



**HAL**  
open science

# Sommeil et blessure. Intérêt de l'allongement de la photopériode pour la récupération d'une blessure musculaire.

Théo Vanneau

► **To cite this version:**

Théo Vanneau. Sommeil et blessure. Intérêt de l'allongement de la photopériode pour la récupération d'une blessure musculaire.. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Paris Cité, 2023. Français. NNT : 2023UNIP7090 . tel-04550393

**HAL Id: tel-04550393**

**<https://theses.hal.science/tel-04550393>**

Submitted on 17 Apr 2024

**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.

Ecole Doctorale Cerveau, Cognition, Comportements (ED 158)

Sommeil-vigilance-fatigue et Santé Publique – Université Paris Cité

Unité Fatigue et Vigilance – Institut de Recherche Biomédicale des Armées

## **Sommeil et blessure. Intérêt de l’allongement de la photopériode pour la récupération d’une blessure musculaire.**

Thèse de doctorat en Neurosciences par **Théo Vanneau**

Dirigée par **Mounir Chennaoui**

Encadrée par **Michael Quiquempoix** et **Aurélie Trignol**



Soutenue publiquement le : **23/06/2023** à l’hôpital **Hôtel-Dieu**, devant le jury composé de :

**Etienne Challet** – Rapporteur  
Directeur de recherche, PhD, HDR, CNRS, Université de Strasbourg

**Juliette Peltzer** – Rapporteur  
PhD, HDR, IRBA, Université Paris Saclay

**Claire Thomas-Junius** – Examinatrice & Présidente du jury  
Professeure des universités, PhD, HDR, Université d’Évry et de Paris Saclay

**Nathalie Koulmann** - Examinatrice  
Professeure agrégée, MD, PhD, HDR, Université d’Évry et de Paris Saclay

**Armelle Rancillac** - Examinatrice  
CR, PhD, HDR, INSERM, Sorbonne Université

**Mounir Chennaoui** – Directeur de thèse  
PhD, HDR, IRBA, Université Paris Cité

**Michael Quiquempoix** – Encadrant de thèse & membre invité  
PhD, IRBA, Université Paris Cité

**Aurélie Trignol** – Encadrante de thèse & membre invité  
MD, PhD, IRBA, Université Paris Cité



**Mr Théo Vanneau a bénéficié d'un statut militaire de volontaire haut niveau du service de santé des armées (VSSA HN) pour la période 2019 - 2023**

**Les travaux présentés dans ce document ont été financés par la Direction Générale de l'Armement (DGA) dans le cadre d'un appel à projets Biomedef.  
(Projet SAN-01-514)**



# REMERCIEMENTS

---

Je souhaite tout d'abord remercier le pharmacien Général Inspecteur Haude Tymen, anciennement directrice de l'Institut de Recherche Biomédical des Armées et le médecin Général Inspecteur Éric Valade, actuel directeur de l'Institut de Recherche Biomédical des Armées, pour m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein de l'institut.

Je remercie le médecin en chef Fabien Sauvet, pour m'avoir intégré, soutenu et accompagné au sein de l'unité Fatigue et Vigilance au cours de ces 4 années de doctorat. Merci d'avoir toujours facilité les choses pour que la science reste notre préoccupation principale. Merci également au professeur Damien Léger qui m'a permis d'intégrer l'équipe d'accueil 7330 : Vigilance Fatigue Sommeil et Santé publique de l'hôpital Hôtel-Dieu.

Je remercie vivement le docteur Étienne Challet et le docteur Juliette Peltzer d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse, ainsi que le médecin Général Inspecteur Nathalie Koulmann, le docteur Armelle Rancillac et le professeur Claire Thomas-Junius, d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse. C'est un honneur pour moi que vous participiez à mon jury de thèse.

Merci à Mounir Chennaoui, mon directeur de thèse. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir accordé ta confiance. Malgré tes responsabilités, tu as toujours su trouver le temps quand c'était nécessaire. Tu m'as laissé de la liberté tout en m'aiguillant à l'aide d'excellents conseils. Merci pour toute ton expérience et ton savoir que tu m'as allégrement dispensé. Ton dévouement pour la recherche m'inspire énormément.

Michael, merci pour ta disponibilité et ton écoute attentive de chaque instant. Tu m'as appris à prendre du recul, à me poser les bonnes questions, tu as transformé mon ardeur excessive en ferveur réfléchie. Tes conseils sont toujours précis et avisés, j'aimerais pouvoir jouir un jour de la même clairvoyance. Merci pour ta bienveillance, tes encouragements et ton enthousiasme qui ont été une vraie bouffée d'oxygène, mais merci également pour ta franchise quand ça n'allait pas.

Un grand merci à Aurélie Trignol. Malgré mon appétence pour les neurosciences, tu m'as appris beaucoup sur la réparation musculaire. Merci pour ta rigueur et ta persévérance face à mes ignorances en histologie.

Merci Danielle, pour ta disponibilité, ton énergie et ton altruisme. Merci d'avoir partagé avec moi un peu de ton érudition infinie. Merci pour ton aide inestimable pour la rédaction des articles scientifiques et pour la rédaction du manuscrit de thèse.

Catherine, merci de m'avoir initié à la théorie et la pratique des dosages biochimiques. Tu m'as montré les réflexions nécessaires à l'intégration de biologie dans un protocole expérimental.

Un énorme merci à Marie-Claire pour toutes ces heures passées dans le froid à découpé des muscles et pour ces milliers de tubes et de puits rempli par tes soins, le tout dans la joie et la bonne humeur !

Je remercie l'ensemble des membres de l'unité Fatigue et Vigilance, Mathias Guillard, Vincent Beauchamps, Pascal Van Beers, Haïk Ayounts. Merci de rendre le quotidien si agréable dans cette unité de recherche.

Merci Emeric, Anaïs, Clémentine, pour avoir égayé mon passage à l'IRBA ! Toutes ces discussions qui permettent de relativiser sur ses problèmes et de sortir un peu du quotidien parfois pesant.

Je tiens également à remercier l'unité animalerie de l'IRBA. Votre aide au quotidien et votre présence 7 jours sur 7, toujours dans la joie et la bonne humeur, est un renfort inestimable. Un merci spécial à Hervé Chaussard pour sa gentillesse et pour avoir toujours trouvé des solutions aux problèmes que l'on a pu rencontrer. Merci également à l'unité prototypage de l'IRBA pour m'avoir aidé à mettre au point des cages sur mesure pour les animaux.

Merci au personnel de l'école doctorale 158, et au personnel de l'université Paris-Cité, merci de m'avoir permis de mener à bien ce doctorat !

Benjamin, Loic, Erwann, Mélanie. Merci pour votre bonne humeur et pour tous ces rires partagés ensemble. Si la recherche à si bon goût aujourd'hui, c'est un peu grâce à vous !

Loulou, Rod, FX, Jorgy, Luca, Malo, Maxou, Hugo, Yoan. La liste des bons moments passés avec vous excéderait certainement le nombre de pages de cette thèse. Nos discussions et nos

débats enflammés, très souvent au prix de quelques heures de sommeil, ont largement contribué à développer la curiosité qui m'anime aujourd'hui. Merci pour tous ces rires et délires qu'on a partagés et qu'on partagera ensemble, tous ces moments de folies qui donne de la saveur à notre existence.

Je ne serais rien sans ma famille, mes parents et mes sœurs. Ces mots ne sont que peu de choses par rapport à ce que je vous dois. Merci pour votre amour, je sais que vous êtes toujours là quelque part avec moi et ça me donne une force inestimable. Merci pour ces valeurs humaines que vous m'avez transmises et que je chéris aujourd'hui. Merci de m'avoir offert la possibilité de faire un métier qui me passionne.

J'achèverai ces remerciements en dédiant ce travail à la femme de ma vie, Calixte. Chaque jour passé à tes côtés est l'expérience la plus agréable qui soit. Tu fais de moi un homme meilleur et tu es la source de toute l'énergie qui m'anime.



# TABLE DES MATIÈRES

---

<b>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>1</b>
<b><u>PARTIE 1 – Le sommeil : généralités.....</u></b>	<b>1</b>
<b>1.1. L'étude du sommeil.....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Définition et histoire du sommeil.....	1
1.1.2. La découverte de l'électroencéphalographie.....	2
1.1.3. Autres méthodes d'étude du sommeil.....	5
1.1.4. L'utilisation des modèles animaux.....	8
<b>1.2. La structure du sommeil des rongeurs.....</b>	<b>9</b>
1.2.1. La macrostructure du sommeil.....	9
1.2.2. La microstructure du sommeil.....	11
<b>1.3. Les réseaux de la veille et du sommeil.....</b>	<b>16</b>
<b>1.4. La régulation du sommeil.....</b>	<b>18</b>
1.4.1. Le processus homéostatique.....	18
1.4.2. Le processus circadien.....	20
1.4.3. Modulation de la régulation du sommeil.....	21
<b>1.5. Les fonctions du sommeil.....</b>	<b>23</b>
1.5.1. La fonction métabolique et énergétique du sommeil.....	24
1.5.2. La fonction d'homéostasie synaptique du sommeil.....	25
1.5.3. La fonction endocrinienne du sommeil.....	26
1.5.4. La fonction immuno-inflammatoire du sommeil.....	28
1.5.5. La fonction glymphatique du sommeil.....	29
<b>1.6. Les effets du manque de sommeil.....</b>	<b>30</b>
<b>1.7. L'extension de sommeil.....</b>	<b>31</b>
<b><u>PARTIE II – Le muscle strié squelettique.....</u></b>	<b>35</b>
<b>2.1. Composition et structure.....</b>	<b>35</b>
2.1.1. Anatomie et fonction du muscle strié squelettique.....	35

2.1.2. Les types de fibres musculaires.....	37
2.1.3. Les autres composants du muscle strié squelettique.....	39
<b>2.2. La blessure musculaire et sa réparation.....</b>	<b>40</b>
2.2.1. Classification des blessures musculaires.....	40
2.2.2. Prise en charge de la douleur musculaire post lésionnelle..	41
2.2.3. Le processus de réparation musculaire.....	42
2.2.4. Le modèle de blessure musculaire par injection de cardiotoxine.....	45
<b>2.3. Rôle du sommeil et de l'horloge circadienne sur le tissu musculaire.....</b>	<b>46</b>
2.3.1. Activité musculaire et horloge circadienne.....	46
2.3.2. Effets du manque de sommeil sur le tissu musculaire.....	47
2.3.3. Effets potentiels de l'extension de sommeil sur le tissu musculaire.....	48
<b>OBJECTIFS ET PROBLÉMATIQUES.....</b>	<b>51</b>
<b>ÉTUDE N°1 : Sommeil et blessure.....</b>	<b>55</b>
<b>3.1. Matériel et méthodes.....</b>	<b>58</b>
<b>3.2. Résultats.....</b>	<b>69</b>
3.2.1. Vérification de la blessure musculaire induite par injection de cardiotoxine.....	69
3.2.2. Effets de la blessure musculaire sur le temps de sommeil.....	70
3.2.3. Effets de la blessure musculaire sur la stabilité du sommeil.....	76
3.2.4. Effets de la blessure musculaire sur les paramètres spectraux du sommeil.....	80
3.2.5. Effets de la blessure musculaire sur les paramètres des <i>spindles</i> .....	82
3.2.6. Évolution de paramètres associés à une douleur sévère après induction de la blessure musculaire.....	88
3.2.7. Analyse des concentration de molécules régulatrices du sommeil en réponse à la blessure musculaire.....	92

<b>ÉTUDE N°2 : Validation d'une nouvelle méthode non invasive pour l'étude du sommeil chez le rat.....</b>	<b>99</b>
<b>4.1. Matériel et méthodes.....</b>	<b>104</b>
<b>4.2. Résultats.....</b>	<b>111</b>
4.2.1. Enregistrements simultanés EEG/EMG et piézoélectriques.....	111
4.2.2. Discrimination veille/sommeil avec le système piézoélectrique.....	112
4.2.3 Évaluation du temps de sommeil.....	113
4.2.4 Évaluation de la fragmentation du sommeil et de l'éveil.....	116
4.2.5 Différences de signaux piézoélectriques selon le stade de sommeil.....	118
4.2.6 Classification du sommeil lent et du sommeil paradoxal avec le système piézoélectrique.....	121
<b>ÉTUDE N°3 : Intérêt de l'allongement de la photopériode pour la récupération d'une blessure musculaire.....</b>	<b>127</b>
<b>5.1. Matériel et méthodes.....</b>	<b>132</b>
<b>5.2. Résultats.....</b>	<b>139</b>
5.2.1. Effets de l'allongement de la photopériode sur le temps de sommeil des animaux blessés.....	139
5.2.2. Effets de l'allongement de la photopériode sur des paramètres de la qualité du sommeil des animaux blessés.....	145
5.2.3. Effets de l'allongement de la photopériode sur la sensibilité mécanique à la douleur des animaux blessés.....	150
5.2.4. Caractérisations biologiques et histologiques des effets de 2 et 14 jours d'allongement de la photopériode sur la réparation musculaire du muscle <i>Tibialis Anterior</i> .....	155
5.2.5. Caractérisations biologiques et histologiques des effets de 14 jours d'allongement de la photopériode sur les muscles <i>Tibialis Anterior</i> et <i>Gastrocnemius</i> d'animaux non blessés.....	162
<b>DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVE.....</b>	<b>171</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>179</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>209</b>
<b>ARTICLES PUBLIÉS.....</b>	<b>215</b>

# LISTE DES FIGURES

---

- Figure 1 : Hans Berger (1873 – 1941) en 1927 retranscrivant l'électroencéphalogramme de sa fille (Ilse).
- Figure 2 : Schéma de l'enregistrement de l'activité neuronale par une électrode d'électroencéphalographie.
- Figure 3 : Exemple de signaux EEG enregistrés pendant l'éveil, le sommeil lent et le sommeil paradoxal.
- Figure 4 : Hypnogramme représentant l'alternance entre éveil, sommeil lent et sommeil paradoxal au cours de 24h chez le rat.
- Figure 5 : Exemples de signaux EEG/EMG correspondants à l'éveil, au sommeil lent et au sommeil paradoxal chez le rat.
- Figure 6 : Exemple de l'application d'un filtre band-pass sur des signaux EEG.
- Figure 7 : Densité de spectre de puissance d'une sous-période d'éveil, de sommeil lent profond et de sommeil paradoxal.
- Figure 8 : Illustration d'un complexe-K suivi par un *spindle* sur un enregistrement EEG chez l'animal lors du sommeil lent.
- Figure 9 : Mécanisme de génération des *spindles* et fonctions associées.
- Figure 10 : Représentation des populations neuronales impliquées dans la régulation du sommeil sur une coupe sagittale de cerveau de rat.
- Figure 11 : Modèle de la régulation du sommeil à deux processus.
- Figure 12 : Diagramme schématique de l'organisation circadienne du SCN.
- Figure 13 : Modèle conceptuel des changements du sommeil en réponse à l'activation du système immunitaire.
- Figure 14 : Représentation schématique du modèle d'allocation énergétique du sommeil.
- Figure 15 : Modèle de la fonction active du sommeil dans la consolidation mnésique.
- Figure 16 : Profil de sécrétion d'hormone de croissance au cours d'une nuit de sommeil.
- Figure 17 : Effets du temps de sommeil sur le ratio ghréline/leptine.
- Figure 18 : Rôle du sommeil lent dans l'élimination des déchets cérébraux.
- Figure 19 : Effets de l'extension de sommeil sur le nombre de laps et sur le temps de réponse lors d'une privation de sommeil.
- Figure 20 : Structure du muscle strié squelettique.
- Figure 21 : Voies de signalisation impliquées dans la synthèse des protéines au niveau musculaire.
- Figure 22 : Processus de formation de nouvelles fibres musculaires.
- Figure 23 : Schéma des 4 étapes de la réparation musculaire.
- Figure 24 : Coupe histologique de muscle (*Tibialis Anterior*) coloré à l'hématoxyline et l'éosine représentant la cinétique de la réparation musculaire induit par injection de cardiotoxine chez la souris.
- Figure 25 : Mécanismes potentiels du manque de sommeil sur le muscle.
- Figure 26 : Effets potentiels de l'extension de sommeil et de ses conséquences sur le muscle.
- Figure 27 : Résumé graphique du protocole et des résultats principaux de cette première étude.
- Figure 28 : Schéma du protocole expérimental.
- Figure 29 : Représentation schématique de l'implantation téléométrique et des enregistrements EEG.
- Figure 30 : Interface du logiciel neuroscore® pour l'annotation visuelle de l'état de vigilance.
- Figure 31 : Méthode de détection automatique des *spindles*.
- Figure 32 : Détail de l'ensemble des paramètres du sommeil et de l'éveil analysés à partir des signaux EEG.
- Figure 33 : Analyses vidéo pour détecter la position des animaux et quantifier leurs déplacements.
- Figure 34 : Immunomarquages et coloration des muscles blessés et des muscles contrôles.
- Figure 35 : Surface de la blessure musculaire et poids du muscle après l'induction de la blessure.
- Figure 36 : Temps total de sommeil par période de 24 heures en réponse à la blessure musculaire.
- Figure 37 : Temps total de sommeil lent et de sommeil paradoxal par période de 24 heures en réponse à la blessure musculaire.
- Figure 38 : Temps total de sommeil par jour en réponse à la blessure musculaire pour la période d'obscurité (20:00-08:00).
- Figure 39 : Temps total de sommeil lent et de sommeil paradoxal en réponse à la blessure musculaire pour la photopériode d'obscurité.
- Figure 40 : Temps total de sommeil par jour en réponse à la blessure musculaire pour la période lumineuse (08:00-20:00).

Figure 41 : Temps total de sommeil lent et de sommeil paradoxal en réponse à la blessure musculaire pour la période lumineuse.

Figure 42 : Fréquence des périodes de sommeil en fonction de leur durée pour la période d'obscurité à J-1.

Figure 43 : Fréquence des périodes de sommeil en fonction de leur durée pour la période d'obscurité à J0.

Figure 44 : Fréquence des périodes de sommeil en fonction de leur durée pour la période d'obscurité à J+1.

Figure 45 : Fréquence des périodes de sommeil en fonction de leur durée pour la période d'obscurité à J+2.

Figure 46 : Fréquence des périodes de sommeil en fonction de leur durée pour la période d'obscurité à J+3.

Figure 47 : Activité en ondes lentes du sommeil lent en réponse à la blessure musculaire (Jour 0 ; Jour +1).

Figure 48 : Activité en ondes lentes du sommeil lent en réponse à la blessure musculaire (Jour +2 ; Jour +3).

Figure 49 : Puissance relative et fréquence moyenne des ondes delta du sommeil lent en réponse à la blessure musculaire pour la période d'obscurité.

Figure 50 : Densité en *spindles* en réponse à la blessure musculaire.

Figure 51 : Nombre de *spindles* par heure pour la période d'obscurité en réponse à la blessure musculaire.

Figure 52 : Corrélation entre le nombre de *spindles* et le temps total de sommeil.

Figure 53 : Corrélations entre le nombre de *spindles* par heure et la durée des périodes de sommeil.

Figure 54 : Corrélations entre le temps total de sommeil et la durée des périodes de sommeil.

Figure 55 : Évolution du poids corporel des animaux CTL et BLS au cours de l'expérimentation.

Figure 56 : Cinétique de la température sous-cutanée en réponse à la blessure musculaire.

Figure 57 : Évolution de la distance parcourue par heure en réponse à la blessure musculaire.

Figure 58 : Évolution de la mobilité du corps par heure en réponse à la blessure musculaire.

Figure 59 : Fréquence et puissance du gamma (60-90 Hz) pendant l'éveil à la suite de l'induction de la blessure musculaire.

Figure 60 : Dosages biochimiques de molécules impliquées dans la réponse à la blessure et dans la régulation du sommeil.

Figure 61 : Rôle hypothétique de BMAL1 musculaire dans la régulation du sommeil et la réponse à la blessure.

Figure 62 : Schéma des étapes méthodologiques de cette étude.

Figure 63 : Schéma du protocole expérimental.

Figure 64 : Illustration de l'identification de l'éveil et du sommeil en EEG/EMG et avec le système piézo.

Figure 65 : Illustration du procédé de régression orthogonale pour le classement et la sélection des paramètres.

Figure 66 : Signaux EEG/EMG/Piézo enregistrés simultanément.

Figure 67 : Temps total de sommeil par heure évalué avec l'EEG/EMG et le système piézo.

Figure 68 : Temps total de sommeil sur 24h et sur les 4h d'extension de la lumière.

Figure 69 : Évaluation de la fragmentation du sommeil avec le système piézo.

Figure 70 : Évaluation de la fragmentation de l'éveil avec le système piézo.

Figure 71 : Illustration de la différence du rythme respiratoire selon le stade de sommeil.

Figure 72 : Analyse spectrale du signal piézo correspondant au sommeil lent et au sommeil paradoxal.

Figure 73 : Représentation du protocole expérimental.

Figure 74 : Illustration de la réalisation du test de Von Frey.

Figure 75 : Identification des muscles *Tibialis Anterior* et *Gastrocnemius* chez le rat.

Figure 76 : Temps total de sommeil et temps passé en sommeil lent et paradoxal pendant la période d'allongement de la lumière.

Figure 77 : Temps total de sommeil et temps passé en sommeil lent et paradoxal de 20:00 à 00:00 pendant la période d'allongement de la lumière.

Figure 78 : Temps total de sommeil et temps passé en sommeil lent et paradoxal pendant la période commune de lumière.

Figure 79 : Temps total de sommeil et temps passé en sommeil lent et paradoxal pendant la période commune d'obscurité.

Figure 80 : Temps total de sommeil et temps passé en sommeil lent et paradoxal par jour.

Figure 81 : Fréquence des périodes de sommeil en fonction de leur durée par jour, pour la période lumineuse commune et la période d'obscurité commune.

Figure 82 : Fréquence des périodes de sommeil en fonction de leur durée pour la période d'allongement de la lumière.

Figure 83 : Ratio des courtes / longues périodes de sommeil pendant la période d'allongement de la lumière.

Figure 84 : Puissance relative des ondes delta pendant le sommeil lent au cours de la période d'allongement de la lumière.

Figure 85 : Évolution de la densité des *spindles* pendant la période d'allongement de la lumière.

Figure 86 : Évolution du seuil de sensibilité à la douleur mécanique à la suite de l'induction de la blessure et à l'allongement de la photopériode.

Figure 87 : Paramètres de la lésion musculaire et du contenu cérébral après 14 jours d'allongement de la photopériode.

Figure 88 : Réponse biologique à la blessure musculaire après deux jours d'allongement de la photopériode.

Figure 89 : Cartographies avec distribution spatiale de l'aire de section transversale des fibres musculaires l'outil MuscleJ.

Figure 90 : Effet de l'allongement de la photopériode sur les fibres musculaires du *Tibialis Anterior* en réparation.

Figure 91 : Effet de l'allongement de la photopériode sur la fréquence et l'aire de section transversale des fibres musculaires en fonction de leur type.

Figure 92 : Effet de l'allongement de la photopériode sur le nombre de noyaux centraux par fibre musculaire.

Figure 93 : Nombre de capillaires par fibre musculaire du *Tibialis Anterior* blessé en réponse à l'allongement de la photopériode.

Figure 94 : Immunomarquages à la Laminine et au Dapi sur des coupes transversales de muscles *Tibialis Anterior* et *Gastrocnemius* d'animaux contrôles 12:12 et 16:8.

Figure 95 : Aire de section transversale des fibres musculaires du *Tibialis Anterior* et du *Gastrocnemius* en réponse à 14 jours d'allongement de la photopériode.

Figure 96 : Fréquence et aire de section des types de fibres musculaires du muscle *Tibialis Anterior* en réponse au changement de photopériode.

Figure 97 : Dosages biochimiques au niveau plasmatique et musculaire après 14 jours d'allongement de la photopériode.

Figure 98 : Fréquence des périodes de sommeil en fonction de leur durée pour la période lumineuse de J-1 à J+2.

Figure 99 : Paramètres des *spindles* en réponse à la blessure musculaire.

Figure 100 : Fréquence des périodes de sommeil paradoxal en fonction de leur durée par jour, pour la période lumineuse commune et la période d'obscurité commune.

Figure 101 : Puissance relative des ondes delta pendant le sommeil lent et des ondes thêta pendant le sommeil paradoxal.

Figure 102 : Évolution des rythmes circadiens de la température sous-cutanée et de l'activité locomotrice après l'allongement de la photopériode.

Figure 103 : Évolution de la distance parcourue par jour et par période de 12 heures.

# LISTE DES TABLES

---

Table 1 : Caractéristiques morphologiques, métaboliques et fonctionnelles des différents types de fibres musculaires.

Table 2 : Résumé de la méthode MLG-R pour la classification des blessures musculaires.

Table 3 : Évaluation du temps total de sommeil quotidien avec l'EEG/EMG et avec le système piézo.

Table 4 : Matrice de confusion de toutes les périodes de 10 secondes annotées en EEG/EMG et avec le système piézo sur les 7 jours d'enregistrements.

Table 5 : Liste des paramètres sélectionnés et utilisés pour la classification automatique du sommeil lent et du sommeil paradoxal.

Table 6 : Matrice de confusion de la classification du sommeil lent et du sommeil paradoxal avec l'annotation visuelle en EEG/EMG et l'utilisation d'un algorithme d'apprentissage supervisé pour le système piézo.

# LISTE DES ABREVIATIONS

---

EEG : Electroencéphalographie  
EMG : Electromyographie  
EOG : Electro-oculographie  
ECG : Electrocardiographie  
IRM : Imagerie par résonance magnétique  
MEG : Magnétoencéphalographie  
SWA : Activité en ondes lentes  
NRT : Noyau réticulé du thalamus  
TC : Thalamo-cortical  
CT : Cortico-thalamique  
LH : Hypothalamus latéral  
VLPO : Noyau ventrolatéral préoptique  
MPO : Aire préoptique médiane  
ATP : Adénosine triphosphate  
TNF : Facteur de nécrose tumoral  
IL : Interleukine  
IFN : Interféron  
PG : Prostaglandine  
GH : Hormone de croissance  
GHRH : Hormone de libération de l'hormone de croissance  
IGF : Facteur de croissance analogue à l'insuline  
TGF : Facteur de croissance transformant  
CXCL : Chimioquinas C-X-C  
VEGF : Facteur de croissance vasculaire endothélial  
SCN : Noyau suprachiasmatique  
DAMP : Motifs moléculaires associés aux dommages cellulaires  
PAMP : Motifs moléculaires associés aux pathogènes  
LCS : Liquide cérébro-spinal  
PVT : Tache de vigilance psychomotrice  
A1R : Récepteur à l'adénosine de type 1  
MEC : Matrice extracellulaire  
BMAL1 : *Brain and muscle ARNT-like 1*  
CTL : Contrôle  
BUP : Buprénorphine  
BLS : Blessure  
TTS : Temps total de sommeil  
RMS : Moyenne quadratique  
CTX : Cardiotoxine  
TA : *Tibialis Anterior*  
GC : *Gastrocnemius*  
HPS : Hémalun-phloxine-safran  
AOL : Activité en onde lentes  
RS : Signal brut  
AS : Autocorrélation  
FFT : Transformée de Fourier rapide  
DPS : Densité de puissance spectrale  
CSA : Aire de section transversale  
WGA : Agglutinine de germe de blé





**« Qui fuit le sommeil court à la mort ».**

Jean-Jacques Rousseau (1712 – 1778)



# REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

---

## **PARTIE 1 – Le sommeil : généralités**

### **1.1 – L'étude du sommeil**

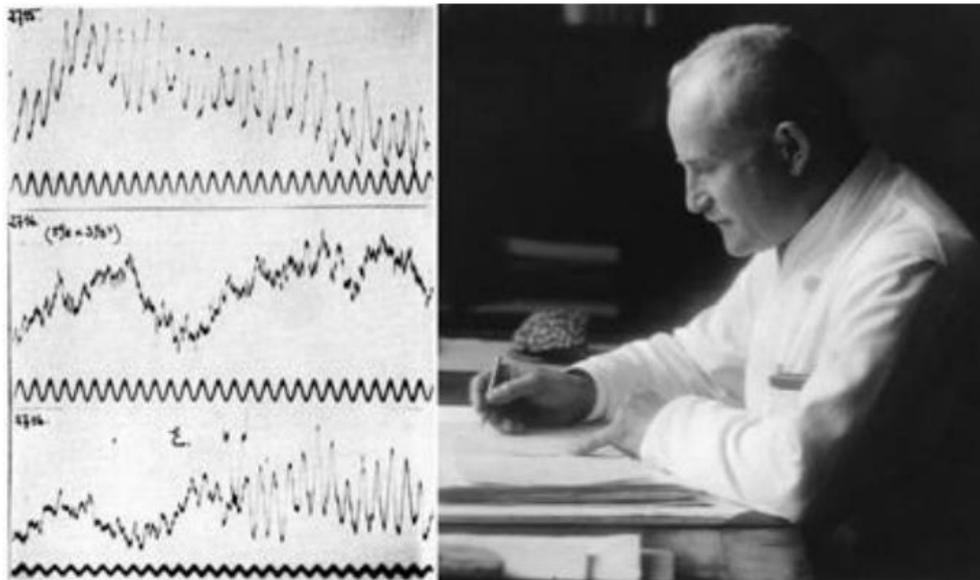
#### **1.1.1. Définition et histoire du sommeil**

Le sommeil est un état physiologique aussi mystérieux qu'indispensable à la vie de la grande majorité des êtres vivants. Il est caractérisé par une perte de la conscience, une réactivité aux stimuli extérieurs amoindrie et une immobilité associée à un déclin du tonus musculaire. Chaque être humain est un expérimentateur averti de cette manifestation physiologique quotidienne. Malgré tout, cette « petite mort » reste un phénomène très particulier et soulève encore aujourd'hui d'importantes questions non élucidées.

Dès l'antiquité, le sommeil suscite beaucoup d'intérêt et est sujet à de multiples interprétations chez de nombreux philosophes. Vers 450 av. J.-C., un médecin grec du nom d'Alcmaemon définit le sommeil comme étant une période de perte de conscience qui pouvait être expliquée par le manque de circulation sanguine vers le cerveau en raison du drainage du sang à la surface du corps. De même, vers 400 av. J.-C., la baisse de la température de surface d'une personne était suspectée d'être la cause du sommeil. Une cinquantaine d'années plus tard, du fait de la diminution du rythme cardiaque lors du sommeil, Aristote a supposé que le sommeil serait dû à un arrêt de la conscience dans le cœur, considéré comme le siège des sens et de la sensibilité. Les premières contre-mesures pour favoriser l'endormissement sont apparues avec le médecin grec Asclépiade de Bithynie, un siècle av. J.-C., qui suspendait le lit de ses patients pour créer un balancier doux et lent. C'est finalement en 162 apr. J.-C. que le médecin Claudius Galien, par ses travaux d'observation et de description de l'anatomie du système nerveux, place le cerveau au centre de nombreux processus psychophysiologiques (dont la conscience) et par conséquent le lieu privilégié pour être impliqué dans l'induction du sommeil. À la suite de cette période de prospérité grecque, l'avènement de la religion chrétienne et de ses considérations contraignent les expérimentations scientifiques et peu de progrès ont été réalisés dans la compréhension et la nature du sommeil.

### 1.1.2. La découverte de l'électroencéphalographie

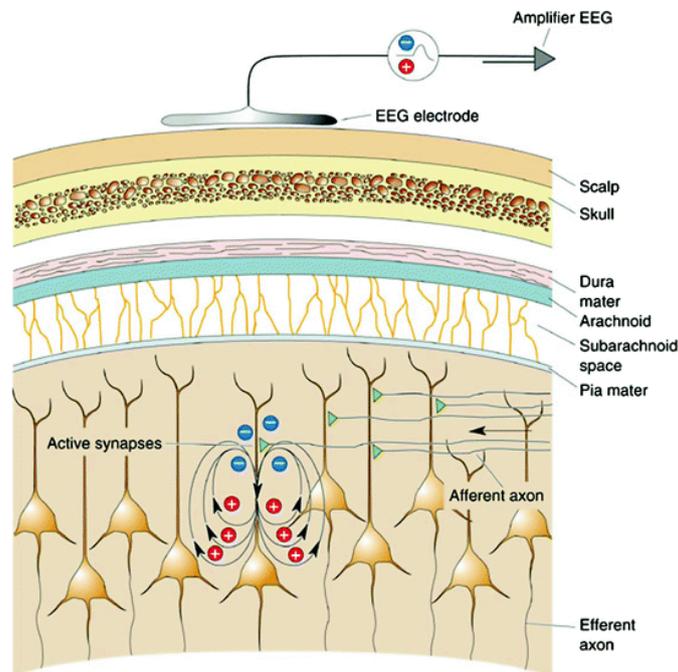
À la fin du 19<sup>e</sup> siècle, le médecin britannique Richard Caton (1842-1926) a enregistré pour la première fois les fluctuations de l'activité électrique du cerveau à l'aide d'un galvanomètre. Cette découverte des propriétés électriques du cerveau a servi de base à l'invention de l'électroencéphalographie (EEG), avec laquelle l'étude et la compréhension du sommeil vont prendre un nouvel essor. Le neurologue allemand Hans Berger, considéré comme le père de l'EEG, effectue, le 6 juillet 1924, le premier enregistrement électroencéphalographique chez l'Homme (Figure 1).



**Figure 1 : Hans Berger (1873 – 1941) en 1927 retranscrivant l'électroencéphalogramme de sa fille (Ilse).** Les signaux supérieurs ont été enregistrés pendant une période de repos, ceux du milieu pendant une période de calcul mental et les signaux inférieurs lors de la délivrance de la réponse au calcul mental. (Zayachkivska & Coenen, 2016)

D'un point de vue technique, l'EEG consiste à poser des électrodes directement sur le crâne de sujets humains (ou animaux) puis à enregistrer la différence de potentiel électrique (qui est amplifiée) avec l'électrode de référence. Nous savons aujourd'hui que ces signaux électriques sont la somme de l'ensemble des courants électriques (potentiels post-synaptiques excitateurs et inhibiteurs) des neurones situés sous l'électrode (principalement les cellules pyramidales du cortex ; Figure 2). Du fait de la conductivité volumique, il est difficile de déterminer quels sont les neurones qui participent ou non au signal enregistré en EEG. Toute l'activité électrique générée autour de l'électrode participe au développement du potentiel électrique. De fait, l'EEG présente une faible précision spatiale et ne permet pas une étude fonctionnelle précise des réseaux de neurones. En revanche, l'EEG est capable

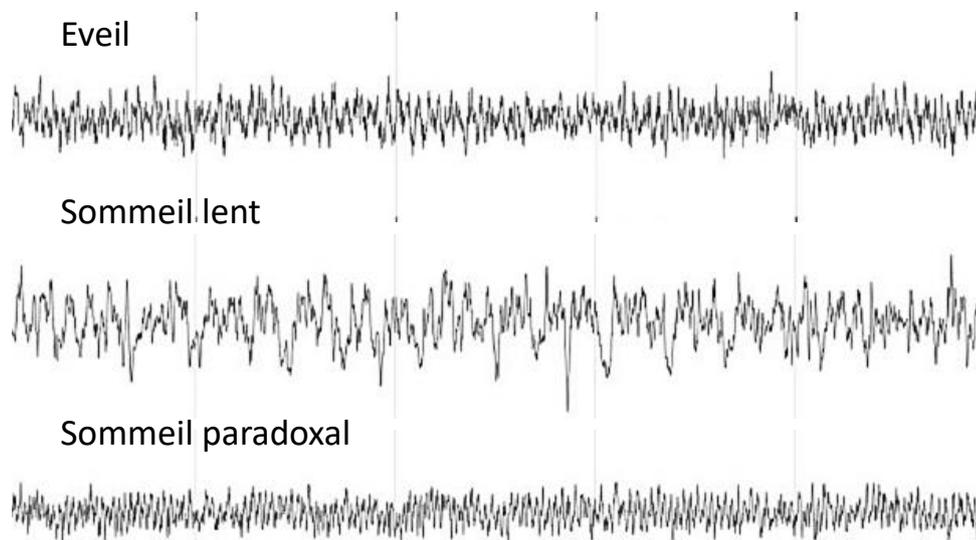
d'enregistrer des variations de potentiel électrique à l'échelle de la milliseconde et, à l'inverse de la précision spatiale, la précision temporelle de l'EEG est très élevée. L'emplacement de l'électrode détermine la région cérébrale qui participe majoritairement à la genèse du signal enregistré. Dans un souci de reproductibilité, l'adoption d'un système général de positionnement des électrodes permet de comparer les résultats obtenus à travers différentes études. C'est le système 10-20 qui est principalement utilisé, ce système est basé sur la relation entre l'emplacement d'une électrode et la zone sous-jacente du cortex cérébral. Les "10" et "20" font référence au fait que les distances réelles entre les électrodes adjacentes représentent 10% ou 20% de la distance totale entre l'avant (nasion) et l'arrière (inion) du crâne ou entre la droite et la gauche.



**Figure 2 : Schéma de l'enregistrement de l'activité neuronale par une électrode d'électroencéphalographie.** L'électrode est posée sur le crâne, en contact direct avec la peau. Elle est séparée des neurones par différentes couches, la peau (épiderme, derme et hypoderme), l'os, la dure-mère, l'arachnoïde, l'espace subarachnoïdien et la pie-mère. Elle enregistre l'ensemble des potentiels post-synaptiques excitateurs et inhibiteurs des neurones à sa portée et le signal enregistré est amplifié avant d'être retranscrit analogiquement ou numériquement (Bear et al., 2016)

Le premier enregistrement EEG pendant le sommeil a été réalisé en 1935 par Alfred Loomis qui décrit pour la première fois les ondes lentes du sommeil, mais également la présence d'ondes plus rapides surimposées à ces ondes lentes et qui surviennent de manière ponctuelle (Loomis et al., 1935a, 1935b). Ces rythmes cérébraux singuliers vont être classifiés en stades de sommeil par le médecin français Michel Jouvet en 1961 qui identifie les deux grands stades de sommeil : le sommeil lent et le sommeil paradoxal (Figure 3). Au cours de l'éveil, l'activité

des neurones corticaux est intense et ils déchargent la plupart du temps de manière asynchrone, générant à la fois des courants positifs et négatifs. La somme de ces signaux correspond donc à un signal peu ample et très variable, qui est qualifié de « gras » lors de la lecture visuelle d'un EEG d'éveil. Lors du passage de l'éveil au sommeil lent, nous observons à la fois un ralentissement de l'activité neuronale et une synchronisation progressive de la décharge neuronale. Ce qui se caractérise par une augmentation progressive de l'amplitude du signal EEG au cours des différents stades de sommeil, pour atteindre une synchronisation maximale lors du sommeil lent profond chez l'homme. En revanche, le sommeil paradoxal est associé à une activité cérébrale proche de l'éveil (mais avec une signature électrophysiologique bien particulière) et à l'absence totale de mouvement.



**Figure 3 : Exemple de signaux EEG enregistrés pendant l'éveil, le sommeil lent et le sommeil paradoxal.** (Adapté de Yamabe et al., 2019)

**Les bandes de fréquences caractéristiques de l'EEG.** Il est possible d'extraire les fréquences des oscillations enregistrées en EEG, notamment grâce à l'utilisation de la transformée de Fourier (voir partie *microstructure du sommeil*). Dès son utilisation dans les années 1950, les scientifiques vont décrire et identifier différents rythmes caractéristiques oscillant dans des gammes de fréquences spécifiques et utilisées pour comparer des signaux EEG dans différents contextes physiologiques ou pathologiques. Les premières gammes de fréquences à être définies sont celles correspondantes aux rythmes **alpha** (oscillations entre 8 et 12 Hz) et **bêta** (oscillations entre 12,5 et 30 Hz) par Hans Berger en 1929 (Berger, 1929). Les ondes lentes spécifiques du sommeil profond, ou rythmes **delta** (entre 0,5 et 4 Hz) ont été décrits une année plus tard par le neurophysiologiste William Grey Walter (1910-1977 ; Walter, 1954). Les

oscillations de 4 à 8 Hz, nommées rythme **thêta**, ont été décrites quant à elles pour la première fois en 1938 au niveau de l'hippocampe du lapin (Jung & Kornmüller, 1938). Enfin, les oscillations très rapides dans la gamme de fréquence comprise entre 30 et 140 Hz, ou rythme **gamma**, ont été décrites pour la première fois au niveau du cortex visuel de singes éveillés en 1964 (Hughes, 1964).

Ainsi, l'enregistrement EEG permet de discriminer précisément l'éveil du sommeil à partir de l'activité des réseaux neuronaux qui est caractéristique de l'état de vigilance. Néanmoins, la faible précision spatiale de l'EEG ne permet pas de discriminer les réseaux neuronaux entre eux et d'étudier leur fonctionnalité propre. De plus, l'utilisation d'électrodes peut être dérangeante dans certaines conditions et peut éventuellement être à l'origine de perturbations du sommeil. D'autres méthodes d'étude du sommeil existent et présentent des avantages et des inconvénients. Le choix de la méthode d'étude dépend des moyens à disposition, du modèle d'étude et de l'objectif scientifique.

### **1.1.3. Autres méthodes d'étude du sommeil**

**L'imagerie par résonance magnétique (IRM).** Le principe de l'IRM est fondé sur les propriétés magnétiques de l'hydrogène. En réponse à une forte activité neuronale, les vaisseaux sanguins augmentent leur taux d'oxygénation (c'est la « réponse hémodynamique ») augmentant de manière concomitante la quantité locale de protons, ce qui induit une signature visible en IRM et qui est appelé l'effet BOLD (« Blood-oxygen-level dependant »). L'IRM fonctionnelle permet donc d'évaluer indirectement l'activité neuronale, et elle présente une résolution spatiale de 1-2 mm, beaucoup plus précise que l'EEG, ce qui rend possible la discrimination fonctionnelle entre des régions cérébrales assez proches. En revanche, le temps d'acquisition nécessaire à la mise en place de l'ensemble des étapes de l'IRM fonctionnelle ainsi que le délai physiologique entre l'activité neuronale et la réponse hémodynamique rendent la précision temporelle de l'IRM très faible. De plus, obtenir des données IRM du cerveau de sujets en train de dormir n'est pas chose aisée, le matériel d'enregistrement fait beaucoup de bruit et l'environnement nécessaire à l'enregistrement de signaux IRM n'est pas compatible avec la détente associée au sommeil. Malgré tout, certaines études ont réussi à enregistrer ces données IRM pendant le sommeil et cela permet de mettre en évidence des phénomènes inaccessibles avec l'EEG. Une étude a notamment montré que l'IRM fonctionnelle permettait d'évaluer quelles régions cérébrales « s'endormaient » les premières, avec une signature

associée au sommeil visible dans un premier temps au niveau thalamique, puis au niveau du cortex occipital et au niveau frontal (Song et al., 2022).

**La magnétoencéphalographie (MEG).** Assez proche de l'EEG, la MEG permet d'enregistrer les champs magnétiques induits par les courants électriques générés par l'activité neuronale. L'avantage de mesurer les champs électriques plutôt que les variations de potentiels électriques directement avec une électrode comme pour l'EEG permet d'identifier très précisément l'origine de l'émission du champ magnétique et confère à la MEG une résolution spatiale bien meilleure que l'EEG (de l'ordre du millimètre). Malheureusement, comme pour l'IRM, cette technologie reste très coûteuse et le système d'enregistrement est bruyant et volumineux, ce qui est incompatible avec la plupart des études sur le sommeil. Toutefois, une étude publiée en 2014 a réussi à enregistrer simultanément des fuseaux du sommeil (voir microstructure *du sommeil*) en EEG et en MEG et a permis d'étudier la dynamique de la connectivité des réseaux pendant les fuseaux du sommeil (Zerouali et al., 2014).

**Les analyses du mouvement.** Une des caractéristiques ancestrales du sommeil reste l'immobilité. Il semble donc possible d'utiliser l'absence de mouvement comme marqueur d'une période de sommeil. Malheureusement, chez l'Homme l'absence de mouvement n'est pas toujours associée au sommeil et les analyses vidéo ainsi que l'utilisation d'accéléromètres qui permettent d'évaluer la quantité de mouvement sont des méthodes complémentaires qui peuvent donner une première estimation du temps total de sommeil, mais ne permettent pas une étude détaillée du sommeil. En revanche, chez l'animal et notamment chez les rongeurs, l'absence de mouvement est très souvent associée au sommeil (Sourieux et al., 2018; Zeng et al., 2012). L'utilisation de méthodes qui permettent d'enregistrer chaque mouvement de l'animal peut permettre de discriminer l'éveil du sommeil. Une de ces méthodes consiste en l'utilisation de tapis rempli de capteurs piézo-électriques placés sous la cage de l'animal (Mang et al., 2014). Ces capteurs vont générer un signal électrique proportionnel à toute déformation physique qu'ils vont recevoir et cela permet d'identifier chaque mouvement effectué par l'animal dans sa cage, jusqu'aux mouvements respiratoires de l'animal endormi. Une étude menée sur la souris a montré que ce système permettait de correctement évaluer le temps de sommeil par heure ainsi que les paramètres associés à la qualité du sommeil (Mang et al., 2014).

**L'électrocardiogramme (ECG), la fréquence respiratoire et la saturation en oxygène.** Le sommeil est également associé à une diminution de la fréquence cardiaque du fait d'une activation majoritaire du système parasympathique (Snyder et al., 1965). Ainsi, un suivi journalier de la fréquence cardiaque par ECG d'un individu pourrait permettre de discriminer les périodes d'activités des périodes de sommeil. Toutefois, de nombreux paramètres peuvent influencer la fréquence cardiaque lors de l'éveil et du sommeil (la température, l'activité de la journée, l'alimentation, l'alcool, le tabac, la caféine, l'apnée du sommeil ou encore le stress) et la discrimination entre l'éveil calme et le sommeil léger n'est parfois pas évidente (Amaral et al., 2001). De plus, la diminution de la fréquence cardiaque est plus marquée en sommeil profond alors que le sommeil paradoxal est associé à des périodes d'activité cardiaque plus intense (Boudreau et al., 2013). Associé à cette diminution de la fréquence cardiaque, le rythme respiratoire diminue également pendant le sommeil, il devient de plus en plus lent et régulier jusqu'au sommeil profond puis redevient plus variable en sommeil paradoxal (Snyder et al., 1965; Sowho et al., 2014). Cette diminution du rythme respiratoire induit une diminution de la saturation en oxygène qu'il est également possible de mesurer en continu et l'enregistrement de la fréquence respiratoire ainsi que de la saturation en oxygène sert de base à l'identification des pathologies respiratoires liées au sommeil comme l'apnée du sommeil. L'utilisation de ces différentes méthodes dans l'évaluation du temps total de sommeil et du temps passé dans chaque stade de sommeil est aujourd'hui popularisée dans de nombreux outils connectés de suivi de la santé et du sommeil (bracelets, montres, anneaux ...). Les résultats sont très corrects pour l'évaluation du temps total de sommeil (>90% de performances en comparaison avec de l'EEG (Altini & Kinnunen, 2021; Chen et al., 2013; Natale et al., 2012), mais restent moins précis pour l'identification des stades de sommeil avec des performances globales entre 60 et 80% (Altini & Kinnunen, 2021).

La méthode choisie pour l'étude du sommeil dépend de l'objectif scientifique. L'utilisation d'outils connectés qui enregistrent la fréquence cardiaque, la fréquence respiratoire ou la saturation en oxygène peut se révéler très pratique chez l'Homme étant donné leur facilité d'utilisation et permet une bonne estimation du temps total de sommeil. L'analyse du mouvement est une alternative intéressante chez le rongeur, elle permet d'identifier les périodes d'éveil et de sommeil de manière non invasive, mais n'est pas compatible avec une étude détaillée de la structure du sommeil. Si l'objectif est l'étude des mécanismes neuronaux

du sommeil, cela requiert toujours un enregistrement de l'activité neuronale. L'IRM et la MEG présentent une précision spatiale bien meilleure que l'EEG, et permettent l'étude fonctionnelle des réseaux neuronaux, mais leur utilisation dans le cadre d'étude sur le sommeil reste compliquée. L'EEG présente une bien meilleure comptabilité avec les études sur le sommeil, ce qui en fait la méthode de référence pour l'étude du sommeil.

Afin de décrypter les mécanismes du sommeil, il est nécessaire de moduler l'activité des réseaux neuronaux impliqués dans la régulation du sommeil. Cela requiert l'utilisation de méthodes invasives comme la pose d'électrodes de stimulation, l'utilisation de l'optogénétique ou encore la manipulation génétique pour modifier l'expression de molécules impliquées dans la régulation du sommeil. Ces explorations fonctionnelles sont rendues possibles par l'utilisation de modèles animaux, et c'est l'utilisation de ces modèles qui sont à l'origine de la majorité des découvertes qui ont été faites sur le sommeil et ses mécanismes.

#### **1.1.4. L'utilisation des modèles animaux pour l'étude du sommeil**

L'état caractérisant le sommeil a été observé chez l'ensemble des mammifères, des oiseaux, des reptiles, des amphibiens, et chez quelques poissons (Kelly et al., 2020; Libourel & Herrel, 2016; Rattenborg, 2006). Des chercheurs ont caractérisé des formes de sommeil chez les insectes (Hartse, 2010) et chez des organismes plus « simples » comme les nématodes (Raizen et al., 2008). Le sommeil est un état physiologique apparu il y a très longtemps dans l'évolution et de fait, si l'organisation du sommeil présente des différences entre les mammifères, la structure générale du sommeil reste similaire (Allison & Cicchetti, 1976; Elgar et al., 1988). Les modèles animaux utilisés pour l'étude du sommeil dans le but d'applications chez l'Homme sont nombreux (chiens, chats, lapins, singes). À titre d'exemple, les mouvements oculaires associés au sommeil paradoxal ont été décrits pour la première fois en 1953 chez l'enfant pendant la sieste (Aserinsky & Kleitman, 1953). Mais c'est en 1959 qu'un médecin français, Michel Jouvet, découvre chez le chat que cet état dépend du tronc cérébral inférieur. Il démontre également que ces périodes de sommeil sont à la fois caractérisées par une atonie musculaire et par une activité cérébrale proche de l'éveil, et lui donne ainsi le nom de sommeil paradoxal (Jouvet & Michel, 1959). De nos jours, la prépondérance des moyens techniques disponibles chez les rongeurs favorise l'utilisation de ces modèles animaux (souris/rats). La proximité relative de ces modèles avec l'Homme et la facilité d'utilisation combinée aux

nombreuses possibilités techniques (chimiques et génétiques) confèrent de nombreux avantages à ces modèles animaux (Shanks et al., 2009; Vandamme, 2014; Wall & Shani, 2008; Yartsev, 2017). Des décennies de recherche sur le sommeil des rongeurs ont permis de maîtriser un grand nombre de paramètres du sommeil de ces animaux et en font d'excellents modèles pour étudier et moduler l'architecture du sommeil.

## 1.2 - La structure du sommeil des rongeurs

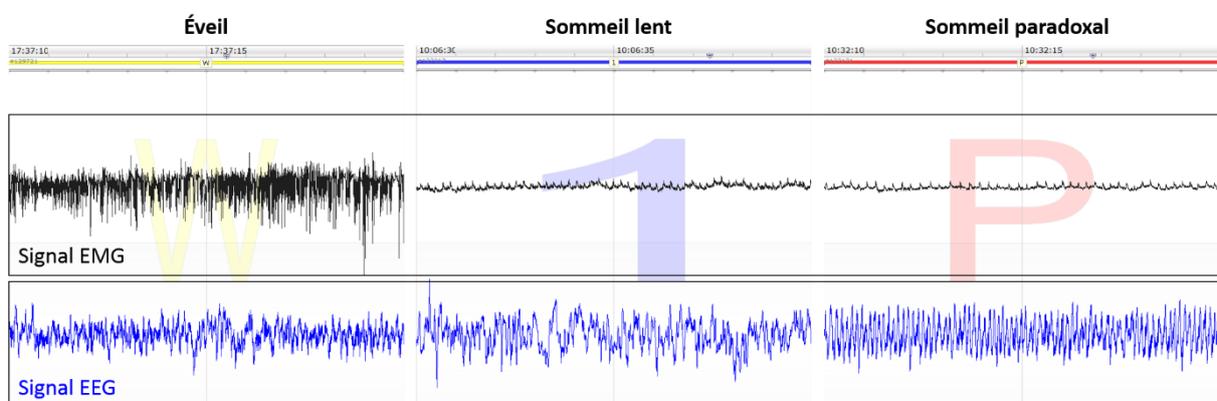
### 1.2.1. La macrostructure du sommeil

Chez les rongeurs, l'enregistrement de l'EEG est, comme chez l'Homme, couplé à un enregistrement de l'activité musculaire : un électromyogramme (EMG), pour aider à la discrimination des stades de sommeil. À l'inverse de l'Homme qui a un sommeil « monophasique », les rongeurs sont des animaux « polyphasiques ». Cela signifie que leur cycle de veille et de sommeil n'est pas constitué de deux grandes périodes bien identifiées, mais de l'alternance de plusieurs périodes de courtes durées. De plus, leur période préférentielle de sommeil est la période lumineuse, ils y dorment en moyenne 70-80% du temps (Franken et al., 1995; Vyazovskiy et al., 2007), ce qui en fait des animaux dits « nocturnes » (à l'inverse de l'Homme qui est un animal « diurne », qui dort la nuit). Ils dorment également entre 20 et 40% pendant leur période préférentielle d'activité, la période d'obscurité. Nous distinguons seulement deux stades de sommeil chez les rongeurs, le sommeil lent, appelé « NREM sleep » (qui regroupe les stades N1, N2 et N3 chez l'Homme) et le sommeil paradoxal appelé « REM sleep ». (Figure 4). Certaines études différencient des stades de sommeil lent également chez le rongeur (Katsageorgiou et al., 2018; Lacroix et al., 2018), mais l'identification de ces stades reste débattue au sein de la communauté scientifique.



**Figure 4 : Hypnogramme représentant l'alternance entre éveil, sommeil lent et sommeil paradoxal au cours de 24h chez le rat.** La période lumineuse est la période préférentielle de sommeil chez le rat, alors que la période d'obscurité est la période préférentielle d'activité. (Adler et al., 2014)

Le sommeil lent chez les rongeurs est caractérisé par la même signature électrophysiologique que le sommeil lent chez l'Homme, avec une réduction progressive de la fréquence enregistrée en EEG jusqu'à une prédominance des ondes lentes de la bande de fréquence delta (0,5-4Hz) associée à une augmentation de l'amplitude du signal EEG. Le sommeil paradoxal présente également les mêmes caractéristiques que le sommeil paradoxal chez l'Homme, avec une forte activité dans la bande de fréquence thêta de l'EEG associé à une atonie musculaire complète. L'éveil est quant à lui caractérisé par un signal EEG de faible amplitude associé à la présence de fréquences rapides (alpha et beta) ainsi qu'une activité musculaire importante (Figure 5).



**Figure 5 : Exemples de signaux EEG/EMG correspondants à l'éveil, au sommeil lent et au sommeil paradoxal chez le rat.** Enregistrements EEG (en noir) et EMG (en bleu) réalisés avec un émetteur de télémétrie chez le rat. La définition du stade correspondant est effectuée par une lecture visuelle en fonction du signal EMG et du signal EEG. (Enregistrements télémétriques réalisés avec des implants HD-X02 et visualisés avec le logiciel Neuroscore)

En pratique, que ce soit chez l'Homme ou chez le rongeur, l'analyse de la structure du sommeil se fait en découpant l'enregistrement EEG/EMG en sous-période de 4, 10, 30 ou 60 secondes selon la précision recherchée, qui dépend de la question scientifique posée. Chaque sous-période est associée à un état de vigilance en fonction des signaux EEG/EMG. La détermination de l'état de vigilance pour chaque sous-période est classiquement réalisée par une lecture visuelle faite par un expert du sommeil, mais il existe également des outils de lecture semi-automatique ou automatique (Supratak et al., 2017 ; Koupparis et al., 2014). À partir de ces annotations, il est possible de calculer un ensemble de paramètres qui nous renseignent sur la structure globale du sommeil, qui est appelé la « macrostructure » du sommeil : la durée totale de sommeil, le temps passé dans chaque stade de sommeil et la stabilité du sommeil (qui dépend de la durée moyenne de chaque période de sommeil). Chez l'Homme nous

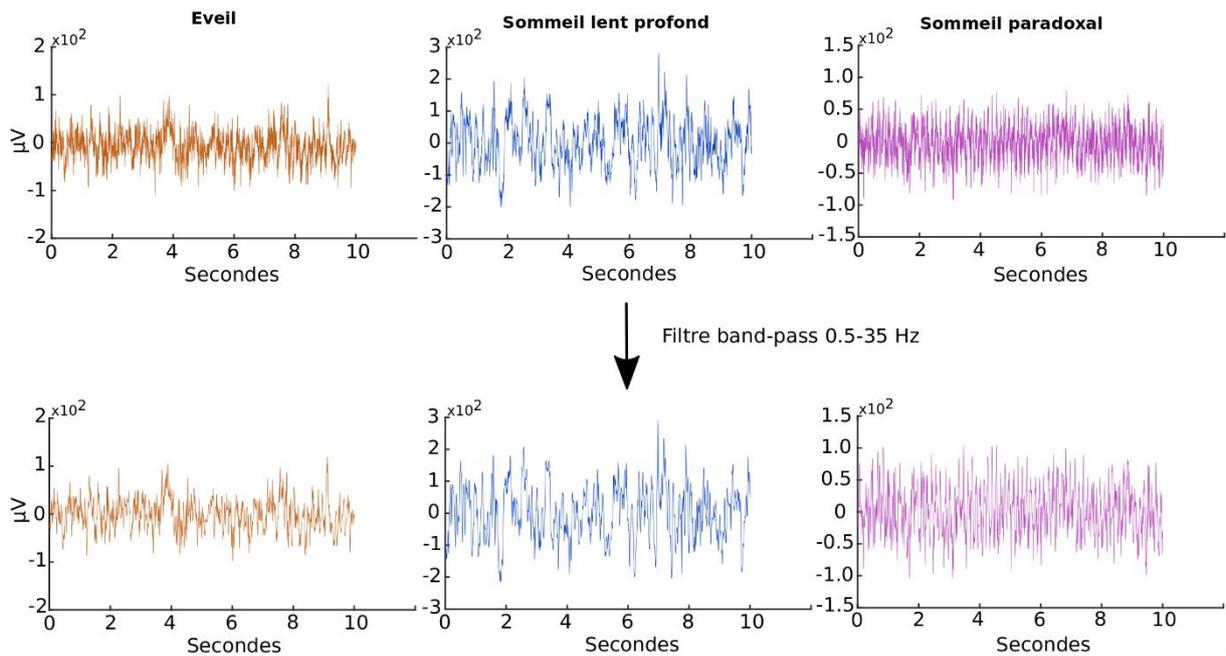
pouvons calculer d'autres paramètres comme la latence d'endormissement ou l'efficacité du sommeil (temps de sommeil / temps passé au lit), mais ce n'est pas le cas chez le rongeur.

Nous pouvons également nous intéresser dans le détail aux signaux EEG contenus dans chaque sous-période annotée. Ce qui est appelé la « microstructure » du sommeil. Ces analyses s'articulent autour de deux types d'approches. La première consiste à réaliser une analyse spectrale approfondie des signaux EEG, la seconde consiste à identifier des événements caractéristiques du signal EEG qui ont lieu pendant le sommeil.

### **1.2.2. La microstructure du sommeil**

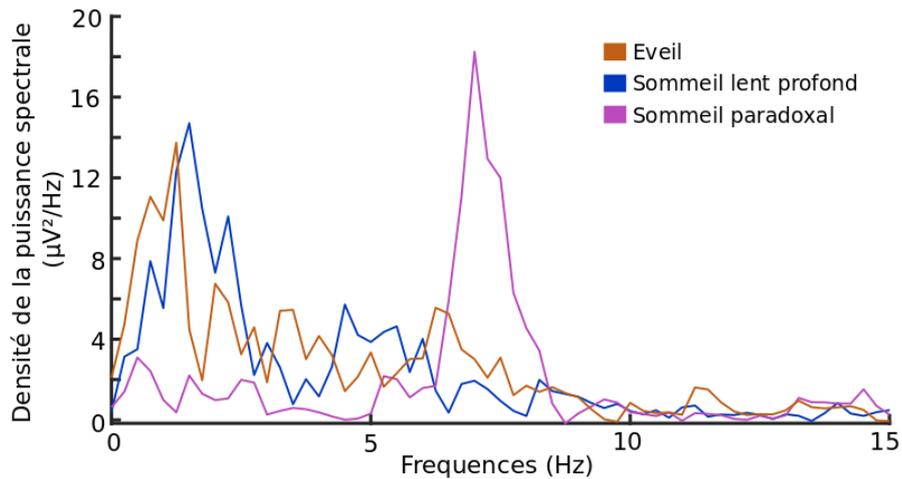
**L'analyse spectrale approfondie.** L'analyse spectrale du sommeil correspond à l'analyse du contenu fréquentiel du signal EEG et sert de référence pour l'identification et la classification des stades de sommeil. La détermination de la puissance des bandes de fréquences caractéristiques (delta, thêta, alpha, bêta et gamma) correspondante à chaque sous-période permet d'aider la lecture visuelle pour déterminer l'état de vigilance et sert de base aux méthodes de classification automatique, mais peut être approfondie. Si deux périodes de sommeil lent sont caractérisées par la présence d'ondes delta, l'identification précise de la fréquence des ondes delta et de leur puissance, peut par exemple, permettre de mettre en évidence des différences entre deux périodes de sommeil lent.

La première étape lors du traitement du signal consiste à filtrer le signal pour éliminer toute forme de bruits potentiels. Il existe de nombreuses méthodes (et types de filtres) différentes et la sélection de la meilleure méthode dépend de l'enregistrement EEG et de la question scientifique à laquelle nous essayons de répondre. La fréquence des courants électriques qui alimentent l'ensemble des appareils est de 50 Hz en Europe, et comme nous ne portons pas d'intérêt aux hautes fréquences au cours de ce travail de thèse, nous avons choisi d'utiliser un filtre de type « band-pass » entre 0,5 et 35 Hz, qui ne va conserver que les fréquences à l'intérieur de l'intervalle choisi (Figure 6).



**Figure 6 : Exemple de l'application d'un filtre *band-pass* sur des signaux EEG.** Signaux EEG d'un enregistrement effectué chez l'animal avant et après l'application d'un filtre *band-pass* sur des périodes de 10 secondes d'éveil, de sommeil lent profond et de sommeil paradoxal. (Signaux enregistrés avec un implant télémétrique chez le rat)

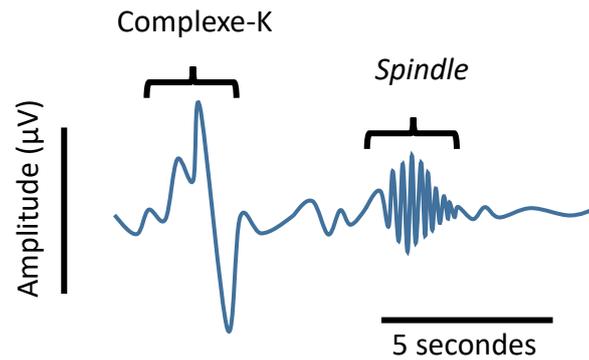
Ensuite, il existe différentes méthodes pour analyser le contenu fréquentiel d'une période d'éveil ou de sommeil. La méthode la plus utilisée consiste à utiliser la transformation de Fourier, qui permet de décrire le spectre fréquentiel d'un intervalle de temps donné, c'est-à-dire d'extraire toutes les fréquences qui composent le signal. L'utilisation de la transformée de Fourier nous permet ainsi d'obtenir toutes les fréquences contenues dans notre signal d'origine et de leur associer une puissance qui représente la quantité de signaux qui oscillent à cette fréquence dans notre signal d'origine. En appliquant la transformée de Fourier sur les signaux de la figure 6, on obtient une densité de spectre de puissance ou chaque fréquence contenue dans notre signal initial est associée à une puissance (Figure 7). Nous pouvons voir, par exemple, le pic de puissance correspondant à la bande de fréquence thêta pour le sommeil paradoxal (4-8 Hz) et un pic de puissance correspondant à la bande de fréquence delta pour le sommeil lent profond (0,5-4 Hz) ce qui est caractéristique de ces états de vigilance (Figure 7).



**Figure 7 : Densité de spectre de puissance d'une sous-période d'éveil, de sommeil lent profond et de sommeil paradoxal.** Toutes les fréquences entre 0 et 15 Hz (avec un pas de 0,25 Hz, échelle des abscisses) sont associées à leur puissance (échelle des ordonnées) après application de la transformation de Fourier sur les signaux illustrés dans la figure 6.

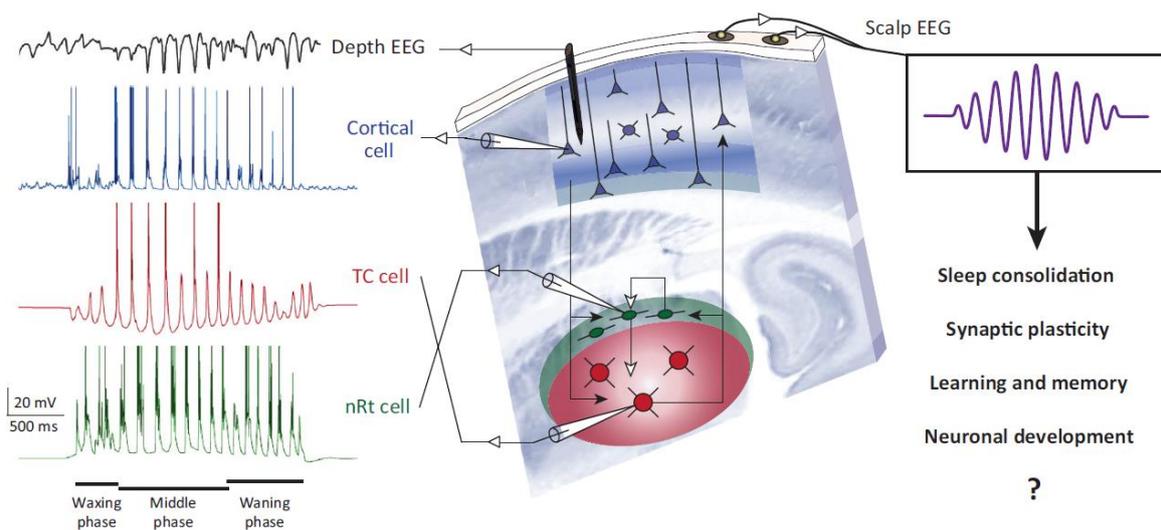
Ainsi, en appliquant la transformée de Fourier sur des périodes de sommeil lent, de sommeil paradoxal ou d'éveil, il est possible de calculer pour chaque bande de fréquences (delta, thêta, alpha et bêta) la fréquence moyenne, la puissance relative et absolue de chaque bande de fréquence, la fréquence maximale et sa puissance associée. L'une des utilisations les plus connues de cette analyse spectrale approfondie consiste à analyser la puissance relative de la bande de fréquence associée aux ondes lentes (delta : 0,5 – 4 Hz) par rapport aux autres bandes de fréquences pendant le sommeil lent profond, qui est appelé la « Slow-wave activity (SWA) » en anglais. Cette SWA est corrélée au « besoin » de sommeil (qui est appelé la pression homéostatique, voir partie *Régulation du sommeil*) et sert de marqueur pour évaluer quantitativement cette pression de sommeil qui s'accumule au cours de l'éveil (Franken et al., 1991; Schwierin et al., 1999).

**L'analyse des événements caractéristiques.** Lors du sommeil lent, surviennent sur l'EEG, des événements caractéristiques, les complexes K et les fuseaux de sommeil, ou « sleep spindles » en anglais (abrégiés en *spindles* dans le reste du document), identifiés pour la première fois par le chercheur américain Alfred Lee Lomis dans les années 1930 (Loomis et al., 1935b, 1938). Les complexes K sont des événements biphasiques spontanés de 0,5-1 secondes, de grande amplitude, qui ont lieu toutes les 60-100 secondes et qui précèdent de quelques secondes les *spindles* (Cash et al., 2009). Les *spindles* qui surviennent quelques secondes après ces complexes K sont des oscillations de 9 à 15 Hz qui durent de 0,5 à 3 secondes en moyenne (Figure 8).



**Figure 8 : Illustration d'un complexe-K suivi par un *spindle* sur un enregistrement EEG chez le rat lors du sommeil lent.** (Signaux adaptés provenant d'un enregistrement téléométrique chez le rat)

À la suite de leur découverte en 1935, les décennies suivantes sont marquées par la recherche des origines de la génération des *spindles* ainsi que de leur fonction. Des études pionnières conduites par le groupe de recherche du neurophysiologiste Mircea Steriade (1924-2006) ont posé les bases de l'idée que le noyau réticulaire du thalamus (NRT) est le générateur primordial des *spindles* (Figure 9). Ces études sont constituées d'enregistrements intracellulaires réalisés au niveau du NRT de chats anesthésiés (Steriade et al., 1985, 1987), ainsi que d'enregistrements réalisés sur des tranches de cerveau de furet et de rongeur (Steriade et al., 1993). Le déclenchement optogénétique des *spindles* par stimulation du NRT chez la souris ouvre maintenant la voie au contrôle de leur apparition spatio-temporelle afin de mieux comprendre leurs fonctions (Barthó et al., 2014; Halassa et al., 2011).



TRENDS in Neurosciences

**Figure 9 : Mécanisme de génération des *spindles* et fonctions associées.** Les cellules du NRT (en vert) exercent une inhibition rythmique sur les neurones thalamocorticaux (TC, en rouge) qui provoque un rebond d'activité glutamatergique. Ce rebond d'activité augmente la synchronisation des neurones TC en synchronisant l'inhibition des neurones du NRT ainsi que la décharge des neurones cortico-thalamiques (CT, en bleu). (Astori et al., 2013; Bonjean et al., 2011)

Les *spindles* sont générés par une première synchronisation intrathalamique due aux propriétés cellulaires des neurones GABAérgique composants le NRT. L'inhibition rythmique des neurones du NRT sur les neurones thalamocorticaux (TC) induit un rebond d'activité glutamatergique des neurones TC qui activent à leur tour les neurones du NRT et permet ainsi la genèse d'une boucle intrathalamique qui augmente la synchronisation des neurones TC. L'activation rythmique des neurones TC et leur décharge en bouffée va permettre la réponse synchrone des neurones cortico-thalamiques (CT) ce qui va encore augmenter la synchronisation et la cohérence spatiale de la décharge thalamique. Nous pouvons distinguer trois phases au niveau des *spindles*, une première phase de génération du *spindle* la « Waxing phase », pendant laquelle les inhibitions rythmiques des neurones du NRT ne sont pas suffisantes pour synchroniser suffisamment les décharges des neurones TC. Puis une phase médiane, la « middle phase » où cette fois les neurones TC se synchronisent et augmente le nombre de neurones impliqués en excitant de manière rythmique les neurones CT, mais aussi les neurones inhibiteurs du NRT. Enfin, la phase terminale, la « Waning phase » lors de laquelle la décharge des neurones TC et des neurones CT devient moins synchrone et l'amplitude de l'oscillation diminue progressivement. Cette phase terminale est en partie expliquée par la présence de canaux ioniques particuliers, des canaux dépolarisants régulés par le niveau de  $Ca^{2+}$  qui induisent une période réfractaire responsable de la désynchronisation des neurones TC. De plus, la désynchronisation progressive entre l'activation CT et l'inhibition du NRT sur les neurones TC pourra empêcher la de-inactivation des canaux T, nécessaire pour la génération de décharge en bouffée, et ainsi participer à la terminaison des *spindles*.

**Les fonctions des *spindles*.** Les *spindles* ont été initialement identifiés comme un filtre sensoriel pour protéger le sommeil (Fernandez & Lüthi, 2020). Une stimulation acoustique plus forte est nécessaire pour réveiller des sujets humains pendant des épisodes de sommeil lent contenant des *spindles* (Yamadori, 1971), et la variabilité naturelle du nombre de *spindles* spontanés pendant le sommeil chez l'Homme présente une corrélation positive avec la tolérance au bruit environnemental (Dang-Vu et al., 2010). Deux autres études utilisant des manipulations optogénétiques chez l'animal ont permis d'aller plus loin en montrant que l'augmentation du nombre de *spindles* pendant le sommeil lent a induit une augmentation de la durée du sommeil lent (Halassa et al., 2011; Kim et al., 2012).

Les *spindles* ont ensuite été impliqués dans la consolidation mnésique à long terme (Antony et al., 2019; Schönauer, 2018 ; voir partie 1.5.2. *La fonction d'homéostasie synaptique du sommeil*). Récemment, les *spindles* ont également été associés à la douleur. En effet, une étude publiée en 2020 observe que plus les animaux sont douloureux, plus le nombre de *spindles* pendant le sommeil lent est faible. De plus, l'augmentation du nombre de *spindles* par stimulation optogénétique (sans modifications de la durée ou de la fréquence des *spindles*) permet de réduire le niveau de douleur de ces animaux (Caravan et al., 2020).

### **1.3 - Les réseaux de la veille et du sommeil**

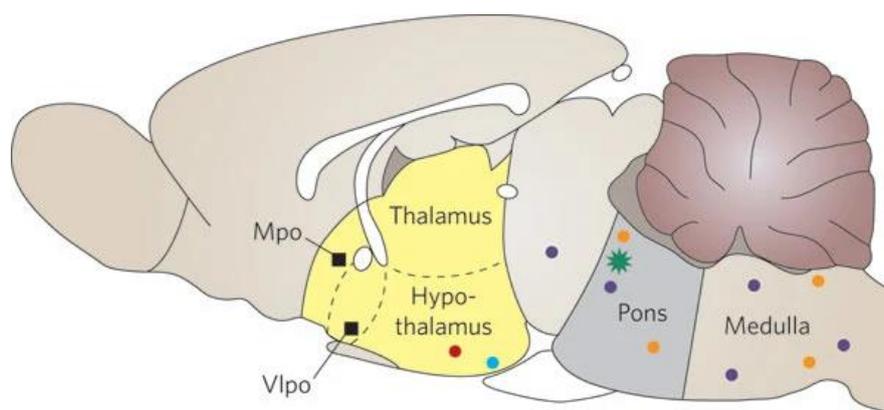
La transition de l'état d'éveil au sommeil induit des changements profonds sur la cognition, le contrôle moteur, l'activité cérébrale et la conscience et représente un enchevêtrement de réseaux finement régulés qui nécessite la participation de multiples acteurs cellulaires et moléculaires (McCormick et al., 2015; McGinley et al., 2015). La modification de la macro ou de la microstructure du sommeil est la conséquence d'une modification d'activité au niveau des réseaux neuronaux qui contrôlent l'état de veille et de sommeil. L'architecture générale de ces réseaux est partagée par l'ensemble des mammifères et est de fait, similaire entre l'Homme et le rat (Eban-rothschild et al., 2018; McGinley et al., 2015; Saper et al., 2010; Siegel, 2005).

La première grande découverte dans l'identification des régions impliquées dans la régulation de la veille et du sommeil a eu lieu en 1928 à Vienne par un neurologue viennois, Constantin Von Economo. Il étudia le cerveau de deux groupes de malades : un groupe dans le coma et un groupe qui ne dormaient pas. Chez les malades dans le coma, il découvrit une lésion au niveau de l'hypothalamus postérieur, région identifiée comme « Centre de l'éveil » (Jouvet, 2000). Chez les malades qui ne dormaient pas, il découvrit la présence d'une lésion au niveau de la partie antérieure de l'hypothalamus, il identifia cette région comme « Centre du sommeil ».

Nous connaissons aujourd'hui la structure et la composition des réseaux qui participent à l'induction et au maintien de l'éveil appelé le « Système réticulaire activateur ascendant » (Figure 10). Ce système est composé de deux noyaux situés en haut du pont constitué de neurones cholinergiques, le noyau tegmental latérodorsal et le noyau pédunculo-pontique qui se projettent au niveau du noyau réticulaire du thalamus. Et d'une seconde voie qui active

directement le cortex, incluant le noyau tubéromammillaire contenant des neurones histaminergiques, le noyau médian et dorsal du raphé contenant des neurones sérotoninergiques, le groupe de neurone A10 contenant de la dopamine et le locus coeruleus contenant des neurones noradrénergiques. Cette voie d'activation est également soutenue par des neurones peptidergique de l'hypothalamus latéral (LH) secrétant de l'orexine ou de la melanin-concentrating hormone et par des neurones du mésencéphale basal qui contiennent de l'acide gamma-aminobutyrique ou de l'acétylcholine (Saper et al., 2005).

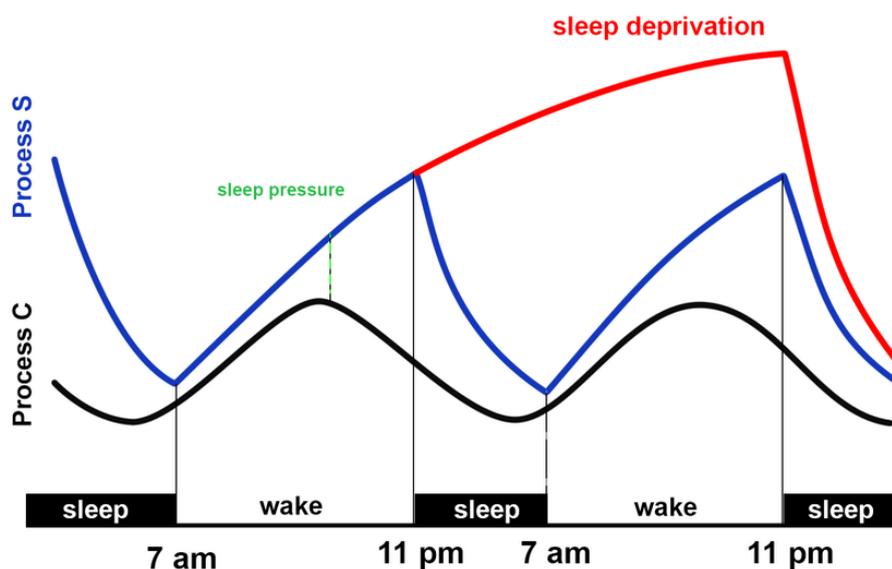
La seconde observation de Von Economo était qu'une lésion au niveau de l'hypothalamus antérieure était à l'inverse, associée à de l'insomnie. À la suite de plusieurs décennies de recherche, le noyau ventrolatéral (VLPO) de l'hypothalamus a été identifié comme étant particulièrement actif pendant le sommeil et projette des terminaisons nerveuses sur tous les groupes de neurones participant à l'éveil (Sherin et al., 1996). Les neurones du VLPO sont actifs pendant le sommeil et contiennent des neurotransmetteurs inhibiteurs, la galanine et le GABA (Gaus et al., 2002; Sherin et al., 1998; Szymusiak et al., 1998). Les neurones du VLPO jouent un rôle central dans l'induction et la maintenance du sommeil en inhibant les structures composant le système ascendant de l'éveil (Figure 10 ; Saper et al., 2005). La lésion spécifique du VLPO induit une diminution du temps de sommeil de plus de 50% (Lu et al., 2000, 2002) ce qui fait du VLPO une structure cruciale pour le sommeil, mais indique également que d'autres mécanismes peuvent être impliqués dans l'induction et le maintien du sommeil en réponse à une lésion du VLPO.



**Figure 10 : Représentation des régions cérébrales contenant les populations neuronales impliquées dans la régulation veille/sommeil sur une coupe sagittale de cerveau de rat.** Le système ascendant de l'éveil est composé de neurones sérotoninergiques (cercles violets), de neurones adrénérgiques ou noradrénérgiques (cercles orange), de neurones histaminergiques (cercle bleu) et de neurones orexinergiques (cercle rouge). Le VLPO et le MPO (carrés noirs) inhibent ces structures de l'éveil et participent à l'induction et la maintenance du sommeil (Siegel, 2005).

## 1.4 - La régulation du sommeil

Tout changement de la macro ou de la microstructure du sommeil est la conséquence d'une modification d'activité des réseaux de la veille et du sommeil. La régulation du sommeil est représentée par l'ensemble des phénomènes modulant l'activité de ces réseaux. Ces phénomènes de régulation du sommeil sont partagés en deux grands processus. Le premier représente la fatigue croissante qui est générée au cours de l'éveil, le second représente le fait que l'envie de dormir coïncide avec la nuit. Ces deux phénomènes ont été décrits et nommés en 1982 par le pharmacologue Alexander A. Borbély. La pression de sommeil qui s'accumule au cours de l'éveil est représentée par le **processus homéostatique** du sommeil, le **processus S**, alors que le fait de ressentir un besoin de sommeil plus important le soir est représenté par le **processus circadien** du sommeil, le **processus C** (Figure 11 ; Borbély, 1982).



**Figure 11 : Modèle de la régulation du sommeil à deux processus.** Le besoin de sommeil est sous la dépendance de deux procédés. Le processus circadien (processus C) qui présente une fluctuation quotidienne et qui est en rapport avec tous les autres rythmes circadiens (alimentation, rythmes sociaux, activité physique ...) est sous le contrôle du principal régulateur circadien, la lumière. Le processus homéostatique (processus S) représente le besoin de sommeil qui s'accumule au cours de l'éveil (Patanaik, 2015).

### 1.4.1. Le processus homéostatique

Le processus homéostatique (également appelé processus S) peut être représenté par la pression du sommeil qui s'accumule pendant l'éveil et s'intensifie au fur et à mesure que l'on reste éveillé (Borbély et al., 2016). Cette pression de sommeil est associée à une augmentation progressive de l'activité des ondes lentes lors du sommeil lent profond et cette mesure sert

de marqueur de la pression homéostatique du sommeil. L'augmentation progressive de cette pression de sommeil pendant l'éveil est en partie due à l'accumulation de certaines molécules produites pendant l'éveil qui sont directement impliquées dans la régulation du sommeil. Une de ces molécules est l'adénosine. L'adénosine est un produit de dégradation de l'ATP, qui est la molécule énergétique utilisée par l'ensemble des cellules de l'organisme. Ainsi, pendant l'éveil, l'importante activité neuronale va engendrer une accumulation de l'adénosine au niveau central. L'implication de l'adénosine dans la mise en place de la pression de sommeil a été dans un premier temps démontrée par l'utilisation d'agonistes de l'adénosine qui permettent de réduire le temps d'éveil et induisent un endormissement précoce (Buday et al., 1961; Feldberg & Sherwood, 1954; Haulica et al., 1973; Portas et al., 1997). D'autres études ont montré que le blocage de son action par des antagonistes, comme la caféine, induit une augmentation du temps d'éveil, augmente la latence d'endormissement et fragmente le sommeil (en fonction de l'heure et de la dose ; Erblang et al., 2019; Porkka-heiskanen & Kalinchuk, 2011).

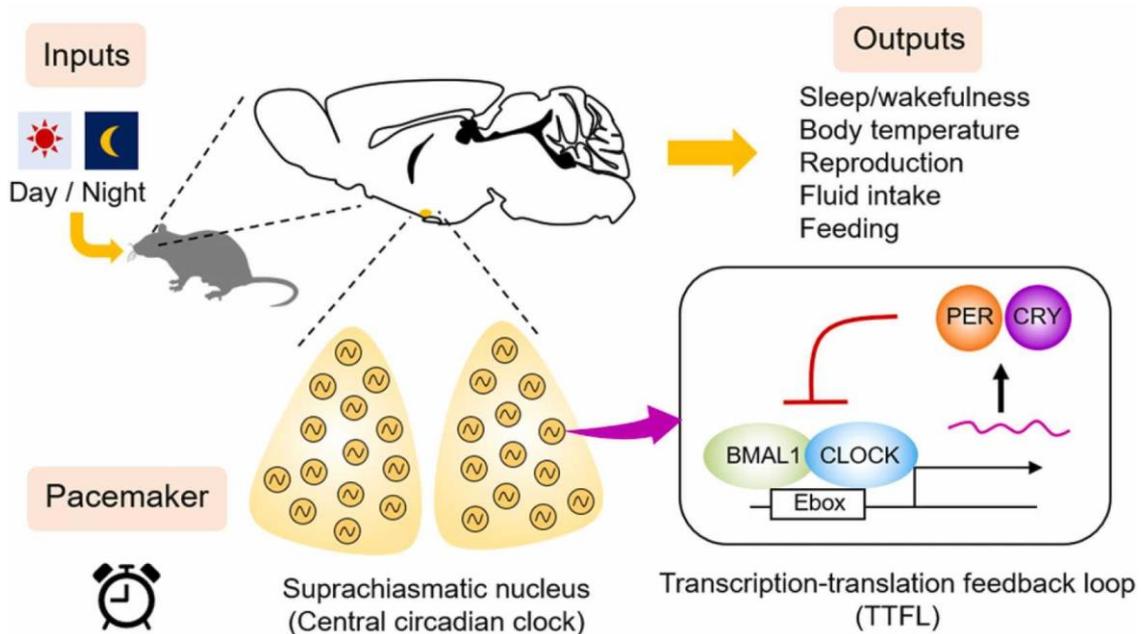
En complément de l'adénosine, les deux principaux médiateurs pro-inflammatoires, les cytokines facteur de nécrose tumorale (TNF)- $\alpha$  et l'interleukine (IL)-1 $\beta$ , participent également à la régulation homéostatique veille/sommeil (Clinton et al., 2011; Krueger, 2008) et ont été identifiés comme « substances régulatrices du sommeil ». Chez l'animal, l'administration de ces cytokines au niveau central induit une augmentation du sommeil lent alors que l'inhibition de leur action induit une diminution de la durée du sommeil lent en condition physiologique ou en réponse à une privation de sommeil (Besedovsky et al., 2019; Krueger et al., 1995; Opp, 2005). D'autres cytokines, notamment les interférons (IFNs), l'IL-2, l'IL-4, l'IL-6, l'IL-10, l'IL-13, l'IL-15 et l'IL-18 semblent également avoir certaines propriétés régulatrices du sommeil, mais la majorité des études ont été réalisées sur les effets somnogéniques de l'IL-1 $\beta$  et du TNF- $\alpha$ . La prostaglandine 2 (PGD<sub>2</sub>), la plus abondante au niveau du système nerveux central des rongeurs, joue également un rôle important dans la régulation du sommeil, l'inhibition de sa production réduit le temps passé en sommeil lent (Scharbarg et al., 2022).

De plus, plusieurs données chez les rongeurs et l'Homme ont indiqué des interrelations entre le sommeil, le système nerveux central et l'axe somatotrope (c'est-à-dire GHRH/GH/IGF-1, hormone de libération de l'hormone de croissance/hormone de croissance/facteur de croissance analogue à l'insuline de type 1 ; Chennaoui et al., 2020; Obal & Krueger, 2004; Van

Cauter et al., 1998; Zegarra-Valdivia et al., 2020). Chez la souris, il a été récemment démontré que l'IGF-1 modulait l'architecture du sommeil par le biais des neurones hypothalamiques à orexine (Zegarra-Valdivia et al., 2020).

### **1.4.2. Le processus circadien**

La grande majorité des processus physiologiques de l'organisme sont sous l'influence de rythmes circadiens. À l'échelle de l'individu, nous pouvons distinguer une horloge centrale, localisée dans l'hypothalamus (noyau suprachiasmatique) et des horloges périphériques dans chaque cellule et chaque tissu. L'horloge centrale est le synchronisateur principal des horloges périphériques et son activité est contrôlée par la présence ou non de lumière dans l'environnement (Figure 12), ce qui fait du cycle lumière-obscurité le rythme primordial pour la régulation de l'ensemble des rythmes circadiens (Moore & Eichler, 1972; Stephan & Zucker, 1972; Turek & Takahashi, 2001). La mise en place de ces rythmes (lumière, alimentation, température) permet d'anticiper les variations environnementales plutôt que de les subir, afin d'optimiser les processus adaptatifs associés (comme la sécrétion d'enzyme de digestion à l'heure des repas, avant l'ingestion de nourriture ; Mistlberger, 2006). À l'échelle moléculaire, le principal facteur qui pilote les rythmes circadiens est un hétérodimère composé de *Circadian Locomotor Output Cycles Kaput* (Clock) et *Brain and Muscle Arnt Like protein-1* (BMAL1). Il est impliqué dans l'expression de ses propres inhibiteurs (Cryptochrome et Period) ce qui permet de générer une boucle de rétroaction circadienne et il participe à la régulation de nombreux processus physiologiques tels que le vieillissement, le développement, le métabolisme et le sommeil (Gekakis et al., 1998; Kondratov et al., 2006; Okamura et al., 2010).



**Figure 12 : Diagramme schématique de l'organisation circadienne du SCN.** Les informations lumineuses environnementales sont reçues par le SCN via le tractus rétino-hypothalamique. Ces informations lumineuses synchronisent, en fonction du cycle jour-nuit, les rythmes circadiens intrinsèques du SCN, qui est considéré comme l'horloge circadienne centrale de l'organisme. Ensuite, le SCN va réguler les rythmes circadiens de la majorité des fonctions physiologiques de l'organisme comme le cycle veille/sommeil ou la température (Ono, 2022).

