimated using the optical fractionator method.

3.2. α -Synuclein pathology

For the α -syn immunostaining, high-resolution whole colour slide images were first acquired with the 3DHitech Panoramic Scanner at the $20 \times$ magnification, with 5 layers in extended mode. Each image was opened in the off-line Mercator Pro software (Explora Nova), and the mapping of all regions of interest was made. Then the threshold surface analysis was conducted to quantify antibody-based staining in the region of interest as previously described (Arotcarena et al., 2019). Briefly, brightness and contrast rules were applied to the RGB pictures to optimize details. The colour thresholding tool was then used to select the threshold corresponding specifically to the brown colour revealed by the DAB staining. In each region, the software extracted the surface corresponding to the threshold defined. The α -syn extent was finally expressed by a surface ratio between the whole SN surface and the threshold staining detection.

3.3. Measurement of α -synuclein in mouse serum

Serum was collected after centrifugation for approximately 20 min at $1000 \times g$ (or 3000 rpm) within 30 min after collection. The supernatants were collected carefully.

All samples have been stored nominally at -80°C prior to analysis. Total serum α -synuclein concentrations were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on alpha-synuclein capture antibody and mouse alpha-synuclein antibody detection according to the manufacturer's protocol (CliniSciences, ref. MBS006917-96). Samples were analyzed in triplicate in blinded experiments. The optical density of the samples was determined at 450 nm with a iMark microplate reader (Biorad) and results were expressed as $\text{pg}/\mu\text{l}$ α -synuclein in serum.

3.4. Statistics

Statistical analyses were performed in GraphPad Prism 8.0 software. Since the study was exploratory, it was powered according to initial investigations. The extent of LB-induced degeneration was however such that far more animals would have been needed for applying two-way ANOVAs (treatment and hemisphere as variables). After completion of this pilot experiments, studies involving twice the number of animals must be performed for authorizing the use of two-way ANOVA. Normal populations were therefore analyzed by unpaired two-tailed *t*-test (paired for contralateral vs ipsilateral comparisons). For all statistical tests, the level of significance was set to $P < 0.05$. Discrete data are represented as mean \pm SEM unless specified otherwise.

4. Results

4.1. Parabiont partners effectively shared their blood circulation

To investigate the blood flow as a route for propagation in experimental synucleinopathy, we employed a unique experimental paradigm combining both LB injections and parabiosis surgery depicted in Fig. 1. The effectiveness of parabiosis was first tested by a retro-orbital injection of Evans Blue 4 weeks after the surgery in one member of each parabiont. Both paws and muzzle of the Evans Blue-injected mice turned blue within 5 min. Uninjected paired parabiotic mice showed blue

coloration all over their body after 24 h and were still blueish 120 h after the injections (Fig. 2A) suggesting that circulation was actually shared by the two mice.

To further ground the establishment of a shared circulation in the parabionts, we used the C57BL/6-Tg(UBC-GFP)30Scha/J transgenic mice that express enhanced Green Fluorescent Protein (GFP) under the direction of the human ubiquitin C promoter in all tissues examined, including leukocytes, making them a useful tool in studies related to in vivo tracking of leukocytes (Schaefer et al., 2001) (Fig. 2B). Therefore, we analyzed by flow cytometry the presence of GFP-positive leukocytes in blood samples of the WT parabiont partner, as a readout indicating that the blood circulations of the two animals are shared (Fig. 2B-C). With 7.8% of GFP-positive cells in the blood stream, the GFP mice exhibit levels consistent with previous studies (Faltusova et al., 2018). Since the parabiotic WT mice exhibited 6.9% of GFP-positive circulating cells, i.e. at a level fully comparable to the GFP mice (Fig. 2C), this experiment confirmed that the parabiosis procedure was successful and the blood circulation actually shared by the two animals.