### 1.4.3. Modulation de la régulation du sommeil

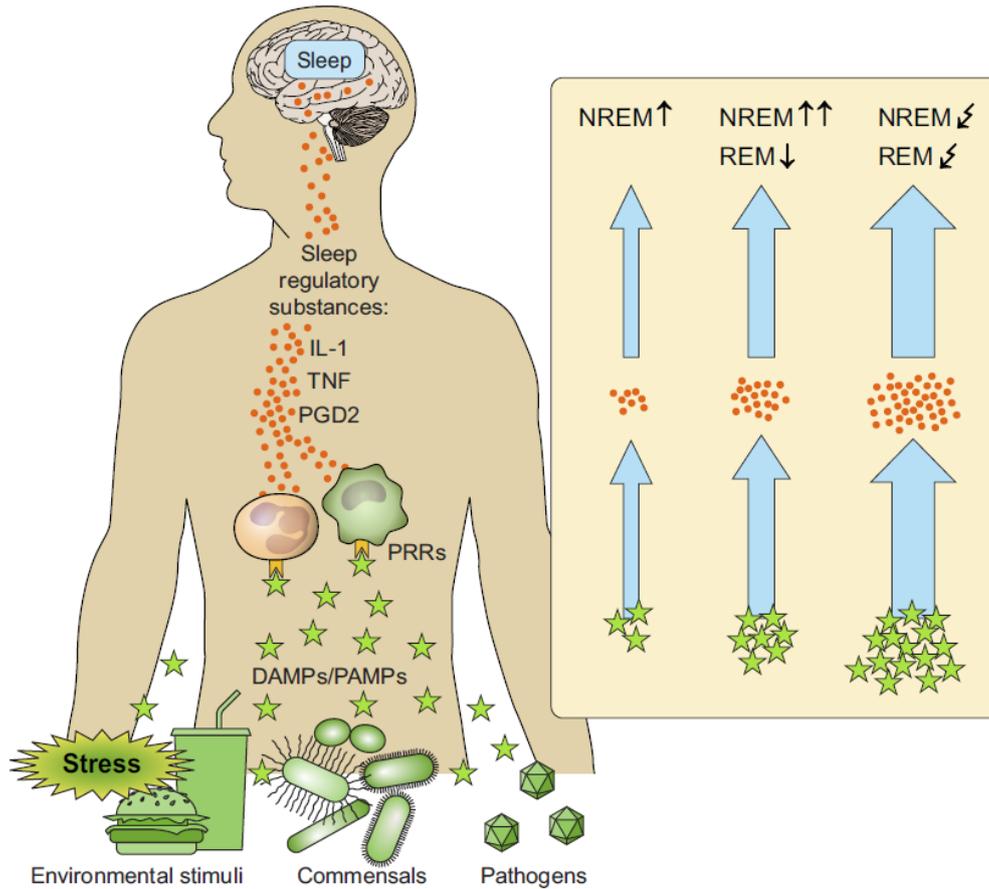
Un des défis actuels de la recherche sur le sommeil est de comprendre les interactions entre les facteurs environnementaux de la société actuelle et les mécanismes de régulation du sommeil. Cela dans le but de maîtriser les effets de ces facteurs sur la macro et la microstructure du sommeil.

Chez l'Homme, un des facteurs environnementaux le plus connu et peut-être le plus néfaste pour le sommeil à l'échelle de la société est l'exposition à la lumière artificielle le soir. Cette exposition tardive à la lumière artificielle désynchronise l'ensemble de nos rythmes circadiens, dont le processus circadien qui régule le sommeil (Borbély & Neuhaus, 1978). Cela a pour conséquence d'augmenter la latence d'endormissement, fragmente le sommeil et induit ainsi une diminution du temps total de sommeil (Czeisler, 2013; Cho et al., 2013).

La température est également un facteur majeur qui participe à la régulation du sommeil. La température du corps suit un rythme circadien synchronisé avec le cycle veille/sommeil avec une augmentation de la température lors de l'éveil et une diminution lors du sommeil. La

relation entre sommeil et température est bidirectionnelle, et la modulation de la température interne joue un rôle important sur le sommeil (Harding et al., 2019). L'efficacité de nos systèmes de thermorégulation est directement corrélée à la qualité du sommeil et l'ensemble des activités quotidiennes qui permettent de stimuler ces systèmes de thermorégulation sont favorables au sommeil (comme le sport, le sauna ou l'immersion dans de l'eau froide ; Harding et al., 2019; Hussain et al., 2019; Robey et al., 2013).

D'autres facteurs environnementaux comme le stress ou l'alimentation jouent un rôle important sur la régulation du sommeil, notamment en activant le système immunitaire. En effet, comme nous l'avons décrit dans le processus homéostatique du sommeil, de nombreuses cytokines pro-inflammatoires ainsi que les prostaglandines jouent un rôle dans la régulation du sommeil (Besedovsky et al., 2019). Toutes les situations qui induisent une activation du système immunitaire et la production d'IL-1 $\beta$ , de TNF- $\alpha$  et de PGD2 (comme un stress, l'ingestion de nourriture grasse et sucrée ou encore une infection virale ou bactérienne) vont induire une augmentation du temps passé en sommeil lent de manière dose-dépendante (Figure 13). L'augmentation du sommeil lent dépend de la quantité de cytokines, lors d'une réponse inflammatoire trop importante (avec de la fièvre par exemple), les effets deviennent négatifs en induisant une fragmentation du sommeil lent et une diminution du sommeil paradoxal et de très fortes doses induisent même une diminution de la durée du sommeil lent et du sommeil paradoxal (Besedovsky et al., 2019; Obal & Krueger, 2003).



**Figure 13 : Modèle conceptuel des changements du sommeil en réponse à l'activation du système immunitaire.** L'exposition à des pathogènes infectieux, des bactéries ou des stimulateurs environnementaux, induit une augmentation des motifs moléculaires associés aux dommages cellulaires (DAMPs) et des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) qui activent le système immunitaire (via les récepteurs de reconnaissance de forme des leucocytes, les PRRs). Les cellules immunitaires vont sécréter des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, TNF) et des prostaglandines (PGD2) qui jouent également un rôle de substances régulatrices du sommeil. L'augmentation de la quantité de ces substances va induire un accroissement du temps passé en sommeil profond et inhiber le sommeil paradoxal de manière dose-dépendante, mais en quantité trop importante elles vont induire une fragmentation du sommeil profond. (Besedovsky et al., 2019)

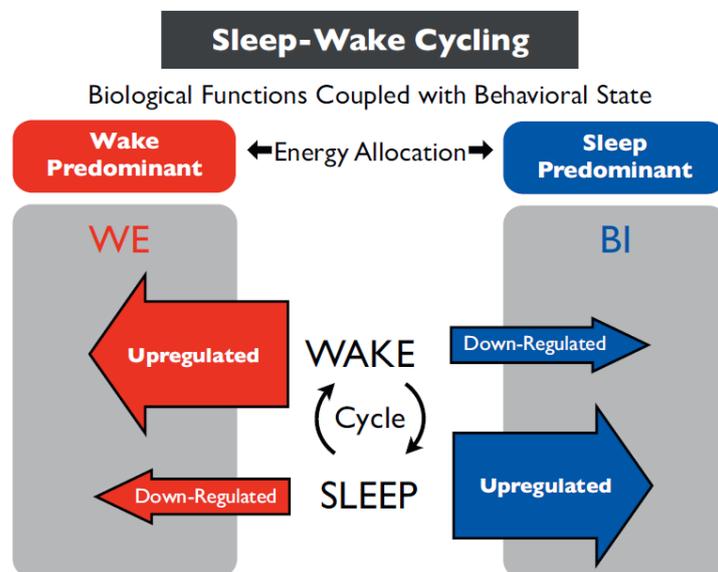
## 1.5 – Les fonctions du sommeil

D'un point de vue évolutif, les contraintes associées au sommeil peuvent s'avérer dangereuses pour la survie en milieu naturel. En effet l'immobilité, l'augmentation du seuil de réponse à un stimulus externe et l'inertie du sommeil (délai entre le réveil et des capacités physiques et cognitives optimales) rendent chaque être vivant endormi vulnérable au monde extérieur. Malgré cela, la présence quasi universelle du sommeil dans l'ensemble du règne animal traduit le fait que le sommeil induit des bénéfices plus importants que les risques qu'il représente. Ces bénéfices sont aujourd'hui regroupés sous la forme de cinq grandes fonctions associées au sommeil.

### 1.5.1. La fonction métabolique et énergétique du sommeil

La baisse de la température, la diminution du métabolisme ainsi que l'immobilité pendant le sommeil permettent de réduire la consommation d'énergie pendant la nuit où la recherche de nourriture est moins efficace pour les espèces diurnes ou pendant la journée pour les espèces nocturnes (Scharf et al., 2008). La théorie initiale était que l'éveil était associé à la consommation d'énergie et que le sommeil permettait le renouvellement des stocks d'énergie (Benington & Heller, 1995). Cette hypothèse a été invalidée par plusieurs résultats qui démontrent notamment la restauration des stocks énergétiques pendant l'éveil (Franken et al., 2003, 2006; Petit et al., 2014).

Il semblerait que ce ne soit pas tant la quantité d'énergie consommée qui change entre l'éveil et le sommeil, mais plutôt l'utilisation qui est faite de cette énergie (Schmidt, 2014). Lors de l'éveil, les investissements énergétiques sont concentrés sur les activités locomotrices et cérébrales à court terme. Lors du sommeil, l'immobilité et la diminution de l'activité cérébrale permettent d'allouer cette énergie à la synthèse protéique, la réparation cellulaire ou encore la réorganisation des réseaux neuronaux (Figure 14).

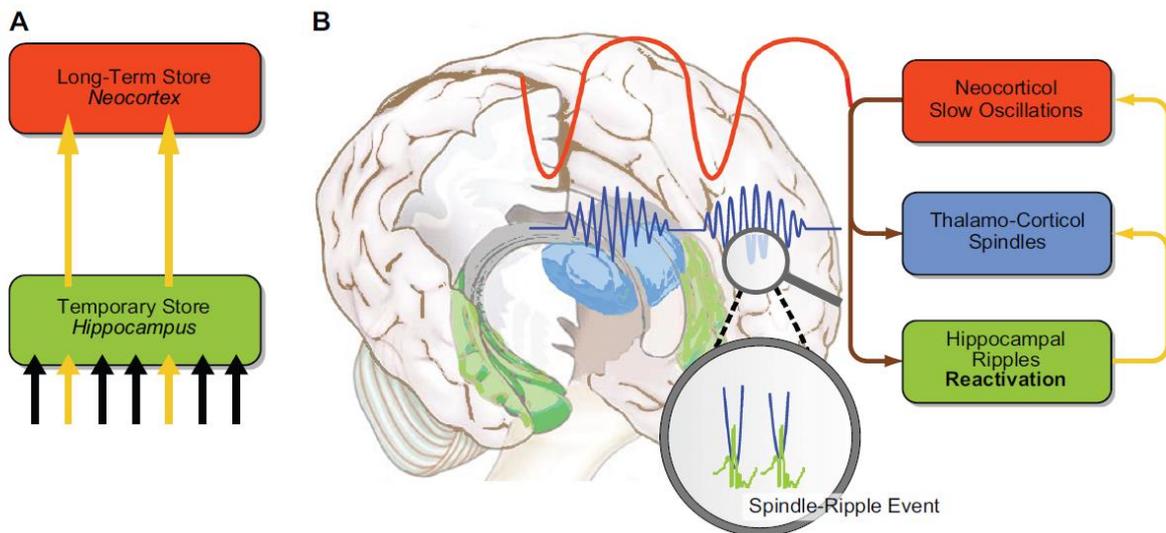


**Figure 14 : Représentation schématique du modèle d'allocation énergétique du sommeil.** Pendant l'éveil, l'utilisation de l'énergie est mobilisée par l'ensemble des activités associées à l'éveil (locomotion, thermorégulation, reproduction ...), représentées par le « Waking Effort (WE) ». En revanche, pendant le sommeil, l'absence de ces activités permet d'investir l'énergie dans des mécanismes biologiques représentés par le « Biological investment (BI) » qui correspondent à la synthèse protéique, la réparation cellulaire, la réorganisation des réseaux neuronaux ... La taille des flèches correspond à la quantité subjective de ressources investies dans chacune des deux catégories, alors que la couleur des flèches est associée à l'état d'éveil (rouge) ou celui du sommeil (bleu). (Schmidt, 2014).

### 1.5.2. La fonction d'homéostasie synaptique du sommeil

La théorie majeure du rôle du sommeil dans l'homéostasie synaptique est proposée par Tononi & Cirelli, 2003. Elle stipule que l'éveil est associé à une forte activité neuronale et à la mise en place de nouvelles connexions synaptiques, ce qui consomme beaucoup d'énergie et sature l'espace cérébral. Le sommeil, associé à la diminution de l'activité cérébrale, servirait alors à la dé-potentialisation de nombreuses synapses pour permettre le retour à l'homéostasie synaptique. Cette théorie est soutenue par plusieurs travaux qui démontrent à la fois une forte augmentation de l'activité métabolique des neurones ainsi que du nombre de synapses au cours de l'éveil et une diminution de la consommation énergétique et du nombre de synapses pendant la période de sommeil concomitante (Maret et al., 2011; Vyazovskiy et al., 2008). En revanche, deux autres études ont montré que la densité des épines dendritiques au niveau de la région CA1 de l'hippocampe, particulièrement impliqué dans la mémoire (Kasai et al., 2010), était diminuée après une privation de sommeil (Havekes & Abel, 2017; Ognjanovski et al., 2018).

Si le sommeil lent a pour fonction de diminuer la densité et le poids des synapses formées pendant l'éveil, comme stipulé par l'hypothèse de l'homéostasie synaptique, cela pose le problème de la conservation des informations nécessaires à l'apprentissage et à la mémoire. Or le rôle des ondes lentes dans la consolidation mnésique a été largement démontré et elles sont nécessaires à la stabilisation de la mémoire dans le temps (Maquet, 2001; Peigneux et al., 2001). Des approches multidisciplinaires ont permis de caractériser, au niveau hippocampique, les mécanismes cellulaires et moléculaires participant au traitement des informations récemment acquises. L'apprentissage au cours de l'éveil induit la création de nouvelles synapses et de nouveaux réseaux au niveau hippocampique (Born & Wilhelm, 2012). Pendant les ondes lentes du sommeil, la plupart de ces synapses sont éliminées ou en tout cas dé-potentialisées, ce qui permet de libérer de l'espace pour l'apprentissage à venir. En revanche, certaines synapses et certains réseaux nouvellement formés sont à l'inverse réactivés pendant ces ondes lentes. La réactivation des réseaux hippocampiques sélectionnés se traduit par une forte activité électrophysiologique et génère des oscillations à haute fréquence, appelées « ripples ». C'est le couplage temporel de ces *ripples* avec les *spindles* thalamocorticaux qui permet le transfert de la mémoire contenue dans ces réseaux précisément réactivés, de l'hippocampe (court terme) vers le cortex (long terme ; Figure 15).



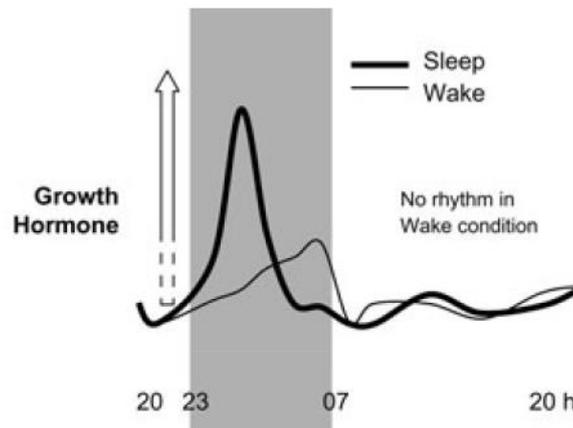
**Figure 15 : Modèle de la fonction active du sommeil dans la consolidation mnésique.** (A) Durant l'éveil, les informations sont encodées à court terme au niveau de l'hippocampe (rectangle vert) avant d'être transférées dans le cortex pendant le sommeil pour un encodage à long terme (rectangle orange). (B) Le transfert d'informations entre l'hippocampe et le cortex nécessite le couplage temporel entre les ripples hippocampiques (rectangle vert, les réseaux locaux contenant l'information à sauvegarder sont sélectionnés et réactivés), les *spindles* thalamocorticaux (rectangle bleu) et les ondes lentes corticales (rectangle orange). (Born & Wilhelm, 2012).

### 1.5.3. La fonction endocrinienne du sommeil

Le sommeil est associé à la sécrétion d'hormones qui jouent un rôle clé dans la croissance du corps chez l'enfant et dans la réparation et le maintien de l'homéostasie tissulaire chez l'adulte. Une des hormones majeures impliquées dans de nombreux processus anaboliques est l'hormone de croissance (« Growth Hormone (GH) »). La GH est une hormone polypeptidique sécrétée par les cellules somatotropes de l'hypophyse, une de ses fonctions principales est de stimuler la sécrétion d'insulin-growth-factor (IGF)-1 par le foie dans la circulation sanguine (Laron, 2001), mais également de stimuler la sécrétion d'IGF au niveau local (Fernandez et al., 2007; Ohlsson et al., 2009).

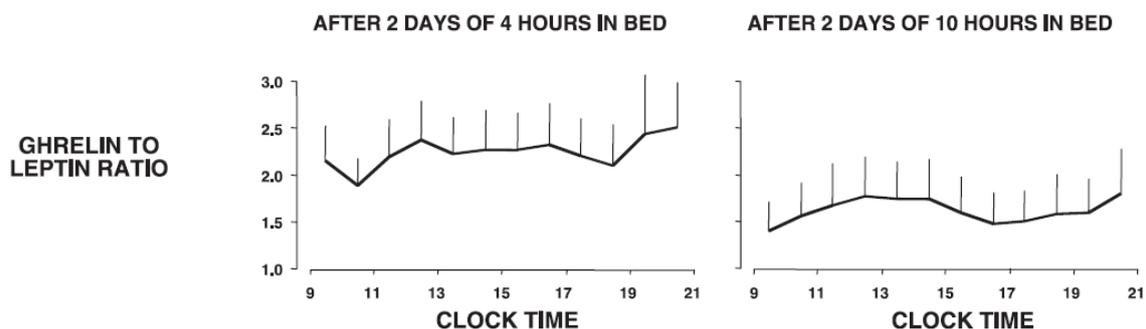
De nombreuses études ont montré que la majorité de la production de GH a lieu pendant les premières heures de sommeil lent profond, où la puissance des ondes delta est maximale. À l'inverse, la privation totale de sommeil induit une diminution drastique de la production d'hormone de croissance (Chennaoui et al., 2020; Lange et al., 2010 ; Figure 16). La production de GH par l'hypophyse est sous le contrôle de la « growth-hormone-releasing hormone (GHRH) ». L'administration exogène de GHRH augmente le temps passé en sommeil lent alors

que l'inhibition de la production endogène de GHRH inhibe le sommeil lent (Obal & Krueger, 2004; Zhang et al., 1999) et les mutations génétiques liées à une déficience en GHRH sont associées à une diminution du temps et de la qualité du sommeil lent et induisent une diminution de la sécrétion de GH qui mène au nanisme (Obal & Krueger, 2004).



**Figure 16 : Profil de sécrétion d'hormone de croissance au cours d'une nuit de sommeil.** Taux d'hormone de croissance lors d'une nuit normale (trait épais) et lors d'une privation de sommeil (trait fin). (Extrait de Lange et al., 2010)

Le sommeil régule également la sécrétion de la leptine et de la ghréline, deux hormones qui jouent un rôle majeur dans la régulation de l'appétit en induisant la satiété ou la faim, respectivement. En condition de manque de sommeil, les niveaux de leptine sont diminués ce qui induit une augmentation de la sensation de faim et augmente les apports caloriques ce qui peut participer à des prises de poids importantes, jusqu'à mener à l'obésité (Figure 17 ; Keith et al., 2006; Lumeng et al., 2007; Spiegel et al., 1999, 2004).



**Figure 17 : Effets du temps de sommeil sur le ratio ghréline/leptine.** Profil journalier de l'évolution du ratio ghréline/leptine après deux jours de restriction de sommeil (à gauche) ou après deux jours d'extension de sommeil (à droite). (Spiegel et al., 1999)

Il est également important d'évoquer les travaux qui ont été menés sur le lien entre le sommeil et l'insuline. L'insuline est une hormone produite par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du

pancréas. Sa fonction principale est de réguler la glycémie, elle favorise l'absorption du glucose sanguin par les cellules adipeuses, les cellules du foie et les cellules du muscle squelettiques et permet ainsi de faire baisser la glycémie. De nombreuses études épidémiologiques ont montré que la perturbation du cycle veille-sommeil était associée au risque de développer une résistance chronique à l'insuline (Cappuccio et al., 2010; Shan et al., 2015). Des études expérimentales menées chez l'Homme ont permis d'objectiver ces observations et ont montré que la restriction de sommeil induisait une résistance à l'insuline au niveau du foie (Donga et al., 2010), au niveau du tissu adipeux (Broussard et al., 2012) et au niveau systémique (Van Leeuwen et al., 2010).

#### **1.5.4. La fonction immuno-inflammatoire du sommeil**

Nous avons vu, dans la partie 1.4.3. *Modulation de la régulation du sommeil*, que le système immunitaire participait à la régulation du sommeil. La relation est réciproque et le sommeil exerce de nombreux effets sur la fonction immunitaire en retour. Le sommeil participe notamment à la redistribution tissulaire des cellules immunitaires (leucocytes, monocytes, lymphocytes) afin de renforcer la disponibilité en cellules immunitaires des ganglions lymphatiques (Dimitrov et al., 2007; Ruiz et al., 2017).

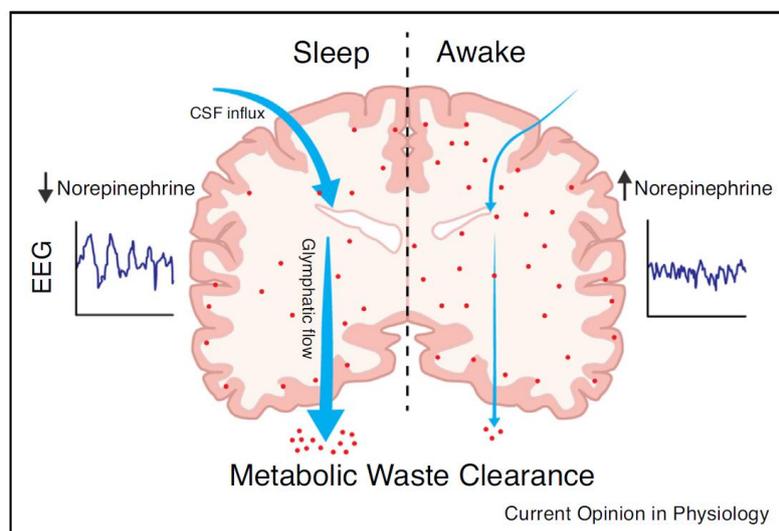
Outre ces aspects de macro-régulation du sommeil sur la fonction immuno-inflammatoire, le rôle du sommeil sur la production de cytokines pro-inflammatoire n'est pas clairement identifié. Les études qui comparent les niveaux plasmatiques de cytokines entre une condition de sommeil normal et une condition de manque de sommeil aiguë (privation/restriction) observent des résultats discordants (c.-à-d. une augmentation, une diminution ou pas de changement) en fonction de la cytokine, de la méthode de dosage utilisée, ou encore de l'heure du prélèvement (Besedovsky et al., 2019; Chennaoui et al., 2014; Irwin, 2019). Cependant, il semblerait qu'à long terme, le manque de sommeil chronique soit associé à une augmentation de l'inflammation (Aho et al., 2013) et à la réduction de la fonctionnalité des leucocytes (Pellegrino et al., 2012).

Le sommeil semble également jouer un rôle dans la consolidation de la mémoire immunitaire. Plusieurs études ont montré qu'une diminution du temps de sommeil était associée à une moindre production d'anticorps (Benedict et al., 2014; Lange et al., 2003, 2011). À l'inverse, des preuves cumulatives suggèrent qu'un temps de sommeil suffisant pourrait améliorer la

réponse immunitaire de la vaccination (Rayatdoost et al., 2022). Cet effet serait induit par le sommeil lent, qui génère un environnement pro-inflammatoire transitoire bénéfique pour la consolidation de la mémoire immunitaire à long terme (Besedovsky et al., 2012).

### 1.5.5. La fonction glymphatique du sommeil

Une étude publiée en 2013 a montré une augmentation importante de l'échange convectif du liquide cérébro-spinal (LCS) avec le liquide interstitiel lors du sommeil (Xie et al., 2013). Les chercheurs ont observé une augmentation du taux de clairance des macromolécules et des substances toxiques produites par les cellules pendant le sommeil. Par analogie avec l'élimination des déchets issus du fonctionnement cellulaire par la circulation lymphatique, les chercheurs ont donné le nom de « Glymphatique » à ce système d'élimination au niveau cérébral. Le système glymphatique est un système de transport de fluides hautement organisé, qui permet l'élimination des déchets tels que la protéine tau (Patel et al., 2019), la protéine  $\beta$ -amyloïde (Iliff et al., 2012) ou encore le lactate (Lundgaard et al., 2017). La régulation de cette fonction glymphatique n'est pas encore totalement élucidée, mais il semblerait que l'influx de LCS dépende en partie de l'amplitude des ondes lentes du sommeil (Figure 18 ; Hablitz et al., 2019).



**Figure 18 : Rôle du sommeil lent dans l'élimination des déchets cérébraux.** Les taux de norépinephrine diminuent pendant le sommeil lent, ce qui augmente l'afflux de liquide cérébro-spinal (CSF en anglais) dans les parenchymes cérébraux et augmente les échanges entre le CSF et le liquide interstitiel, ce qui permet d'éliminer les déchets métaboliques cérébraux. Lors de l'éveil, associé avec des taux élevés de norépinephrine, l'afflux du CSF dans les parenchymes cérébraux est fortement réduit et les échanges avec le liquide interstitiel sont moins importants. (Hauglund et al., 2020)

## 1.6. Les effets du manque de sommeil

Malgré ces fonctions primordiales pour la santé, le sommeil est souvent négligé dans notre société connectée qui considère le sommeil comme une perte de temps et qui favorise les activités nocturnes éveillant. En tous lieux, la proportion de personnes en dette de sommeil ne cesse d'augmenter (Chattu et al., 2019; Hoyos et al., 2015). Le bulletin épidémiologique hebdomadaire de santé publique France en mars 2019 met en évidence le temps de sommeil quotidien des Français qui est de moins de 7h en moyenne, avec plus d'un tiers des Français qui dorment moins de 6h par nuit (Léger et al., 2019). Or, nous savons par de multiples études que dormir moins de 6 heures est associé à de nombreux risques pour la santé et diminue les performances physiques et cognitives.

**Sur la santé publique.** La durée et la qualité du sommeil ont un impact important sur la santé physique et mentale (Simon & Walker, 2018; Grandou et al., 2019; Kecklund & Axelsson, 2016) et la diminution chronique du temps de sommeil est un facteur de risque pour le diabète (Spiegel et al., 2005), l'obésité (Spiegel et al., 2009), les maladies cardiovasculaires (Tobaldini et al., 2019) et les maladies neurodégénératives (Krause et al., 2017). Par conséquent, le manque de sommeil est une des principales questions de santé dans notre société, et représente un problème de santé publique majeur.

**Sur les performances cognitives.** Le manque de sommeil a un impact négatif sur la vigilance et les capacités attentionnelles, la perception sensorielle, les émotions, la mémoire, l'apprentissage et les fonctions exécutives (Alhola & Polo-Kantola, 2007; Kyle et al., 2017; Lim & Dinges, 2010; Smithies et al., 2021). De nombreuses études montrent une augmentation du temps de réaction à la suite d'une privation (Lim & Dinges, 2010) ou une restriction de sommeil (Rabat et al., 2016) ainsi qu'une augmentation du taux d'erreur. L'ensemble de ces effets augmentent sensiblement le risque d'accident en cas de manque de sommeil. Selon les données épidémiologiques qui décrivent la gravité du manque de sommeil dans nos sociétés, il est difficile d'imaginer l'impact global du manque de sommeil dans le monde en termes d'accidentologie (Hillman & Lack, 2013; Leger, 1994; Teran-Santos et al., 1999).

**Sur les performances physiques.** La reconnaissance de l'importance du sommeil dans le monde du sport est en constante évolution. Le sommeil des sportifs professionnels est confronté à de nombreuses contraintes (charge de travail, stress, voyages, jet-lag, compétitions tard le soir) et de nombreuses études ont observé une altération du sommeil chez les athlètes (altération de la quantité/qualité), ainsi qu'un risque élevé de développer des symptômes insomniaques (Hauswirth et al., 2014; Gupta et al., 2017; Knufinke et al., 2018; Leeder et al., 2012). Le sommeil semble pourtant être un point capital pour la performance sportive (Brandt et al., 2017; Juliff et al., 2018). Cependant, l'impact du sommeil sur les performances sportives n'est pas le même selon le sport considéré et selon les individus. Au niveau des performances d'endurance (aérobie), les résultats de plusieurs études montrent que le manque de sommeil diminue les performances, et cela peut être dû à une augmentation de la perception de l'effort, mais également à une diminution des stocks musculaires de glycogène (Fullagar et al., 2015; Oliver et al., 2009; Skein et al., 2011). Au niveau des performances anaérobies, certaines études décrivent un effet négatif du manque de sommeil (Abdelmalek et al., 2013; Souissi et al., 2003) alors que d'autres investigateurs ne constatent aucune modification (Mougin et al., 1996; Taheri & Arabameri, 2012). En revanche, pour les sports qui nécessitent des capacités cognitives, comme de la précision, des temps de réaction courts ou encore de la tactique (comme le tennis, les fléchettes, le basket, le volley ou le rugby), la dégradation du sommeil semble toujours associée à une dégradation des performances alors que l'augmentation du temps de sommeil les améliore (Edwards & Waterhouse, 2009; Mah et al., 2011; Reyner & Horne, 2013; Schwartz & Simon, 2015; Suppiah et al., 2016).

## **1.7. L'extension de sommeil**

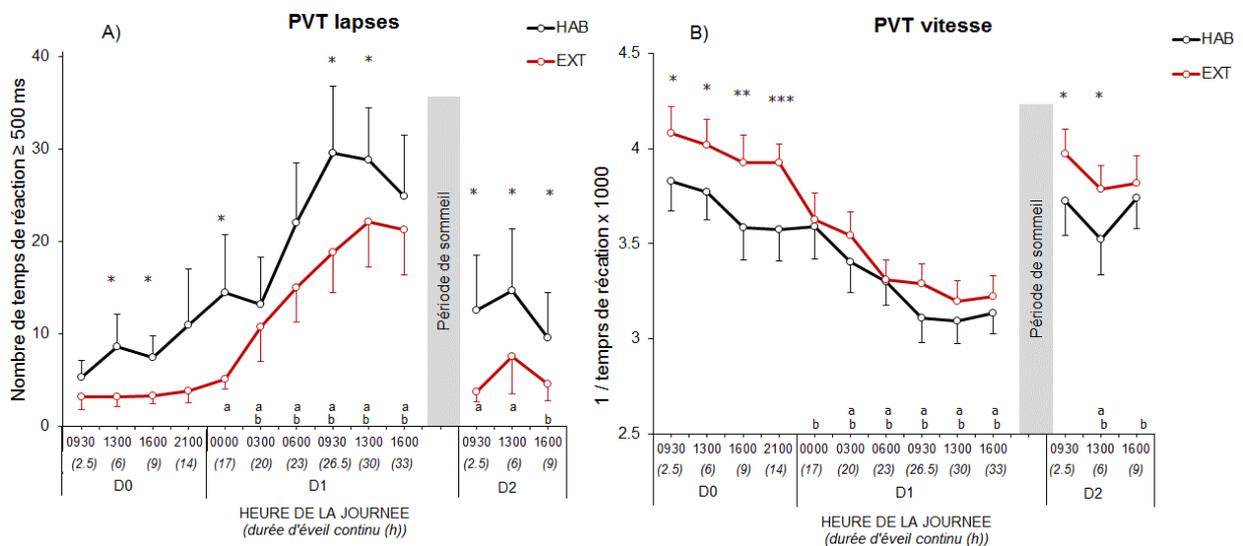
Il existe peu de contre-mesures pour faire face aux nombreux effets délétères du manque de sommeil. La sieste ou la prise de caféine sont les plus utilisées, elles permettent de limiter la dégradation des capacités cognitives en condition de manque de sommeil (Quiquempoix et al., 2022; Vgontzas et al., 2007).

Une autre stratégie possible est d'augmenter la durée de son temps de sommeil, c'est-à-dire de faire de « l'extension de sommeil », avant une période de manque de sommeil. Cela permet

de faire de la « provision de sommeil », ce que l'on appelle le « banking sleep » en anglais (Rupp et al., 2009).

Chez l'Homme, l'extension de sommeil consiste à augmenter le temps passé au lit, en se couchant 2 heures plus tôt, permettant ainsi d'augmenter d'environ 90 minutes le temps total de sommeil (Chennaoui et al., 2016). Lors d'une privation de sommeil, une des tâches cognitives qui est fortement dégradée concerne les processus attentionnels et est évaluée par des tests visuels d'évaluation de l'attention soutenue, le plus connu étant le « psychomotor vigilance task (PVT) ». Lors de ce test de PVT, il faut réagir le plus vite possible à une stimulation qui apparaît à l'écran en appuyant sur un bouton. Le temps de réponse est mesuré pour chaque essai, et les réponses de plus de 500 ms (appelées « lapses ») servent de marqueurs pour évaluer les niveaux de vigilance du sujet. Une étude publiée par notre unité de recherche en 2015 a montré que la dégradation des processus d'attention lors d'une privation de sommeil est moins importante chez des sujets qui ont préalablement réalisés de l'extension de sommeil (Figure 19 ; Arnal et al., 2015).

**Figure 19 : Effets de l'extension de sommeil sur le nombre de laps et sur le temps de réponse lors d'une**



**privation de sommeil.** (A) Nombre de laps lors du test de vigilance psychomotrice (PVT) pour le groupe « temps habituel de sommeil » (HAB, courbe noire) et pour le groupe qui a réalisé préalablement de l'extension de sommeil (EXT, courbe rouge) lors du jour contrôle, D0, puis pendant le jour de privation de sommeil, D1 et le jour de récupération, D2 (les heures de la journée correspondantes sont précisées sur l'axe des abscisses). (B) similaire à (A), mais pour la vitesse de réponse lors du PVT. \* différences significatives entre HAB et EXT (\* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$ ) ; a : différences significatives par rapport à D0 (09 :30) dans la condition HAB ; b : différences significatives par rapport à D0 (09 :30) dans la condition EXT. (Adapté de Arnal et al., 2015)

Afin d'étudier en détail les mécanismes mis en jeu par l'extension de sommeil, notre unité a employé une méthode permettant de réaliser de l'extension de sommeil chez le rat. Étant un animal nocturne, le rat dort préférentiellement durant la période lumineuse. L'allongement artificiel de la durée de cette période lumineuse (+4h) permet d'augmenter le temps de sommeil des animaux de 90 minutes en moyenne (Sauvet et al., 2018). Notre unité a montré que, chez l'Homme comme chez l'animal, deux semaines d'extension de sommeil permettaient d'augmenter les taux plasmatiques d'IGF-1 (Chennaoui et al., 2016, 2017). Étant donné l'implication d'IGF-1 dans le maintien des fonctions cognitives (Chennaoui et al., 2020; Creyghton et al., 2004) cette augmentation d'IGF-1 est une piste pour expliquer les effets protecteurs de l'extension de sommeil sur les performances cognitives. De plus, cette augmentation d'IGF-1 a été retrouvée au niveau du cortex frontal des animaux, ce qui renforce l'hypothèse d'une implication potentielle d'IGF-1 dans les bénéfices cognitifs induits par l'extension de sommeil (Chennaoui et al., 2017). Une diminution de la concentration en récepteurs à l'adénosine de type 1 (A1R) a également été observée au niveau du cortex frontal des animaux à la suite de deux semaines d'extension de sommeil. Étant donné la fonction somnogénique de l'activation de ces récepteurs par l'adénosine, qui participent à la mise en place de la pression de sommeil au cours de l'éveil, ce résultat est également un élément pour expliquer les effets cognitifs de l'extension de sommeil (Chennaoui et al., 2017).

Au-delà de ces résultats concernant les tissus cérébraux, l'augmentation d'IGF-1 a également été retrouvée au niveau du muscle squelettique (*Gastrocnemius*) des animaux après deux semaines d'extension de sommeil (Chennaoui et al., 2017). Or, IGF-1 joue un rôle particulièrement important dans le processus de réparation d'une blessure musculaire (voir partie 2.2.3. *Le processus de réparation musculaire*).

Lors de ce travail de thèse, nous nous sommes en partie intéressés aux effets que pourrait avoir l'extension de sommeil sur la récupération d'une blessure musculaire.



# **Partie II – Le muscle strié squelettique**

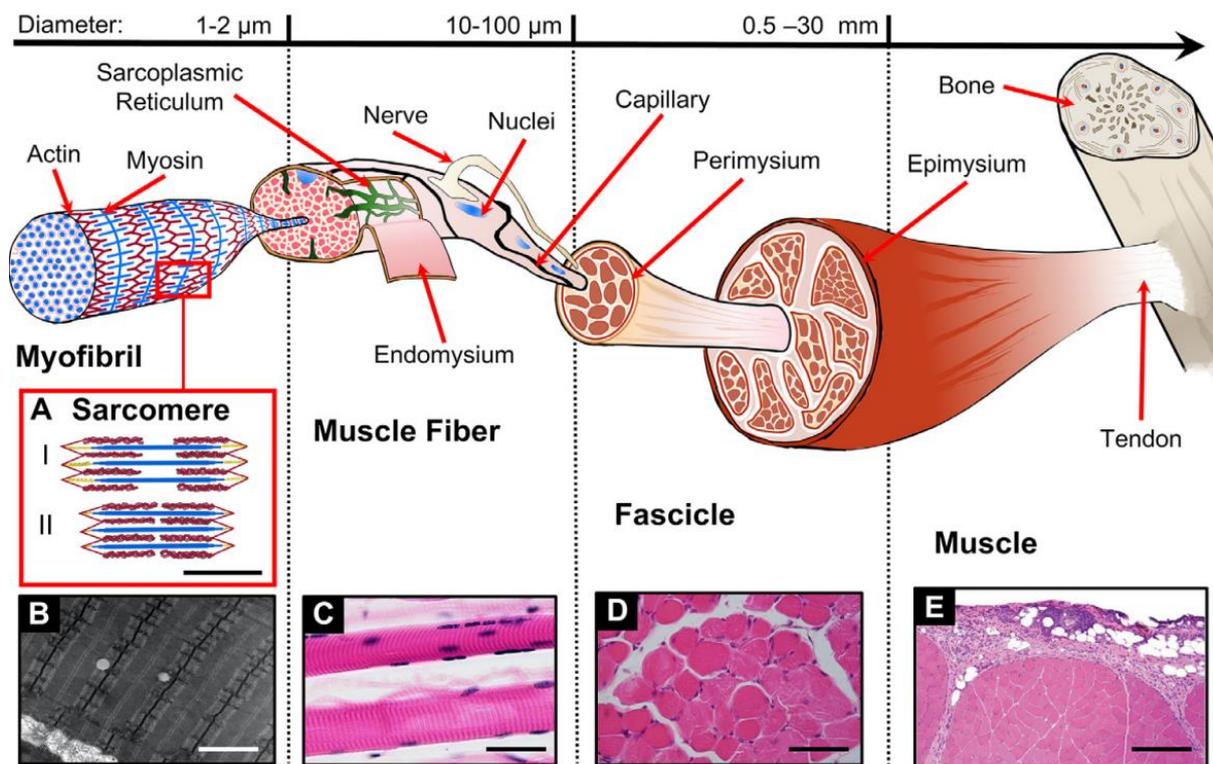
## **2.1. Composition et structure**

Les muscles participent à diverses fonctions essentielles à la vie chez les métazoaires comme la digestion ou la respiration. Ils participent également à leur adaptation à différentes contraintes environnementales, en permettant le mouvement (par mobilisation osseuse) ou en contribuant à sa thermorégulation (production de chaleur lors de leur contraction). Les caractéristiques fonctionnelles et anatomiques des différents muscles ont permis de les diviser en trois grandes catégories : les muscles lisses, le muscle strié cardiaque et les muscles striés squelettiques. Lors de ce travail de thèse, nous allons étudier spécifiquement cette dernière catégorie.

### **2.1.1. Anatomie et fonction du muscle strié squelettique**

**Les muscles striés squelettiques** se fixent par l'intermédiaire des tendons au squelette et permettent le mouvement de celui-ci. Le nom de « muscle strié » vient des premières observations au microscope optique de ce tissu en coupe longitudinale, qui ont décrit des striations transversales et longitudinales. À l'échelle moléculaire, cela correspond à des répétitions de myofilaments d'actine et de myosine appelées sarcomères, qui sont les unités fonctionnelles responsables de la contraction musculaire et qui composent les myofibrilles (Figure 22). Le mécanisme de contraction musculaire, identifié par Huxley en 1957, est basé sur le glissement de ces filaments d'actine entre les filaments de myosine (Huxley, 1957).

Les cellules du muscle strié squelettique, également appelées fibres musculaires, peuvent mesurer de quelques millimètres jusqu'à 1 mètre de long (Frontera & Ochala, 2015). Elles sont composées de cellules plurinucléées très allongées dont les noyaux se situent en périphérie, sous la membrane plasmique. Au niveau de son organisation tridimensionnelle, le tissu musculaire est compartimenté par différentes couches de matrice extracellulaire : l'endomysium qui entoure chaque fibre musculaire, le périmysium qui regroupe plusieurs fibres en faisceaux et l'épimysium enveloppant l'ensemble du muscle (Figure 20).



**Figure 20 : Structure du muscle strié squelettique.** À Structure d'un sarcomère et mécanisme de glissement des filaments d'actine (rouge) sur les filaments de myosine (rouge). B Image de myofibrilles par microscopie électronique à transmission (barre d'échelle : 1nm). C Fibres musculaires au microscope à contraste de phase (barre d'échelle : 50  $\mu$ m), D coloration histologique d'un faisceau de fibres musculaires (barre d'échelle : 100  $\mu$ m). E coupe transversale d'une portion de muscle (barre d'échelle : 0,5 mm). (Gotti et al., 2020)

La fonction de ce tissu étant de produire du mouvement ou de générer de la force (en cas de contraction-isométrique), cela nécessite une grande consommation d'énergie, qui est fournie par une vascularisation organisée en réseau anastomotique permettant un transport adéquat en nutriments et oxygène. La contraction des muscles striés squelettiques est volontaire, par une innervation des motoneurones  $\alpha$  dont le corps cellulaire se situe au niveau de la corne antérieure de la moelle épinière. Au niveau fonctionnel, une unité motrice correspond à l'ensemble formé par un motoneurone et les fibres musculaires qu'il innerve dont le nombre peut aller jusqu'au plusieurs centaines (150 fibres en moyenne). L'intensité de la contraction d'un muscle dépend du nombre d'unités motrices qui ont été activées ainsi que de la taille des unités motrices (Lieber, 2002). De plus, la vitesse de la contraction des unités motrices dépend du type de fibres musculaires qui la compose.

## 2.1.2. Les types de fibres musculaires

L'analyse des propriétés contractiles et métaboliques des fibres musculaires a permis d'établir l'existence de différents types de fibres qui expriment des chaînes lourdes de myosine spécifique (Stein & Padykula, 1962; Yellin & Guth, 1970). Nous pouvons distinguer les fibres oxydatives lentes (Type I), les fibres oxydatives rapides (Type IIA) et les fibres glycolytiques rapides (Type IIB et IIX chez le rat ; Kucera & Dorovini-Zis, 1979) dont les caractéristiques principales sont détaillées dans la table 1.

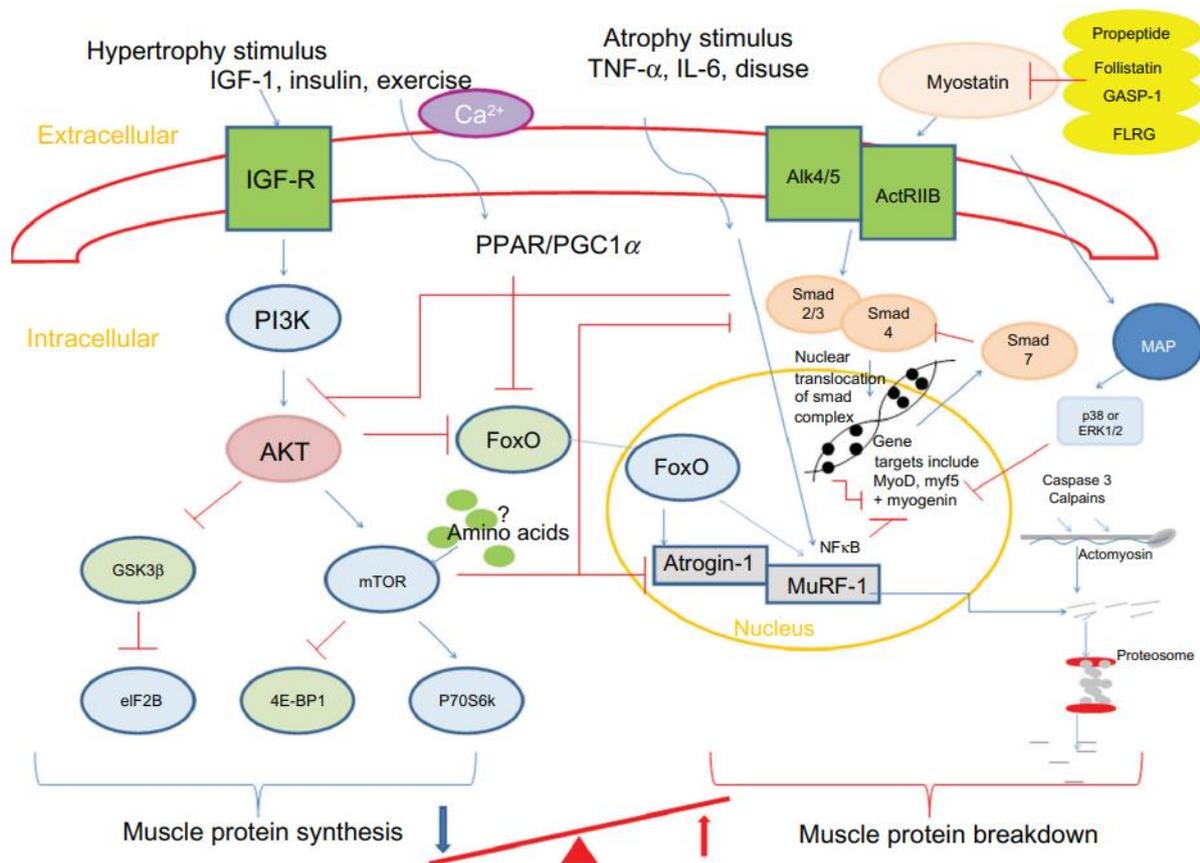
	Type I	Type IIA	Type IIX (Human)	Type IIB (Mouse, Rat)
Anatomical color	Red	Red	White	White
Contractile speed	Slow-twitch	Fast-twitch	Fast-twitch	Fast-twitch
Myosin heavy chain isoform	Type I	Type IIA	Type IIX	Type IIB
Metabolic	Oxidative	Oxidative	Glycolytic	Glycolytic
Myofibrillar ATPase activity	Low	High	High	High
Mitochondrial density	High	High	Medium	Low
Fatigue	Resistant	Resistant	Fast	Fast

**Table 1 : Caractéristiques morphologiques, métaboliques et fonctionnelles des différents types de fibres musculaires.** (Mori, 2021)

Il existe une forte variabilité interindividuelle dans la proportion des types de fibres au sein d'un muscle donné. Initialement déterminée par des facteurs génétiques (Fuku et al., 2019), l'entraînement peut modifier cette proportion (Wilson et al., 2012). Il existe également des fibres hybrides, pouvant exprimer simultanément deux ou trois types de chaînes lourdes de myosine (I, IIA et IIB). Ces types de fibre peuvent servir de transition avant leur changement de typage ou peuvent permettre d'obtenir un profil contractile mixte (Medler, 2019). Le muscle strié squelettique est un tissu qui possède une forte plasticité, pouvant moduler son type de fibre, mais également leur taille selon la demande fonctionnelle ou l'état global (physiologique ou pathologique) de l'individu.

La force générée par les fibres musculaires dépend ainsi de leur type, mais également de leur taille (Krivickas et al., 2011; Miller et al., 1993) qui peut être augmentée par un processus appelé hypertrophie, ou alors diminué par un processus appelé atrophie. L'hypertrophie chez l'adulte est un phénomène observé après un entraînement physique régulier comme lors de la pratique de la musculation (Andersen & Aagaard, 2010; Schiaffino et al., 2013). Pour induire de l'hypertrophie, la synthèse protéique musculaire doit être supérieure à la dégradation

protéique musculaire. Quand l'inverse se produit, la taille des fibres musculaires diminue et nous parlons alors d'atrophie musculaire, qui est par exemple observée en cas d'inactivité prolongée (Machida & Booth, 2004b). Deux voies de signalisation majeures sont impliquées pour moduler la synthèse protéique : la voie IGF-1 – PI3K – Akt – mTOR, qui stimule la synthèse protéique (Risson et al., 2009; Schiaffino & Mammucari, 2011) et la voie Myostatine – Smad2/3 qui l'inhibe (Lee, 2004; Taylor et al., 2001). La dégradation protéique, principalement contrôlée par le dimère Atrogin-1/MuRF-1 est inhibée par mTOR et stimulée par les cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et TNF- $\alpha$ ) et le manque d'activité (Figure 21). D'autres facteurs participent à la régulation directe ou indirecte de mTOR et jouent un rôle dans la croissance des fibres musculaires, comme les androgènes (voir Figure 21 ; White et al., 2013).



**Figure 21 : Voies de signalisation impliquées dans la synthèse des protéines au niveau musculaire.** L'ensemble de ces voies de signalisation convergent vers la modulation de l'activité de mTOR qui contrôle la synthèse des protéines. IGF-1, l'insuline ou l'exercice stimulent l'activité de mTOR en activant la voie PI3K-Akt. Le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 ou l'inactivité inhibe la croissance musculaire en activant le complexe Smad2/3/Smad4. La follistatine induit la croissance musculaire en inhibant l'action de la myostatine et de l'activine A. (Donalson et al., 2012)

### **2.1.3. Les autres composants du muscle strié squelettique**

Les fibres musculaires sont ancrées dans un tissu de soutien composé de différents molécules et types cellulaires qui sont indispensables à la fonction musculaire. La matrice extracellulaire (MEC) qui est directement au contact des fibres musculaires est composée d'un mélange complexe constitué de collagène, de glycoprotéines, de protéoglycanes et d'élastine (Halper, 2021; Takala & Virtanen, 2000). Cette MEC est en interaction permanente avec les fibroblastes (principaux sécréteurs des composants de la MEC) et les cellules immunitaires locales. La MEC régule la circulation de l'ensemble des facteurs qui interagissent avec les fibres musculaires (comme les facteurs de croissance, les facteurs pro et anti-inflammatoires ...) et joue ainsi un rôle sur le développement musculaire et la réparation musculaire, mais aussi sur la transmission de la force de contraction des fibres musculaires (Csapo et al., 2020).

Ancrés dans les différentes couches de tissu conjonctif formées par la MEC, nous observons la présence de nerfs, qui innervent les fibres musculaires et induisent la contraction des fibres, ainsi que des vaisseaux sanguins qui alimentent les fibres musculaires en oxygène et en nutriments. Le nombre de capillaires est associé à la performance musculaire et l'analyse de la quantité de vaisseaux sanguins est un facteur de l'évaluation de la fonctionnalité musculaire (Klausen et al., 1981).

## 2.2. La blessure musculaire et sa réparation

### 2.2.1. Classification des blessures musculaires

Les blessures musculaires sont fréquentes chez les athlètes et les militaires (Ekstrand et al., 2011; Keogh & Winwood, 2017). Elles sont un des principaux facteurs d'invalidité dans les armées et d'arrêt de l'entraînement chez les athlètes (Ressort et al., 2013; Teyhen et al., 2018). Du fait des pratiques sportives (course à pied, football, rugby, athlétisme ...), les muscles les plus touchés sont majoritairement les muscles des membres inférieurs (Ekstrand et al., 2011; Volpi et al., 2004). Sur le plan clinique, une blessure est représentée par une perte de fonctionnalité musculaire, la plupart du temps associée à une douleur importante (Tidball, 2011). Il existe différents types de blessure musculaire définis à partir de leurs localisations anatomiques ou de critères fonctionnels spécifiques. La perte de force générée par le muscle lésé en fonction de l'aire du muscle, le temps nécessaire pour atteindre la force maximale ou encore la fatigabilité du muscle sont des évaluations fonctionnelles courantes (Tidball, 2011). Une autre évaluation possible est basée sur l'analyse anatomopathologique du muscle lésé. Chez l'Homme, cela est réalisé à l'aide de l'imagerie médicale, principalement par IRM ou échographie à ultrason.

Une fois ces évaluations effectuées, le recours à un système général de classification est nécessaire pour établir des protocoles de prise en charge adaptés. La première classification a été établie en 1962 (O'Donoghue, 1962) et ne cesse d'évoluer depuis (Ryan, 1969; Stoller, 2007; Takebayashi et al., 1995). Aujourd'hui deux systèmes de classification sont particulièrement utilisés, le système de Munich (Mueller-Wohlfahrt et al., 2013) et le système MLG-R (pour « Mechanism, Location, Grading of severity and number of muscle re-injuries » ; Valle et al., 2017) qui combinent la localisation anatomique et les données cliniques de la blessure aux données obtenues par imagerie (échographie, IRM). Un exemple de classification selon le système MLG-R pour les blessures aux ischiojambiers est illustré dans la table 2.

Mechanism of injury (M)	Locations of injury (L)	Grading of severity (G)	Number of muscle re-injuries (R)
<b>Hamstrings direct injuries</b>			
<b>T</b> (direct)	<b>P</b> Injury located in the proximal third of the muscle belly	0-3	0 1st episode 1 1st re-injury 2 2nd re-injury, and so on.
	<b>M</b> Injury located in the middle third of the muscle belly		
	<b>D</b> Injury located in the distal third of the muscle belly		
<b>Hamstrings indirect injuries</b>			
<b>I</b> (indirect) plus subindex <b>s</b> for stretching-type, or subindex <b>p</b> for sprinting-type.	<b>P</b> Injury located in the proximal third of the muscle belly. The second letter is a subindex <b>p</b> or <b>d</b> to describe the injury relation with the proximal or distal MTJ respectively.	0-3	0 1st episode 1 1st re-injury 2 2nd re-injury, and so on.
	<b>M</b> Injury located in the middle third of the muscle belly, plus the corresponding subindex.		
	<b>D</b> Injury located in the distal third of the muscle belly, plus the corresponding subindex.		
<b>Negative MRI injuries (location is pain related)</b>			
<b>N</b> plus subindex <b>s</b> for indirect injuries stretching-type, or subindex <b>p</b> for sprinting-type.	<b>N p</b> Proximal third injury	0-3	0 1st episode 1 1st re-injury 2 2nd re-injury, and so on.
	<b>N m</b> Middle third injury		
	<b>N d</b> Distal third injury		
<b>Grading of injury severity</b>			
0	When codifying indirect injuries with clinical suspicion but negative MRI, a Grade 0 injury is codified. In these cases the second letter describes the pain locations in the muscle belly.		
1	Hyperintense muscle fibres oedema without intramuscular haemorrhage or architectural distortion (fibre architecture and pennation angle preserved). Oedema pattern: interstitial hyperintensity with feathery distribution on FSPD or T2 FSE+ STIR images.		
2	Hyperintense muscle fibres and/or peritendon oedema with minor muscle fibers architectural distortion (fibre blurring and/or pennation angle distortion) +/- minor intermuscular haemorrhage, but no quantifiable gap between fibres. Oedema pattern, same as for grade 1.		
3	Any quantifiable gap between fibres in craniocaudal or axial planes. Hyperintense focal defect with partial retraction of muscle fibers +/- intermuscular haemorrhage. The gap between fibers at the injury's maximal area in an axial plane of the affected muscle belly should be documented. The exact %CSA should be documented as a subindex to the grade.		
r	When codifying an intra-tendon injury or an injury affecting the MTJ or intramuscular tendon showing disruption/retraction or loss of tension exist (gap), a superscript (r) should be added to the grade.		

**Table 2 : Résumé de la méthode MLG-R pour la classification des blessures musculaires.** Lors d'études précliniques réalisées chez l'animal, l'exploration de la blessure peut être réalisée de manière plus directe, par des analyses histologiques après prélèvement du muscle lésé. Cela permet d'évaluer aux temps très précoces l'étendue des lésions au sein du tissu. À des temps plus tardifs, cela pourra être investigué indirectement en quantifiant la surface du tissu qui est en cours de réparation à la suite de cette lésion. (Valle et al., 2017)

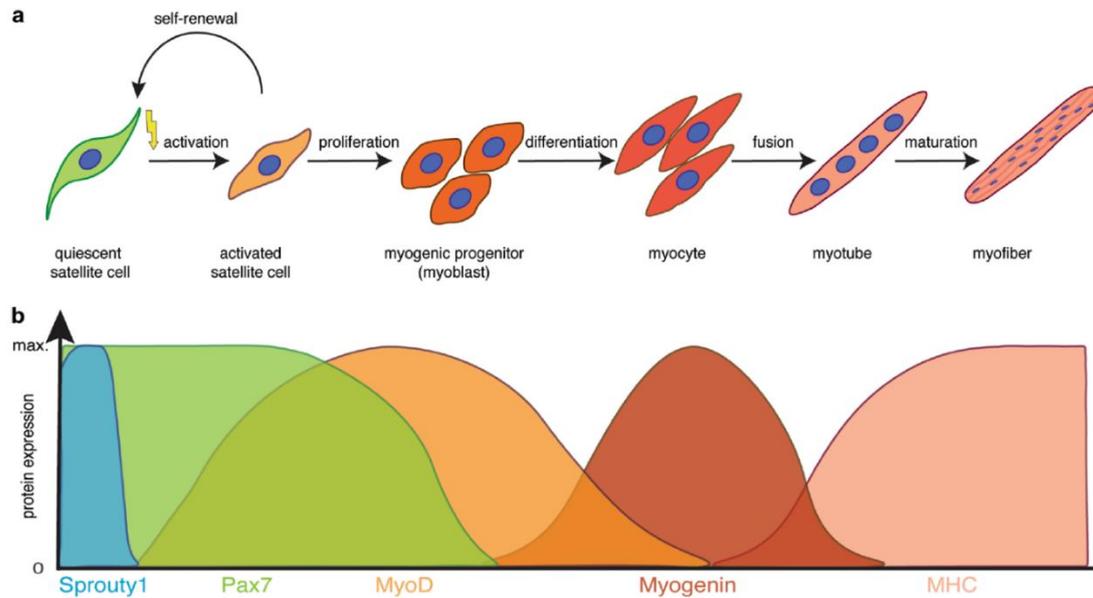
### 2.2.2. Prise en charge de la douleur musculaire post lésionnelle

La douleur est un élément majeur associé aux blessures musculaires et nécessite le plus souvent une prise en charge thérapeutique (Baoge et al., 2012). Si l'utilisation d'analgésique est souvent préconisée et pratiquée, les anti-inflammatoires non stéroïdiens sont fortement déconseillés lors des premiers jours post-blessure, puisqu'ils sont décrits comme délétères pour la phase précoce pro-inflammatoire de la réparation musculaire (Lundberg & Howatson, 2018). Une bonne gestion de la douleur est indispensable à la prise en charge d'une blessure

musculaire puisqu'au-delà de l'aspect psychologique, elle permet une remobilisation précoce du membre lésé qui semble être bénéfique pour retrouver une fonctionnalité musculaire optimale (Järvinen & Lehto, 1993; Järvinen et al., 2007; Kannus, 2000).

### **2.2.3. Le processus de réparation musculaire**

Le muscle est un tissu qui présente une forte capacité de réparation, même après une nécrose de plus de 90% de ses fibres musculaires, il est capable de se régénérer et de retrouver sa fonctionnalité d'origine (Schiaffino & Partridge, 2008). Cependant cette capacité de réparation dépend du type de blessure, les lésions qui altèrent le tissu de soutien comme le modèle de blessure par écrasement ou les blessures associées à une perte de substance musculaire réparent moins bien que les lésions qui ciblent les fibres musculaires (Akimau et al., 2005; Sicari et al., 2012). Cette capacité de réparation dépend principalement des cellules souches adultes de ce tissu, les cellules satellites qui sont à l'état de quiescente dans le muscle sain (Mauro, 1961). À la suite d'une blessure musculaire, ces cellules vont s'activer et devenir des progéniteurs myogéniques qui vont ensuite proliférer et se différencier en myocytes avant de fusionner pour donner de nouvelles fibres musculaires fonctionnelles (Seale et al., 2001; Yin et al., 2013). L'ensemble de ces étapes forme ce que nous appelons la myogenèse (Figure 22A). L'expression de différents facteurs de transcription, comme Pax7 et MyoD, va réguler de façon intrinsèque cette myogenèse (Figure 22B). Cependant, le processus de réparation est plus complexe, impliquant de nombreux types cellulaires et molécules issues du micro-environnement local, mais également en intégrant des molécules de signalisation d'origine systémique. Les différentes phases de cette réparation musculaire nécessitent une fine coordination spatio-temporelle et une perturbation de cette synchronisation peut être plus ou moins délétère selon le mécanisme impliqué (Mann et al., 2011).



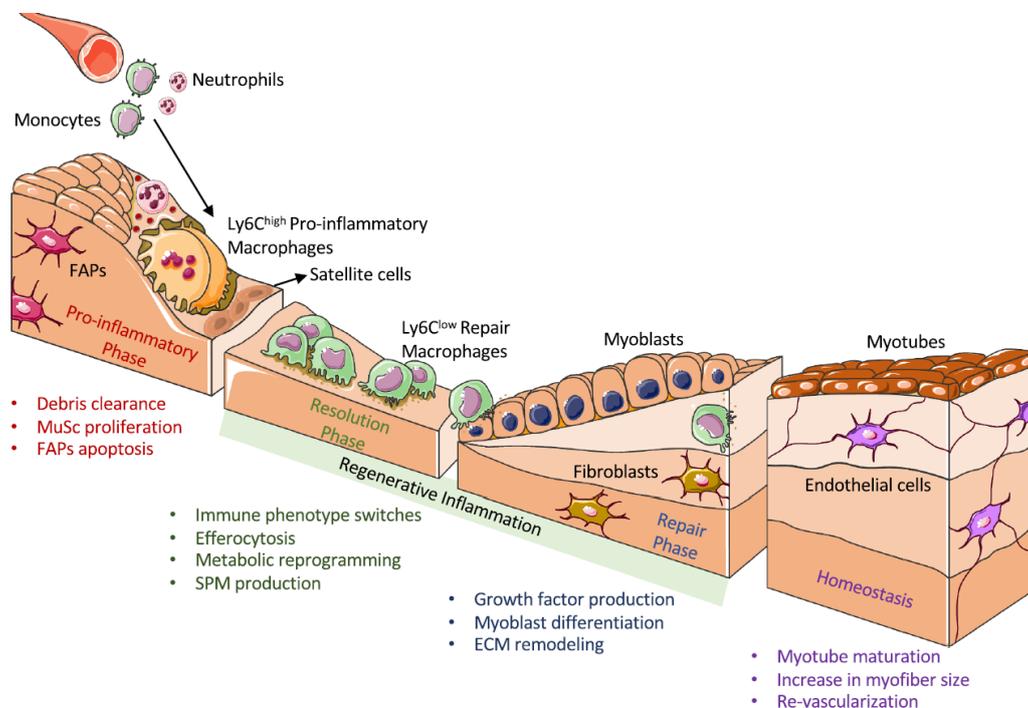
**Figure 22 : Processus de formation de nouvelles fibres musculaires.** **a** Illustration schématique des différentes étapes de la formation de nouvelles fibres musculaires par les cellules souches musculaires. Elles sont activées (par exemple à la suite d'une blessure), prolifèrent, se différencient et fusionnent pour former des myotubes qui vont maturer pour devenir des fibres musculaires fonctionnelles. **b** Profil d'expression des principaux modulateurs de la progression des étapes de la formation des fibres musculaires. (Schmidt et al., 2019)

Le processus de réparation musculaire qui se met en place en réponse à une lésion musculaire peut être séparé en quatre grandes étapes (Figure 23) qui se chevauchent (Chazaud, 2020; Tidball, 2011). Une première phase dite pro-inflammatoire fait suite à la nécrose des fibres musculaires induite par la blessure (mécanique ou pharmacologique). Cela va libérer de nombreux débris cellulaires contenus habituellement dans le cytoplasme des cellules dont des DAMPS, aussi appelées alarmines, comme HMGB1 (pour « high-mobility group box 1 ; Palumbo et al., 2007). Ces débris vont stimuler la production de chimiokines par les cellules immunitaires résidentes (principalement des macrophages) qui vont ainsi attirer des neutrophiles et des monocytes circulants (Chazaud et al., 2009; Tidball & Villalta, 2010). Ces derniers vont se différencier en macrophages pro-inflammatoires après s'être infiltrés dans le tissu lésé. L'ensemble de ces réactions va modifier le micro-environnement des cellules satellites qui vont s'activer et la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires par les cellules immunitaires comme le  $TNF-\alpha$  va stimuler la prolifération des progéniteurs myogéniques (Arnold et al., 2007a; Costamagna et al., 2015).

La seconde phase est caractérisée par un environnement anti-inflammatoire qui fait suite à un processus actif de résolution de l'inflammation induit par des molécules comme les médiateurs lipidiques pro-résolvant comme les résolvines, qui sont sécrétées par les cellules

immunitaires (Giannakis et al., 2019; Serhan & Chiang, 2008). Les macrophages, en phagocytant les débris cellulaires et les cellules apoptotiques (aussi appelé efferocytose), vont changer de phénotype entraînant une diminution de la production des facteurs pro-inflammatoires associée à une augmentation de la production de facteurs anti-inflammatoires et de facteurs de croissance (Arnold et al., 2007a; Barnig et al., 2022). Ces molécules vont induire la troisième étape dite de réparation en stimulant la différenciation des progéniteurs myogéniques qui vont fusionner pour former de nouvelles fibres musculaires (Wosczyzna & Rando, 2018). La dernière étape correspond à la croissance et maturation de ces nouvelles fibres musculaires permettant le rétablissement de l'homéostasie tissulaire.

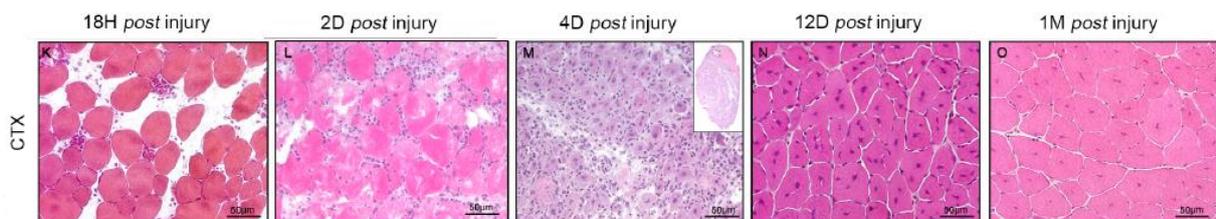
Au cours de la réparation musculaire et de manière coordonnée à la myogenèse, l'angiogenèse correspond à la prolifération et la différenciation des cellules endothéliales qui va permettre la formation de nouveaux vaisseaux sanguins afin de revasculariser le muscle (Latroche et al., 2017). Une matrice extracellulaire transitoire va également être secrétée en quantité importante par les fibroblastes, puis elle sera ensuite remodelée pour aboutir à la formation d'une nouvelle matrice extracellulaire fonctionnelle (Plikus et al., 2021; Yun et al., 2010).



**Figure 23 : Schéma des 4 étapes de la réparation musculaire.** La phase pro-inflammatoire, caractérisée par une infiltration de neutrophile et monocytes Ly6C+ suivie par l'étape de résolution de l'inflammation puis par l'étape de réparation associée à la mise en place des nouvelles fibres musculaires. Ces nouvelles fibres vont mûrir et l'homéostasie du tissu va être retrouvée. (Patsalos et al., 2021)

## 2.2.4. Le modèle de blessure musculaire par injection de cardiotoxine

Afin d'étudier en détail les mécanismes de la réparation musculaire, il est nécessaire de disposer de modèles de blessure chez l'animal qui permettent de reproduire les différentes étapes du processus de réparation musculaire et qui soient hautement reproductibles. Un des modèles de blessure les plus utilisés chez le rongeur est l'injection intramusculaire de myotoxine comme la notexine ou la cardiotoxine (Figure 24 ; Garry et al., 2016; Guardiola et al., 2017). Ces toxines vont induire une nécrose massive des fibres musculaires et vont engendrer l'activation du processus de réparation musculaire, sans traumatisme mécanique (Guardiola et al., 2017). La cinétique de réparation ainsi que les mécanismes moléculaires associés à ces modèles de blessure sont bien décrits dans la littérature et leur utilisation permet donc d'évaluer avec précision les effets de différentes conditions sur le processus de réparation musculaire (Garry et al., 2016).



**Figure 24 : Coupes histologiques de muscle (*Tibialis Anterior*) coloré à l'hématoxyline et l'éosine représentant la cinétique de la réparation musculaire induit par injection de cardiotoxine chez la souris. (Hardy et al., 2016)**

## 2.3. Rôle du sommeil et de l'horloge circadienne sur le tissu musculaire

Comme la plupart des processus physiologiques de notre corps, le tissu musculaire est sous l'influence de rythmes circadiens. Ces rythmes quotidiens sont régulés par un système circadien intrinsèque et ne sont pas seulement des réponses aiguës aux signaux de l'environnement. L'alternance des cycles veille-sommeil et la durée/qualité du sommeil, exercent également un rôle important sur le tissu musculaire, et ses effets sont pour la plupart interconnectés avec les effets des rythmes circadiens. De fait, il est parfois difficile de différencier les effets propres des rythmes circadiens et du sommeil.

### 2.3.1. Activité musculaire et horloge circadienne

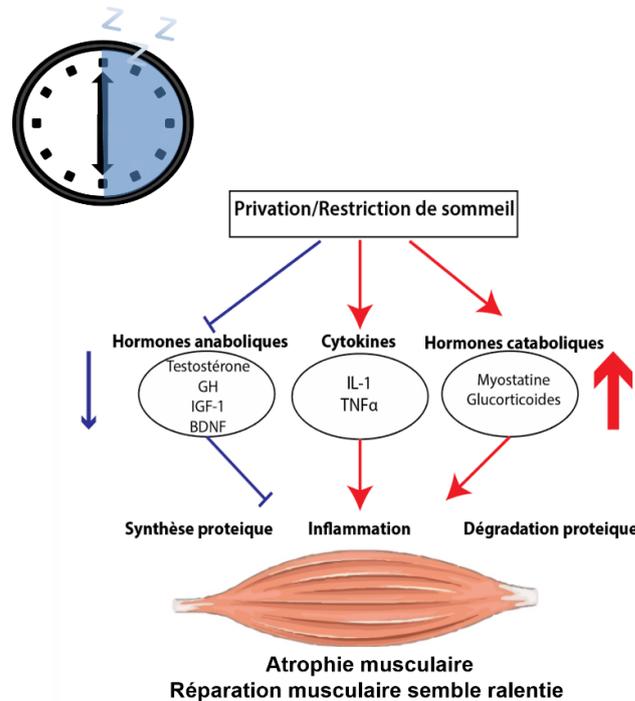
L'activité locomotrice initiée par les muscles squelettiques joue un rôle important dans la synchronisation de notre horloge biologique et participe à la régulation circadienne de l'ensemble de nos rythmes (Dibner et al., 2009; Schibler & Sassone-Corsi, 2002). Des études ont également montré que l'horloge périphérique du muscle joue un rôle majeur au niveau local et participe à la régulation métabolique et fonctionnelle du muscle (Andrews et al., 2010; Chatterjee et al., 2013, 2015; Woldt et al., 2013). L'activité métabolique du muscle squelettique présente un rythme circadien et il semblerait que cela permette de préparer les transitions entre les périodes d'activités et les périodes de repos (Dyar et al., 2014). De plus, la force exercée par les muscles squelettiques est également sujette à des variations circadiennes avec les valeurs les plus élevées en fin de journée (16:00 – 20:00 heures ; Douglas et al., 2021). Un des éléments clé de l'horloge moléculaire, BMAL1 (voir partie 1.4 - *La régulation du sommeil*) est fortement exprimé au niveau musculaire et participe à la régulation de la transcription de nombreux gènes cibles (Chatterjee & Ma, 2016). La suppression de l'expression de BMAL1 induit une altération du métabolisme glucidique (Harfmann et al., 2016) et une atrophie des fibres musculaires (Kondratov et al., 2006; McDearmon et al., 2006). BMAL1 participe également aux processus de réparation musculaire (Chatterjee et al., 2015) et des travaux montrent que la qualité de la réparation musculaire dépend de l'heure de la blessure musculaire (Katoku-kikyo et al., 2021; Zhu et al., 2022).

### 2.3.2. Effet du manque de sommeil sur le tissu musculaire

Le sommeil joue également un rôle important sur la fonction musculaire, sur l'occurrence des blessures musculaires et sur leur réparation. Une étude menée sur 4 mois chez des footballeurs professionnels a montré que la survenue des blessures musculaires était associée à une baisse de la qualité du sommeil la semaine qui précédait la blessure (Nédélec et al., 2019). Une autre étude, menée sur 7576 militaires américains, a montré que la durée de sommeil était associée à l'occurrence de blessures musculaires (Grier et al., 2020). Malgré tout, la plupart des études réalisées sur le lien entre le manque de sommeil et l'occurrence des lésions musculaires sont des études rétrospectives et les mécanismes sous-jacents ne sont pas bien identifiés (Gouttebauge et al., 2016; Milewski et al., 2014). Il semblerait que l'augmentation du risque de blessure à la suite du manque de sommeil provienne d'une combinaison de la dégradation des performances cognitives et des performances physiques (Chennaoui et al., 2021).

Une question encore peu explorée est l'impact que peut avoir le manque de sommeil sur le muscle sain et les processus de la réparation musculaire. Une étude a mis en évidence le développement d'une atrophie musculaire des fibres glycolytiques (IIA et IIB) avec la diminution de la taille des fibres musculaires associée à une augmentation des taux plasmatiques de corticostérone, et une diminution des taux plasmatiques de testostérone en réponse à 96 heures de privation de sommeil paradoxal (Mônico-neto et al., 2015). La même équipe a également montré que 96 heures de privation de sommeil paradoxal induisaient une diminution des taux musculaire d'IGF-1 et semblerait augmenter la durée de la réparation musculaire à la suite d'une blessure musculaire (Mônico-Neto et al., 2017). Une autre étude publiée en 2013 a montré que la privation de sommeil diminue fortement la quantité des facteurs de transcription de l'activation (MyoD) et de la différenciation (Myogénine) des progéniteurs musculaires de la réparation musculaire et entraîne des déficits de la fonction contractile à la suite d'une blessure myotoxique (Schwarz et al., 2013). De nombreuses études ont parallèlement montré que le manque de sommeil (privation aiguë, mais aussi restriction chronique) induit une augmentation des cytokines pro-inflammatoires, IL-6, IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  (Chennaoui et al., 2011; Haack et al., 2007; Tobaldini et al., 2019; Venancio & Suchecki, 2015) qui pourrait jouer un rôle délétère lors de la réparation musculaire. En effet, la mise en place d'une inflammation chronique est associée au niveau musculaire, à l'accumulation d'éléments

de la MEC (notamment le collagène) qui conduit à une fibrose et réduit la capacité de réparation des cellules souches musculaires (Figure 25 ; Mann et al., 2011). Une étude a également montré, à la suite d'un exercice intensif, que la privation de sommeil réduisait la synthèse protéique, ce qui diminue la capacité de réparer les dommages musculaires induits par l'exercice (Yang et al., 2019).

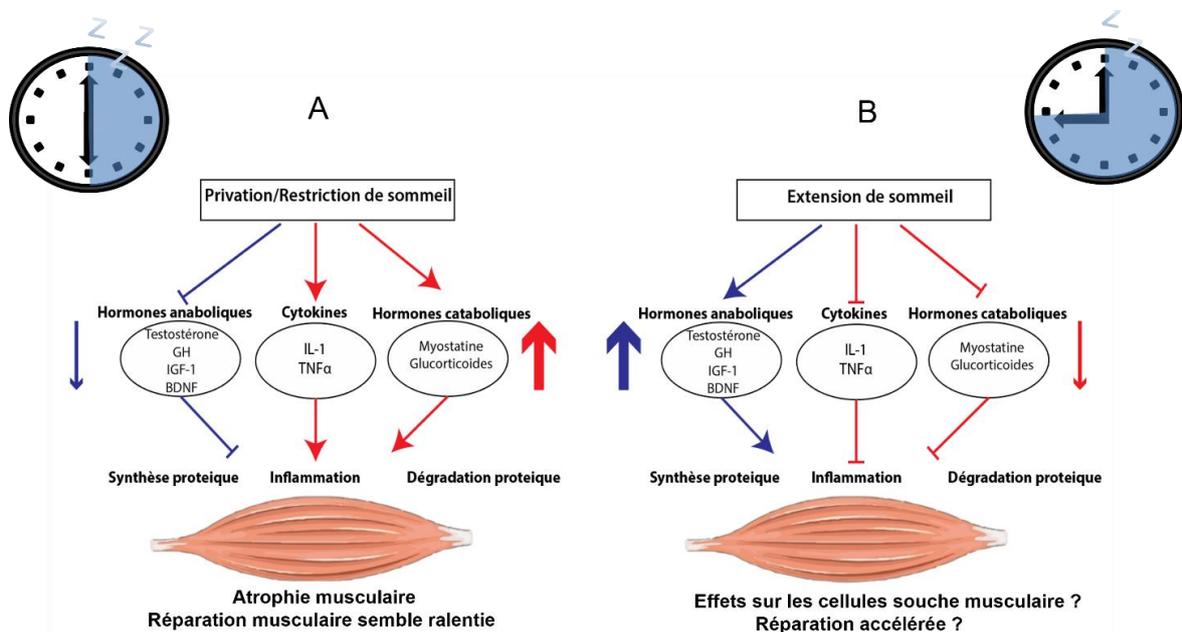


**Figure 25 : Mécanismes potentiels du manque de sommeil sur le muscle.** Le manque de sommeil induit une diminution des hormones anaboliques comme IGF-1 et la testostérone et augmente les niveaux de cytokines pro-inflammatoires comme IL-1 et TNF- $\alpha$  ainsi que les taux d'hormones cataboliques comme le cortisol. Cela entraîne au niveau musculaire, une réduction de la synthèse protéique, une augmentation de l'inflammation et de la dégradation protéique qui engendrent une atrophie musculaire. Ces mécanismes pourraient également altérer la réparation musculaire qui a lieu après la survenue d'une blessure musculaire (traduit et adapté de Dattilo et al., 2011).

### 2.3.3. Effets potentiels de l'extension de sommeil sur le tissu musculaire

À l'inverse du manque de sommeil qui semble procatabolique, l'augmentation de la durée de sommeil ou « extension » de sommeil induit une augmentation des taux plasmatiques et musculaires d'IGF-1 (voir Partie 1.7. *L'extension de sommeil*). Une supplémentation en IGF-1 au niveau musculaire permet de stimuler la croissance musculaire (Ascenzi et al., 2019; Machida & Booth, 2004a) et semble être bénéfique au processus de réparation musculaire (Senesi et al., 2013; Song et al., 2013). IGF-1 est impliqué dans l'activation, la prolifération et

la différenciation des cellules souches musculaires (Mourkioti & Rosenthal, 2005). Il joue également un rôle clé dans la résolution de l'inflammation et la transition des macrophages pro-inflammatoires vers un profil anti-inflammatoire qui est primordial pour une réparation musculaire efficiente (Tonkin et al., 2015). Ainsi, contrairement au manque de sommeil, l'extension de sommeil induit une augmentation des hormones anaboliques et pourrait permettre une diminution des cytokines pro-inflammatoires et des hormones cataboliques. On peut faire l'hypothèse que ces effets seraient favorables au maintien de la masse musculaire, et aux mécanismes associés à la réparation musculaire (Figure 26).



**Figure 26 : Effets potentiels de l'extension de sommeil et de ses conséquences sur le muscle.** À l'inverse du manque de sommeil (A), l'extension de sommeil (B) induirait une augmentation des taux d'hormones anabolisantes et semblerait avoir un effet positif sur la régulation de l'inflammation chronique et des hormones cataboliques. La mise en place de cet environnement anabolique pourrait être bénéfique au maintien de la masse musculaire et/ou aux processus de réparation musculaire qui se mettent en place à la suite d'une lésion. (partie A traduite et adaptée de Dattilo et al., 2011, partie B hypothèses à partir de Chennaoui et al., 2021).



# OBJECTIFS ET PROBLÉMATIQUES

---

## Étude n°1 :

### Sommeil et blessure

Il existe très peu de données décrivant les effets d'une blessure musculaire sur le sommeil, qui survienne pourtant fréquemment dans la population générale et notamment chez les sportifs. Dans cette étude, nous avons étudié, chez l'animal, l'impact d'une lésion musculaire sur l'architecture et les mécanismes de régulation du sommeil. Ces connaissances peuvent permettre d'établir des recommandations adaptées sur la gestion du sommeil après une blessure musculaire. Mais également, de comprendre davantage les interactions systémiques fondamentales impliquant des molécules participant au processus de réparation d'une blessure et à la régulation du sommeil.

**L'objectif principal de cette première étude était de caractériser les changements de la macro et de la microstructure du sommeil de l'animal en réponse à une blessure musculaire.**

**L'objectif secondaire était d'identifier les mécanismes de la régulation du sommeil impliqués dans les potentielles variations de la structure du sommeil en réponse à la blessure musculaire.**

## **Étude n°2 :**

### **Validation d'une nouvelle méthode non invasive pour analyser le sommeil chez le rat**

La méthode de référence pour l'étude du sommeil est basée sur l'enregistrement de l'EEG couplé à l'enregistrement de l'EMG. Cela nécessite de réaliser une chirurgie afin d'implanter des électrodes au niveau cérébral et au niveau musculaire. La réalisation de l'acte chirurgical, ainsi que la présence de corps étranger (électrodes/implant) de manière chronique, peuvent provoquer une réponse immunitaire et générer une inflammation chronique. L'étude détaillée des processus associés à la réparation musculaire peut être perturbée par cette inflammation chronique. Ainsi, afin d'avoir la possibilité d'évaluer le temps de sommeil des animaux tout en étudiant les mécanismes associés à la réparation musculaire de manière optimale, il est nécessaire d'utiliser une méthode non invasive qui permet d'analyser le temps de sommeil des animaux.

**L'objectif de cette étude consistait à évaluer la performance d'un système piézoélectrique afin d'étudier la structure du sommeil chez le rat.**

## **Étude n°3 :**

# **Intérêt de l'allongement de la photopériode pour la récupération d'une blessure musculaire**

L'optimisation de la récupération d'une blessure est un enjeu majeur tout d'abord pour favoriser la guérison, mais également pour minimiser le temps d'incapacité induit par la lésion et permettre une reprise rapide de l'entraînement ou des opérations militaires. De récents travaux ont montré que l'extension de sommeil diminue la sensibilité à la douleur et pourrait être bénéfique à la récupération d'une blessure musculaire (Simonelli et al., 2019 ; revue Chennaoui et al., 2021). Notre étude précédente (Étude n°1) a montré une augmentation du temps de sommeil en réponse à une blessure musculaire induite par injection d'une myotoxine chez le rat. Nous avons étudié la possibilité de potentialiser cette réponse adaptative du sommeil à la blessure par de l'extension de sommeil induit par un allongement de la photopériode. Ensuite, nous avons évalué les potentiels bénéfiques de cette potentialisation sur la récupération de la blessure musculaire.

**Le premier objectif de cette étude était d'évaluer la possibilité de réaliser de l'extension de sommeil sur des animaux après réalisation d'une blessure musculaire par injection de myotoxine.**

**Le deuxième objectif était d'évaluer les effets de l'allongement de la photopériode sur la sensibilité à la douleur pour les animaux blessés.**

**Le troisième objectif de cette étude était d'évaluer les effets de l'allongement de la photopériode sur des paramètres biologiques et histologiques de la réparation musculaire.**

**« Le sommeil est le seul don gratuit  
qu'accordent les dieux »**

Plutarque (46 – 125)

# ÉTUDE N°1

---

## Sommeil et blessure

# Résumé

Le sommeil est un état physiologique primordial pour la santé et le bien-être des mammifères (Simon & Walker, 2018; Grandou et al., 2019; Kecklund & Axelsson, 2016). Cependant, s'il est communément admis aujourd'hui qu'un sommeil de qualité est nécessaire pour la récupération d'une blessure musculaire, ou encore qu'une blessure pourrait être un facteur dégradant la qualité de sommeil, les interactions entre le sommeil et la blessure musculaire sont très peu décrites dans la littérature.

L'objectif de cette première étude était de caractériser, chez le rat, **les modifications des paramètres du sommeil en réponse à une blessure musculaire induite par injection d'une myotoxine**. Pour se faire, l'électroencéphalogramme (EEG) et l'électromyogramme (EMG) de **24 rats Wistar** ont été enregistrés avant (de J-3) et après (jusqu'à J+8) réalisation d'une lésion musculaire par injection de cardiotoxine dans le muscle *Tibialis Anterior* [**n=8 par groupe**, contrôle (CTL), contrôle + buprénorphine (CTL+Bup) et blessure (BLS)]. À partir de ces enregistrements EEG/EMG, nous avons analysé des **paramètres du sommeil** : le temps total de sommeil (TTS), le temps passé par stade de sommeil ainsi que la puissance et la fréquence de chaque bande de fréquence (delta, thêta, alpha, bêta) au cours du sommeil. Outre ces paramètres, nous nous sommes intéressés à la **stabilité du sommeil** en étudiant notamment les quantités d'épisodes de sommeil/éveil en fonction de leur durée, et nous avons également analysé **les paramètres des spindles** (densité, durée, amplitude, fréquence), qui sont en lien avec la stabilité du sommeil (Fernandez & Lüthi, 2020). L'ensemble de ces analyses a été mené par périodes de 24h ainsi qu'en isolant les périodes lumineuses (périodes préférentielles de sommeil chez le rat) et les périodes d'obscurité (périodes préférentielles d'activité chez le rat).

Nos résultats mettent en évidence une **augmentation du temps de sommeil lent 48 et 72h après l'induction de la blessure**. Cette augmentation se produit **spécifiquement durant la période d'obscurité** et est associée à une **plus grande stabilité du sommeil durant les 24 premières heures post-blessure**. Les caractéristiques spectrales du sommeil lent/paradoxal ainsi que les paramètres des spindles ne sont pas significativement modifiés dans la condition BLS.

Afin **d'identifier les mécanismes biologiques impliqués** dans cette augmentation du temps de sommeil lent, nous avons réalisé des **prélèvements sanguins et tissulaires 48h après**

**l'induction de la blessure musculaire** sur d'autres animaux cette fois-ci non implantés en EEG/EMG (n=16). Des molécules impliquées à la fois dans la régulation du sommeil et la réparation musculaire (notamment : TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IGF-1, BMAL1) ont été dosées dans le plasma, le cortex frontal, l'hippocampe et les muscles *Tibialis Anterior*. Ces résultats ont permis de mettre en évidence deux pistes mécanistiques qui peuvent être impliquées dans l'augmentation du temps de sommeil lent observée en réponse à la blessure : la diminution du contenu en d'IGF-1 au niveau cérébral et la diminution de BMAL1 au niveau musculaire.

## 3.1. Matériel et Méthodes

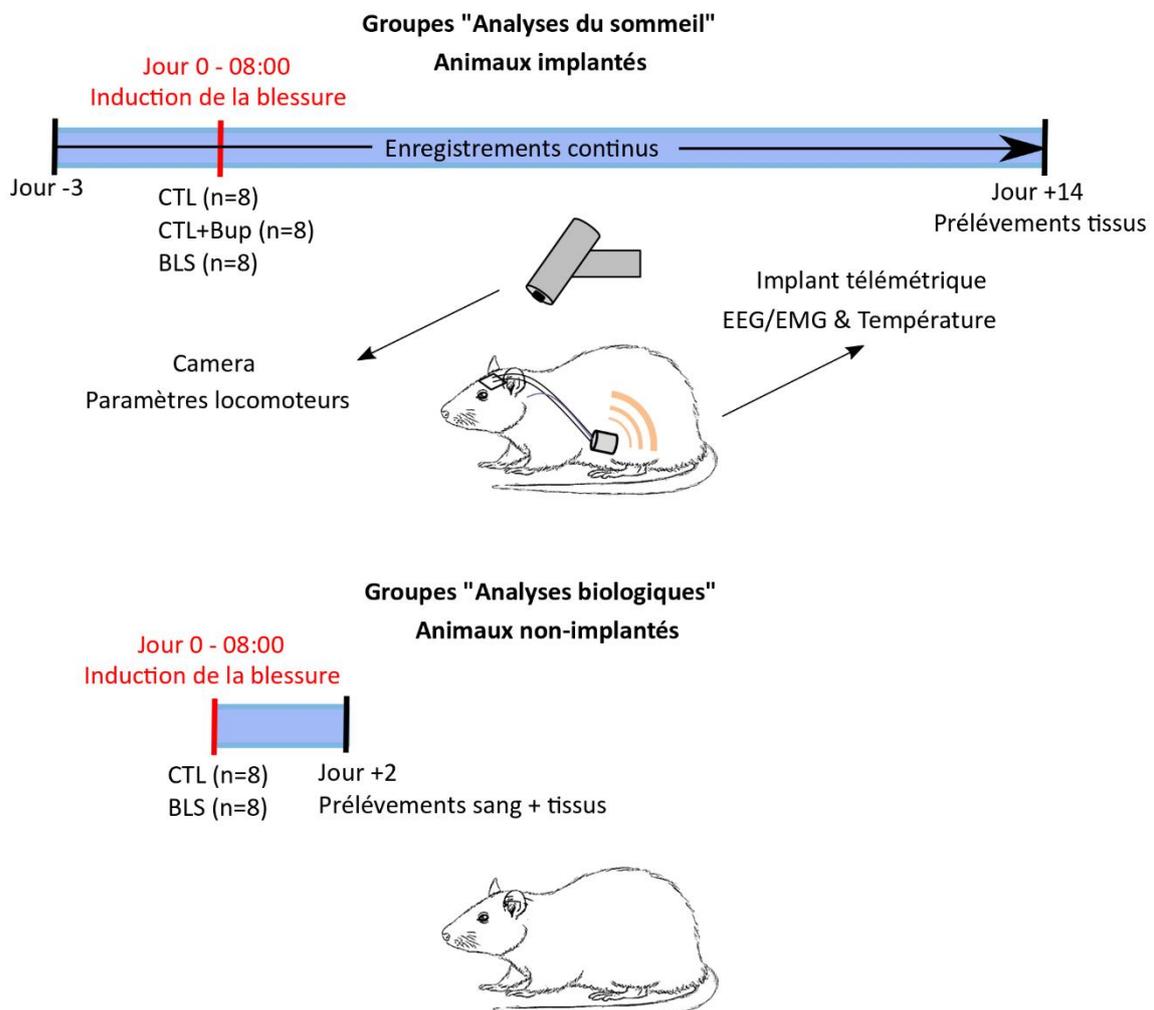
### 1 - Protocole expérimental et induction de la blessure

Cette étude a été réalisée sur **40 rats Wistar mâles** (provenant du laboratoire de Charles Rivers, France) âgés de 4 semaines et pesant entre 200 et 220 grammes à leur arrivée. Après une semaine d'acclimatation, les animaux ont été placés à 4 par cage (612 x 435 x 216 mm) avec 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité (allumée à 08:00 et éteinte à 20:00) avec une température ( $21^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) et une ventilation (ACH 70) contrôlée. La nourriture et l'eau étaient disponibles à volonté. Les animaux ont été séparés en deux groupes principaux, un groupe **d'animaux implantés en EEG/EMG pour l'analyse des paramètres sommeil** (n=24) et un groupe **d'animaux non implantés pour les analyses biologiques** (n=16 ; Figure 28).

**Groupes « Analyses du sommeil ».** Les animaux ont été implantés avec un émetteur télémétrique pour enregistrer l'EEG/EMG et la température. Après l'opération les animaux ont été placés dans des cages individuelles dans des armoires ventilées (BIO-C36, Techniplast, Buguggiate, Italie) pour une période de récupération de 10 jours. Les animaux ont ensuite été séparés en trois groupes de 8 animaux : un groupe contrôle (CTL), un groupe contrôle + buprénorphine (CTL+Bup) et un groupe blessure (BLS). Les enregistrements télémétriques ont démarré trois jours avant l'induction de la blessure (J-3) pour les groupes CTL et BLS et un jour avant (J-1) pour le groupe CTL+Bup. À J0, à 08:00, les animaux de chaque groupe ont été anesthésiés pendant 10 minutes avec du vetflurane (1-2%). Les animaux BLS ont reçu une injection de 400 $\mu\text{L}$  (à 10  $\mu\text{M}$ , réalisée en deux points d'injections de 200 $\mu\text{L}$ ) de cardiotoxine dans le muscle *Tibialis Anterior* droit, sans ouverture de la peau et une unique injection sous-cutanée de buprénorphine (0,05mg/kg) pour l'analgésie. Les animaux CTL+Bup ont reçu la même injection de buprénorphine (0,05mg/kg). Les animaux du groupe CTL n'ont reçu aucune injection (Bigard et al., 1997). Les animaux CTL et BLS ont été euthanasiés 14 jours après l'induction de la blessure et nous avons collecté les muscles *Tibialis Anterior* droit et gauche.

**Groupes « Analyses biologiques ».** Les animaux ont été séparés en deux groupes d'animaux, un groupe CTL (n=8) et un groupe BLS (n=8) et ont respectivement suivi la même procédure de blessure que les animaux CTL et BLS des groupes « animaux implantés », mais n'ont pas été implantés avec un émetteur de télémétrie. Les animaux ont été euthanasiés deux jours après l'induction de la blessure et nous avons collecté un volume sanguin, les *Tibialis Anterior*

droit et gauche, le cortex frontal et l'hippocampe. L'étude a été approuvée par le comité d'éthique institutionnel de l'IRBA (DAP\_11-2019).

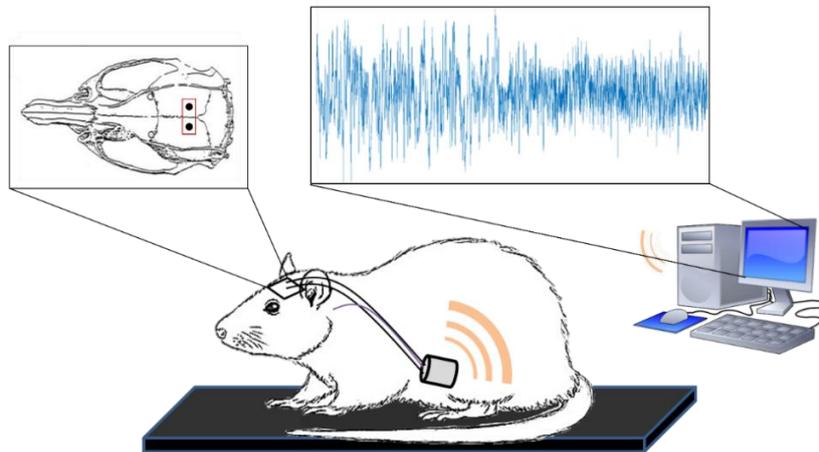


**Figure 28 : Schéma du protocole expérimental.** Les animaux des groupes « **Analyses du sommeil** » ont été implantés avec un émetteur de télémétrie. Les enregistrements télémétriques (EEG/EMG/Température) et vidéo (paramètres locomoteurs) sont réalisés en continu à partir de J-3 jusqu'au jour de l'euthanasie (J+14 ; à l'exception du groupe CTL+Bup qui est enregistré de J-1 à J+3). Les animaux des groupes « **Analyses biologiques** » ne sont pas implantés avec un émetteur de télémétrie. La blessure par injection de cardiotoxine (et l'injection de buprénorphine pour les groupes concernés) est réalisée à 08:00 (début de la période lumineuse) à J0.

## 2 - Implantation chirurgicale de l'émetteur de télémétrie

Afin d'enregistrer l'EEG/EMG et la température des animaux, nous avons implanté les animaux des groupes « **Analyses du sommeil** » avec un émetteur de télémétrie HD-02X (Data Sciences International, St Paul, USA). Cet émetteur permet d'enregistrer et de recueillir les signaux en Wifi et donc de laisser les animaux libres de leur mouvement pendant toute la durée de l'expérimentation. Les animaux ont reçu une prémédication avec une injection sous-cutanée de buprénorphine (0,05mg/kg), puis 40 min après, une injection intrapéritonéale

infra-anesthésique de kétamine (25mg/kg) et de dexmédétomidine (0,04mg/kg). Pendant l'opération, du vetflurane (1-2%) pouvait être ajouté en fonction des paramètres physiologiques de l'animal (fréquence respiratoire, fréquence cardiaque et température) pour éviter son réveil. Après désinfection, le crâne est incisé (3-4 cm), l'émetteur est glissé sous la peau de l'animal et placé en position dorsale pour éviter au maximum de gêner les mouvements de l'animal. 400  $\mu$ L de duplocilline (MSD) sont injectés au niveau du corps de l'émetteur afin de prévenir les infections. Une électrode bipolaire est placée au niveau des muscles du cou afin d'enregistrer l'activité musculaire de l'animal. La seconde électrode bipolaire est positionnée au niveau du cortex somato-moteur (-2 mm A/P,  $\pm$ 2 mm latéraux par rapport au bregma). Les électrodes sont ensuite fixées à l'aide de vis (0-80 x 1/16, Phymep, France) et scellées dans du ciment dentaire (TempBond, Kerr, USA).



**Figure 29 : Représentation schématique de l'implantation télémetrique et des enregistrements EEG.** L'émetteur est implanté en sous-cutané au niveau dorso-latéral de l'animal. Il est relié à une électrode bipolaire placée en contact avec le cortex somato-sensoriel pour enregistrer l'EEG et une autre électrode bipolaire placée au niveau des muscles du cou pour enregistrer l'EMG. Les signaux sont transmis par wifi à l'ordinateur d'enregistrement (la plaque noire sous l'animal sert de relai pour la transmission des signaux à l'ordinateur).

### 3 - Euthanasie, analyses histologiques et dosages biochimiques

**Groupes « Analyses du sommeil ».** Les animaux (n=24) ont été sacrifiés par décapitation, avec une anesthésie préalable faite au vetflurane (2% dans la cage à induction, 5 min). Les muscles *Tibialis Anterior* ont été prélevés sur glace, congelés dans l'isopentane (-100°C) et stockés à -80°C. Des coupes de 8  $\mu$ m ont été réalisées au cryostat (CryoStar, NX70, EpreDia). Les immunomarquages anti-laminine et Dapi ont été réalisés sur ces coupes, avec un blocage d'une heure avec de l'Emerald (#936B-08 Sigma-Aldrich, É.-U.). Ensuite, les coupes ont été incubées avec l'anticorps primaire anti-Laminine ([1/200] Rabbit anti-Laminine #ab11575, Abcam) pendant toute la nuit min à +4°C. Le lendemain, après des lavages, les coupes ont été

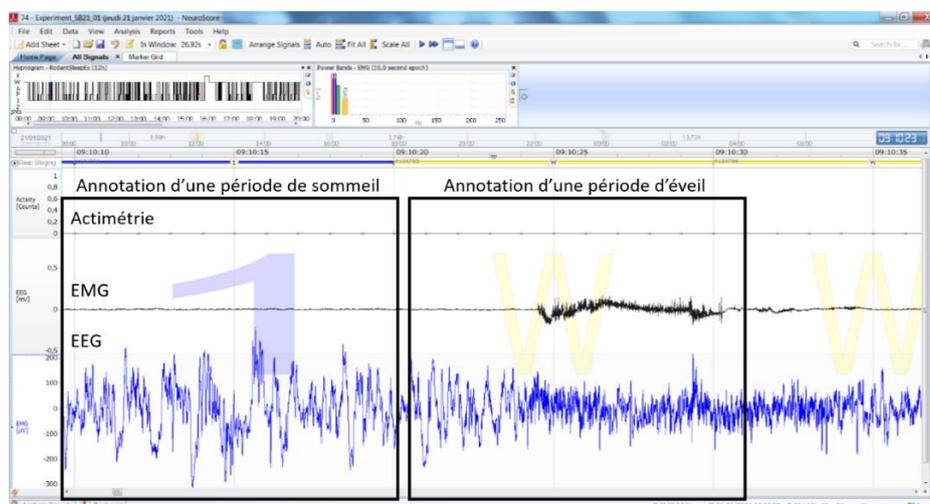
incubées avec l'anticorps secondaire ([1/500] Donkey anti-rabbit Alexa Fluor 488 #A21206, ThermoFisher) pendant 1 heure à température ambiante. Les lamelles ont ensuite été montées avec un milieu contenant du Dapi (#ab104139). Les coupes ont été scannées (10X, Axioscan Z1, Zeiss, Allemagne) et le pourcentage de la zone blessée a été calculée manuellement sur FIJI comme étant : la surface totale contenant des noyaux centraux / surface totale du muscle. Nous avons également réalisé, sur automate, des colorations Hémalum-Phloxine-Safran (HPS) en plongeant les coupes dans l'Hémalum (pour 100 mL : 0,2g Hematein, 5g Alun de potassium, 2 mL acides Acétique, 98 mL d'eau distillée), ensuite dans la Phloxine (0,5g/100mL) et le Safran (2g/1000mL) avec une déshydratation à l'alcool (70% ; 95% ; 100%).

**Groupes « Analyses biologiques ».** Les animaux (n=16) ont été sacrifiés par décapitation, sans anesthésie préalable. Le sang a directement été récupéré et centrifugé à 3000g pendant 10 minutes afin de séparer le plasma et des aliquots ont été réalisés et conservés à -80°C pour des analyses biochimiques ultérieures. Le cortex frontal et l'hippocampe ont été prélevés sur glace et directement plongés dans de l'azote liquide. Les muscles *Tibialis Anterior* droits (correspondants aux muscles lésés) ont été prélevés sur glace puis coupés en deux, une moitié étant dédiée aux analyses histologiques (congelée dans l'isopentane à -100°C et stockée à -80°C) et l'autre moitié aux dosages biochimiques (plongée dans l'azote liquide et stockée à -80°C). Pour les dosages biochimiques, chaque tissu (musculaires et cérébraux) a ensuite été décongelé et broyé dans un milieu de broyage spécifique (Ph 7,4 ; 25Mm Hepes ; 0,1% CHAPS ; 5Mm MgCl<sub>2</sub> ; 0,3μM Aprotinine ; 1Mm Leupetine ; 14μM E64 ; 130μM Bestatine ; 1Mm EDTA ; 2Mm AEBSF). Le contenu total en protéines de chaque surnageant a été évalué selon l'absorbance à 795 nm (BioDrop). Les concentrations en TNF-α, IL-1β, CXCL1, IL-2 et IL-10 des tissus et du plasma ont été mesurées en utilisant un ELISA multiplex (Simoa Planar Array Assay Rat Cytokines Panel 1, SP-X, Quanterix). Les concentrations en IGF-1, TGF-β (libre et total), VEGF, et BMAL1 ont été quantifiées à l'aide de kits ELISA (IGF-1 : MG100, R&D systems ; TGFβ libre : Legend Max, Biolegend ; TGF-β total : Legend Max, BioLegend ; VEGF : ERVEGFA, Invitrogen ; BMAL1 : MBS1607686, MyBioSource) pour le muscle *Tibialis Anterior*, le cortex frontal, l'hippocampe et le plasma (hormis pour BMAL1). Pour la partie histologique, des cryocoupes de 8 μm ont été réalisées au cryostat (CryoStar, NX70, Eppredia). Puis nous avons

réalisé des colorations HPS sur automate comme celui décrit pour les animaux « **Analyses du sommeil** ».

#### 4 - Analyse des signaux EEG/EMG/Température

Nous avons enregistré les signaux EEG/EMG et la température émis par l'émetteur télémétrique avec le logiciel NeuroScore 6.0 (Data Sciences International, St Paul, MN, USA). Les signaux EEG/EMG ont été enregistrés avec une fréquence d'échantillonnage de 500Hz et la température avec une fréquence d'échantillonnage de 10Hz. Les signaux EEG ont été filtrés avec un filtre de type band-pass (0,3-49Hz) et l'état de l'animal (Éveil/Sommeil lent/Sommeil paradoxal) a été défini par périodes de 10 secondes à partir d'une analyse visuelle, sur le logiciel Neuroscore. Cette classification a été réalisée pour les 24 animaux implantés, à partir de trois jours avant la blessure (J-3) jusqu'à 8 jours après la blessure (J+8) pour les animaux CTL et BLS, et de J-1 à J+3 pour les animaux CTL+Bup. Ce qui correspond à une classification sur un total de 232 jours, et à un nombre total de **2 004 480 périodes de 10 secondes annotées visuellement** pour les 24 animaux. La classification a été faite selon les caractéristiques des signaux EEG/EMG. L'éveil est défini en EEG/EMG par des fréquences rapides en EEG (8-35 Hz), variables et très peu amples, et un signal ample et variable en EMG. À l'inverse, le sommeil lent est caractérisé par des ondes lentes en EEG (0,5-4Hz), très amples, la présence de complexe K et de *spindles*, et un signal EMG de faible amplitude. Le sommeil paradoxal est caractérisé par une forte présence d'onde thêta (4-8Hz) en EEG et une absence totale de signal en EMG.

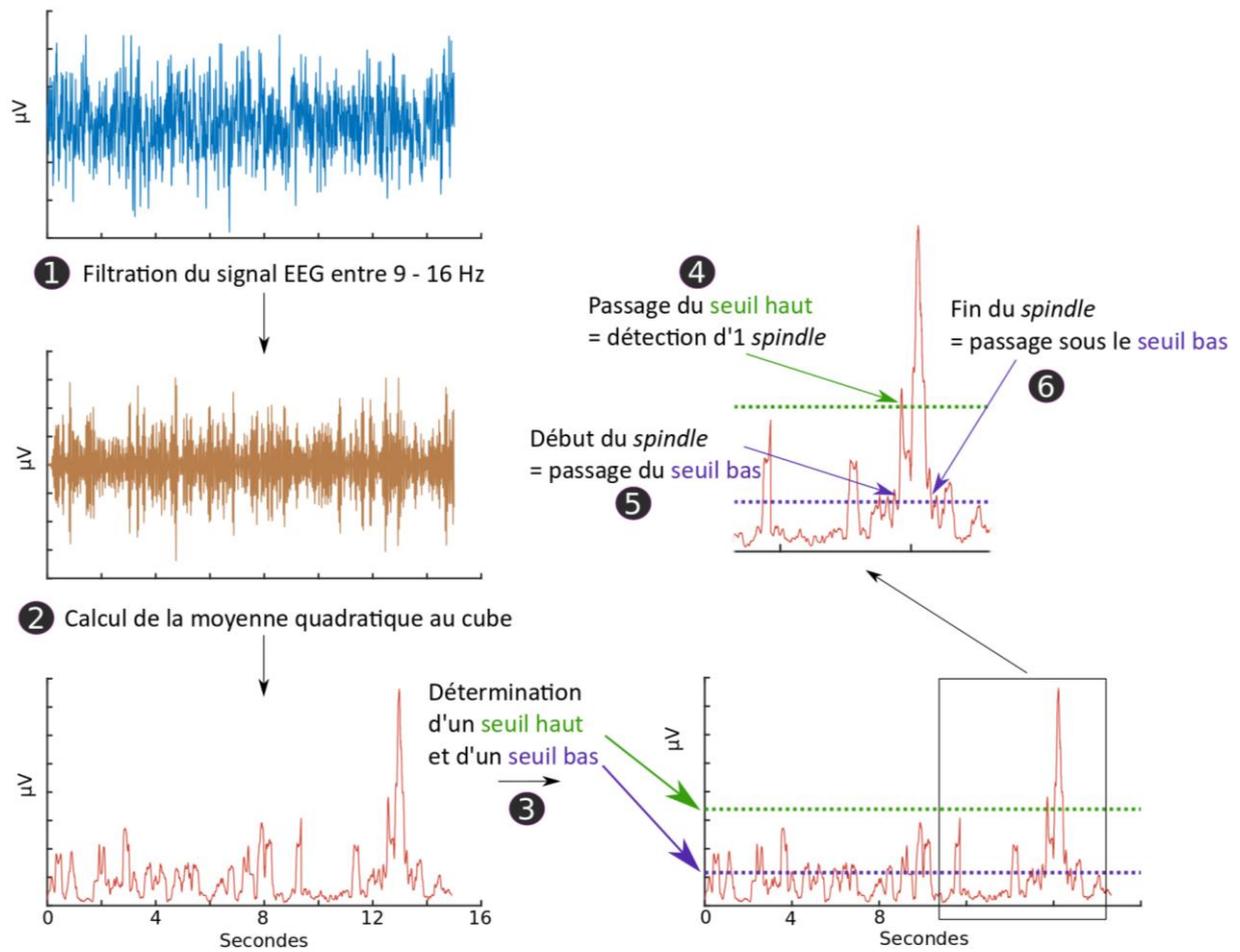


**Figure 30 : Interface du logiciel neuroscore® pour l'annotation visuelle de l'état de vigilance.** Annotation visuelle de l'état de l'animal en fonction du signal EEG (en bleu) et du signal EMG (en noir) et de l'actimétrie (en gris) par périodes de 10 secondes.

Le temps total de sommeil est calculé pour chaque heure en additionnant le temps passé en sommeil lent et le temps passé en sommeil paradoxal. De plus, pour chaque heure, la durée de chaque épisode d'éveil, de sommeil lent ou de sommeil profond, a été calculée et divisée par le temps passé dans l'état correspondant.

## **5 - Analyse spectrale et détection automatique des *spindles* du signal EEG**

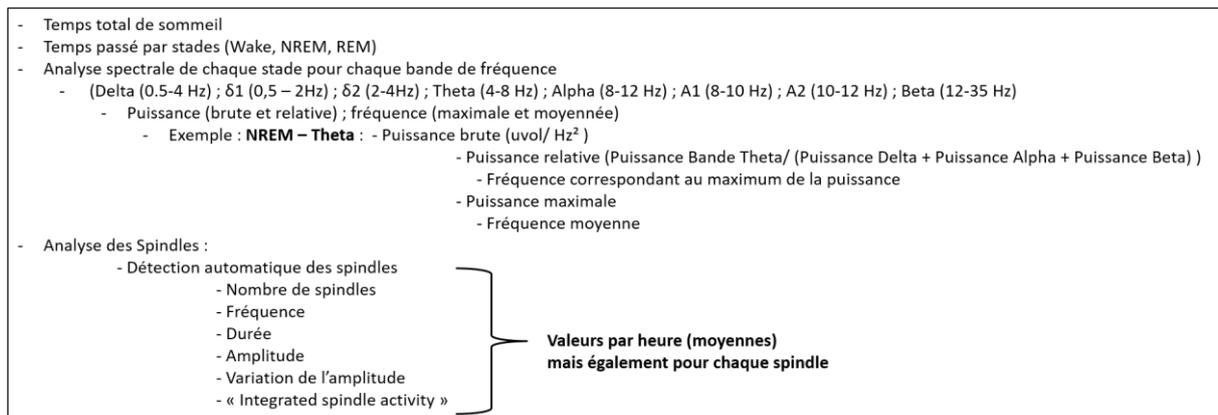
Pour chaque heure d'enregistrement, nous avons regroupé les périodes associées au sommeil lent, au sommeil paradoxal et à l'éveil. Puis nous avons appliqué une transformée de Fourier (FFT) avec la méthode de Pwelch (avec une fenêtre glissante de 2 secondes et 50% de recouvrement). Pour chacun des trois états (éveil/sommeil lent/sommeil paradoxal), nous avons réalisé nos analyses pour les 4 bandes de fréquences caractéristiques : delta (0,5-4Hz) ; thêta (4-8Hz) ; alpha (8-12Hz) ; bêta (12-35Hz), de plus, pour le sommeil lent nous avons fait la distinction entre les ondes delta lentes ( $\delta_1$  : 0,5 – 2Hz) et les ondes delta plus rapides ( $\delta_2$  : 2 – 4Hz) et pour l'éveil nous avons distingué l'alpha lent (8 - 10Hz) de l'alpha rapide (10 - 12Hz). Nous avons également analysé les paramètres de la bande de fréquence gamma (60 – 90Hz) pendant l'éveil. Pour chaque bande de fréquence, nous avons calculé : la densité de la puissance spectrale absolue ( $V^2/Hz$ ), la puissance relative (par rapport aux autres bandes de fréquence), la fréquence moyenne (Hz), la puissance maximale ( $V^2/Hz$ ) et la fréquence correspondante à la puissance maximale (Hz). Nous avons également réalisé une analyse des *spindles* en utilisant la méthode de détection automatique décrite par Uygun et al., 2019 et présentée dans la figure 31.



**Figure 31 : Méthode de détection automatique des *spindles*.** La première étape consiste à filtrer le signal EEG entre 9 et 16 Hz **1**, puis à calculer la moyenne quadratique au cube (RMS<sup>3</sup>) de ce signal filtré **2** et à déterminer la valeur d'un seuil haut **3** (3,5\*moyenne de la RMS<sup>3</sup> sur l'ensemble du signal) et d'un seuil bas (1,2\*moyenne de la RMS<sup>3</sup> sur l'ensemble du signal). Un *spindle* est détecté chaque fois que le seuil haut est franchi **4** et le début du *spindle* correspond alors au franchissement du seuil bas préalable au franchissement du seuil haut **5**. La fin du *spindle* correspond au passage sous le seuil bas postérieur au franchissement du seuil haut **6**. Cette méthode de détection automatique est issue des travaux de Uygun et al., 2019.

Nous avons mené ces analyses en écrivant des algorithmes avec le logiciel MatLab®, la figure 32 résume l'ensemble des paramètres que nous avons analysés à partir des signaux EEG/EMG.

### Analyse heure par heure avec un algorithme écrit sous MatLab

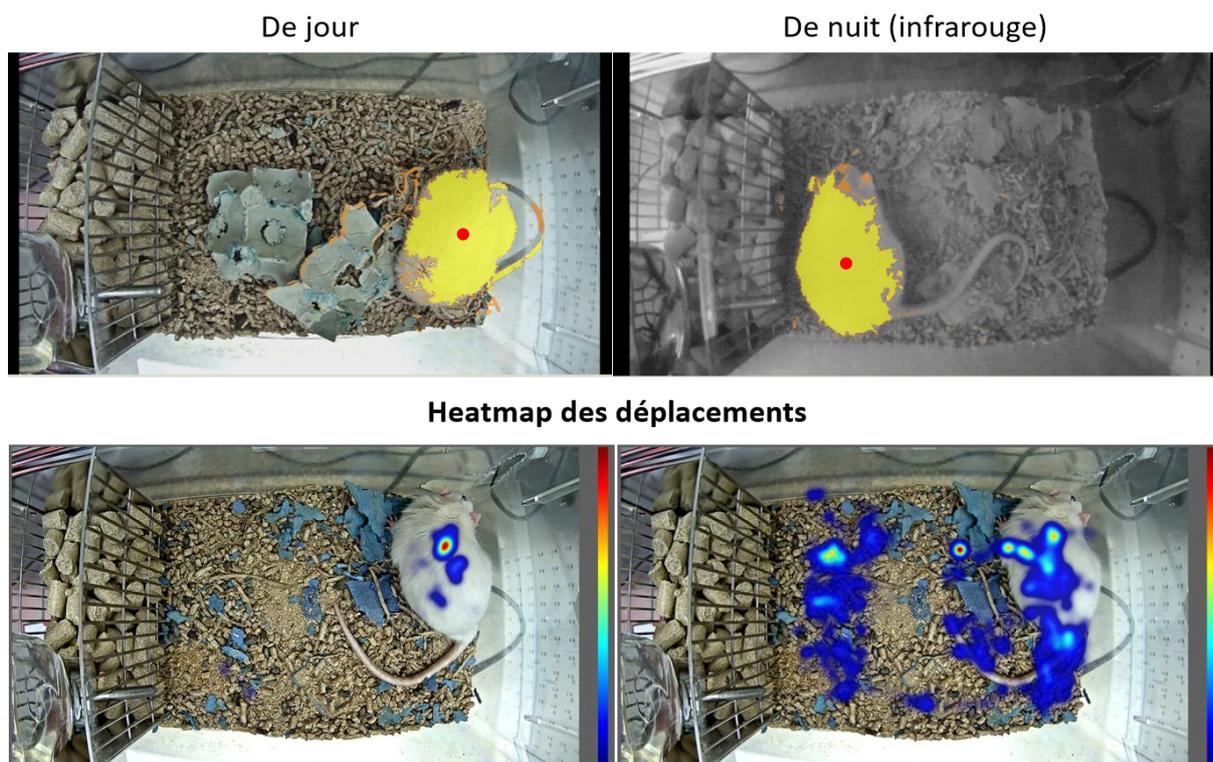


**Figure 32 : Détail de l'ensemble des paramètres du sommeil et de l'éveil analysés à partir des signaux EEG/EMG.**

## 6 - Enregistrements et analyses des vidéos

Les animaux des groupes « **Analyses du sommeil** » ont également été filmés en continu de J-3 à J+14 par des caméras Axis P1365 Mk II avec des illuminateurs infrarouges RayTec (VAR2-IA-1C, RayTec, Ashington, Royaume-Uni) pour les périodes nocturnes. Les vidéos (30 FPS, 1920x1080 px) ont ensuite été découpées heure par heure et analysées avec le logiciel EthoVision (EthoVision XT 15.0, Noldus, Wageningen, Pays-Bas). Sur chaque image, la détection automatique de l'animal est effectuée par contraste de pixel. De fait, il a fallu optimiser la couleur de chaque élément présent sur la vidéo (litière, grille des cages ...) pour augmenter le plus possible le contraste entre les animaux (les rats Wistar sont blancs) et le reste de l'image (voir Figure 33). Cela nous a permis de calculer la distance parcourue par heure pour chaque animal (« combien » l'animal bouge), et également le pourcentage du corps de l'animal qui est en mouvement par heure (« comment » l'animal bouge).

## Détection de l'animal par contraste d'image avec EthoVision



**Figure 33 : Analyses vidéo pour détecter la position des animaux et quantifier leurs déplacements.** La détection des animaux se fait par contraste et permet d'identifier la position de l'animal, que ce soit de jour (à gauche) ou de nuit avec un éclairage infrarouge (à droite). Le suivi image par image du point central de l'animal (point rouge) permet de calculer, après calibration de la taille de la cage, la distance parcourue par l'animal au cours de l'enregistrement vidéo. De plus, la détection du corps entier de l'animal (zone jaune) permet d'évaluer le pourcentage du corps de l'animal qui est en mouvement quand l'animal se déplace.

### 7 - Analyses statistiques

L'ensemble des analyses statistiques concernant les analyses du mouvement et de la température ont été menées en utilisant des statistiques par permutations (Maris & Oostenveld, 2007) réalisées en développant notre propre algorithme sur Matlab (2019b, MathWorks). Tous les autres résultats qui sont associés à des séries temporelles, mais avec des moyennes journalières (temps de sommeil, fragmentation du sommeil, poids des animaux) ont été analysés à l'aide d'ANOVAs normales ou d'ANOVA de Friedman dans le cas de données non normales, réalisées sur Jamovi (1.6.23). La normalité des données a été vérifiée à l'aide du test de Shapiro-Wilk, et l'homogénéité des variances par le test de Levene. Les comparaisons de deux moyennes (poids du muscle, dosages biochimiques) ont été réalisées à l'aide du test de Student si les données suivaient la loi normale et présentaient des variances similaires, et à l'aide du test de Mann-Whitney sinon. Les analyses de corrélation ont été réalisées en calculant le coefficient de corrélation de Pearson.

**Les statistiques par permutation** (Maris & Oostenveld, 2007). Cette approche statistique est une alternative aux analyses de variances classiquement utilisées (ANOVA classique et ANOVA de Friedman). Elle permet notamment de réaliser des analyses statistiques cohérentes sur des séries temporelles, en s'affranchissant des limites déterminées par l'erreur de type I (la « family wise error rate (FWER) »). Une série temporelle comme notre analyse de la température sur 4 jours, où nous avons calculé une moyenne afin d'avoir un point de mesure par 5 min par groupe (ce qui donne donc 288 points par jour et 1 152 pour 4 jours), reste assez compliquée à aborder d'un point de vue statistique. La première limite vient du fait que la sensibilité de l'ANOVA pour détecter des variations fugaces sur de longues séries temporelles est contrainte par le nombre de points composant la série temporelle. De plus, si l'ANOVA détecte des différences, l'utilisation de test post-hoc (test de Tukey, Durbin-conover, ...) est contrainte par la FWER, puisque s'il fallait réaliser 1 152 tests post-hoc dans notre cas, la correction du risque  $\alpha$  à appliquer serait très conservatrice (pour un  $\alpha$  de 0,05 cela donnerait  $0,05/288=4,31^{-5}$  avec une correction de Bonferroni). L'analyse statistique par permutation et par « groupe » permet de pallier ce problème de correction du risque  $\alpha$ .

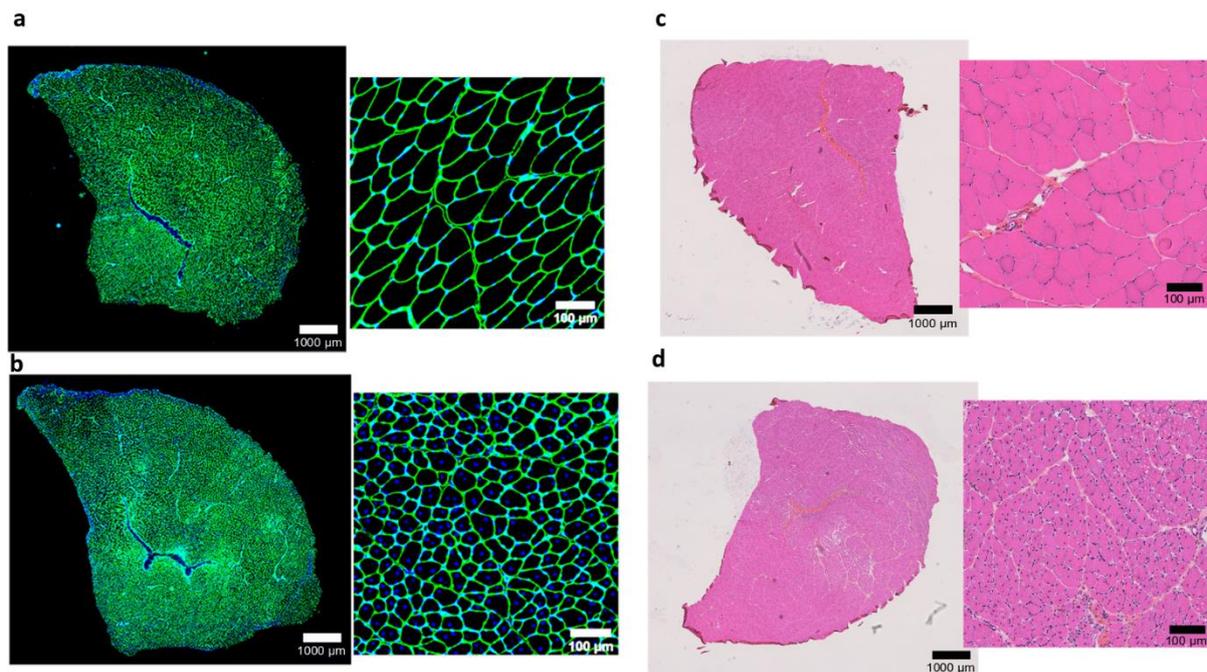
Le principe de l'analyse par permutation est basé sur le fait de mélanger aléatoirement les valeurs entre nos conditions pour obtenir de nouveaux jeux de données issus de nos valeurs initiales, mais aléatoirement réparties. Ensuite, nous réalisons un test statistique « classique » comme un test  $t$  de Student entre ces valeurs aléatoirement réparties. En réalisant ces deux étapes (permutations aléatoires et test statistique) 1000 fois nous obtenons une distribution de 1000 valeurs statistiques aléatoires. Certaines valeurs seront donc, « par chance », significatives (à cause de l'inflation de l'erreur de type I). L'idée ensuite est de réaliser le même test statistique, cette fois-ci sur nos données initiales sans permutation, et de comparer la valeur statistique obtenue avec la distribution des 1000 valeurs statistiques obtenues après répartition aléatoire de nos données. Nous allons reporter cette valeur sur la distribution des 1000 valeurs de  $t$  de Student obtenues aléatoirement après mélange des groupes et nous allons calculer combien de valeurs sont supérieures ou inférieures à notre valeur  $t$  cible (cela dépend du type de comparaison, dans notre cas c'est une comparaison bilatérale). Le seuil de significativité que nous avons choisi est  $\alpha=0,05$  (cela signifie que si plus de 50 valeurs de  $t$  de Student calculés à partir du mélange aléatoire de nos groupes sont plus élevées que notre valeur cible de  $t$  de Student le test n'est pas significatif).

À partir de ce principe de base des analyses statistiques par permutations, une méthode dédiée aux analyses des séries temporelles, appelée « cluster-based permutation approach » (analyse statistique par permutation et par « groupe ») a été mise en place (Maris & Oostenveld, 2007). Afin de décrire brièvement la méthode, nous allons l'illustrer avec un exemple. Prenons nos 1 152 points correspondant à notre analyse de la température sur 4 jours (un point toutes les 5 min). Pour chacun des 1 152 points, nous avons 8 valeurs de température pour le groupe BLS et 8 valeurs pour le groupe CTL. Pour chaque point, nous allons permuter aléatoirement ces 16 valeurs entre elles afin d'obtenir 1 152 nouveaux groupes de 8 valeurs. Ensuite, nous allons calculer, point par point, un test  $t$  de student entre chaque groupe de 8 valeurs, pour obtenir 1 152 valeurs  $t$  de student issues de ces permutations aléatoires. Sur ces 1 152 valeurs, nous allons déterminer toutes celles qui sont statistiquement significatives (selon un risque  $\alpha$  de 5%, sans correction), et nous allons les réunir par « série » en extrayant toutes les valeurs significatives consécutives. À partir de cette étape, deux méthodes sont envisageables. La première méthode, appelé  $t_{max}$  consiste à sélectionner la valeur  $t$  de student la plus élevée par série (comme précédemment il faut tout d'abord déterminer si nous effectuons un test unilatéral ou bilatéral, dans notre cas où nous effectuons un test bilatéral nous avons pris la valeur absolue). La seconde méthode (celle que nous avons choisie), appelée  $t_{mass}$  consiste à faire la somme des valeurs  $t$  de Student au sein de chaque série. Ensuite, que ce soit pour la méthode  $t_{max}$  ou  $t_{mass}$ , il faut sélectionner la valeur la plus élevée parmi l'ensemble des valeurs calculées sur toutes les séries. Ainsi, quelle que soit la méthode choisie, nous obtenons, à la fin de l'ensemble de ces étapes, une seule valeur statistique. Ensuite, en répétant ce cycle de permutation 1000 fois, nous obtenons 1000 valeurs de  $t_{max}$  (ou de  $t_{mass}$  selon la méthode choisie). Enfin, nous appliquons les mêmes étapes à notre jeu de données initial, mais cette fois-ci sans permutation, afin de calculer pour chaque série de valeurs significatives, une valeur de  $t_{max}$  ou de  $t_{mass}$ . Finalement, nous allons comparer chaque valeur de  $t_{max}$  ou de  $t_{mass}$  obtenues pour chaque série avec nos données initiales, et si la valeur de  $t_{max}$  ou de  $t_{mass}$  du groupe est supérieure à 5% de la distribution formée par nos 1000 valeurs obtenues par permutations aléatoires, le groupe de valeurs associé est déclaré comme étant statistiquement différent entre nos deux groupes d'animaux.

## 3.2. Résultats

### 3.2.1. Vérification de la blessure musculaire induite par injection de cardiotoxine

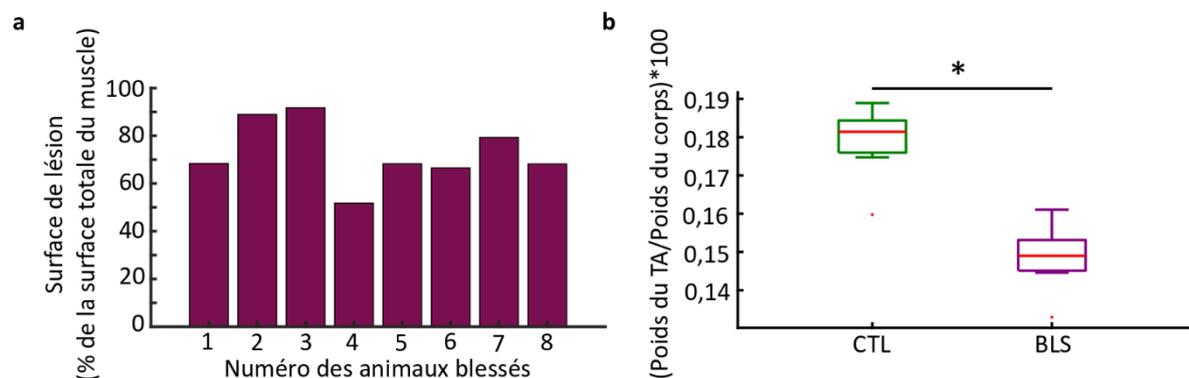
Dans un premier temps, nous avons vérifié la qualité et la reproductibilité de notre modèle de blessure musculaire par injection de cardiotoxine (CTX) dans le muscle *Tibialis Anterior* (TA). Pour cela, nous avons réalisé des immunomarquages en fluorescence anti-laminine (protéine de la membrane basale entourant les fibres musculaires, visualisée en vert) couplée à l'utilisation du Dapi (marque les noyaux des cellules, visualisés en bleu), ainsi que des colorations HPS sur les coupes transversales des TA prélevés 14 jours après l'induction de la blessure (Fig. 34). Les muscles des animaux blessés présentent des fibres musculaires plus petites et un noyau en position central (Fig. 34b, d), ce qui est caractéristique des fibres musculaires en réparation, contrairement aux fibres saines qui présentent un noyau en périphérie (Fig. 34a, c).



**Figure 34 : Immunomarquages et coloration des muscles blessés et des muscles contrôles. a** immunomarquage anti-laminine (en vert, membrane basale des fibres musculaires) et Dapi (en bleu, noyaux cellulaires) d'une coupe de TA contrôle et **b** blessé. **c** coloration hémalun-phloxine-safran (HPS) d'une coupe de TA contrôle et **d** blessé.

La taille de la lésion musculaire a été estimée à partir de la zone en réparation et est comprise entre 60 et 90% de la surface totale du TA pour les animaux blessés, la moyenne étant de 71% (Fig. 35a). Le poids moyen des TA blessés ( $537 \pm 20$  mg) est significativement plus faible que

le poids moyen des TA contrôles ( $669 \pm 20$  mg). La différence est toujours présente après normalisation par le poids du corps de l'animal (Fig. 35b).



**Figure 35 : Surface de la blessure musculaire et poids du TA après l'induction de la blessure.** **a** surface estimée de la lésion par rapport à la surface totale du TA pour les 8 animaux du groupe BLS. **b** poids des TA contrôles (CTL, vert) et des TA blessés (BLS, violet). \* :  $p < 0,05$ , test t de Student.

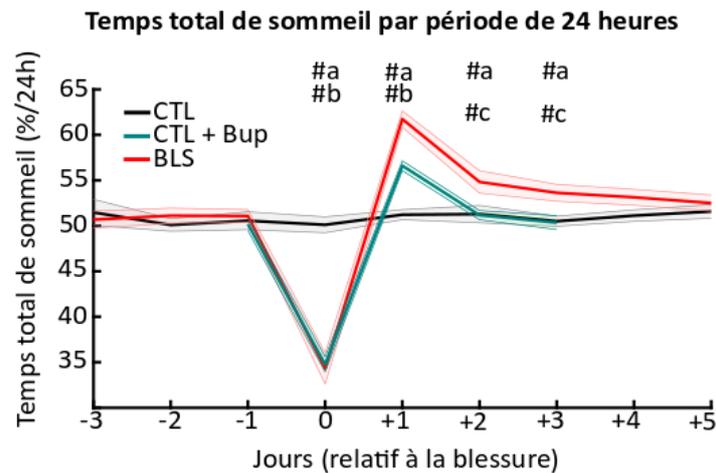
**Discussion.** Pour notre étude, nous avons choisi le modèle de blessure musculaire par injection de cardiotoxine. La reproductibilité de ce modèle de blessure permet d'obtenir des blessures musculaires homogènes et la cinétique de la régénération musculaire induite par la myotoxine est bien décrite dans la littérature (Garry et al., 2016; Guardiola et al., 2017; Hardy et al., 2016). En cohérence avec ce souci de reproductibilité, le choix du muscle blessé (le TA), nous a permis de ne pas ouvrir la peau de l'animal et ainsi de limiter les potentielles différences entre les animaux (Bigard et al., 1997). Nous avons retrouvé les caractéristiques histologiques spécifiques des fibres musculaires en réparation avec des fibres musculaires de petite taille et un noyau en position centrale pour tous les TA blessés. La zone lésée représente en moyenne 71% de la surface totale du muscle. La taille minimale admissible de la zone lésée varie selon les études, de plus de 90% (McArthur et al., 2020; Rahman et al., 2020; Shan et al., 2014) à  $\pm 70-80\%$  (Guardiola et al., 2012; Mounier et al., 2013; Saclier et al., 2020).

### 3.2.2. Effets de la blessure musculaire sur le temps de sommeil

Afin d'évaluer les effets de la blessure musculaire sur la quantité de sommeil, nous avons calculé le temps total de sommeil (TTS) ainsi que le temps passé dans chaque stade de sommeil (sommeil lent et sommeil paradoxal) trois jours avant la blessure (J-3), jusqu'à 8 jours après la blessure (J+8) pour les animaux CTL et BLS, et de J-1 à J+3 pour les animaux CTL+Bup. Pour déterminer si les potentielles modifications du temps de sommeil sont indépendantes ou non du cycle nyctéméral, nous avons réalisé ces analyses par périodes de 24 heures, mais

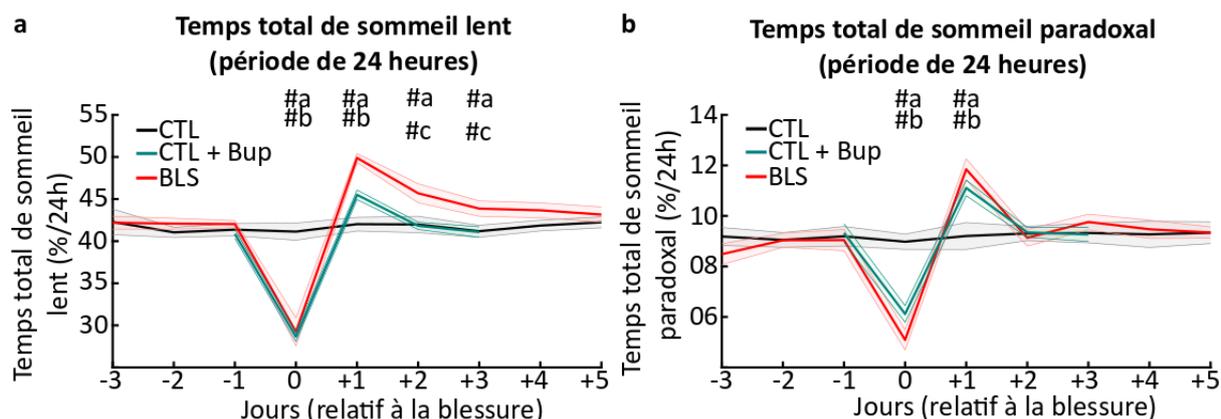
également en séparant la période lumineuse (période préférentielle de sommeil du rat ; de 08:00 à 20:00) et la période d'obscurité (période préférentielle d'activité du rat ; de 20:00 à 08:00).

**Le temps total de sommeil par périodes de 24 heures** est significativement plus faible pour les animaux CTL+Bup et les animaux BLS à J0 (le jour de l'induction de la blessure), comparés aux animaux CTL. Ensuite, à J+1 le TTS est significativement plus élevé pour le groupe CTL+Bup et le groupe BLS comparés aux animaux CTL, et il n'y a pas de différence entre les groupes CTL+Bup et BLS que ce soit à J0 et J+1. Ensuite, à partir de J+2 il n'y a plus de différence entre le TTS des animaux CTL+Bup et le TTS des animaux CTL. En revanche, à J+2 et J+3, le TTS est significativement plus élevé pour les animaux BLS comparés aux deux groupes contrôles (Fig. 36).



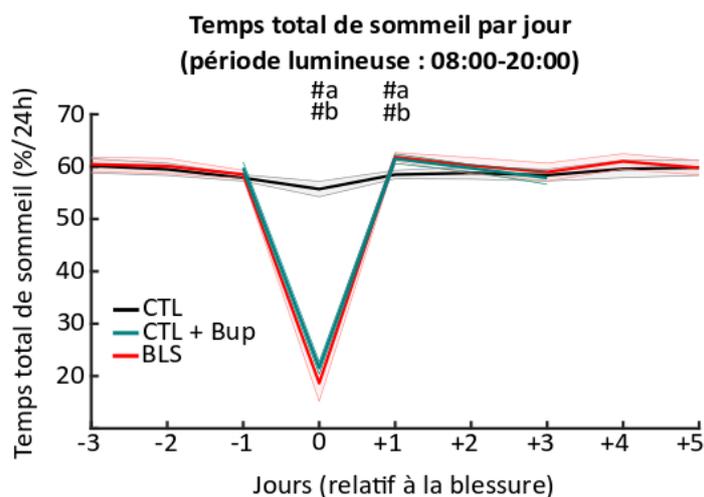
**Figure 36 : Temps total de sommeil par période de 24 heures en réponse à la blessure musculaire.** Évolution du temps total de sommeil par période de 24 heures calculé en pourcentage par 24h pour les animaux du groupe contrôle (CTL, courbe noire), du groupe contrôle+buprénorphine (CTL+Bup, courbe verte) et du groupe blessure (BLS, courbe rouge). La blessure a lieu à J0. L'erreur standard de la moyenne est représentée par l'aire autour de la courbe. #a :  $p < 0,05$  entre CTL et BLS ; #b :  $p < 0,05$  entre CTL et CTL+Bup ; #c :  $p < 0,05$  entre CTL+Bup et BLS. Friedman ANOVA & test post-hoc Durbin-Conover.

Quand nous distinguons le sommeil lent du sommeil paradoxal, nous observons que la diminution du TTS à J0 suivie du rebond de sommeil à J+1, pour les animaux CTL+Bup et les animaux BLS, est commune au sommeil lent et au sommeil paradoxal (Fig. 37a, b). En revanche, l'augmentation du TTS à J+2 et J+3 pour les animaux BLS est seulement due à une augmentation du temps total de sommeil lent (Fig. 37a).



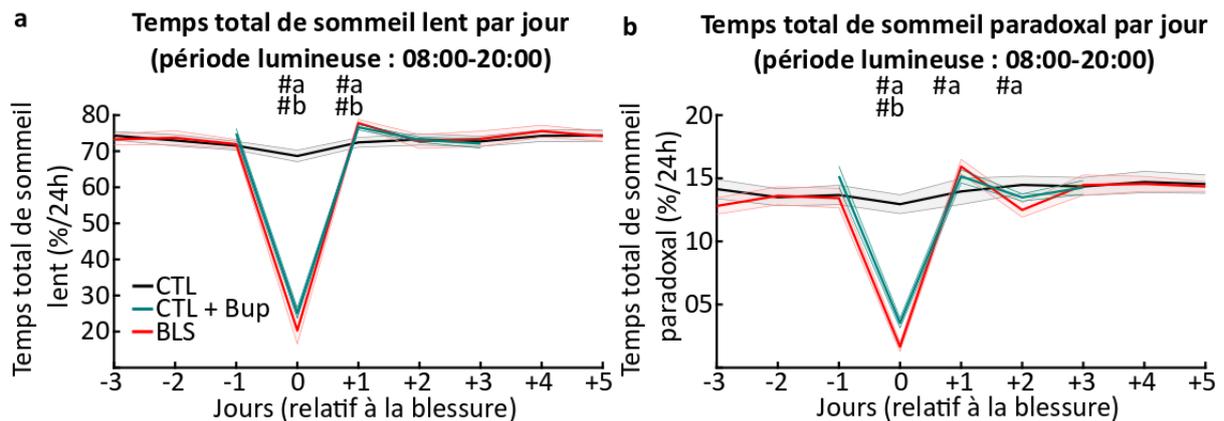
**Figure 37 : Temps total de sommeil lent et de sommeil paradoxal par période de 24 heures en réponse à la blessure musculaire.** **a** Évolution du temps total de sommeil lent par période de 24 heures calculée en pourcentage par 24h pour le groupe contrôle (CTL, courbe noire), le groupe contrôle+buprénorphine (CTL+Bup, courbe verte) et le groupe blessure (BLS, courbe rouge). La blessure a lieu à J0. **b** similaire à **a** pour le temps total de sommeil paradoxal. L'erreur standard de la moyenne est représentée par l'aire autour de la courbe. #a :  $p < 0,05$  entre CTL et BLS ; #b :  $p < 0,05$  entre CTL et CTL+Bup ; #c :  $p < 0,05$  entre CTL+Bup et BLS. Friedman ANOVA & test post-hoc Durbin-Conover.

**Le temps total de sommeil en période lumineuse (08:00 – 20:00)** ne présente aucune différence significative entre les animaux CTL+Bup et les animaux BLS. Le TTS est plus faible pour les animaux CTL+Bup et les animaux BLS à J0 comparés aux animaux CTL, puis le TTS est plus élevé à J+1 pour les animaux CTL+Bup et les animaux BLS comparés aux animaux CTL (Fig. 38)



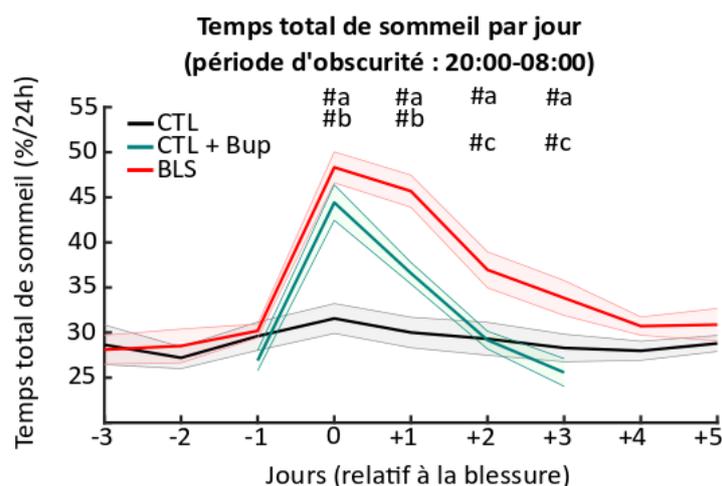
**Figure 38 : Temps total de sommeil par jour en réponse à la blessure musculaire pour la période lumineuse (08:00-20:00).** Évolution du temps total de sommeil par jour pour la période lumineuse pour les animaux du groupe contrôle (CTL, courbe noire), du groupe contrôle+buprénorphine (CTL+Bup, courbe verte) et du groupe blessure (BLS, courbe rouge). La blessure a lieu à J0. L'erreur standard de la moyenne est représentée par l'aire autour de la courbe. #a :  $p < 0,05$  entre CTL et BLS ; #b :  $p < 0,05$  entre CTL et CTL+Bup ; #c :  $p < 0,05$  entre CTL+Bup et BLS. Friedman ANOVA & test post-hoc Durbin-Conover.

La diminution du TTS à J0 pendant la période lumineuse est commune au sommeil lent et au sommeil paradoxal, que ce soit pour les animaux CTL+Bup ou les animaux BLS (Fig. 39a, b). À J+1, nous observons un temps total de sommeil lent plus élevé pour les animaux CTL+Bup et BLS comparés aux animaux CTL (Fig. 39a). Le temps passé en sommeil paradoxal est plus élevé pour les animaux BLS à J+1 suivi par une diminution à J+2 comparé aux animaux CTL (Fig. 39b). Il n'y a aucune différence significativement entre les animaux CTL+Bup et les animaux BLS.



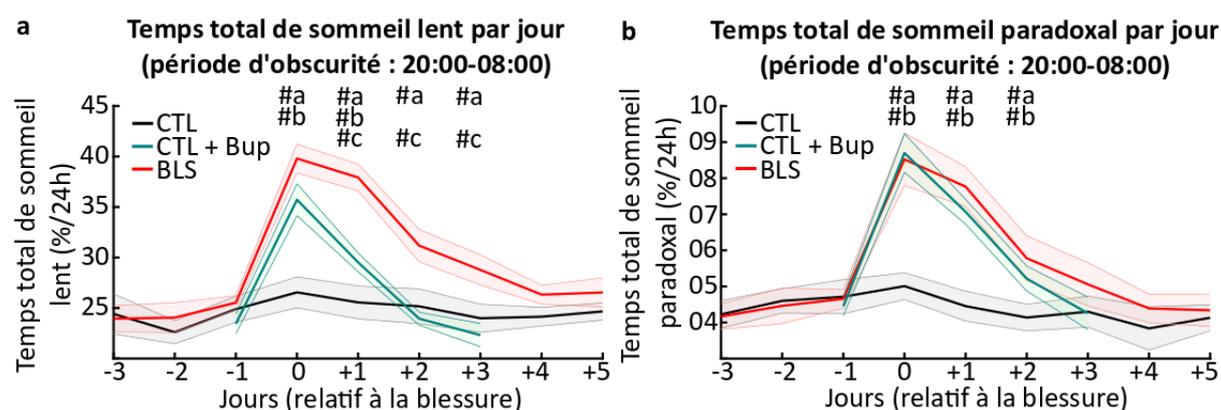
**Figure 39 : Temps total de sommeil lent et de sommeil paradoxal en réponse à la blessure musculaire pour la période lumineuse.** **a** Évolution du temps total de sommeil lent par jour pour la période lumineuse pour le groupe contrôle (CTL, courbe noire), du groupe contrôle+buprénorphine (CTL+Bup, courbe verte) et du groupe blessure (BLS, courbe rouge). La blessure a lieu à J0. **b** similaire à **a** pour le temps total de sommeil paradoxal. L'erreur standard de la moyenne est représentée par l'aire autour de la courbe. #a :  $p < 0,05$  entre CTL et BLS ; #b :  $p < 0,05$  entre CTL et CTL+Bup ; #c :  $p < 0,05$  entre CTL+Bup et BLS. Friedman ANOVA & test post-hoc Durbin-Conover.

**Le temps total de sommeil en période d'obscurité (20:00 – 08:00)** est significativement plus élevé pour les animaux CTL+Bup et les animaux BLS à J0 et J+1, comparés aux animaux CTL. De plus, le TTS est significativement plus élevé à J+2 et J+3 pour les animaux BLS par rapport aux deux groupes contrôles (Fig. 40).



**Figure 40 : Temps total de sommeil par jour en réponse à la blessure musculaire pour la période d'obscurité (20:00-08:00).** Évolution du temps total de sommeil par jour pour la période d'obscurité calculé en pourcentage par jour pour les animaux du groupe contrôle (CTL, courbe noire), du groupe contrôle+buprénorphine (CTL+Bup, courbe verte) et du groupe blessure (BLS, courbe rouge). La blessure a lieu à J0. L'erreur standard de la moyenne est représentée par l'aire autour de la courbe. #a :  $p < 0,05$  entre CTL et BLS ; #b :  $p < 0,05$  entre CTL et CTL+Bup ; #c :  $p < 0,05$  entre CTL+Bup et BLS. Friedman ANOVA & test post-hoc Durbin-Conover.

Nous observons que l'augmentation du TTS pour les animaux CTL+Bup et les animaux BLS à J0 et J+1 est due à une augmentation du sommeil lent et du sommeil paradoxal (Fig. 41a, b). En revanche, l'augmentation du TTS observé à J+2 et J+3 pour les animaux BLS est spécifique du sommeil lent (Fig. 41a). En effet, nos résultats montrent que le temps de sommeil lent est significativement plus élevé pour les animaux BLS à J+1, J+2 et J+3 par rapport aux deux groupes contrôles (Fig. 41a).



**Figure 41 : Temps total de sommeil lent et de sommeil paradoxal en réponse à la blessure musculaire pour la photopériode d'obscurité.** a Évolution du temps total de sommeil lent par jour pour la période d'obscurité pour le groupe contrôle (CTL, courbe noire), le groupe contrôle+buprénorphine (CTL+Bup, courbe verte) et le groupe blessure (BLS, courbe rouge). La blessure a lieu à J0. b similaire à a pour le temps total de sommeil paradoxal. L'erreur standard de la moyenne est représentée par l'aire autour de la courbe. #a :  $p < 0,05$  entre CTL et BLS ; #b :  $p < 0,05$  entre CTL et CTL+Bup ; #c :  $p < 0,05$  entre CTL+Bup et BLS. Friedman ANOVA & test post-hoc Durbin-Conover.

**Discussion.** La diminution du TTS observé pendant la période lumineuse à J0 n'est pas différente entre les groupes BLS et CTL+Bup, ce qui suggère qu'elle est essentiellement due à l'injection de buprénorphine. Ces résultats sont en accord avec les études précédentes qui montrent que la buprénorphine supprime totalement le sommeil pendant sa durée d'action (4-8 heures ; Gauthier et al., 2011; O'Brien et al., 2021). Consécutivement à cette période de privation de sommeil, nous observons un « rebond » de sommeil, caractérisé par un TTS plus élevé pendant 36 heures pour les animaux BLS et les animaux CTL+Bup (commun au sommeil lent et au sommeil paradoxal). Ce rebond de sommeil débute pendant la période d'obscurité à J0, se prolonge pendant la période lumineuse à J+1 puis pendant la période d'obscurité à J+1 et prend fin pendant la période lumineuse à J+2 durant laquelle le TTS est similaire pour les trois groupes d'animaux. En revanche, nous observons que le TTS est significativement plus élevé pour les animaux BLS pendant les périodes d'obscurité à J+2 et J+3 par rapport aux deux groupes contrôles. Ainsi, ces résultats montrent une **augmentation du TTS 48 et 72 heures post-blessure** qui a lieu **pendant la période d'obscurité** et qui est **spécifique du sommeil lent**.

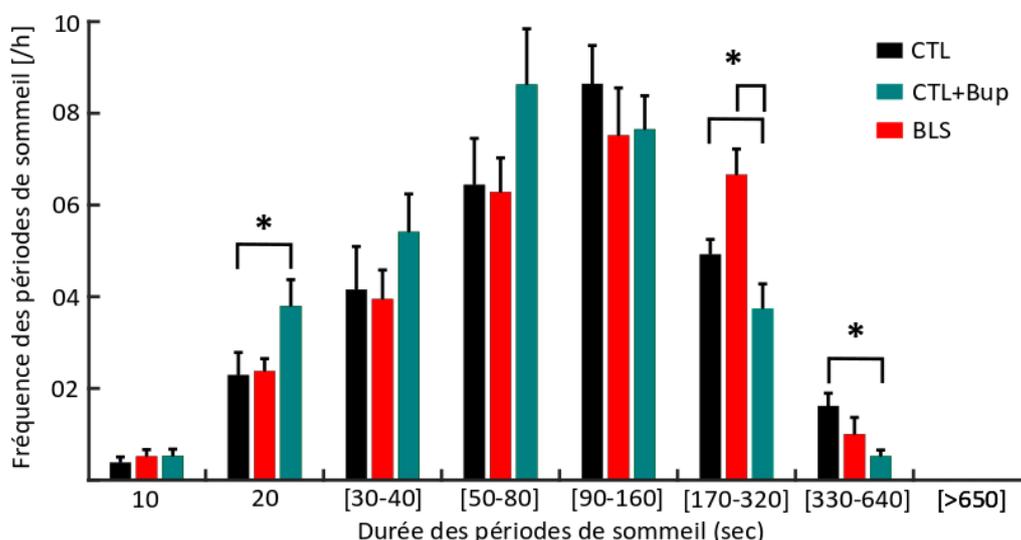
Il est surprenant d'observer que l'augmentation significative du TTS à 48 et 72h après l'induction de la blessure a lieu pendant la période préférentielle d'activité du rat (période d'obscurité). Ce résultat peut être expliqué par le fait que les animaux dormants déjà  $\pm 80\%$  du temps pendant la période lumineuse, les opportunités de sommeil supplémentaire pendant cette période sont limitées. Cette hypothèse est supportée par le fait qu'à la suite d'une privation de sommeil de 12 heures qui a lieu pendant la période d'obscurité (pendant laquelle les animaux dorment 20-40% du temps) les chercheurs n'observent pas de rebond de sommeil pendant la période lumineuse consécutive à la période de privation (Lancel & Kerkhof, 1989; Vyazovskiy et al., 2007). Une autre hypothèse est que la période d'augmentation du TTS post-blessure, dépend de l'horaire à laquelle la blessure est réalisée. Afin d'évaluer cette possibilité, il faudrait étudier les modifications du sommeil induites après l'induction de la blessure réalisée au début de la période d'obscurité. Cette approche a été étudiée sur la drosophile par Singh & Donlea, 2020. Les auteurs observent également une augmentation du TTS après l'induction d'une blessure chez la drosophile (le retrait des antennes). L'augmentation du TTS a toujours lieu pendant la période d'activité de la drosophile, que les antennes soient retirées au début de la période d'activité ou au début de la période de sommeil (dans ce cas,

l'augmentation du TTS est « décalée » et à lieu pendant la période d'activité consécutive à la période de sommeil).

### 3.2.3. Effets de la blessure musculaire sur la stabilité du sommeil

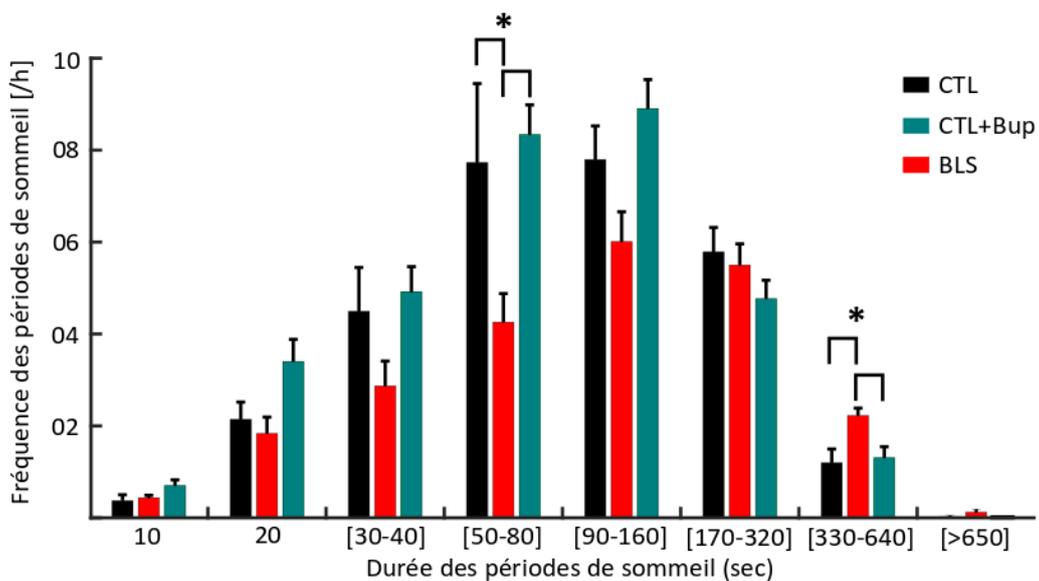
Après avoir constaté les effets de la lésion musculaire sur la quantité de sommeil, nous avons évalué les changements potentiels de paramètres associés à la qualité du sommeil en réponse à la blessure. Un paramètre majeur de la qualité du sommeil est sa stabilité. De courtes périodes de sommeil (de 10 à 40 secondes) sont associées à de l'instabilité, alors que de longues périodes de sommeil (de 170 à plus de 650 secondes) sont associées à un sommeil stable. Le nombre « brut » de ces périodes de sommeil dépend du temps total de sommeil, qui est augmenté pour les animaux BLS. Pour tenir compte de ce biais, nous avons calculé le nombre de périodes de sommeil par heure de sommeil. Étant donné les résultats sur le temps de sommeil (effets spécifiques à la période d'obscurité), nous avons choisi de représenter ici seulement l'évolution de la stabilité du sommeil pendant la période d'obscurité (les résultats concernant la période lumineuse sont disponibles au niveau de la figure 98 en annexe).

À J-1 de l'induction de la blessure, pendant la période d'obscurité, il n'y a pas de différences significatives entre les animaux CTL et les animaux BLS, quelle que soit la durée des périodes de sommeil. En revanche, les animaux CTL+Bup présentent une fréquence (nombre de périodes de sommeil par heure de sommeil) de périodes de sommeil de 20 secondes plus élevée que les animaux CTL et une fréquence des périodes de 170-330 secondes plus faible que les animaux CTL et BLS, ainsi qu'une fréquence plus faible des périodes de 330-640 secondes comparées aux animaux CTL (Fig. 42).



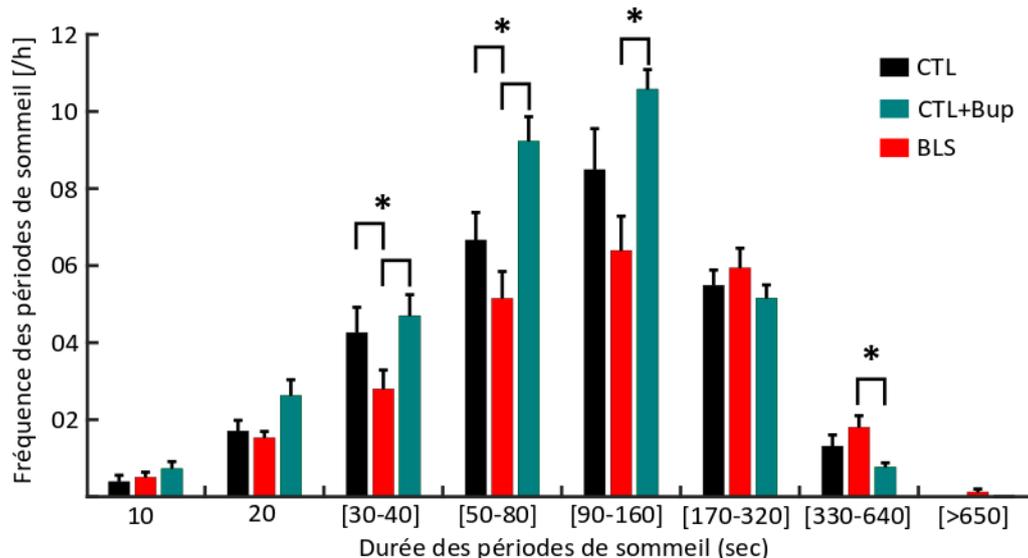
**Figure 42 : Fréquence des périodes de sommeil en fonction de leur durée pour la période d'obscurité à J-1.** Nombre de périodes de sommeil par heure de sommeil en fonction de leur durée (catégories : [10] ; [20] ; [30-40] ; [50-80] ; [90-160] ; [170-320] ; [330-640] ; >650) secondes) pour les animaux contrôles (CTL, barres noires), les animaux contrôles+buprénorphine (CTL+Bup, barres bleues) et pour les animaux blessés (BLS, barres rouges) pour la période d'obscurité au Jour -1. \* : p<0,05. Friedman ANOVA & test post-hoc Durbin-Conover.

**Le jour de l'induction de la blessure (J0),** pendant la période d'obscurité, la fréquence des périodes de sommeil de 50-80 secondes est plus faible pour les animaux BLS comparée aux animaux CTL+Bup et CTL. À l'inverse, la fréquence des périodes de sommeil de 330-640 secondes est plus élevée pour les animaux BLS comparés aux animaux CTL+Bup et CTL (Fig. 43).



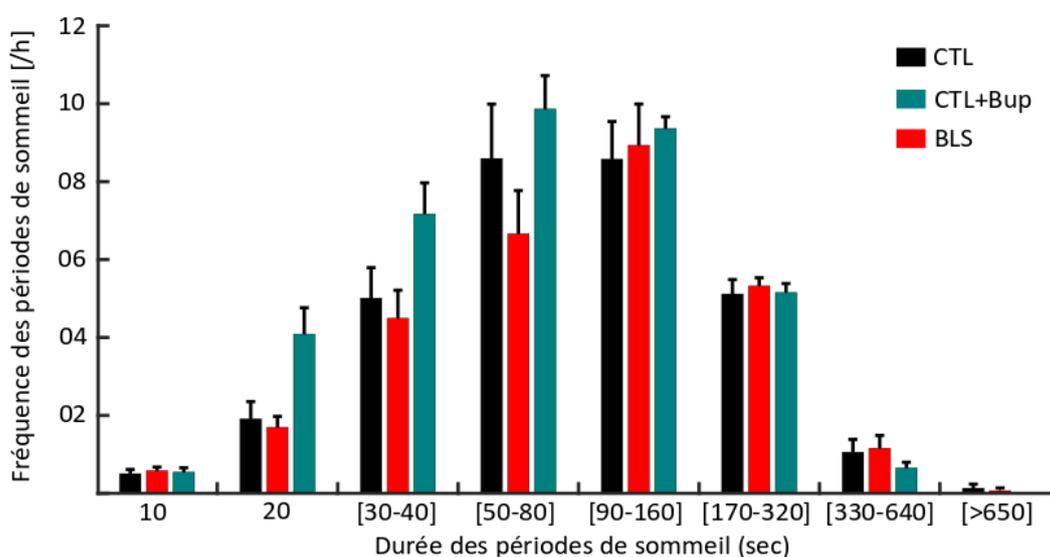
**Figure 43 : Fréquence des périodes de sommeil en fonction de leur durée pour la période d'obscurité à J0.** Nombre de périodes de sommeil par heure de sommeil en fonction de leur durée (catégories : [10] ; [20] ; [30-40] ; [50-80] ; [90-160] ; [170-320] ; [330-640] ; >650) secondes) pour les animaux contrôles (CTL, barres noires), les animaux contrôles+buprénorphine (CTL+Bup, barres bleues) et pour les animaux blessés (BLS, barres rouges) pour la période d'obscurité au Jour 0. \* : p<0,05. Friedman ANOVA & test post-hoc Durbin-Conover.

**À J+1,** la fréquence des périodes de sommeil de 30-40 secondes et des périodes de 50-80 secondes est plus faible pendant la période d'obscurité pour les animaux BLS comparés aux animaux CTL+Bup et CTL. À l'inverse, la fréquence des périodes de sommeil de 330-640 secondes est plus élevée pour les animaux du groupe BLS comparés aux animaux CTL+Bup (Fig. 44).



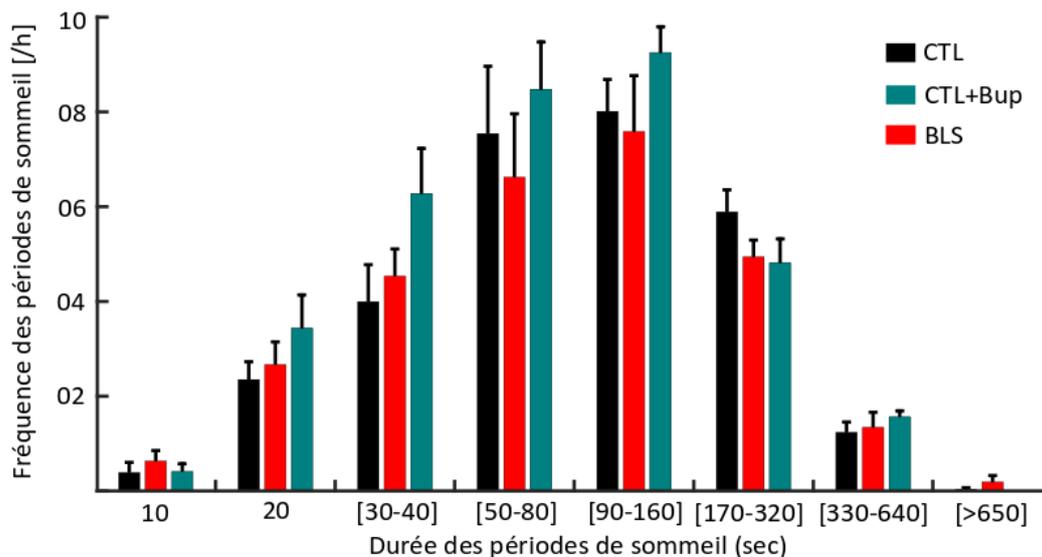
**Figure 44 : Fréquence des périodes de sommeil en fonction de leur durée pour la période d’obscurité à J+1.** Nombre de périodes de sommeil par heure de sommeil en fonction de leur durée (catégories : [10] ; [20] ; [30-40] ; [50-80] ; [90-160] ; [170-320] ; [330-640] ; [>650] secondes) pour les animaux contrôles (CTL, barres noires), les animaux contrôles+buprénorphine (CTL+Bup, barres bleues) et pour les animaux blessés (BLS, barres rouges) pour la période d’obscurité au Jour +1. \* :  $p < 0,05$ . Friedman ANOVA & test post-hoc Durbin-Conover.

Pendant la période d’obscurité à J+2 après l’induction de la blessure, il n’y a aucune différence entre les trois groupes d’animaux (Fig. 45).



**Figure 45 : Fréquence des périodes de sommeil en fonction de leur durée pour la période d’obscurité à J+2.** Nombre de périodes de sommeil par heure de sommeil en fonction de leur durée (catégories : [10] ; [20] ; [30-40] ; [50-80] ; [90-160] ; [170-320] ; [330-640] ; [>650] secondes) pour les animaux contrôles (CTL, barres noires), les animaux contrôles+buprénorphine (CTL+Bup, barres bleues) et pour les animaux blessés (BLS, barres rouges) pour la période d’obscurité au Jour +2. \* :  $p < 0,05$ . Friedman ANOVA & test post-hoc Durbin-Conover.

Il n’y a également pas de différences pour la période d’obscurité à J+3 entre les trois groupes d’animaux (Fig. 46).



**Figure 46 : Fréquence des périodes de sommeil en fonction de leur durée pour la période d’obscurité à J+3.** Nombre de périodes de sommeil par heure de sommeil en fonction de leur durée (catégories : [10] ; [20] ; [30-40] ; [50-80] ; [90-160] ; [170-320] ; [330-640] ; >650) secondes) pour les animaux contrôles (CTL, barres noires), les animaux contrôles+buprénorphine (CTL+Bup, barres bleues) et pour les animaux blessés (BLS, barres rouges) pour la période d’obscurité au Jour +3.

**Discussion.** Le jour de l’induction de la blessure, nous observons, pendant la période d’obscurité, une diminution des courtes périodes de sommeil (50-80 secondes) et une augmentation des longues périodes de sommeil (330-640 secondes) spécifique aux animaux blessés. À J+1, nous observons également une diminution des courtes périodes de sommeil (30-40 et 50-80 secondes) pour les animaux blessés. Ces résultats témoignent d’une **augmentation de la stabilité du sommeil spécifique aux animaux BLS pendant les périodes d’obscurité à J0 et J+1 post-blessure.**

C’est un résultat plutôt inattendu étant donné que la blessure musculaire est indubitablement associée à une certaine douleur et que la douleur est associée à une augmentation de la fragmentation du sommeil (Andersen & Tufik, 2003; Cardis et al., 2021; Silva et al., 2011; Sutton & Opp, 2014). Cependant, quelques études n’observent pas d’effets de la douleur sur le sommeil (Kontinen et al., 2003) et des études supplémentaires semblent nécessaires pour clarifier la relation entre douleur et sommeil. Il est probable que les effets de la douleur sur le sommeil varient en fonction de l’origine et de l’intensité de la douleur (Mogil, 2009). Pour corroborer nos résultats et tenir compte des aspects nociceptifs de la blessure musculaire dans notre contexte expérimental, nous avons conduit des analyses de certains paramètres

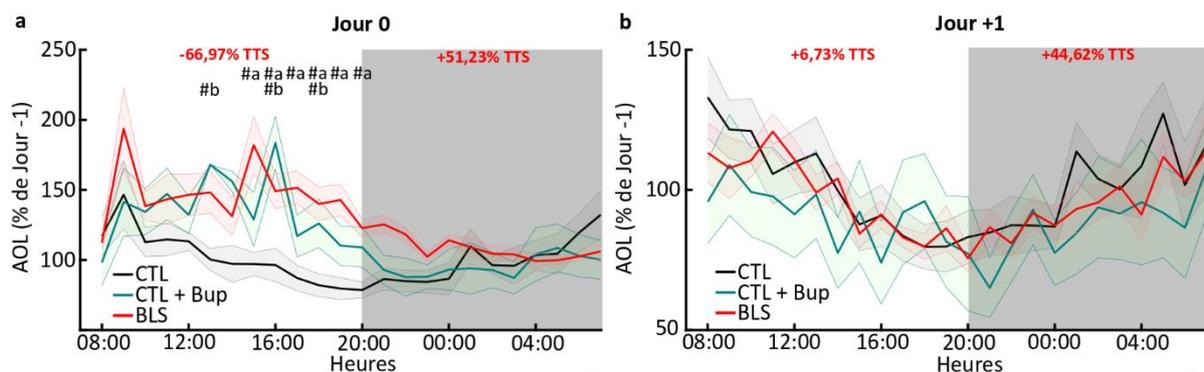
physiologiques et comportementaux associés indirectement à la douleur de l'animal (voir 6 – *Analyses de paramètres associés à une douleur sévère*).

Avant cela et afin de compléter notre analyse des caractéristiques du sommeil, nous avons conduit une analyse spectrale du sommeil lent et du sommeil paradoxal.

### 3.2.4. Effets de la blessure musculaire sur les paramètres spectraux du sommeil

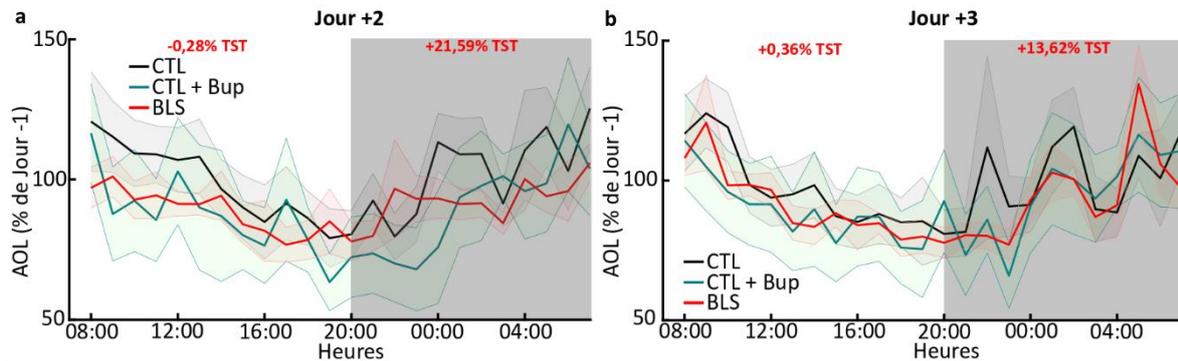
L'augmentation du temps total de sommeil à la suite d'une privation de sommeil ou à une infection virale ou bactérienne est associée à une augmentation de la pression de sommeil, symbolisée par une augmentation de l'activité des ondes lentes (AOL – qui correspondent aux ondes delta : 0,5 – 4Hz) en sommeil lent. Ainsi, afin d'identifier l'implication potentielle d'une augmentation de la pression de sommeil à la suite de la blessure, nous avons analysé l'évolution de l'AOL en sommeil lent heure par heure de Jour 0 au Jour +3.

**Le jour de l'induction de la blessure**, l'AOL est plus élevée pour les animaux BLS et les animaux CTL+Bup comparés aux animaux CTL pendant la seconde partie de la période lumineuse (de 15:00 à 20:00 pour les animaux BLS). Cette période lumineuse est associée à une diminution du temps total de sommeil pour les animaux BLS (-66.97% comme indiqué sur la figure 47) et pour les animaux CTL+Bup. Il n'y a pas de différence d'AOL pendant la période d'obscurité à J0. Le lendemain de l'induction de la blessure (J+1), il n'y a aucune différence d'AOL entre les trois groupes d'animaux, alors que le temps total de sommeil est significativement augmenté pour les animaux BLS et les animaux CTL+Bup (Fig. 47).



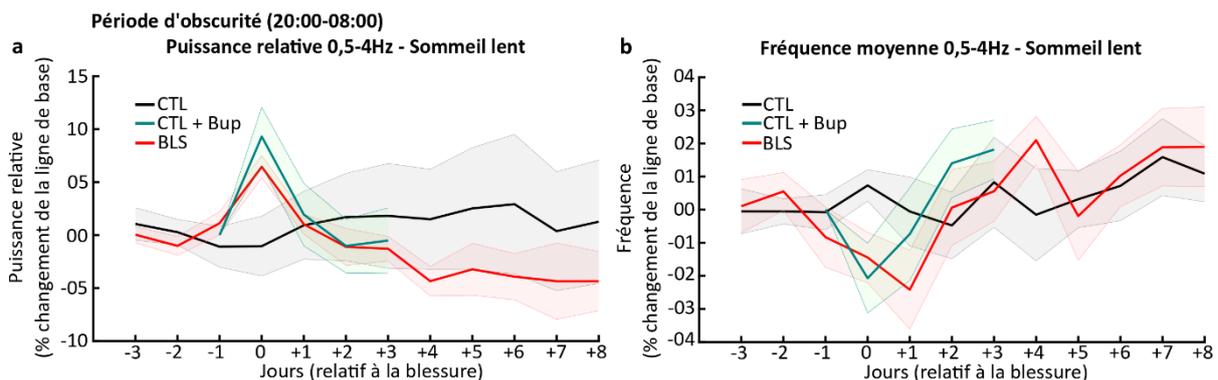
**Figure 47 : Activité en ondes lentes du sommeil lent en réponse à la blessure musculaire (J0 ; J+1).** **a** mesure de l'activité en ondes lentes en pourcentage (par rapport à J-1) par heure pour les animaux contrôles (CTL, courbe noire), du groupe contrôle+buprénorphine (CTL+Bup, courbe verte) et du groupe blessure (BLS, courbe rouge) pour J0 et **b** pour J+1. Le pourcentage de changement du temps total de sommeil pour le groupe blessé correspondant à chaque période (lumineuse/obscurité) est indiqué en rouge. L'erreur standard de la moyenne est représentée par l'aire autour de la courbe. #a :  $p < 0,05$  entre CTL et BLS ; #b :  $p < 0,05$  entre CTL et CTL+Bup ; #c :  $p < 0,05$  entre CTL+Bup et BLS. Friedman ANOVA & test post-hoc Durbin-Conover.

À J+2 et J+3, il n'y a également pas de différence d'AOL entre les trois groupes d'animaux (Fig. 48).



**Figure 48 : Activité en ondes lentes du sommeil lent en réponse à la blessure musculaire (J+2 ; J+3).** a mesure de l'activité en ondes lentes en pourcentage (par rapport à J-1) par heure pour les animaux contrôles (CTL, courbe noire), du groupe contrôle+buprénorphine (CTL+Bup, courbe verte) et du groupe blessure (BLS, courbe rouge) pour J+2 et b pour J+3. Le pourcentage de changement du temps total de sommeil pour le groupe blessé correspondant à chaque photopériode est indiqué en rouge. L'erreur standard de la moyenne est représentée par l'aire autour de la courbe. #a :  $p < 0,05$  entre CTL et BLS ; #b :  $p < 0,05$  entre CTL et CTL+Bup ; #c :  $p < 0,05$  entre CTL+Bup et BLS. Friedman ANOVA & test post-hoc Durbin-Conover.

En complément de ces analyses de l'AOL, afin d'obtenir une vision détaillée des paramètres spectraux du sommeil, nous avons étudié l'évolution de 84 paramètres de J-3 à J+8 (voir *Méthodes*). De toutes ces analyses, aucune différence n'a été constatée entre nos trois groupes d'animaux. Nous avons choisi de représenter ici, à titre d'exemple, les résultats de l'évolution de la puissance relative (Fig. 49a) et de la fréquence (Fig. 49b) des ondes delta au cours du sommeil lent pendant la période d'obscurité.



**Figure 49 : Puissance relative et fréquence moyenne des ondes delta du sommeil lent en réponse à la blessure musculaire pour la période d'obscurité.** a Puissance relative des ondes delta (0,5-4Hz) en pourcentage de changement par rapport à la ligne de base par jour pour les animaux contrôles (CTL, courbe noire), du groupe contrôle+buprénorphine (CTL+Bup, courbe verte) et du groupe blessure (BLS, courbe rouge). b similaire à a pour la fréquence moyenne des ondes delta. L'erreur standard de la moyenne est représentée par l'aire autour de la courbe.

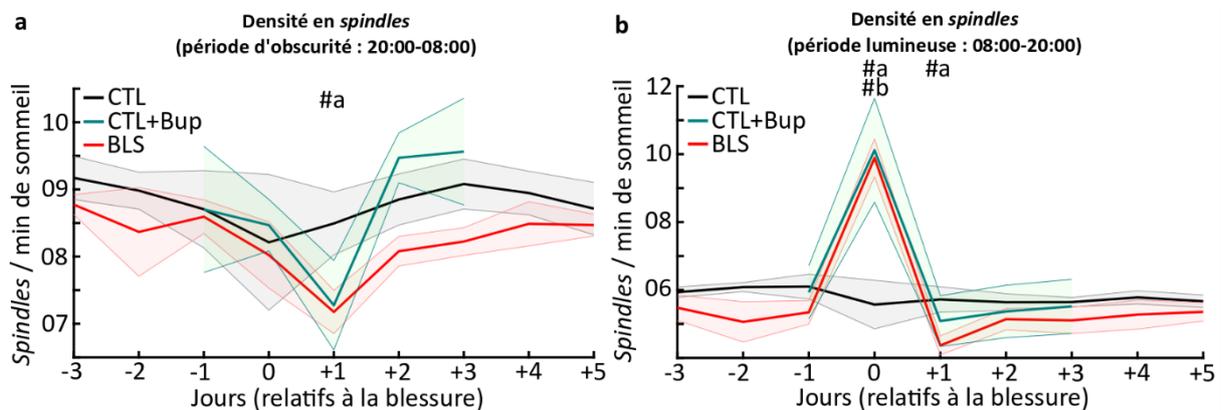
**Discussion.** La lésion musculaire conduisant à une augmentation du temps de sommeil, nous avons voulu savoir si cela pouvait être associé à une modification de la pression de sommeil. Le principal marqueur de la pression de sommeil est représenté par l'AOL, qui augmente au cours de l'éveil et diminue au cours du sommeil (Borbély et al., 1984). L'AOL est significativement plus élevée chez les animaux CTL+Bup et BLS comparés aux animaux CTL à la fin de la période lumineuse lors du jour de l'injection (réalisée à 08:00). Cette augmentation de l'AOL est la conséquence de la période de privation de sommeil pendant les 4-8 heures après l'injection de buprénorphine et est comparable à l'augmentation de l'AOL observée à la suite d'une période de privation de sommeil (Borbély et al., 1984; Vyazovskiy et al., 2004). Elle représente l'augmentation de la pression de sommeil à la fin de la période lumineuse à J0 pour les animaux CTL+Bup et BLS et peut être associée à l'augmentation du temps total de sommeil pendant la période d'obscurité consécutive (Brunner et al., 1993; Trachsel et al., 1986). L'augmentation du temps de sommeil observée pendant la période lumineuse à Jour +1 pour les animaux CTL+Bup et les animaux BLS ne peut également pas être dissociée de cette augmentation de la pression de sommeil. En effet, des études montrent qu'une augmentation de l'AOL peut être associée à une augmentation du TTS pendant 24 heures (Brunner et al., 1993; Franken et al., 1991; Trachsel et al., 1986). En revanche, il n'y a pas de différence d'AOL à J+1, J+2 ou J+3 entre nos groupes, ce qui suggère que **l'augmentation du temps de sommeil total observé spécifiquement chez les animaux BLS** pendant les périodes d'obscurité à J+2 et J+3 **n'est pas associée à une augmentation de la pression de sommeil.**

### **3.2.5. Effets de la blessure musculaire sur les paramètres des *spindles***

En complément de ces analyses spectrales, nous avons déterminé les effets de la blessure sur les *spindles*. Les *spindles* sont des événements caractéristiques qui ont lieu pendant le sommeil lent et la densité des *spindles* (nombre de *spindles* / minute de sommeil lent) est impliquée dans la stabilité et la durée du sommeil, et est également corrélée à l'intensité d'une douleur (Caravan et al., 2020; Kim et al., 2012). Afin d'évaluer leur potentielle implication dans les effets sur le temps et la stabilité du sommeil que nous avons observés chez les animaux BLS, nous avons analysé l'évolution de 4 caractéristiques des *spindles* (densité, durée, fréquence et amplitude) après l'induction de la blessure. Pour détecter les *spindles* nous avons utilisé un algorithme de détection automatique qui est détaillé dans les *Méthodes* (Uygun et al., 2019). Nous avons choisi de représenter les résultats concernant la densité des *spindles*

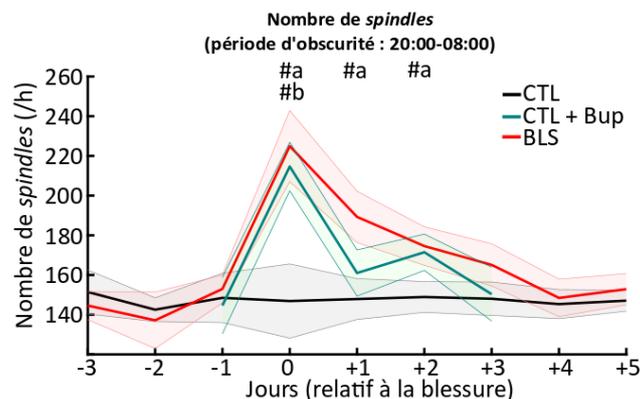
uniquement. Toutefois, leur durée, leur fréquence et leur amplitude des *spindles* sont disponibles au niveau de la figure 99 en annexe.