4.2. Lewy bodies-injected mice display characteristic lesion

We then used unilateral injection of LB fractions derived from PD patients (Fig. 3A) into the SN of adult mice to model α -syn-induced dopaminergic neuronal loss. Four months after administration, LB-injected mice displayed, as expected, a loss of dopaminergic neurons (Fig. 3B) and a trend to a loss of fibers (Fig. 3C) while vehicle injection showed no dopamine neuron loss and no striatal dopaminergic terminal loss (Supplementary Fig. S1A-B). This result confirms previously reported toxicity of other SNpc-derived LB fractions, validating the toxicity of the preparation. Total endogenous α -syn expectedly remained stably expressed in LB-injected mice and their parabionts (Fig. 3D) but in the vehicle-injected mice (Supplementary Fig. S1C). Such nigral dopaminergic degeneration was however accompanied by an increase in nigral S129 phosphorylated- α -syn in LB-injected mice (Fig. 3E) in contrast to vehicle-treated mice (Supplementary Fig. S1D). These histopathological features were consistent with the rates extensively reported (Bengoa-Vergniory et al., 2020; Bourdenx et al., 2020; Recasens et al., 2014; Soria et al., 2020).

4.3. Uninjected parabiont mice are unaffected

The brains of the uninjected parabiont were investigated in the same manner and compared to the LB-injected parabiont as well as to the vehicle-treated mice and their parabionts. The uninjected parabiont mice neither showed a loss of nigral TH-positive neurons and a striatal dopaminergic terminal loss (Fig. 3B-C). No overt changes in α -syn-related histopathological markers (Fig. 3D-E) were observed. Interestingly, and at odds with the primate data (Arotcarena et al., 2020), α -syn serum levels were not different between vehicle or LB-injected mice or their parabionts (Fig. 3F and Supplementary Fig. 1E). In addition, we checked that α -syn serum levels are not different between vehicle-injected controls ($n = 3$) and LB-injected mice ($n = 5$) in a non-parabiont experimental design ($p = 0.8015$). Altogether, suggesting that, in this species and within a four-month timeframe, the blood flow does not convey pathological information.

5. Discussion

Here, we show that, while the LB-receiving mice exhibited a loss of dopamine neurons and an increase in nigral S129 phosphorylated α -syn immunoreactivity, their parabiotic bloodstream-sharing partners did not show any trend for a lesion or changes in phosphorylated- α -syn level.

To investigate the possibility of a blood circulation-based propagation of pathology, we employed a unique paradigm of α -syn-induced dopaminergic neuronal loss by unilateral inoculation of LB fractions