Nous observons une densité de *spindles* plus faible pour les animaux BLS comparés aux animaux CTL à J+1 pendant la période d'obscurité (Fig. 50a). À l'inverse, pendant la période lumineuse, nous observons une densité de *spindles* plus élevée pour les animaux CTL+Bup et BLS comparés aux animaux CTL à J0 (Fig. 50b). Cependant, les animaux BLS présentent également une densité en *spindles* significativement plus faible que les animaux CTL à J+1 pendant la période lumineuse (Fig. 50b).



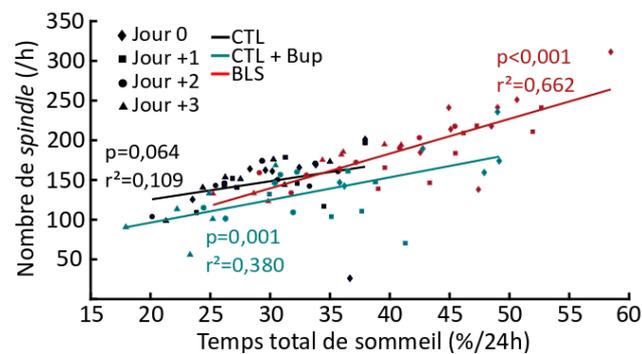
**Figure 50 : Densité en *spindles* en réponse à la blessure musculaire.** **a** Densité en *spindles* (nombre de *spindles*/minute de sommeil) de J-3 à J+5, pour le groupe contrôle (CTL, courbe noire), du groupe contrôle+buprénorphine (CTL+Bup, courbe verte) et du groupe blessure (BLS, courbe rouge) pour la période d'obscurité (20:00-08:00). **b** similaire à **a** pour la période lumineuse (08:00-20:00). L'erreur standard de la moyenne est représentée par l'aire autour de la courbe. #a :  $p < 0,05$  entre CTL et BLS ; #b :  $p < 0,05$  entre CTL et CTL+Bup. Friedman ANOVA & test post-hoc Durbin-Conover.

Le nombre « brut » de *spindles* par heure pendant la période d'obscurité suit une dynamique similaire à celle du temps total de sommeil lent, il est plus élevé à J0 pour les animaux BLS et CTL+Bup comparés aux animaux CTL et à J+1 et J+2 pour les animaux BLS comparés aux animaux CTL (Fig. 51).



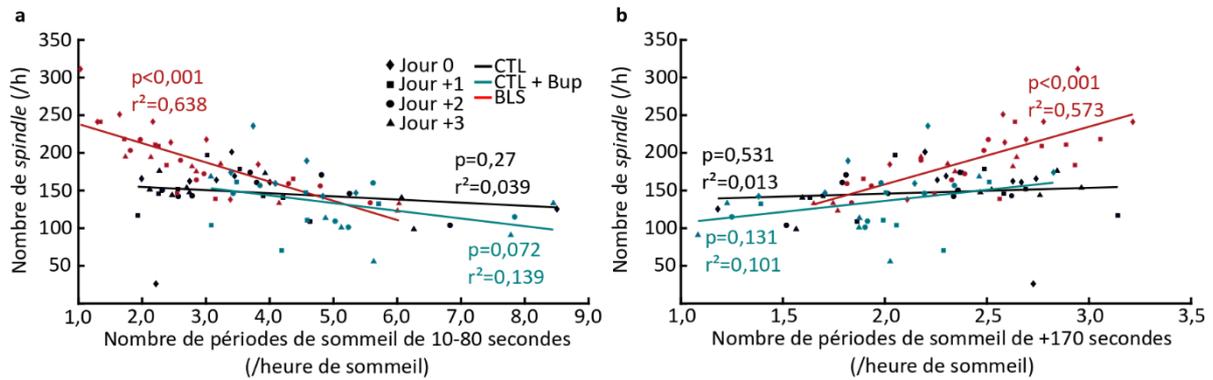
**Figure 51 : Nombre de *spindles* par heure pour la période d'obscurité en réponse à la blessure musculaire.** Nombre de *spindles* par heure pour la période d'obscurité de J-3 à J+5 pour les animaux contrôles (CTL, courbe noire), du groupe contrôle+buprénorphine (CTL+Bup, courbe verte) et du groupe blessure (BLS, courbe rouge). L'erreur standard de la moyenne est représentée par l'aire autour de la courbe. #a :  $p < 0,05$  entre CTL et BLS ; #b :  $p < 0,05$  entre CTL et CTL+Bup. Friedman ANOVA & test post-hoc Durbin-Conover.

La dynamique similaire entre le temps total de sommeil lent et le nombre de *spindles* semble logique étant donné que les *spindles* ont lieu pendant le sommeil lent. Toutefois, afin de vérifier cette relation dans le cas d'animaux blessés, nous avons calculé la corrélation entre le nombre de *spindles* par heure et le temps total de sommeil de J0 à J+3. Le TTS est significativement corrélé avec le nombre de *spindles* par heure pour les animaux BLS et CTL+Bup (Fig. 52).



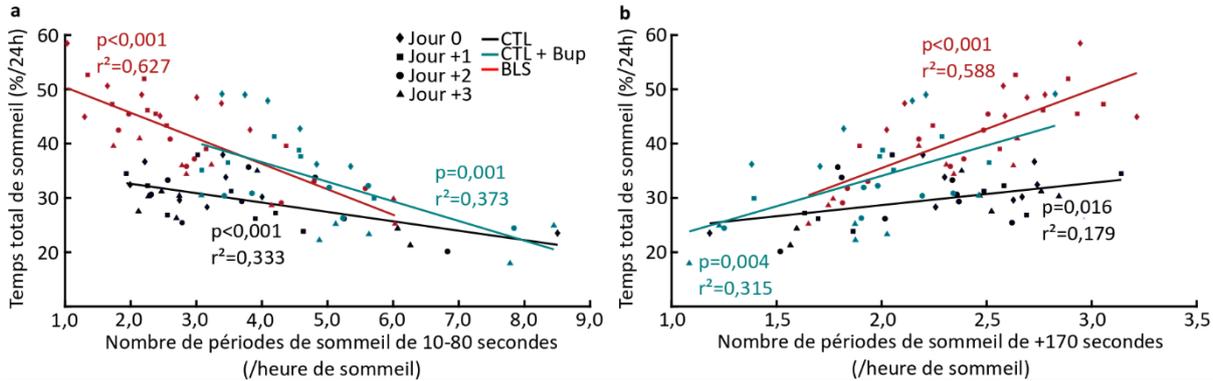
**Figure 52 : Corrélation entre le nombre de *spindles* et le temps total de sommeil.** Temps total de sommeil en fonction du nombre de *spindles* par heure pour la période d'obscurité pour les animaux contrôles (CTL, noir), du groupe contrôle+buprénorphine (CTL+Bup, vert) et du groupe blessure (BLS, rouge). Chaque point représente un animal par jour, pour Jour 0 (losange), Jour +1 (carré), Jour +2 (rond) et Jour +3 (triangle). Le coefficient de corrélation linéaire mis au carré est représenté avec la couleur associée et la valeur statistique correspondante est affichée sur le graphique.

Pour évaluer le lien entre le nombre de *spindles* et la stabilité du sommeil, nous avons corrélié le nombre de courtes (10-80 secondes) et longues (+170 secondes) périodes de sommeil avec le nombre de *spindles* par heure. De J0 à J+3, le nombre de *spindles* par heure est négativement corrélé avec les courtes périodes de sommeil (de 10 à 80 secondes) pour les animaux BLS seulement. Inversement, le nombre de *spindles* de J0 à J+3 est positivement corrélé avec les longues périodes de sommeil (+170 secondes) seulement pour les animaux BLS également (Fig. 53).



**Figure 53 : Corrélations entre le nombre de *spindles* par heure et la durée des périodes de sommeil.** **a** Nombre de périodes de sommeil de 10-80 secondes en fonction du nombre de *spindles* par heure pour les animaux contrôles (CTL, noir), contrôle+buprénorphine (CTL+Bup, vert) et blessés (BLS, rouge). Chaque point représente un animal par jour, pour Jour 0 (losange), Jour +1 (carré), Jour +2 (rond) et Jour +3 (triangle). **b** similaire à **a** pour les périodes de sommeil de +170 secondes. Le coefficient de corrélation linéaire mis au carré est représenté avec la couleur associée et la valeur statistique correspondante est affichée sur le graphique.

Cependant, nous avons également montré que le TTS était corrélé avec le nombre de *spindles* par heure pour les animaux BLS. Afin d'étudier l'influence du temps total de sommeil sur la stabilité du sommeil, nous avons effectué les mêmes analyses de corrélations que précédemment. Nous pouvons voir qu'à partir du Jour 0 jusqu'au Jour +3, le temps total de sommeil est négativement corrélé avec les courtes périodes de sommeil (10-80 secondes), et ce pour les trois groupes d'animaux. À l'inverse, le temps total de sommeil est positivement corrélé avec les longues périodes de sommeil également pour les trois groupes d'animaux (Fig. 54).



**Figure 54 : Corrélations entre le temps total de sommeil et la durée des périodes de sommeil.** **a** Nombre de périodes de sommeil de 10-80 secondes en fonction du temps total de sommeil pour les animaux contrôles (CTL, noir), contrôle+buprénorphine (CTL+Bup, vert) et blessés (BLS, rouge). Chaque point représente un animal par jour, pour Jour 0 (losange), Jour +1 (carré), Jour +2 (rond) et Jour +3 (triangle). **b** similaire à **a** pour les périodes de sommeil de +170 secondes. Le coefficient de corrélation linéaire mis au carré est représenté avec la couleur associée et la valeur statistique correspondante est affichée sur le graphique.

**Discussion.** Chez les humains et les rongeurs, les *spindles* participent à la stabilisation du sommeil en filtrant les stimulations sensorielles afin de préserver le sommeil d'un réveil exogène (Fernandez & Lüthi, 2020). Chez des souris dont les modifications génétiques induisent une diminution de la densité en *spindles*, nous observons une augmentation de la fragmentation du sommeil lent associée à une diminution du TTS (Anderson et al., 2005; Blethyn et al., 2006; Cueni et al., 2008; Lee et al., 2004). À l'inverse, l'augmentation de la densité en *spindles* par le biais de manipulation optogénétique permet d'augmenter le temps total de sommeil lent (Kim et al., 2012). En termes de densité de *spindles*, nous n'avons pas observé d'augmentation significative à J+2 ou J+3 qui puisse être lié à l'augmentation du temps total de sommeil observée chez les animaux blessés. En revanche nous avons observé une augmentation significative de la densité en *spindles* pendant la période lumineuse le jour de l'induction de la blessure (à J0) pour les animaux BLS et CTL+Bup, suivie d'une diminution significative pendant la période d'obscurité à J+1 pour les animaux BLS. L'augmentation de la densité en *spindles* à J0 pendant la période lumineuse est un résultat inattendu. En effet, étant donné que la buprénorphine, injectée au début de la période lumineuse (à 08:00) induit une privation de sommeil pendant  $\pm 6$  heures, cela traduit le fait que le sommeil qui a lieu à la suite de cette privation est associé à une densité en *spindles* plus importante. Or, des études menées sur la privation de sommeil ont montré que la densité en *spindles* est réduite pendant les premières heures de sommeil de récupération après une privation de sommeil (Curcio et al., 2003; Dijk et al., 1993; Vyazovskiy et al., 2004). Cette augmentation de la densité en *spindles* semble être due aux effets spécifiques de la buprénorphine plutôt qu'à la diminution du temps total de sommeil induit par la buprénorphine pour les groupes BLS et CTL+Bup. Il n'existe pas de données dans la littérature à ce sujet et il serait intéressant de mener des investigations sur les effets de la buprénorphine sur les paramètres des *spindles*.

En revanche, nous observons une diminution de la densité en *spindles* pendant la période d'obscurité à J+1, uniquement chez le groupe BLS. C'est également un résultat surprenant étant donné que nous observons une augmentation de la stabilité pendant cette période d'obscurité et que les *spindles* ont une fonction de stabilisation du sommeil (Fernandez & Lüthi, 2020). Cependant, les *spindles* sont également liés à la douleur (chez l'Homme ou le rat), avec une diminution du nombre de *spindles* lorsque l'intensité de la douleur augmente (Caravan et al., 2020; Landis et al., 2004). Il existe également des preuves que l'augmentation

du nombre de *spindles* (par stimulation optogénétique) peut réduire l'intensité de la douleur chronique chez les rats (Caravan et al., 2020). Il est donc possible que la diminution de la densité en *spindles* que nous observons pendant la période d'obscurité au Jour +1 chez les animaux BLS soit due à la douleur induite par la blessure musculaire. Cependant, cette diminution en densité en *spindles* n'a lieu que pendant cette période de 12 heures, ce qui laisse à penser que les animaux BLS ne présentent pas une douleur importante dans les jours qui suivent. Cette supposition est corroborée par les analyses supplémentaires réalisées dans la partie suivante : 6 – *Analyses des paramètres associés à une douleur sévère* (poids, température, locomotion).

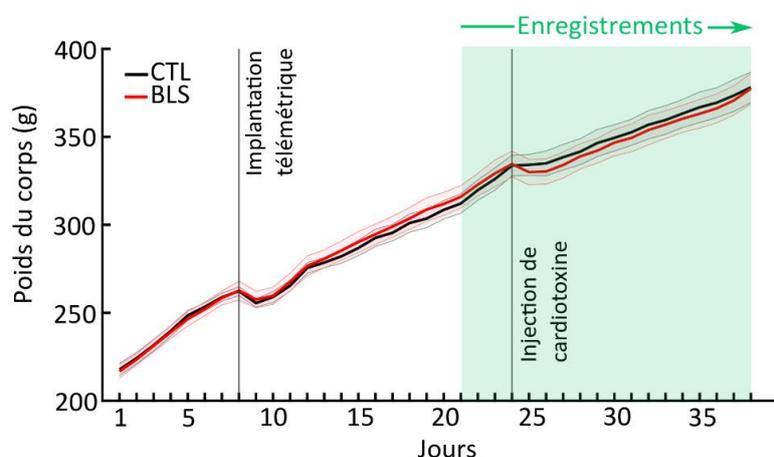
Il semble logique d'observer, pendant les périodes d'obscurité, une dynamique similaire entre le nombre de *spindles* par heure et le temps total de sommeil lent (corrélation positive). En revanche, il est intéressant d'observer que le nombre de *spindles* est négativement corrélé avec les courtes périodes de sommeil (10-80 secondes) et positivement corrélé avec les longues périodes de sommeil (+170 secondes) seulement pour les animaux BLS. Ce résultat suggère que les *spindles* exercent potentiellement un rôle stabilisateur du sommeil plus important chez les animaux BLS. Cependant, le TTS est lui-même négativement corrélé avec les courtes périodes de sommeil et positivement corrélé avec les longues périodes de sommeil pour les trois groupes d'animaux. Ainsi, pour les animaux BLS, il est impossible de dire si c'est le nombre de *spindles* qui participe à la stabilisation du sommeil et à l'augmentation du TTS ou si c'est l'augmentation du TTS qui induit à la fois une stabilisation du sommeil et une augmentation du nombre de *spindles*. Pour nous aider à conclure sur l'implication des *spindles*, la manipulation optogénétique des *spindles* afin de réduire ou d'augmenter leur nombre pourrait nous permettre d'évaluer leur implication dans la stabilisation et l'augmentation du temps de sommeil en réponse à la blessure musculaire.

Cette analyse des *spindles* achève notre analyse des paramètres du sommeil. Une question qui reste en suspens est de déterminer si les modifications du sommeil que nous observons sont dues à la nécrose massive des fibres musculaires due à l'injection de la cardiotoxine et aux mécanismes précoces associés à la réparation musculaire ou à d'autres facteurs confondants. Le principal facteur confondant que nous avons identifié est la douleur associée à la blessure, qui pourrait potentiellement modifier la quantité ou la qualité du sommeil des animaux blessés.

### 3.2.6. Évolution de paramètres associés à une douleur sévère après induction de la blessure musculaire

La blessure musculaire est indubitablement associée à une certaine douleur. Nos analyses n'ont pas pour objectif de quantifier ce niveau de douleur, mais de mettre en évidence la présence ou non d'une douleur sévère chez les animaux BLS. Pour cela, nous avons comparé l'évolution de plusieurs paramètres physiologiques et comportementaux entre les animaux BLS et les animaux CTL : l'évolution du poids corporel ; la température sous-cutanée ; l'activité locomotrice ; la bande de fréquence gamma pendant l'éveil. Ces analyses sont complémentaires des résultats que nous avons observés sur la densité des *spindles* qui suggèrent l'absence d'une douleur importante chez les animaux blessés.

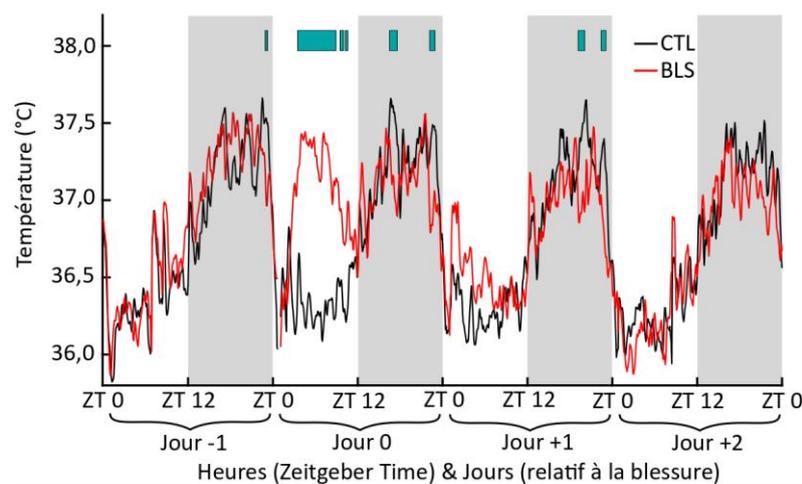
Pendant les 35 jours, qui correspondent à la totalité du protocole expérimental (comprenant la période de récupération post-chirurgicale due à l'implantation téléométrique), la prise de poids des animaux BLS est similaire à celle des animaux CTL. Une légère perte de poids peut être notée pour les deux groupes pendant 24-48h après la chirurgie d'implantation téléométrique (J8), ainsi que pour les animaux BLS après l'induction de la blessure (J24), mais il n'y a aucune différence significative entre les deux groupes d'animaux (Fig. 55).



**Figure 55 : Évolution du poids corporel des animaux CTL et BLS au cours de l'expérimentation.** Les animaux ont été pesés quotidiennement pour le groupe contrôle (CTL, courbe noire) et le groupe blessé (BLS, courbe rouge). La chirurgie pour implanter l'émetteur de télémetrie a lieu 8 jours après l'arrivée des animaux et l'injection de cardiotoxine, qui a lieu 3 jours après le début des enregistrements, est réalisée 24 jours après l'arrivée des animaux.

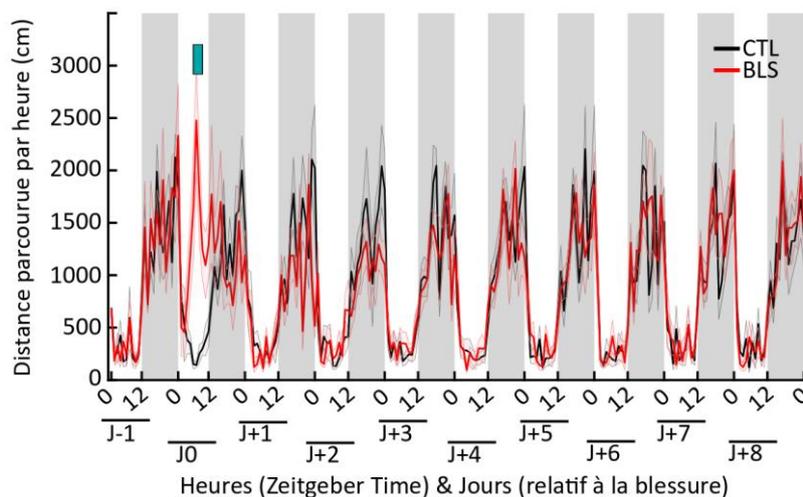
L'analyse de la température sous-cutanée peut rendre compte de la présence de processus inflammatoires potentiellement douloureux. La cinétique de la température sous-cutanée sur 3 jours démontre l'alternance entre les périodes préférentielles de sommeil (qui

correspondent aux périodes lumineuses) associées à une température plus basse, et les périodes préférentielles d'activité (qui correspondent aux périodes d'obscurité) associées à une température plus élevée, pour les deux groupes d'animaux. Les animaux BLS présentent des températures significativement plus élevées le jour de l'induction de la blessure (qui a lieu à 08:00 à J0), de 11h à 19h comparées aux animaux CTL (Fig. 56 ; les différences statistiques sont indiquées par le rectangle vert). De plus, les animaux BLS présentent des températures significativement plus basses que les animaux CTL pendant les deux premières périodes d'obscurité après induction de la blessure (Fig. 56).



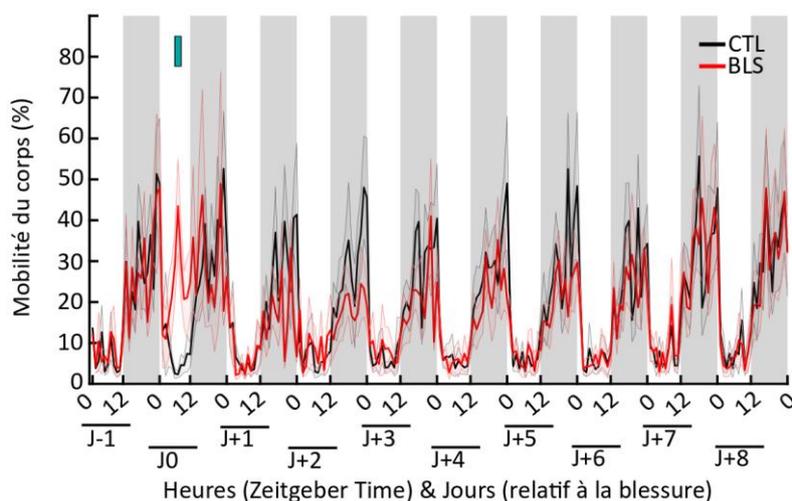
**Figure 56 : Cinétique de la température sous-cutanée en réponse à la blessure musculaire.** Température sous-cutanée de Jour -1 au Jour +2, chaque point représente la température moyenne pour 5 min d'enregistrement (fréquence d'échantillonnage de 10Hz) pour le groupe contrôle (CTL, courbe noire) et le groupe blessé (BLS, courbe rouge). Les rectangles verts représentent les différences statistiques ( $p < 0,05$ ) évaluées par la méthode statistique « cluster-based permutation » (voir Méthodes).

L'évolution de l'activité locomotrice après l'induction de la blessure nous permet d'identifier une potentielle diminution des déplacements des animaux BLS qui témoignerait d'une douleur ou d'une gêne en lien avec la blessure. La distance parcourue par heure au sein de leur cage de vie est plus élevée pour les animaux BLS comparés aux animaux CTL le jour de l'induction de la blessure (Fig. 57). Il est assez surprenant de voir que hormis cette différence, il n'y a aucune diminution de la distance parcourue par nos animaux blessés comparés aux animaux contrôles les jours suivants.



**Figure 57 : Évolution de la distance parcourue par heure en réponse à la blessure musculaire.** Distance parcourue (en cm/h) par les animaux du groupe contrôle (**CTL, courbe noire**) et les animaux blessés (**BLS, courbe rouge**) de J-1 à J+8. Les rectangles verts représentent les différences statistiques ( $p < 0,05$ ) évaluées par la méthode statistique « cluster-based permutation » (voir Méthodes).

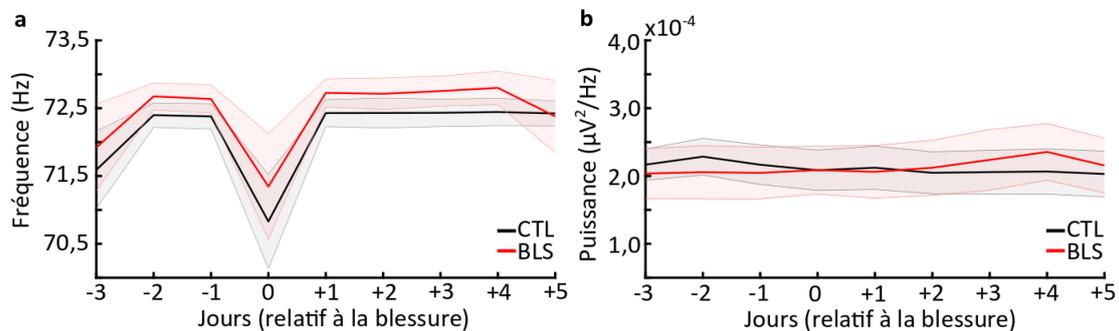
Pour compléter ce résultat, nous avons également analysé la manière dont les animaux bougent, par la mesure du pourcentage du corps en mouvement quand l'animal est en mouvement. Encore une fois, la seule différence se situe le jour de l'induction de la blessure avec les animaux BLS qui présentent des valeurs plus élevées du pourcentage du corps en mouvement par rapport aux animaux CTL (Fig. 58).



**Figure 58 : Évolution de la mobilité du corps par heure en réponse à la blessure musculaire.** Mobilité du corps (en %) pour les animaux du groupe contrôle (**CTL, courbe noire**) et les animaux blessés (**BLS, courbe rouge**) de J-1 à J+8. Les rectangles verts représentent les différences statistiques ( $p < 0,05$ ) évaluées par la méthode statistique « cluster-based permutation » (voir Méthodes).

Nous avons également analysé la fréquence moyenne et la puissance de la bande de fréquence Gamma (60-90 Hz) de l'EEG pendant l'éveil, qui est un marqueur de la douleur

chronique. Il n'y a aucune différence entre les deux groupes d'animaux, que ce soit pour la fréquence moyenne ou la puissance du Gamma en réponse à la blessure (Fig. 59).



**Figure 59 : Fréquence et puissance du gamma (60-90 Hz) pendant l'éveil à la suite de l'induction de la blessure musculaire. a** Fréquence de la bande de fréquence gamma (60-90 Hz) sur l'EEG des animaux contrôles (CTL, courbe noire) et des animaux blessés (BLS, courbe rouge) de J-3 à J+5, **b** puissance de la bande de fréquence gamma.

**Discussion.** L'objectif de ces différentes analyses (poids, température, locomotion, bande de fréquence gamma en EEG) était de mettre en évidence l'apparition d'une douleur sévère chez les animaux BLS comparés aux animaux CTL. Alors qu'une douleur sévère est associée à un arrêt ou une diminution de la prise de poids dans la littérature (Hestehave et al., 2017; Mogil, 2009; Wuarin et al., 1987), aucune différence n'est observée entre les animaux CTL et les animaux BLS dans notre étude. De même, aucune variation majeure n'est constatée dans l'évolution de l'activité locomotrice, de la température sous-cutanée et de la puissance dans la bande de fréquence gamma (60-90 Hz) en réponse à la blessure **suggérant l'absence d'une douleur excessive** (Peng et al., 2018; Wang et al., 2016).

L'augmentation de l'activité locomotrice le jour de l'induction de la blessure est vraisemblablement une conséquence de la privation de sommeil induite par la buprénorphine, qui induit également une augmentation de la température sous-cutanée. Nous noterons également que la température sous-cutanée plus faible pour les animaux BLS comparés aux animaux CTL pendant les périodes d'obscurité à J0 et J+1 est associée à une augmentation du TTS pour les animaux BLS.

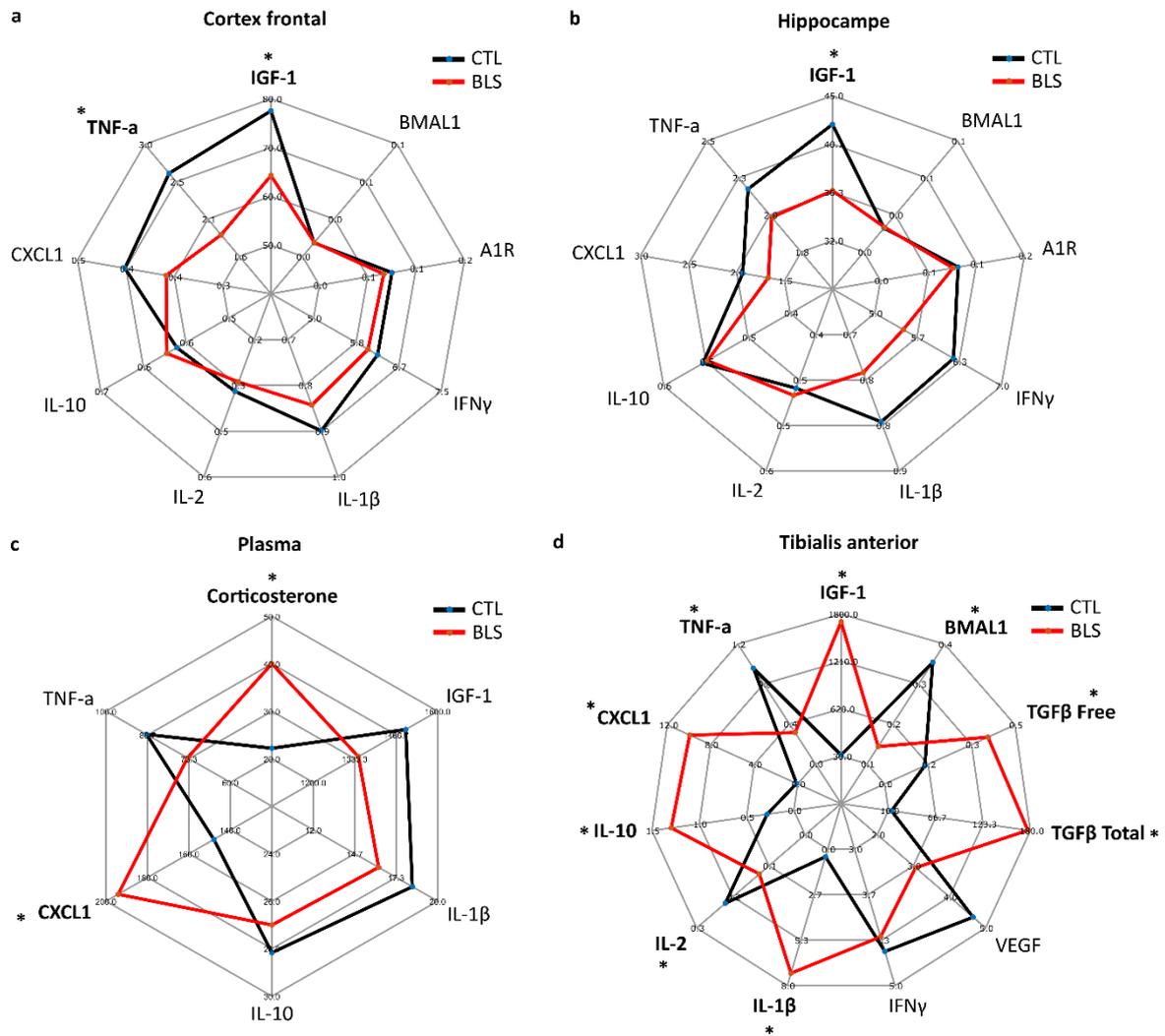
Ces observations physiologiques et comportementales sur l'absence d'une douleur excessive sont en accord avec nos résultats obtenus sur le sommeil. En effet, nous observons une augmentation du TTS et de la stabilité du sommeil et plusieurs études ont montré que la douleur musculaire chronique induisait une fragmentation du sommeil (Andersen & Tufik,

2003; Cardis et al., 2021; Silva et al., 2011; Sutton & Opp, 2014) associée, selon le modèle de douleur utilisé, à une diminution du temps de sommeil lent (Andersen & Tufik, 2003; Silva et al., 2011).

### **3.2.7. Analyse des concentrations de molécules régulatrices du sommeil en réponse à la blessure musculaire**

L'objectif de cette dernière partie était d'explorer les mécanismes sous-jacents aux effets de la blessure sur le sommeil (augmentation du TTS et de la stabilité). Afin d'évaluer l'implication de plusieurs facteurs à la fois dans la réponse à la blessure musculaire et dans la régulation du sommeil, nous avons réalisé des dosages biochimiques dans le cortex frontal et l'hippocampe, ainsi que dans le plasma et le TA. Ces dosages ont été réalisés sur des tissus prélevés 48h (à 08:00) après l'induction de la blessure sur des animaux CTL et BLS non implantés (groupe « **Analyses biologiques** » dans les *Méthodes*).

Dans le cortex frontal, la concentration moyenne de TNF- $\alpha$  et d'IGF-1 est plus faible pour les animaux BLS comparés aux animaux CTL (Fig. 60a). Au niveau de l'hippocampe, la concentration d'IGF-1 est plus faible pour les animaux BLS comparés aux animaux CTL (Fig. 60b). Dans le plasma, le niveau de corticostérone des animaux BLS est plus élevé par rapport aux animaux CTL (Fig. 60c). Enfin, au niveau du TA blessé, les animaux blessés présentent des taux plus élevés pour : IGF-1, TGF $\beta$  libre, TGF $\beta$  total, IL-1 $\beta$ , IL-10, CXCL1, et des taux plus faibles de : IL-2 et de TNF- $\alpha$  comparés aux animaux CTL (Fig. 60d).



**Figure 60 : Dosages biochimiques de molécules impliquées dans la réponse à la blessure et dans la régulation du sommeil.** Contenu protéique évalué 48h après l'induction de la blessure en cytokines pro- et anti-inflammatoires, en protéine circadienne « Brain and Muscle ARNT-like 1 (BMAL1) » et en facteurs de croissance au niveau **a** du cortex frontal, **b** de l'hippocampe, **c** du plasma et **d** du muscle *Tibialis Anterior*. Cytokines pro-inflammatoires : Facteur de nécrose tumorale (TNF- $\alpha$ ), interleukine (IL)-1 $\beta$ , interféron (IFN)- $\gamma$ , chimiokines C-X-C motif ligand (CXCL)-1, IL-2 ; Cytokines anti-inflammatoires : IL-10 ; Facteurs de croissance : facteur de croissance semblable à l'insuline (IGF)-1, facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGF), facteur de croissance transformant (TGF)- $\beta$  total et libre, récepteur A1 à l'adénosine (A1R) et corticostérone plasmatique ; prélèvements réalisés à 08:00 au Jour +2. \* :  $p < 0,05$ , test t de Student,  $n = 8$  animaux par groupe : contrôle (CTL, courbe noire) et blessé (BLS, courbe rouge).

**Discussion.** Afin d'identifier les potentiels mécanismes moléculaires associés aux modifications du sommeil en réponse à la blessure, nous avons réalisé des dosages de molécules impliquées à la fois dans la régulation du sommeil et qui sont modifiées précocement à la suite de la survenue d'une blessure musculaire. Ces dosages ont été effectués deux jours après l'induction de la lésion (J+2), c.-à-d. pendant l'augmentation du TTS

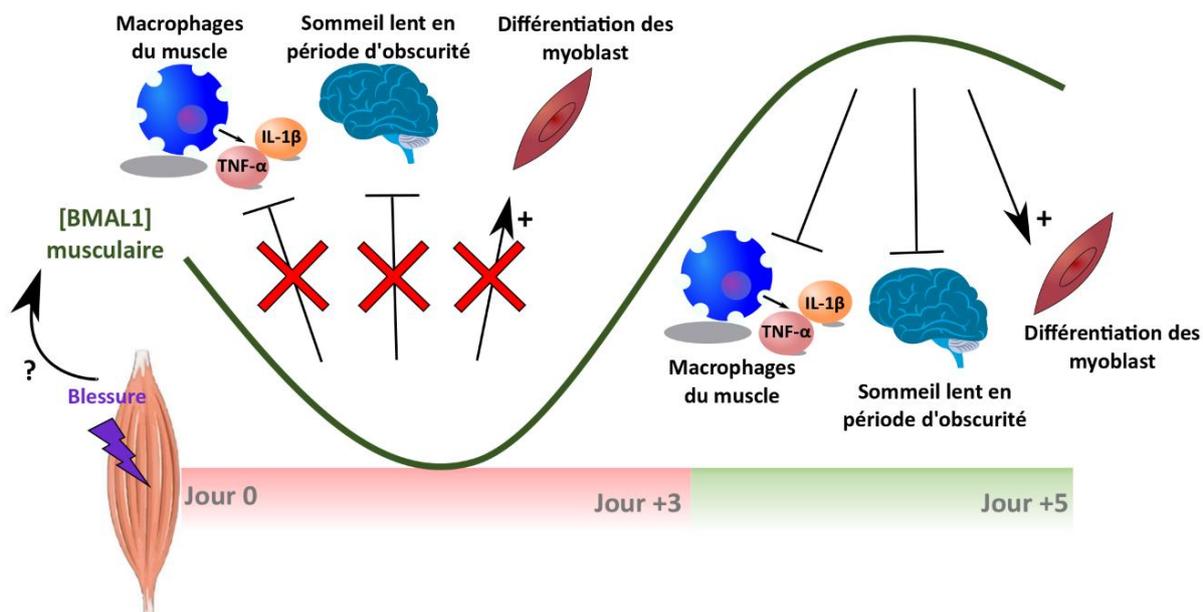
constaté sur les animaux BLS implantés. Dans le cas d'un challenge infectieux, l'augmentation du TTS semble induite par la réponse immuno-inflammatoire impliquant une production accrue des cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  (Besedovsky et al., 2019). Étant donné que les lésions musculaires induisent une nécrose cellulaire qui va activer et recruter des cellules immunitaires entraînant une libération massive de cytokines inflammatoires au niveau local (Smith et al., 2008), cela pourrait également engendrer une augmentation au niveau cérébral et induire une augmentation du TTS. Nous avons analysé le contenu tissulaire des cytokines pro-inflammatoires dans le tissu cérébral et la circulation sanguine, afin d'évaluer cette possibilité. Nous avons constaté un niveau plus faible de TNF- $\alpha$  dans le cortex frontal chez les animaux BLS par rapport aux animaux CTL, et aucune différence significative pour toutes les autres cytokines pro- et anti-inflammatoires que ce soit au niveau du cortex frontal ou de l'hippocampe. Le niveau plus faible de TNF- $\alpha$  dans le cortex frontal des animaux blessés est observé après la période d'obscurité de J+1 (l'euthanasie a lieu à 08:00, c.-à-d. au début de la période lumineuse de J+2), pendant laquelle nous observons une augmentation du TTS (d'environ 45 %, comme indiqué dans la figure 47). Le TNF- $\alpha$  est impliqué dans la régulation du sommeil et les concentrations cérébrales de TNF- $\alpha$  fluctuent avec le cycle veille-sommeil, avec un pic au début de la période de repos et un creux après la période de sommeil (Floyd & Krueger, 1997; Krueger et al., 1998). Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que le niveau plus faible de TNF- $\alpha$  dans le cortex frontal des animaux blessés est une conséquence de l'augmentation du TTS qui a eu lieu pendant la période d'obscurité précédant le prélèvement cérébral (Dimitrov et al., 2015; Rockstrom et al., 2018).

Le fait que les niveaux d'IGF-1 au niveau du cortex frontal et de l'hippocampe soient plus faibles chez les animaux blessés est inattendu, encore une fois au regard de l'heure du prélèvement, qui correspond à la fin de la période d'obscurité de J+1 pendant laquelle le TTS et le temps de sommeil lent ont été augmentés. Le sommeil lent est associé à la sécrétion de l'hormone de libération de l'hormone de croissance (GHRH ; Obal & Krueger, 2004) et la GHRH exerce une stimulation simultanée sur le temps de sommeil lent et sur la sécrétion de GH (Obal & Krueger, 2004). Comme la production d'IGF-1 au niveau plasmatique et au niveau local est stimulée par la GH (Giustina & Veldhuis, 1998) nous aurions pu s'attendre à observer une augmentation de la quantité d'IGF-1 suite à l'augmentation du temps de sommeil lent pour les animaux BLS. Ces niveaux plus faibles d'IGF-1 soulignent une limite de notre objectif, qui

était d'établir des liens entre les effets des lésions sur le sommeil et les molécules régulatrices du sommeil. Si ces molécules régulatrices modulent le sommeil, elles sont également modulées par le temps de sommeil et selon l'heure du prélèvement, la modification du temps de sommeil peut modifier l'expression de ces molécules. Pour avoir une idée plus précise de leur implication dans l'augmentation du TTS pendant la période d'obscurité, le prélèvement de tissus aurait dû être effectué juste avant la période d'obscurité, c'est-à-dire à 20:00 à J+2, ou à 20:00 à J+1 (le TTS étant augmenté de 25% et 45% respectivement pour ces deux derniers). En revanche, au-delà du choix de temporalité du prélèvement et des problématiques que cela soulève, cette diminution des niveaux d'IGF-1 au niveau cérébral pourrait jouer un rôle dans l'augmentation du TTS étant donné l'effet éveillant d'IGF-1 par la stimulation des neurones à orexine (Zegarra-Valdivia et al., 2020). Ces auteurs ont démontré chez la souris, qu'une inactivation génétique des récepteurs à l'IGF-1 des neurones à orexine est associée à des niveaux plus faibles d'orexine dans l'hypothalamus, une activité prédominante des ondes lentes dans l'EEG et une latence réduite du sommeil. Ainsi, l'injection et le blocage de l'action d'IGF-1 au niveau thalamique et la modulation et l'analyse de l'activité des neurones à orexine à la suite d'une blessure musculaire pourrait permettre de déterminer leur potentielle implication dans l'augmentation du TTS observée après blessure. À l'avenir, nous pourrions également étudier s'il existe des liens mécanistiques entre la forte production locale d'IGF-1 au niveau musculaire en réponse à la blessure et les niveaux cérébraux d'IGF-1, faisant de l'IGF-1 un médiateur entre les blessures périphériques et la régulation centrale du sommeil.

Un autre résultat intéressant est le niveau plus faible de BMAL1 au niveau des muscles des animaux blessés deux jours après la blessure comparée au niveau de BMAL1 observé dans les muscles des animaux CTL. BMAL1 est un facteur de transcription qui régule l'expression de nombreux gènes cibles et qui est un composant primordial de l'horloge moléculaire de l'ensemble de nos cellules. Il est impliqué dans de très nombreuses fonctions et notamment dans le maintien et l'intégrité de la fonction des muscles squelettiques (Andrews et al., 2010) et dans le processus de réparation musculaire (Chatterjee et al., 2013; McDearmon et al., 2006). En effet, une étude a montré que BMAL1 participe à la régulation temporelle de la myogenèse notamment en favorisant la prolifération et la différenciation des progéniteurs musculaires (Chatterjee et al., 2015). Cette étude a montré que BMAL1 est fortement régulée

à la hausse 5 jours après l'induction d'une lésion musculaire (par injection de cardiotoxine) au niveau du muscle *Tibialis Anterior* (Chatterjee et al., 2015). D'autre part, BMAL1 a été décrit comme contrôlant les réponses inflammatoires des macrophages en inhibant la production d'IL-1 $\beta$  et de TNF- $\alpha$  (Curtis et al., 2015; Early et al., 2018; Oishi et al., 2017) démontrant des fonctions anti-inflammatoires claires. Il est important de noter que ces observations ont été faites en dehors du tissu musculaire et du contexte de la réparation musculaire. Cependant, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'une baisse initiale des niveaux de BMAL1 musculaire (mesurée à J+2 dans notre étude) en réponse à la blessure musculaire serait un mécanisme supplémentaire à ceux déjà connus pour faciliter la mise en place de la réponse pro-inflammatoire précoce à la blessure. Puis cette diminution serait suivie d'une régulation ascendante pendant la transition vers la phase anti-inflammatoire et la différenciation des myoblastes (Jour +5 dans l'étude de Chatterjee et al., 2015). En plus de ce rôle anti-inflammatoire, BMAL1 est également associé à l'activité locomotrice et à la régulation du sommeil (Ehlen et al., 2017; McDearmon et al., 2006; Schiaffino et al., 2016). Une inactivation génétique de BMAL1 au niveau du corps entier chez la souris est associée à une réduction de l'activité locomotrice (McDearmon et al., 2006) et à une augmentation de la quantité totale de sommeil pendant la période d'obscurité (Ehlen et al., 2017). La réexpression ciblée de l'expression de BMAL1 dans le muscle (et pas dans le cerveau) diminue le temps de sommeil lors de la période d'obscurité (Ehlen et al., 2017). De plus, les souris surexprimant BMAL1 au niveau musculaire présentent une moindre augmentation du temps de sommeil à la suite d'une privation de sommeil (Ehlen et al., 2017). Ainsi, des niveaux plus faibles de BMAL1 au niveau du muscle blessé pourraient être en lien avec l'augmentation du temps de sommeil observé lors de la période d'obscurité en réponse à la blessure (Fig. 61). Cependant, comme BMAL1 est un facteur de transcription, la baisse au niveau musculaire ne peut pas avoir un effet direct sur la régulation du sommeil. Ainsi, des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer quelles pourraient être les protéines régulées par BMAL1, produites au niveau musculaire et qui pourraient être impliquées dans la régulation du sommeil. D'autres études sont également nécessaires pour déterminer avec précision la cinétique des niveaux de BMAL1 en réponse à une blessure musculaire et la nécessité ou non de cette diminution précoce des niveaux musculaires de BMAL1 pour permettre l'augmentation du temps de sommeil observé après une blessure.



**Figure 61 : Rôle hypothétique de BMAL1 musculaire dans la régulation du sommeil et la réponse à la blessure.** En réponse à la lésion musculaire, nous observons une diminution du contenu musculaire en BMAL1. La diminution de BMAL1 permet de lever l'inhibition que BMAL1 exerce sur la production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages et sur le temps de sommeil en période d'obscurité. Cela permet également d'éviter l'effet stimulant que BMAL1 exerce sur la différenciation des myoblastes qui doit intervenir plus tardivement dans le processus de réparation musculaire. En effet, après 3-4 jours, le passage à un environnement moins inflammatoire est associé à une augmentation du niveau musculaire de BMAL1 ce qui permet de limiter la production des cytokines pro-inflammatoire, de stimuler la différenciation des myoblastes et de retrouver un temps de sommeil normal pendant la période d'obscurité.

## Conclusion

En conclusion, nos résultats indiquent **une augmentation du temps total de sommeil, spécifique au sommeil lent, 48 et 72 heures après l'induction de la blessure musculaire** associée à une **augmentation de la stabilité du sommeil pendant les premières 24 heures** post-blessure. Ces modifications du sommeil ont lieu pendant la période préférentielle d'activité du rat (la période d'obscurité) et ne sont pas associées à un changement des paramètres spectraux du sommeil. Nos résultats ne permettent pas de conclure sur l'implication des spindles dans la stabilisation du sommeil observé chez les animaux BLS, mais les spindles ne semblent pas responsables de l'augmentation du TTS. En revanche, les concentrations plus faibles d'IGF-1 au niveau cérébral, et de BMAL1 au niveau musculaire observé deux jours après l'induction de la blessure (c.-à-d. pendant l'augmentation du TTS) pourraient jouer un rôle dans l'augmentation du TTS

**« Le sommeil est une petite mort. Une  
minuscule échappée sur le grand lit immobile  
du néant »**

Rachel Fontane

## ÉTUDE N°2

---

**Validation d'une nouvelle méthode non  
invasive pour l'analyse du sommeil chez le  
rat**

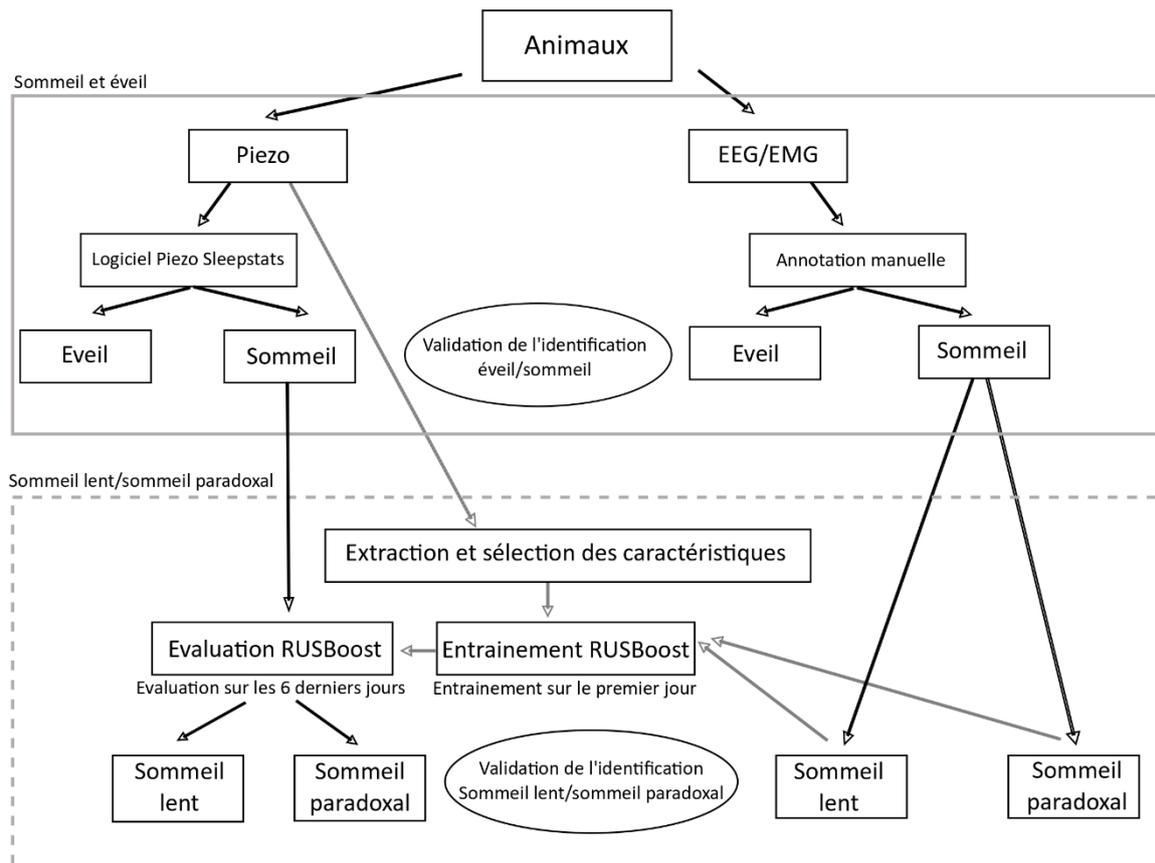
## Résumé

La méthode de référence pour l'analyse du sommeil chez les mammifères est la polysomnographie (enregistrements EEG et EMG) permettant de caractériser la quantité et l'architecture du sommeil par lecture manuelle ou à l'aide d'algorithmes automatiques (Campbell, 2009; Deboer, 2007; Saper, 1890). Cependant, l'inflammation provoquée par la chirurgie, nécessaire à l'implantation des électrodes, peut induire des biais dans les analyses portant sur les réponses inflammatoires centrales et périphériques (Woalder, 2017). De plus, le coût temporel et financier de la polysomnographie n'est pas adapté aux études qui souhaitent prendre en compte le sommeil comme variable secondaire. Afin de répondre à ces problématiques, des techniques non invasives, telles que l'actimétrie, qui permettent d'évaluer le temps de sommeil ont été développées chez la souris (Fisher et al., 1990; McShane et al., 2012; Pack et al., 2007; Tang & Sanford, 2002) et l'une des plus prometteuses est le système piézoélectrique (piézo ; Mang et al., 2014). Les capteurs piézo ont la propriété d'émettre un signal électrique proportionnel à toute déformation physique reçue et permettent d'enregistrer l'ensemble des mouvements effectués par les animaux. La sensibilité des capteurs permet d'enregistrer jusqu'aux mouvements respiratoires des souris endormies (Mang et al., 2014). L'usage d'un tel système pour discriminer le sommeil et l'éveil n'a jamais été éprouvé chez le rat, un modèle animal très utilisé pour lequel il n'y a pas encore d'alternatives non invasives fiables à l'EEG/EMG pour l'analyse du sommeil.

L'objectif de notre étude était **d'évaluer les performances du système piézoélectrique pour identifier l'éveil et le sommeil chez le rat** en comparant ces résultats avec ceux obtenus avec la lecture visuelle de l'EEG/EMG. Pour cela des **enregistrements simultanés** avec le **système piézo et l'EEG/EMG** ont été réalisés pendant 7 jours sur des animaux (**n=14**) soumis à deux types de photopériodes différentes, la photopériode contrôle 12:12 (**n=7**) et une photopériode « allongée » 16:8 (**n=7**). La modification du rythme veille-sommeil par le changement de photopériode permet de vérifier que le système piézo est capable d'évaluer des temps de sommeils sous différentes contraintes. Le **TTS par jour** (évalué sur les 7 jours d'enregistrements) et le **TTS par heure** (évalué sur les 24 dernières heures) sont **similaires entre les deux méthodes d'enregistrement**, que ce soit pour les animaux exposés à la photopériode 12:12 ou 16:8.

L'objectif secondaire de cette étude était d'évaluer le potentiel du système piézoélectrique pour discriminer les stades de sommeil : le sommeil lent et le sommeil paradoxal. Le signal piézoélectrique qui est enregistré lorsque l'animal est endormi provient majoritairement des mouvements respiratoires de l'animal. Des études ont observé une accélération de la fréquence respiratoire pendant le sommeil paradoxal (Snyder et al., 1965; Yaghouby et al., 2016) et une équipe de recherche a réussi à discriminer le sommeil lent du sommeil paradoxal à l'aide d'un radar doppler qui enregistre les mouvements respiratoires chez le rat (Zeng et al., 2012).

Ainsi, nous avons **évalué la possibilité d'identifier les stades de sommeil à partir du signal respiratoire enregistré par le système piézoélectrique**. Pour cela, nous avons réalisé une analyse spectrale du signal piézo couplée à une analyse de la stabilité du signal afin d'identifier des paramètres permettant de discriminer les stades de sommeil. La **sélection de trente-cinq paramètres** spécifiques et l'utilisation d'un **algorithme de classification** automatique ont permis de **discriminer les deux stades de sommeil** avec une **précision de 90%** par rapport à la notation visuelle EEG/EMG.



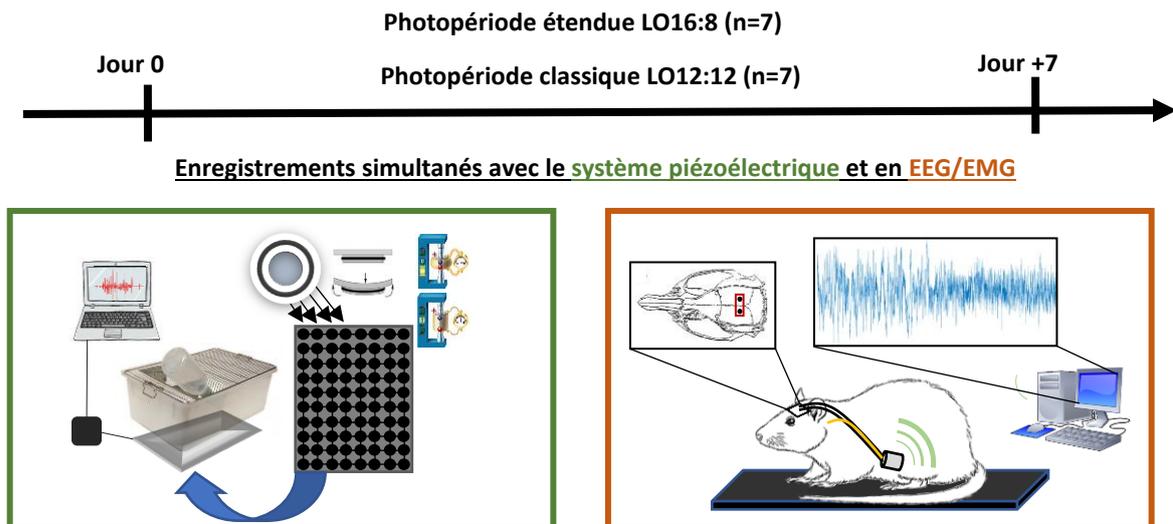
**Figure 62 : Schéma des étapes méthodologiques de cette étude.** Le premier rectangle (ligne pleine) correspond à l'évaluation du système piézoélectrique pour identifier l'éveil et le sommeil. Nous avons comparé pour chaque période de 10 secondes (823 359 périodes), pendant 7 jours d'enregistrements, l'annotation manuelle faite à partir du signal EEG/EMG et l'état évalué par le logiciel piézo. Cela sur 7 animaux soumis à la photopériode LO12:12, mais également sur 7 animaux soumis à une photopériode modifiée (LO16:8). Puis sur les animaux soumis à la LO12:12 nous avons extrait et sélectionné des caractéristiques du signal brut piézo et nous avons entraîné un algorithme pour discriminer le sommeil lent du sommeil paradoxal avec les données du premier jour (second carré, ligne pointillée). Nous avons évalué la performance de l'algorithme sur les données des 6 jours restants.



## 4.1. Matériel et Méthodes

### 1 - Procédure expérimentale

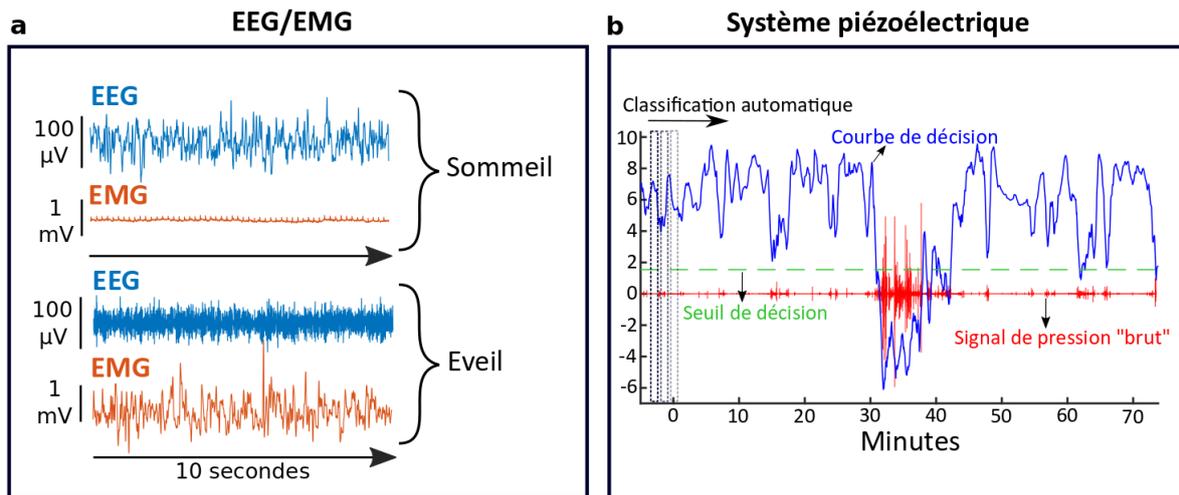
L'expérience a été réalisée sur **14 rats** Wistar mâles (laboratoire Charles Rivers, France) âgés de 4 semaines et pesant 200-220 g à leur arrivée. Pendant une semaine, les animaux ont été placés à 4 par cage (612 x 435 x 216 mm), soumis à une photopériode 12:12 (12:12 : 12 heures de lumière : 12 heures d'obscurité ; éclairage de 08:00 à 20:00) dans un environnement à température contrôlée ( $21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) avec de l'eau et de la nourriture disponibles ad libitum. Sept jours après leur arrivée au laboratoire, les émetteurs pour l'enregistrement des EEG/EMG ont été implantés chirurgicalement (HD-X02, Data Sciences International, St Paul, USA). L'implantation chirurgicale et la procédure analgésique ont été décrites dans les *méthodes* de l'étude n°1. Après la chirurgie, les animaux ont été logés individuellement dans une armoire ventilée (BIO-C36, Tecniplast, Buguggiate, Italie) et ont bénéficié d'une période de récupération de dix jours sous la photopériode habituelle 12:12 avant le début des enregistrements. Après ces dix jours, les rats ont été placés dans le dispositif piézoélectrique (piézo ; Signal Solutions, LLC, Lexington, KY, USA) et enregistré simultanément avec l'EEG/EMG et le système piézo. Les cages piézoélectriques sont des cages individuelles standard (435 x 290 x 150 mm) qui se composent d'une première cage en polycarbonate dans laquelle est placé un tapis rempli de capteurs. Une deuxième cage plus fine est ensuite placée sur ce tapis et remplie de litière. Les cages sont transparentes et il y en a deux par étage, ce qui limite l'isolement. Dès le début des enregistrements, le groupe 12:12 est resté soumis à la photopériode 12:12 tandis que l'autre groupe a été soumis à la photopériode « allongée » 16:8 (éclairage de 08:00 à 00:00). Pendant cette période, les animaux sont laissés seuls et ne sont dérangés que pour surveiller l'eau et la nourriture. L'étude a été approuvée par le comité institutionnel d'éthique animale (Protocole DAP\_11-2019).



**Figure 63 : Schéma du protocole expérimental.** Nous avons réalisé des enregistrements simultanés avec le système piézoélectrique et un implant téléométrique EEG/EMG sur 14 animaux pendant 7 jours. Nous avons séparé les animaux en deux groupes, soumis à deux photopériodes différentes afin de modifier la dynamique de sommeil des animaux.

## 2 - Acquisition et analyses des signaux EEG/EMG et des signaux piézoélectriques

Les signaux EEG/EMG ont été enregistrés à l'aide du logiciel Neuroscore version 6.0 (DSI, St Paul, MN, USA). Les signaux EEG ont été échantillonnés à 500 Hz et ont été filtrés (de type « band pass » de 0,3-49 Hz) et chaque période de 10 secondes a été classée en tant que période d'éveil, de sommeil lent ou de sommeil paradoxal en fonction de la fréquence et de l'amplitude des signaux EEG/EMG (voir partie 1.2.1 : *La macrostructure du sommeil*). À partir de ces annotations, nous avons calculé le temps total de sommeil (TTS) comme la durée du sommeil lent + la durée du sommeil paradoxal. Le système piézoélectrique est composé du système PiezoSleep 2.0 et du logiciel d'analyse est PiezoSleepStats (Signal Solutions, LLC, Lexington, KY, USA). Le fonctionnement détaillé du système est décrit dans Mang et al., 2014. Brièvement, le tapis rempli de capteurs piézoélectriques est placé sous la cage de l'animal. Ces capteurs piézoélectriques émettent un signal électrique proportionnel à chaque déformation physique subite. Le signal correspondant à une période d'éveil est ample et variable, à l'inverse, la phase de sommeil est caractérisée par un signal régulier de faible amplitude. À partir de l'amplitude et de la variabilité du signal, le logiciel PiezoSleepStats calcule une courbe de décision statistique et une valeur seuil qui lui permet de discriminer l'éveil du sommeil (Fig. 64). Nous avons effectué des enregistrements de 24h pour permettre au logiciel PiezoSleepStats de prendre en compte les variations interquotidiennes de poids des animaux.



**Figure 64 : Illustration de l'identification de l'éveil et du sommeil en EEG/EMG et avec le système piézo.** **a** l'annotation de chaque période de 10 secondes en EEG/EMG est faite par lecture visuelle en fonction de la fréquence et de l'amplitude des signaux EEG/EMG. **b** la discrimination automatique entre éveil et sommeil pour le système piézo repose sur le calcul d'une courbe de décision (en bleu) qui est calculée à partir de l'amplitude et de la variabilité du signal de pression « brut » (en rouge). Une valeur de seuil (en vert) est déterminée en fonction de l'écart-type et de l'amplitude moyenne de la courbe de pression (pour par exemple prendre en compte le poids de l'animal). Pour toutes les valeurs de décision supérieures à la valeur de seuil, l'animal est considéré comme endormi, et réveillé pour les valeurs inférieures.

### 3 – Comparaison des deux méthodes d'enregistrement

Pour chaque période de 10 secondes, l'état (éveil ou sommeil) de l'animal est évalué à la fois avec la notation visuelle des signaux EEG/EMG et automatiquement pour le système piézo. Nous avons choisi des périodes de 10 secondes, car nous considérons que c'est un bon compromis pour étudier la stabilité du sommeil tout en permettant une lecture manuelle pendant 7 jours. Nous avons calculé la sensibilité, la spécificité et la précision du système piézo en comparant les résultats obtenus avec les deux méthodes sur toutes les périodes de 10 secondes et cela pour les deux photopériodes (ce qui correspond à un total de 823 359 périodes après suppression de certaines époques classées comme illisibles sur l'EEG/EMG). La sensibilité est la capacité de la méthode à identifier correctement les périodes de sommeil (également appelée « vrais positifs »). La spécificité est la capacité de la méthode à identifier correctement les périodes d'éveil (également appelée « vrais négatifs »). La précision est la proportion de bons résultats, qu'ils soient vrais, positifs ou vrais négatifs. Pour le TTS, nous avons évalué le pourcentage de sommeil par jour pendant les sept jours d'enregistrement. Nous avons également analysé la cinétique du sommeil heure par heure pour le dernier jour d'enregistrement. Sur la base de l'identification de chaque période de 10 secondes, nous avons également examiné la qualité du sommeil en mesurant la fréquence des épisodes de

sommeil et de veille par heure sur huit catégories de durée d'épisodes consécutifs (10, 20, 30-40, 50-80, 90-160, 170-320, 330-640, >650 sec).

#### **4 - Extraction des paramètres pour classifier les stades de sommeil à partir du signal piézoélectrique**

Alors que nous avons utilisé le logiciel PiezoSleepStats qui fournit une notation automatisée de l'éveil et du sommeil, nous avons tenté de discriminer le sommeil lent du sommeil paradoxal en utilisant nos propres méthodes d'analyses. Pour cela, nous avons travaillé uniquement sur le signal brut (RS) enregistré par le système piézo et nous avons considéré uniquement le groupe soumis à la photopériode classique (12:12, n=7). Nous avons réalisé l'ensemble de ces analyses en écrivant nos algorithmes sur le logiciel Matlab (R2019b, MathWorks). Afin de réduire les signaux parasites et de mettre en évidence les oscillations caractéristiques du signal piézo issues de l'enregistrement des animaux endormis, nous avons calculé l'autocorrélation du signal (AS) piézo. La fonction d'autocorrélation est une méthode utilisée avec succès pour décrire la stabilité des signaux respiratoires (Donohue et al., 2008; Zeng et al., 2012) qui permet de mettre en évidence les différences entre les signaux piézo associés au sommeil lent et au sommeil paradoxal. À partir de ces deux types de signaux (RS et AS), nous avons extrait le Kurtosis, l'écart-type, la moyenne, la racine carrée des écarts à la moyenne et la variation de l'enveloppe du signal. L'analyse spectrale du RS et de l'AS a été effectuée en appliquant la transformée de Fourier (FFT) via la méthode de Pwelch (Pw ; avec une fenêtre glissante de 5 secondes et un recouvrement de 50%). De cette analyse spectrale, nous avons extrait la fréquence maximale entre 0-8 Hz et 1-3 Hz ; la puissance spectrale maximale entre 0-8 Hz et 1-3 Hz ; la fréquence moyenne pondérée entre 0-1 Hz, 1-3 Hz, 3-5 Hz, 5-7 Hz ; certains rapports de puissance spectrale : 1,4/1,6 Hz - 1,6/1,8 Hz - 1,4/1,8 Hz - 2,2/2,4 Hz - 2/5 Hz ; et la densité spectrale entre 1-3 Hz et 3-5 Hz. Nous avons également calculé la fréquence instantanée ( $Fq_{inst}$ ) du RS, en utilisant la transformation de Hilbert (Cohen, 2014) pour évaluer précisément les changements de fréquence à l'intérieur des périodes de 10 secondes de sommeil lent et paradoxal. Nous avons étudié l'écart-type de la  $Fq_{inst}$ , la moyenne et la variation de l'enveloppe.

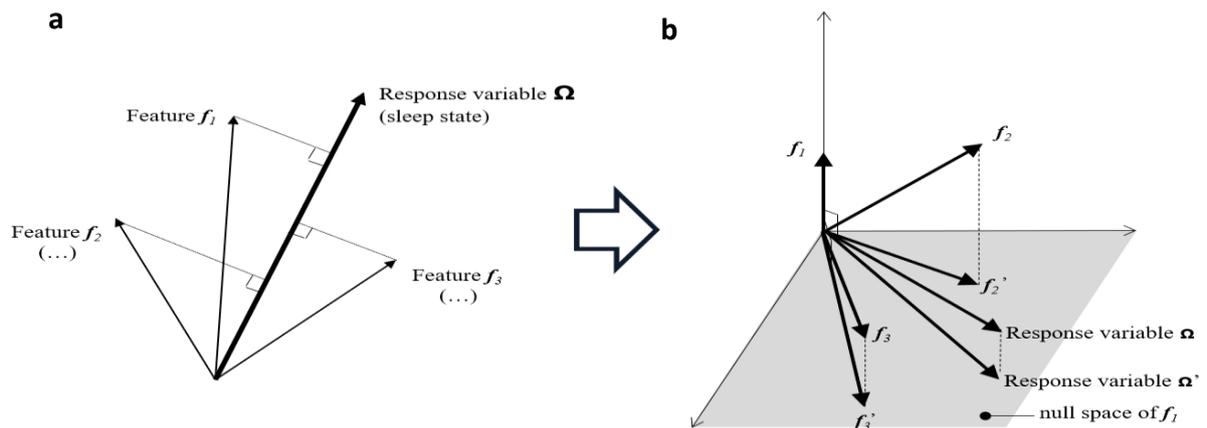
#### **5 - Sélection des paramètres informatifs pour l'identification des stades de sommeil**

Une fois l'ensemble des paramètres candidats calculés, il a fallu sélectionner les paramètres pertinents pour la discrimination des stades de sommeil. La méthode utilisée pour établir

l'ensemble des paramètres pertinents pour la discrimination des stades de sommeil (variable de réponse) comprend deux étapes : (1) classement des paramètres candidats par ordre de pertinence décroissante par rapport à la variable de réponse à l'aide de l'algorithme de régression orthogonale (OFR), et (2) élimination des paramètres non pertinents par la méthode de la sonde aléatoire.

**Algorithme OFR.** L'algorithme OFR (Chen et al., 1988) fonctionne de manière itérative, étant donné les vecteurs de variables  $f_k$ ,  $k \in [1...N]$  ( $N$  étant le nombre de paramètres candidats) et le vecteur de la variable réponse  $\Omega$  (Figure 65). Tous les vecteurs sont définis dans l'espace d'observation ; dont la dimension est égale au nombre d'exemples. Tout d'abord, tous les paramètres candidats (y compris les vecteurs "sondes" définis ci-dessous) sont classés en fonction de leurs corrélations avec la variable réponse. Dans l'espace d'observation, la corrélation  $c_k$  entre le vecteur « paramètres »  $f_k$  et la variable réponse est le cosinus carré de l'angle entre le paramètre candidat et la variable réponse :  $c_k = \cos^2(f_k, \Omega)$ . Le paramètre le plus corrélé (avec le cosinus carré maximal) est classé en premier. Ensuite, tous les paramètres restants et la variable réponse sont orthogonalisés par rapport au premier paramètre, afin d'éliminer la contribution de ce dernier à la variable réponse. Le premier paramètre est alors mis de côté et retiré de l'ensemble, et l'algorithme est itéré sur les paramètres orthogonaux restants, jusqu'à ce que tous les paramètres candidats soient classés.

**Méthode de la sonde aléatoire.** Après le classement des paramètres candidats, la sélection a été effectuée par la méthode des sondes aléatoires (Stoppiglia et al., 2003). Plus précisément, 100 vecteurs "sondes" tirés au hasard ont été ajoutés à l'ensemble des paramètres candidats, et classés avec ces derniers comme décrits ci-dessus. Plus la probabilité qu'une sonde soit mieux classée qu'un paramètre candidat est élevée, plus la pertinence de ce paramètre candidat est faible. Pour chaque paramètre candidat  $i$ , la probabilité cumulative  $P_p(i)$  qu'une sonde  $p$  soit mieux classée que ce paramètre a été calculée ;  $P_p(i)$  peut être interprétée comme le risque de conserver le paramètre  $i$  bien qu'il ne soit pas pertinent. Tous les paramètres candidats pour lesquels ce risque est supérieur à un seuil défini par l'utilisateur sont écartés. Ici, le seuil choisi est de 0,01 (cela traduit le fait que nous avons arrêté de sélectionner les paramètres candidats dès que la première variable sonde « aléatoire » a été classée).



**Figure 65 : Illustration du procédé de régression orthogonale pour le classement et la sélection des paramètres.** **a** tous les paramètres candidats sont classés en fonction de leur corrélation avec la variable de réponse (les stades de sommeil), qui correspond au cosinus carré de l'angle formé entre le paramètre candidat et la variable réponse ; le paramètre le plus corrélé (avec le cosinus carré le plus élevé) est classé premier. **b** tous les paramètres restants et la variable réponse sont orthogonalisés par rapport au premier paramètre, dans le but d'éliminer sa contribution aux autres paramètres. Ensuite, le premier paramètre est mis de côté et retiré du groupe de paramètres candidats et le procédé reprend du début avec les paramètres candidats restants jusqu'au classement de tous les paramètres.

## 6 - Algorithme d'apprentissage supervisé pour la classification du sommeil lent et du sommeil paradoxal

Maintenant que nous avons sélectionné les paramètres candidats pertinents, il a fallu définir l'algorithme optimal pour discriminer les stades de sommeil en fonction de notre jeu de données. La problématique majeure à prendre en compte dans la sélection de l'algorithme de classification dans notre cas est le déséquilibre au sein de notre variable réponse : il y a beaucoup plus de périodes de sommeil lent que de périodes de sommeil paradoxal. Ce déséquilibre entre nos deux classes peut engendrer des défauts de classification selon l'algorithme utilisé. Afin de répondre à cette problématique, il existe deux méthodes classiquement utilisées et décrites dans la littérature (Weiss, 2004). La première méthode, le « data sampling » consiste à diminuer la différence du nombre d'exemple entre les classes, soit en diminuant le nombre d'exemples de la classe la plus représentée (« undersampling ») ou en augmentant le nombre d'exemples de la classe la moins représentée (« oversampling »). La seconde méthode, le « data boosting » consiste à réajuster les paramètres de classification chaque fois qu'un exemple est mal classifié, et cela permet de diminuer les effets néfastes d'une répartition déséquilibrée entre deux classes. L'algorithme RUSBoost combine ces deux

méthodes et permet ainsi d'obtenir de très bons résultats dans le cas d'un jeu de données déséquilibré comme le nôtre (Seiffert et al., 2010).

## **7 - Analyses statistiques**

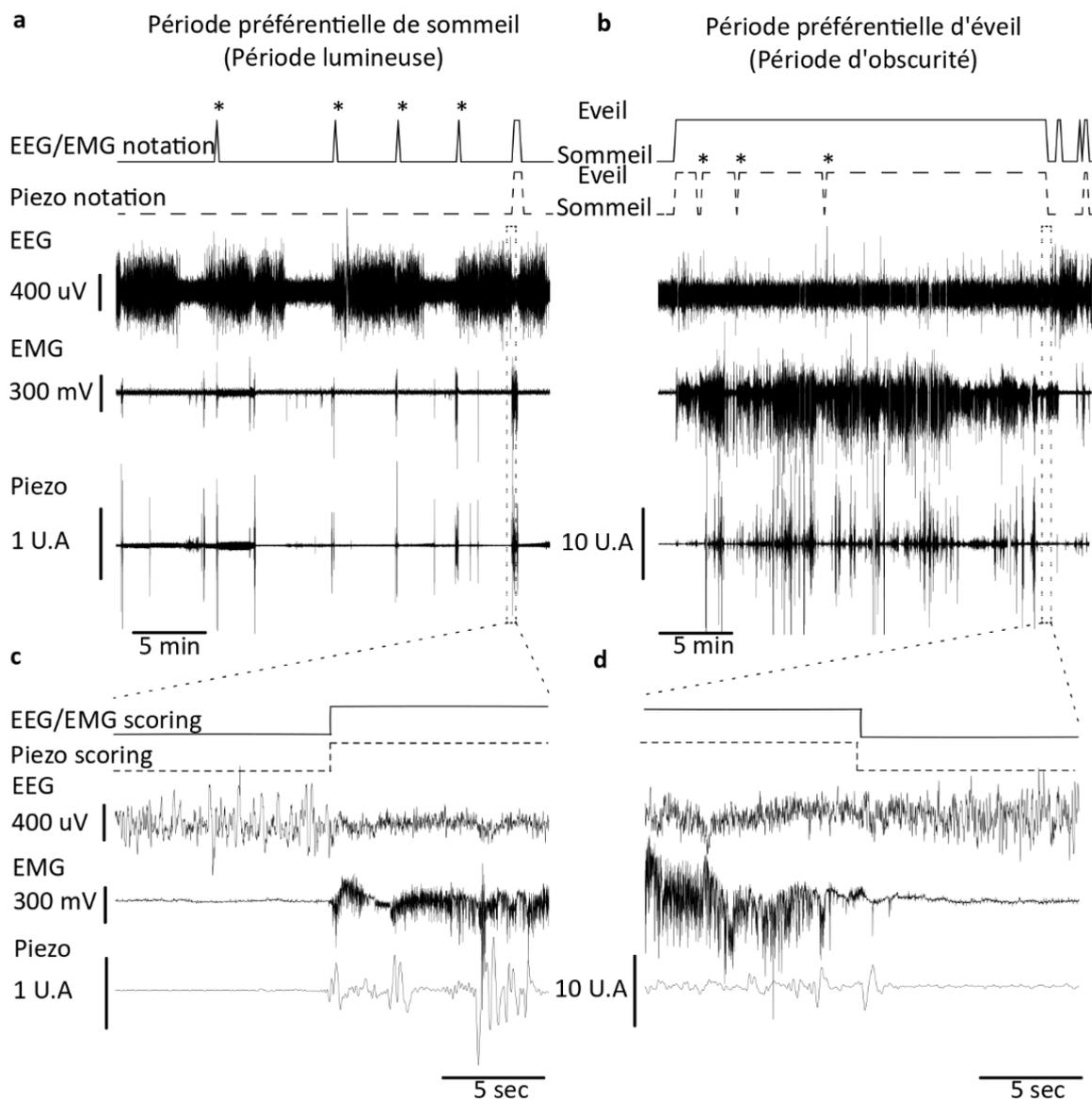
Toutes les données sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne et ont été analysées à l'aide de Jamovi (The jamovi project, jamovi 2.3). La normalité de chaque distribution a été testée avec le test de Shapiro-Wilk et l'égalité des variances avec un test de Fisher. Dans le cas de données normales (TTS sur 7 jours), nous avons réalisé une analyse de variance (ANOVA) à deux facteurs et à mesures répétées, incluant la méthode (système piézoélectrique vs EEG/EMG) comme facteur intra-animal et la photopériode (groupes 12:12 vs 16:8) comme facteur interanimal. Pour les tests posthoc, nous avons appliqué la correction de Bonferroni sur le risque  $\alpha$  pour les comparaisons multiples. Comme les valeurs n'étaient pas distribuées selon la loi normale pour l'évaluation du TTS heure par heure, nous avons utilisé une ANOVA de Friedman avec deux facteurs (méthode (piézo et EEG/EMG) et heure (24 niveaux) pour le groupe 12:12 et le groupe 16:8. Une analyse de corrélation de Spearman a été réalisée entre le TTS par heure évalué par le système piézo et celui évalué avec l'EEG/EMG.

## 4.2. Résultats

Première partie : Discrimination du sommeil et de l'éveil avec le système piézoélectrique

### 4.2.1. Enregistrements simultanés EEG/EMG et piézoélectrique

La qualité des signaux EEG/EMG et des signaux enregistrés avec le système piézoélectrique pour l'identification des états de sommeil et d'éveil est illustrée sur un enregistrement de 30 minutes réalisé pendant la période préférentielle de sommeil (Fig. 66a) et pendant la période préférentielle d'activité (Fig. 66b) correspondant respectivement à la période lumineuse et à la période d'obscurité, avec l'illustration d'une courte transition (20 secondes) du sommeil à l'éveil (Fig. 66c) et de l'éveil au sommeil (Fig. 66d).



**Figure 66 : Signaux EEG/EMG/Piézo enregistrés simultanément.** **a** Pendant la période préférentielle de sommeil (période lumineuse), et **b** pendant la période préférentielle d'activité (période d'obscurité). L'annotation de l'état (éveil/sommeil) par EEG/EMG (ligne pleine) et avec le système piézo (ligne pointillée) est indiquée au-dessus des signaux. (\*) illustrent les différences dans l'annotation entre les deux méthodes. **c** et **d** représentent des zooms de 20 secondes illustrant une transition du sommeil à l'éveil (c) ou de l'éveil au sommeil (d).

**Discussion.** D'un point de vue pratique, le système piézoélectrique peut être comparé à de l'actimétrie aiguë étant donné qu'il enregistre l'ensemble des mouvements de l'animal (Flores et al., 2007; Mang et al., 2014; Yaghouby et al., 2016). Ce rapprochement entre ces deux méthodes est illustré par le haut niveau de similarité entre l'EMG et le système piézoélectrique sur les enregistrements de 30 minutes présentés sur la figure 73. La similarité est encore plus évidente sur les transitions entre le sommeil et l'éveil. En revanche, nous pouvons voir que lors de la période préférentielle de sommeil, le système piézo détecte bien du mouvement, mais n'associe pas ces événements avec le réveil de l'animal (ce sont les \* de la figure 73a). Une explication potentielle est que ces mouvements ne durent pas assez longtemps ou sont trop peu intenses pour provoquer une chute significative de la courbe de décision du système piézoélectrique (voir *Méthodes*) et être alors associés à une période d'éveil par le système piézo. À l'inverse, nous pouvons voir que pendant la période préférentielle d'activité le système piézo détecte de courtes périodes de sommeil qui ne sont pas détectées en EEG/EMG. Ces événements sont anecdotiques en termes de temps total de sommeil à l'échelle de l'heure, mais peuvent potentiellement affecter l'étude de la fragmentation du sommeil. Ces observations dessinent une tendance du système piézo à surévaluer le sommeil par rapport à l'éveil, soit en omettant de courtes périodes de réveil, soit en détectant de « fausses » périodes de sommeil.

#### **4.2.2. Discrimination veille/sommeil avec le système piézoélectrique**

Nous avons tout d'abord comparé l'annotation de l'ensemble des périodes de 10 secondes entre nos deux méthodes d'enregistrements. Pour rappel, l'annotation se fait avec une lecture visuelle pour les signaux EEG/EMG et se fait automatique pour le système piézo (avec le logiciel PiezoSleepStats, voir *Méthodes*). Au total, 823 359 périodes de 10 secondes (419 806 pour le groupe 12:12 et 403 553 pour le groupe 16:8) ont été comparées entre les deux méthodes. La matrice de confusion entre les deux méthodes d'enregistrement pour l'annotation des périodes de sommeil et d'éveil est présentée dans la table 3. Pour les animaux soumis à la photopériode 12:12, la sensibilité est de 84,8% et la spécificité de 78,4% avec une

précision de 81,9%. Pour les animaux soumis à la photopériode 16:8, la sensibilité est de 90,5% et la spécificité de 76,3% avec une précision de 84,9%. La correspondance globale pour les 823 359 périodes est de 83,4%.

Photopériode 12:12 (n=7)				Photopériode 16:8 (n=7)			
EEG/EMG				EEG/EMG			
		Sommeil	Éveil			Sommeil	Éveil
Piézo	Sommeil	84,8 % (sensibilité)	21,63%	Piézo	Sommeil	90,5% (sensibilité)	23,74%
	Éveil	15,2%	78,37% (spécificité)		Éveil	9,50%	76,26% (spécificité)
Précision		81,91%		Précision		84,89%	

**Table 3 : Matrice de confusion de toutes les périodes de 10 secondes annotées en EEG/EMG et avec le système piézo sur les 7 jours d'enregistrements.**

**Discussion.** En comparant l'ensemble des périodes de 10 secondes annotées avec les deux méthodes d'enregistrement, la précision moyenne est de 83,4% (sur 823 359 périodes). C'est un résultat un peu moins élevé que celui obtenu chez la souris (90%), mais ces études ont été menées sur 48h maximum (Flores et al., 2007; Mang et al., 2014). En revanche, nous observons que les erreurs de classification majoritaires sont des périodes annotées comme des périodes de sommeil par le système piézo alors que ce sont des périodes d'éveils selon la lecture de l'EEG/EMG. Ce résultat illustre une fois de plus ce qui semble être le point faible du système piézo, à savoir une légère surestimation du sommeil par manque de sensibilité pour la détection des courtes périodes d'éveil.

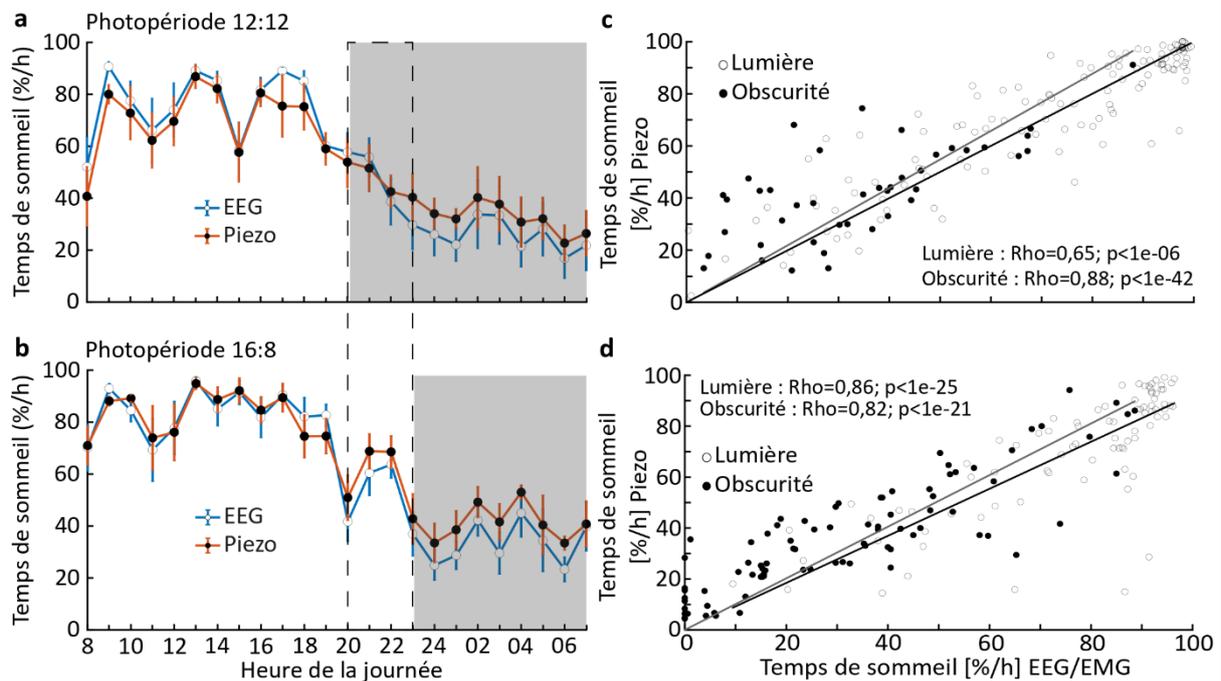
#### 4.2.3. Analyse du temps total de sommeil par jour et par heure

Ensuite, nous avons comparé les résultats obtenus pour l'évaluation du temps total de sommeil (TTS) par jour (évalué sur les 7 jours d'enregistrement), mais également heure par heure (évalué sur les dernières 24 heures d'enregistrement). Le TTS par jour (%/24h) évalué avec le système piézoélectrique et l'EEG/EMG est significativement plus élevé pour les animaux 16:8 par rapport aux animaux 12:12, et il n'y a pas de différence significative entre les deux méthodes pour la même photopériode (12:12 ou 16:8 ; table 4).

Temps total de sommeil (%/24h)		
	Photopériode 12:12	Photopériode 16:8
EEG/EMG	54,9 ± 1,7	60,7 ± 3,0 #
Piézoélectrique	56,3 ± 3,2	64,3 ± 4,9 #

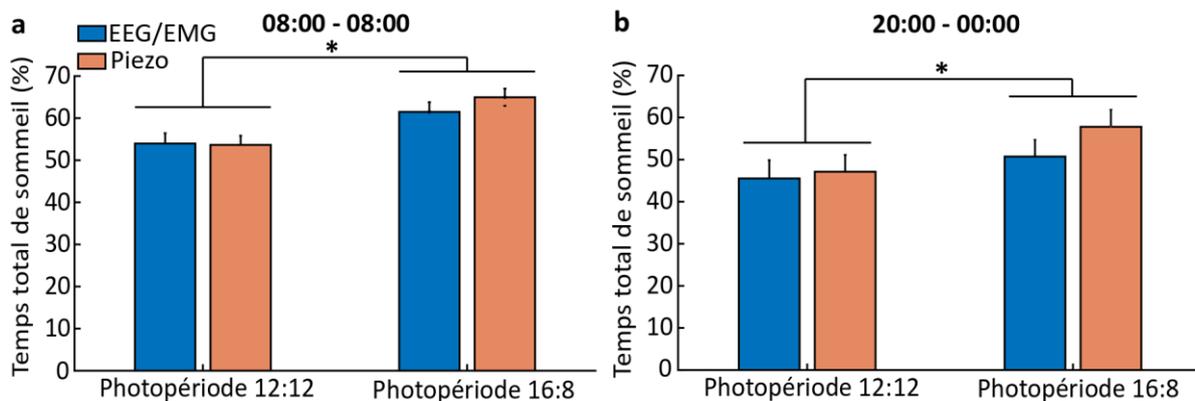
**Table 4 : Évaluation du temps total de sommeil quotidien avec l'EEG/EMG et avec le système piézo.** # différences significatives entre le groupe 16:8 et le groupe 12:12. ANOVA à deux facteurs ( $p < 0,05$  pour le facteur photopériode) et test post hoc de Tukey avec une correction de Bonferroni.

Nous avons ensuite étudié l'évaluation du TTS heure par heure entre les deux méthodes d'enregistrement (pendant les 24 dernières heures de l'enregistrement, entre le jour 6 et le jour 7). Aucune différence statistique n'est observée entre le TTS évalué avec le système piézo et celui évalué avec l'EEG/EMG pour le groupe 12:12, ou pour le groupe 16:8 (Fig. 67a, b). Les changements soudains du temps de sommeil par heure ont été bien mesurés par le système piézoélectrique (Fig. 74a, par exemple à 15:00). Le temps de sommeil évalué heure par heure par le système piézoélectrique est significativement corrélé au temps de sommeil évalué par l'EEG/EMG que ce soit pendant la période lumineuse ou pendant la période d'obscurité, et cela pour les deux photopériodes (Fig. 67c, d).



**Figure 67 : Temps total de sommeil par heure évalué avec l'EEG/EMG et le système piézo.** a) TTS évalué par le système piézo (Piezo, courbe orange) et avec l'EEG/EMG (EEG, courbe bleue) pour le groupe 12:12 et b) pour le groupe 16:8. La lumière reste allumée de 20:00 à 00:00 pour les animaux soumis à la photopériode 16:8 (rectangle en pointillés). c) Analyse de corrélation entre le TTS évalué avec l'EEG/EMG (axe des abscisses) et le TTS évalué avec le système piézo (axe des ordonnées), chaque point représente le TTS d'un animal pour une heure pendant la période lumineuse (point blanc) et pendant la période d'obscurité (point noir) pour la photopériode 12:12 et d) pour la photopériode 16:8.

De plus, sur ces 24h, nous observons un TTS significativement plus élevé pour animaux soumis à la photopériode 16:8 par rapport aux animaux soumis à la photopériode 12:12, que ce soit sur l'ensemble des 24h (Fig. 68a) ou seulement pendant la période d'allongement de la lumière (de 20:00 à 00:00 ; Fig. 68b). Cette différence de TTS est similaire pour les deux méthodes d'enregistrements (Fig. 68a, b).



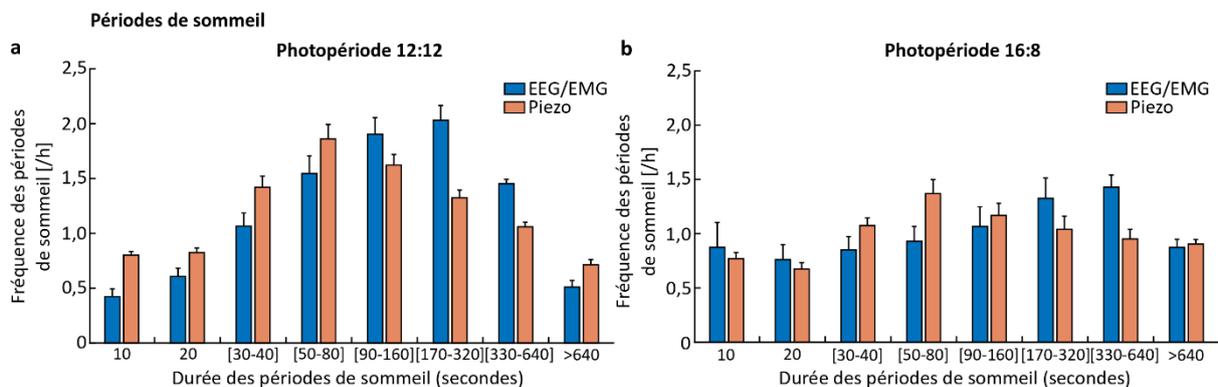
**Figure 68 : Temps total de sommeil sur 24h et sur les 4h d'extension de la lumière.** a TTS moyen durant les 24h évaluées avec l'EEG/EMG (bleu) et le système piézo (orange) et b durant les 4 heures d'extension de lumière (de 20:00 à 00:00, voir figure 74). \* :  $p < 0,05$ . ANOVA à deux facteurs ( $p < 0,05$  pour le facteur photopériode) et test post-hoc de Tukey avec une correction de Bonferroni.

**Discussion.** Le TTS évalué en % par jour sur les 7 jours d'enregistrements est similaire entre le système piézo et l'EEG/EMG pour les animaux 12:12 et pour les animaux 16:8. Les deux méthodes ont identifié un TTS significativement plus important pour les animaux 16:8 ce qui démontre la capacité du système piézoélectrique à correctement évaluer le sommeil des animaux lors d'une modification du rythme de sommeil des animaux (Sauvet et al., 2018). En revanche, nous retrouvons la tendance observée lors de la présentation des signaux bruts enregistrés avec les deux méthodes (Figure 73) avec des valeurs de TTS plus élevées avec le système piézo. Après avoir évalué la capacité du système piézo à correctement évaluer le TTS quotidien, nous avons évalué sa pertinence pour l'évaluation du TST heure par heure. Que ce soit en condition de sommeil « classique » ou modifié, le système piézo permet de traquer avec précision les changements de temps de sommeil à l'échelle de l'heure et ne présente aucune différence significative avec l'annotation manuelle du sommeil à l'aide des signaux l'EEG/EMG. Il est intéressant d'observer que selon nos résultats, le système piézo ne semble pas surestimer le sommeil pendant la période lumineuse, mais présente une tendance à la surestimation pendant la période d'obscurité. Ces résultats nous permettent de penser que la

non-détection des courtes périodes d'éveil observées sur la Figure 73 ne semble pas associée à une surestimation du sommeil pendant la période lumineuse, alors que la détection de « fausses » périodes de sommeil pendant la période d'obscurité semble avoir des effets plus importants sur l'évaluation du temps de sommeil par heure. L'inverse est observé dans l'étude de Mang et al., 2014, avec une tendance à la surestimation du sommeil pendant la période lumineuse. Ces différences peuvent venir du fait que cette étude a été menée sur la souris, qui présente un sommeil plus polyphasique que le rat et que le sommeil a été annoté à partir de périodes de 4 secondes.

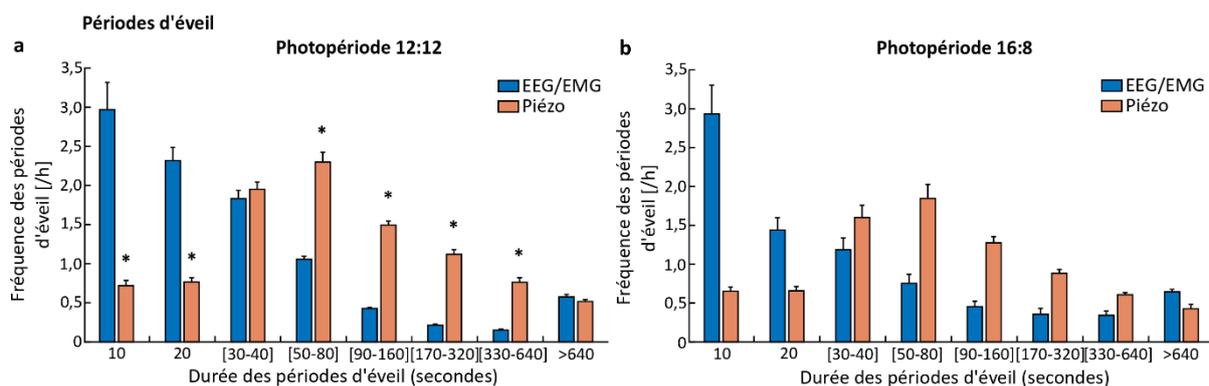
#### 4.2.4. Évaluation de la fragmentation du sommeil et de l'éveil

Afin d'évaluer les performances du système piézo pour évaluer la fragmentation du sommeil et de l'éveil, nous avons noté la durée de chaque période de sommeil et d'éveil pendant les 7 jours d'enregistrements. Nous avons catégorisé la durée de ces périodes ([10] ; [20] ; [30-40] ; [50-80] ; [90-160] ; [170-320] ; [330-640] ; [>640] secondes) et la fréquence de chaque catégorie a été calculée par heure de sommeil pour les deux méthodes d'enregistrement et pour les deux photopériodes. Il n'y a aucune différence dans la fréquence de l'ensemble des catégories des périodes de sommeil entre les deux méthodes d'enregistrement, que ce soit pour la photopériode 12:12 ou la photopériode 16:8 (Fig. 69a, b).



**Figure 69 : Évaluation de la fragmentation du sommeil avec le système piézo.** a Fréquence des périodes de sommeil évaluée en EEG/EMG (bleu) et avec le système piézo (orange) pour les animaux 12:12 et b pour les animaux 16:8.

En revanche, pour les périodes d'éveils, le système piézoélectrique a sous-estimé le nombre d'éveils de moins de 30 secondes et a surestimé le nombre d'éveils de 50 à 640 secondes pour les animaux soumis à la photopériode 12:12 (Fig. 70a). Nous observons la même tendance pour les animaux soumis à la photopériode 16:8, mais la différence n'est pas significative (Fig. 70b).



**Figure 70 : Évaluation de la fragmentation de l'éveil avec le système piézo.** **a** Fréquence des périodes d'éveil évaluée en EEG/EMG (bleu) et avec le système piézo (orange) pour les animaux 12:12 et **b** pour les animaux 16:8. \* :  $p < 0,05$ . ANOVA à deux facteurs ( $p < 0,05$  pour le facteur photopériode) et test post-hoc de Tukey avec une correction de Bonferroni.

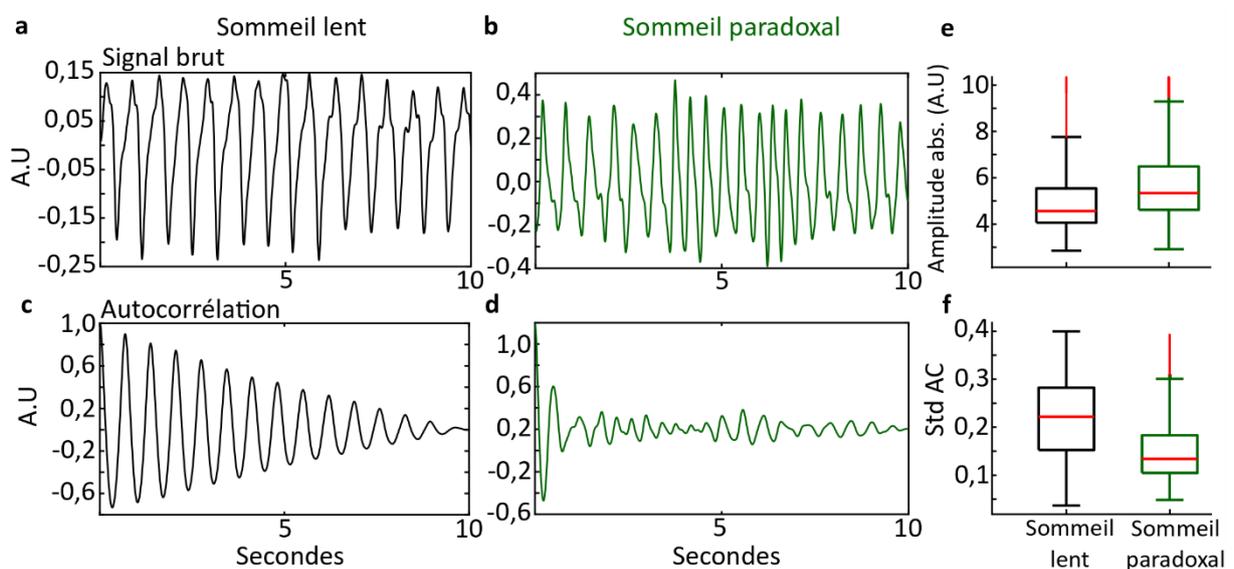
**Discussion.** Nos résultats n'indiquent aucune différence significative pour l'évaluation des périodes de sommeil de 10 à 640 secondes entre nos deux méthodes d'enregistrement. Le système piézo semble donc permettre une évaluation de la structure du sommeil à l'échelle de la dizaine de secondes. L'observation que nous avons faite sur la détection de « fausses » périodes de sommeil pendant la période préférentielle d'activité (Figure 73b) ne semble pas se vérifier à l'échelle des 7 jours d'enregistrements, le système piézo ne surestime pas les courtes périodes de sommeil comme observé chez la souris (Mang et al., 2014). En revanche, pour les périodes d'éveil, le système piézo sous-estime les périodes d'éveil de 10 à 40 secondes et surestime les périodes d'éveil entre 50 et 640 secondes. Encore une fois, ce résultat est à l'inverse des résultats observés chez la souris avec une surestimation des courtes périodes d'éveil (8 secondes) et une sous-estimation des périodes d'éveil de 32-60 secondes (Mang et al., 2014). En revanche, ce résultat confirme les observations que nous avons faites sur la présentation des signaux bruts pendant la période préférentielle de sommeil (Figure 73a, période lumineuse) ou encore sur le pourcentage de périodes d'éveils classés par erreur en périodes de sommeil par le système piézo (Table 2). Une explication possible de la sous-estimation des périodes d'éveil pourrait être que si l'animal se réveille, mais ne fait aucun mouvement, les variations de l'activité neuronale visible sur l'EEG peuvent permettre d'identifier le réveil de l'animal alors que l'EMG seul ou le système piézoélectrique ne le peuvent pas. Une autre explication pourrait être que, puisque le système piézoélectrique utilise un seuil de décision fixe, même si un mouvement est enregistré par le système, il peut ne pas être assez important pour franchir la valeur seuil (voir *Méthodes*). Cela peut conduire

à une sous-estimation des courts épisodes d'éveil, mais permet également au système de ne pas considérer tous les mouvements parasites survenant pendant le sommeil.

## 2° partie : Discrimination du sommeil lent et du sommeil paradoxal avec le système piézoélectrique

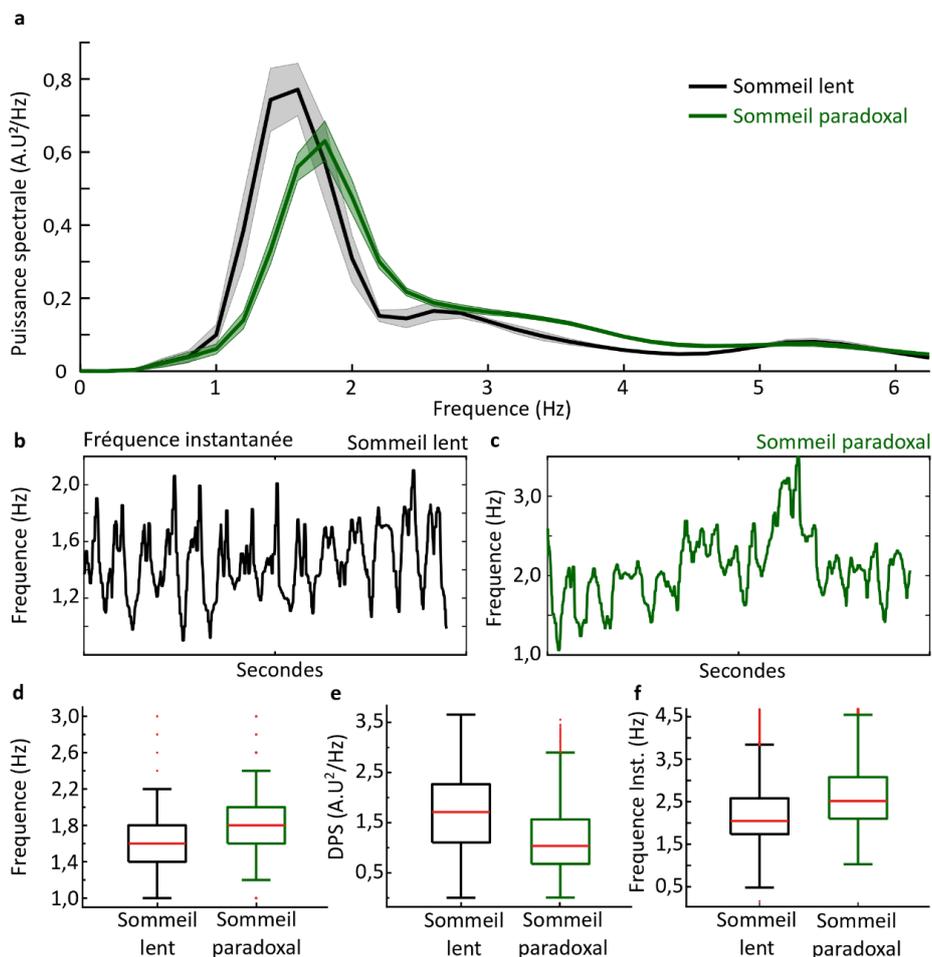
### 4.2.5. Différences de signaux piézoélectriques selon le stade de sommeil

Afin d'évaluer la possibilité de discriminer les deux stades de sommeil, nous avons réalisé des analyses détaillées du signal « brut » de pression enregistré par le système piézoélectrique. Nous avons conduit ces analyses sur les signaux enregistrés pendant les 7 jours d'enregistrements, mais uniquement sur les animaux soumis à la photopériode 12:12 (n=7). Le signal enregistré par le système piézoélectrique lorsque l'animal est endormi correspond majoritairement aux mouvements respiratoires. Ce signal respiratoire enregistré avec le système piézo apparaît comme plutôt régulier lors du sommeil lent alors qu'il présente plus de variabilité lors du sommeil paradoxal (Fig. 71a, b). Cette différence de régularité est amplifiée lors du calcul de l'autocorrélation du signal et cela permet de mettre en évidence la différence de régularité du signal entre les deux stades de sommeil (Fig. 71c, d). Sur l'ensemble des périodes de sommeil lent et de sommeil paradoxal, la moyenne de la différence d'amplitude absolue (interne à chaque période, correspond à : (valeur maximale – valeur minimale)) est plus élevée lors du sommeil paradoxal (Fig. 71e). À l'inverse, la déviation standard de l'autocorrélation lors du sommeil paradoxal est moins élevée que lors du sommeil lent (Fig. 71f).



**Figure 71 : Illustration de la différence du rythme respiratoire selon le stade de sommeil.** **a** Signaux bruts enregistrés avec le système piézo pendant une période de sommeil lent et **b** une période de sommeil paradoxal annoté en EEG/MEG. **c** et **d** autocorrélation du signal correspondante à **a** et **b**. **e** Amplitude absolue du signal piézo calculé sur l'ensemble des périodes de sommeil lent et de sommeil paradoxal. **f** déviation standard de l'autocorrélation calculée à partir du signal brut pour l'ensemble des périodes de sommeil lent et de sommeil paradoxal.

L'application de la transformée de Fourier sur les signaux bruts enregistrés avec le système piézo permet de mettre en évidence une augmentation de la fréquence moyenne pendant le sommeil paradoxal par rapport au sommeil lent (Fig. 72a), avec des valeurs plus élevées au maximum (Fig. 72d ; 1,5 Hz pour le sommeil lent, 1,79 Hz pour le sommeil paradoxal), mais une densité spectrale de puissance plus faible (Fig.72e). Afin de capturer les fugaces variations fréquentielles du signal piézo, nous avons également réalisé une analyse de la fréquence instantanée du sommeil lent (Fig. 72b) et du sommeil paradoxal (Fig. 72c).



**Figure 72 : Analyse spectrale du signal piézo correspondant au sommeil lent et au sommeil paradoxal.** **a** Densité de puissance spectrale (DPS) moyenne du signal piézo pour l'ensemble des périodes de sommeil lent et de sommeil paradoxal. **b** Exemples de fréquence instantanée calculés pendant une période de sommeil lent et **c** pendant une période de sommeil paradoxal. **d** Fréquence correspondant au maximum de la DPS pour l'ensemble des périodes de sommeil lent et de sommeil paradoxal. **e** et **f** comme pour **d**, mais pour la DPS maximale et la fréquence instantanée moyenne, respectivement.

**Discussion.** La deuxième partie de notre étude consistait à déterminer la faisabilité de la discrimination des stades de sommeil lent et paradoxal avec le système piézoélectrique. L'identification de caractéristiques physiologiques spécifiques du sommeil lent et du sommeil paradoxal à partir d'une analyse de la fréquence respiratoire est un défi qui a déjà été relevé. Nous savons que le rythme respiratoire lors du sommeil lent est très régulier, alors que des études antérieures ont montré une augmentation de la fréquence et de la variabilité du rythme respiratoire lors du sommeil paradoxal (Snyder et al., 1965). Sur la base de ces différences, la classification du sommeil lent et du sommeil paradoxal avec un système piézoélectrique a déjà été étudiée chez la souris (Yaghouby et al., 2016). En revanche, ces auteurs ont choisi de ne pas se concentrer sur la différence de fréquence, mais plutôt sur l'instabilité de la respiration pendant le sommeil paradoxal et leurs résultats atteignent de bonnes performances de classification (Éveil 89%/96%, sommeil lent 51%/96%, sommeil paradoxal 73%/75%, pour la sensibilité/spécificité respectivement), mais la sensibilité est assez faible pour le sommeil lent. Nos résultats sont en accord avec ces observations et mettent en évidence l'irrégularité du signal respiratoire lors du sommeil paradoxal (Figure 71). Afin d'amplifier cette irrégularité, nous avons utilisé la méthode d'autocorrélation. L'autocorrélation d'un signal stable diminue progressivement et de manière régulière, alors que pour un signal instable, l'amplitude diminue rapidement et oscille autour de 0 sur l'axe des abscisses comme le montre la figure 71. Une description spectrale de l'autocorrélation associée à des paramètres de formes tels que le Kurtosis, l'écart-type, la variation d'enveloppe et l'opérateur énergétique appelé Teager-Kaiser (Boudraa & Salzenstein, 2018), nous a permis d'amplifier les différences de régularité de la respiration observées entre le sommeil lent et le sommeil paradoxal.

Au-delà de la différence de régularité, nous avons également observé une différence de fréquence du signal respiratoire enregistré par le système piézo pendant le sommeil lent et le sommeil paradoxal. Une autre équipe s'est intéressée à la fréquence respiratoire de l'animal endormi et a utilisé un radar Doppler (couplé à un enregistrement vidéo) afin d'analyser la respiration chez le rat (Zeng et al., 2012). Lors de cette étude, les chercheurs ont également observé une augmentation de la fréquence respiratoire lors du sommeil paradoxal (2,06 Hz contre 1,59 Hz pour le sommeil lent). Nos résultats sont en accord avec cette observation, mais la différence est plus subtile avec nos données (1,88 Hz contre 1,64 Hz pour le sommeil

lent). Cela pourrait être dû à la différence de temps d'enregistrement (56h pour Zeng et 7 jours ici), mais aussi à un manque de sensibilité du système piézo par rapport au radar Doppler. Une autre explication est que notre analyse spectrale provient d'une analyse FFT (méthode Welch) en utilisant une fenêtre glissante de 5 secondes (50% de recouvrement), limitant l'identification de rapide changement du rythme respiratoire (d'une durée de 1-2 secondes). Afin de résoudre ce problème, la fréquence instantanée ( $F_{q\_inst}$ ) calculée à partir de la transformation de Hilbert (Cohen, 2014) nous permet d'analyser de manière plus précise les changements abrupts de fréquence. L'ajout de cette analyse fréquentielle augmente les performances de classification (+4% pour le sommeil paradoxal), ce qui illustre la complémentarité entre ce type d'analyse et une approche FFT plus classique.

Finalement, deux résultats majeurs ressortent de ces analyses des signaux bruts piézoélectriques. Une instabilité du signal respiratoire lors du sommeil paradoxal, qui est la variable principale qui a été utilisée pour la classification des stades de sommeil dans l'étude de Yaghouby et al., 2016. Mais également une fréquence respiratoire plus élevée lors du sommeil paradoxal, qui est la variable principale qui a été utilisée cette fois-ci dans l'étude de Zeng et al., 2012. Nous avons choisi de combiner ces deux axes dans le calcul de nos variables pour identifier le stade de sommeil : la différence de régularité et la différence de fréquence. Nous avons effectué une analyse spectrale complète du signal ( $F_{max}$ , PSD...) avec une description de la forme du signal.

#### **4.2.6. Classification du sommeil lent et du sommeil paradoxal avec le système piézoélectrique**

À partir des différences décrites précédemment, nous avons calculé un ensemble de paramètres (45 au total) issus du traitement du signal piézo et choisis comme étant potentiellement informatifs. Puis nous avons procédé à la sélection mathématique des paramètres objectivement informatifs pour la discrimination des stades de sommeil (voir *Méthodes*). Les paramètres qui ont été sélectionnés comme pertinents pour estimer le stade de sommeil sont présentés dans la table 5 ci-dessous. Les paramètres non sélectionnés sont les suivants : fréquence maximale (1-3Hz, RS) ; Rapport PSD (1,4/1,8 Hz, RS ; 1,4/1,6 Hz AC ; 1,6/1,8 Hz AC ; 2/5 Hz AS) ; PSD moyen (0-1Hz, RS) ; PSD moyen (3-5 Hz, RS) ; Écart-type (RS) ; Moyenne (AS) ; Variation de l'enveloppe (RS).

Nom du paramètre	Type du signal source	Description
F_max	PwRS	Fréquence au maximum
Max_PSD	PwRS, PwAS	Puissance spectrale max
F_max_1-3	PwRS, PwAS	Fréquence max 1-3Hz
Max_PSD_1-3	PwRS, PwAS	Puissance spectrale max 1-3Hz
R_PSD_1	PwRS, PwAS	Ratio puissance 1.4Hz / 1.6Hz
R_PSD_2	PwRS, PwAS	Ratio puissance 1.6Hz / 1.8Hz
R_PSD_3	PwRS	Ratio puissance 1.4Hz / 1.8Hz
R_PSD_4	PwAS	Ratio puissance 2,2Hz / 2,4Hz
R_PSD_5	PwRS	Ratio puissance 2Hz / 5 Hz
MPSD_1	PwRS, PwAS	Puissance moyenne pondérée 0,1-1Hz
MPSD_1-3	PwRS, PwAS	Puissance moyenne pondérée 1-3Hz
MPSD_3-5	PwRS, PwAS	Puissance moyenne pondérée 3-5Hz
MPSD_5-7	PwRS, PwAS	Puissance moyenne pondérée 5-7Hz
AUC_PSD_1-3	PwRS	Aire sous la courbe de puissance 1-3Hz
AUC_PSD_3-5	RS, AS	Aire sous la courbe de puissance 3-5Hz
Kt	RS, AS, Fq_inst	Kurtosis
Std	RS, Fq_inst	Déviatoin standard
Mn	RS, AS	Moyenne
RMS	RS, AS, Fq_inst	Valeur quadratique moyenne
Env_Var	RS, AS	Variation de l'enveloppe
Tkeo		Opérateur énergétique Teager-Kaiser

**Table 5 : Liste des paramètres sélectionnés et utilisés pour la classification automatique du sommeil lent et du sommeil paradoxal.** RS : signal brut ; AS : autocorrélation du signal ; Pw : transformé de Fourier avec la méthode de Pwelch.

En utilisant ces 35 paramètres informatifs et après avoir entraîné notre algorithme (voir *Méthodes*), nous avons obtenu, avec 129 700 périodes de sommeil lent et 24 303 périodes de sommeil paradoxal : 92,5% de sensibilité, 75,5% de spécificité et 89,8% de précision (Table 6). En effet, 120 000 périodes de sommeil lent (/129 700) ont été bien classées, ce qui correspond à 92,5%, alors que 9 700 périodes ont été classées à tort en sommeil paradoxal (7,5%). Pour le sommeil paradoxal, 18 349 périodes (/24 303) ont été correctement classées, ce qui correspond à 75,5%, alors que 5 954 périodes ont été classées à tort en sommeil lent.

EEG/EMG			
		Sommeil lent	Sommeil paradoxal
Piezo	Sommeil lent	92,5% (sensibilité)	24,5%
	Sommeil paradoxal	7,5%	75,5% (spécificité)
Précision		89,8%	

**Table 6 : Matrice de confusion de la classification du sommeil lent et du sommeil paradoxal avec l'annotation visuelle en EEG/EMG et l'utilisation d'un algorithme d'apprentissage supervisé pour le système piézo.** (Sur 129 700 périodes de 10 secondes pour le sommeil lent et 24 303 périodes pour le sommeil paradoxal)

**Discussion.** En utilisant les 35 paramètres sélectionnés, la discrimination entre le sommeil lent et le sommeil paradoxal présente une précision de 89,8 % et une sensibilité/spécificité de 92,5%/75,5% par rapport à la méthode EEG/EMG. La spécificité, qui correspond ici à l'identification correcte du sommeil paradoxal, ne semble pas suffisamment élevée pour permettre une utilisation en routine du système piézo pour les études qui nécessitent de discriminer les deux stades de sommeil. Une des hypothèses pour expliquer que la sensibilité ne soit pas suffisamment élevée est que la signature respiratoire du sommeil paradoxal ne présente pas les mêmes contraintes temporelles que la signature cérébrale. En effet, l'identification du sommeil paradoxal par notre algorithme de classification est basée sur l'augmentation de la fréquence respiratoire et sur l'irrégularité de la respiration lors du sommeil de l'animal, alors que l'identification du sommeil paradoxal en EEG/EMG dépend principalement de la puissance dans la bande de fréquence thêta (4-8 Hz). Il est possible qu'un délai soit présent, soit dans l'apparition, soit dans la disparition de la signature respiratoire du sommeil paradoxal par rapport à la signature cérébrale. De plus, nous avons observé que la fréquence respiratoire moyenne est plus rapide et plus instable lors du sommeil paradoxal, mais au sein même d'une période de sommeil paradoxal nous observons une alternance entre des périodes de haute variabilité et de stabilité associée à de rapides changements de fréquences. Il serait intéressant de comprendre l'origine physiologique de ces changements de fréquence respiratoire et leur fonction potentielle. Il est également possible que le choix de périodes de 10 secondes pour identifier les stades de sommeil ne soit pas optimal pour mettre en évidence ces variations de rythme respiratoire. En outre, lors de la notation visuelle de l'EEG/EMG, les évaluateurs prennent une décision basée sur le signal de la période considérée. Mais ils peuvent également utiliser les informations de la période précédente ou suivante lorsqu'ils ont un doute et que le signal n'est pas très clair, afin de « lisser » la notation. Cette méthode est basée sur des preuves physiologiques qui indiquent que la probabilité d'être en sommeil paradoxal est plus grande lorsque nous étions en sommeil paradoxal quelques secondes auparavant et que nous serons en sommeil paradoxal quelques secondes plus tard (Vivaldi et al., 2005). C'est pour mettre en œuvre cette réalité physiologique dans notre modèle que nous prenons la moyenne du score basé sur la période actuelle, la période précédente et la période suivante pour prendre une décision entre le sommeil lent et le sommeil paradoxal pour la période considérée (voir Zeng et al., 2012).

Une des possibilités pour augmenter les performances d'identification du sommeil paradoxal dans des études futures serait de combiner plusieurs méthodes non invasives. L'utilisation d'une caméra infrarouge de haute qualité pourrait potentiellement détecter les changements de température de surface de la peau liés au stade de sommeil (Lindert & Van Someren, 2018). Une autre possibilité vient du fait que chez les souris, l'atonie associée à la transition entre le sommeil lent et le sommeil paradoxal induit un changement subtil de la surface et de la forme de la souris qui peut être détectée par l'analyse des données vidéo (McShane et al., 2012). Ce n'est actuellement pas le cas, mais si l'activité de chaque capteur piézo formant le tapis était représentée sur une carte d'activation, les changements de forme et de surface du rat ou de la souris pourraient potentiellement être détectés par un système piézoélectrique et cela pourrait permettre de faciliter la discrimination entre les deux stades de sommeil.

L'utilisation du système piézoélectrique chez le rat présente tout de même certaines limites qui peuvent avoir leur importance selon l'objectif scientifique. Comme le montrent nos résultats, le système piézo sous-estime les périodes d'éveil de courte durée et surestime les périodes d'éveil plus longues. Ce résultat vient du fait que le système piézo semble avoir du mal à détecter les courts éveils (comme illustré sur la figure 73), ce qui incite à la prudence dans les études pharmacologiques liées à l'évaluation de la qualité du sommeil, qui s'intéressent par exemple aux éveils pendant les périodes de sommeil (comme l'administration de caféine). De plus, les études pharmacologiques qui utilisent un agent connu pour modifier la fréquence respiratoire peuvent parfaitement utiliser le système piézoélectrique pour distinguer l'éveil et le sommeil, car il est basé sur le mouvement/immobilité (tant que l'agent pharmacologique ne joue pas un rôle sur la mobilité de l'animal). Cependant, cela peut affecter la discrimination des stades de sommeil si les effets sur la respiration ne sont pas les mêmes sur le sommeil lent et sur le sommeil paradoxal. Pour ces études, il peut être nécessaire d'effectuer un ensemble de quelques animaux avec une implantation EEG/EMG et de comparer si les caractéristiques sélectionnées pour la discrimination du sommeil lent et du sommeil paradoxal restent les mêmes ou si de nouvelles caractéristiques doivent être identifiées. Également, pour l'ensemble des études qui utilisent des modèles où la locomotion de l'animal est modifiée, il est nécessaire de réaliser une vérification des performances du système piézo en réalisant une comparaison avec la lecture

de l'EEG/EMG. Une autre limite importante à prendre en compte dans cette étude est que la notation manuelle des signaux EEG/EMG a été effectuée par un seul évaluateur.

## **Conclusion**

En conclusion, nos résultats indiquent que l'utilisation du système piézoélectrique semble être une alternative fiable à la méthode EEG/EMG pour l'étude du temps de sommeil chez le rat. Nous avons évalué la robustesse du système en réalisant ces analyses sur 7 jours et en modifiant le rythme classique de sommeil des animaux. De plus, nous avons démontré la possibilité de discriminer le sommeil lent et le sommeil paradoxal avec le système piézo en utilisant les différences de rythmes respiratoires associés aux stades de sommeil.

**« Il n’y a pas de douleur que le sommeil ne  
sache vaincre ».**

Honoré de Balzac (1799 – 1850)

## ÉTUDE N°3

---

**Intérêt de l'allongement de la photopériode  
pour la récupération d'une blessure  
musculaire**

## Résumé

Les blessures musculaires sont fréquentes chez le sportif et le militaire (López-Valenciano et al., 2020; Lovalekar et al., 2021). L'optimisation de la récupération d'une blessure est un enjeu majeur tout d'abord pour favoriser la guérison, mais également pour minimiser le temps d'incapacité induit par la lésion et permettre une reprise rapide de l'entraînement ou des opérations militaires. De récents travaux ont montré que l'extension de sommeil diminue la sensibilité à la douleur et pourrait être bénéfique à la récupération d'une blessure musculaire (Chennaoui et al., 2021; Simonelli et al., 2019). Notre étude précédente (Étude n°1) montre une augmentation du temps de sommeil en réponse à une blessure musculaire induite par une myotoxine. Premièrement, nous souhaitons étudier la possibilité de potentialiser cette réponse adaptative du sommeil à la blessure par de l'extension de sommeil induit par un allongement de la photopériode. Ensuite, si cela fonctionne, nous souhaitons rechercher les potentiels bénéfiques de cette potentialisation sur la récupération de la blessure musculaire.

Ainsi, le premier objectif de cette troisième étude était **d'évaluer la possibilité de réaliser de l'extension de sommeil sur des animaux après une blessure musculaire induite par une myotoxine**. Le rat étant un animal nocturne, l'augmentation du temps d'exposition à la lumière chaque jour, c'est-à-dire en passant d'une photopériode classique 12:12 (heures de lumière : heures d'obscurité) à une photopériode « allongée » 16:8, offre plus de fenêtres d'opportunité de sommeil à l'animal. Ceci va donc induire, en l'absence de toutes potentielles perturbations, une augmentation du temps de sommeil pendant les 4 heures d'allongement de la lumière comme cela a déjà été observé chez le rongeur (Sauvet et al., 2018).

Pour déterminer les effets de l'allongement de la photopériode chez l'animal blessé, nous avons enregistré l'EEG/EMG de 16 rats Wistar séparés en deux groupes (n=8) : un groupe d'animaux blessés par injection de cardiotoxine dans le muscle *Tibialis Anterior* (BLS) et un groupe d'animaux contrôle qui n'ont pas subi d'injection (CTL), exposés à une photopériode allongée (16:8). À partir de ces enregistrements EEG/EMG, nous avons analysé plusieurs paramètres du sommeil : le temps total de sommeil (TTS), le temps passé par stade de sommeil ainsi que la puissance et la fréquence de chaque bande de fréquence (delta, thêta, alpha, bêta) au cours du sommeil. Nous nous sommes aussi intéressés à la stabilité du sommeil en étudiant les quantités d'épisodes de sommeil en fonction de leur durée. Ces différents

paramètres ont été analysés à partir de trois jours avant la blessure (J-3) jusqu'à 7 jours post-blessure (J+7). Le changement de photopériode est effectué le même jour que l'induction de la blessure musculaire (à J0). Afin de vérifier l'efficacité de l'allongement de la photopériode, nous avons comparé ces données aux données de sommeil des animaux exposés à la photopériode 12:12 provenant de l'étude n°1.

Premièrement, nous observons une augmentation du TTS pendant la période d'allongement de la lumière pour les animaux contrôles 16:8 par rapport aux contrôles 12:12. Ce résultat confirme l'étude de Sauvet et al., 2018 : l'extension de sommeil est vérifiée chez des animaux non blessés dans nos conditions expérimentales. En outre, il n'y a pas de différences significatives entre le TTS des animaux contrôles 16:8 et le TTS des animaux blessés 16:8 au cours de cette période d'allongement de la lumière. De plus, au cours de cette période, de J0 à J+7, le TTS des animaux blessés 16:8 est significativement supérieur à celui des blessés 12:12. Ces résultats illustrent l'efficacité de l'allongement de la photopériode pour augmenter le temps de sommeil des animaux blessés. Pendant cette période d'allongement de la lumière, le temps total de sommeil lent des animaux blessés 16:8 est de surcroît plus élevé que celui des contrôles 16:8 pendant les deux premiers jours post-blessure (à J0 et J+1). Or, notre précédente étude (voir Étude n°1) montre que la réponse adaptative à la blessure est caractérisée par une augmentation du temps de sommeil lent pendant 72 heures post-blessure. Notre résultat semble ainsi traduire un effet cumulatif de la réponse adaptative du sommeil à la blessure et à l'extension de sommeil, provoqué par l'allongement de la période de lumière.

Pendant la période d'obscurité, nous observons une augmentation similaire du TTS pour les animaux blessés 16:8 et 12:12, en lien avec la réponse adaptative du sommeil à la blessure. Les animaux blessés 16:8 présentent ainsi une augmentation du TTS pendant la période d'allongement de la lumière sur les 7 jours d'enregistrement, et également une augmentation du TTS pendant la période d'obscurité sur deux jours post-blessure. L'ensemble de ces résultats montre que les animaux blessés 16:8 présentent un TTS par jour plus élevé à la fois par rapport aux blessés 12:12, mais également par rapport aux contrôles 16:8 pendant les premiers jours post-blessure.

Par ailleurs, l'analyse de la durée des périodes de sommeil et l'analyse spectrale du sommeil montre que le sommeil lent des animaux blessés 16:8 est plus stable et est associé à une

puissance relative en ondes lentes plus importante par rapport aux sommeil des animaux blessés 12:12, pendant la période d'allongement de la lumière.

Le second objectif de cette étude était **d'évaluer les effets de l'allongement de la photopériode sur la sensibilité à la douleur induite par la blessure**. Le seuil de sensibilité à la douleur a été évalué quotidiennement pendant 14 jours sur les animaux blessés 16:8 et blessés 12:12, à l'aide du test de Von Frey. L'allongement de la photopériode a permis de limiter l'augmentation de sensibilité mécanique à la douleur induite par la blessure et a également permis son retour plus rapide à des niveaux de base. De plus, au 14<sup>e</sup> jour d'allongement de la photopériode, la concentration des cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$  et IL-2 et de la chimiokine CXCL1 dans l'hippocampe des animaux blessés 16:8 est significativement inférieure à celle des animaux blessés 12:12. Cette diminution de l'inflammation pourrait être en lien avec les effets bénéfiques de l'allongement de la photopériode sur la douleur.

Le troisième objectif de cette étude était **d'évaluer les effets de l'allongement de la photopériode sur des paramètres biologiques et histologiques de la réparation musculaire**. L'évaluation des paramètres biologiques (cytokines pro-inflammatoires et facteurs de croissance) et histologiques (taille des fibres musculaires, nombre de noyaux centraux, nombre de capillaires par fibres ...) a été faite sur les muscles blessés 12:12 ou 16:8, prélevés à deux moments clé de la réparation musculaire : à J+2 et J+14 post-blessure. Aucun effet significatif de l'allongement de la photopériode n'a été observé sur les paramètres biologiques et histologiques du muscle blessé.

Une autre question originale que nous souhaitons aborder était celle des **effets biologiques et histologiques des 14 jours d'allongement de la photopériode sur des fibres musculaires provenant d'animaux non blessés**. Pour cela nous avons analysé le nombre et l'aire de section transversale des fibres musculaires des muscles *Tibialis Anterior* (TA) et *Gastrocnemius* (GC) prélevés sur des animaux contrôles exposés à la photopériode 12:12 ou 16:8, et nous avons réalisé des dosages des facteurs impliqués dans la croissance des fibres musculaires (IGF-1, TGF $\beta$  ...). Que ce soit pour le TA ou le GC, les animaux non blessés soumis à la photopériode 16:8 présentent une aire de section transversale des fibres musculaires plus élevée que les animaux soumis à la photopériode 12:12, sans augmentation significative des facteurs de croissance.



## 5.1. Matériel et Méthodes

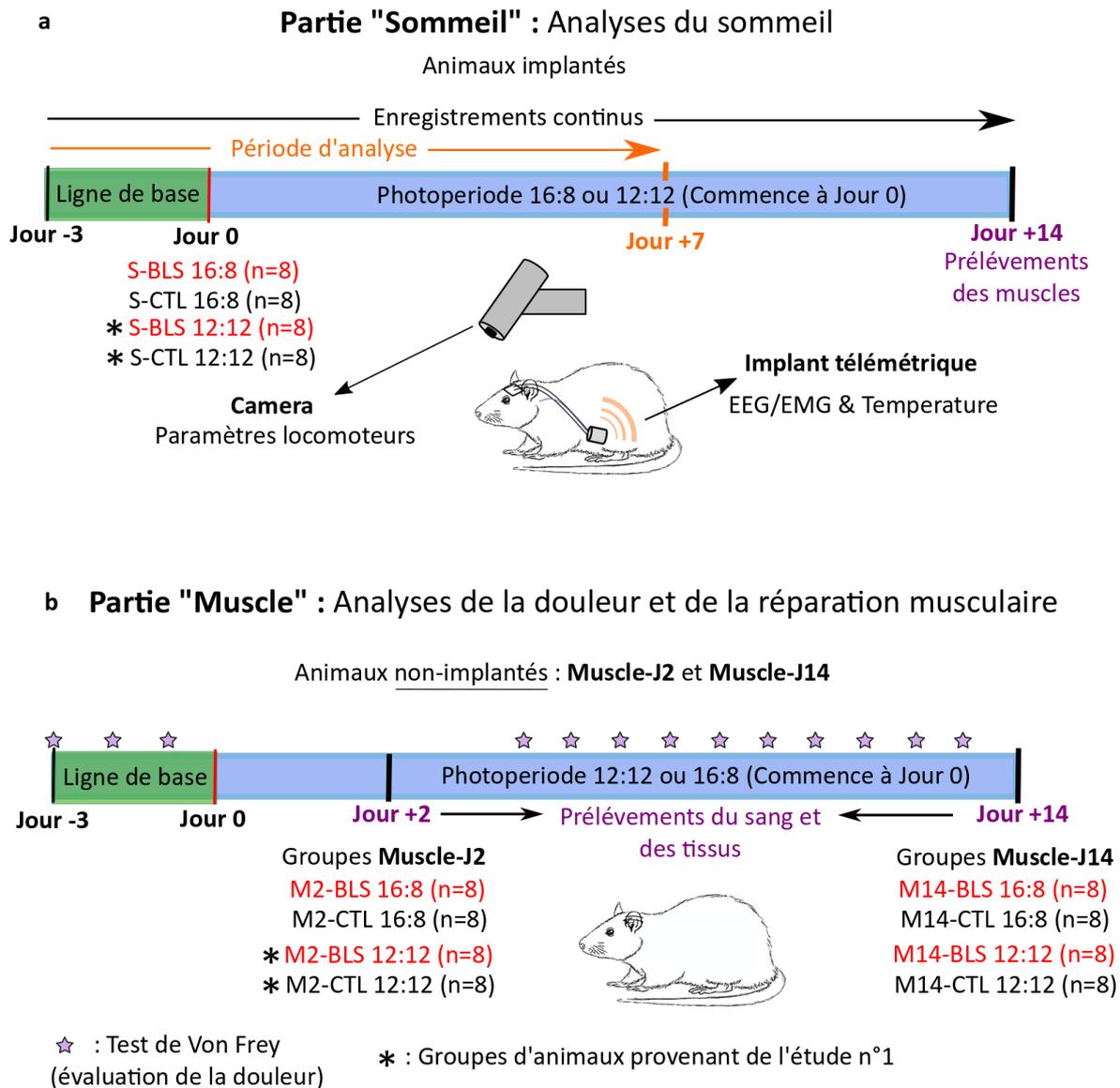
### 1 - Animaux et protocole expérimental

Les expérimentations ont nécessité l'utilisation de 64 rats Wistar mâles (Laboratoire Charles Rivers, France) **répartis en deux groupes principaux** : 16 rats implantés chirurgicalement pour recueillir les signaux EEG/EMG/température (partie « **Sommeil** ») ; 48 rats non implantés (partie « **Muscle** »). Pendant la semaine d'acclimatation, l'ensemble des animaux ont été logés à 4 par cage (612 x 435 x 216 mm) sous une photopériode lumière/obscurité de 12 heures (éclairage de 08:00 heures à 20:00 heures) avec de la nourriture et de l'eau disponibles *ad libitum* dans un environnement à température ( $21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) et ventilation (ACH 70) contrôlées.

Les animaux correspondant à la partie « **Sommeil** » ont été implantés avec des émetteurs de télémétrie permettant d'enregistrer l'EEG/EMG/température après la période d'acclimatation. Après la chirurgie, les animaux ont été logés individuellement dans une armoire ventilée (BIO-C36, Tecniplast ; Buguggiate, Italie) et ont bénéficié d'une période de récupération de 10 jours. Ensuite, l'ensemble des animaux ont été enregistrés (EEG/EMG/Temp/Vidéo) pendant 3 jours – ligne de base (de J-3 à J-1) – sous la photopériode 12:12. Après ces 3 jours, les animaux ont été séparés en 2 groupes (**n=8** par groupe) : un groupe d'animaux contrôles (CTL) et un groupe d'animaux « blessés » (BLS) exposés à la photopériode 16:8 (**S-CTL 16:8** et **S-BLS 16 :8**). Les animaux du groupe blessé ont reçu, à J0, une injection de 400 $\mu\text{L}$  (10 $\mu\text{M}$ , réalisée en deux points d'injections de 200 $\mu\text{L}$ ) de cardiotoxine (CTX, Latoxan, France) dans le TA droit (sans ouvrir la peau) sous une anesthésie de 10 minutes au vetflurane (1-2%) couplé à une injection sous-cutanée de buprénorphine (0,05mg/kg) pour l'analgésie. Les animaux du groupe contrôle ont été anesthésiés pendant 10 minutes sous vetflurane (1-2%) pour contrôler les effets de l'anesthésie sur les paramètres du sommeil. Le changement de photopériode a été effectué en même temps que l'induction de la blessure musculaire à J0.

Les animaux correspondant à la partie « **Muscle** » ont été logés individuellement après la semaine d'acclimatation. Ils n'ont pas subi de chirurgie et ont été séparés en 4 groupes de 16 animaux : un groupe « **Muscle** » (M-) CTL soumis à la photopériode 12:12 (**M-CTL 12:12**), un groupe CTL 16:8 (**M-CTL 16:8**), un groupe BLS 12:12 (**M-BLS 12:12**) et un groupe BLS 16:8 (**M-BLS 16:8**). La procédure pour la blessure est similaire à celle pour les animaux de la partie

« Sommeil ». Dans chacun des 4 groupes, la moitié des animaux (**n=8**) ont été euthanasiés 2 jours (« **Muscle-J2** ») et les autres animaux 14 jours (« **Muscle-J14** ») après l'induction de la blessure. Nous avons réalisé une évaluation quotidienne des seuils de sensibilité à la douleur avec le test de von Frey de J-3 à J13 (pas de mesure de J0 à J3) sur les animaux « **Muscle-J14** ». L'étude a été approuvée par le comité institutionnel d'éthique animale (protocole DAP\_11-2019).



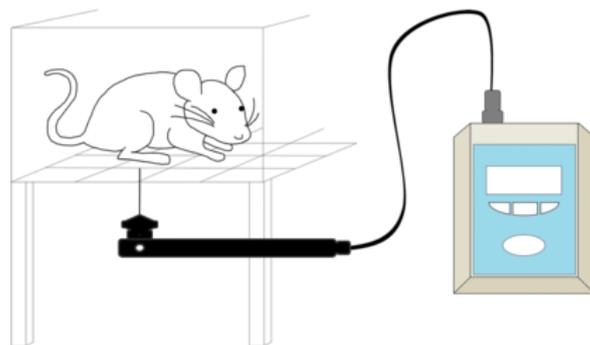
**Figure 73 : Représentation du protocole expérimental.** Cette étude se déroule en deux parties, une première partie se concentre sur l'étude du sommeil et nécessite l'implantation d'un émetteur de télémétrie pour enregistrer l'EEG/EMG/Température des animaux. Puis une seconde partie où les animaux ne subissent pas de chirurgie afin de permettre une évaluation optimale des niveaux de douleur (test de Von Frey), et plusieurs paramètres biologiques et histologiques du tissu musculaire sain et en cours de réparation.

## 2 - Implantation téléométrique, acquisition et analyse des signaux EEG/EMG/ et de la température

Les animaux « **Sommeil** » ont été implantés avec des émetteurs pour l'enregistrement de l'EEG/EMG/Température (HD-X02, Data Sciences International, St Paul, USA). La procédure chirurgicale est décrite dans les *Méthodes* de l'étude n°1. Nous avons enregistré les signaux EEG/EMG/Température en utilisant Neuroscore 6.0 (DSI, St Paul, MN, USA). Les signaux de température ont été échantillonnés à 10Hz tandis que les signaux EEG et EMG ont été échantillonnés à 500Hz. L'annotation manuelle des périodes de 10 secondes en tant qu'éveil, sommeil lent et sommeil paradoxal, les analyses spectrales et la détection/analyse des *spindles* a été effectuée selon les mêmes principes que ceux décrits pour l'étude n°1.

## 3 - Évaluation de la douleur

Nous avons utilisé le test électronique de Von Frey 5 (BIO-EVF5, Bioseb, USA) avec les cages de contention associées (BIO-PVF, Bioseb, USA) afin d'évaluer l'évolution du seuil de sensibilité à la douleur en réponse à la blessure pour les animaux du groupe « **Muscle-J14** ». La description précise du test est détaillée dans l'étude Ferrier et al., 2016. Brièvement, une pression croissante est appliquée sous la patte de l'animal, dès que l'animal retire sa patte, la pression correspondante est automatiquement enregistrée et correspond au seuil de douleur de l'animal. Au cours de chaque test, deux mesures par patte sont effectuées. Pendant la semaine d'acclimatation, les animaux ont été placés dans la cage de contention pendant 1 à 2 heures par jour et stimulés doucement avec la pointe sous la patte afin de les habituer aux conditions du test. Les deux derniers jours de la semaine d'acclimatation, le test de Von Frey a été réalisé en conditions réelles. Les mesures ont commencé à être enregistrées à partir du premier jour de la ligne de base (J-3 avant l'injection de CTX) et quotidiennement jusqu'à J+13, sauf les 4 premiers jours (pour des raisons éthiques) après l'injection de CTX (de J0 à J+3).

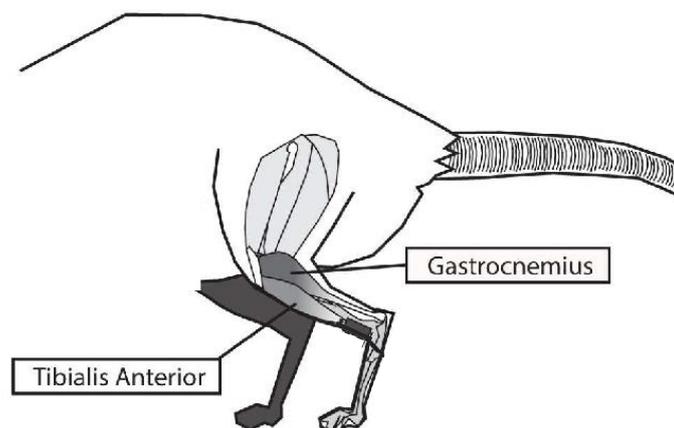


**Figure 74 : Illustration de la réalisation du test de Von Frey.** L'animal est placé dans une cage sur une grille perforée. L'expérimentateur tient un manche métallique sur lequel est positionné un cône en plastique fin. L'expérimentation applique une pression croissante avec ce cône sur le dessous de la patte de l'animal, dès que l'animal retire sa patte, la valeur de pression qui était appliquée est automatiquement sauvegardée et correspond au seuil de sensibilité mécanique à la douleur. (Woo Um et al., 2019)

#### 4 – Euthanasie et prélèvements

**Groupes de la partie « Sommeil ».** Les animaux ont été sacrifiés par décapitation, avec une anesthésie préalable faite au vetflurane (2% dans la cage à induction, 5 min). Les TA ont été prélevés et congelés dans l'isopentane (-100°C) refroidi par de l'azote liquide.

**Groupes de la partie « Muscle ».** Les animaux « **Muscle-J14** » et « **Muscle-J2** » ont été sacrifiés par décapitation, sans anesthésie préalable. Le sang a directement été récupéré et centrifugé à 3000g pendant 10 minutes, le plasma a été fractionné par aliquots qui ont été placés à -80°C en attendant les dosages biochimiques. Le cortex frontal et l'hippocampe ont été prélevés sur glace et directement plongés dans de l'azote liquide. Les TA droits (correspondants à la patte blessés) ont été prélevés sur glace puis coupés en deux, une moitié étant dédiée aux analyses histologiques (congelée dans l'isopentane à -100°C) et l'autre moitié aux dosages biochimiques (plongée dans l'azote liquide) pour les animaux « **Muscle-J2** » seulement. Pour les animaux « **Muscle-J14** », les TA droits ont été prélevés puis entièrement dédiés aux analyses histologiques. Les TA gauches ont été prélevés et coupés en deux pour les deux groupes d'animaux, une moitié étant dédiée aux analyses histologiques et l'autre moitié aux dosages biochimiques. Les GC droits et gauches des animaux Muscle-J14 ont également été prélevés.



**Figure 75 : Identification des muscles *Tibialis Anterior* et *Gastrocnemius* chez le rat.**

## 5 – Immunomarquages et coloration

Des coupes transversales de 8 µm des muscles congelés ont été réalisées au cryostat (CryoStar, NX70, Epredia). L'ensemble des immunomarquages ont été réalisés, avec, une étape de blocage d'une heure avec de l'Emerald (#936B-08 Sigma-Aldrich, US). Pour les immunomarquages au CD31/Laminine/Dapi, les coupes ont été incubées avec l'anticorps primaire anti-Laminine ([1/200] Lapin IgG, #ab11575, Abcam) et l'anticorps primaire anti-CD31 ([1/200] Souris, #ab64543) toute la nuit à +4°C dans une chambre humide. Après des lavages, les coupes ont été incubées avec les anticorps secondaires ([1/500] Âne anti-lapin Alexa 488, #A-21206, ThermoFisher ; [1/500] Âne anti-souris Alexa 594, #A-21203, ThermoFisher) pendant 1h dans l'obscurité à température ambiante. Pour les marquages au WGA (Wheat Germ Agglutinin), les coupes ont été incubées avec l'anticorps anti-WGA ([1/1000] WGA Alexa 555 #W32464, ThermoFisher) pendant 45 min dans l'obscurité à 4°C. Pour les typages des chaînes lourdes de myosines, les coupes ont été incubées avec les anticorps anti-MHC I ([1/200] Souris IgG2b #BA-D5-s, Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB)), anti-MHC IIA ([1/200] Souris igG1 #SC-71-s, DSHB), anti-MHC IIB ([1/50] Souris IgM #BF-F3-s, DSHB) et anti-laminine ([1/200] Lapin IgG, #ab11575, Abcam) pendant 45 min à 37°C. Après des lavages, les coupes ont été incubées avec les anticorps secondaires ([1/500] Chèvre anti-souris IgG2b Alexa Fluor 647 #A21242 ; Chèvre anti-souris IgG1 Alexa Fluor 568 #A21124 ; Chèvre anti-souris IgM Alexa Fluor 488 #A21039 ; Chèvre anti-lapin IgG Alexa Fluor 750 #A21039). Les lamelles ont ensuite été montées avec un milieu de montage contenant du Dapi (#ab104139). Les colorations Hémalun-Phloxine-Safran (HPS) ont été réalisées en plongeant les coupes dans l'Hémalun (pour 100 mL : 0.2g Hematein, 5g Alun de Potassium, 2 mL Acide Acétique, 98 mL d'eau distillée), ensuite dans la Phloxine (0.5g/100mL) et le Safran (2g/1000mL) puis une déshydratation à l'alcool (70, 95, 100%).

## 6 – Analyses des images histologiques

Les coupes ont été scannées (10X, Axioscan Z1, Zeiss, Allemagne). Le pourcentage de la zone blessé a été calculé manuellement sur FIJI (2.11.0) comme étant (la surface totale contenant des noyaux centraux / surface totale du muscle) à partir des immunomarquages WGA. Le nombre de fibres musculaires, l'aire de section transversale (CSA) de chaque fibre musculaire, le nombre de fibres musculaires en fonction du type de myosine et leur CSA correspondante,

ainsi que le nombre de noyaux par fibres, ont été calculés automatiquement en utilisant l'outil bio-informatique « MuscleJ » sur FIJI (Mayeuf-Louchart et al., 2018).

## 7 - Dosages biochimiques

Pour les dosages biochimiques, chaque tissu (musculaire et cérébral) a été décongelé et broyé dans un milieu de broyage spécifique (Ph 7,4, 25 Mm Hepes, 0,1% CHAPS, 5 Mm MgCl<sub>2</sub>, 0,3 μM Aprotinine, 1 Mm Leupetine, 14μM E64, 130 μM Bestatine, 1 Mm EDTA, 2 Mm AEBSF). Le contenu total en protéine de chaque surnageant a été évalué selon l'absorbance à 795 nm (BioDrop). Les concentrations en TNF-α, IL-1β, IL-6 (non détectée), CXCL1, IL-2 et IL-10 des tissus et du plasma ont été mesurées en utilisant un ELISA multiplex (Simoa Planar Array Assay Rat Cytokines Panel 1, SP-X, Quanterix). Les concentrations en IGF-1, TGF-β (libre et total), VEGF, et BMAL1 ont été mesurées à l'aide de kits ELISA classiques (IGF-1 : MG100, R&D systems ; TGFβ libre : Legend Max, Biolegend ; TGF-β total : Legend Max, BioLegend ; VEGF : ERVEGFA, Invitrogen ; BMAL1 : MBS1607686, MyBioSource) pour le TA, le cortex frontal, l'hippocampe et le plasma (hormis pour BMAL1).

## 8 – Analyses statistiques

Les analyses statistiques des séries temporelles (analyses du sommeil, de la température, du mouvement) ont été menées en utilisant des statistiques par permutations décrites dans l'étude n°1 (Maris & Oostenveld, 2007) réalisée en développant notre propre algorithme sur Matlab (2019b, MathWorks). Le test statistique utilisé est le test t de Student et la correction du risque d'erreur de type 1 a été faite par la méthode de Benjamini-Hochberg. Les résultats associés à des comparaisons de deux moyennes (surface de lésions, poids des muscles, concentrations protéiques ...) ont été analysés à l'aide de test de Student (données suivant la loi normale) ou de test de Mann-Whitney dans le cas de données non normales, réalisés sur Jamovi (1.6.23). La normalité des données a été vérifiée à l'aide du test de Shapiro-Wilk, l'homogénéité des variances par le test de Levene. La comparaison de la distribution de la surface de section des fibres musculaires et les concentrations protéiques avec quatre groupes (groupes « **Muscle-J2** ») a été réalisée avec une ANOVA à deux facteurs (photopériode et surface de section) suivie par des tests posthoc de Wilcoxon dans le cas de données suivant la loi normale. Dans le cas de données non normales, nous avons utilisé une ANOVA de Friedman avec des tests posthoc de Durbin-Conover.



## 5.2. Résultats

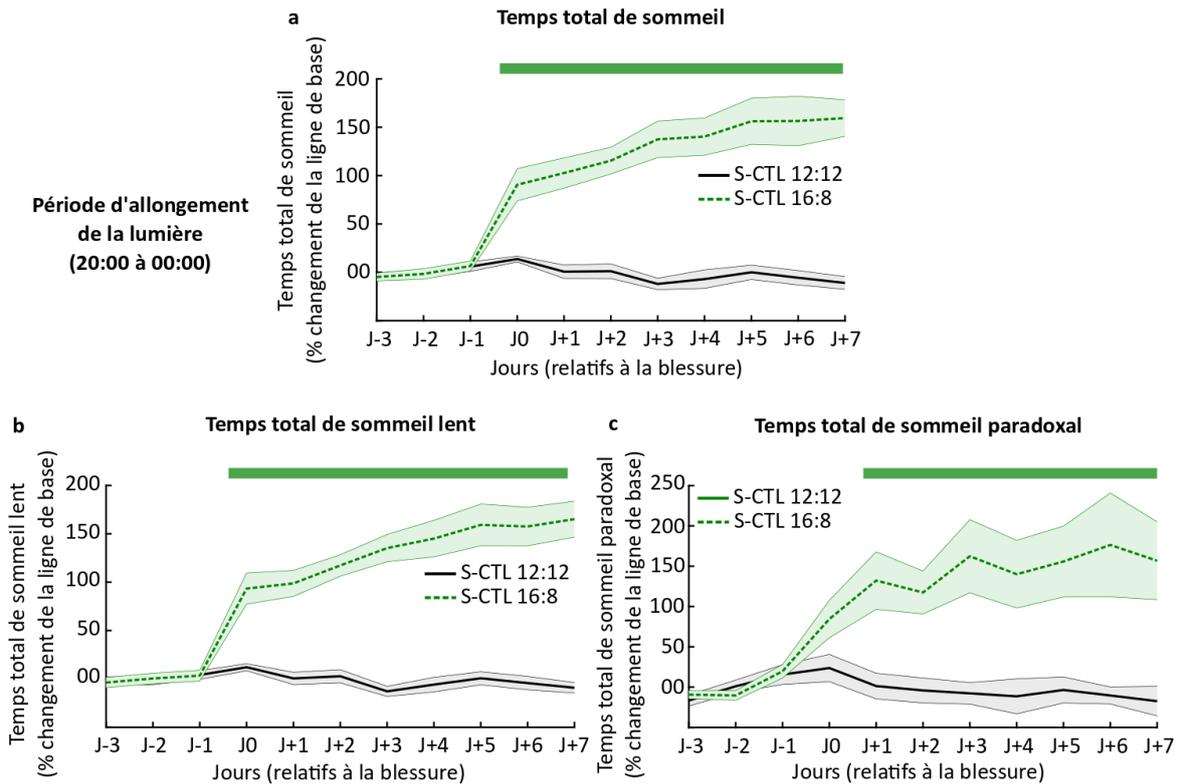
### 5.2.1. Effets de l'allongement de la photopériode sur le temps de sommeil des animaux blessés.

L'objectif de cette première partie est d'évaluer la possibilité d'induire de l'extension de sommeil par allongement de la photopériode chez l'animal après une blessure musculaire. Pour cela nous avons analysé le TTS et le temps passé en sommeil lent et en sommeil paradoxal sur des animaux blessés (n=8) et non blessés (n=8) soumis à la photopériode allongée 16:8. Afin d'identifier en détail les effets de l'allongement de la photopériode, nous avons analysé le sommeil pendant la période d'allongement de la lumière (de 20:00 à 00:00), pendant la période de lumière commune (de 08:00 à 20:00), la période d'obscurité commune (de 00:00 à 08:00) et également par jour (de 08:00 à 08:00). Cela de J-3 à J+7 post-blessure.

Nous avons choisi d'exprimer les résultats pour le sommeil en pourcentage de changement par rapport à la ligne de base (calculée de J-3 à J-1) étant donné que cela nous permet de comparer les modifications du sommeil pour les mêmes animaux soumis à la photopériode 12:12 puis 16:8 (« intra-groupe »), mais également de comparer les profils de sommeil entre différents animaux soumis aux deux types de photopériode (« inter-groupe »).

L'extension de sommeil induit par l'allongement de la photopériode est caractérisée, chez le rat non blessé, par une augmentation du temps de sommeil pendant la période d'allongement de la lumière placée de 20:00 à 00:00 (Sauvet et al., 2018). Ainsi, afin de vérifier que nous sommes capables de reproduire ces résultats, nous avons tout d'abord comparé le sommeil des animaux contrôles 16:8 avec le sommeil des animaux contrôles 12:12 provenant de l'étude n°1 pendant cette période d'allongement de la lumière. Nous avons choisi de ne pas répliquer le groupe expérimental des animaux contrôles 12 :12 pour des raisons éthiques.

Pendant la période d'allongement de la lumière (entre 20:00 et 00:00), nous observons un TTS significativement plus élevé pour les animaux contrôles 16:8 par rapport aux animaux contrôles 12:12 de J0 à J+7 (Fig. 76a). La même dynamique est observée pour le temps total de sommeil lent, qui est significativement plus élevé de J0 à J+7 et pour le temps total de sommeil paradoxal, qui est significativement plus élevé de J+1 à J+7 (Fig. 76b, c).

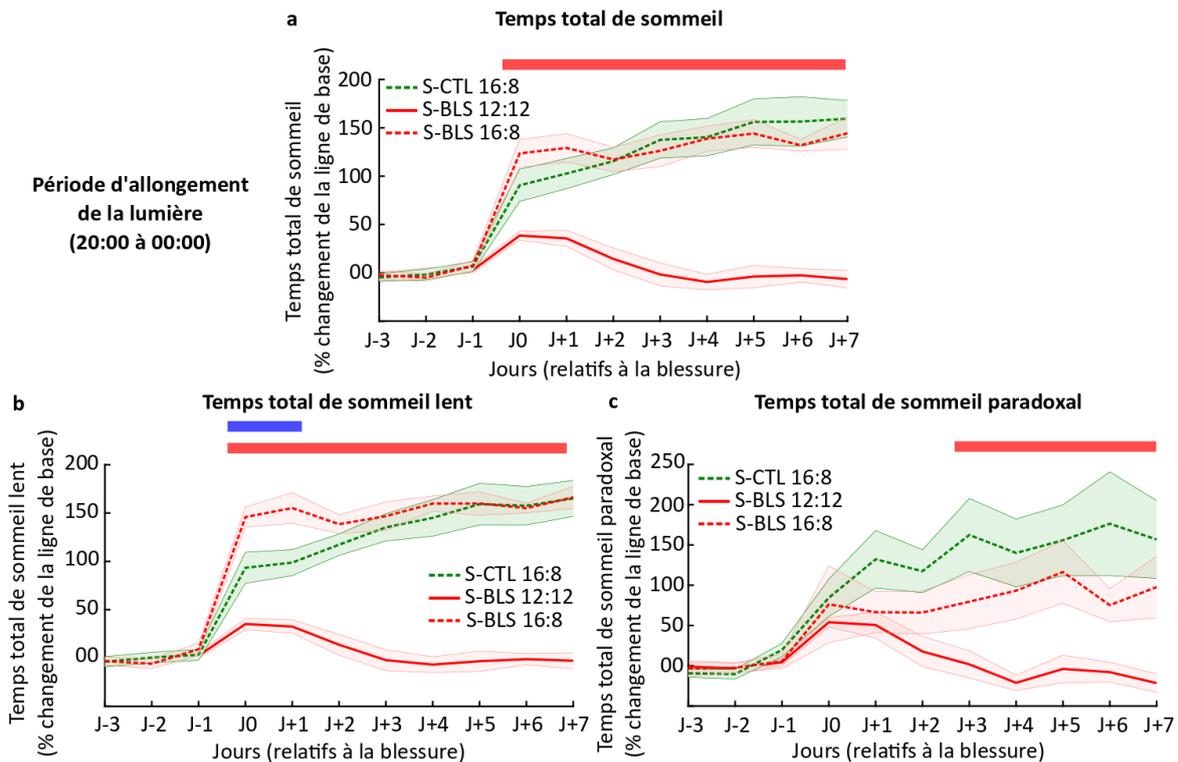


**Figure 76 : Temps total de sommeil et temps passé en sommeil lent et paradoxal pendant la période d'allongement de la lumière.** **a** Temps total de sommeil pendant la période d'allongement de la lumière, de 20:00 à 00:00, pour les animaux des groupes « Sommeil » (S-) : contrôles 12:12 (S-CTL 12:12, courbe pleine noire) et les animaux contrôles 16:8 (S-CTL 16:8, courbe pointillée verte), de J-3 à J+7 en pourcentage de changement par rapport à la ligne de base (de J-3 à J-1), **b** pour le temps total de sommeil lent et **c** pour le temps total de sommeil paradoxal. Les rectangles de couleur verte indiquent les différences statistiques ( $p < 0,05$ ) entre les deux groupes, évalués par des tests statistiques par permutations avec une correction de Benjamini-Hochberg (voir Méthodes),  $n=8$  animaux par groupe.

Il s'agit maintenant d'évaluer les effets de l'allongement de la photopériode chez l'animal blessé. Afin de distinguer les effets propres de la modification de la photopériode de ceux dus à la blessure, nous avons comparé le sommeil des animaux blessés exposés à la photopériode 16:8 avec deux groupes d'animaux : les animaux non blessés exposés à la photopériode 16:8 (différences statistiques indiquées par le rectangle bleu), mais également avec les animaux blessés exposés à la photopériode 12:12 (différences statistiques indiquées par le rectangle rouge) provenant de l'étude n°1.

Premièrement, il n'y a pas de différence de TTS entre les animaux blessés 16:8 et contrôles 16:8 pendant la période d'allongement de la lumière (Fig. 84a). En revanche, le TTS est plus élevé de J0 à J+7 pour les animaux blessés 16:8 par rapport aux animaux blessés 12:12 (Fig. 77a, rectangle rouge). De manière similaire, le temps total de sommeil lent des animaux blessés 16:8 est significativement plus élevé que celui des animaux blessés 12:12, de J0 à J+7 (Fig. 77b,

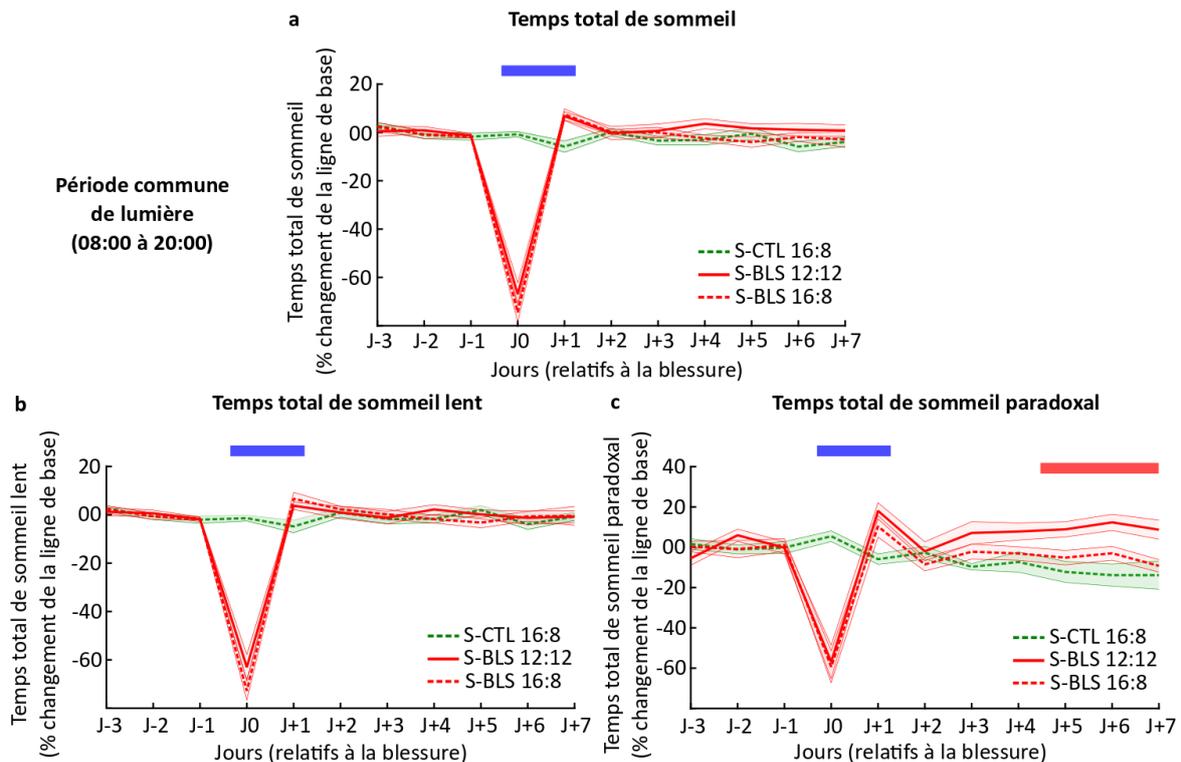
rectangle rouge). De plus, à J0 et J+1, le temps total de sommeil lent des animaux blessés 16:8 est plus élevé que celui des animaux contrôles 16:8 (Fig. 77b, rectangle bleu) puis il n'y a plus de différences à partir de J+2. Le temps total de sommeil paradoxal est significativement plus élevé de J+3 à J+7 pour les animaux blessés 16:8 par rapport aux animaux blessés 12:12 (Fig. 77c, rectangle rouge) et il n'y a pas de différence entre les animaux blessés 16:8 et contrôles 16:8.



**Figure 77 : Temps total de sommeil et temps passé en sommeil lent et paradoxal de 20:00 à 00:00 pendant la période d'allongement de la lumière.** a Temps total de sommeil pendant la période d'allongement de la lumière, de 20:00 à 00:00, pour les animaux des groupes « Sommeil » (S-) : contrôles 16:8 (S-CTL 16:8, courbe pointillée verte), blessés 12:12 (S-BLS 12:12, courbe pleine rouge) et blessés 16:8 (S-BLS 16:8, courbe pointillée rouge) de J-3 à J+7 en pourcentage de changement par rapport à la ligne de base (de J-3 à J-1), b pour le temps total de sommeil lent et c pour le temps total de sommeil paradoxal. Les rectangles de couleurs indiquent les différences statistiques ( $p < 0,05$ ) entre les groupes entre les groupes S-CTL 16:8 et S-BLS 16:8 (rectangles bleus) et entre les groupes S-BLS 12:12 et S-BLS 16:8 (rectangles rouges) évalués par des tests statistiques par permutations avec une correction de Benjamini-Hochberg (voir Méthodes),  $n=8$  animaux par groupe.

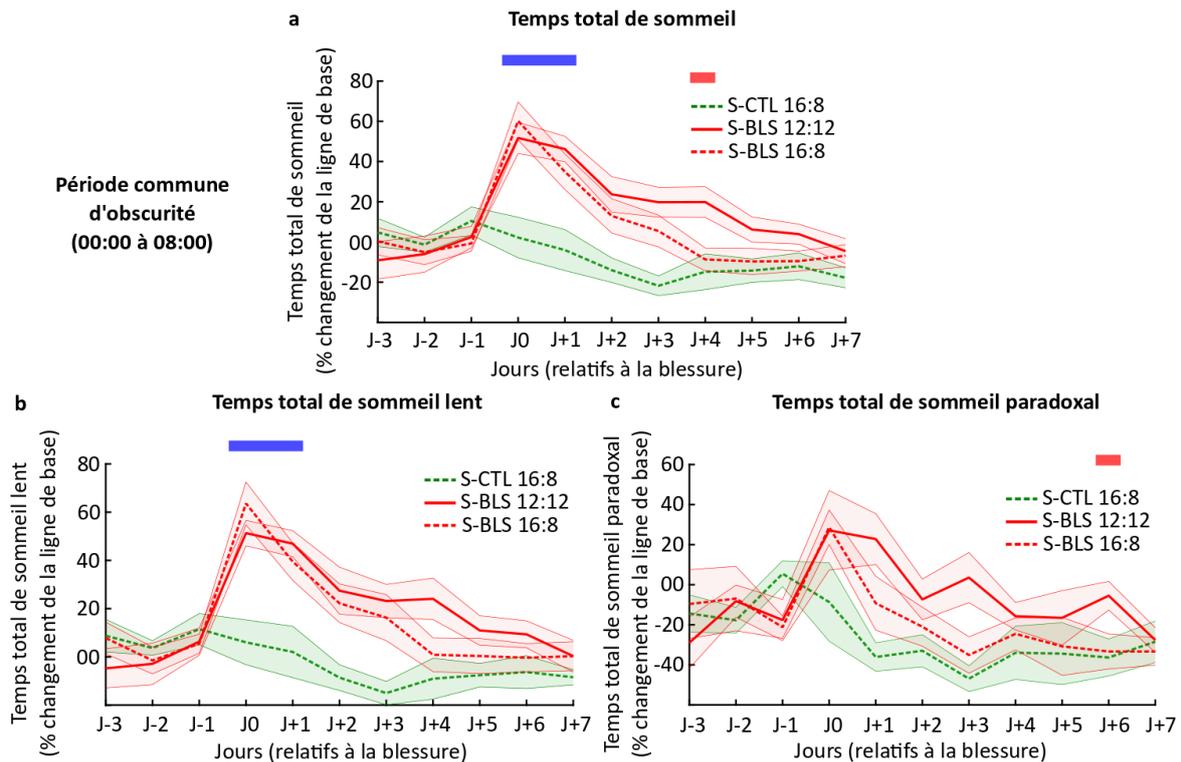
Quand nous nous intéressons spécifiquement à la période lumineuse commune (de 08:00 à 20:00), nous observons une importante diminution du TTS à J0 suivi par une augmentation à J+1 pour les animaux blessés 16:8 par rapport aux animaux contrôles 16:8 (Fig. 78a). Il n'y a pas de différence entre les animaux blessés 12:12 et 16:8 et nous observons les mêmes résultats pour le sommeil lent et le sommeil paradoxal, avec une diminution à J0 suivie par un rebond à J+1 (Fig. 78b, c). Ce phénomène est dû à l'injection de buprénorphine qui a eu lieu à

J0 pour les deux groupes d'animaux blessés (voir Étude n°1). En effet, nous avons contrôlé les effets de la buprénorphine lors de notre précédente étude et nous avons constaté une forte diminution de sommeil à la suite de son injection (à 08:00), suivi par un rebond de sommeil à J+1. En revanche, nous observons un temps total de sommeil paradoxal plus faible pour les animaux blessés 16:8 par rapport aux animaux blessés 12:12 de J+5 à J+7 (Fig. 78c).



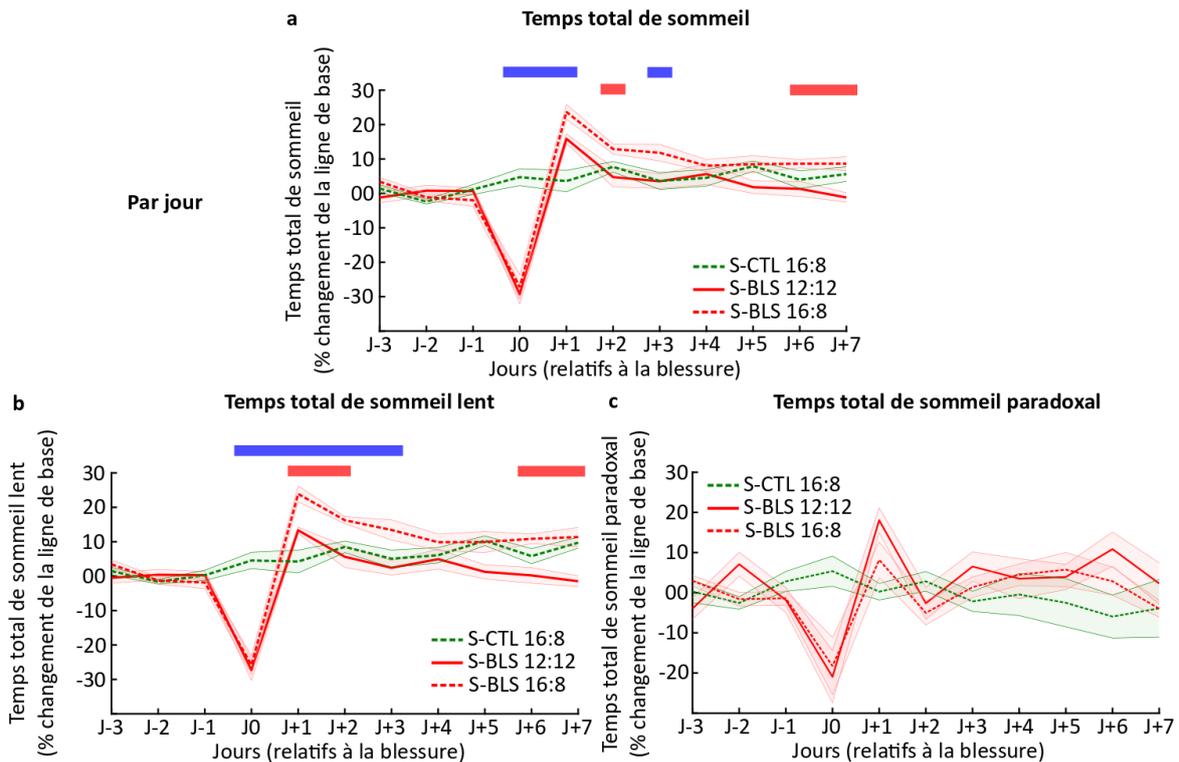
**Figure 78 : Temps total de sommeil et temps passé en sommeil lent et paradoxal pendant la période commune de lumière.** **a** Temps total de sommeil pendant la période commune de lumière de 08:00 à 20:00 pour les animaux des groupes « Sommeil » (S) : contrôles 16:8 (S-CTL 16:8, courbe pointillée verte), blessés 12:12 (S-BLS 12:12, courbe pleine rouge) et blessés 16:8 (S-BLS 16:8, courbe pointillée rouge) de J-3 à J+7 en pourcentage de changement par rapport à la ligne de base (de J-3 à J-1), **b** pour le temps total de sommeil lent et **c** pour le temps total de sommeil paradoxal. Les rectangles de couleurs indiquent les différences statistiques ( $p < 0,05$ ) entre les groupes S-CTL 16:8 et S-BLS 16:8 (rectangles bleus) et entre les groupes S-BLS 12:12 et S-BLS 16:8 (rectangles rouges) évalués par des tests statistiques par permutations avec une correction de Benjamini-Hochberg (voir Méthodes),  $n = 8$  animaux par groupe.

Pendant la période commune d'obscurité (de 00:00 à 08:00), le TTS est plus élevé pour les animaux blessés 16:8 par rapport aux animaux contrôles 16:8 à J0 et J+1 (Fig. 79a). Nous observons la même dynamique pour le temps total de sommeil lent, avec une augmentation similaire pour les deux groupes d'animaux blessés (Fig. 79b). En revanche, il n'y a pas de différences pour le temps total de sommeil paradoxal (Fig. 79c). Nous noterons également un TTS plus faible pour les animaux blessés 16:8 par rapport aux animaux blessés 12:12 à J+4, ainsi qu'un temps total de sommeil paradoxal plus faible à J+6 (Fig. 79a, c).



**Figure 79 : Temps total de sommeil et temps passé en sommeil lent et paradoxal pendant la période commune d'obscurité.** **a** Temps total de sommeil pendant la période commune d'obscurité de 00:00 à 08:00 pour les animaux des groupes « Sommeil » (S-) : contrôles 16:8 (S-CTL 16:8, courbe pointillée verte), blessés 12:12 (S-BLS 12:12, courbe pleine rouge) et blessés 16:8 (S-BLS 16:8, courbe pointillée rouge) de J-3 à J+7 en pourcentage de changement par rapport à la ligne de base (de J-3 à J-1), **b** pour le temps total de sommeil lent et **c** pour le temps total de sommeil paradoxal. Les rectangles de couleurs indiquent les différences statistiques ( $p < 0,05$ ) entre les groupes S-CTL 16:8 et S-BLS 16:8 (rectangles bleus) et entre les groupes S-BLS 12:12 et S-BLS 16:8 (rectangles rouges) évalués par des tests statistiques par permutations avec une correction de Benjamini-Hochberg (voir Méthodes),  $n=8$  animaux par groupe.

Quand nous analysons le temps de sommeil par jour (toutes les périodes de lumière et d'obscurité incluses), nous retrouvons la diminution du TTS, du temps de sommeil lent et du temps de sommeil paradoxal à J0 pour les animaux blessés 16:8 et 12:12 (Fig. 80a-c). Ensuite, le TTS par jour est plus élevé pour les animaux blessés 16:8 par rapport aux animaux contrôles 16:8 à J+1 et J+3 (Fig. 80a). De plus, le TTS par jour des animaux blessés 16:8 est également plus élevé par rapport aux animaux blessés 12:12 à J+2 puis à J+6 et J+7 (Fig. 80a). Ces différences proviennent d'une augmentation spécifique du temps de sommeil lent alors que le sommeil paradoxal ne présente pas de différences significatives (Fig. 80b, c). En effet, le temps total de sommeil lent par jour est plus élevé pour les animaux blessés 16:8 de J+1 à J+3 par rapport aux animaux contrôles 16:8 (Fig. 80b) et à J+1, J+2, J+6 et J+7 par rapport aux animaux blessés 12:12 (Fig. 80b).



**Figure 80 : Temps total de sommeil et temps passé en sommeil lent et paradoxal par jour.** **a** Temps total de sommeil par jour pour les animaux des groupes « Sommeil » (S-) : contrôles 16:8 (S-CTL 16:8, courbe pointillée verte), blessés 12:12 (S-BLS 12:12, courbe pleine rouge) et blessés 16:8 (S-BLS 16:8, courbe pointillée rouge) de J-3 à J+7 en pourcentage de changement par rapport à la ligne de base (de J-3 à J-1), **b** pour le temps total de sommeil lent et **c** pour le temps total de sommeil paradoxal. Les rectangles de couleurs indiquent les différences statistiques ( $p < 0,05$ ) entre les groupes S-CTL 16:8 et S-BLS 16:8 (rectangles bleus) et entre les groupes S-BLS 12:12 et S-BLS 16:8 (rectangles rouges) évalués par des tests statistiques par permutations avec une correction de Benjamini-Hochberg (voir Méthodes),  $n = 8$  animaux par groupe.