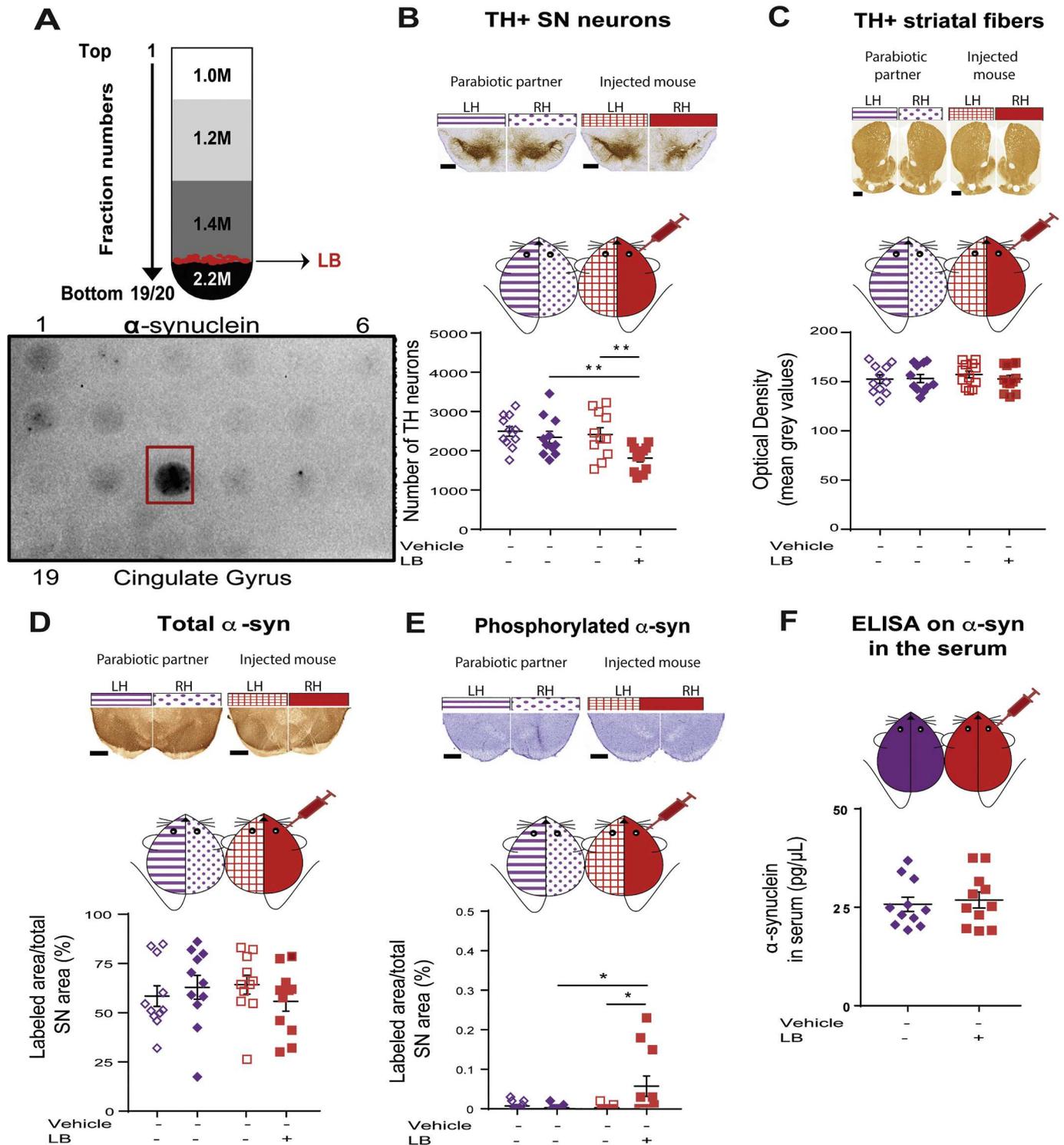


Fig. 3. Nigrostriatal neurodegeneration and α -synuclein pathology in Lewy bodies (LB)-injected mice and their parabiotic partners. (A) Purification of LB from cingulate gyrus from Parkinson's disease brains displayed by (top) a schematic representation of the sucrose gradient fractionation procedure used to purify LB-containing fractions from freshly frozen post-mortem brain tissue of sporadic PD patients, and (bottom) a representative image of filter retardation assay probed with a human specific α -synuclein antibody to assess the presence of insoluble α -synuclein aggregates in the different fractions obtained from cingulate gyrus from sporadic PD patients. Red rectangle indicates LB-containing fraction selected for injections. (B) Representative pictures (top) and quantification (bottom) of tyrosine hydroxylase (TH)-positive SN neurons (brown; Nissl staining in purple) in LB-injected mice ($n = 11$) and parabiotic partners ($n = 11$) at 4 months after injections. Scale bar, 500 μ m. (C) Representative photomicrographs (top) of TH-immunostained striatum and optical densitometry analysis (bottom) of striatal TH immunoreactivity from LB-injected mice ($n = 11$) and parabiotic partners ($n = 11$) at 4 months after injection. Scale bar, 500 μ m. Representative nigral sections (top) and analysis (bottom) of (D) endogenous α -synuclein and (E) S129 phosphorylated α -synuclein immunostaining in LB-injected mice ($n = 11$) and parabiotic partners ($n = 11$). (F) Scatter-plot of endogenous α -synuclein concentration in the serum of LB-injected ($n = 11$) and parabiotic partners ($n = 11$) measured by ELISA. Comparisons were made using unpaired t -test. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.0001$ compared to non-injected hemisphere or parabiotic partners.

derived from PD patients into the SN of adult wild-type mice (Arotcarena et al., 2020; Bengoa-Vergniory et al., 2020; Bourdenx et al., 2020; Recasens et al., 2014; Soria et al., 2020). Histopathological features in the LB injected mice were coherent with what has been previously described in this model (Arotcarena et al., 2020; Bengoa-Vergniory et al., 2020; Bourdenx et al., 2020; Recasens et al., 2014; Soria et al., 2020) within a comparable time frame, i.e. 4 months post-injection. Since we have shown that 17 months survival did not lead to a dramatic enhancement of nigral cell loss (Recasens et al., 2014), we opted for a 4 months survival time, i.e. for the time during which pathology occurs the most. Neuronal cell loss and α -syn pathology remained unilateral in the present study as in previous studies (Arotcarena et al., 2020; Bourdenx et al., 2020; Recasens et al., 2014; Soria et al., 2020) suggested that α -syn-induced pathology propagation was limited to the injected hemisphere.

Given that the blood flow may act as a vehicle for inter-individual contamination or long-distance spreading (Arotcarena et al., 2020; Lohmann et al., 2019), we postulated that blood could enhance pathological processes. Such possibility was investigated through the parabiosis procedure, an experimental paradigm often used to study systemic or circulatory factors between individuals (Conboy et al., 2013; Eggele and Wyss-Coray, 2014; Villeda et al., 2014). Parabionts that are considered as equal partners instead of simple hosts and donors have been often used in haematology (Beura et al., 2018; Dick et al., 2019), aging (Ludwig and Elashoff, 1972; Morrison et al., 2019; Villeda et al., 2014), endocrinology (Coleman and Hummel, 1969; Weitze, 1945) as well as in stem cell biology (Sherwood et al., 2004; Wagers et al., 2002) and more recently in Huntington's disease neuropathology (Rieux et al., 2020). Time being the essence, the exact experimental schedule should be assessed as a limiting factor. Indeed, the parabiosis procedure is considered to result in a joined circulation after 4 weeks, while LB stereotactic injection took place in the present study on the very same day of the parabiosis surgery. We might thus have missed the possibility of pathological changes in endogenous α -syn or its effects during the first month after LB injection.

The present study was prompted by the observation that patient-derived α -syn aggregates were able to induce nigrostriatal lesions and enteric nervous system pathology after either enteric or striatal injection in non-human primates (Arotcarena et al., 2020) with concomitant increase in serum synuclein levels while dorsal nucleus of vagus nerve was lacking synuclein pathology suggesting a possible systemic mechanism in which the bloodstream would act as a route for long-distance bidirectional transmission of pathological α -syn (Arotcarena et al., 2020). The measurements were assessed in blood samples in non-human primates 2 years after the administration of patient-derived α -syn aggregates demonstrate that sustained circulatory pathological rise in synuclein levels occurs in primates while the present results show that, after 4 months, LB-receiving mice do not exhibit such an increase. Through seemingly different in duration, one shall consider that 4 months corresponds to 16% of mouse life expectancy life while 24 months represents 6% of baboon life span (Arotcarena et al., 2020).