**Discussion.** Le TTS est significativement augmenté pendant les 4 heures d’allongement de la lumière (de 20:00 à 00:00) pour les animaux contrôles 16:8 par rapport aux animaux contrôles 12:12. Ce résultat est en accord avec l’étude de Sauvet et al., 2018 qui montre que l’extension de sommeil induite par la photopériode 16:8 est due à une augmentation du TTS pendant la période d’allongement de la lumière. Cela permet ainsi de valider la faisabilité de l’extension de sommeil chez l’animal non blessé dans nos conditions expérimentales. Nous avons ensuite montré, qu’il n’y a pas de différence significative entre le TTS des animaux contrôles 16:8 et blessés 16:8 au cours de cette période prolongée de lumière. D’autre part, le TTS des animaux blessés 16:8 est significativement plus élevé que le TTS des animaux blessés 12:12 au cours de la période d’allongement de la lumière, de J0 à J+7. Ces résultats démontrent l’efficacité de la modification de la photopériode pour augmenter le temps de sommeil des animaux blessés pendant la période d’allongement de la lumière, et donc pour induire de l’extension de

sommeil. De plus, le temps total de sommeil lent pendant cette période d'allongement de la lumière est plus élevé pour les animaux blessés 16:8 à J0 et J+1 par rapport aux animaux contrôles 16:8. Ce résultat suggère un aspect cumulatif de la réponse adaptative du sommeil à la blessure musculaire et de l'extension de sommeil provoquée par l'allongement de la période de lumière. En effet, la réponse adaptative du sommeil à la blessure est caractérisée par une augmentation du temps de sommeil pendant 72 heures post-blessure (voir Étude n°1, Vanneau et al., 2023). Qui plus est, nous observons une augmentation similaire du TTS, spécifique au sommeil lent, pour les deux groupes d'animaux blessés, 16:8 et 12:12 pendant la période d'obscurité (Vanneau et al., 2023). Il est intéressant d'observer que les animaux blessés 16:8, qui profitent d'une opportunité de sommeil supplémentaire juste avant la période d'obscurité (de 20:00 à 00:00) présentent tout de même une augmentation de temps de sommeil similaire aux animaux 12:12 pendant la période d'obscurité (de 00:00 à 08:00).

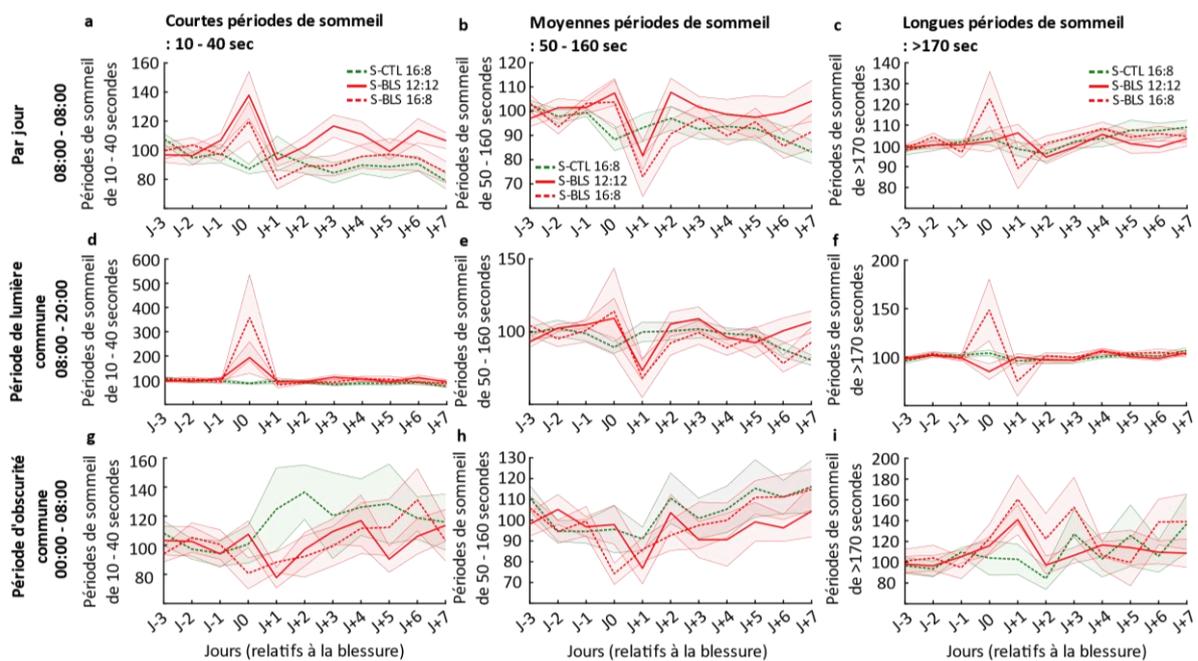
Conformément à nos résultats précédents, le temps de sommeil paradoxal n'est pas soumis à des modifications en réponse à la lésion musculaire (Vanneau et al., 2023). Selon nos résultats, le temps de sommeil paradoxal par jour n'est également pas modifié par l'allongement de la photopériode. Ce constat est en accord avec les études précédentes sur l'allongement de la période lumineuse qui observent une augmentation du temps de sommeil par jour spécifique au sommeil lent (Borbély & Neuhaus, 1978; Sauvet et al., 2018). Dans notre étude cependant, l'analyse du temps de sommeil par période d'intérêt révèle qu'il y a bien une augmentation du temps de sommeil paradoxal pendant la période d'allongement de la lumière. Mais cette augmentation est contrebalancée par une diminution du temps de sommeil paradoxal pendant la période de lumière commune et nous n'observons pas de différence du temps de sommeil paradoxal par jour. Cela suggère une régulation homéostatique spécifique de la quantité quotidienne de sommeil paradoxal (Barbato & Wehr, 1998; Park & Weber, 2020).

### **5.2.2. Effets de l'allongement de la photopériode sur des paramètres de la qualité du sommeil des animaux blessés.**

Outre la quantité de sommeil, nous avons caractérisé les changements de qualité de sommeil induit par la modification de la photopériode chez l'animal blessé. Comme pour la quantité de sommeil, nous avons évalué des paramètres de qualité du sommeil (stabilité du sommeil, puissance des ondes lentes et densité des *spindles*) par jour, pour la période de lumière commune, pour la période d'obscurité commune et pour la période d'allongement de la

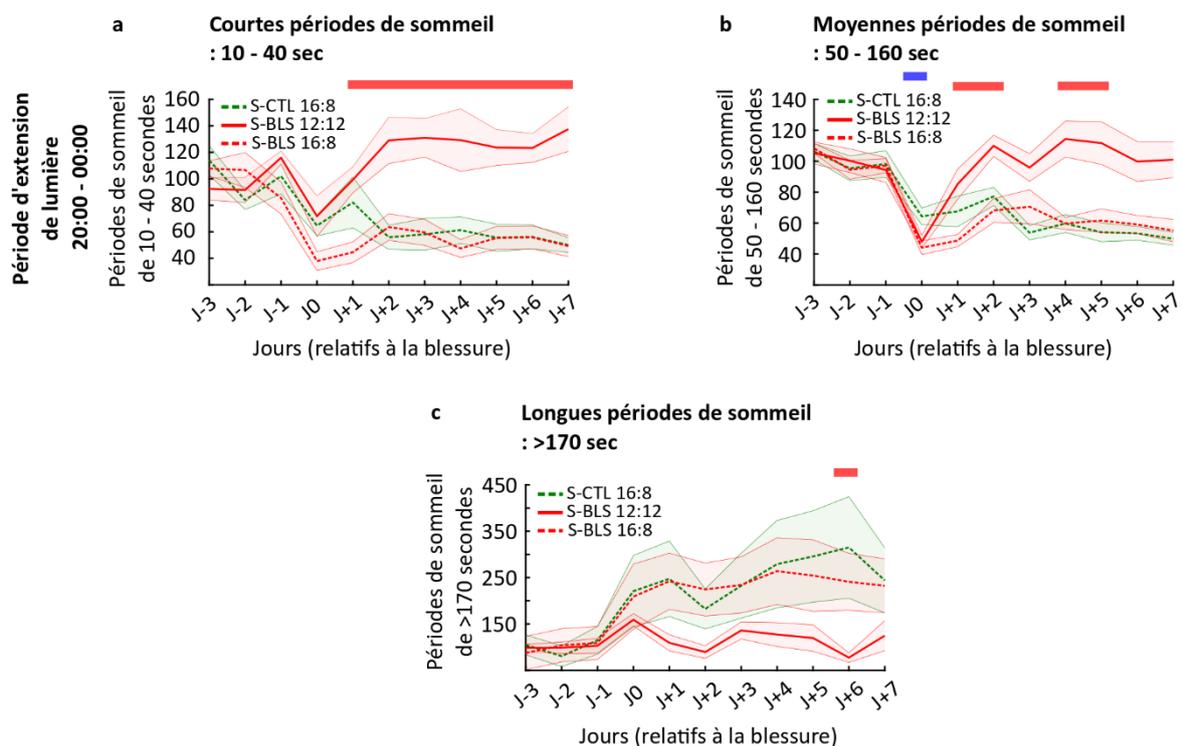
lumière. Une des composantes de la qualité du sommeil est sa stabilité, représentée par la durée des périodes de sommeil (Mavanji et al., 2010). Alors que les longues périodes de sommeil (>170 secondes) sont associées à la stabilité du sommeil chez le rat, les courtes périodes de sommeil (10 à 40 secondes) sont associées à un sommeil fragmenté. Nous avons calculé la durée de chaque période de sommeil de J-3 à J+7 après la blessure et nous avons évalué la fréquence (nombre de périodes par heure de sommeil) de ces périodes en fonction de leur durée : courte (de 10 à 40 secondes), moyenne (de 50 à 160 secondes) ou longue (>170 secondes). Étant donné les résultats sur le temps de sommeil, nous avons choisi de présenter ici les résultats concernant le sommeil lent, les résultats associés au sommeil paradoxal sont disponibles au niveau de la figure 100 en annexe.

Que ce soit pour les courtes, moyennes ou longues périodes de sommeil lent, il n'y a pas de modification de leur fréquence (exprimée en pourcentage de changement par rapport à la fréquence calculée pendant la ligne de base) par jour, pour la période commune de lumière ou pour la période commune d'obscurité (Fig. 81a-i).



**Figure 81 : Fréquence des périodes de sommeil lent en fonction de leur durée par jour, pour la période lumineuse commune et la période d'obscurité commune.** a Fréquence des périodes de sommeil lent de 10 à 40 secondes pour les animaux des groupes « Sommeil » (S-) implantés avec un émetteur EEG/EMG : contrôles 16:8 (S-CTL 16:8, courbe pointillée verte), blessés 12:12 (S-BLS 12:12, courbe pleine rouge) et blessés 16:8 (S-BLS 16:8, courbe pointillée rouge) de J-3 à J+7 en pourcentage de changement par rapport à la ligne de base (de J-3 à J-1), b pour les périodes de sommeil de 50 à 160 secondes et c pour les périodes de sommeil de >170 secondes. d, e, f respectivement similaires à a, b, c pour la période de lumière commune et g, h, i pour la période d'obscurité commune, n=8 animaux par groupe.

En revanche quand nous nous intéressons spécifiquement à la période d'allongement de la lumière (de 20:00 à 00:00), nous observons une diminution significative de la fréquence des courtes périodes de sommeil de J+1 jusqu'à J+7 pour les animaux blessés 16:8 comparés aux blessés 12:12 (Fig. 82a). La fréquence des moyennes périodes de sommeil est également plus faible pour les animaux blessés 16:8 à J+1, J+2 et à J+4 et J+5 (Fig. 82b), alors que la fréquence des longues périodes de sommeil est plus importante pour les animaux blessés 16:8 à J+6 comparés aux blessés 12:12 (Fig. 82c).

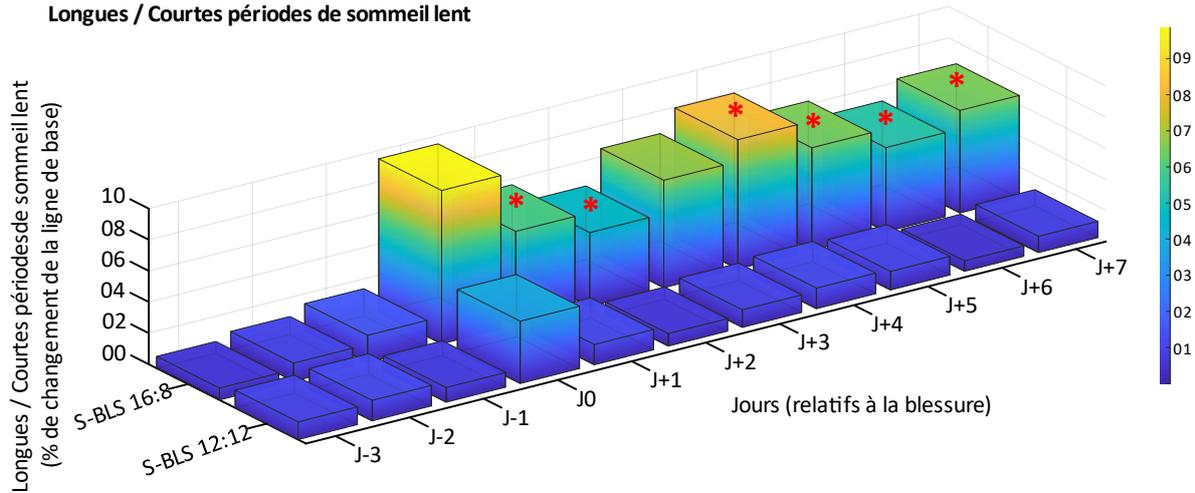


**Figure 82 : Fréquence des périodes de sommeil en fonction de leur durée pour la période d'allongement de la lumière.** a Fréquence des périodes de sommeil de 10 à 40 secondes pour les animaux des groupes « Sommeil » (S-) implantés avec un émetteur EEG/EMG : contrôles 16:8 (S-CTL 16:8, courbe pointillée verte), blessés 12:12 (S-BLS 12:12, courbe pleine rouge) et blessés 16:8 (S-BLS 16:8, courbe pointillée rouge) de J-3 à J+7 en pourcentage de changement par rapport à la ligne de base (de J-3 à J-1), b pour les périodes de sommeil de 50 à 160 secondes et c pour les périodes de sommeil de >170 secondes. Les rectangles de couleurs indiquent les différences statistiques ( $p < 0,05$ ) entre les groupes S-CTL 16:8 et S-BLS 16:8 (rectangles bleus) et entre les groupes S-BLS 12:12 et S-BLS 16:8 (rectangles rouges) évalués par des tests statistiques par permutations avec une correction de Benjamini-Hochberg (voir Méthodes),  $n=8$  animaux par groupe.

Le ratio de la fréquence des courtes / longues périodes de sommeil est ainsi plus élevé pour les animaux blessés 16:8 comparés aux blessés 12:12, de J+1 à J+7 pendant la période d'allongement de la lumière (Fig. 83).

Période d'allongement de la lumière (20:00 - 00:00)

Longues / Courtes périodes de sommeil lent

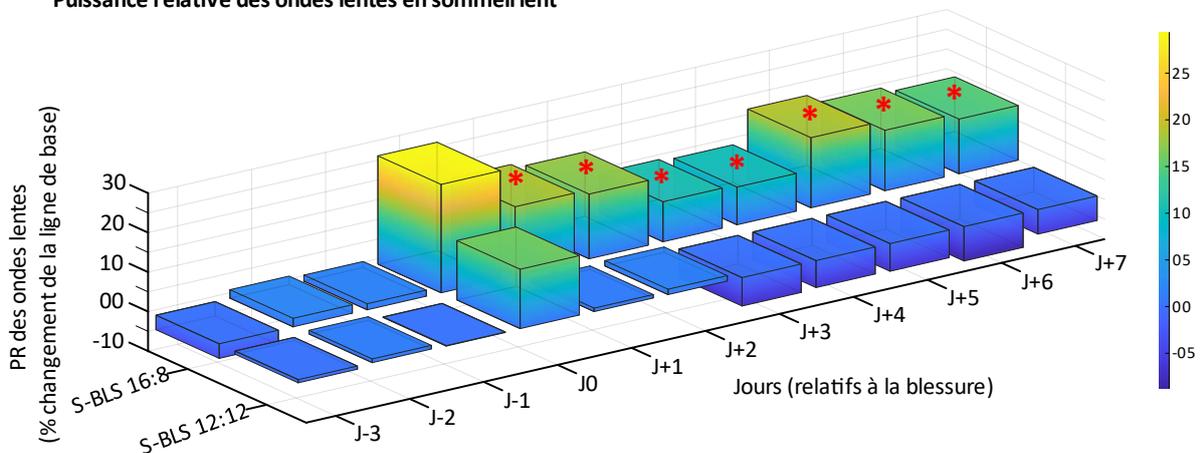


**Figure 83 : Ratio des courtes / longues périodes de sommeil pendant la période d'allongement de la lumière.** Fréquence des courtes périodes de sommeil (en pourcentage de changement par rapport à la ligne de base) divisée par la fréquence des longues périodes de sommeil (en pourcentage de changement par rapport à la ligne de base) pendant le sommeil lent, pour la période d'allongement de la lumière, de J-3 à J+7 pour les animaux S-BLS 12:12 et S-BLS 16:8. Les astérisques rouges indiquent les différences ( $p < 0,05$ ) évaluées par des tests statistiques par permutations avec une correction de Benjamini-Hochberg (voir *Méthodes*),  $n = 8$  animaux par groupe.

Un autre paramètre associé à la qualité du sommeil est la puissance des ondes lentes (c'est-à-dire la puissance delta) pendant le sommeil lent (Vyazovskiy, 2015). Parallèlement à l'augmentation de la stabilité du sommeil, nous avons observé une augmentation de la puissance relative des ondes delta pendant le sommeil lent de la période d'allongement de la lumière pour les animaux blessés 16:8 par rapport aux blessés 12:12 de J+1 à J+7 (Fig. 84), alors qu'il n'y a pas de modification pour les autres périodes (Fig. 101 en annexe).

Période d'allongement de la lumière (20:00 - 00:00)

Puissance relative des ondes lentes en sommeil lent

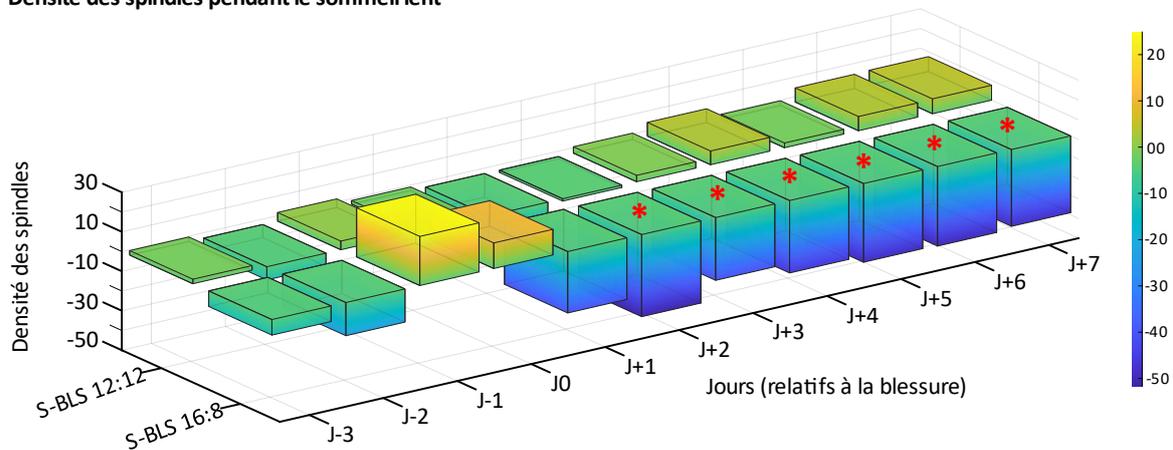


**Figure 84 : Puissance relative des ondes delta pendant le sommeil lent au cours de la période d’allongement de la lumière.** Puissance (calculée à l’aide de la transformée de Fourier) relative des ondes delta (0,5-4 Hz / 0,5 – 35 Hz) pendant le sommeil lent, exprimé en pourcentage de changement par rapport à la ligne de base, pour la période d’allongement de la lumière, de J-3 à J+7 pour les animaux S-BLS 12:12 et S-BLS 16:8. Les astérisques rouges indiquent les différences ( $p < 0,05$ ) évaluées par des tests statistiques par permutations avec une correction de Benjamini-Hochberg (voir *Méthodes*),  $n=8$  animaux par groupe.

Nous avons également évalué la densité des *spindles* (c.-à-d. le nombre de *spindles* par minute de sommeil lent), un paramètre associé à plusieurs fonctions telles que la stabilité du sommeil (Fernandez & Lüthi, 2020). De manière surprenante, la densité des *spindles* pendant la période d’allongement de la lumière est plus faible pour les animaux blessés 16:8 par rapport aux blessés 12:12 de J+2 à J+7 (Fig. 85).

Période d’allongement de la lumière (20:00 - 00:00)

Densité des *spindles* pendant le sommeil lent



**Figure 85 : Évolution de la densité des *spindles* pendant la période d’allongement de la lumière.** Densité des *spindles* pendant le sommeil lent, en pourcentage de changement de la ligne de base pour la période d’allongement de la lumière, de J-3 à J+7 pour les animaux S-BLS 12:12 et S-BLS 16:8. Les astérisques rouges indiquent les différences ( $p < 0,05$ ) évaluées par des tests statistiques par permutations avec une correction de Benjamini-Hochberg (voir *Méthodes*),  $n=8$  animaux par groupe.

**Discussion.** Outre l'augmentation de la quantité de sommeil, nous constatons un changement significatif de la stabilité du sommeil et donc de la qualité du sommeil pendant la période d’allongement de la lumière chez les animaux blessés 16:8 par rapport aux blessés 12:12. Avec, à la fois une réduction des périodes de sommeil courtes (10-40 secondes) et une augmentation des périodes de sommeil longues (>170 secondes), résultant en un sommeil plus stable pour les animaux blessés 16:8 (Gall et al., 2008; Stephenson et al., 2012). De plus, nous observons une puissance relative des ondes delta plus élevée pendant le sommeil lent, reflétant un sommeil potentiellement plus réparateur (Decker et al., 2009; Gorlova et al.,

2019). En effet, le sommeil lent est associé à la libération de l'hormone de croissance (GH) et à la synthèse protéique (Ramm & Smith, 1990; Van Cauter et al., 2004) et la puissance delta est corrélée à la sécrétion de GH et représente un marqueur du « pouvoir réparateur » du sommeil (Prinz et al., 1995; Tasali et al., 2008).

En revanche, la densité des *spindles* est significativement diminuée pour les animaux blessés 16:8 de J+2 à J+7. C'est un résultat inattendu étant donné que nous observons en parallèle, une augmentation de la stabilité du sommeil et que les *spindles* sont impliqués dans la stabilisation du sommeil (Fernandez & Lüthi, 2020). De plus, la régulation homéostatique des *spindles* est inversement corrélée à l'activité en ondes lentes qui marque la pression de sommeil, le nombre de *spindles* est faible en début de période sommeil et augmente au cours du sommeil (Borbély et al., 1981; De Gennaro et al., 2000; Dijk et al., 1993; Finelli et al., 2001). Cependant, Wei et al., 1999 observent une diminution du nombre de *spindles* à la fin de la période de sommeil et il est possible que ce phénomène soit d'autant plus important en condition d'extension de sommeil.

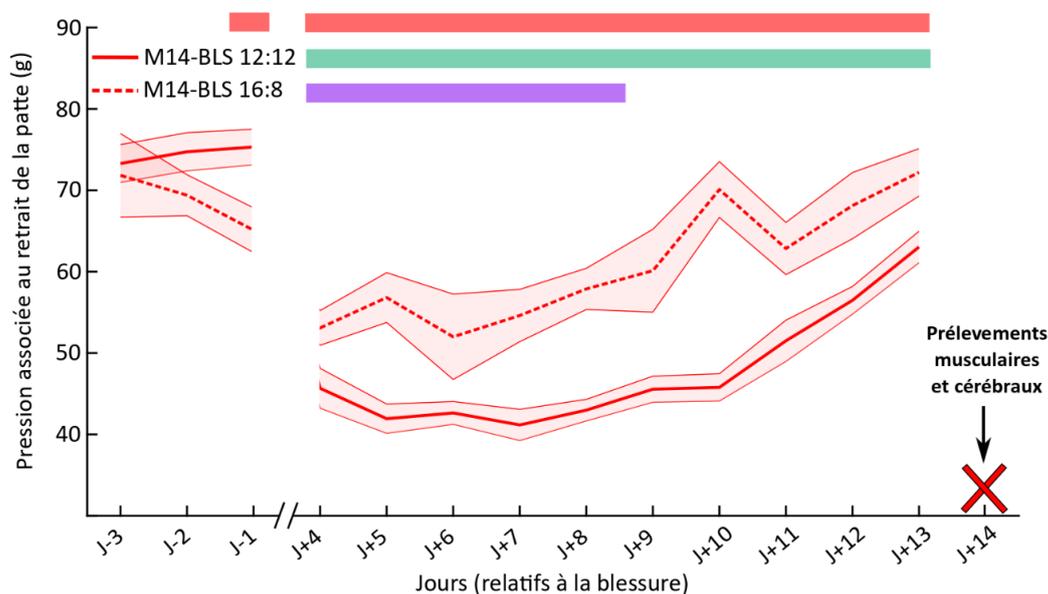
En conclusion, nos résultats montrent que le changement de photopériode induit une augmentation de la quantité de sommeil, et que ce sommeil « étendu » est de meilleure qualité. Cela renforce notre hypothèse de potentiels effets bénéfiques de l'extension de la photopériode sur certains indicateurs de la récupération de la blessure musculaire, notamment la sensibilité à la douleur.

### **5.2.3. Effets de l'allongement de la photopériode sur la sensibilité à la douleur mécanique des animaux blessés.**

Un des indicateurs indirects de la récupération d'une blessure musculaire est la douleur associée à la blessure. Des études ont montré que la quantité et la qualité du sommeil sont des facteurs pouvant moduler la sensibilité à la douleur (Brennan & Lieberman, 2009; Faraut et al., 2015; Simonelli et al., 2019), mais cela n'a jamais été démontré dans un contexte de blessure musculaire. Ainsi, nous avons voulu évaluer les effets de l'allongement de la photopériode sur la sensibilité à la douleur des animaux blessés. Pour cela, nous avons effectué des tests de Von Frey de J-3 à J+13 sur des animaux blessés, mais non implantés (groupes « **Muscles-J14 (M14)** ») soumis soit à la photopériode 12:12, soit à la photopériode 16:8 (voir Fig. 80b pour les détails du protocole). Le 14<sup>e</sup> jour, nous avons prélevé le muscle blessé afin de comparer les paramètres de la blessure (poids du muscle et surface de lésion)

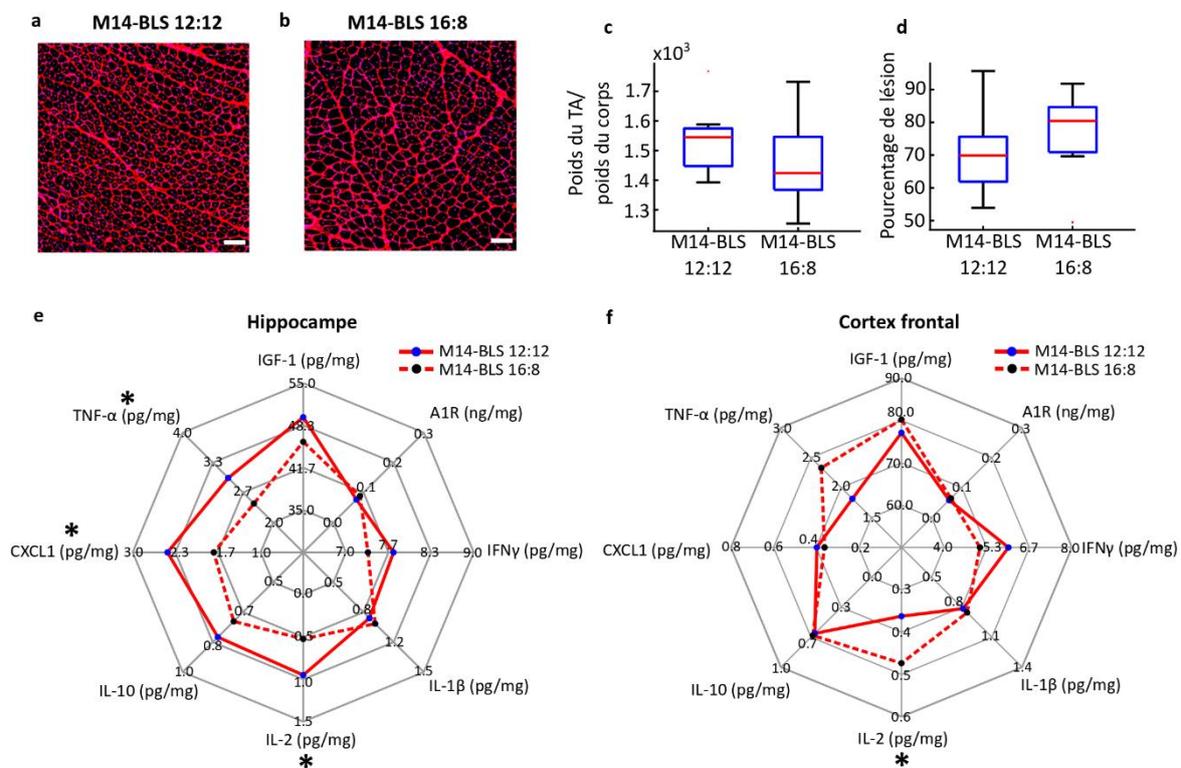
pour les deux groupes d'animaux. Nous avons également prélevé l'hippocampe et le cortex frontal sur lesquels nous avons effectué des dosages de facteurs inflammatoires associés au traitement de la douleur au niveau central (Mokhtari et al., 2019; Mutso et al., 2012). Ces mesures ont été effectuées sur des animaux non implantés afin d'éviter les potentiels biais induits par la chirurgie d'implantation téléométrique sur les facteurs inflammatoires que nous avons choisi de quantifier.

Nos résultats montrent que la blessure musculaire induit une diminution des niveaux de pression entraînant le retrait de la patte de l'animal, tant pour les animaux soumis à la photopériode 12:12 que pour ceux soumis à la photopériode 16:8. Cependant, les niveaux de pression sont significativement plus bas pour les animaux 12:12 dès le premier jour de mesure après induction de la blessure (à J+4) jusqu'à la fin de l'expérience (à J+13) par rapport aux niveaux de pression des animaux 16:8. De plus, les animaux blessés 16:8 reviennent à des valeurs de pression similaires à celles mesurées avant la blessure à J+9, à l'inverse des animaux 12:12 qui ne retrouvent pas des valeurs de pression comparables à celles mesurées avant la blessure même à J+13 (Fig. 86).



**Figure 86 : Évolution du seuil de sensibilité à la douleur mécanique à la suite de l'induction de la blessure et à l'allongement de la photopériode.** Valeurs de pression moyenne associée au retrait de la patte des animaux lors du test de Von Frey (en grammes) pour la patte blessée des animaux M14-BLS 12:12 (courbe rouge pleine) et la patte blessée des animaux M14-BLS 16:8 (courbe rouge pointillé) de J-3 à J+13. Aucun test de Von Frey n'est effectué pendant les trois premiers jours post-blessure. Les différences statistiques ( $p < 0,05$ ) entre les deux groupes sont indiquées par le rectangle de couleur rouge, les différences avec la ligne de base pour les animaux 12:12 sont indiquées par le rectangle de couleur verte et pour les animaux 16:8 par le rectangle de couleur violette, évaluées par des tests statistiques par permutations avec une correction de Benjamini-Hochberg (voir *Méthodes*),  $n=8$  animaux par groupe.

À J+14, les animaux ont été euthanasiés et nous avons prélevé le TA blessé pour l'histologie, et les tissus cérébraux (hippocampe et cortex frontal) du fait des travaux du laboratoire montrant l'augmentation du facteur neurotrophique IGF-1 dans le cortex frontal après 14 jours d'extension de sommeil (Chennaoui et al., 2017), donc des effets centraux. Nous avons pesé le muscle blessé et calculé la surface de la zone en réparation (pour évaluer a posteriori le pourcentage de surface de lésion) avec un immunomarquage au WGA afin d'évaluer les potentielles différences entre les blessures des animaux 12:12 et 16:8 (Fig. 87a, b). Il n'y a aucune différence significative pour le poids relatif du TA (rapporté au poids de l'animal) et la surface de la lésion musculaire entre les animaux blessés 12:12 et 16:8 (Fig. 87c, d). Pour l'hippocampe et le cortex frontal, nous avons réalisé des dosages d'IGF-1 et de molécules impliquées dans l'inflammation et donc dans la régulation centrale de la douleur et du sommeil. Au niveau de l'hippocampe, la concentration (exprimée en pg/mg de protéines totales) des cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-2) et de la chimiokine CXCL1 est plus faible chez les animaux blessés 16:8 par rapport aux blessés 12:12 (Fig. 87e). En revanche au niveau du cortex frontal, la concentration en IL-2 est significativement plus élevée pour les animaux blessés 16:8 (Fig. 87f).



**Figure 87 : Paramètres de la lésion musculaire et du contenu cérébral après 14 jours d'allongement de la photopériode.** **a** Coupe transversale de TA après un immunomarquage au WGA pour un animal M14-BLS 12:12 et **b** pour un animal M14-BLS 16:8. **c** Boxplot représentant le poids du TA divisé par le poids du corps des animaux

pour chaque groupe et **d** pourcentage de surface de la lésion musculaire. Contenu protéique en cytokines pro- et anti-inflammatoires et en facteurs de croissance au niveau **e** de l'hippocampe, **f** du cortex frontal. Cytokines pro-inflammatoires : Facteur de nécrose tumorale (TNF- $\alpha$ ), interleukine (IL)-1 $\beta$ , interféron (IFN)- $\gamma$ , chimiokines C-X-C motif ligand (CXCL)-1, IL-2 ; Cytokines anti-inflammatoires : IL-10 ; Facteurs de croissance : facteur de croissance semblable à l'insuline (IGF)-1, facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGF), facteur de croissance transformant (TGF)- $\beta$  total et libre, récepteur A1 à l'adénosine (A1R) ; prélèvements réalisés à 08:00 au Jour +14. \* :  $p < 0,05$ , test t de Student,  $n=8$  animaux par groupe : animaux blessés 12:12 (**M14-BLS 12:12, courbe rouge pleine**) et 16:8 (**M14-BLS 16:8, courbe rouge pointillé**).

**Discussion.** Le lien entre sommeil et sensibilité à la douleur paraît assez bien établi dans des situations de manque de sommeil (Brennan & Lieberman, 2009; Faraut et al., 2015; Lewandowski et al., 2010; Moldofsky, 2001). Une douleur chronique intense est elle-même associée à une diminution de la qualité du sommeil (Foley et al., 2007; Power et al., 2005) et une mauvaise qualité du sommeil est associée à une augmentation de l'intensité de la douleur (Haack & Mullington, 2005; Kundermann et al., 2004; Simpson et al., 2018). Il a été démontré qu'une augmentation du temps de sommeil à la suite d'une restriction de sommeil (un sommeil de « récupération ») permet de réduire la sensibilité à la douleur (Davies et al., 2008). Cependant, les effets d'une extension de sommeil sur la douleur hors privation de sommeil et dans un contexte de blessure musculaire n'ont jamais été démontrés. Simonelli et al., 2019 ont montré que l'extension du sommeil permet d'augmenter la tolérance à la douleur, mais n'affecte pas le seuil de sensibilité à la douleur. Par ailleurs, Roehrs et al., 2012 ont augmenté le temps de sommeil d'adultes sains jugés « endormis » (les individus dorment en moyenne 7,28 heures par jour, mais présentent des scores de latence de sommeil pathologiques) pendant 4 jours, et cela s'est traduit par une augmentation de la latence de retrait des doigts (+25%) lors du test de la plaque chauffante. Ainsi, notre étude est en accord avec ces observations faites dans des contextes différents, et amène un résultat original sur les effets bénéfiques de l'augmentation de la durée totale du sommeil sur la sensibilité à la douleur mécanique induite par une blessure musculaire. Nous pouvons tout d'abord remarquer que le niveau de pression de la ligne de base (et à partir de J+8 pour les animaux blessés 16:8) se situe autour de 70-80g, ce qui est en accord avec les valeurs moyennes mesurées pour des animaux non blessés dans la littérature (Ferrier et al., 2016). Nos résultats montrent ensuite que, pour les deux groupes d'animaux, la blessure musculaire induit une diminution des valeurs de pression associée au retrait de la patte des animaux. En revanche, les animaux blessés exposés à la photopériode 12:12 présentent des valeurs de pression significativement plus basses que celles mesurées pour les animaux 16:8, cela dès la première mesure (J+4)

jusqu'à la fin de l'expérimentation (J+13). Par ailleurs, pendant les 13 jours de mesures, les valeurs de pression mesurées pour les animaux blessés 12:12 sont significativement plus basses que les valeurs de pression à l'état basal (mesurées avant l'induction de la blessure). Concernant les animaux blessés 16:8, les valeurs de pression mesurées ne présentent plus de différences significatives avec les valeurs mesurées à l'état basal (avant la blessure) à partir de J+8. Ainsi, non seulement l'allongement de la photopériode a permis de limiter la diminution des seuils de sensibilité à la douleur induite par la blessure, mais elle a également permis un retour plus rapide au niveau de base.

Un des mécanismes qui pourrait être impliqué dans ces effets sur la sensibilité à la douleur mécanique chez les animaux blessés serait une différence de l'activité locomotrice entre les animaux 12:12 et 16:8. En effet, il est connu que l'immobilisation d'un muscle quelques jours après une blessure est bénéfique pour la réparation musculaire, notamment en limitant la mise en place de tissu fibreux (Järvinen et al., 2005, 2007). Par ailleurs, cette période d'immobilisation ne doit pas être trop longue et la balance entre immobilisation et remobilisation est un facteur important pour optimiser la récupération fonctionnelle d'une blessure (Järvinen & Lehto, 1993; Järvinen et al., 2013). Afin de mesurer les effets potentiels de l'allongement de la photopériode sur l'activité locomotrice des animaux, nous avons filmé les animaux implantés (groupes « Sommeil ») pendant 24 heures avant le changement de photopériode et 7 jours après le changement de photopériode. Pour les animaux blessés, l'allongement de la photopériode induit une diminution de la distance parcourue pendant les 4 heures supplémentaires de lumière (Figure 102 en annexe). Nous ne pouvons donc pas exclure que l'ajout de cette période d'inactivité pour les animaux 16:8 ne soit pas impliqué dans l'établissement des effets bénéfiques de l'allongement de la photopériode sur la sensibilité à la douleur. Cependant, cette diminution de la distance parcourue pendant la période d'allongement de la lumière n'induit pas de différence significative sur les moyennes journalières de la distance parcourue entre les animaux blessés 16:8 et 12:12 (Figure 103 en annexe).

Il est important de signaler que notre mesure de la sensibilité à la douleur est effectuée sous la patte blessée des animaux, donc à proximité de la lésion musculaire, mais n'est pas effectuée directement sur le muscle blessé. Ce n'est pas une évaluation directe de la douleur

au niveau de la lésion et nos résultats ne peuvent pas être mis en relation directe avec les niveaux inflammatoires du muscle blessé.

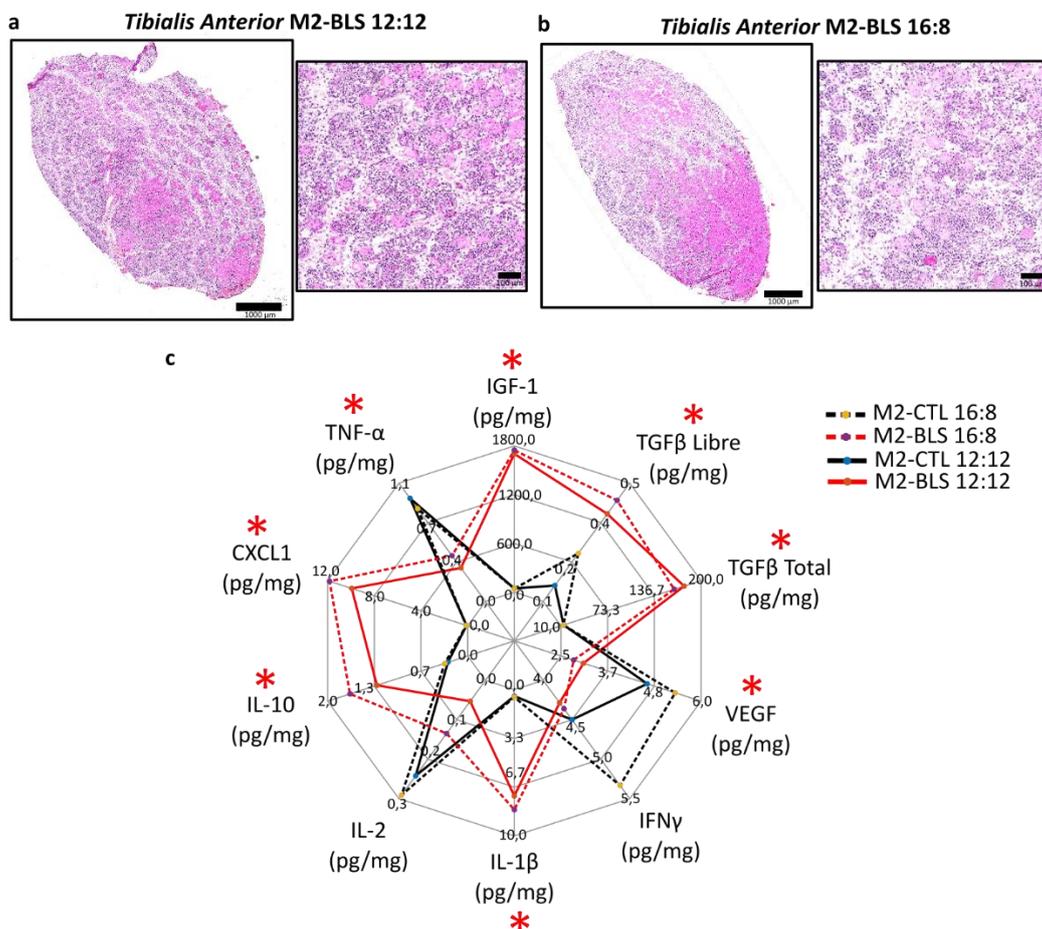
Ensuite, nous avons tenté d'identifier les potentiels intermédiaires biologiques en lien avec les effets de l'allongement de la photopériode sur la douleur. Pour cela, nous avons effectué des analyses biochimiques sur des tissus prélevés 14 jours après l'induction de la blessure. Ces résultats peuvent être mis en relation avec la différence de sensibilité à la douleur mesurée à J+13, mais nous n'avons pas effectué d'analyse biochimique pendant l'évaluation de la douleur. Premièrement, à J+14 le poids des muscles ainsi que le pourcentage de surface lésée sont similaires entre les animaux blessés 12:12 et 16:8, ce qui suggère que la différence de sensibilité à la douleur, au moins à J+13, ne provient pas d'une différence de taille de la lésion musculaire. Deuxièmement, nous avons observé des concentrations plus faibles de plusieurs cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-2 et CXCL1) dans l'hippocampe. L'hippocampe est une structure cérébrale impliquée dans la perception de la douleur aiguë et chronique (Espinoza & Habas, 2018; Leknes & Tracey, 2008; Liu & Chen, 2009; Wang et al., 2016). Plusieurs études ont montré que la douleur chronique était associée à des anomalies dans l'hippocampe, telles qu'une neurogenèse réduite, qui pourrait résulter d'une augmentation des facteurs inflammatoires (Mokhtari et al., 2019; Mutso et al., 2012). De plus, la privation de sommeil induit une augmentation des marqueurs inflammatoires dans l'hippocampe, qui pourrait être impliqué dans l'effet négatif de la privation de sommeil sur la douleur (Chennaoui et al., 2015; Nijs et al., 2017; Wadhwa et al., 2017). Ainsi, nous pouvons faire l'hypothèse que l'effet anti-inflammatoire de l'extension du sommeil au niveau de l'hippocampe soit bénéfique pour réduire l'augmentation de sensibilité à la douleur induite par la lésion musculaire. Des études supplémentaires sur les mécanismes neurobiologiques mis en jeu par l'extension de sommeil sur la sensibilité à la douleur sont nécessaires.

#### **5.2.4. Caractérisations biologiques et histologiques des effets de 2 et 14 jours d'allongement de la photopériode sur la réparation musculaire du muscle *Tibialis anterior*.**

Nous avons observé une augmentation du temps total de sommeil lent (induit par l'allongement de la photopériode) à J+1 et J+2 pour les animaux blessés 16:8 par rapport aux blessés 12:12. Afin d'étudier les effets potentiels de cette augmentation du temps de sommeil lent sur les étapes très précoces de la réparation musculaire, nous avons analysé les taux de

cytokines pro-inflammatoires et de facteurs de croissance au niveau du muscle d'animaux blessés non implantés deux jours après l'allongement de la photopériode et l'induction de la blessure (Groupes « **Muscle-J2 (M2)** »).

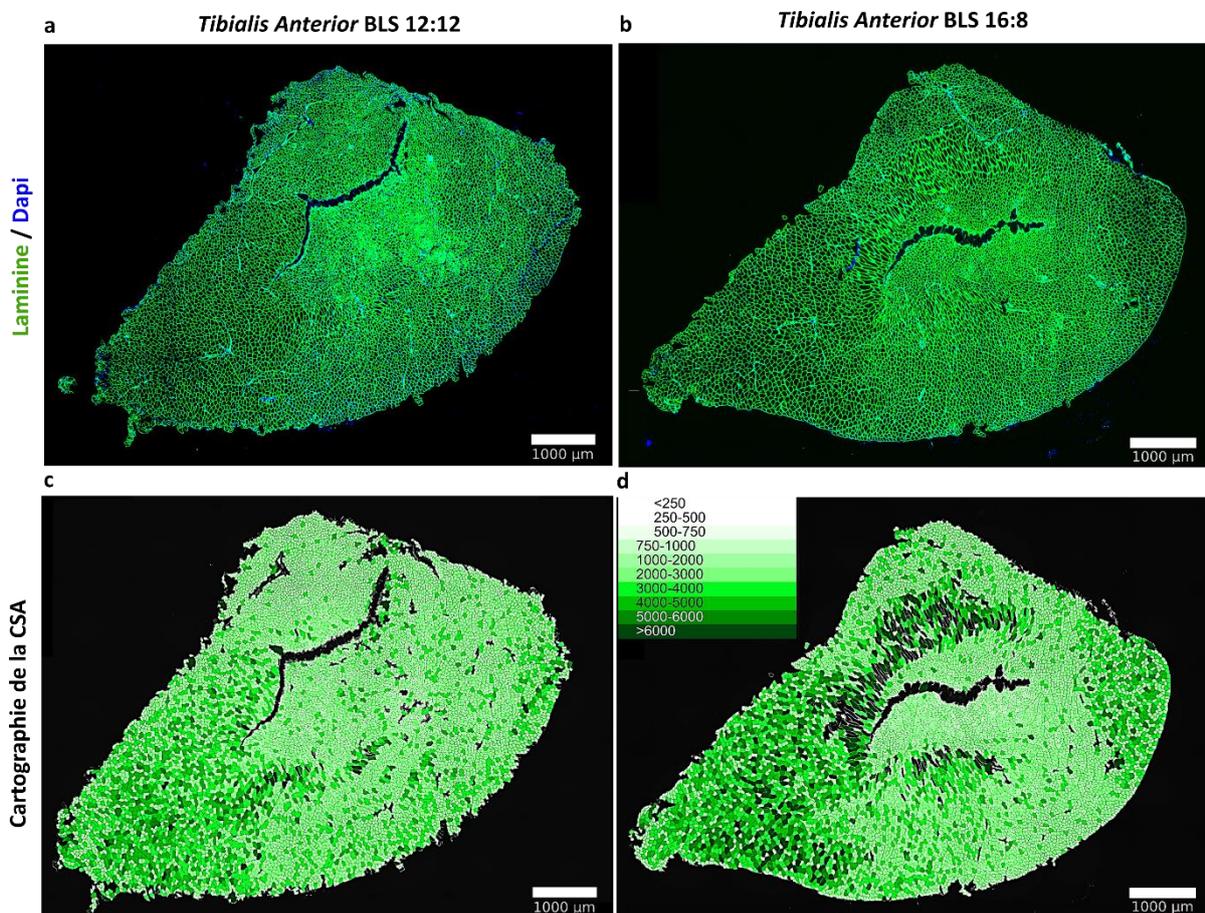
Les colorations HPS réalisées sur les TA prélevés deux jours après l'induction de la blessure témoignent de la nécrose de la quasi-totalité des fibres musculaires, que ce soit pour les animaux 12:12 ou 16:8. Nous observons un important infiltrat de cellules immunitaires qui est caractéristique de la phase pro-inflammatoire précoce du processus de réparation musculaire (Fig. 88a, b). Nos dosages effectués à J+2 post-blessure rendent compte de la réponse biologique à la nécrose musculaire massive induite par l'injection de CTX et du début de la réparation musculaire. Cette « signature biologique » de la blessure musculaire à J+2 est similaire entre les animaux blessés 12:12 et 16:8. Elle est caractérisée par une augmentation importante des cytokines pro-inflammatoires, IL-1 $\beta$  et CXCL1, et anti-inflammatoire IL-10, des facteurs de croissance IGF-1 et TGF $\beta$  (sous la forme libre et totale), et une diminution du TNF- $\alpha$  et du VEGF par rapport aux animaux contrôles, quelle que soit la photopériode (Fig. 88c). Il n'y a aucune différence significative entre les TA des animaux blessés 12:12 et 16:8.



**Figure 88 : Réponse biologique à la blessure musculaire après deux jours d'allongement de la photopériode. a** Coupe transversale de TA deux jours après l'induction de la blessure colorée à l'HPS pour un animal soumis à la photopériode 12:12 et **b** pour un animal soumis à la photopériode 16:8 (barre d'échelle pour le muscle entier : 1000µm et 100µm pour le zoom). **c** Résultats des dosages (voir Méthodes) réalisés sur le TA prélevé à 08:00 deux jours après l'induction de la blessure musculaire pour les animaux de la partie « Muscle » (M2-) contrôles 12:12 (**M2-CTL 12:12, courbe noire pleine**) et les animaux blessés 12:12 (**M2-BLS 12:12, courbe rouge pleine**), pour les animaux contrôles 16:8 (M2-CTL 16:8, courbe noire pointillée) et blessés 16:8 (**M2-BLS 16:8, courbe rouge pointillée**). Il n'y a pas de différence entre les deux groupes contrôles et entre les deux groupes blessures. \* :  $p < 0,05$ . Anova à deux facteurs (blessure et photopériode) suivie de tests posthoc de Wilcoxon avec correction de Bonferroni. Les astérisques rouges indiquent les différences entre les groupes blessés et les groupes contrôles au sein de chaque photopériode,  $n=8$  animaux par groupe.

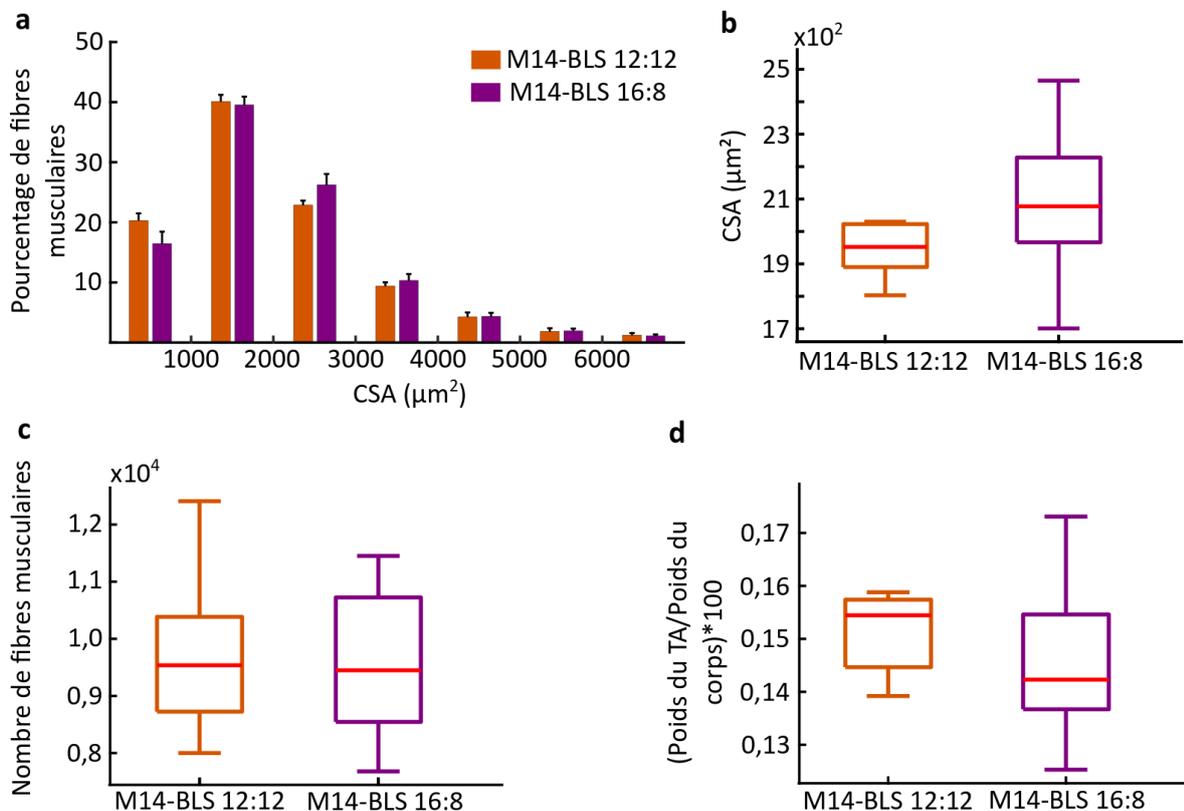
Ensuite, nous avons analysé l'effet de 14 jours d'allongement de la photopériode sur des paramètres histologiques permettant d'évaluer la réparation musculaire : l'aire de surface transversale des fibres musculaires (CSA) ; le nombre des fibres musculaires (total et par type de fibres) et leur nombre de noyaux par fibre et de capillaires associés par fibre sur des animaux blessés non implantés (Groupes « **Muscle-J14 (M14)** »).

Les immunomarquages visualisant la laminine et les noyaux (par le Dapi) effectués sur des coupes transversales de TA (Fig. 89a, c) nous permettent de calculer, à l'aide de l'outil MuscleJ (voir Méthodes) la taille de chaque fibre musculaire.



**Figure 89 : Cartographies avec distribution spatiale de l'aire de section transversale des fibres musculaires avec l'outil MuscleJ.** **a** Coupe transversale des TA prélevés 14 jours après l'induction de la blessure pour un animal blessés 12:12 et pour un animal blessé 16:8 après un immunomarquage anti-laminine (marque la membrane basale des fibres musculaires en vert) et au DAPI (marque les noyaux en bleu), **b** pour un animal M14-BLS 16:8. **c, d** Cartographie de la CSA des fibres musculaires calculée automatiquement à l'aide de MuscleJ pour les coupes de muscles **a** et **b**, respectivement.

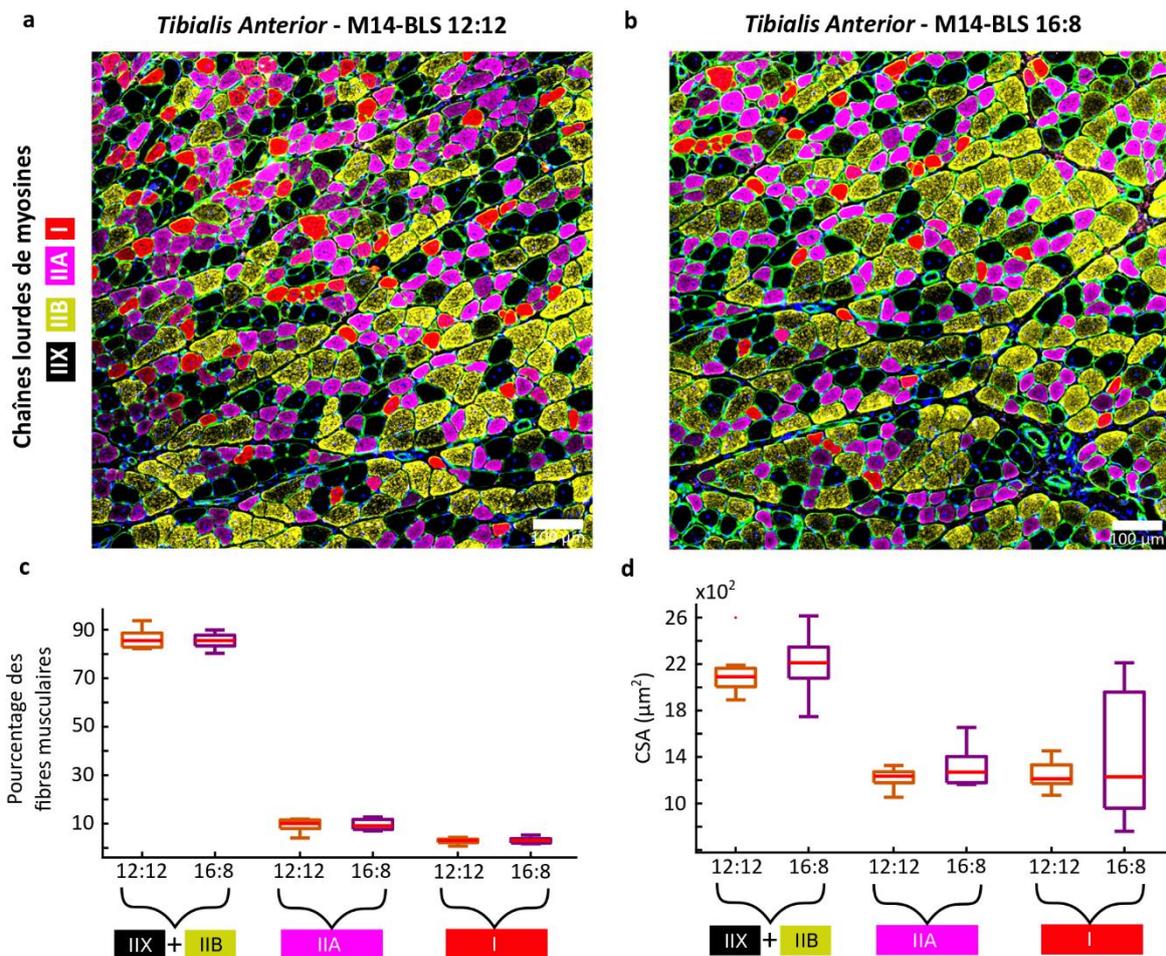
Il n'y a aucune différence dans la distribution de la CSA des fibres musculaires entre les animaux blessés 12:12 (calculée sur 78 924 fibres au total) et les animaux blessés 16:8 (calculée sur 77 542 fibres ; Fig. 90a) ou pour la CSA moyenne des fibres musculaires (Fig. 90b). Le nombre moyen de fibres musculaires par muscle entre les deux groupes d'animaux n'est également pas différent (Fig. 96c) et le poids relatif du TA (rapporté au poids de l'animal) est similaire entre les animaux blessés 12:12 et 16:8 (Fig. 96d).



**Figure 90 : Effet de l'allongement de la photopériode sur les fibres musculaires du TA en réparation.** **a** Aire de section transversale (CSA) des fibres musculaires du TA blessé ([0-1000] ; [1000-2000] ; [2000-3000] ; [3000-4000] ; [4000-5000] ; [5000-6000] ; >6000]  $\mu\text{m}^2$ ) prélevé 14 jours après l'induction de la blessure musculaire pour les animaux de la partie « Muscle » (M14-) blessés 12:12 (M14-BLS 12:12, en orange) et pour les animaux blessés 16:8 (M14-BLS 16:8, en violet). **b** CSA moyenne pour l'ensemble des fibres musculaires pour les animaux M14-BLS 12:12 et M14-BLS 16:8, **c** nombre de fibres musculaires et **d** poids du TA/poids du corps multiplié par 100. Anova de Friedman pour la fréquence des fibres musculaires en fonction de leur SST et tests t de Student pour les paramètres représentés par des boîtes à moustaches, n=8 animaux par groupe.

Nous avons également analysé la CSA des fibres musculaires en fonction du type de fibres musculaires. Pour cela nous avons réalisé un marquage ciblant les différents types de chaînes

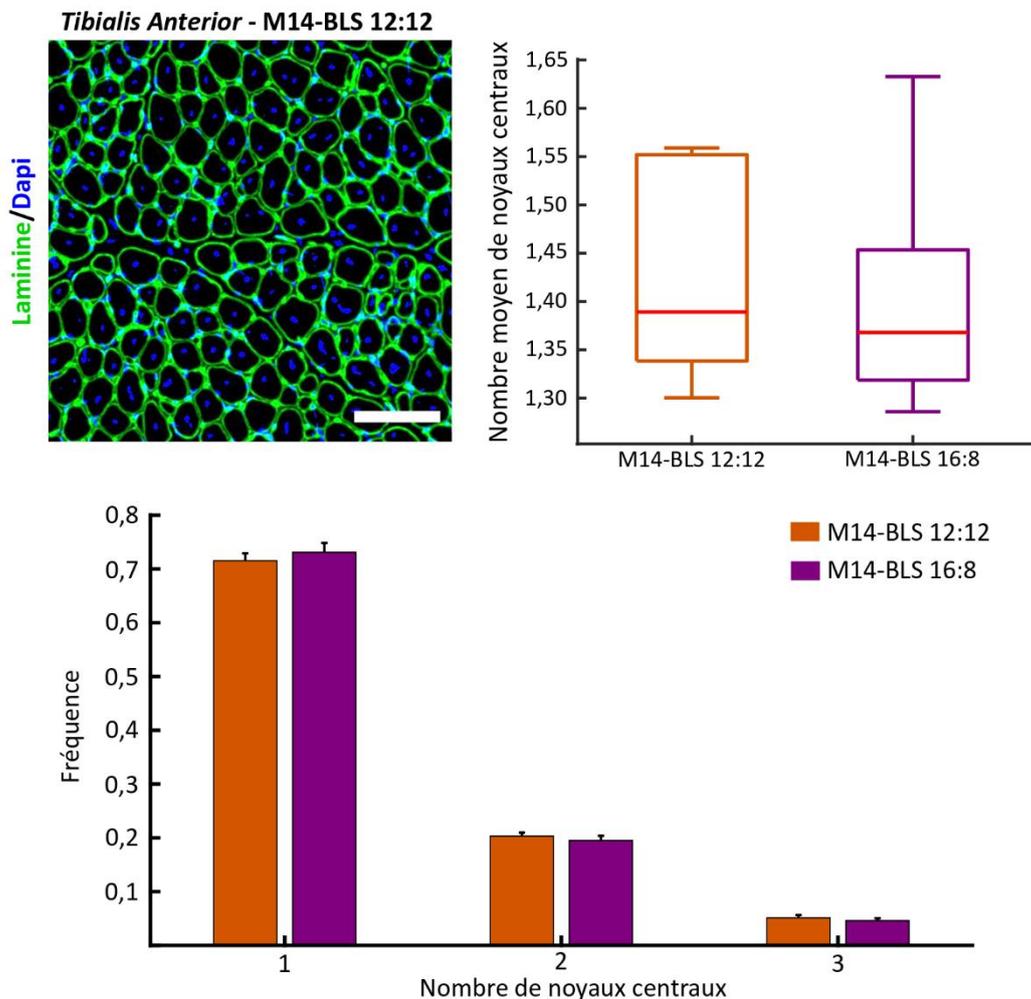
lourdes de myosine permettant d'identifier les fibres de type IIB, IIA et les fibres de type I (Fig. 91a, b). Le signal de notre marquage anti-IIB était trop faible pour différencier, avec MuscleJ, les fibres IIB marquées et les fibres IIX non marquées. C'est pourquoi nous avons choisi de regrouper ces deux types de fibres. Il n'y a pas de différence en termes de fréquence des types de fibres musculaires entre les deux groupes (Fig. 91c) et la CSA des fibres musculaires pour chaque type de fibres musculaires n'est pas non plus différente entre les animaux blessés 12:12 et 16:8 (Fig. 91d).



**Figure 91 : Effet de l'allongement de la photopériode sur la fréquence et l'aire de section transversale des fibres musculaires en fonction de leur type.** **a** Coupe transversale du TA après un immunomarquage des types de fibres musculaires (type IIX non marqué en noir ; IIB en jaune ; IIA en rose ; I en rouge) prélevé 14 jours après l'induction de la blessure musculaire pour les animaux de la partie « Muscle » (M14-) blessés 12:12 (M14-BLS 12:12) et **b** pour les animaux blessés 16:8 (M14-BLS 16:8) **c** Fréquence des types de fibres musculaires pour les animaux blessés 12:12 (M14-BLS 12:12, en orange) et pour les animaux blessés 16:8 (M14-BLS 16:8, en violet), **d** CSA pour chaque type de fibres musculaires. Anova à deux facteurs (photopériode et type de fibres) pour la fréquence et la CSA des fibres musculaires, n=8 animaux par groupe.

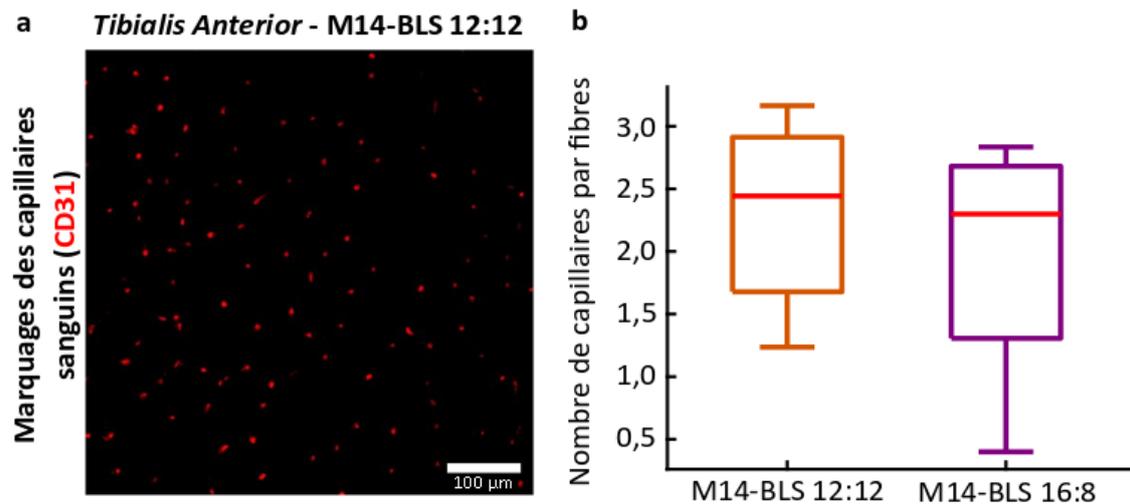
Un autre paramètre de la réparation musculaire analysé est le nombre de noyaux centraux par fibre musculaire. La détection des noyaux est effectuée à l'aide du marquage au Dapi (en

bleu) et chaque fibre musculaire est individualisée à l'aide du marquage à la Laminine (Fig. 91a). Il n'y a pas de différence dans le nombre moyen de noyaux centraux par fibre musculaire (Fig. 91b) ou dans la fréquence du nombre de noyaux centraux par fibres musculaires ([1] ; [2] ; [3]) entre les animaux blessés 12:12 et 16:8 (Fig. 91c).



**Figure 92 : Effet de l'allongement de la photopériode sur le nombre de noyaux centraux par fibre musculaire.** a Coupe transversale d'un TA d'un animal M14-BLS 12:12 avec un immunomarquage de la laminine (en vert) et des noyaux par le Dapi (en bleu). b Nombre de noyaux centraux pour les animaux blessés 12:12 (M14-BLS 12:12, en orange) et pour les animaux blessés 16:8 (M14-BLS 16:8, en violet). c Fréquence des fibres musculaires en fonction du nombre de noyaux centraux pour les animaux blessés 12:12 (M14-BLS 12:12, en orange) et pour les animaux blessés 16:8 (M14-BLS 16:8, en violet). Test t de Student pour le nombre moyen de noyaux centraux et Anova de Friedman pour la fréquence du nombre de noyaux centraux par fibre musculaire, n=8 animaux par groupe.

Nous avons également évalué le nombre de capillaires sanguins par fibre musculaire en utilisant un immunomarquage de la protéine CD31 (« cluster differentiation 31 » ; Fig. 92a) : il n'y a pas de différence entre les deux groupes d'animaux (Fig. 92b).



**Figure 93 : Nombre de capillaires par fibre musculaire du TA blessé en réponse à l’allongement de la photopériode.** **a** Coupe transversale d’un TA blessé pour un animal M14-BLS 12:12 après un immunomarquage au CD31 (qui marque les capillaires sanguins en rouge), **b** nombre de capillaires par fibre musculaire pour les animaux blessés 12:12 (M14-BLS 12:12, en orange) et pour les animaux blessés 16:8 (M14-BLS 16:8, en violet). Test t de Student, n=8 animaux par groupe.

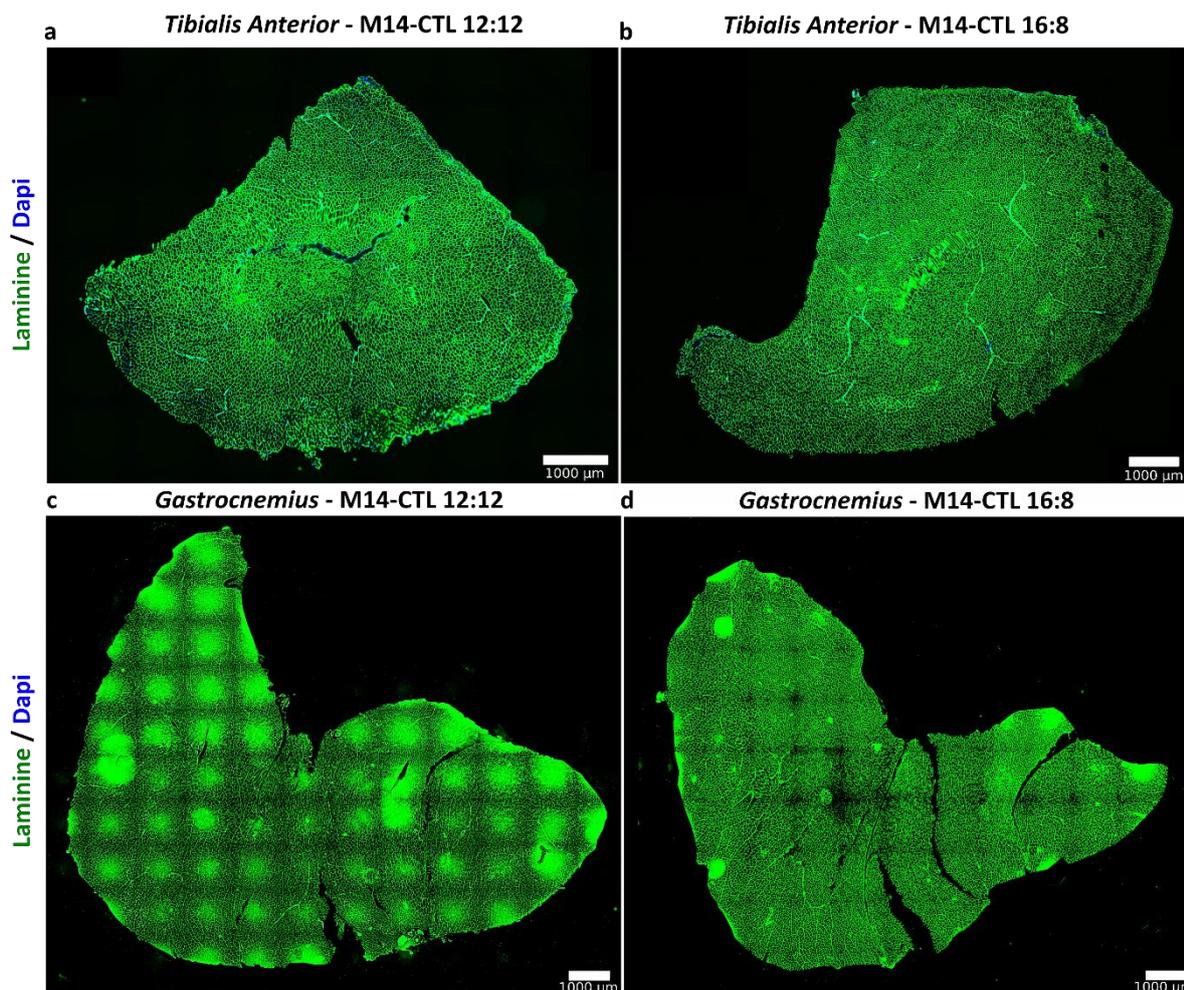
**Discussion.** Nous n’observons pas d’effet significatif de l’allongement de la photopériode sur les paramètres histologiques de la réparation musculaire que nous avons évalués. Deux jours après l’allongement de la photopériode et l’induction de la blessure, nos résultats confirment la présence d’une nécrose généralisée des fibres du muscle blessé, que ce soit pour les animaux 12:12 ou 16:8, qui est caractéristique de l’injection de cardiotoxine (Guardiola et al., 2017; Hardy et al., 2016; Mounier et al., 2013). À deux jours post-blessure, la réponse cellulaire implique majoritairement des macrophages au profil pro-inflammatoire qui sécrètent des facteurs inflammatoires comme l’IL-1 $\beta$  et CXCL1 (Chazaud, 2020). Ces macrophages vont progressivement adopter un profil anti-inflammatoire et sécréter des facteurs comme l’IL-10, le TGF- $\beta$  et l’IGF-1 impliqués dans la myogenèse (Arnold et al., 2007; Dort et al., 2019). Nos résultats illustrent cette période de transition avec à la fois la sécrétion importante des facteurs pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , CXCL1) et des facteurs anti-inflammatoire/facteurs de croissance (IL-10 ; TGF- $\beta$  ; IGF-1). Un résultat surprenant est la diminution de la concentration de TNF- $\alpha$  pour les deux groupes d’animaux blessés alors que le TNF- $\alpha$  est décrit comme étant fortement exprimé par les macrophages durant les premiers jours de la blessure (Arnold et al., 2007; Hirata et al., 2003). Il est possible que notre prélèvement, effectué à 08:00 à J+2, ne soit pas adéquat pour observer une augmentation de TNF- $\alpha$ , des prélèvements supplémentaires réalisés par exemple à 20:00 à J+2 ou à J+1 et J+3 pourraient nous permettre d’identifier plus

précisément la cinétique d'augmentation du TNF- $\alpha$  dans notre modèle. Une autre possibilité est que nos dosages sont effectués sur du tissu entier et que les débris issus de la nécrose massive, l'infiltrat cellulaire massif ou des remodelages de la MEC empêchent la détection des molécules de TNF- $\alpha$ . Selon nos résultats, 48 heures d'allongement de la photopériode ne semblent donc pas avoir d'effet sur la réponse à J+2 post-blessure.

De manière similaire, les différentes explorations histologiques que nous avons réalisées (CSA des fibres musculaires, nombre de capillaires par fibre, nombre de noyaux par fibre) sur des animaux blessés soumis à la photopériode allongée ou à la photopériode classique pendant 14 jours n'indiquent aucun effet significatif de l'allongement de la photopériode. Nous observons toutefois une tendance à une CSA des fibres musculaires plus élevée pour le TA blessé du groupe BLS 16:8 par rapport aux animaux BLS 12:12. Une des limites pourrait être le nombre d'animaux par groupe (n=8) qui est peut-être trop faible pour nous permettre d'observer un effet significatif de l'allongement de la photopériode. De plus, il est possible que le modèle de blessure musculaire que nous avons choisi, qui est très inflammatoire et qui n'est pas représentatif d'une lésion traumatique mécanique, ne permette pas d'identifier des bénéfices potentiels de l'extension de sommeil. L'utilisation d'autres modèles de blessures dans de futures études pourrait permettre de renforcer nos connaissances sur le rôle du sommeil dans la réparation musculaire.

#### **5.2.5. Caractérisations biologiques et histologiques des effets de 14 jours d'allongement de la photopériode sur les muscles *Tibialis Anterior* et *Gastrocnemius* d'animaux non blessés.**

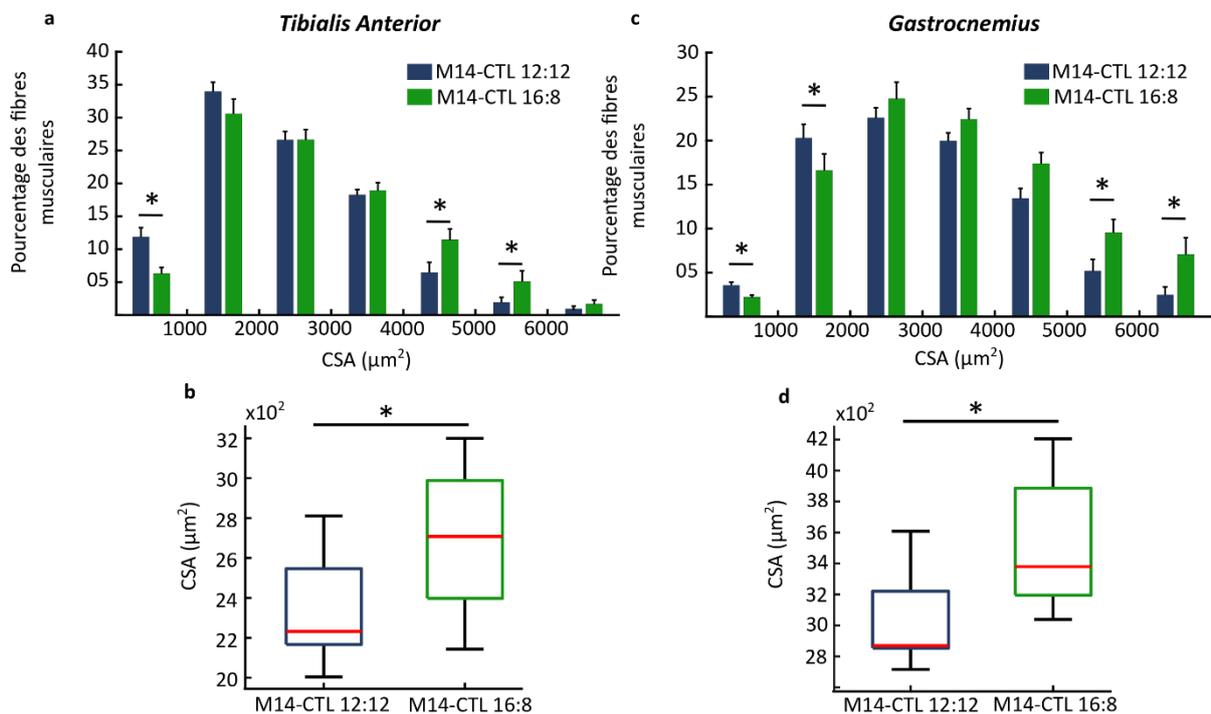
Une autre question que nous souhaitons aborder est celle des effets biologiques et histologiques des 14 jours d'allongement de la photopériode sur des fibres musculaires provenant d'animaux non blessés et non implantés (Groupes « **Muscles-J14** (M14) »). Pour cela nous avons analysé le nombre et la CSA des fibres musculaires des muscles TA et *Gastrocnemius* (GC ; Fig. 93a-d) prélevés sur des animaux contrôles (non-blessés) après 14 jours d'exposition à la photopériode 12:12 ou 16:8. Nous avons également réalisé, sur ces deux types de muscle et sur le plasma, des dosages des facteurs impliqués dans la croissance des fibres musculaires.



**Figure 94 : Immunomarquages anti-laminine et Dapi sur des coupes transversales de TA et de GC. a** coupe transversale du TA pour un animal contrôle 12:12, **b** pour un animal contrôle 16:8, **c** du GC pour un animal contrôle 12:12 et **d** pour un animal contrôle 16:8.

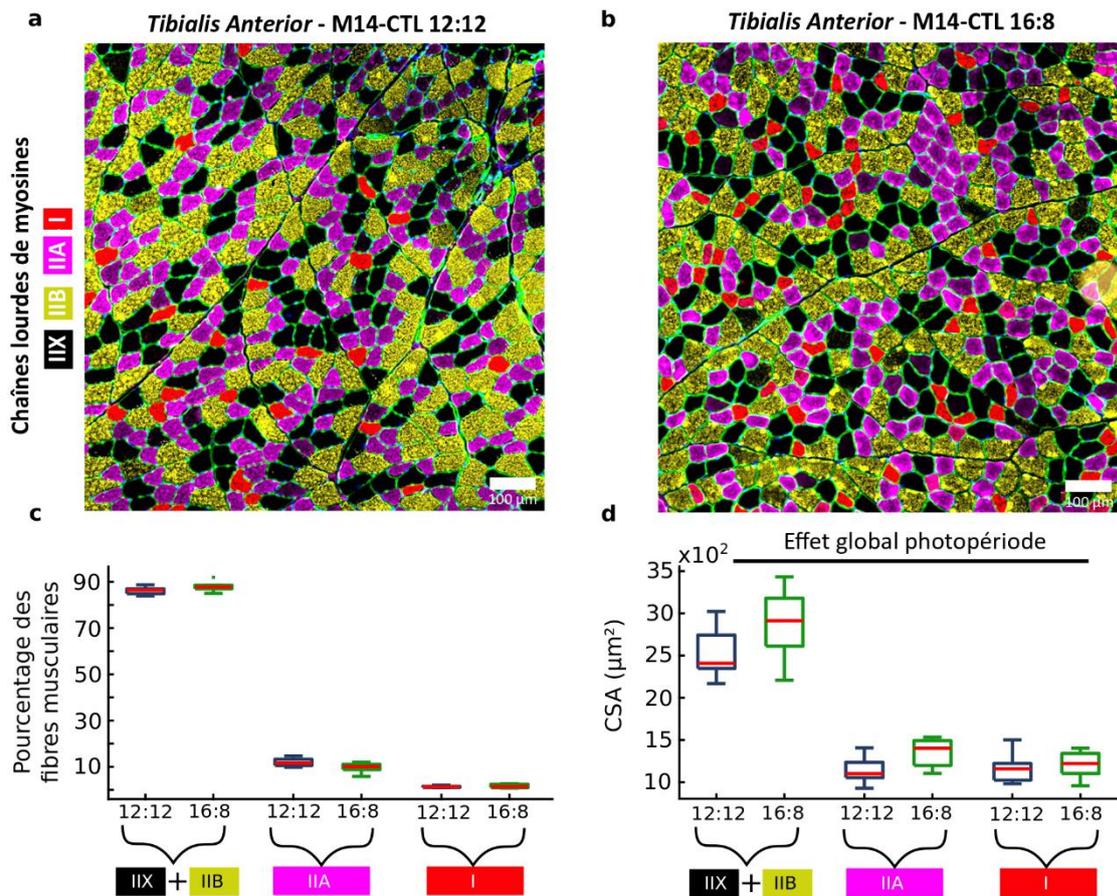
Les résultats de ces analyses montrent que pour le TA, les animaux contrôles soumis à la photopériode 16:8 présentent un pourcentage significativement plus faible de petites fibres musculaires et un pourcentage significativement plus élevé de larges fibres musculaires comparé aux animaux contrôles 12:12 (Fig. 94a). La CSA moyenne pour l'ensemble des fibres musculaires du TA est plus élevée pour les animaux contrôles 16:8 (calculée sur 83 589 fibres) comparés aux animaux contrôles 12:12 (calculée sur 78 129 fibres ; Fig. 94b). De manière similaire, pour le GC, les animaux contrôles 16:8 présentent également un pourcentage plus faible de petites fibres musculaires ainsi qu'un pourcentage plus élevé de fibres musculaires de grande taille (Fig. 94b) comparés aux animaux contrôles 12:12 (Fig. 101c). La CSA moyenne pour l'ensemble des fibres musculaires est également plus élevée pour le GC des animaux

contrôles 16:8 (calculée sur 129 879 fibres) par rapport au GC des animaux contrôles 12:12 (calculée sur 123 620 fibres ; Fig. 94d).



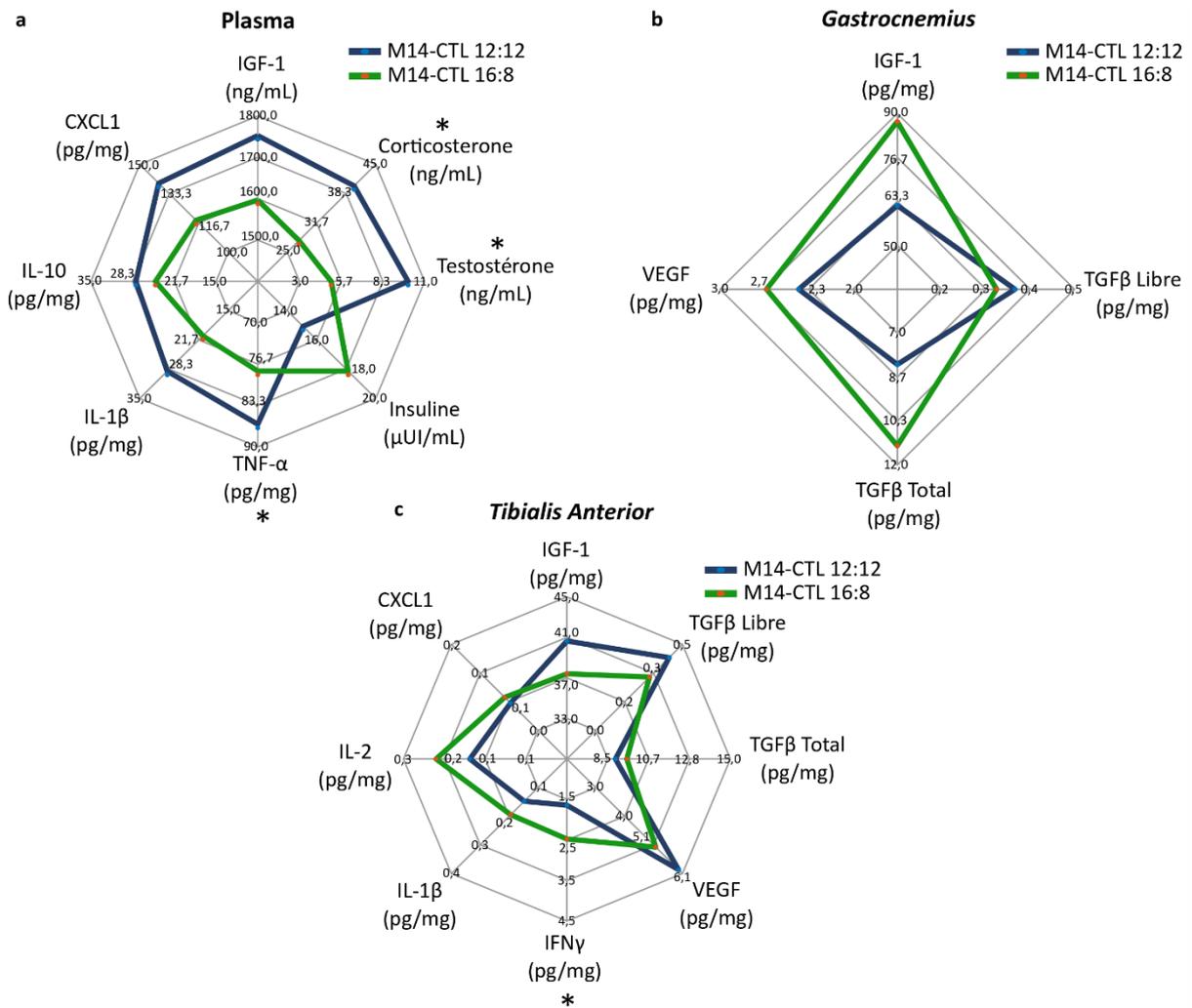
**Figure 95 : Aire de section transversale des fibres musculaires du TA et du GC en réponse à 14 jours d'allongement de la photopériode. a** Fréquence (en %) des fibres musculaires en fonction de leur aire de section transversale (CSA ; [0-1000] ; [1000-2000] ; [2000-3000] ; [3000-4000] ; [4000-5000] ; [5000-6000] ; [>6000] μm<sup>2</sup>) pour le TA des animaux M14-CTL 12:12 (en bleu) et des animaux M14-CTL 16:8 (en vert), et **b** surface de section transversale moyenne pour l'ensemble des fibres musculaires du TA. **c** et **d** similaire à **a** et **b** pour le GC. \* : p<0,05, ANOVA de Friedman et tests post-hoc de Durbin-Conover avec une correction de Bonferroni pour la fréquence des fibres musculaires en fonction de leur SST. Test t de Student pour la CSA moyenne pour l'ensemble des fibres musculaires, n=8 animaux par groupe.

Pour mettre en évidence un potentiel effet de l'allongement de la photopériode selon le type de fibres musculaires, nous avons analysé la CSA pour chaque type de fibres musculaires composant le TA défini à partir de leur chaîne lourde de myosine : les fibres de type IIX, IIB, IIA et les fibres de type I (Fig. 95a, b). Il n'y a pas d'effet significatif du facteur photopériode pour la fréquence des fibres musculaires (Fig. 95c). Pour la CSA des fibres musculaires, nous observons un effet significatif du facteur photopériode, mais pas d'effet significatif pour un type précis de fibres (Fig. 95d).



**Figure 96 : Fréquence et aire de section des types de fibres musculaires du TA en réponse au changement de photopériode.** **a** Immunomarquage des différents types de chaîne lourde de myosine (IIX : non marquée en noir ; IIB : jaune ; IIA : rose ; I : rouge) sur une coupe de TA d'un animal M14-CTL 12:12 et **b** pour un animal M14-CTL 16:8. **c** Fréquence de chaque type de fibre musculaire (même code couleur que le marquage) pour les animaux M14-CTL 12:12 (en bleu) et pour les animaux M14-CTL 16:8 (en vert) et **d** Aire de section transversale pour chaque type de fibres. Anova à deux facteurs (photopériode et type de fibres) pour la fréquence et la CSA des fibres musculaires suivie de tests posthoc de Wilcoxon, n=8 animaux par groupe.

Pour les facteurs impliqués dans la croissance des fibres musculaires au niveau systémique, il n'y a pas de différence liée à la photopériode pour les concentrations plasmatiques d'IGF-1, d'insuline, de IL-1, IL-10, et CXCL1, mais les concentrations de corticostérone, de TNF- $\alpha$  et de testostérone sont significativement inférieures pour les animaux CTL 16:8 comparés aux 12:12 (Fig. 96a). Au niveau du TA, il n'y a pas de différence entre les animaux contrôles 16:8 et 12:12 pour les concentrations d'IGF-1, de TGF $\beta$  libre et total, de VEGF, IL-1 $\beta$ , IL-2 ou CXCL1, mais les concentrations d'IFN $\gamma$  sont significativement inférieures chez les animaux CTL 16:8 comparés aux 12:12 (Fig. 96b). Au niveau du GC, il n'y a pas de différence entre les animaux contrôles 12:12 et 16:8 pour les concentrations d'IGF-1, de TGF $\beta$  libre et total, et de VEGF (Fig. 96c).