A further limitation of the study is the lack of rise in plasma α -syn levels in both the parabiotic and non-parabiotic LB mice at odds with the NHP study. Various mechanisms might be at work as hypothesized by many (Lashuel et al., 2013; Mollenhauer et al., 2017; Soria et al., 2017), but inter-individual contamination, if any, could occur through the release of α -syn-positive extracellular vesicles, including exosomes and ectosomes, by neurons after LB exposure. While far less clear for α -syn-positive neuronal exosomes, recent studies have suggested a possible role in Multiple System Atrophy for α -syn-positive oligodendroglial exosomes (Bassil et al., 2017; Soria et al., 2017; Yu et al., 2020). Comparable parabiotic studies should thus be conducted with glial cytoplasmic inclusions, the pathological hallmark of Multiple System Atrophy, instead of LBs. Finally, as the study deals exclusively with intracerebral LB administration, the present data do not rule out the possibility that α -syn aggregates formed in the enteric nervous system may spread to the

brain via the bloodstream in the parabiotic mice. This would deserve specific investigation.

An experimental factor that should not be overlooked is the actual doses of patient-derived α -syn aggregates or of recombinant α -syn preformed fibrils that are administered to experimental animals. Patient-derived α -syn aggregates were initially used with the premises that they contain toxic α -syn species although they are likely to contain other non-pathological constituents trapped in the inclusions (Bourdenx et al., 2020; Recasens et al., 2014). As a result, nigrostriatal degeneration and synucleinopathy in mice and non-human primates were obtained after administration of ~ 10 to 20 μ g in mice and ~ 24 μ g in NHP (Arotcarena et al., 2020; Bengoa-Vergniory et al., 2020; Bourdenx et al., 2020; Recasens et al., 2014; Soria et al., 2020). In most studies using either transgenic animals or synthetic α -syn preformed fibrils, pathology is induced after injection of 5 to 50 μ g of recombinant α -syn preformed fibrils (Lohmann et al., 2019; Luk et al., 2012; Peelaerts et al., 2015; Volpicelli-Daley et al., 2014). Recent studies have suggested that systemic, i.e. oral and intravenous, exposure to 50 to 500 μ g of recombinant α -syn preformed fibrils accelerated the development of α -synuclein pathology in TgM83^{+/−} mice (Lohmann et al., 2019). Such massive doses (10^6 times more than the patient-derived α -syn aggregates) administered to α -syn-overexpressing animals are likely to elicit phenomena of rare or no likelihood of occurrence in wild-type animals, and hence in human beings.

Currently, patients with neurodegenerative disorders, at the exception of patients suffering from prion diseases (Lauwers et al., 2020), are not excluded from blood or organ donation but given the accumulating evidence that many pathological proteins associated with neurodegenerative diseases are capable of spreading and causing pathological changes (Jucker and Walker, 2013; Soto, 2012), it is important to understand if there is a risk associated with these procedures. In the context of PD, the required four-month period of continuous blood infusion used in this study makes any clinical risk of transmitting disease by blood transfusion very low. These findings are in line with previous reports examining the risk of developing Alzheimer's disease in individuals that have received blood transfusion from patients diagnosed with this disease (Edgren et al., 2016). On the contrary, in the specific case of prion diseases, human-to-human transmission of amyloid probably acquired from blood transfusion has been reported in rare cases (Urwin et al., 2016). Moreover, epidemiological studies ruled out the risk of "transmission" of neurodegenerative disorders through blood transfusion or organ transplantation (Lyon, 2017). There was also no risk association between subjects who received blood from affected donors and those who received blood from healthy donors (Edgren et al., 2016). These studies highlight the striking difference in infectivity between prion diseases mediated by PrP^{Sc} and the synucleinopathies mediated by α -syn. While the prion nature of α -syn is now demonstrated (De Giorgi et al., 2020), one may hypothesize that either it is less infectious or lesser quantities can actually be found in body fluids or peripheral organs. Altogether, these epidemiological evidences associated to our experimental data suggest that full-blown disease would still be extremely unlikely, in comparison to prion aggregates, as toxicity of patient-derived α -syn aggregates in the parabiosis model was absent.

Altogether, our study suggests that, in the patient-derived α -synuclein aggregates-injected mouse model and within the selected time frame, the disease is not "transmitted" through the bloodstream.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105255>.

Ethics approval

The brain samples were obtained from The Netherlands Brain Bank, Netherlands Institute for Neuroscience, Amsterdam (open access: www.brainbank.nl). All material has been collected from donors for or from whom a written informed consent for a brain autopsy and the use of the material and clinical information for research purposes had been

obtained by the Netherlands Brain Bank.

Author contributions

Erwan Bezard, Benjamin Dehay, Chuan Qin: Conceived and designed the experiments.

Xuan Yu, Marine Persillet, Ling Zhang, Yu Zhang, Sun Xiuping, Xianglei Li, Ludivine Greger, Sandra Dovero, Benjamin Dehay, Gregory Porras: Performed the experiments.

Ran Gao, Chuan Qin: Acquired the Funding.

Xuan Yu, Marine Persillet, Benjamin Dehay, Erwan Bezard: Wrote the manuscript.

All authors: Edited the manuscript.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analyzed during the current study available from the corresponding author on reasonable request.

Author statement

None of the author has a conflict of interest to declare with respect to the content of this manuscript. All listed authors have approved the manuscript.

The authors have participated to the research as follows:

Erwan Bezard, Benjamin Dehay, Chuan Qin: Conceived and designed the experiments.

Xuan Yu, Marine Persillet, Ling Zhang, Yu Zhang, Sun Xiuping, Xianglei Li, Ludivine Greger, Sandra Dovero, Benjamin Dehay, Gregory Porras: Performed the experiments.

Ran Gao, Chuan Qin: Acquired the Funding.

Xuan Yu, Marine Persillet, Benjamin Dehay, Erwan Bezard: Wrote the manuscript.

All authors: Edited the manuscript.

Declaration of Competing Interest

E.B. is Chief Scientific Officer of Motac Neuroscience Ltd. All other authors declare no competing financial interests.

Acknowledgements

This work was supported by National Natural Science Foundation of China Grant (31970510, 81941012), CAMS Innovation Fund for Medical Sciences (CIFMS) grant (2016-I2M-2-006, 2016-I2M-1-010) and SAFEA: Introduction of Overseas Talents in Cultural and Educational Sector (G20190001626). We wish to express our gratitude to the Netherlands Brain Bank for providing the human samples and to Floriane Louboutin, Alexandre Boissonnas, Christophe Combadiere and Pauline Hamon for their help in teaching the parabiosis procedure (« Chemokines In Pathology and Inflammation » (CHIP) Team Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses – CIMI-Paris UPMC – Inserm U1135 – CNRS ERL 825 Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière).

References

Arotcarena, M.L., et al., 2019. Transcription factor EB overexpression prevents neurodegeneration in experimental synucleinopathies. *JCI Insight*. 4.
 Arotcarena, M.L., et al., 2020. Bidirectional gut-to-brain and brain-to-gut propagation of synucleinopathy in non-human primates. *Brain*. 143, 1462–1475.
 Bai, L., et al., 2016. Anti-aging effect of *Siraitia grosvenorii* by enhancement of hematopoietic stem cell function. *Am J Chin Med*. 44, 803–815.
 Bengoa-Vergniory, N., et al., 2020. CLR01 protects dopaminergic neurons in vitro and in mouse models of Parkinson's disease. *Nat. Commun*. 11, 4885.