**Figure 97 : Dosages biochimiques au niveau plasmatique et musculaire après 14 jours d'allongement de la photopériode.** a Concentrations mesurées au niveau plasmatique, b au niveau du GC et c au niveau du TA pour les animaux contrôles 12:12 (M14-CTL 12:12, courbe bleue) et 16:8 (M14-CTL 16:8, courbe verte). Facteur de nécrose tumorale (TNF-α), interleukine (IL)-1β, interféron (IFN)-γ, chimiokines C-X-C motif ligand (CXCL)-1, IL-2 ; IL-10 ; facteur de croissance semblable à l'insuline (IGF)-1, facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGF), facteur de croissance transformant (TGF)-β total et libre ; prélèvements réalisés à 08:00 à J+14. \* : p<0,05, test t de Student avec une correction de Bonferroni, n=8 animaux par groupe.

**Discussion.** Dans cette étude nous montrons pour la première fois un effet de l'allongement de la photopériode sur CSA des fibres musculaires du muscle squelettique non lésé. Que ce soit pour le TA ou le GC, deux muscles aux propriétés morpho-fonctionnelles différentes, l'allongement de la photopériode est associé à une diminution de la fréquence des fibres musculaires de petite taille (CSA<2000 μm<sup>2</sup>) et une augmentation de la fréquence des larges fibres musculaires (CSA>5000 μm<sup>2</sup>) par rapport aux animaux exposés à la photopériode 12:12. Le mécanisme de croissance d'une fibre musculaire (appelé hypertrophie) qui permet d'augmenter la CSA est centré sur l'activation du complexe IGF1-Akt-mTOR (Schiaffino et al.,

2013). Plusieurs voies d'activation peuvent stimuler l'activité de ce complexe (voir *Partie 2.1.2 : Les types de fibres musculaires*), mais la voie d'activation principale passe par l'IGF-1 (Mavalli et al., 2010; Musarò et al., 2001; Schiaffino & Mammucari, 2011). Une étude préalable de notre laboratoire a montré que la concentration d'IGF-1 était augmentée au niveau du GC et au niveau plasmatique après 14 jours d'exposition à la photopériode 16:8 chez un animal non blessé (Chennaoui et al., 2017). Cette augmentation d'IGF-1 pourrait expliquer la CSA plus élevée au niveau du muscle des animaux 16:8 dans notre étude, mais nos résultats sur 8 animaux ne mettent pas en évidence d'augmentation significative de la concentration d'IGF-1, que ce soit au niveau du GC, du TA ou du plasma des animaux après 14 jours d'exposition à la photopériode 16:8. Dans notre étude, nous n'observons aucun changement significatif dans le contenu musculaire ou systémique de facteurs trophiques (IGF-1, TGF $\beta$  et testostérone) qui pourraient expliquer l'augmentation de la CSA. Ces résultats des dosages biochimiques doivent être interprétés avec prudence, car nous ne disposons pas d'une cinétique entre le J+2 et J+14. De plus, les variations circadiennes des facteurs de croissance peuvent également expliquer qu'avec un seul point de mesure, nous n'ayons pas observé l'effet lié à l'allongement de la photopériode (Haus et al., 2001; Mock et al., 1978; Wang & Li, 2021). D'autant plus que nous avons vu que le changement de photopériode induit un décalage du rythme circadien notamment à l'heure du prélèvement (entre 08:00 et 10:00 à Jour +14), avec les animaux 16:8 contrôle (non-blessés) qui présentent une augmentation de leur température corporelle et de leur activité au début de la période lumineuse (Figure 102 en annexe). Or, le rythme circadien d'IGF-1 est associé à une augmentation pendant la période lumineuse et une diminution pendant la période d'activité (Bertani et al., 2010; Ikeda et al., 2018; Li et al., 2012). Nos résultats indiquent donc que le début de la période commune de lumière (à 08:00) est associé à une activité et une température plus élevée pour les animaux 16:8 (plus actifs à 08:00 du fait de leur photopériode allongée 16:8) comparés aux animaux 12:12, qui débutent leur période de « sommeil » à 08:00. Notre prélèvement est ainsi effectué pendant cette période de transition, qui semble cruciale pour la régulation de la quantité d'IGF-1. Pour répondre précisément à cette question relative aux effets de l'allongement de la photopériode sur IGF-1, il faudrait effectuer plusieurs prélèvements pendant les 14 jours, mais également à différentes heures (par exemple : à la fin de période lumineuse commune : 20:00 et à la fin de la période d'extension de lumière : 00:00).

Une limite majeure de notre étude est que nous n'avons pas évalué la CSA des fibres musculaires sur les mêmes animaux avant et après le changement de photopériode. En effet une possibilité, qui ne peut être écartée étant donné le faible nombre d'animaux par groupe, est que les animaux du groupe 16:8 possèdent, par hasard, des fibres musculaires de plus grosse taille que les animaux 12:12. En revanche, l'utilisation d'un outil bio-informatique permettant de calculer la taille de la totalité des fibres musculaires du muscle ( $\pm 10\ 000$  fibres par muscle *Tibialis Anterior* et  $\pm 16\ 000$  pour le muscle *Gastrocnemius*) renforce significativement la puissance de nos analyses statistiques.

En conclusion de cette partie, ces résultats concernant l'effet de 14 jours d'allongement de la photopériode sur un muscle non blessé chez l'animal sont préliminaires et doivent être interprétés avec précaution. Ils pourraient cependant être en cohérence avec différentes études qui ont démontré une augmentation des performances athlétiques après un protocole d'extension de sommeil chez l'Homme (Mah et al., 2011; Schwartz & Simon, 2015; Swinbourne et al., 2018). Cependant, aucune de ces études n'a réalisé de mesure objective de la fonction musculaire (comme la force de contraction maximale) et des études supplémentaires sont nécessaires pour permettre d'identifier en détail les effets de l'extension de sommeil sur la fonction musculaire.

## Conclusion

Cette étude a, dans un premier temps, démontré l'efficacité de l'allongement de la photopériode pour augmenter le temps de sommeil des animaux blessés. Cette extension de sommeil induit par le changement de photopériode est cumulative de la réponse adaptative du sommeil à la blessure démontrée dans l'étude n°1 (Vanneau et al., 2023). Nous observons également une augmentation de la stabilité et de la puissance relative des ondes lentes pendant le sommeil lent au cours de cette période supplémentaire de lumière pour les animaux blessés 16:8.

Ensuite, nous avons démontré que l'augmentation de la sensibilité mécanique à la douleur induite par la blessure musculaire est significativement moins importante pour les animaux exposés à la photopériode 16:8 par rapport aux animaux 12:12. De plus, la récupération à des niveaux basaux de sensibilité à la douleur est plus rapide pour les animaux blessés 16:8. Cependant, aucun effet significatif de la photopériode 16:8 n'a été observé sur les paramètres biologiques et histologiques de la réparation musculaire que nous avons analysé, que ce soit à J+2 ou J+14 post-blessure.

En revanche, à J+14, les animaux non blessés exposés à la photopériode 16:8 présentent une aire de section transversale des fibres musculaires des muscles *Tibialis Anterior* et *Gastrocnemius* plus élevée que les animaux non blessés exposés à la photopériode 12:12. Ces résultats originaux demandent à être confirmés, mais offrent des perspectives intéressantes sur le rôle potentiel de l'extension de sommeil dans le maintien et le développement musculaire.



# DISCUSSION GÉNÉRALE & PERSPECTIVES

---

De récents travaux suggèrent que l'hygiène du sommeil et en particulier la gestion du temps de sommeil pourrait être un élément important à prendre en compte pour optimiser le processus de récupération d'une blessure musculaire (pour revue : Chennaoui et al., 2021). Or les blessures musculosquelettiques sont fréquentes aussi bien chez le sportif que chez le militaire (Knapik et al., 2001; López-Valenciano et al., 2020; Lovalekar et al., 2021). Une étude de santé publique de 2011 sur des militaires français (8157 déclarations sur un semestre) a montré que la fréquence des lésions musculosquelettiques était de 75 %, que l'atteinte du membre inférieur était la plus fréquente (63 %), que la course à pied était le sport le plus traumatique (21,5 %), et qu'un militaire de l'armée de terre avait 2,1 fois plus de risques de se blesser qu'un marin (Ressort et al., 2013). Cependant, s'il est communément admis aujourd'hui qu'un sommeil de qualité est nécessaire pour la récupération d'une blessure musculaire, les effets d'une blessure musculaire sur le sommeil restent peu connus.

Ainsi, le premier objectif de cette thèse était de caractériser les paramètres du sommeil en réponse à l'induction d'une blessure musculaire par injection de cardiotoxine au niveau du muscle *Tibialis Anterior* du rat. Cette étude a montré une augmentation du temps total de sommeil (TTS), spécifique au sommeil lent, après 48 et 72 heures d'induction de la blessure, et une plus grande stabilité du sommeil durant les 24 premières heures post-blessure (Vanneau et al., 2023). Cette augmentation se produit spécifiquement durant la période d'obscurité, sans modification de l'activité des ondes lentes (AOL) qui traduit la pression de sommeil, et sans augmentation significative de la densité des *spindles* qui puisse être liée à l'augmentation du TTS. À ce jour, ce sont les premiers résultats qui décrivent la réponse adaptative du sommeil à une blessure musculaire chez les mammifères. Notre étude ne permet pas de savoir si cette augmentation du temps de sommeil est bénéfique pour la réparation de la blessure au niveau tissulaire. Pour cela, des analyses de la réparation musculaire en empêchant la mise en place de cette réponse adaptative du sommeil sont nécessaires.

Une question majeure est de savoir si cette réponse adaptative du sommeil est spécifique du modèle de blessure musculaire utilisé. Dans le cas des blessures musculaires induites, de futures études utilisant par exemple un modèle de lésions excentriques d'exercice induites par un ergomètre sont nécessaires (Hubal, 2009). D'autres études sur les modifications du sommeil en réponse à d'autres types de blessures induites sur modèle animal comme des blessures osseuses ou ligamentaires sont également nécessaires (Carpenter & Hankenson, 2004; Durand et al., 2020; Mills & Simpson, 2012).

La transposition de nos résultats obtenus sur un modèle animal à des études chez l'Homme reste difficile compte tenu, dans le cas d'une blessure chez l'Homme, de l'utilisation de traitements pharmacologiques (antalgiques, anti-inflammatoires ; Hotfiel et al., 2018) qui peuvent interagir avec la réponse naturelle du sommeil à la blessure.

À la suite de ces résultats, nous avons évalué s'il était possible de potentialiser cette réponse adaptative du sommeil à la blessure musculaire en allongeant la photopériode. Une étude précédente du laboratoire a montré que l'allongement de la photopériode en passant de 12 à 16 heures de lumière par jour (i.e., 4 heures de lumière supplémentaires, de 20:00 à 00:00) permet d'induire de l'extension de sommeil chez le rat (Sauvet et al., 2018). Cette extension de sommeil induite est reflétée par une augmentation du temps de sommeil pendant les 4 heures d'allongement de la lumière, de 20:00 à 00:00. Nos résultats ont tout d'abord confirmé et étendu les observations de 2018 en montrant un TTS et un temps de sommeil lent significativement plus élevés pendant la période d'allongement de la lumière (entre 20:00 et 00:00) pour les animaux non blessés 16:8 par rapport aux animaux non blessés 12:12, et ceci dès le premier jour de modification de la photopériode (J0) jusqu'à la fin de la période d'analyse (J+7). Ce résultat a permis de vérifier la faisabilité expérimentale de l'extension de sommeil sur des animaux non blessés dans nos conditions expérimentales.

Ensuite nous avons évalué les effets de cet allongement de la photopériode sur des animaux blessés par injection de cardiotoxine au niveau du muscle *Tibialis Anterior*. Nos résultats montrent que, entre 20:00 et 00:00, le TTS des animaux blessés 16:8 n'est pas différent du TTS des animaux contrôles 16:8. De plus, pendant cette période, le TTS des animaux blessés 16:8 est significativement supérieur à celui des blessés 12:12, de J0 à J+7 post-blessure. Ces deux résultats démontrent l'efficacité de l'allongement de la photopériode pour augmenter le temps de sommeil des animaux blessés. Pendant cette période d'allongement de la lumière,

le temps total de sommeil lent des animaux blessés 16:8 est de surcroît plus élevé que celui des contrôles 16:8 pendant les deux premiers jours post-blessure (à J0 et J+1). De plus, nous observons pendant la période commune d'obscurité, une augmentation similaire du TTS pour les animaux blessés 12:12 et pour les animaux blessés 16:8. Ces observations semblent traduire un effet cumulatif de la réponse adaptative du sommeil à la blessure et de l'extension de sommeil (induite par l'allongement de la période de lumière) illustrant le besoin de sommeil important qui caractérise les animaux après une blessure musculaire. En outre, pendant la période d'allongement de la lumière, le sommeil lent des animaux blessés 16:8 est plus stable et est associé à une puissance relative des ondes lentes plus élevée par rapport aux blessés 12:12.

En termes de potentiel bénéfique sur la récupération de la blessure musculaire, nos résultats montrent que l'allongement de la photopériode a permis de limiter l'augmentation de sensibilité à la douleur mécanique induite par la blessure et a également permis son retour plus rapide à des niveaux de base. Ceci sans pouvoir totalement écarter que l'allongement de la photopériode représente un ajout d'inactivité locomotrice, qui est illustré par la diminution de la distance parcourue pendant les 4 heures supplémentaires de lumière pour les animaux 16:8. En effet, il est connu que l'immobilisation d'un muscle quelques jours après une blessure est bénéfique pour la réparation musculaire, notamment en limitant la mise en place de tissu fibreux (Järvinen & Lehto, 1993; Järvinen et al., 2007, 2013). Cependant, cette diminution d'activité pendant les 4 heures supplémentaires de lumière reste modérée puisqu'elle n'induit pas de différence significative au niveau des moyennes journalières de la distance parcourue entre les animaux blessés 12:12 et 16:8. Néanmoins, cette période d'allongement de la lumière induit indubitablement un décalage au niveau des rythmes circadiens, visible par exemple au niveau de la température. Une solution pour dissocier les effets du sommeil de ceux des rythmes circadiens serait de décaler ou de fractionner les 4 heures de lumière supplémentaire et d'évaluer les effets sur le sommeil et sur la sensibilité mécanique à la douleur.

L'interaction entre la quantité et la qualité de sommeil et la douleur est bien décrite dans la littérature (Brennan & Lieberman, 2009; Faraut et al., 2015; Moldofsky, 2001). Cependant la majorité des études démontre la mise en place d'une interaction négative : le manque de sommeil augmente la sensibilité à la douleur (Haack & Mullington, 2005; Kundermann et al.,

2004; Simpson et al., 2018), et l'augmentation de la douleur est associée à des perturbations du sommeil (Foley et al., 2007; Power et al., 2005). Nos résultats originaux soulignent cette interaction en démontrant qu'elle peut également être positive, et qu'une augmentation du temps de sommeil peut permettre de réduire la sensibilité à la douleur mécanique dans le cadre d'une blessure musculaire chez l'animal. Les dosages effectués au niveau de l'hippocampe prélevé 14 jours après la modification de la photopériode ont mis en évidence une diminution des concentrations de cytokines inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-2 et CXCL1) pour les animaux blessés 16:8 par rapport aux animaux blessés 12:12. Or, l'hippocampe est une structure cérébrale impliquée dans la perception de la douleur aiguë et chronique (Espinoza & Habas, 2018; Leknes & Tracey, 2008; Liu & Chen, 2009; Wang et al., 2016), et des études ont montré une corrélation entre l'augmentation des facteurs inflammatoires dans l'hippocampe et le développement de douleurs chroniques (Mokhtari et al., 2019; Vasic & Schmidt, 2017). Ainsi, nous pouvons faire l'hypothèse que ces effets anti-inflammatoires de l'extension au niveau de l'hippocampe seraient impliqués dans les effets bénéfiques que nous observons sur la sensibilité à la douleur.

Par ailleurs, la douleur associée à la blessure musculaire représente un frein important pour la remobilisation précoce du muscle, qui est une étape importante pour la récupération fonctionnelle. En plus de l'établissement d'un cercle vertueux entre douleur et sommeil, l'extension de sommeil pourrait ainsi faciliter la remobilisation précoce du muscle et favoriser la récupération fonctionnelle de la blessure. Cette évaluation des effets de l'extension de sommeil sur la récupération fonctionnelle du muscle est un des objectifs que nous avons en perspective en cohérence avec nos résultats. Avec par exemple, la mesure de différents paramètres fonctionnels (force maximale de contraction, fatigabilité, élasticité du muscle, etc.) à l'aide d'un ergomètre et d'outils d'imagerie lors de la récupération d'une blessure sur des animaux blessés exposés à la photopériode modifiée.

Toujours en termes de potentiel bénéfique de l'allongement de la photopériode, nous avons analysé des paramètres biologiques et histologiques de la réparation musculaire précoce (à J+2, soit 2 jours après l'induction de la blessure et l'allongement de la photopériode) et plus tardive (à J+14, soit 14 jours après l'induction de la blessure et l'allongement de la photopériode). Pour les paramètres biologiques, nous avons choisi de quantifier les concentrations de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- $\alpha$  et CXCL1 et de facteurs de

croissance tels qu'IGF-1 et TGF $\beta$ . Pour les paramètres histologiques du muscle *Tibialis Anterior* nous avons choisi de mesurer la taille des fibres musculaires, le nombre de noyaux centraux et le nombre de capillaires par fibres. Nos résultats n'ont montré aucun effet significatif de l'allongement de la photopériode sur les paramètres biologiques et histologiques du muscle blessé, que ce soit à J+2 ou à J+14 post-blessure. À J+2, nos résultats illustrent la période de transition des différentes phases de la régénération musculaire en réponse à une blessure, avec à la fois la sécrétion importante des facteurs pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , CXCL1) et des facteurs anti-inflammatoire/facteurs de croissance (IL-10 ; TGF- $\beta$  ; IGF-1). À J+14 nous observons une tendance à une surface de section des fibres musculaires du TA lésé plus élevée pour les animaux blessés 16:8 par rapport aux animaux 12:12. Une des limites qui pourrait expliquer l'absence d'effet significatif des 14 jours d'allongement de la photopériode sur les paramètres histologiques et biologiques pourrait être le nombre d'animaux par groupe (n=8) qui est peut-être trop faible. Il est également possible que le modèle de blessure musculaire par injection de cardiotoxine ne permette pas d'observer des effets de l'allongement de la photopériode.

Dans le travail de recherche que nous avons conduit, il est important de noter que l'ensemble des explorations sur les paramètres de la récupération musculaire post-blessure, dont la sensibilité à la douleur mécanique, ont été menées sur des animaux non implantés en télémétrie, donc qui n'ont pas subi de chirurgie, afin de ne pas perturber notre étude des mécanismes inflammatoires. Cependant, et afin de pouvoir évaluer le temps de sommeil de ces animaux non implantés, nous avons validé en parallèle une méthode non invasive d'analyse du sommeil chez le rat utilisant le système piézoélectrique (Vanneau et al., 2021), qui correspond à l'étude n°2 de ce travail de thèse. En comparant les résultats avec ceux obtenus avec la lecture visuelle de l'EEG/EMG, nous avons pu démontrer la validité de ce système piézoélectrique pour différencier l'éveil et le sommeil, mais également pour discriminer les stades de sommeil à partir du signal respiratoire enregistré par le système piézoélectrique. Malheureusement, nous n'avons pas anticipé que des défauts techniques du système piézoélectrique induiraient une dérive importante des signaux qui l'a rendu inutilisable pour évaluer le temps de sommeil des animaux non implantés dans notre étude n°3.

Enfin, un objectif secondaire était d'analyser les effets de 14 jours d'allongement de la photopériode sur des muscles provenant d'animaux non blessés, le muscle *Tibialis Anterior* et le *Gastrocnemius*. Cela en continuité d'une observation précédente du laboratoire montrant une augmentation de la concentration d'IGF-1 dans le plasma et dans le muscle *Gastrocnemius* après 14 jours d'exposition à la photopériode 16:8 chez un animal non blessé (Chennaoui et al., 2017). Nos résultats montrent que la CSA moyenne pour l'ensemble des fibres musculaires du muscle *Tibialis Anterior* et du *Gastrocnemius* est plus élevée pour les animaux 16:8 comparés aux 12:12, sans que cet effet se décline sur un type particulier de fibres rapides ou lentes pour le *Tibialis Anterior*, seul muscle pour lequel nous avons réalisé un marquage des différents types de chaînes lourdes de myosine. Cependant, nous n'observons aucun effet significatif lié à la photopériode dans les contenus musculaires ou au niveau systémique de facteurs trophiques (IGF-1, TGF $\beta$  et testostérone) qui pourraient expliquer l'augmentation de la CSA. Deux limites importantes de ces analyses sont le faible nombre d'animaux pour chaque groupe (n=8) et le fait de ne pas avoir les valeurs de CSA avant et après l'exposition à la photopériode 16:8. Ces résultats demandent à être confirmés par des études supplémentaires, cependant ils permettent d'envisager de nouvelles pistes pour l'utilisation de l'extension de sommeil. À la lumière de ces résultats, il est légitime de se demander si l'extension de sommeil réalisée préalablement à la blessure peut avoir des effets sur la récupération de la blessure. En d'autres termes, est-ce que l'utilisation prophylactique de l'extension de sommeil présente un intérêt particulier pour la récupération d'une blessure musculaire.

**« Bien plus que le temps, c'est le sommeil qui est l'antidote du chagrin. L'insomnie, en revanche, qui grossit la moindre contrariété et la convertit en coup du sort, veille sur nos blessures et les empêche de déperir ».**

Emile Cioran (1911 – 1995)



# BIBLIOGRAPHIE

---

- Abdelmalek, S., Chtourou, H., Aloui, A., Aouichaoui, C., Souissi, N., & Tabka, Z. (2013). Effect of time of day and partial sleep deprivation on plasma concentrations of IL-6 during a short-term maximal performance. *European Journal of Applied Physiology*, *113*(1), 241–248. <https://doi.org/10.1007/s00421-012-2432-7>
- Adler, D. A., Ammanuel, S., Lei, J., Dada, T., Borbiev, T., Johnston, M. V., Kadam, S. D., & Burd, I. (2014). Circadian cycle-dependent EEG biomarkers of pathogenicity in adult mice following prenatal exposure to in utero inflammation. *Neuroscience*, *275*, 305–313. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.06.022>
- Aho, V., Ollila, H. M., Rantanen, V., Kronholm, E., Surakka, I., van Leeuwen, W. M. A., Lehto, M., Matikainen, S., Ripatti, S., Härmä, M., Sallinen, M., Salomaa, V., Jauhiainen, M., Alenius, H., Paunio, T., & Porkka-Heiskanen, T. (2013). Partial Sleep Restriction Activates Immune Response-Related Gene Expression Pathways: Experimental and Epidemiological Studies in Humans. *PLoS ONE*, *8*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077184>
- Akimau, P., Yoshiya, K., Hosotsubo, H., Takakuwa, T., Tanaka, H., & Sugimoto, H. (2005). New experimental model of crush injury of the hindlimbs in rats. *Journal of Trauma - Injury, Infection and Critical Care*, *58*(1), 51–58. <https://doi.org/10.1097/01.TA.0000154066.11748.38>
- Alhola, P., & Polo-Kantola, P. (2007). Sleep deprivation: Impact on cognitive performance. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, *3*(5), 553–567.
- Allison, T., & Cicchetti, D. V. (1976). Sleep in Mammals: Ecological and Constitutional Correlates. *Science*, *194*(4266), 732–734.
- Altini, M., & Kinnunen, H. (2021). The promise of sleep: A multi-sensor approach for accurate sleep stage detection using the oura ring. *Sensors*, *21*(13), 1–21. <https://doi.org/10.3390/s21134302>
- Andersen, J. L., & Aagaard, P. (2010). Effects of strength training on muscle fiber types and size; consequences for athletes training for high-intensity sport. *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports*, *20*(SUPPL. 2), 32–38. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0838.2010.01196.x>
- Andersen, M. L., & Tufik, S. (2003). Sleep patterns over 21-day period in rats with chronic constriction of sciatic nerve. *Brain Research*, *984*(1–2), 84–92. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(03\)03095-6](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(03)03095-6)
- Anderson, M. P., Mochizuki, T., Xie, J., Fischler, W., Manger, J. P., Talley, E. M., Scammell, T. E., & Tonegawa, S. (2005). Thalamic Cav3.1 T-type Ca<sup>2+</sup> channel plays a crucial role in stabilizing sleep. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(5), 1743–1748. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409644102>
- Andrews, J. L., Zhang, X., McCarthy, J. J., McDearmon, E. L., Hornberger, T. A., Russell, B., Campbell, K. S., Arbogast, S., Reid, M. B., Walker, J. R., Hogenesch, J. B., Takahashi, J. S., & Esser, K. A. (2010). CLOCK and BMAL1 regulate MyoD and are necessary for maintenance of skeletal muscle phenotype and function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(44), 19090–19095. <https://doi.org/10.1073/pnas.1014523107>
- Antony, J. W., Schönauer, M., Staresina, B. P., & Cairney, S. A. (2019). Sleep Spindles and Memory Reprocessing. *Trends in Neurosciences*, *42*(1), 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2018.09.012>

- Arnal, P. J., Sauvet, F., Leger, D., van Beers, P., Bayon, V., Bougard, C., Rabat, A., Millet, G. Y., & Chennaoui, M. (2015). Benefits of Sleep Extension on Sustained Attention and Sleep Pressure Before and During Total Sleep Deprivation and Recovery. *Sleep, 38*(12), 1935–1943. <https://doi.org/10.5665/sleep.5244>
- Arnold, L., Henry, A., Poron, F., Baba-Amer, Y., Van Rooijen, N., Plonquet, A., Gherardi, R. K., & Chazaud, B. (2007a). Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *Journal of Experimental Medicine, 204*(5), 1057–1069. <https://doi.org/10.1084/jem.20070075>
- Arnold, L., Henry, A., Poron, F., Baba-Amer, Y., Van Rooijen, N., Plonquet, A., Gherardi, R. K., & Chazaud, B. (2007b). Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *Journal of Experimental Medicine, 204*(5), 1057–1069. <https://doi.org/10.1084/jem.20070075>
- Ascenzi, F., Barberi, L., Dobrowolny, G., Villa Nova Bacurau, A., Nicoletti, C., Rizzuto, E., Rosenthal, N., Scicchitano, B. M., & Musarò, A. (2019). Effects of IGF-1 isoforms on muscle growth and sarcopenia. *Aging Cell, 18*(3), 1–11. <https://doi.org/10.1111/accel.12954>
- Aserinsky, E., & Kleitman, N. (1953). Regularly Occuring Periods of Eye Motility, and Concomitant Phenomena during Sleep. *Science, 118*(3062), 273–274.
- Astori, S., Wimmer, R. D., & Lüthi, A. (2013). Manipulating sleep spindles - expanding views on sleep, memory, and disease. *Trends in Neurosciences, 36*(12), 738–748. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.10.001>
- Baoge, L., Van Den Steen, E., Rimbaut, S., Philips, N., Witvrouw, E., Almqvist, K. F., Vanderstraeten, G., & Vanden Bossche, L. C. (2012). Treatment of Skeletal Muscle Injury: A Review. *ISRN Orthopedics, 2012*, 1–7. <https://doi.org/10.5402/2012/689012>
- Barbato, G., & Wehr, T. A. (1998). Homeostatic Regulation of REM Sleep in Humans during Extended Sleep. *Sleep, 21*(3), 267–276. <https://doi.org/10.1093/sleep/21.3.267>
- Barnig, C., Lutzweiler, G., Giannini, M., Lejay, A., Charles, A. L., Meyer, A., & Geny, B. (2022). Resolution of Inflammation after Skeletal Muscle Ischemia–Reperfusion Injury: A Focus on the Lipid Mediators Lipoxins, Resolvins, Protectins and Maresins. *Antioxidants, 11*(6). <https://doi.org/10.3390/antiox11061213>
- Barthó, P., Slézia, A., Mátyás, F., Faradz-Zade, L., Ulbert, I., Harris, K. D., & Acsády, L. (2014). Ongoing network state controls the length of sleep spindles via inhibitory activity. *Neuron, 82*(6), 1367–1379. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.04.046>
- Bear, M. F., Connors, B. W., & Paradiso, M. A. (2016). *Neuroscience: Exploring the Brain*. Wolters Kluwer. <https://books.google.fr/books?id=vVz4oAEACAAJ>
- Ben Simon, E., & Walker, M. P. (2018). Sleep loss causes social withdrawal and loneliness. *Nature Communications, 9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05377-0>
- Benedict, C., Cedernaes, J., Giedraitis, V., Nilsson, E. K., Hogenkamp, P. S., Vagesjö, E., Massena, S., Pettersson, U., Christofferson, G., Phillipson, M., Broman, J. E., Lannfelt, L., Zetterberg, H., & Schiöth, H. B. (2014). Acute sleep deprivation increases serum levels of neuron-specific enolase (NSE) and S100 calcium binding protein B (S-100B) in healthy young men. *Sleep, 37*(1), 195–198. <https://doi.org/10.5665/sleep.3336>
- Benington, J. H., & Craig Heller, H. (1995). Restoration of brain energy metabolism as the function of sleep. *Progress in Neurobiology, 45*(4), 347–360. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(94\)00057-O](https://doi.org/10.1016/0301-0082(94)00057-O)

- Berger, H. (1929). Über das Elektrenkephalogramm des Menschen. *Archiv Für Psychiatrie Und Nervenkrankheiten*, 94(1), 16–60. <https://doi.org/10.1007/BF01835097>
- Bertani, S., Carboni, L., Criado, A., Michielin, F., Mangiarini, L., & Vicentini, E. (2010). Circadian profile of peripheral hormone levels in Sprague-Dawley rats and in common marmosets (*Callithrix jacchus*). *In Vivo*, 24(6), 827–836.
- Besedovsky, L., Lange, T., & Born, J. (2012). Sleep and immune function. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 463(1), 121–137. <https://doi.org/10.1007/s00424-011-1044-0>
- Besedovsky, L., Lange, T., & Haack, M. (2019). The sleep-immune crosstalk in health and disease. *Physiological Reviews*, 99(3), 1325–1380. <https://doi.org/10.1152/physrev.00010.2018>
- Bigard, A. X., Serrurier, B., Merino, D., Lienhard, F., Berthelot, M., & Guezennec, C. Y. (1997). Myosin heavy chain composition of regenerated soleus muscles during hindlimb suspension. *Acta Physiologica Scandinavica*, 161(1), 23–30. <https://doi.org/10.1046/j.1365-201X.1997.00193.x>
- Blethyn, K. L., Hughes, S. W., Tóth, T. I., Cope, D. W., & Crunelli, V. (2006). Neuronal basis of the slow (<1 Hz) oscillation in neurons of the nucleus reticularis thalami in vitro. *Journal of Neuroscience*, 26(9), 2474–2486. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3607-05.2006>
- Bonjean, M., Baker, T., Lemieux, M., Timofeev, I., Sejnowski, T., & Bazhenov, M. (2011). Corticothalamic feedback controls sleep spindle duration in vivo. *Journal of Neuroscience*, 31(25), 9124–9134. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0077-11.2011>
- Borbély, A. A. (1982). A Two Process Model of Sleep Regulation. *Human Neurobiology*, 1, 195–204.
- Borbély, A. A., Baumann, F., Brandeis, D., Strauch, I., & Lehmann, D. (1981). Sleep deprivation: effect on sleep stages and EEG power density in man. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 51(6), 483–493. [https://doi.org/10.1016/0013-4694\(92\)90069-T](https://doi.org/10.1016/0013-4694(92)90069-T)
- Borbély, A. A., Daan, S., Wirz-Justice, A., & Deboer, T. (2016). The two-process model of sleep regulation: A reappraisal. *Journal of Sleep Research*, 25(2), 131–143. <https://doi.org/10.1111/jsr.12371>
- Borbély, A. A., & Neuhaus, H. U. (1978). Daily pattern of sleep, motor activity and feeding in the rat: Effects of regular and gradually extended photoperiods. *Journal of Comparative Physiology* □ A, 124(1), 1–14. <https://doi.org/10.1007/BF00656386>
- Borbély, A. A., Tobler, I., & Hanagasioglu, M. (1984). Effect of sleep deprivation on sleep and EEG power spectra in the rat. *Behavioural Brain Research*, 14(3), 171–182. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(84\)90186-4](https://doi.org/10.1016/0166-4328(84)90186-4)
- Born, J., & Wilhelm, I. (2012). System consolidation of memory during sleep. *Psychological Research*, 76(2), 192–203. <https://doi.org/10.1007/s00426-011-0335-6>
- Boudraa, A. O., & Salzenstein, F. (2018). Teager–Kaiser energy methods for signal and image analysis: A review. *Digital Signal Processing: A Review Journal*, 78, 338–375. <https://doi.org/10.1016/j.dsp.2018.03.010>
- Boudreau, P., Yeh, W.-H., Dumont, G. A., & Boivin, D. B. (2013). Circadian variation of heart rate variability across sleep stages. *Sleep*, 36(12), 1919–1928. <https://doi.org/10.1093/cvr/24.3.210>
- Brandt, R., Bevilacqua, G. G., & Andrade, A. (2017). Perceived Sleep Quality, Mood States, and Their Relationship with Performance among Brazilian Elite Athletes during a Competitive Period. *Journal of Strength and Conditioning Research*, 31(4), 1033–1039. <https://doi.org/10.1519/JSC.0000000000001551>

- Brennan, M. J., & Lieberman, J. A. (2009). Sleep disturbances in patients with chronic pain: Effectively managing opioid analgesia to improve outcomes. *Current Medical Research and Opinion*, 25(5), 1045–1055. <https://doi.org/10.1185/03007990902797790>
- Broussard, J. L., Ehrmann, D. A., Van Cauter, E., Tasali, E., & Brady, M. J. (2012). Impaired insulin signaling in human adipocytes after experimental sleep restriction: A randomized, crossover study. *Annals of Internal Medicine*, 157(8), 549–557. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-157-8-201210160-00005>
- Brunner, D. P., Dijk, D. J., & Borbely, A. A. (1993). Repeated partial sleep deprivation progressively changes the EEG during sleep and wakefulness. *Sleep*, 16(2), 100–113. <https://doi.org/10.1093/sleep/16.2.100>
- Buday, P. V., Carr, C. J., & Miya, T. S. (1961). A PHARMACOLOGIC STUDY OF SOME NUCLEOSIDES AND NUCLEOTIDES. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 13(1), 290–299. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1961.tb11826.x>
- Campbell, I. G. (2009). EEG recording and analysis for sleep research. *Current Protocols in Neuroscience*, SUPPL.49, 1–19. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns1002s49>
- Cappuccio, F. P., D'Elia, L., Strazzullo, P., & Miller, M. A. (2010). Quantity and quality of sleep and incidence of type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care*, 33(2), 414–420. <https://doi.org/10.2337/dc09-1124>
- Caravan, B., Hu, L., Veyg, D., Kulkarni, P., Zhang, Q., Chen, Z. S., & Wang, J. (2020). Sleep spindles as a diagnostic and therapeutic target for chronic pain. *Molecular Pain*, 16, 1–9. <https://doi.org/10.1177/1744806920902350>
- Cardis, R., Lecci, S., Fernandez, L. M. J., Osorio-Forero, A., Chung, P. C. S., Fulda, S., Decosterd, I., & Lüthi, A. (2021). Cortico-autonomic local arousals and heightened somatosensory arousability during nrems of mice in neuropathic pain. *eLife*, 10, 1–27. <https://doi.org/10.7554/eLife.65835>
- Carpenter, J. E., & Hankenson, K. D. (2004). Animal models of tendon and ligament injuries for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 25(9), 1715–1722. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00507-6](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00507-6)
- Cash, S. S., Halgren, E., Dehghani, N., Rossetti, A. O., Thesen, T., Wang, C. M., Devinsky, O., Kuzniecky, R., Doyle, W., Madsen, J. R., Bromfield, E., Eross, L., Halász, P., Karmos, G., Csercsa, R., Wittner, L., & Ulbert, I. (2009). The human K-complex represents an isolated cortical down-state. *Science*, 324(5930), 1084–1087. <https://doi.org/10.1126/science.1169626>
- Charles Czeisler. (2013). Casting light on sleep deficiency. *Nature*, 2013.
- Chatterjee, S., & Ma, K. (2016). Circadian clock regulation of skeletal muscle growth and repair [version 1; referees: 3 approved]. *F1000Research*, 5, 1–12. <https://doi.org/10.12688/F1000RESEARCH.9076.1>
- Chatterjee, S., Nam, D., Guo, B., Kim, J. M., Winnier, G. E., Lee, J., Berdeaux, R., Yechoor, V. K., & Ma, K. (2013). Brain and muscle Arnt-like 1 is a key regulator of myogenesis. *Journal of Cell Science*, 126(10), 2213–2224. <https://doi.org/10.1242/jcs.120519>
- Chatterjee, S., Yin, H., Nam, D., Li, Y., & Ma, K. (2015). Brain and muscle Arnt-like 1 promotes skeletal muscle regeneration through satellite cell expansion. *Experimental Cell Research*, 331(1), 200–210. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.08.041>
- Chattu, V. K., Chattu, S. K., Burman, D., Spence, D. W., & Pandi-Perumal, S. R. (2019). The interlinked rising epidemic of insufficient sleep and diabetes mellitus. *Healthcare (Switzerland)*, 7(1), 1–18.

<https://doi.org/10.3390/healthcare7010037>

- Chazaud, B. (2020). Inflammation and Skeletal Muscle Regeneration: Leave It to the Macrophages! *Trends in Immunology*, 41(6), 481–492. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.04.006>
- Chazaud, B., Brigitte, M., Yacoub-Youssef, H., Arnold, L., Gherardi, R., Sonnet, C., Lafuste, P., & Chretien, F. (2009). Dual and beneficial roles of macrophages during skeletal muscle regeneration. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 37(1), 18–22. <https://doi.org/10.1097/JES.0b013e318190ebdb>
- Chen, S., Billings, S. A., & Luo, W. (1988). Orthogonal Least Squares Methods and Their Application to Nonlinear System Identification. *White Rose*. <http://eprints.whiterose.ac.uk/78100/>
- Chen, Z., Lin, M., Chen, F., Lane, N. D., Cardone, G., Wang, R., Li, T., Chen, Y., Choudhury, T., & Campbell, A. T. (2013). Unobtrusive sleep monitoring using smartphones. *Proceedings of the 2013 7th International Conference on Pervasive Computing Technologies for Healthcare and Workshops, PervasiveHealth 2013*, 145–152. <https://doi.org/10.4108/icst.pervasivehealth.2013.252148>
- Chennaoui, M., Arnal, P. J., Dorey, R., Sauvet, F., Ciret, S., Gallopin, T., Leger, D., Drogou, C., & Gomez-Merino, D. (2017). Changes of cerebral and/or peripheral adenosine A1receptor and IGF-I concentrations under extended sleep duration in rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11), 1–10. <https://doi.org/10.3390/ijms18112439>
- Chennaoui, M., Arnal, P. J., Drogou, C., Sauvet, F., & Gomez-Merino, D. (2016). Sleep extension increases IGF-I concentrations before and during sleep deprivation in healthy young men. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism = Physiologie Appliquee, Nutrition et Metabolisme*, 41(9), 963–970. <https://doi.org/10.1139/apnm-2016-0110>
- Chennaoui, M., Drogou, C., Sauvet, F., Gomez-Merino, D., Scofield, D. E., & Nindl, B. C. (2014). Effect of acute sleep deprivation and recovery on Insulin-like Growth Factor-I responses and inflammatory gene expression in healthy men. *European Cytokine Network*, 25(3), 52–57. <https://doi.org/10.1684/ecn.2014.0356>
- Chennaoui, M., Gomez-Merino, D., Drogou, C., Geoffroy, H., Dispersyn, G., Langrume, C., Ciret, S., Gallopin, T., & Sauvet, F. (2015). Effects of exercise on brain and peripheral inflammatory biomarkers induced by total sleep deprivation in rats. *Journal of Inflammation (United Kingdom)*, 12(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12950-015-0102-3>
- Chennaoui, M., Léger, D., & Gomez-Merino, D. (2020). SLEEP AND THE GH/IGF-1 AXIS: Consequences and countermeasures of sleep loss/disorders. *Sleep Medicine Reviews*, 49, 101223. <https://doi.org/10.1016/j.smr.2019.101223>
- Chennaoui, M., Sauvet, F., Drogou, C., Van Beers, P., Langrume, C., Guillard, M., Gourby, B., Bourrilhon, C., Florence, G., & Gomez-Merino, D. (2011). Effect of one night of sleep loss on changes in tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) levels in healthy men. *Cytokine*, 56(2), 318–324. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2011.06.002>
- Chennaoui, M., Vanneau, T., Trignol, A., Arnal, P., Gomez-Merino, D., Baudot, C., Perez, J., Pochettino, S., Eirale, C., & Chalabi, H. (2021). How does sleep help recovery from exercise-induced muscle injuries? *Journal of Science and Medicine in Sport*, 24(10), 982–987. <https://doi.org/10.1016/j.jsams.2021.05.007>
- Cho, J. R., Joo, E. Y., Koo, D. L., & Hong, S. B. (2013). Let there be no light: The effect of bedside light on sleep quality and background electroencephalographic rhythms. *Sleep Medicine*, 14(12), 1422–1425. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2013.09.007>

- Christophe Hausswirth, Louis, J., Aubry, A., Bonnet, G., Duffield, R., & Meur, Y. Le. (2014). Evidence of Disturbed Sleep and Increased Illness in Overreached Endurance Athletes. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 46(5), 1036–1045.
- Clinton, J. M., Davis, C. J., Zielinski, M. R., Jewett, K. A., & Krueger, J. M. (2011). Biochemical regulation of sleep and sleep biomarkers. *Journal of Clinical Sleep Medicine*, 7(5).  
<https://doi.org/10.5664/JCSM.1360>
- Cohen, M. X. (2014). Fluctuations in oscillation frequency control spike timing and coordinate neural networks. *Journal of Neuroscience*, 34(27), 8988–8998.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0261-14.2014>
- Costamagna, D., Costelli, P., Sampaolesi, M., & Penna, F. (2015). Role of Inflammation in Muscle Homeostasis and Myogenesis. *Mediators of Inflammation*, 2015.  
<https://doi.org/10.1155/2015/805172>
- Creyghton, W. M., Van Dam, P. S., & Koppeschaar, H. P. F. (2004). The role of the somatotrophic system in cognition and other cerebral functions. *Seminars in Vascular Medicine*, 4(2), 167–172.  
<https://doi.org/10.1055/s-2004-835375>
- Csapo, R., Gumpenberger, M., & Wessner, B. (2020). Skeletal Muscle Extracellular Matrix – What Do We Know About Its Composition, Regulation, and Physiological Roles? A Narrative Review. *Frontiers in Physiology*, 11(March), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00253>
- Cueni, L., Canepari, M., Luján, R., Emmenegger, Y., Watanabe, M., Bond, C. T., Franken, P., Adelman, J. P., & Lüthi, A. (2008). T-type Ca<sup>2+</sup> channels, SK2 channels and SERCAs gate sleep-related oscillations in thalamic dendrites. *Nature Neuroscience*, 11(6), 683–692.  
<https://doi.org/10.1038/nn.2124>
- Curcio, G., Ferrara, M., Pellicciari, M. C., Cristiani, R., & De Gennaro, L. (2003). Effect of total sleep deprivation on the landmarks of stage 2 sleep. *Clinical Neurophysiology*, 114(12), 2279–2285.  
[https://doi.org/10.1016/S1388-2457\(03\)00276-1](https://doi.org/10.1016/S1388-2457(03)00276-1)
- Curtis, A. M., Fagundes, C. T., Yang, G., Palsson-McDermott, E. M., Wochal, P., McGettrick, A. F., Foley, N. H., Early, J. O., Chen, L., Zhang, H., Xue, C., Geiger, S. S., Hokamp, K., Reilly, M. P., Coogan, A. N., Vigorito, E., FitzGerald, G. A., & O’Neill, L. A. J. (2015). Circadian control of innate immunity in macrophages by miR-155 targeting Bmal1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(23), 7231–7236.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1501327112>
- Dang-Vu, T. T., McKinney, S. M., Buxton, O. M., Solet, J. M., & Ellenbogen, J. M. (2010). Spontaneous brain rhythms predict sleep stability in the face of noise. In *Current Biology* (Vol. 20, Issue 15, pp. 626–627). <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.06.032>
- Dattilo, M., Antunes, H. K. M., Medeiros, A., Mônico Neto, M., Souza, H. S., Tufik, S., & De Mello, M. T. (2011a). Sleep and muscle recovery: Endocrinological and molecular basis for a new and promising hypothesis. *Medical Hypotheses*, 77(2), 220–222.  
<https://doi.org/10.1016/j.mehy.2011.04.017>
- Dattilo, M., Antunes, H. K. M., Medeiros, A., Mônico Neto, M., Souza, H. S., Tufik, S., & De Mello, M. T. (2011b). Sleep and muscle recovery: Endocrinological and molecular basis for a new and promising hypothesis. *Medical Hypotheses*, 77(2), 220–222.  
<https://doi.org/10.1016/j.mehy.2011.04.017>
- Davies, K. A., Macfarlane, G. J., Nicholl, B. I., Dickens, C., Morriss, R., Ray, D., & McBeth, J. (2008). Restorative sleep predicts the resolution of chronic widespread pain: Results from the EPIFUND

- study. *Rheumatology*, 47(12), 1809–1813. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/ken389>
- De Gennaro, L., Ferrara, M., & Bertini, M. (2000). Topographical distribution of spindles: Variations between and within NREM sleep cycles. *Sleep Research Online*, 3(4), 155–160.
- Deboer, T. (2007). Technologies of sleep research. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(10), 1227–1235. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-6533-0>
- Decker, M. J., Tabassum, H., Lin, J. M. S., & Reeves, W. C. (2009). Electroencephalographic correlates of Chronic Fatigue Syndrome. *Behavioral and Brain Functions*, 5, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1744-9081-5-43>
- Dibner, C., Schibler, U., & Albrecht, U. (2009). The mammalian circadian timing system: Organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annual Review of Physiology*, 72, 517–549. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135821>
- Dijk, D. J., Hayes, B., & Czeisler, C. A. (1993). Dynamics of electroencephalographic sleep spindles and slow wave activity in men: effect of sleep deprivation. *Brain Research*, 626(1–2), 190–199. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)90579-C](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)90579-C)
- Dimitrov, S., Besedovsky, L., Born, J., & Lange, T. (2015). Differential acute effects of sleep on spontaneous and stimulated production of tumor necrosis factor in men. *Brain, Behavior, and Immunity*, 47, 201–210. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.11.017>
- Dimitrov, S., Lange, T., Nohroudi, K., & Born, J. (2007). Number and function of circulating human antigen presenting cells regulated by sleep. *Sleep*, 30(4), 401–411. <https://doi.org/10.1093/sleep/30.4.401>
- Donga, E., Van Dijk, M., Van Dijk, J. G., Biermasz, N. R., Lammers, G. J., Van Kralingen, K. W., Corssmit, E. P. M., & Romijn, J. A. (2010). A single night of partial sleep deprivation induces insulin resistance in multiple metabolic pathways in healthy subjects. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 95(6), 2963–2968. <https://doi.org/10.1210/jc.2009-2430>
- Donohue, K. D., Medonza, D. C., Crane, E. R., & O'Hara, B. F. (2008). Assessment of a non-invasive high-throughput classifier for behaviours associated with sleep and wake in mice. *BioMedical Engineering Online*, 7, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1475-925X-7-14>
- Dort, J., Fabre, P., Molina, T., & Dumont, N. A. (2019). Macrophages Are Key Regulators of Stem Cells during Skeletal Muscle Regeneration and Diseases. *Stem Cells International*, 2019(Dmd). <https://doi.org/10.1155/2019/4761427>
- Durand, M., Barbier, L., Mathieu, L., Poyot, T., Demoures, T., Souraud, J. B., Masquelet, A. C., & Collombet, J. M. (2020). Towards understanding therapeutic failures in masquelet surgery: First evidence that defective induced membrane properties are associated with clinical failures. *Journal of Clinical Medicine*, 9(2), 1–16. <https://doi.org/10.3390/jcm9020450>
- Dyar, K. A., Ciciliot, S., Wright, L. E., Biensø, R. S., Tagliazucchi, G. M., Patel, V. R., Forcato, M., Paz, M. I. P., Gudiksen, A., Solagna, F., Albiero, M., Moretti, I., Eckel-Mahan, K. L., Baldi, P., Sassone-Corsi, P., Rizzuto, R., Bicciato, S., Pilegaard, H., Blaauw, B., & Schiaffino, S. (2014). Muscle insulin sensitivity and glucose metabolism are controlled by the intrinsic muscle clock. *Molecular Metabolism*, 3(1), 29–41. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2013.10.005>
- Early, J. O., Menon, D., Wyse, C. A., Cervantes-Silva, M. P., Zaslona, Z., Carroll, R. G., Palsson-McDermott, E. M., Angiari, S., Ryan, D. G., Corcoran, S. E., Timmons, G., Geiger, S. S., Fitzpatrick, D. J., O'Connell, D., Xavier, R. J., Hokamp, K., O'Neill, L. A. J., & Curtis, A. M. (2018). Circadian clock protein BMAL1 regulates IL-1 $\beta$  in macrophages via NRF2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(36), E8460–E8468.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1800431115>

- Eban-rothschild, A., Appelbaum, L., & Lecea, L. De. (2018). Neuronal Mechanisms for Sleep / Wake Regulation and Modulatory Drive. *Nature Publishing Group*, 43(5), 937–952. <https://doi.org/10.1038/npp.2017.294>
- Edwards, B. J., & Waterhouse, J. (2009). Effects of one night of partial sleep deprivation upon diurnal rhythms of accuracy and consistency in throwing darts. *Chronobiology International*, 26(4), 756–768. <https://doi.org/10.1080/07420520902929037>
- Ehlen, J. C., Brager, A. J., Baggs, J., Pinckney, L., Gray, C. L., DeBruyne, J. P., Esser, K. A., Takahashi, J. S., & Paul, K. N. (2017). Bmal1 function in skeletal muscle regulates sleep. *ELife*, 6, 1–14. <https://doi.org/10.7554/elife.26557>
- Ekstrand, J., Hägglund, M., & Waldén, M. (2011). Epidemiology of muscle injuries in professional football (soccer). *American Journal of Sports Medicine*, 39(6), 1226–1232. <https://doi.org/10.1177/0363546510395879>
- Elgar, M. A., Pagel, M. D., & Harvey, P. H. (1988). Sleep in mammals. *Animal Behaviour*, 36(5), 1407–1419. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(88\)80211-2](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(88)80211-2)
- Erblang, M., Drogou, C., Merino, D. G., Metlaine, A., Boland, A., Deleuze, J. F., Thomas, C., Sauvet, F., & Chennaoui, M. (2019). The impact of genetic variations in ADORA2A in the association between caffeine consumption and sleep. *Genes*, 10(12), 1–17. <https://doi.org/10.3390/genes10121021>
- Espinoza, S., & Habas, C. (2018). Neuroimaging of Pain. *Contemporary Clinical Neuroscience*, 6, 323–337. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-78926-2\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-319-78926-2_14)
- Faraut, B., Léger, D., Medkour, T., Dubois, A., Bayon, V., Chennaoui, M., & Perrot, S. (2015). Napping reverses increased pain sensitivity due to sleep restriction. *PLoS ONE*, 10(2), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117425>
- Feldberg, W., & Sherwood, S. L. (1954). Injections of drugs into the lateral ventricle of the cat. *The Journal of Physiology*, 123(1), 148–167. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1954.sp005040>
- Ference Obal and James M. Krueger. (2003). Biochemical regulation of non-rapide-eye-movement sleep. *Frontiers in Bioscience*, 3, 520–550.
- Fernandez, L. M. J., & Lüthi, A. (2020). Sleep Spindles: Mechanisms and Functions. *Physiological Reviews*, 100(2), 805–868. <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2018>
- Fernandez, S., Fernandez, A. M., Lopez-Lopez, C., & Torres-Aleman, I. (2007). Emerging roles of insulin-like growth factor-I in the adult brain. *Growth Hormone and IGF Research*, 17(2), 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.ghir.2007.01.006>
- Ferrier, J., Marchand, F., & David Balayssac. (2016). Assessment of Mechanical Allodynia in Rats Using the Electronic Von Frey Test. *Bio-Protocol*, 6, 1–6. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.1933> [www.bio-protocol.org/e1933](http://www.bio-protocol.org/e1933)
- Finelli, L. A., Ackermann, P., & Borbély, A. A. (2001). Individual “fingerprints” in human sleep EEG topography. *Neuropsychopharmacology*, 25(5), S57–S62. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(01\)00320-7](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(01)00320-7)
- Fisher, S. P., Godinho, S. I. H., Potheary, C. A., Hankins, M. W., Foster, R. G., & Peirson, S. N. (1990). Rapid assessment of sleep/wake behaviour in mice Simon. *Theriogenology*, 33(3), 723–732. <https://doi.org/10.1177/0748730411431550>.Rapid

- Flores, A. E., Flores, J. E., Deshpande, H., Picazo, J. A., Xie, X., Franken, P., Heller, H. C., Grahn, D. A., & O'Hara, B. F. (2007). Pattern recognition of sleep in rodents using piezoelectric signals generated by gross body movements. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, *54*(2), 225–233. <https://doi.org/10.1109/TBME.2006.886938>
- Floyd, R. A., & Krueger, J. M. (1997). Diurnal variation of TNF $\alpha$  in the rat brain. *NeuroReport*, *8*(4), 915–918. <https://doi.org/10.1097/00001756-199703030-00020>
- Foley, D. J., Vitiello, M. V., Bliwise, D. L., Ancoli-Israel, S., Monjan, A. A., & Walsh, J. K. (2007). Frequent napping is associated with excessive daytime sleepiness, depression, pain, and nocturia in older adults: Findings from the national sleep foundation 2003 sleep in america poll. *American Journal of Geriatric Psychiatry*, *15*(4), 344–350. <https://doi.org/10.1097/01.JGP.0000249385.50101.67>
- Franken, P., Dijk, D. J., Tobler, I., & Borbely, A. A. (1991). Sleep deprivation in rats: Effects on EEG power spectra, vigilance states, and cortical temperature. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, *261*(1 30-1). <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1991.261.1.r198>
- Franken, P., Gip, P., Hagiwara, G., Ruby, N. F., & Heller, H. C. (2003). Changes in brain glycogen after sleep deprivation vary with genotype. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, *285*(2 54-2), 413–419. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00668.2002>
- Franken, P., Gip, P., Hagiwara, G., Ruby, N. F., & Heller, H. C. (2006). Glycogen content in the cerebral cortex increases with sleep loss in C57BL/6J mice. *Neuroscience Letters*, *402*(1–2), 176–179. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.03.072>
- Franken, P., Tobler, I., & Borbely, A. A. (1995). Varying photoperiod in the laboratory rat: Profound effect on 24-h sleep pattern but no effect on sleep homeostasis. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, *269*(3 38-3). <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1995.269.3.r691>
- Frontera, W. R., & Ochala, J. (2015). Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. *Behavior Genetics*, *45*(2), 183–195. <https://doi.org/10.1007/s00223-014-9915-y>
- Fuku, N., Kumagai, H., & Ahmetov, I. I. (2019). Genetics of muscle fiber composition. In *Sports, Exercise, and Nutritional Genomics: Current Status and Future Directions*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816193-7.00014-2>
- Fullagar, H. H. K., Skorski, S., Duffield, R., Hammes, D., Coutts, A. J., & Meyer, T. (2015). Sleep and Athletic Performance: The Effects of Sleep Loss on Exercise Performance, and Physiological and Cognitive Responses to Exercise. *Sports Medicine*, *45*(2), 161–186. <https://doi.org/10.1007/s40279-014-0260-0>
- G. Weiss. (2004). Mining with rarity: A unifying framework. *SIGKDD Explorations*, *6*(1), 7–19. <http://storm.cis.fordham.edu/gweiss/papers/sigkdd04.pdf>
- Gall, A. J., Todd, W. D., Ray, B., Coleman, C. M., & Blumberg, M. S. (2008). The development of day-night differences in sleep and wakefulness in Norway rats and the effect of bilateral enucleation. *Journal of Biological Rhythms*, *23*(3), 232–241. <https://doi.org/10.1177/0748730408316954>
- Gaus, S. E., Strecker, R. E., Tate, B. A., Parker, R. A., & Saper, C. B. (2002). Ventrolateral preoptic nucleus contains sleep-active, galaninergic neurons in multiple mammalian species. *Neuroscience*, *115*(1), 285–294. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(02\)00308-1](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00308-1)

- Gauthier, E. A., Guzick, S. E., Brummett, C. M., Baghdoyan, H. A., & Lydic, R. (2011). Buprenorphine disrupts sleep and decreases adenosine concentrations in sleep-regulating brain regions of sprague dawley rat. *Anesthesiology*, *115*(4), 743–753.  
<https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e31822e9f85>
- Gekakis, N., Staknis, D., Nguyen, H. B., Davis, F. C., Wilsbacher, L. D., King, D. P., Takahashi, J. S., & Weitz, C. J. (1998). Role of the CLOCK Protein in the Mammalian Circadian Mechanism. *Science*, *280*(June).
- Giannakis, N., Sansbury, B. E., Patsalos, A., Hays, T. T., Riley, C. O., Han, X., Spite, M., & Nagy, L. (2019). Dynamic changes to lipid mediators support transitions among macrophage subtypes during muscle regeneration. *Nature Immunology*, *20*(5), 626–636.  
<https://doi.org/10.1038/s41590-019-0356-7>
- Giustina, A., & Veldhuis, J. D. (1998). Pathophysiology of the Neuroregulation of Growth Hormone Secretion in Experimental Animals and the Human. *Endocrine Reviews*, *19*(6), 717–797.  
<https://doi.org/10.1210/er.19.6.717>
- Glynnis A. Garry , Marie Lue Antony, and D. J. G. (2016). Cardiotoxin Induced Injury and Skeletal Muscle Regeneration. *Methods in Molecular Biology*, *1460*(1), 191–208.  
<https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3810-0>
- Gorlova, S., Ichiba, T., Nishimaru, H., Takamura, Y., Matsumoto, J., Hori, E., Nagashima, Y., Tatsuse, T., Ono, T., & Nishijo, H. (2019). Non-restorative sleep caused by autonomic and electroencephalography parameter dysfunction leads to subjective fatigue at wake time in shift workers. *Frontiers in Neurology*, *10*(FEB), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00066>
- Gotti, C., Sensini, A., Zucchelli, A., Carloni, R., & Focarete, M. L. (2020). Hierarchical fibrous structures for muscle-inspired soft-actuators: A review. *Applied Materials Today*, *20*, 100772.  
<https://doi.org/10.1016/j.apmt.2020.100772>
- Gouttebauge, V., Aoki, H., Ekstrand, J., Verhagen, E. A. L. M., & Kerkhoffs, G. M. M. J. (2016). Are severe musculoskeletal injuries associated with symptoms of common mental disorders among male European professional footballers? *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, *24*(12), 3934–3942. <https://doi.org/10.1007/s00167-015-3729-y>
- Grandou, C., Wallace, L., Fullagar, H. H. K., Duffield, R., & Burley, S. (2019). The Effects of Sleep Loss on Military Physical Performance. *Sports Medicine*, *49*(8), 1159–1172.  
<https://doi.org/10.1007/s40279-019-01123-8>
- Grier, T., Dinkeloo, E., Reynolds, M., & Jones, B. H. (2020). Sleep duration and musculoskeletal injury incidence in physically active men and women: A study of U.S. Army Special Operation Forces soldiers. *Sleep Health*, *6*(3), 344–349. <https://doi.org/10.1016/j.sleh.2020.01.004>
- Guardiola, O., Andolfi, G., Tirone, M., Iavarone, F., Brunelli, S., & Minchiotti, G. (2017). Induction of Acute Skeletal Muscle Regeneration by Cardiotoxin Injection. *Journal of Visualized Experiments*, *119*, 1–6. <https://doi.org/10.3791/54515>
- Guardiola, O., Lafuste, P., Brunelli, S., Iaconis, S., Touvier, T., Mourikis, P., De Bock, K., Lonardo, E., Andolfi, G., Bouché, A., Liguori, G. L., Shen, M. M., Tajbakhsh, S., Cossu, G., Carmeliet, P., & Minchiotti, G. (2012). Cripto regulates skeletal muscle regeneration and modulates satellite cell determination by antagonizing myostatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(47). <https://doi.org/10.1073/pnas.1204017109>
- Gupta, L., Morgan, K., & Gilchrist, S. (2017). Does Elite Sport Degrade Sleep Quality? A Systematic Review. *Sports Medicine*, *47*(7), 1317–1333. <https://doi.org/10.1007/s40279-016-0650-6>

- H. Stoppiglia, Dreyfus, G., Dubois, R., & Ouassar., Y. (2003). Raking a Random Feature For Variable And Feature Selection. *Journal of Machine Learning Research*, *1*, 1399–1414. <https://doi.org/10.1162/153244303322753733>
- H.E, H. (1957). The double array of filaments in cross-striated muscle. *The Journal of Cell Biology*, *3*(5), 631.
- Haack, M., & Mullington, J. M. (2005). Sustained sleep restriction reduces emotional and physical well-being. *Pain*, *119*(1–3), 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2005.09.011>
- Haack, M., Sanchez, E., & Mullington, J. M. (2007). Elevated inflammatory markers in response to prolonged sleep restriction are associated with increased pain experience in healthy volunteers. *Sleep*, *30*(9), 1145–1152. <https://doi.org/10.1093/sleep/30.9.1145>
- Hablitz, L. M., Vinitzky, H. S., Sun, Q., Stæger, F. F., Sigurdsson, B., Mortensen, K. N., Lilius, T. O., & Nedergaard, M. (2019). Increased glymphatic influx is correlated with high EEG delta power and low heart rate in mice under anesthesia. *Science Advances*, *5*(2). <https://doi.org/10.1126/sciadv.aav5447>
- Halassa, M. M., Siegle, J. H., Ritt, J. T., Ting, J. T., Feng, G., & Moore, C. I. (2011). Selective optical drive of thalamic reticular nucleus generates thalamic bursts and cortical spindles. *Nature Publishing Group*, *14*(9), 1118–1120. <https://doi.org/10.1038/nn.2880>
- Halper, J. (2021). Basic Components of Connective Tissues and Extracellular Matrix: Fibronectin, Fibrinogen, Laminin, Elastin, Fibrillins, Fibulins, Matrilins, Tenascins and Thrombospondins. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *1348*, 105–126. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-80614-9\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-030-80614-9_4)
- Harding, E. C., Franks, N. P., & Wisden, W. (2019). The temperature dependence of sleep. *Frontiers in Neuroscience*, *13*(APR), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00336>
- Hardy, D., Besnard, A., Latil, M., Jouvion, G., Briand, D., Thépenier, C., Pascal, Q., Guguin, A., Gayraud-Morel, B., Cavailon, J. M., Tajbakhsh, S., Rocheteau, P., & Chrétien, F. (2016). Comparative study of injury models for studying muscle regeneration in mice. *PLoS ONE*, *11*(1), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147198>
- Harfmann, B. D., Schroder, E. A., Kachman, M. T., Hodge, B. A., Zhang, X., & Esser, K. A. (2016). Muscle-specific loss of Bmal1 leads to disrupted tissue glucose metabolism and systemic glucose homeostasis. *Skeletal Muscle*, *6*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13395-016-0082-x>
- Hartse, K. M. (2010). Sleep in insects. In *Evolution of sleep: phylogenetic and functional perspectives* (pp. 34–56). Cambridge University Press Cambridge, UK.
- Hauglund, N. L., Pavan, C., & Nedergaard, M. (2020). Cleaning the sleeping brain – the potential restorative function of the glymphatic system. *Current Opinion in Physiology*, *15*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2019.10.020>
- Haulica, I., Ababeu, L., Branisteanu, D., & Topoliceanu, F. (1973). Preliminary data on the possible hypnogenic role of adenosine. *Journal of Neurochemistry*, *21*(September 1972), 1019–1020.
- Haus, E., Haus, E., Dumitriu, L., Nicolau, G. Y., Bologa, S., & Sackett-Lundeen, L. (2001). Circadian rhythms of basic fibroblast growth factor (bFGF), epidermal growth factor (EGF), insulin-like growth factor-1 (IGF-1), insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3), cortisol, and melatonin in women with breast cancer. *Chronobiology International*, *18*(4), 709–727. <https://doi.org/10.1081/CBI-100106083>
- Havekes, R., & Abel, T. (2017). The tired hippocampus: the molecular impact of sleep deprivation on

- hippocampal function. *Current Opinion in Neurobiology*, 44, 13–19.  
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.02.005>
- Hestehave, S., Munro, G., Christensen, R., Pedersen, T. B., Arvastson, L., Hougaard, P., & Abelson, K. S. P. (2017). Is there a reasonable excuse for not providing post-operative analgesia when using animal models of peripheral neuropathic pain for research purposes? *PLoS ONE*, 12(11), 1–23.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188113>
- Hillman, D. R., & Lack, L. C. (2013). Public health implications of sleep loss: The community burden. *Medical Journal of Australia*, 199(8), S7–S10. <https://doi.org/10.5694/mja13.10620>
- Hirata, A., Masuda, S., Tamura, T., Kai, K., Ojima, K., Fukase, A., Motoyoshi, K., Kamakura, K., Miyagoe-Suzuki, Y., & Takeda, S. (2003). Expression profiling of cytokines and related genes in regenerating skeletal muscle after cardiotoxin injection: A role for osteopontin. *American Journal of Pathology*, 163(1), 203–215. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63644-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63644-9)
- Hotfiel, T., Seil, R., Bily, W., Bloch, W., Gokeler, A., Kriffter, R. M., Mayer, F., Ueblacker, P., Weisskopf, L., & Engelhardt, M. (2018). Nonoperative treatment of muscle injuries-recommendations from the GOTS expert meeting. *Journal of Experimental Orthopaedics*, 5(1).  
<https://doi.org/10.1186/s40634-018-0139-3>
- Hoyos, C., Glozier, N., & Marshall, N. S. (2015). Recent Evidence on Worldwide Trends on Sleep Duration. *Current Sleep Medicine Reports*, 1(4), 195–204. <https://doi.org/10.1007/s40675-015-0024-x>
- Hughes, J. R. (1964). Responses From the Visual Cortex of Unanesthetized Monkeys. *International Review of Neurobiology*, 7(C), 99–152. [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(08\)60266-4](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(08)60266-4)
- Hussain, J. N., Greaves, R. F., & Cohen, M. M. (2019). A hot topic for health: Results of the Global Sauna Survey. *Complementary Therapies in Medicine*, 44(January), 223–234.  
<https://doi.org/10.1016/j.ctim.2019.03.012>
- Hyldahl, R.; Hubal, M. (2009). Lengthening our Perspective: Morphological, Cellular and Molecular Responses to Eccentric Exercise. *Muscle & Nerve*, 40(2), fiii-fiv.  
<http://doi.wiley.com/10.1002/mus.21475>
- Ikeda, Y., Kamagata, M., Hirao, M., Yasuda, S., Iwami, S., Sasaki, H., Tsubosaka, M., Hattori, Y., Todoh, A., Tamura, K., Shiga, K., Ohtsu, T., & Shibata, S. (2018). Glucagon and/or IGF-1 Production Regulates Resetting of the Liver Circadian Clock in Response to a Protein or Amino Acid-only Diet. *EBioMedicine*, 28, 210–224. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.01.012>
- Iliff, J. J., Wang, M., Liao, Y., Plogg, B. A., Peng, W., Gundersen, G. A., Benveniste, H., Vates, G. E., Deane, R., Goldman, S. A., Nagelhus, E. A., & Nedergaard, M. (2012). A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid  $\beta$ . *Science Translational Medicine*, 4(147).  
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003748>
- Irwin, M. R. (2019). Sleep and inflammation: partners in sickness and in health. *Nature Reviews Immunology*, 19(November), 702–715. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0190-z>
- Järvinen, M. J., & Lehto, M. U. K. (1993). The Effects of Early Mobilisation and Immobilisation on the Healing Process Following Muscle Injuries. *Sports Medicine: Evaluations of Research in Exercise Science and Sports Medicine*, 15(2), 78–89. <https://doi.org/10.2165/00007256-199315020-00002>
- Järvinen, T. A. H., Järvinen, M., & Kalimo, H. (2013). Regeneration of injured skeletal muscle after the injury. *Muscles, Ligaments and Tendons Journal*, 3(4), 337–345.

<https://doi.org/10.11138/mltj/2013.3.4.337>

- Järvinen, T. A. H., Järvinen, T. L. N., Kääriäinen, M., Äärimaa, V., Vaittinen, S., Kalimo, H., & Järvinen, M. (2007). Muscle injuries: optimising recovery. *Best Practice and Research: Clinical Rheumatology*, 21(2), 317–331. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2006.12.004>
- Järvinen, T. A. H., Järvinen, T. L. N., Kääriäinen, M., Kalimo, H., & Järvinen, M. (2005). Muscle injuries: Biology and treatment. In *American Journal of Sports Medicine* (Vol. 33, Issue 5, pp. 745–764). <https://doi.org/10.1177/0363546505274714>
- Jouvet, M. (2000). *Pourquoi rêvons-nous, pourquoi dormons-nous ?* (Odile Jaco).
- Jouvet, M., & Michel, F. (1959). [Electromyographic correlations of sleep in the chronic decorticate & mesencephalic cat]. *Comptes rendus des seances de la Societe de biologie et de ses filiales*, 153(3), 422–425.
- Juliff, L. E., Halson, S. L., Hebert, J. J., Forsyth, P. L., & Peiffer, J. J. (2018). Longer sleep durations are positively associated with finishing place during a national multiday netball competition. *Journal of Strength and Conditioning Research*, 32(1), 189–194. <https://doi.org/10.1519/jsc.0000000000001793>
- Jung, R., & Kornmüller, A. E. (1938). Eine Methodik der Ableitung lokalisierter Potentialschwankungen aus subcorticalen Hirngebieten. *Archiv Für Psychiatrie Und Nervenkrankheiten*, 109(1), 1–30. <https://doi.org/10.1007/BF02157817>
- Kannus, P. (2000). Immobilization or early mobilization after an acute soft-tissue injury? *Physician and Sportsmedicine*, 28(3), 55–63. <https://doi.org/10.3810/psm.2000.03.775>
- Kasai, H., Fukuda, M., Watanabe, S., Hayashi-Takagi, A., & Noguchi, J. (2010). Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. *Trends in Neurosciences*, 33(3), 121–129. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2010.01.001>
- Katoku-kikyo, N., Paatela, E., Houtz, D. L., Lee, B., Munson, D., Wang, X., & Hussein, M. (2021). *Per1 / Per2 – Igf2 axis – mediated circadian regulation of myogenic differentiation*. 220(7).
- Katsageorgiou, V., Sona, D., Zanutto, M., Lassi, G., Garcia-garcia, C., Tucci, V., & Murino, V. (2018). A novel unsupervised analysis of electrophysiological signals reveals new sleep substages in mice. 1–23.
- Kecklund, G., & Axelsson, J. (2016). Health consequences of shift work and insufficient sleep. *BMJ (Online)*, 355, 1–13. <https://doi.org/10.1136/bmj.i5210>
- Keith, S. W., Redden, D. T., Katzmarzyk, P. T., Boggiano, M. M., Hanlon, E. C., Benca, R. M., Ruden, D., Pietrobelli, A., Barger, J. L., Fontaine, K. R., Wang, C., Aronne, L. J., Wright, S. M., Baskin, M., Dhurandhar, N. V., Lijoi, M. C., Grilo, C. M., DeLuca, M., Westfall, A. O., & Allison, D. B. (2006). Putative contributors to the secular increase in obesity: Exploring the roads less traveled. *International Journal of Obesity*, 30(11), 1585–1594. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803326>
- Kelly, M. L., Collin, S. P., Hemmi, J. M., & Lesku, J. A. (2020). Evidence for Sleep in Sharks and Rays: Behavioural, Physiological, and Evolutionary Considerations. *Brain, Behavior and Evolution*, 94(1–4), 37–50. <https://doi.org/10.1159/000504123>
- Keogh, J. W. L., & Winwood, P. W. (2017). The Epidemiology of Injuries Across the Weight-Training Sports. *Sports Medicine*, 47(3), 479–501. <https://doi.org/10.1007/s40279-016-0575-0>
- Kim, A., Latchoumane, C., Lee, S., Kim, G. B., Cheong, E., Augustine, G. J., & Shin, H. S. (2012). Optogenetically induced sleep spindle rhythms alter sleep architectures in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(50), 20673–20678.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1217897109>

- KLAUSEN, K., ANDERSEN, L. B., & PELLE, I. (1981). Adaptive changes in work capacity, skeletal muscle capillarization and enzyme levels during training and detraining. *Acta Physiologica Scandinavica*, *113*(1), 9–16. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1981.tb06854.x>
- Knapik, J. J., Sharp, M. A., Canham-Chervak, M., Hauret, K., Patton, J. F., & Jones, B. H. (2001). Risk factors for training-related injuries among men and women in basic combat training. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, *33*(6), 946–954. <https://doi.org/10.1097/00005768-200106000-00014>
- Knufinke, M., Nieuwenhuys, A., Geurts, S. A. E., Møst, E. I. S., Maase, K., Moen, M. H., Coenen, A. M. L., & Kompier, M. A. J. (2018). Train hard, sleep well? Perceived training load, sleep quantity and sleep stage distribution in elite level athletes. *Journal of Science and Medicine in Sport*, *21*(4), 427–432. <https://doi.org/10.1016/j.jsams.2017.07.003>
- Kondratov, R. V., Kondratova, A. A., Gorbacheva, V. Y., Vykhovanets, O. V., & Antoch, M. P. (2006). Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock. *Genes and Development*, *20*(14), 1868–1873. <https://doi.org/10.1101/gad.1432206>
- Kontinen, V. K., Ahnaou, A., Drinkenburg, W. H. I. M., & Meert, T. F. (2003). Sleep and EEG patterns in the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Physiology and Behavior*, *78*(2), 241–246. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(02\)00966-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(02)00966-6)
- Krause, A. J., Simon, E. Ben, Mander, B. A., Greer, S. M., Saletin, J. M., Goldstein-Piekarski, A. N., & Walker, M. P. (2017). The sleep-deprived human brain. *Nature Reviews Neuroscience*, *18*(7), 404–418. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.55>
- Krivickas, L. S., Dorer, D. J., Ochala, J., & Frontera, W. R. (2011). Relationship between force and size in human single muscle fibres. *Experimental Physiology*, *96*(5), 539–547. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2010.055269>
- Krueger, J. (2008). The Role of Cytokines in Sleep Regulation. *Current Pharmaceutical Design*, *14*(32), 3408–3416. <https://doi.org/10.2174/138161208786549281>
- Krueger, J. M., Fang, J., Taishi, P., Chen, Z., Kushikata, T., & Gardi, J. (1998). Sleep: a physiologic role for IL-1beta and TNF-alpha. In *Annals of the New York Academy of Sciences* (Vol. 856, pp. 148–159). <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb08323.x>
- Krueger, J. M., Takahashi, S., Kapcis, L., Bredow, S., Roky, R., Fang, J., Floyd, R., Renegar, K. B., Guha-Thakurta, N., Novitsky, S., & Obdl, F. (1995). Cytokines in sleep regulation. In *Advances in Neuroimmunology* (Vol. 5).
- Kucera, J., & Dorovini-Zis, K. (1979). Types of human intrafusal muscle fibers. *Muscle & Nerve*, *2*(6), 437–451. <https://doi.org/10.1002/mus.880020605>
- Kundermann, B., Krieg, J. C., Schreiber, W., & Lautenbacher, S. (2004). The effect of sleep deprivation on pain. *Pain Research and Management*, *9*(1), 25–32. <https://doi.org/10.1155/2004/949187>
- Kyle, S. D., Sexton, C. E., Feige, B., Luik, A. I., Lane, J., Saxena, R., Anderson, S. G., Bechtold, D. A., Dixon, W., Little, M. A., Ray, D., Riemann, D., Espie, C. A., Rutter, M. K., & Spiegelhalder, K. (2017). Sleep and cognitive performance: cross-sectional associations in the UK Biobank. *Sleep Medicine*, *38*, 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2017.07.001>
- Lacroix, M. M., de Lavilléon, G., Lefort, J., El Kanbi, K., Bagur, S., Laventure, S., Dauvilliers, Y., Peyron, C., & Benchenane, K. (2018). Improved sleep scoring in mice reveals human-like stages. *BioRxiv*,

489005. <http://biorxiv.org/content/early/2018/12/07/489005.abstract>

- Lancel, M., & Kerkhof, G. A. (1989). Effects of repeated sleep deprivation in the dark- or light-period on sleep in rats. *Physiology and Behavior*, *45*(2), 289–297. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(89\)90130-3](https://doi.org/10.1016/0031-9384(89)90130-3)
- Landis, C. A., Lentz, M. J., Rothermel, J., Buchwald, D., & Shaver, J. L. F. (2004). Decreased sleep spindles and spindle activity in midlife women with fibromyalgia and pain. *Sleep*, *27*(4), 741–750. <https://doi.org/10.1093/sleep/27.4.741>
- Lange, T., Dimitrov, S., Bollinger, T., Diekelmann, S., & Born, J. (2011). Sleep after Vaccination Boosts Immunological Memory. *The Journal of Immunology*, *187*(1), 283–290. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100015>
- Lange, T., Dimitrov, S., & Born, J. (2010). Effects of sleep and circadian rhythm on the human immune system. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1193*, 48–59. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05300.x>
- Lange, T., Perras, B., Fehm, H. L., & Born, J. (2003). Sleep enhances the human antibody response to hepatitis A vaccination. *Psychosomatic Medicine*, *65*(5), 831–835. <https://doi.org/10.1097/01.PSY.0000091382.61178.F1>
- Latroche, C., Weiss-Gayet, M., Muller, L., Gitiaux, C., Leblanc, P., Liot, S., Ben-Larbi, S., Abou-Khalil, R., Verger, N., Bardot, P., Magnan, M., Chrétien, F., Mounier, R., Germain, S., & Chazaud, B. (2017). Coupling between Myogenesis and Angiogenesis during Skeletal Muscle Regeneration Is Stimulated by Restorative Macrophages. *Stem Cell Reports*, *9*(6), 2018–2033. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.10.027>
- Lee, J., Kim, D., & Shin, H. S. (2004). Lack of delta waves and sleep disturbances during non-rapid eye movement sleep in mice lacking  $\alpha 1G$ -subunit of T-type calcium channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(52), 18195–18199. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408089101>
- Lee, S. J. (2004). Regulation of muscle mass by myostatin. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *20*, 61–86. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.20.012103.135836>
- Leeder, J., Glaister, M., Pizzoferro, K., Dawson, J., & Pedlar, C. (2012). Sleep duration and quality in elite athletes measured using wristwatch actigraphy. *Journal of Sports Sciences*, *30*(6), 541–545. <https://doi.org/10.1080/02640414.2012.660188>
- Leger, D. (1994). The cost of sleep-related accidents: A report for the National Commission on Sleep Disorders Research. *Sleep*, *17*(1), 84–93. <https://doi.org/10.1093/sleep/17.1.84>
- Léger, D., Zeghnoun, A., Faraut, B., & Richard, J.-B. (2019). *Le temps de sommeil en France / Sleep Time in France (Bulletin épidémiologique hebdomadaire - Santé Publique France)*.
- Leknes, S., & Tracey, I. (2008). A common neurobiology for pain and pleasure. *Nature Reviews Neuroscience*, *9*(4), 314–320. <https://doi.org/10.1038/nrn2333>
- Lewandowski, A. S., Palermo, T. M., Motte, S. D. La, & Fu, R. (2010). Temporal daily associations between pain and sleep in adolescents with chronic pain versus healthy adolescents. *Pain*, *151*(1), 220–225. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2010.07.016>
- Li, Y., Komuro, Y., Fahrion, J. K., Hu, T., Ohno, N., Fenner, K. B., Wootton, J., Raoult, E., Galas, L., Vaudry, D., & Komuro, H. (2012). Light stimuli control neuronal migration by altering of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(7), 2630–2635. <https://doi.org/10.1073/pnas.1111326109>

- Libourel, P. A., & Herrel, A. (2016). Sleep in amphibians and reptiles: a review and a preliminary analysis of evolutionary patterns. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, *91*(3), 833–866. <https://doi.org/10.1111/brv.12197>
- Lieber, R. L. (2002). *Skeletal Muscle Structure, Function, and Plasticity*. Lippincott Williams & Wilkins. [https://books.google.fr/books?id=T0fbq%5C\\_b89cAC](https://books.google.fr/books?id=T0fbq%5C_b89cAC)
- Lim, J., & Dinges, D. F. (2010). A Meta-Analysis of the Impact of Short-Term Sleep Deprivation on Cognitive Variables. *Psychological Bulletin*, *136*(3), 375–389. <https://doi.org/10.1037/a0018883>
- Lindert, B. Te, & Van Someren, E. J. . (2018). Skin Temperature, Sleep and Vigilance. *Handbook of Clinical Neurology*, *156*, 353–365.
- Liu, M. G., & Chen, J. (2009). Roles of the hippocampal formation in pain information processing. *Neuroscience Bulletin*, *25*(5), 237–266. <https://doi.org/10.1007/s12264-009-0905-4>
- Loomis, A. L., Harvey, E. N., & Hobart, G. (1935a). Further observation on the potential rhythms of the cerebral cortex during sleep. *Science*, *82*(2122), 198–200. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(58\)90176-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(58)90176-4)
- Loomis, A. L., Harvey, E. N., & Hobart, G. (1935b). Potential rhythms of the cerebral cortex during sleep. *Science*, *81*(2111), 597–598. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(58\)90176-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(58)90176-4)
- Loomis, A. L., Harvey, E. N., & Hobart, G. A. (1938). DISTRIBUTION OF DISTURBANCE-PATTERNS IN THE HUMAN ELECTROENCEPHALOGRAM, WITH SPECIAL REFERENCE TO SLEEP. *Journal of Neurophysiology*, *1*(5), 413–430. <https://doi.org/10.1152/jn.1938.1.5.413>
- López-Valenciano, A., Ruiz-Pérez, I., Garcia-Gómez, A., Vera-Garcia, F. J., De Ste Croix, M., Myer, G. D., & Ayala, F. (2020). Epidemiology of injuries in professional football: A systematic review and meta-analysis. *British Journal of Sports Medicine*, *54*(12), 711–718. <https://doi.org/10.1136/bjsports-2018-099577>
- Lovalekar, M., Hauret, K., Roy, T., Taylor, K., Blacker, S. D., Newman, P., Yanovich, R., Fleischmann, C., Nindl, B. C., Jones, B., & Canham-Chervak, M. (2021). Musculoskeletal injuries in military personnel—Descriptive epidemiology, risk factor identification, and prevention. *Journal of Science and Medicine in Sport*, *24*(10), 963–969. <https://doi.org/10.1016/j.jsams.2021.03.016>
- Lu, J., Bjorkum, A. A., Xu, M., Gaus, S. E., Shiromani, P. J., & Saper, C. B. (2002). Selective Activation of the Extended Ventrolateral Preoptic Nucleus during Rapid Eye Movement Sleep. *Journal of Neuroscience*, *22*(11), 4568–4576. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-11-04568.2002>
- Lu, J., Greco, M. A., Shiromani, P., & Saper, C. B. (2000). Effect of lesions of the ventrolateral preoptic nucleus on NREM and REM sleep. *Journal of Neuroscience*, *20*(10), 3830–3842. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-10-03830.2000>
- Lumeng, J. C., Somashekar, D., Appugliese, D., Kaciroti, N., Corwyn, R. F., & Bradley, R. H. (2007). Shorter sleep duration is associated with increased risk for being overweight at ages 9 to 12 years. *Pediatrics*, *120*(5), 1020–1029. <https://doi.org/10.1542/peds.2006-3295>
- Lundberg, T. R., & Howatson, G. (2018). Analgesic and anti-inflammatory drugs in sports: Implications for exercise performance and training adaptations. *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports*, *28*(11), 2252–2262. <https://doi.org/10.1111/sms.13275>
- Lundgaard, I., Lu, M. L., Yang, E., Peng, W., Mestre, H., Hitomi, E., Deane, R., & Nedergaard, M. (2017). Glymphatic clearance controls state-dependent changes in brain lactate concentration. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *37*(6), 2112–2124. <https://doi.org/10.1177/0271678X16661202>

- Machida, S., & Booth, F. W. (2004a). Insulin-like growth factor 1 and muscle growth: implication for satellite cell proliferation. *Proceedings of the Nutrition Society*, *63*(2), 337–340. <https://doi.org/10.1079/pns2004354>
- Machida, S., & Booth, F. W. (2004b). Regrowth of Skeletal Muscle Atrophied from Inactivity. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, *36*(1), 52–59. <https://doi.org/10.1249/01.MSS.0000106175.24978.84>
- Mah, C. D., Mah, K. E., Kezirian, E. J., & Dement, W. C. (2011). The Effects of Sleep Extension on the Athletic Performance of Collegiate Basketball Players. *Sleep*, *34*(7), 943–950. <https://doi.org/10.5665/sleep.1132>
- Mang, G. M., Nicod, J., Emmenegger, Y., Donohue, K. D., O'Hara, B. F., & Franken, P. (2014). Evaluation of a piezoelectric system as an alternative to electroencephalogram/electromyogram recordings in mouse sleep studies. *Sleep*, *37*(8), 1383–1392. <https://doi.org/10.5665/sleep.3936>
- Mann, C. J., Perdiguero, E., Kharraz, Y., Aguilar, S., Pessina, P., Serrano, A. L., & Muñoz-Cánoves, P. (2011). Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. *Skeletal Muscle*, *1*(1), 21. <https://doi.org/10.1186/2044-5040-1-21>
- Maquet, P. (2001). The role of sleep in Learning and Memory. *Science*, *294*(November), 1048–1052. <https://doi.org/10.1016/j.copsyc.2019.08.016>
- Maret, S., Faraguna, U., Nelson, A. B., Cirelli, C., & Tononi, G. (2011). Sleep and waking modulate spine turnover in the adolescent mouse cortex. *Nature Neuroscience*, *14*(11), 1418–1420. <https://doi.org/10.1038/nn.2934>
- Maris, E., & Oostenveld, R. (2007). Nonparametric statistical testing of EEG- and MEG-data. *Journal of Neuroscience Methods*, *164*(1), 177–190. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2007.03.024>
- MAURO, A. (1961). Satellite cell of skeletal muscle fibers. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, *9*, 493–495. <https://doi.org/10.1083/jcb.9.2.493>
- Mavalli, M. D., DiGirolamo, D. J., Fan, Y., Riddle, R. C., Campbell, K. S., Van Groen, T., Frank, S. J., Sperling, M. A., Esser, K. A., Bamman, M. M., & Clemens, T. L. (2010). Distinct growth hormone receptor signaling modes regulate skeletal muscle development and insulin sensitivity in mice. *Journal of Clinical Investigation*, *120*(11), 4007–4020. <https://doi.org/10.1172/JCI42447>
- Mavanji, V., Teske, J. A., Billington, C. J., & Kotz, C. M. (2010). Elevated sleep quality and orexin receptor mRNA in obesity-resistant rats. *International Journal of Obesity*, *34*(11), 1576–1588. <https://doi.org/10.1038/ijo.2010.93>
- Mayeuf-Louchart, A., Hardy, D., Thorel, Q., Roux, P., Gueniot, L., Briand, D., Mazeraud, A., Bouglé, A., Shorte, S. L., Staels, B., Chrétien, F., Duez, H., & Danckaert, A. (2018). MuscleJ: A high-content analysis method to study skeletal muscle with a new Fiji tool. *Skeletal Muscle*, *8*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13395-018-0171-0>
- McArthur, S., Juban, G., Gobbetti, T., Desgeorges, T., Theret, M., Gondin, J., Toller-Kawahisa, J. E., Reutelingsperger, C. P., Chazaud, B., Perretti, M., & Mounier, R. (2020). Annexin A1 drives macrophage skewing to accelerate muscle regeneration through AMPK activation. *Journal of Clinical Investigation*, *130*(3), 1156–1167. <https://doi.org/10.1172/JCI124635>
- McCormick, D. A., McGinley, M. J., & Salkoff, D. B. (2015). Brain state dependent activity in the cortex and thalamus. *Current Opinion in Neurobiology*, *31*, 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2014.10.003>

- McDearmon, E. L., Patel, K. N., Ko, C. H., Walisser, J. A., Schook, A. C., Chong, J. L., Wilsbacher, L. D., Song, E. J., Hong, H.-K., Bradfield, C. A., & Takahashi, J. S. (2006). Dissecting the Functions of the Mammalian Clock Protein BMAL1 by Tissue-Specific Rescue in Mice. *Science*, *314*(NOVEMBER), 1304–1308.
- Mcginley, M. J., Vinck, M., Reimer, J., Batista-brito, R., Zagha, E., Cadwell, C. R., Tolia, A. S., Cardin, J. A., & McCormick, D. A. (2015). Perspective Waking State : Rapid Variations Modulate Neural and Behavioral Responses. *Neuron*, *87*(6), 1143–1161. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.09.012>
- McGinley, M. J., Vinck, M., Reimer, J., Batista-Brito, R., Zagha, E., Cadwell, C. R., Tolia, A. S., Cardin, J. A., & McCormick, D. A. (2015). Waking State: Rapid Variations Modulate Neural and Behavioral Responses. *Neuron*, *87*(6), 1143–1161. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.09.012>
- McShane, B. B., Galante, R. J., Biber, M., Jensen, S. T., Wyner, A. J., & Pack, A. I. (2012). Assessing REM Sleep in Mice Using Video Data. *Sleep*, *35*(3), 433–442. <https://doi.org/10.5665/sleep.1712>
- Medler, S. (2019). Mixing it up: The biological significance of hybrid skeletal muscle fibers. *Journal of Experimental Biology*, *22*(23), 10BITUARY. <https://doi.org/10.1242/jeb.200832>
- Milewski, M. D., Skaggs, D. L., Bishop, G. A., Pace, J. L., Ibrahim, D. A., Wren, T. A. L., & Barzdukas, A. (2014). *Chronic Lack of Sleep is Associated With Increased Sports Injuries in Adolescent Athletes*. *34*(2), 129–133.
- Miller, A. E. J., Macdougall, J. D., Tarnopolsky, M. A., & Sale, D. G. (1993). Gender differences in strength and muscle fibers characteristics. *European Journal of Applied Physiology*, *2*(66), 254–262. <https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.1946.tb34690.x>
- Mills, L. A., & Simpson, A. H. R. W. (2012). In vivo models of bone repair. *Journal of Bone and Joint Surgery - Series B*, *94 B*(7), 865–874. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.94B7.27370>
- Mistlberger, R. E. (2006). Circadian Rhythms: Perturbing a Food-Entrained Clock. *Current Biology*, *16*(22), 968–969. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.10.020>
- Mock, E. J., Norton, H. W., & Frankel, A. I. (1978). Daily rhythmicity of serum testosterone concentration in the male laboratory rat. *Endocrinology*, *103*(4), 1111–1121. <https://doi.org/10.1210/endo-103-4-1111>
- Mogil, J. S. (2009). *Animal models of pain : progress and challenges*. *10*(APRIL). <https://doi.org/10.1038/nrn2606>
- Mokhtari, T., Tu, Y., & Hu, L. (2019). Involvement of the hippocampus in chronic pain and depression. *Brain Science Advances*, *5*(4), 288–298. <https://doi.org/10.26599/bsa.2019.9050025>
- Moldofsky, H. (2001). Sleep and pain. *Sleep Medicine Reviews*, *5*(5), 385–396. <https://doi.org/10.1053/smr.2001.0179>
- Mônico-Neto, M., Dáttilo, M., Ribeiro, D. A., Lee, K. S., de Mello, M. T., Tufik, S., & Antunes, H. K. M. (2017). REM sleep deprivation impairs muscle regeneration in rats. *Growth Factors*, *35*(1), 12–18. <https://doi.org/10.1080/08977194.2017.1314277>
- Mônico-neto, M., Quaglia, S., Giampá, D. C., Lee, K. S., Melo, C. M. De, Souza, H. D. S., Dáttilo, M., Minali, P. A., Henrique, P., Prado, S., Tufik, S., Mello, M. T. De, Karen, H., & Antunes, M. (2015). Negative Energy Balance Induced by Paradoxical Sleep Deprivation Causes Multicompartmental Changes in Adipose Tissue and Skeletal Muscle. *International Journal of Endocrinology*, *2015*.
- Moore, R. Y., & Eichler, V. B. (1972). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Research Bulletin*, *72*(900), 54–56.