Beura, L.K., et al., 2018. T cells in nonlymphoid tissues give rise to lymph-node-resident memory T cells. *Immunity*. 48 (327–338), e5.
 Bourdenx, M., et al., 2020. Identification of distinct pathological signatures induced by patient-derived alpha-synuclein structures in nonhuman primates. *Sci Adv*. 6, eaaz9165.
 Braak, H., et al., 2003. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* 24, 197–211.
 Coleman, D.L., Hummel, K.P., 1969. Effects of parabiosis of normal with genetically diabetic mice. *Am. J. Phys.* 217, 1298–1304.
 Conboy, M.J., et al., 2013. Heterochronic parabiosis: historical perspective and methodological considerations for studies of aging and longevity. *Aging Cell* 12, 525–530.
 Dehay, B., et al., 2016. Alpha-synuclein propagation: new insights from animal models. *Mov. Disord.* 31, 161–168.
 Dick, S.A., et al., 2019. Self-renewing resident cardiac macrophages limit adverse remodeling following myocardial infarction. *Nat. Immunol.* 20, 29–39.
 Duyverman, A.M., et al., 2012. A transient parabiosis skin transplantation model in mice. *Nat. Protoc.* 7, 763–770.
 Edgren, G., et al., 2016. Transmission of neurodegenerative disorders through blood transfusion: a cohort study. *Ann. Intern. Med.* 165, 316–324.
 Eggel, A., Wyss-Coray, T., 2014. A revival of parabiosis in biomedical research. *Swiss Med. Wkly.* 144, w13914.
 Faltusova, K., et al., 2018. Stem cell defect in ubiquitin-green fluorescent protein mice facilitates engraftment of lymphoid-primed hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 36, 1237–1248.
 Hashimoto, D., et al., 2013. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity*. 38, 792–804.
 Jucker, M., Walker, L.C., 2013. Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature*. 501, 45–51.
 Kamran, P., et al., 2013. Parabiosis in mice: a detailed protocol (J Vis Exp).
 Kordower, J.H., et al., 2008. Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nat. Med.* 14, 504–506.
 Lauwers, E., et al., 2020. Potential human transmission of amyloid β pathology: surveillance and risks. *Lancet Neurol* 19, 872–878.
 Li, J.Y., et al., 2008. Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat. Med.* 14, 501–503.
 Lohmann, S., et al., 2019. Oral and intravenous transmission of alpha-synuclein fibrils to mice. *Acta Neuropathol.* 138, 515–533.
 Ludwig, F.C., Elashoff, R.M., 1972. Mortality in syngeneic rat parabionts of different chronological age. *Trans N Y Acad Sci.* 34, 582–587.
 Luk, K.C., et al., 2012. Pathological alpha-synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science*. 338, 949–953.
 Lyon, J., 2017. Study suggests Alzheimer and Parkinson disease are not transmitted through blood transfusion. *JAMA*. 317, 123–124.
 Mendez, I., et al., 2008. Dopamine neurons implanted into people with Parkinson's disease survive without pathology for 14 years. *Nat. Med.* 14, 507–509.
 Morrison, E.J., et al., 2019. Parabiosis incompletely reverses aging-induced metabolic changes and oxidant stress in mouse red blood cells. *Nutrients*. 11.
 Peelaerts, W., et al., 2015. Alpha-Synuclein strains cause distinct synucleinopathies after local and systemic administration. *Nature*. 522, 340–344.
 Recasens, A., et al., 2014. Lewy body extracts from Parkinson disease brains trigger alpha-synuclein pathology and neurodegeneration in mice and monkeys. *Ann. Neurol.* 75, 351–362.
 Rieux, M., et al., 2020 Jun 8. Shedding a new light on Huntington's disease: how blood can both propagate and ameliorate disease pathology. *Mol. Psychiatry*. <https://doi.org/10.1038/s41380-020-0787-4>.
 Schaefer, B.C., et al., 2001. Observation of antigen-dependent CD8+ T-cell/dendritic cell interactions in vivo. *Cell. Immunol.* 214, 110–122.
 Sherwood, R.I., et al., 2004. Determinants of skeletal muscle contributions from circulating cells, bone marrow cells, and hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 22, 1292–1304.
 Soria, F.N., et al., 2020. Synucleinopathy alters nanoscale organization and diffusion in the brain extracellular space through hyaluronan remodeling. *Nat. Commun.* 11, 3440.
 Soto, C., 2012. Transmissible proteins: expanding the prion heresy. *Cell*. 149, 968–977.
 Urwin, P.J.M., et al., 2016. Creutzfeldt-Jakob disease and blood transfusion: updated results of the UK transfusion medicine epidemiology review study. *Vox Sang.* 110, 310–316.
 Villeda, S.A., et al., 2014. Young blood reverses age-related impairments in cognitive function and synaptic plasticity in mice. *Nat. Med.* 20, 659–663.
 Volpicelli-Daley, L.A., et al., 2014. Addition of exogenous alpha-synuclein preformed fibrils to primary neuronal cultures to seed recruitment of endogenous alpha-synuclein to Lewy body and Lewy neurite-like aggregates. *Nat. Protoc.* 9, 2135–2146.
 Wagers, A.J., et al., 2002. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science*. 297, 2256–2259.
 Weitze, M., 1945. The action of the pituitary gland on the growth of mice shown by parabiosis. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 22, 151–158.

Titre : Etude des altérations des cycles éveil/sommeil dans des modèles murins de la maladie de Parkinson et de l'atrophie multisystématisée

Résumé : La maladie de Parkinson (MP) et l'atrophie multisystématisée (AMS) sont des synucléinopathies caractérisées par la perte des neurones dopaminergiques (DA) dans la substance noire pars compacta (SNpc) et par la présence d'inclusions cytoplasmiques, appelés corps de Lewy (LB) et inclusions cytoplasmiques gliales (GCI) respectivement et constitués notamment d'alpha-synucléine (α -syn) mal conformée. En plus des troubles moteurs, les patients MP et AMS présentent de nombreux symptômes non-moteurs dont les altérations des cycles éveil/sommeil qui peuvent apparaître de manière précoce et qui sont même considérées comme prédictifs du développement de synucléinopathies. Le but de ma thèse est donc d'étudier le possible lien entre la progression de la neurodégénérescence, la progression de la pathologie liée à l' α -syn et l'apparition d'altérations des cycles éveil/sommeil dans des modèles murins de la maladie de Parkinson et de l'atrophie multisystématisée. Le travail réalisé est particulièrement pertinent car comprendre si les altérations des cycles éveil/sommeil peuvent servir au niveau expérimental de marqueur de la progression de la pathologie pourrait permettre une détection précoce et amener à de nouvelles stratégies thérapeutiques pour ralentir sa progression.

Mots clés : sommeil ; modélisation animale, synucléine, pathologies humaines

Title: Study of sleep/wake alterations in mouse model of Parkinson's disease and Multiple system atrophy

Abstract: Parkinson's disease (PD) and Multiple System Atrophy are both synucleinopathies. These diseases are characterized by the loss of dopaminergic neurons of the substantia nigra pars compacta (SNpc) and the presence of cytoplasmic inclusions. These inclusions are named Lewy Bodies (LB) in PD and glial cytoplasmic inclusions (GCI) in MSA and contain notably misfolded alpha-synuclein (α -syn). In addition to movement disorders, PD and MSA patients exhibit a myriad of non-motor symptoms including sleep/wake alterations that may occur early in the course of the diseases and that are even considered as predictors of synucleinopathies. The aim of my thesis is thus to investigate the likelihood of a relationship between the progression of neurodegeneration, the progression of the α -syn pathology, and the occurrence of sleep/wake issues in mouse model of Parkinson's disease and Multiple system atrophy. This work is of particular relevance as understanding if sleep disorders may serve experimentally as a surrogate marker of neurodegeneration or pathology progression could provide an early way detection and lead to new therapeutic strategies to slow down its progression.

Keywords: sleep; animal modeling; synuclein; human pathology

Unité de recherche

Institut des Maladies Neurodégénératives, CNRS UMR 5293, Centre Broca Nouvelle-Aquitaine,
146 rue Léo Saignat 33076 Bordeaux, France