<http://www.sciencedirect.com.ezaccess.libraries.psu.edu/science/article/pii/S0006899372900546>

- Mori, K. (2021). Maintenance of skeletal muscle to counteract sarcopenia in patients with advanced chronic kidney disease and especially those undergoing hemodialysis. *Nutrients*, *13*(5). <https://doi.org/10.3390/nu13051538>
- Mougin, F., Bourdin, H., Simon-Rigaud, M. L., Didier, J. M., Toubin, G., & Kantelip, J. P. (1996). Effects of a selective sleep deprivation on subsequent anaerobic performance. *International Journal of Sports Medicine*, *17*(2), 115–119. <https://doi.org/10.1055/s-2007-972818>
- Mounier, R., Théret, M., Arnold, L., Cuvellier, S., Bultot, L., Göransson, O., Sanz, N., Ferry, A., Sakamoto, K., Foretz, M., Viollet, B., & Chazaud, B. (2013). AMPK $\alpha$ 1 regulates macrophage skewing at the time of resolution of inflammation during skeletal muscle regeneration. *Cell Metabolism*, *18*(2), 251–264. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.06.017>
- Mourkioti, F., & Rosenthal, N. (2005). IGF-1, inflammation and stem cells: Interactions during muscle regeneration. *Trends in Immunology*, *26*(10), 535–542. <https://doi.org/10.1016/j.it.2005.08.002>
- Mueller-Wohlfahrt, H. W., Haensel, L., Mithoefer, K., Ekstrand, J., English, B., McNally, S., Orchard, J., Van Dijk, N., Kerkhoffs, G. M., Schamasch, P., Blottner, D., Swaerd, L., Goedhart, E., & Uebliacker, P. (2013). Terminology and classification of muscle injuries in sport: The Munich consensus statement. *British Journal of Sports Medicine*, *47*(6), 342–350. <https://doi.org/10.1136/bjsports-2012-091448>
- Musarò, A., McCullagh, K., Paul, A., Houghton, L., Dobrowolny, G., Molinaro, M., Barton, E. R., L Sweeney, H., & Rosenthal, N. (2001). Localized IGF-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nature Genetics*, *27*(2), 195–200. <https://doi.org/10.1038/84839>
- Mutso, A. A., Radzicki, D., Baliki, M. N., Huang, L., Banisadr, G., Centeno, M. V., Radulovic, J., Martina, M., Miller, R. J., & Vania Apkarian, A. (2012). Abnormalities in hippocampal functioning with persistent pain. *Journal of Neuroscience*, *32*(17), 5747–5756. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0587-12.2012>
- Natale, V., Drejak, M., Erbacci, A., Tonetti, L., Fabbri, M., & Martoni, M. (2012). Monitoring sleep with a smartphone accelerometer. *Sleep and Biological Rhythms*, *10*(4), 287–292. <https://doi.org/10.1111/j.1479-8425.2012.00575.x>
- Nédélec, M., Leduc, C., Dawson, B., Guilhem, G., & Dupont, G. (2019). *Case Study: Sleep and Injury in Elite Soccer - A mixed Method Approach*. *33*(11), 3085–3091.
- Nijs, J., Loggia, M. L., Polli, A., Moens, M., Huysmans, E., Goudman, L., Meeus, M., Vanderweeën, L., Ickmans, K., & Clauw, D. (2017). Sleep disturbances and severe stress as glial activators: key targets for treating central sensitization in chronic pain patients? *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, *21*(8), 817–826. <https://doi.org/10.1080/14728222.2017.1353603>
- Nunes Amaral, L. A., Ivanov, P. C., Aoyagi, N., Hidaka, I., Tomono, S., Goldberger, A. L., Stanley, H. E., & Yamamoto, Y. (2001). Behavioral-independent features of complex heartbeat dynamics. *Physical Review Letters*, *86*(26), 6026–6029. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.86.6026>
- O'Brien, C. B., Locklear, C. E., Glovak, Z. T., Unzaga, D. Z., Baghdoyan, H. A., & Lydic, R. (2021). Opioids cause dissociated states of consciousness in C57BL/6J mice. *Journal of Neurophysiology*, *126*(4), 1265–1275. <https://doi.org/10.1152/jn.00266.2021>
- O'Donoghue, D. J. (1962). *Treatment of Injuries to Athletes*. 3.

- Obal, F., & Krueger, J. M. (2004). GHRH and sleep. *Sleep Medicine Reviews, 8*(5), 367–377. <https://doi.org/10.1016/j.smr.2004.03.005>
- Ognjanovski, N., Broussard, C., Zochowski, M., & Aton, S. J. (2018). Hippocampal network oscillations rescue memory consolidation deficits caused by sleep loss. *Cerebral Cortex, 28*(10), 3711–3723. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhy174>
- Ohlsson, C., Mohan, S., Sjögren, K., Tivesten, Å., Isgaard, J., Isaksson, O., Jansson, J. O., & Svensson, J. (2009). The role of liver-derived insulin-like growth factor-I. *Endocrine Reviews, 30*(5), 494–535. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0010>
- Oishi, Y., Hayashi, S., Isagawa, T., Oshima, M., Iwama, A., Shimba, S., Okamura, H., & Manabe, I. (2017). Bmal1 regulates inflammatory responses in macrophages by modulating enhancer RNA transcription. *Scientific Reports, 7*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07100-3>
- Okamura, H., Doi, M., Fustin, J. M., Yamaguchi, Y., & Matsuo, M. (2010). Mammalian circadian clock system: Molecular mechanisms for pharmaceutical and medical sciences. *Advanced Drug Delivery Reviews, 62*(9–10), 876–884. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.06.004>
- Oliver, S. J., Costa, R. J. S., Walsh, N. P., Laing, S. J., & Bilzon, J. L. J. (2009). One night of sleep deprivation decreases treadmill endurance performance. *European Journal of Applied Physiology, 107*(2), 155–161. <https://doi.org/10.1007/s00421-009-1103-9>
- Ono, D. (2022). Neural circuits in the central circadian clock and their regulation of sleep and wakefulness in mammals. *Neuroscience Research, 182*(May), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2022.05.005>
- Opp, M. R. (2005). Cytokines and Sleep. *Sleep Medicine Reviews, 9*, 355–364. [https://doi.org/10.1016/S1567-7443\(07\)10011-9](https://doi.org/10.1016/S1567-7443(07)10011-9)
- Pack, A. I., Galante, R. J., Maislin, G., Cater, J., Metaxas, D., Lu, S., Zhang, L., Smith, R. Von, Kay, T., Lian, J., Svenson, K., & Peters, L. L. (2007). Novel method for high-throughput phenotyping of sleep in mice. *Physiological Genomics, 28*(2), 232–238. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00139.2006>
- Palumbo, R., Galvez, B. G., Pusterla, T., De Marchis, F., Cossu, G., Marcu, K. B., & Bianchi, M. E. (2007). Cells migrating to sites of tissue damage in response to the danger signal HMGB1 require NF-κB activation. *Journal of Cell Biology, 179*(1), 33–40. <https://doi.org/10.1083/jcb.200704015>
- Park, S. H., & Weber, F. (2020). Neural and Homeostatic Regulation of REM Sleep. *Frontiers in Psychology, 11*(July). <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2020.01662>
- Patanaik, A. (2015). *Vulnerability to Sleep Deprivation : A Drift Diffusion Model Perspective*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1201.9923>
- Patel, T. K., Habimana-Griffin, L., Gao, X., Xu, B., Achilefu, S., Alitalo, K., McKee, C. A., Sheehan, P. W., Musiek, E. S., Xiong, C., Coble, D., & Holtzman, D. M. (2019). Dural lymphatics regulate clearance of extracellular tau from the CNS. *Molecular Neurodegeneration, 14*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13024-019-0312-x>
- Patsalos, A., Tzerpos, P., Wei, X., & Nagy, L. (2021). Myeloid cell diversification during regenerative inflammation: Lessons from skeletal muscle. *Seminars in Cell and Developmental Biology, 119*, 89–100. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2021.05.005>
- Peigneux, P., Laureys, S., Delbeuck, X., & Maquet, P. (2001). Sleeping brain, learning brain. the role of sleep for memory systems. *NeuroReport, 12*(18), A111–A124.

<https://doi.org/10.1097/00001756-200112210-00001>

- Pellegrino, R., Sunaga, D. Y., Guindalini, C., Martins, R. C. S., Mazzotti, D. R., Wei, Z., Daye, Z. J., Andersen, M. L., & Tufik, S. (2012). Whole blood genome-wide gene expression profile in males after prolonged wakefulness and sleep recovery. *Physiological Genomics*, *44*(21), 1003–1012. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00058.2012>
- Peng, W., Xia, X., Yi, M., Huang, G., Zhang, Z., Iannetti, G., & Hu, L. (2018). Brain oscillations reflecting pain-related behavior in freely moving rats. *Pain*, *159*(1), 106–118. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001069>
- Petit, J. M., Buret-Godinot, S., Magistretti, P. J., & Allaman, I. (2014). Glycogen metabolism and the homeostatic regulation of sleep. *Metabolic Brain Disease*, *30*(1), 263–279. <https://doi.org/10.1007/s11011-014-9629-x>
- Plikus, M. V., Wang, X., Sinha, S., Forte, E., Thompson, S. M., Herzog, E. L., Driskell, R. R., Rosenthal, N., Biernaskie, J., & Horsley, V. (2021). Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease. *Cell*, *184*(15), 3852–3872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.06.024>
- Porkka-heiskanen, T., & Kalinchuk, A. V. (2011). Adenosine , energy metabolism and sleep homeostasis. *Sleep Medicine Reviews*, *15*(2), 123–135. <https://doi.org/10.1016/j.smr.2010.06.005>
- Portas, C. M., Thakkar, M., Rainnie, D. G., Greene, R. W., & McCarley, R. W. (1997). Role of adenosine in behavioral state modulation: A microdialysis study in the freely moving cat. *Neuroscience*, *79*(1), 225–235. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(96\)00640-9](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(96)00640-9)
- Power, J. D., Perruccio, A. V., & Badley, E. M. (2005). Pain as a mediator of sleep problems in arthritis and other chronic conditions. *Arthritis Care and Research*, *53*(6), 911–919. <https://doi.org/10.1002/art.21584>
- Prinz, P. N., Moe, K. E., Dulberg, E. M., Larsen, L. H., Vitiello, M. V., Toivola, B., & Merriam, G. R. (1995). Higher plasma IGF-1 levels are associated with increased delta sleep in healthy older men. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, *50*(4), 222–226. <https://doi.org/10.1093/gerona/50A.4.M222>
- Quiquempoix, M., Sauvet, F., Erblang, M., Van Beers, P., Guillard, M., Drogou, C., Trignol, A., Vergez, A., Léger, D., Chennaoui, M., Gomez-Merino, D., & Rabat, A. (2022). Effects of Caffeine Intake on Cognitive Performance Related to Total Sleep Deprivation and Time on Task: A Randomized Cross-Over Double-Blind Study. *Nature and Science of Sleep*, *14*(December 2021), 457–473. <https://doi.org/10.2147/NSS.S342922>
- Rabat, A., Gomez-Merino, D., Roca-Paixao, L., Bougard, C., Van Beers, P., Dispersyn, G., Guillard, M., Bourrilhon, C., Drogou, C., Arnal, P. J., Sauvet, F., Leger, D., & Chennaoui, M. (2016). Differential Kinetics in Alteration and Recovery of Cognitive Processes from a Chronic Sleep Restriction in Young Healthy Men. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *10*(May), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2016.00095>
- Rahman, F. A., Angus, S. A., Stokes, K., Karpowicz, P., & Krause, M. P. (2020). Impaired ECM remodeling and macrophage activity define necrosis and regeneration following damage in aged skeletal muscle. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(13), 1–23. <https://doi.org/10.3390/ijms21134575>
- Raizen, D. M., Zimmerman, J. E., Maycock, M. H., Ta, U. D., You, Y. J., Sundaram, M. V., & Pack, A. I. (2008). Lethargus is a *Caenorhabditis elegans* sleep-like state. *Nature*, *451*(7178), 569–572. <https://doi.org/10.1038/nature06535>

- Ramm, P., & Smith, C. T. (1990). Rates of cerebral protein synthesis are linked to slow wave sleep in the rat. *Physiology and Behavior*, *48*(5), 749–753. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(90\)90220-X](https://doi.org/10.1016/0031-9384(90)90220-X)
- Rattenborg, N. C. (2006). Do birds sleep in flight? *Naturwissenschaften*, *93*(9), 413–425. <https://doi.org/10.1007/s00114-006-0120-3>
- Rayatdoost, E., Rahmanian, M., Sanie, M. S., Rahmanian, J., Matin, S., Kalani, N., Kenarkoohi, A., Falahi, S., & Abdoli, A. (2022). Sufficient Sleep, Time of Vaccination, and Vaccine Efficacy: A Systematic Review of the Current Evidence and a Proposal for COVID-19 Vaccination. *Yale Journal of Biology and Medicine*, *95*(2), 221–235.
- Ressort, T., Desjeux, G., Marsan, P., & Thevenin-Garron, V. (2013). [Sport-related injuries and conditions among French military personnel]. *Santé Publique (Vandoeuvre-Lès-Nancy, France)*, *25*(3), 263–270. <https://doi.org/10.3917/spub.253.0263>
- Reyner, L. A., & Horne, J. A. (2013). Sleep restriction and serving accuracy in performance tennis players, and effects of caffeine. *Physiology and Behavior*, *120*, 93–96. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.07.002>
- Risson, V., Mazelin, L., Roceri, M., Sanchez, H., Moncollin, V., Corneloup, C., Richard-Bulteau, H., Vignaud, A., Baas, D., Defour, A., Freyssenet, D., Tanti, J. F., Le-Marchand-Brustel, Y., Ferrier, B., Conjard-Duplany, A., Romanino, K., Bauché, S., Hantai, D., Mueller, M., ... Gangloff, Y. G. (2009). Muscle inactivation of mTOR causes metabolic and dystrophin defects leading to severe myopathy. *Journal of Cell Biology*, *187*(6), 859–874. <https://doi.org/10.1083/jcb.200903131>
- Robey, E., Dawson, B., Halson, S., Gregson, W., King, S., Goodman, C., & Eastwood, P. (2013). Effect of evening postexercise cold water immersion on subsequent sleep. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, *45*(7), 1394–1402. <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e318287f321>
- Rockstrom, M. D., Chen, L., Taishi, P., Nguyen, J. T., Gibbons, C. M., Veasey, S. C., & Krueger, J. M. (2018). Tumor necrosis factor alpha in sleep regulation. *Sleep Medicine Reviews*, *40*, 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.smrv.2017.10.005>
- Roehrs, T. A., Harris, E., Randall, S., & Roth, T. (2012). Pain sensitivity and recovery from mild chronic sleep loss. *Sleep*, *35*(12), 1667–1672. <https://doi.org/10.5665/sleep.2240>
- Ruiz, F. S., Andersen, M. L., Guindalini, C., Araujo, L. P., Lopes, J. D., & Tufik, S. (2017). Sleep influences the immune response and the rejection process alters sleep pattern: Evidence from a skin allograft model in mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, *61*, 274–288. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.12.027>
- Rupp, T. L., Wesensten, N. J., Bliese, P. D., & Balkin, T. J. (2009). Banking sleep: Realization of benefits during subsequent sleep restriction and recovery. *Sleep*, *32*(3), 311–321. <https://doi.org/10.1093/sleep/32.3.311>
- Ryan, A. J. (1969). Quadriceps strain, rupture and charlie horse. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, *1*(2), 106–111.
- Saclier, M., Lapi, M., Bonfanti, C., Rossi, G., Antonini, S., & Messina, G. (2020). The Transcription Factor Nfix Requires RhoA-ROCK1 Dependent Phagocytosis to Mediate Macrophage Skewing during Skeletal Muscle Regeneration. *Cells*, *9*(3), 1–17. <https://doi.org/10.3390/cells9030708>
- Saper, C. B. (1890). *The Neurobiology of Sleep*. 19–31.
- Saper, C. B., Fuller, P. M., Pedersen, N. P., Lu, J., & Scammell, T. E. (2010). Sleep State Switching. In *Neuron* (Vol. 68, Issue 6, pp. 1023–1042). Elsevier Inc.

<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.032>

- Saper, C. B., Scammell, T. E., & Lu, J. (2005). Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature*, *437*(7063), 1257–1263. <https://doi.org/10.1038/nature04284>
- Sauvet, F., Gomez-Merino, D., Dorey, R., Ciret, S., Gallopin, T., Drogou, C., Arnal, P. J., & Chennaoui, M. (2018). Lengthening of the photoperiod influences sleep characteristics before and during total sleep deprivation in rat. *Journal of Sleep Research*, *April*, e12709. <https://doi.org/10.1111/jsr.12709>
- Scharbarg, E., Walter, A., Lecoin, L., Gallopin, T., Lemaître, F., Guille-Collignon, M., Rouach, N., & Rancillac, A. (2022). Prostaglandin D2 Controls Local Blood Flow and Sleep-Promoting Neurons in the VLPO via Astrocyte-Derived Adenosine. *ACS Chemical Neuroscience*. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.2c00660>
- Scharf, M. T., Naidoo, N., Zimmerman, J. E., & Pack, A. I. (2008). The energy hypothesis of sleep revisited. *Progress in Neurobiology*, *86*(3), 264–280. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2008.08.003>
- Schiaffino, S., Blaauw, B., & Dyar, K. A. (2016). The functional significance of the skeletal muscle clock: Lessons from Bmal1 knockout models. *Skeletal Muscle*, *6*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13395-016-0107-5>
- Schiaffino, S., Dyar, K. A., Ciciliot, S., Blaauw, B., & Sandri, M. (2013). Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS Journal*, *280*(17), 4294–4314. <https://doi.org/10.1111/febs.12253>
- Schiaffino, S., & Mammucari, C. (2011). Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: Insights from genetic models. *Skeletal Muscle*, *1*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/2044-5040-1-4>
- Schiaffino, S., & Partridge, T. (2008). *Skeletal Muscle Repair and Regeneration*. Springer Netherlands. <https://books.google.nl/books?id=3arwHDny8sEC>
- Schibler, U., & Sassone-Corsi, P. (2002). A web of circadian pacemakers. *Cell*, *111*(7), 919–922. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)01225-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)01225-4)
- Schmidt, M. H. (2014). The energy allocation function of sleep: A unifying theory of sleep, torpor, and continuous wakefulness. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *47*, 122–153. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.08.001>
- Schmidt, M., Schüler, S. C., Hüttner, S. S., von Eyss, B., & von Maltzahn, J. (2019). Adult stem cells at work: regenerating skeletal muscle. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *76*(13), 2559–2570. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03093-6>
- Schönauer, M. (2018). Sleep Spindles: Timed for Memory Consolidation. In *Current Biology* (Vol. 28, Issue 11, pp. R656–R658). <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.03.046>
- Schwartz, J., & Simon, R. D. (2015). Sleep extension improves serving accuracy: A study with college varsity tennis players. *Physiology and Behavior*, *151*, 541–544. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.08.035>
- Schwarz, P., Graham, W., Li, F., Locke, M., & Peever, J. (2013). Sleep deprivation impairs functional muscle recovery following injury. *Sleep Medicine*, *14*, e262. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2013.11.638>
- Schwierin, B., Achermann, P., Deboer, T., Oleksenko, A., Borbély, A. A., & Tobler, I. (1999). Regional differences in the dynamics of the cortical EEG in the rat after sleep deprivation. *Clinical*

- Neurophysiology*, 110(5), 869–875. [https://doi.org/10.1016/S1388-2457\(99\)00020-6](https://doi.org/10.1016/S1388-2457(99)00020-6)
- Seale, P., Asakura, A., & Rudnicki, M. A. (2001). The Potential of Muscle Stem Cells. *Developmental Cell*, 1(3), 333–342. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(01\)00049-1](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(01)00049-1)
- Seiffert, C., Khoshgoftaar, T. M., Van Hulse, J., & Napolitano, A. (2010). RUSBoost: A hybrid approach to alleviating class imbalance. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics Part A: Systems and Humans*, 40(1), 185–197. <https://doi.org/10.1109/TSMCA.2009.2029559>
- Senesi, P., Luzi, L., Montesano, A., Mazzocchi, N., & Terruzzi, I. (2013). Betaine supplement enhances skeletal muscle differentiation in murine myoblasts via IGF-1 signaling activation. *Journal of Translational Medicine*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-174>
- Serhan, C. N., & Chiang, N. (2008). Endogenous pro-resolving and anti-inflammatory lipid mediators: A new pharmacologic genus. *British Journal of Pharmacology*, 153(SUPPL. 1), 200–215. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707489>
- Shan, T., Zhang, P., Liang, X., Bi, P., Yue, F., & Kuang, S. (2014). Lkb1 is indispensable for skeletal muscle development, regeneration, and satellite cell homeostasis. *Stem Cells*, 32(11), 2893–2907. <https://doi.org/10.1002/stem.1788>
- Shan, Z., Ma, H., Xie, M., Yan, P., Guo, Y., Bao, W., Rong, Y., Jackson, C. L., Hu, F. B., & Liu, L. (2015). Sleep duration and risk of type 2 diabetes: A meta-analysis of prospective studies. *Diabetes Care*, 38(3), 529–537. <https://doi.org/10.2337/dc14-2073>
- Shanks, N., Greek, R., & Greek, J. (2009). *Philosophy , Ethics , and Humanities Are animal models predictive for humans ?* 20, 1–20. <https://doi.org/10.1186/1747-5341-4-2>
- Sherin, J. ., Shiromani, P. ., McCarley, R. ., & Saper, C. . (1996). Activation of Ventrolateral Preoptic Neurons During Sleep. *Science*, 271(January), 216–219. <https://doi.org/10.1126/science.271.5246.216>
- Sherin, J. E., Elmquist, J. K., Torrealba, F., & Saper, C. B. (1998). Innervation of histaminergic tuberomammillary neurons by GABAergic and galaninergic neurons in the ventrolateral preoptic nucleus of the rat. *Journal of Neuroscience*, 18(12), 4705–4721. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.18-12-04705.1998>
- Sicari, B. M., Agrawal, V., Siu, B. F., Medberry, C. J., Dearth, C. L., Turner, N. J., & Badylak, S. F. (2012). A murine model of volumetric muscle loss and a regenerative medicine approach for tissue replacement. *Tissue Engineering - Part A*, 18(19–20), 1941–1948. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2012.0475>
- Siegel, J. M. (2005). REM Sleep. *Principles and Practice of Sleep Medicine*, 120–135. <https://doi.org/10.1016/B0-72-160797-7/50017-3>
- Silva, A., Araujo, P., Zager, A., Tufik, S., & Andersen, M. L. (2011). Sex differences in sleep pattern of rats in an experimental model of osteoarthritis. *European Journal of Pain*, 15(6), 545–553. <https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2010.10.009>
- Simonelli, G., Mantua, J., Gad, M., St Pierre, M., Moore, L., Yarnell, A. M., Quartana, P. J., Braun, A., Balkin, T. J., Brager, A. J., & Capaldi, V. F. (2019). Sleep extension reduces pain sensitivity. *Sleep Medicine*, 54, 172–176. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2018.10.023>
- Simpson, N. S., Scott-Sutherland, J., Shiva Gautam, N. S., & Haack, M. (2018). Chronic exposure to insufficient sleep alters processes of pain habituation and sensitization. *Pain*, 176(1), 139–148. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001053>
- Singh, P., & Donlea, J. M. (2020). Bidirectional Regulation of Sleep and Synapse Pruning after Neural

- Injury. *Current Biology*, 30(6), 1063-1076.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.12.065>
- Skein, M., Duffield, R., Edge, J., Short, M. J., & Mündel, T. (2011). Intermittent-sprint performance and muscle glycogen after 30 h of sleep deprivation. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 43(7), 1301–1311. <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e31820abc5a>
- Smith, C., Kruger, M. J., Smith, R. M., & Myburgh, K. H. (2008). *The Inflammatory Response to Skeletal Muscle Injury Illuminating Complexities*. 38(11), 947–969.
- Smithies, T. D., Toth, A. J., Dunican, I. C., Caldwell, J. A., Kowal, M., & Campbell, M. J. (2021). The effect of sleep restriction on cognitive performance in elite cognitive performers: A systematic review. *Sleep*, 44(7), 1–15. <https://doi.org/10.1093/sleep/zsab008>
- Snyder, F., Hobson, J. A., Morrison, D. F., Goldfrank, F., & Robson, J. G. (1965). Changes in Respiration, Heart Rate, and Systolic Blood Pressure in Human Sleep. *Survey of Anesthesiology*, 9(4), 304. <https://doi.org/10.1097/00132586-196508000-00005>
- Song, C., Boly, M., Tagliazucchi, E., Laufs, H., & Tononi, G. (2022). fMRI spectral signatures of sleep. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(30), 1–12. <https://doi.org/10.1073/pnas.2016732119>
- Song, Y. H., Song, J. L., Delafontaine, P., & Godard, M. P. (2013). The therapeutic potential of IGF-I in skeletal muscle repair. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 24(6), 310–319. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2013.03.004>
- Souissi, N., Sesboüé, B., Gauthier, A., Larue, J., & Davenne, D. (2003). Effects of one night's sleep deprivation on anaerobic performance the following day. *European Journal of Applied Physiology*, 89(3–4), 359–366. <https://doi.org/10.1007/s00421-003-0793-7>
- Souriaux, M., Bestaven, E., Guillaud, E., Bertrand, S., Cabanas, M., Milan, L., Mayo, W., Garret, M., & Cazalets, J. R. (2018). 3-D motion capture for long-term tracking of spontaneous locomotor behaviors and circadian sleep/wake rhythms in mouse. *Journal of Neuroscience Methods*, 295(November 2017), 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2017.11.016>
- Sowho, M., Amatoury, J., Kirkness, J. P., & Patil, S. P. (2014). Sleep and respiratory physiology in adults. *Clinics in Chest Medicine*, 35(3), 469–481. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2014.06.002>
- Spiegel, K., Knutson, K., Leproult, R., Tasali, E., & Van Cauter, E. (2005). Sleep loss: A novel risk factor for insulin resistance and Type 2 diabetes. *Journal of Applied Physiology*, 99(5), 2008–2019. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00660.2005>
- Spiegel, K., Leproult, R., L'Hermite-Balériaux, M., Copinschi, G., Penev, P. D., & Van Cauter, E. (2004). Leptin levels are dependent on sleep duration: Relationships with sympathovagal balance, carbohydrate regulation, cortisol, and thyrotropin. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(11), 5762–5771. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-1003>
- Spiegel, K., Leproult, R., & Van Cauter, E. (1999). Impact of sleep debt on metabolic and endocrine function. *Lancet*, 354(9188), 1435–1439. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)01376-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)01376-8)
- Spiegel, K., Tasali, E., Leproult, R., & Van Cauter, E. (2009). Effects of poor and short sleep on glucose metabolism and obesity risk. *Nature Reviews Endocrinology*, 5(5), 253–261. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2009.23>
- Stein, J. M., & Padykula, H. A. (1962). Histochemical classification of individual skeletal muscle fibers of the rat. *The American Journal of Anatomy*, 110, 103–123. <https://doi.org/10.1002/aja.1001100203>
- Stephan, F. K., & Zucker, I. (1972). Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of

- rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(6), 1583–1586. <https://doi.org/10.1073/pnas.69.6.1583>
- Stephenson, R., Lim, J., Famina, S., Caron, A. M., & Dowse, H. B. (2012). Sleep-wake behavior in the rat: Ultradian rhythms in a light-dark cycle and continuous bright light. *Journal of Biological Rhythms*, 27(6), 490–501. <https://doi.org/10.1177/0748730412461247>
- Steriade, M., Deschenes, M., Domich, L., & Mulle, C. (1985). Abolition of spindle oscillations in thalamic neurons disconnected from nucleus reticularis thalami. *Journal of Neurophysiology*, 54(6), 1473–1497. <https://doi.org/10.1152/jn.1985.54.6.1473>
- Steriade, M., Domich, L., Oakson, G., & Deschenes, M. (1987). The deafferented reticular thalamic nucleus generates spindle rhythmicity. *Journal of Neurophysiology*, 57(1), 260–273. <https://doi.org/10.1152/jn.1987.57.1.260>
- Steriade, M., McCormick, D. A., & Sejnowski, T. J. (1993). Thalamocortical Oscillations in the Sleeping and Aroused Brain. *Science*, 262(5134), 679–685.
- Stoller, D. W. (2007). *Magnetic Resonance Imaging in Orthopaedics and Sports Medicine* (Issue vol.~1). Lippincott Williams & Wilkins. [https://books.google.co.jp/books?id=fkBSxDyH%5C\\_O4C](https://books.google.co.jp/books?id=fkBSxDyH%5C_O4C)
- Suppiah, H. T., Low, C. Y., Choong, G. C. W., & Chia, M. (2016). Restricted and unrestricted sleep schedules of Asian adolescent, high-level student athletes: effects on sleep durations, marksmanship and cognitive performance. *Biological Rhythm Research*, 47(4), 505–518. <https://doi.org/10.1080/09291016.2016.1151102>
- Sutton, B. C., & Opp, M. R. (2014). Musculoskeletal Sensitization and sleep: Chronic muscle pain fragments sleep of mice without altering its duration. *Sleep*, 37(3), 505–513. <https://doi.org/10.5665/sleep.3486>
- Swinbourne, R., Miller, J., Smart, D., Dulson, D., & Gill, N. (2018). The Effects of Sleep Extension on Sleep, Performance, Immunity and Physical Stress in Rugby Players. *Sports*, 6(2), 42. <https://doi.org/10.3390/sports6020042>
- Szymusiak, R., Alam, N., Steininger, T. L., & McGinty, D. (1998). Sleep-waking discharge patterns of ventrolateral preoptic/anterior hypothalamic neurons in rats. *Brain Research*, 803(1–2), 178–188. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(98\)00631-3](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(98)00631-3)
- Taheri, M., & Arabameri, E. (2012). The effect of sleep deprivation on choice Reaction time and anaerobic power of college student athletes. *Asian Journal of Sports Medicine*, 3(1), 15–20. <https://doi.org/10.5812/asjms.34719>
- Takala, T. E., & Virtanen, P. (2000). Biochemical composition of muscle extracellular matrix: The effect of loading. *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports*, 10(6), 321–325. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0838.2000.010006321.x>
- Takebayashi, S., Takasawa, H., Banzai, Y., Miki, H., Sasaki, R., Itoh, Y., & Matsubara, S. (1995). Sonographic findings in muscle strain injury: Clinical and MR imaging correlation. *Journal of Ultrasound in Medicine*, 14(12), 899–905. <https://doi.org/10.7863/jum.1995.14.12.899>
- Tang, X., & Sanford, L. D. (2002). Telemetric recording of sleep and home cage activity in mice. *Sleep*, 25(6), 691–699. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12224849>
- Tasali, E., Leproult, R., Ehrmann, D. A., & Van Cauter, E. (2008). Slow-wave sleep and the risk of type 2 diabetes in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(3), 1044–1049. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706446105>

- Taylor, W. E., Bhasin, S., Artaza, J., Byhower, F., Azam, M., Willard, D. H., Kull, F. C., & Gonzalez-Cadavid, N. (2001). Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C2C12 muscle cells. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, *280*(2 43-2), 221–228. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.2001.280.2.e221>
- Teran Santos, Jimenez-Gomez A, C.-G. J. (1999). The association between sleep apnea and the risk of traffic accidents. *N Engl J Med*, *340*, 847–851.
- Teyhen, D. S., Goffar, S. L., Shaffer, S. W., Kiesel, K., Butler, R. J., Tedaldi, A. M., Prye, J. C., Rhon, D. I., & Plisky, P. J. (2018). Incidence of musculoskeletal injury in US army unit types: A prospective cohort study. *Journal of Orthopaedic and Sports Physical Therapy*, *48*(10), 749–757. <https://doi.org/10.2519/jospt.2018.7979>
- Tidball, J. G. (2011). Mechanisms of muscle injury, repair, and regeneration. *Comprehensive Physiology*, *1*(4), 2029–2062. <https://doi.org/10.1002/cphy.c100092>
- Tidball, J. G., & Villalta, S. A. (2010). Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, *298*(5). <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00735.2009>
- Tobaldini, E., Fiorelli, E. M., Solbiati, M., Costantino, G., Nobili, L., & Montano, N. (2019). Short sleep duration and cardiometabolic risk: from pathophysiology to clinical evidence. *Nature Reviews Cardiology*, *16*(4), 213–224. <https://doi.org/10.1038/s41569-018-0109-6>
- Tonkin, J., Temmerman, L., Sampson, R. D., Gallego-colon, E., Barberi, L., Bilbao, D., Schneider, M. D., Musarò, A., & Rosenthal, N. (2015). *Monocyte / Macrophage-derived IGF-1 Orchestrates Murine Skeletal Muscle Regeneration and Modulates Autocrine Polarization*. *23*(7), 1189–1200. <https://doi.org/10.1038/mt.2015.66>
- Tononi, G., & Cirelli, C. (2003). Sleep and synaptic homeostasis: A hypothesis. *Brain Research Bulletin*, *62*(2), 143–150. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2003.09.004>
- Trachsel, L., Tobler, I., & Borbely, A. A. (1986). Sleep regulation in rats: Effects of sleep deprivation, light, and circadian phase. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, *251*(6 (20/6)). <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1986.251.6.r1037>
- Turek, F. W., & Takahashi, J. S. (2001). Introduction to circadian rhythms. *Biological Clock in Fish*, *12*, 1–7. <https://doi.org/10.1201/b10170>
- Uygun, D. S., Katsuki, F., Bolortuya, Y., Aguilar, D. D., McKenna, J. T., Thankachan, S., McCarley, R. W., Basheer, R., Brown, R. E., Strecker, R. E., & McNally, J. M. (2019). Validation of an automated sleep spindle detection method for mouse electroencephalography. *Sleep*, *42*(2), 1–13. <https://doi.org/10.1093/sleep/zsy218>
- Valle, X., Alentorn-Geli, E., Tol, J. L., Hamilton, B., Garrett, W. E., Pruna, R., Til, L., Gutierrez, J. A., Alomar, X., Balias, R., Malliaropoulos, N., Monllau, J. C., Whiteley, R., Witvrouw, E., Samuelsson, K., & Rodas, G. (2017). Muscle Injuries in Sports: A New Evidence-Informed and Expert Consensus-Based Classification with Clinical Application. *Sports Medicine*, *47*(7), 1241–1253. <https://doi.org/10.1007/s40279-016-0647-1>
- Van Cauter, E., Latta, F., Nedeltcheva, A., Spiegel, K., Leproult, R., Vandenbril, C., Weiss, R., Mockel, J., Legros, J. J., & Copinschi, G. (2004). Reciprocal interactions between the GH axis and sleep. *Growth Hormone and IGF Research*, *14*(SUPPL. A), 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.ghir.2004.03.006>
- Van Cauter, E., Plat, L., & Copinschi, G. (1998). Interrelations between sleep and the somatotrophic axis. *Sleep*, *21*(6), 553–566. <https://doi.org/10.1093/sleep/21.6.553>

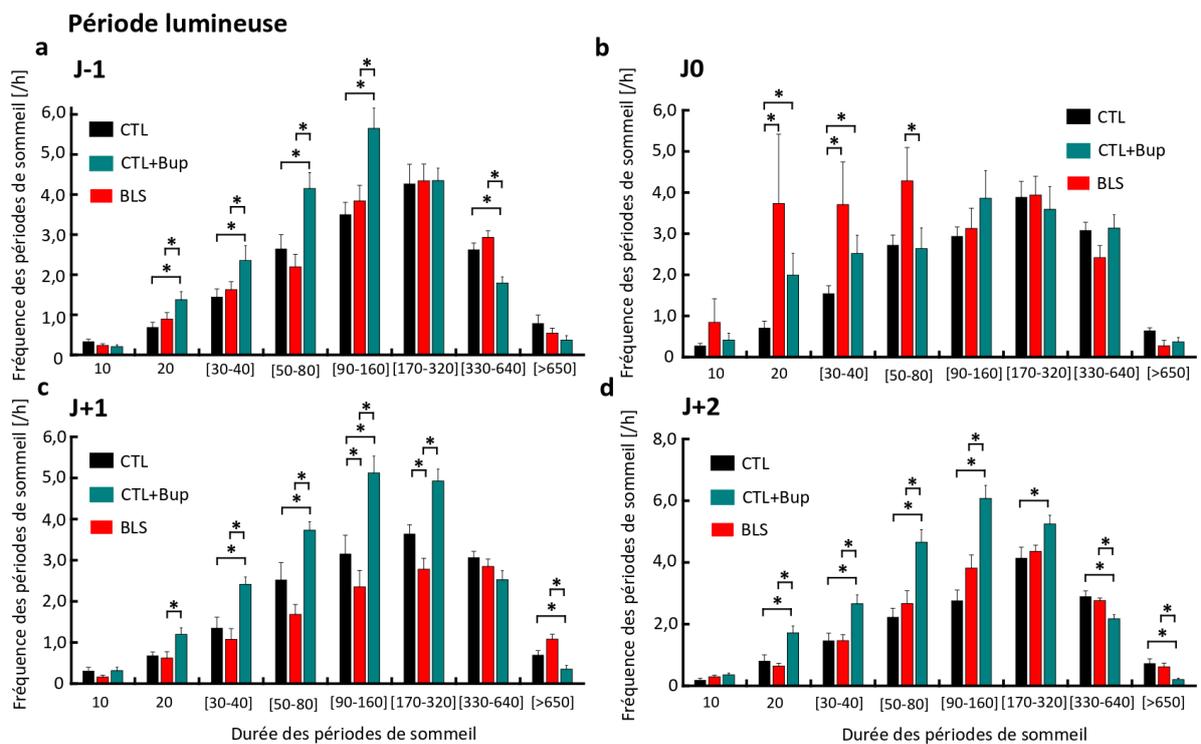
- Van Leeuwen, W. M. A., Hublin, C., Sallinen, M., Härmä, M., Hirvonen, A., & Porkka-heiskanen, T. (2010). Prolonged sleep restriction affects glucose metabolism in healthy young men. *International Journal of Endocrinology*, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/108641>
- Vandamme, T. F. (2014). Use of rodents as models of human diseases. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 6(1), 2–9. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.124301>
- Vanneau, T., Quiquempoix, M., Trignol, A., Sauvet, F., Léger, D., Gomez-Merino, D., & Chennaoui, M. (2023). Muscle injury induces an increase in total and NREM sleep time. *Sleep*, 1–22.
- Vanneau, T., Quiquempoix, M., Trignol, A., Verdonk, C., Van Beers, P., Sauvet, F., Gomez-Merino, D., & Chennaoui, M. (2021). Determination of the sleep–wake pattern and feasibility of NREM/REM discrimination using the non-invasive piezoelectric system in rats. *Journal of Sleep Research*, 30(6), 1–12. <https://doi.org/10.1111/jsr.13373>
- Vasic, V., & Schmidt, M. H. H. (2017). Resilience and vulnerability to pain and inflammation in the hippocampus. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(4). <https://doi.org/10.3390/ijms18040739>
- Venancio, D. P., & Suchecki, D. (2015). Prolonged REM sleep restriction induces metabolic syndrome-related changes: Mediation by pro-inflammatory cytokines. *Brain, Behavior, and Immunity*, 47(December), 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.12.002>
- Vgontzas, A. N., Pejovic, S., Zoumakis, E., Lin, H. M., Bixler, E. O., Basta, M., Fang, J., Sarrigiannidis, A., & Chrousos, G. P. (2007). Daytime napping after a night of sleep loss decreases sleepiness, improves performance, and causes beneficial changes in cortisol and interleukin-6 secretion. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 292(1), 253–261. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00651.2005>
- Vivaldi, E. A., Ocampo-Garcés, A., & Villegas, R. (2005). Short-term homeostasis of REM sleep throughout a 12:12 light:dark schedule in the rat. *Sleep*, 28(8), 931–943. <https://doi.org/10.1093/sleep/28.8.931>
- Volpi, P., Melegati, G., Tornese, D., & Bandi, M. (2004). Muscle strains in soccer: A five-year survey of an Italian major league team. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 12(5), 482–485. <https://doi.org/10.1007/s00167-003-0478-0>
- Vyazovskiy, V. V. (2015). Sleep, recovery, and metaregulation: Explaining the benefits of sleep. *Nature and Science of Sleep*, 7, 171–184. <https://doi.org/10.2147/NSS.S54036>
- Vyazovskiy, V. V., Achermann, P., Borbély, A. A., & Tobler, I. (2004). The dynamics of spindles and EEG slow-wave activity in NREM sleep in mice. *Archives Italiennes de Biologie*, 142(4), 511–523.
- Vyazovskiy, V. V., Achermann, P., & Tobler, I. (2007). Sleep homeostasis in the rat in the light and dark period. *Brain Research Bulletin*, 74(1–3), 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2007.05.001>
- Vyazovskiy, V. V., Cirelli, C., Pfister-Genskow, M., Faraguna, U., & Tononi, G. (2008). Molecular and electrophysiological evidence for net synaptic potentiation in wake and depression in sleep. *Nature Neuroscience*, 11(2), 200–208. <https://doi.org/10.1038/nn2035>
- Wadhwa, M., Prabhakar, A., Ray, K., Roy, K., Kumari, P., Jha, P. K., Kishore, K., Kumar, S., & Panjwani, U. (2017). Inhibiting the microglia activation improves the spatial memory and adult neurogenesis in rat hippocampus during 48h of sleep deprivation. *Journal of Neuroinflammation*, 14(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0998-z>
- Wall, R. J., & Shani, M. (2008). Are animal models as good as we think ? *Theriogenology*, 69, 2–9.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.09.030>

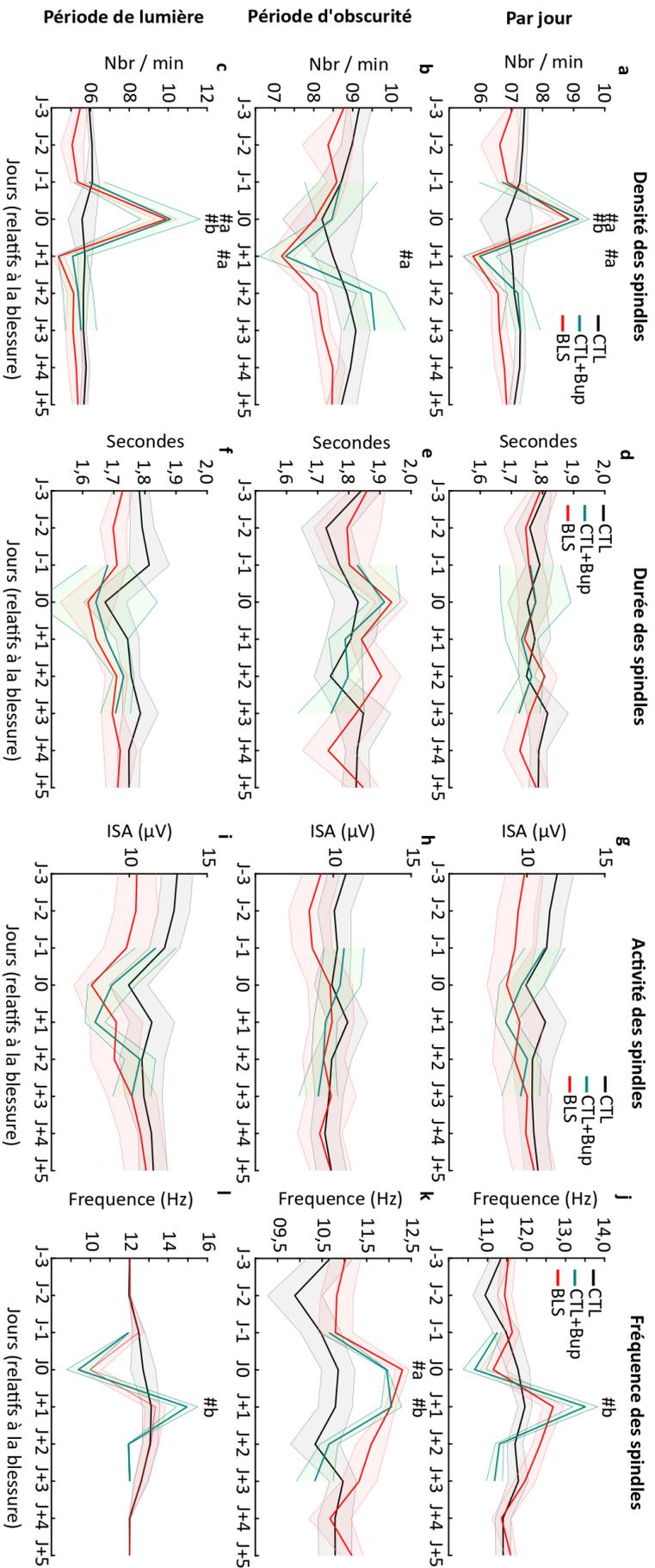
- Walter, W. G. (1954). The living brain. In *Psychosomatic Medicine* (Vol. 16, Issue 4).  
[https://journals.lww.com/psychosomaticmedicine/Fulltext/1954/07000/Book\\_Reviews.12.aspx](https://journals.lww.com/psychosomaticmedicine/Fulltext/1954/07000/Book_Reviews.12.aspx)
- Wang, J., Wang, J., Xing, G. G., Li, X., & Wan, Y. (2016). Enhanced Gamma oscillatory activity in rats with chronic inflammatory pain. *Frontiers in Neuroscience*, *10*(NOV), 1–8.  
<https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00489>
- Wang, X. L., & Li, L. (2021). Circadian Clock Regulates Inflammation and the Development of Neurodegeneration. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *11*(September), 1–16.  
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.696554>
- Wei, H. G., Riel, E., Czeisler, C. A., & Dijk, D. J. (1999). Attenuated amplitude of circadian and sleep-dependent modulation of electroencephalographic sleep spindle characteristics in elderly human subjects. *Neuroscience Letters*, *260*(1), 29–32. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(98\)00851-9](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(98)00851-9)
- White, J. P., Gao, S., Puppa, M. J., Sato, S., Welle, S. L., & Carson, J. A. (2013). Testosterone regulation of Akt/mTORC1/FoxO3a Signaling in Skeletal Muscle. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *365*(2), 174–186. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2006.05.022>
- Wilson, J. M., Loenneke, J. P., Jo, E., Wilson, G. J., Zourdos, M. C., & Kim, J. S. (2012). The effects of endurance, strength, and power training on muscle fiber type shifting. In *Journal of Strength and Conditioning Research* (Vol. 26, Issue 6, pp. 1724–1729).  
<https://doi.org/10.1519/JSC.0b013e318234eb6f>
- Woalder. (2017). Confounding effect of EEG implantation surgery: inadequacy of surgical control in a two hit model of temporal lobe epilepsy. *Physiology & Behavior*, *176*(1), 139–148.  
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Woldt, E., Sebti, Y., Solt, L. A., Duhem, C., Lancel, S., Eeckhoutte, J., Hesselink, M. K. C., Paquet, C., Delhaye, S., Shin, Y., Kamenecka, T. M., Schaart, G., Lefebvre, P., Nevière, R., Burris, T. P., Schrauwen, P., Staels, B., & Duez, H. (2013). Rev-erb- $\alpha$  modulates skeletal muscle oxidative capacity by regulating mitochondrial biogenesis and autophagy. *Nature Medicine*, *19*(8), 1039–1046. <https://doi.org/10.1038/nm.3213>
- Wosczyzna, M. N., & Rando, T. A. (2018). A Muscle Stem Cell Support Group: Coordinated Cellular Responses in Muscle Regeneration. *Developmental Cell*, *46*(2), 135–143.  
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.06.018>
- Wuarin, L., Zahnd, G. R., Kaufmann, F., Burcklen, L., & Adler, J. (1987). Hyperalgesia in spontaneous and experimental animal models of diabetic neuropathy. *Diabetologia*, *30*, 653–658.
- Xie, L., Kang, H., Xu, Q., Chen, M. J., Liao, Y., Thiyagarajan, M., O'Donnell, J., Christensen, D. J., Nicholson, C., Iliff, J. J., Takano, T., Deane, R., & Nedergaard, M. (2013). Sleep drives metabolite clearance from the adult brain. *Science*, *342*(6156), 373–377.  
<https://doi.org/10.1126/science.1241224>
- Yaghouby, F., Donohue, K. D., O'Hara, B. F., & Sunderam, S. (2016). Noninvasive Dissection of Mouse Sleep Using a Piezoelectric Motion Sensor. *Journal of Neuroscience Methods*, *259*(12), 90–100.  
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Yamabe, M., Horie, K., Shiokawa, H., Funato, H., Yanagisawa, M., & Kitagawa, H. (2019). MC-SleepNet: Large-scale Sleep Stage Scoring in Mice by Deep Neural Networks. *Scientific Reports*, *9*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51269-8>

- Yamadori. (1971). Role of spindles in the onset of sleep. *Kobe Journal of Medicine Science*, 17, 97–111.
- Yang, D. F., Shen, Y. L., Wu, C., Huang, Y. S., Lee, P. Y., Er, N. X., Huang, W. C., & Tung, Y. T. (2019). Sleep deprivation reduces the recovery of muscle injury induced by high-intensity exercise in a mouse model. *Life Sciences*, 235(September), 116835. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116835>
- Yartsev, M. M. (2017). The emperor ' s new wardrobe: Rebalancing diversity of animal models in neuroscience research. *Science*, 358(October), 466–469.
- Yellin, H., & Guth, L. (1970). The histochemical classification of muscle fibers. *Experimental Neurology*, 26(2), 424–432. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(70\)90137-8](https://doi.org/10.1016/0014-4886(70)90137-8)
- Yin, H., Price, F., & Rudnicki, M. A. (2013). Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiological Reviews*, 93(1), 23–67. <https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2011>
- Yun, Y. R., Won, J. E., Jeon, E., Lee, S., Kang, W., Jo, H., Jang, J. H., Shin, U. S., & Kim, H. W. (2010). Fibroblast growth factors: Biology, function, and application for tissue regeneration. *Journal of Tissue Engineering*, 1(1), 1–18. <https://doi.org/10.4061/2010/218142>
- Z, L. (2001). Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone. *Journal of Clinical Pathology*, 54(1), 311–316.
- Zayachkivska, O., & Coenen, A. M. L. (2016). *beck's-memorial an essay in honour of his 150th birthday AN ESSAY IN HONOUR OF HIS 150 TH BIRTHDAY Anton Coenen and Oksana Zayachkivska with Stanis ł aw Konturek and Wies ł aw Pawlik Kraków ( Poland ), Lviv ( Ukraine ), Nijmegen ( the Netherlands )* (Issue January).
- Zegarra-Valdivia, J. A., Pignatelli, J., Fernandez de Sevilla, M. E., Fernandez, A. M., Munive, V., Martinez-Rachadell, L., Nuñez, A., & Torres Aleman, I. (2020). Insulin-like growth factor I modulates sleep through hypothalamic orexin neurons. *FASEB Journal*, 34(12), 15975–15990. <https://doi.org/10.1096/fj.202001281RR>
- Zeng, T., Mott, C., Mollicone, D., & Sanford, L. D. (2012). Automated determination of wakefulness and sleep in rats based on non-invasively acquired measures of movement and respiratory activity. *Journal of Neuroscience Methods*, 204(2), 276–287. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2011.12.001>
- Zerouali, Y., Lina, J. M., Sekerovic, Z., Godbout, J., Dube, J., Jolicoeur, P., & Carrier, J. (2014). A time-frequency analysis of the dynamics of cortical networks of sleep spindles from MEG-EEG recordings. *Frontiers in Neuroscience*, 8(OCT), 14–16. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00310>
- Zhang, J., Obál, F., Zheng, T., Fang, J., Taishi, P., & Krueger, J. M. (1999). Intrapreoptic microinjection of GHRH or its antagonist alters sleep in rats. *Journal of Neuroscience*, 19(6), 2187–2194. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-06-02187.1999>
- Zhu, P., Hamlish, N. X., Thakkar, A. V., Steffek, A. W. T., Rendleman, E. J., Khan, N. H., Waldeck, N. J., DeVilbiss, A. W., Martin-Sandoval, M. S., Mathews, T. P., Chandel, N. S., & Peek, C. B. (2022). BMAL1 drives muscle repair through control of hypoxic NAD+ regeneration in satellite cells. *Genes and Development*, 36(3–4), 149–166. <https://doi.org/10.1101/gad.349066.121>

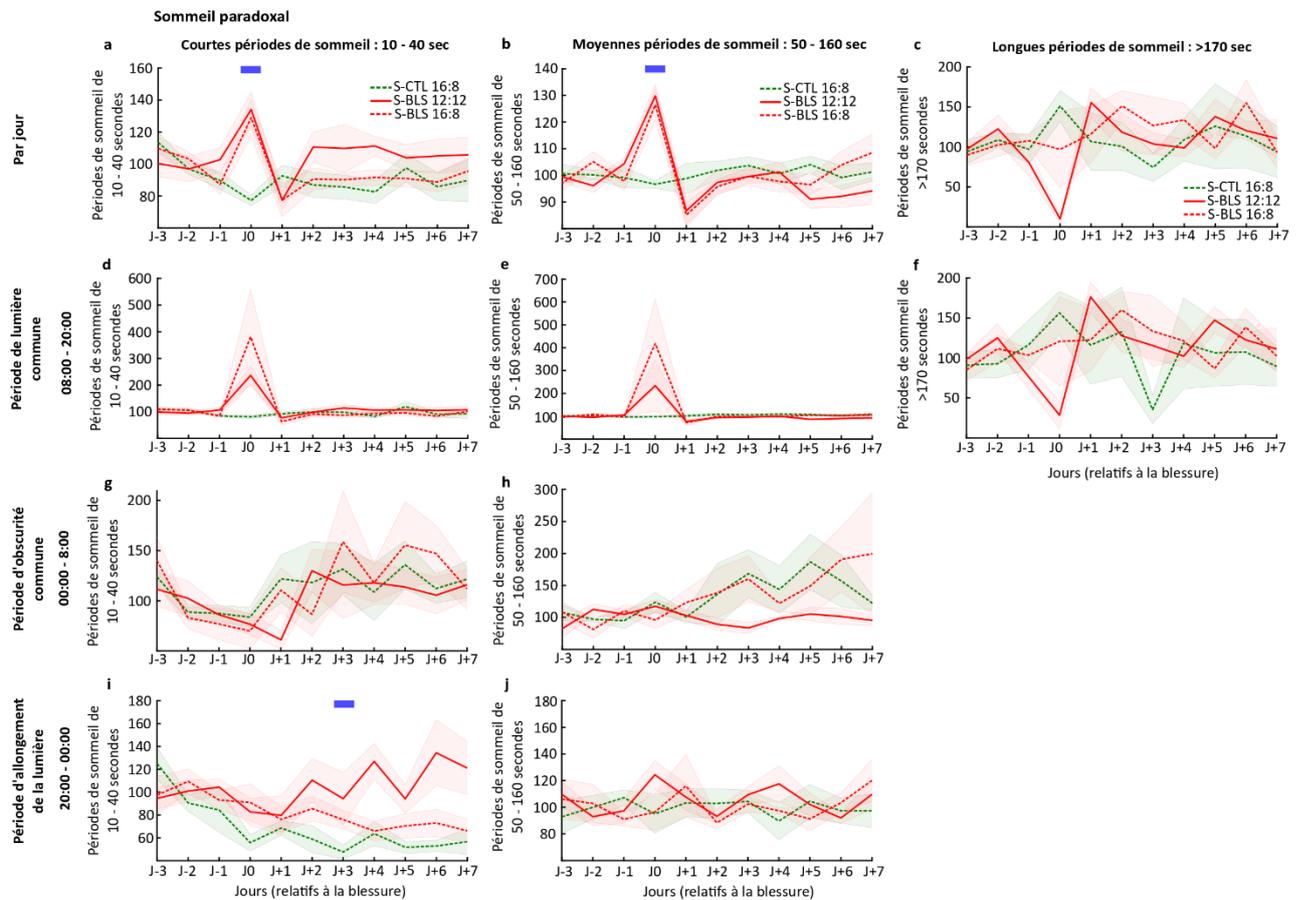
# ANNEXES



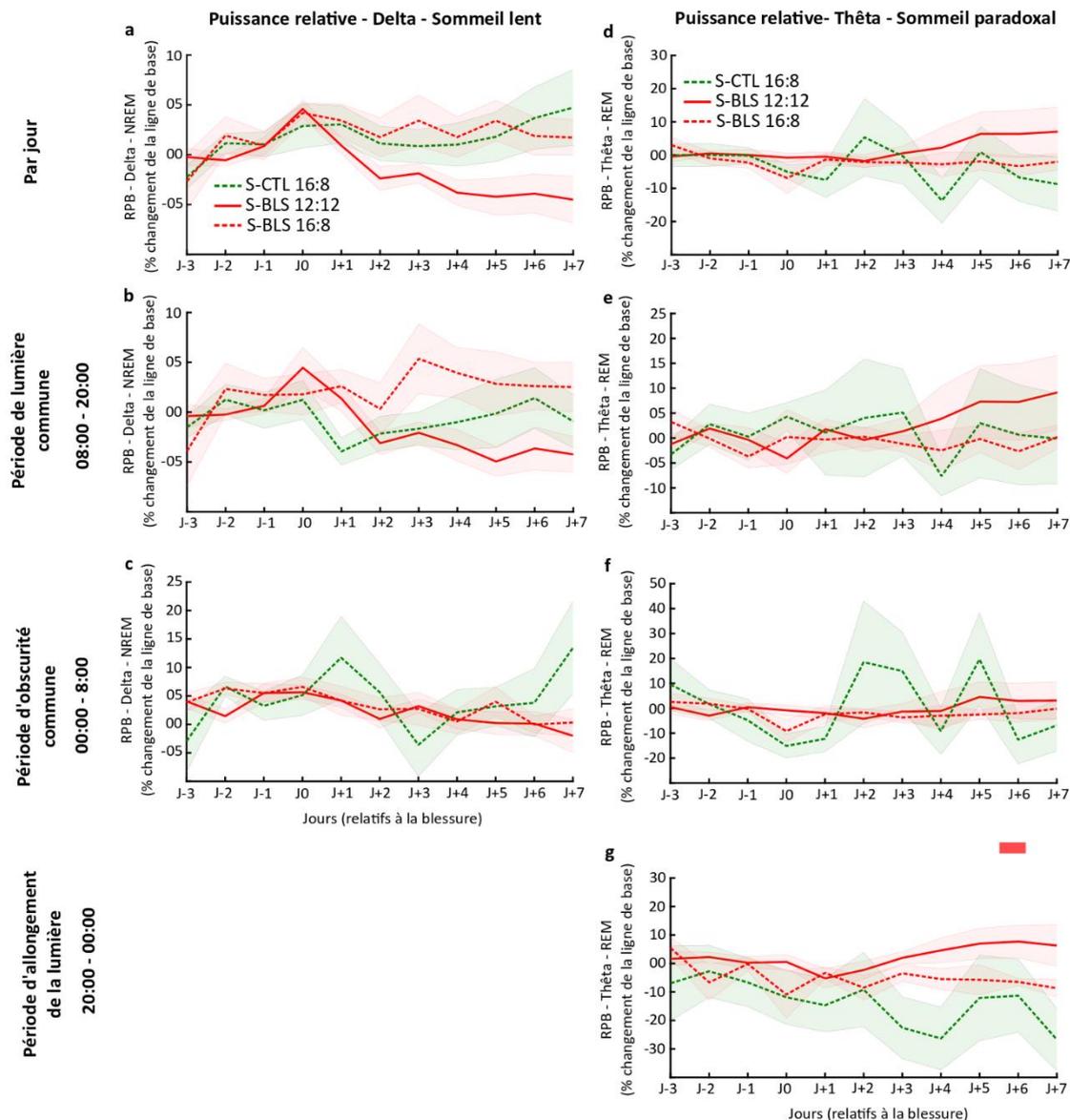
**Figure 98 : Fréquence des périodes de sommeil en fonction de leur durée pour la période lumineuse de J-1 à J+2. a** Nombre de périodes de sommeil par heure de sommeil en fonction de leur durée (catégories : [10] ; [20] ; [30-40] ; [50-80] ; [90-160] ; [170-320] ; [330-640] ; [>650] secondes) pour les animaux contrôles (CTL, barres noires), les animaux contrôles+buprénorphine (CTL+Bup, barres bleues) et pour les animaux blessés (BLS, barres rouges) pour la période lumineuse à J-1, **b** à J0, **c** à J+1 et **d** à J+2. \* :  $p < 0,05$ . Friedman ANOVA & test post-hoc Durbin-Conover.



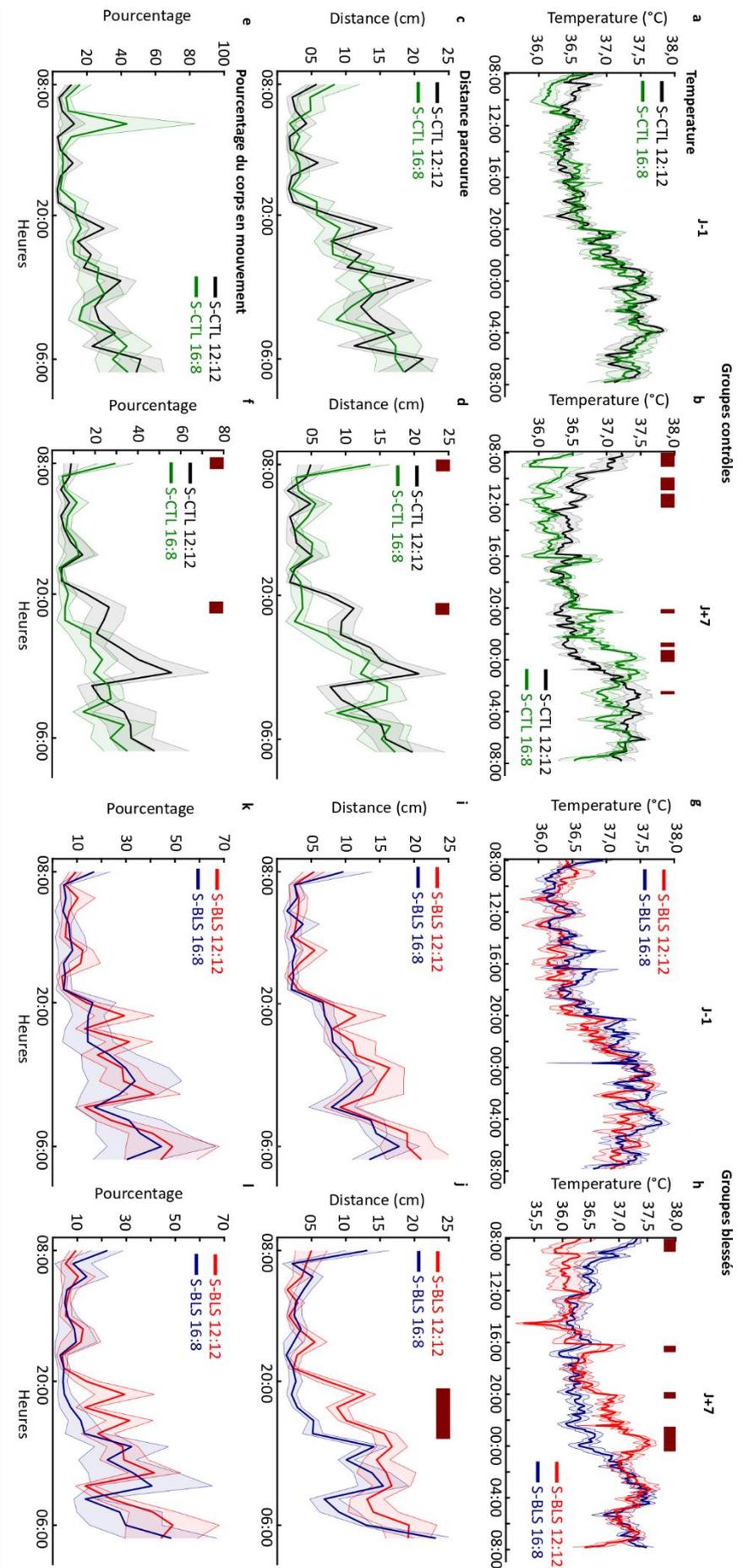
**Figure 99 : Paramètres des spindles en réponse à la blessure musculaire.** a Densité en spindles (nombre de spindles/minute de sommeil) de J-3 à J+5, pour le groupe contrôle (CTL, courbe noire), du groupe contrôle+buprénorphine (CTL+Bup, courbe verte) et du groupe blessure (BLS, courbe rouge) par jour, b pendant la période d'obscurité et c pendant la période de lumière. d, e, f similaire à a, b, c pour la durée des spindles, g, h, i pour l'activité des spindles et j, k, l pour la fréquence des spindles. L'erreur standard de la moyenne est représentée par l'aire autour de la courbe. #a :  $p < 0,05$  entre CTL et BLS ; #b :  $p < 0,05$  entre CTL et CTL+Bup. Friedman ANOVA & test post-hoc Durbin-Conover.



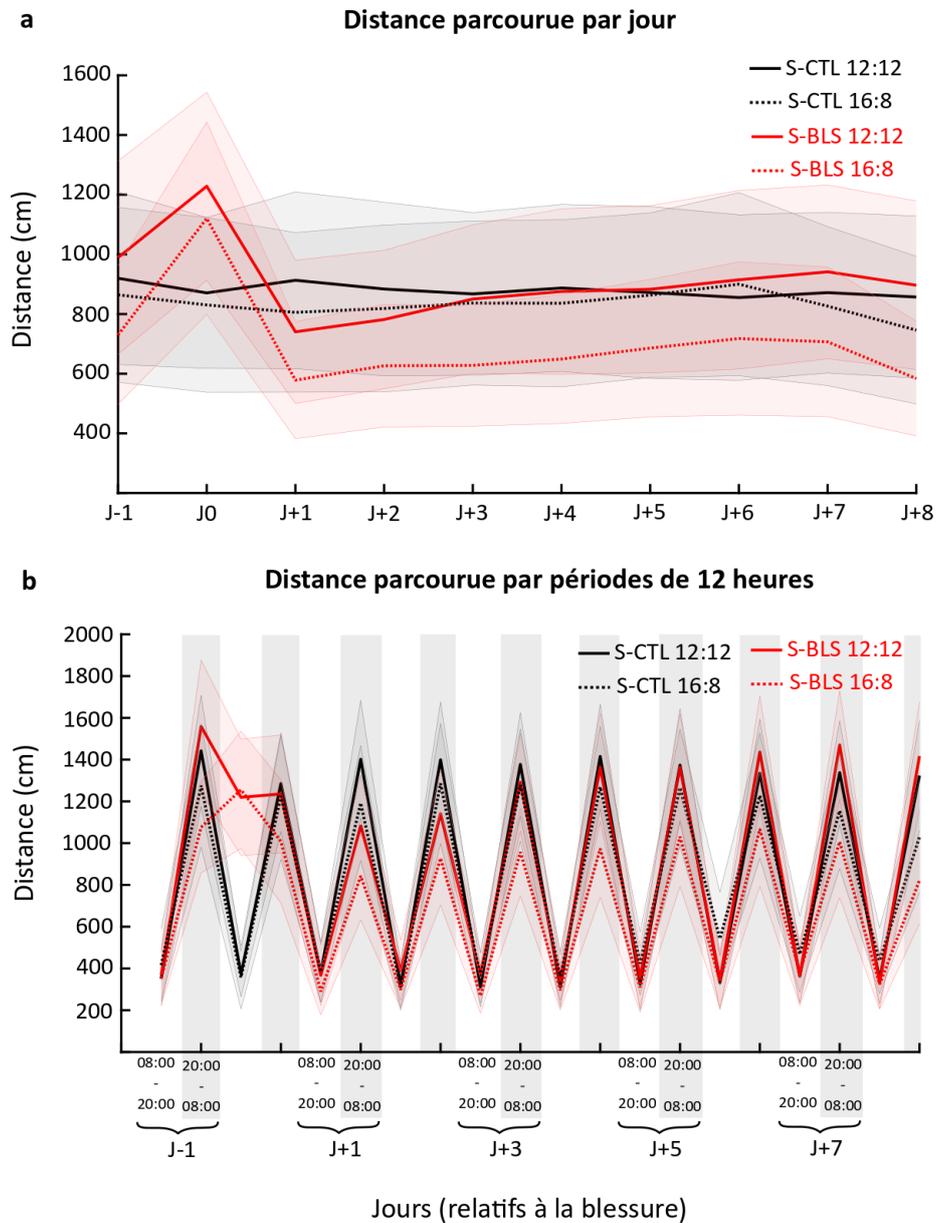
**Figure 100 : Fréquence des périodes de sommeil paradoxal en fonction de leur durée par jour, pour la période lumineuse commune et la période d'obscurité commune. a** Fréquence des périodes de sommeil paradoxal de 10 à 40 secondes pour les animaux des groupes « Sommeil » (S-) implantés avec un émetteur EEG/EMG : contrôles 16:8 (S-CTL 16:8, courbe pointillée verte), blessés 12:12 (S-BLS 12:12, courbe pleine rouge) et blessés 16:8 (S-BLS 16:8, courbe pointillée rouge) de J-3 à J+7 en pourcentage de changement par rapport à la ligne de base (de J-3 à J-1), **b** pour les périodes de sommeil de 50 à 160 secondes et **c** pour les périodes de sommeil de >170 secondes. **d**, **e**, **f** respectivement similaires à **a**, **b**, **c** pour la période de lumière commune et **g**, **h**, respectivement similaire à **d**, **f** pour la période d'obscurité commune et **i**, **j** pour la période d'allongement de la lumière, n=8 animaux par groupe. Les rectangles bleus indiquent les différences statistiques ( $p < 0,05$ ) entre les groupes S-CTL 16:8 et S-BLS 16:8 évalués par des tests statistiques par permutations avec une correction de Benjamini-Hochberg (voir Méthodes), n=8 animaux par groupe.



**Figure 101 : Puissance relative des ondes delta pendant le sommeil lent et des ondes thêta pendant le sommeil paradoxal.** **a** Puissance relative des ondes delta (0,5 – 4 Hz) pendant le sommeil lent pour les animaux des groupes « Sommeil » (S-) implantés avec un émetteur EEG/EMG : contrôles 16:8 (S-CTL 16:8, courbe pointillée verte), blessés 12:12 (S-BLS 12:12, courbe pleine rouge) et blessés 16:8 (S-BLS 16:8, courbe pointillée rouge) de J-3 à J+7 en pourcentage de changement par rapport à la ligne de base (de J-3 à J-1) par jour, **b** pendant la période de lumière commune, **c** pendant la période d'obscurité commune (les données pour la période d'allongement de la lumière sont présentées en **Figure 84**). **d**, **e**, **f** similaires à **a**, **b**, **c** pour la puissance relative des ondes thêta (4,25 – 8,0 Hz) pendant le sommeil paradoxal et **g** pendant la période d'allongement de la lumière. Les rectangles rouges indiquent les différences statistiques ( $p < 0,05$ ) entre les groupes S-BLS 12:12 et S-BLS 16:8 évalués par des tests statistiques par permutations avec une correction de Benjamini-Hochberg (voir Méthodes),  $n=8$  animaux par groupe.



**Figure 102 : Évolution des rythmes circadiens de la température sous-cutanée et de l'activité locomotrice après l'allongement de la photopériode.** a Température sous-cutanée heure par heure à J-1 pour les animaux des groupes « Sommeil » (S-) implantés avec un émetteur EEG/EMG : contrôlés 12:12 (S-CTL 12:12, **courbe noire**) et les animaux contrôlés 16:8 (S-CTL 16:8, **courbe verte**) et b à J+7. c Distance parcourue (en centimètres) à J-1 dans la cage de vie des animaux évaluée heure par heure par détection automatique des animaux sur des vidéos-surveillance (voir *Méthodes*) pour les animaux S-CTL 12:12 (courbe noire) et les animaux S-CTL 16:8 (**courbe verte**), d à J+7. e, f similaire à c, d pour le pourcentage du corps en mouvement. g-l similaire à a-f pour les animaux blessés 12:12 (S-BLS 12:12, **courbe rouge**) et les animaux blessés 16:8 (S-BLS 16:8, **courbe bleue**). Les rectangles marron indiquent les différences statistiques ( $p < 0,05$ ) entre les deux groupes d'animaux évalués par des tests statistiques par permutations avec une correction de Benjamini-Hochberg (voir *Méthodes*),  $n = 8$  animaux par groupe.



**Figure 103 : Évolution de la distance parcourue par jour et par période de 12 heures.** **a** Distance parcourue (en centimètres) par jour pour les animaux des groupes « Sommeil » (S-) implantés avec un émetteur EEG/EMG : contrôles 12:12 (S-CTL 12:12, courbe noire), contrôle 16:8 (S-CTL 16:8, courbe noire pointillée), blessés 12:12 (S-BLS 12:12, courbe pleine rouge) et blessés 16:8 (S-BLS 16:8, courbe pointillée rouge) dans leur cage de vie de J-1 à J+8, **b** similaire à a pour la distance parcourue par périodes de 12 heures (de 08:00 à 20:00 et de 20:00 à 08:00).

# ARTICLES PUBLIÉS

---



## Review

## How does sleep help recovery from exercise-induced muscle injuries?

Mounir Chennaoui<sup>a,b,\*</sup>, Théo Vanneau<sup>a,b</sup>, Aurélie Trignol<sup>a,b</sup>, Pierrick Arnal<sup>c</sup>, Danielle Gomez-Merino<sup>a,b</sup>, Christophe Baudot<sup>d</sup>, Jesus Perez<sup>d</sup>, Sebastiano Pochettino<sup>d</sup>, Cristiano Eirale<sup>d,e</sup>, Hakim Chalabi<sup>d,e,\*</sup>

<sup>a</sup> French Armed Forces Biomedical Research Institute (IRBA), France

<sup>b</sup> Paris University, Vigilance Fatigue SOMmeil unit (VIFASOM) EA 7330, France

<sup>c</sup> Dreem, Science Team, New York, USA

<sup>d</sup> Paris Saint Germain FC, France

<sup>e</sup> Aspetar Sports and Orthopedics Hospital, Qatar

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 3 July 2020

Received in revised form 20 March 2021

Accepted 11 May 2021

Available online 18 May 2021

## Keywords:

Exercise injuries

Muscle regeneration

Sleep deprivation

Sleep extension

## ABSTRACT

**Objectives:** Athletes and military personnel may experience sleep disturbances due to conditions of training and competitions or military missions/field operations. The risk of muscle injuries is greater for them when sleep duration decreases, and training load increases simultaneously, which can be exacerbated by fatigue. Accumulating evidence demonstrates that sleep extension improved performance, pain sensitivity and GH/IGF-I anabolic responses, which may be beneficial in accelerating recovery from muscle injuries.

**Design & Methods:** This narrative review describes the importance of sleep for the recovery/prevention of exercise-induced muscle injuries and provides perspectives on the transferability of currently available scientific evidence to the field.

**Results:** The first part presents the role of sleep and its interaction with the circadian system for the regulation of hormonal and immune responses, and provides information on sleep in athletes and soldiers and its relationship to injury risk. The second part is an overview of muscle injuries in sport and presents the different phases of muscle regeneration and repair, i.e. degeneration, inflammation, regeneration, remodeling and maturation. Part three provides information on the deleterious effects of sleep deprivation on muscle tissue and biological responses, and on the benefits of sleep interventions. Sleep extension could potentially help and/or prevent recovery from exercise-induced muscle-injuries through increasing local IGF-I and controlling local inflammation.

**Conclusions:** Although the science of sleep applied to sport is still an emerging field, the current scientific literature shows many potential physiological pathways between sleep and exercise-related muscle injuries. More direct studies are needed to establish clear guidelines for medical personnel and coaches.

© 2021 The Authors. Published by Elsevier Ltd. on behalf of Sports Medicine Australia. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## Practical recommendations

Raising athletes' and military soldiers' awareness of the multiple consequences of sleep deprivation has become essential to encourage them to prioritize getting optimal sleep in order to promote recovery processes after muscle injuries, and as well as to prevent injuries. The development of sleep interventions and also diet-based interventions remained important for increasing sleep duration, improving the quality and quantity of sleep, and consequently pain sensitivity and psychological well-being. Specific recommendations to improve the quality of sleep may be to limit exposure to bright light from smartphones or tablets, and to noise in and outside the bedroom, and also to adjust the ambient temperature, and limit fatigue linked to combined stressors. The concept of sleep extension could lead to better regeneration of a muscle

injury given the increase in IGF-1 levels and possibly the control of local inflammation. Future studies are necessary in humans and animals to assess the impact of sleep optimized strategies on physiological and clinical mechanisms of recovery from exercise induced muscle injuries and the consecutive athletic performances.

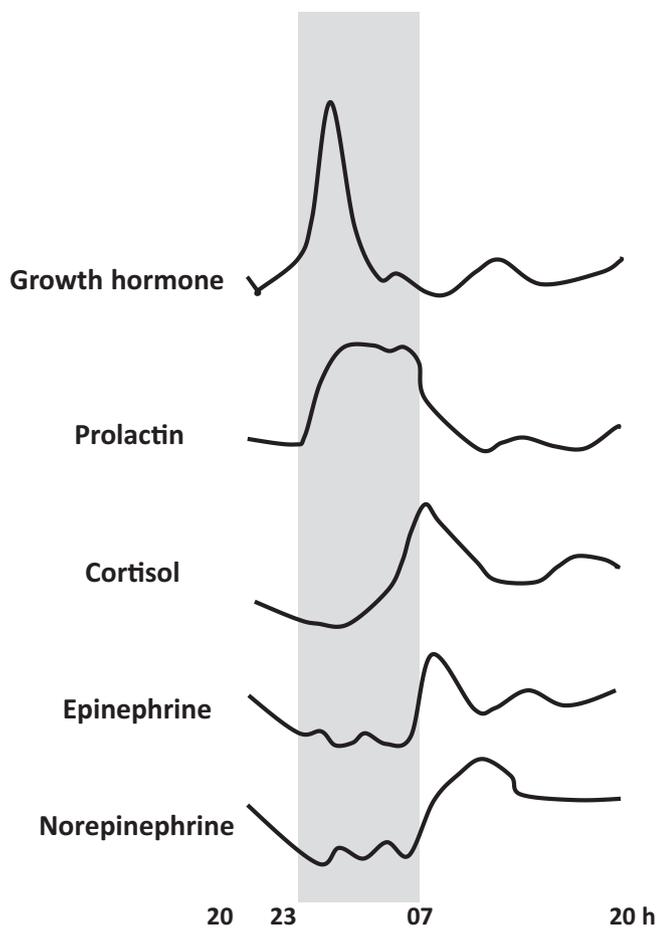
## 1. Introduction

## What is sleep?

Sleep is a basic physiological need and is an important component of human life. Sleep in most individuals occupies between 20% and 40% of the day, and serves multiple restorative functions in the body and the brain through numerous biological processes and systems. Sleep improves memory recall, regulates glucose metabolism, reduces mental fatigue, and plays important role in tissue repair, synaptic homeostasis, and immune-inflammatory responses.<sup>1–3</sup> The restorative function of

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: [mounirchennaoui@gmail.com](mailto:mounirchennaoui@gmail.com) (M. Chennaoui), [hchalabi@psg.fr](mailto:hchalabi@psg.fr) (H. Chalabi).



**Fig. 1.** Effects of sleep and the circadian system on levels of growth hormone (GH), prolactin, cortisol, epinephrine, and norepinephrine in healthy young men during 24 h under conditions of habitual sleep. Adapted from Lange et al., 2010<sup>61</sup>

sleep also includes the removal of toxic waste byproducts in the brain which have accumulated throughout the day.<sup>1</sup> To promote health, it is recommended that adults sleep at least 7 h per night.

Sleep in humans is divided into two major phases, the first being non-rapid eye movement (NREM) which is predominant during the early part of sleep and decreases in intensity and duration across the sleep period, and the second is rapid eye movement (REM) (also called paradoxical sleep) which becomes more intense and extensive towards the end of the sleep period.<sup>4</sup> The NREM sleep includes three stages, N1, N2, and N3 the deeper or delta wave sleep. Sleep is an important physiologic process controlled in part by an internal circadian clock and in part by a homeostatic mechanism where the pressure for sleep increases in proportion to the duration of prior wakefulness.<sup>2</sup> The circadian system regulates physiological and behavioral processes such as the sleep–wake cycle, locomotor activity, cardiovascular and digestive processes, hormones secretion, body temperature, metabolism, and immunity (Fig. 1).<sup>5</sup>

Sleep and its different stages are characterized by their respective neurochemical milieu of neurotransmitters and hormones and the activity patterns in various endocrine systems. Interaction between sleep and the circadian system regulates hormonal control including melatonin, the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis with cortisol, the hypothalamic–pituitary–thyroid axis, and epinephrine. Moreover, sleep is accompanied by a marked increase in growth hormone (GH), prolactin, and melatonin release, as well as downregulation of the HPA axis and the sympathetic nervous system (SNS).<sup>5,6</sup> Consequently, there is a nocturnal decrease in plasma cortisol, epinephrine and

norepinephrine levels. A rapid increase in plasma thyroid stimulating hormone (TSH) levels is also observed in the early evening, beginning 4–5 h before the habitual bedtime. However, the influence of sleep on GH secretion is stronger than the circadian system's influence. A major increase of GH levels occurred soon after sleep onset irrespective of the time of day that sleep takes place, and a surge occurs fairly soon after recommencement of sleep when nocturnal sleep is interrupted. The GH secretion is observed preferentially during slow-wave sleep.

The interaction between sleep and the circadian system also exerts a strong regulatory influence on immune function. During nocturnal sleep, hormones with proinflammatory action and cytokines are synchronized to facilitate the initiation of adaptive immune responses in lymph nodes.<sup>7</sup> Acute and chronic sleep deprivation causes an imbalance in the catabolic/anabolic hormonal ratio and increases markers of systemic inflammation. Increases in the catabolic cortisol, catecholamines and TSH levels have been previously observed and also decreases in the anabolic hormones including testosterone, GH and the GH-related growth factor IGF-I.<sup>3,5,6</sup> In support of these observations on the importance of sleep, numerous studies indicated that a sleep debt may have adverse consequences on cognitive capacities, vigilance, fatigue, mood disorders, and stress, even in young healthy individuals, through perturbations of endocrine secretions and/or sub-clinical inflammatory responses.<sup>3,8</sup>

#### Exercise and sleep

Sleep and exercise influence each other through complex and reciprocal interactions, including multiple physiological and psychological pathways. It is now clear that exercise represents a potential complementary or alternative approach to improving adult sleep. A systematic review of previous meta-analyses suggests that exercise is associated with significant improvements in the apnea-hypopnea index, overall sleep quality, subjective sleep, and sleep latency.<sup>9</sup> In this study, the methodological quality ranged from 36% to 64% while quality of evidence was very low. The link between exercise and sleep is in fact subject to multiple moderating factors such as gender, age, fitness level, quality of sleep and exercise characteristics (intensity, duration, time of day, environment, etc.).<sup>10,11</sup> The beneficial impact of exercise on sleep quality likely implicated mood, the interaction of circadian rhythm, and physiological effects on thermoregulation, cardiac and autonomic function, and hormonal and immune responses.<sup>10</sup> The practical recommendations for improving sleep seem on moderate aerobic exercise training.

In contrast, endurance athletes and soldiers with obvious signs of overreaching/overtraining (i.e., high perceived fatigue and decreased performance) reported a progressive decrease in sleep quality indices, slight reductions in sleep quantity, and an increase in injury and upper respiratory tract infections.<sup>12,13</sup>

#### Sleep in athlete and military populations

Sleep is an important element in optimizing athletic performance and recovery, and the consequences of inadequate sleep are particularly important for elite athletes and tactical military personnel, especially younger ones.<sup>14,15</sup>

#### The sleep characteristics of athlete and military populations

Previous research has indicated elite athletes have a high prevalence of poor sleep quality, insufficient sleep quantity, and disturbances of the circadian rhythm and sleep patterns due to several competitions.<sup>16,17</sup> A systematic review reported that elite athletes generally show a high overall prevalence of insomnia symptoms characterized by longer sleep latencies, greater sleep fragmentation, non-restorative sleep, and excessive daytime fatigue, despite the limited number of high quality studies.<sup>18</sup> Marked between-sport differences on these symptoms was

observed, with individual sports showing the highest levels of sleep disturbance. The sleep of elite athletes is affected by multiple sport-specific factors (type of sport, training load, training/competition time, chronotype, jet lag, seasonal phases) and environmental factors (sleep environment and electronic multimedia devices), the specific conditions of training and competition being probably the most influential factor leading to sleep variability in elite athletes.<sup>19</sup> Especially, scheduling training sessions or competitions during extremely early or late hours can strongly interfere with circadian and homeostatic rhythms.

Currently, recent studies show that military operational personnel are also often exposed to significant sleep debt associated with climatic, nutritional, psychological, physical and mental stressors.<sup>15</sup> In addition, even when they have opportunities for sleep, several additional environmental disruptors in the military operational context make it difficult to obtain restorative sleep, such as light, noise, temperature, and air pollution.

### Sleep and the injury risk in athlete and military populations

When circadian rhythmicity and sleep homeostasis are misaligned, the athletic performance can be affected and injuries can occur.<sup>20</sup> The sleep onset latency and efficiency were altered on the night and in the week before lower limb injury occurrence in a four-month follow-up of an elite male soccer player competing in French League 1 and Union of European Football Associations matches.<sup>21</sup> Nevertheless, most studies on the relationship between reduced sleep duration and injury risk were retrospective and concerned young athletes, and the underlying mechanisms are unclear.<sup>22,23</sup> The sleep duration was also associated with the incidence of musculoskeletal injury in 7576 soldiers (mostly men aged less than 35 years, for 95% and 70% of them) from the US Army Special Operations Command.<sup>24</sup> With respect to performance, impairments in reaction time and cognitive function and high levels of fatigue after sleep deprivation were suggested to contribute to injury risk in adolescent elite athletes.<sup>25</sup> An experimental acute ~30 h of sleep deprivation in team-sport athletes was shown to result in slowed pacing strategies, reduced intermittent-sprint performance, reduced muscle glycogen content, reduced peak voluntary force and activation, and negative perceptual strain.<sup>26</sup> A recent meta-analysis on the sleep of elite athletes, including fifty-four studies with objective sleep outcomes (total sleep time and sleep efficiency), demonstrated impairment of sleep the night of competition compared with previous nights, and that additional factors such as early morning training, increases in training load, travel departure times, jet lag and altitude can additionally impair athletes' sleep.<sup>27</sup> Finally, sleep disturbances were also shown detrimental to the recovery processes particularly in the elite soccer after match, resulting in impaired muscle glycogen repletion and muscle damage repair, altered cognitive function and mental fatigue.<sup>11</sup> All of these results explain why interventions targeting sleep, such as sleep extension and sleep hygiene strategies, have been viewed over the past decade as effective strategies for prevention and/or recovery of muscle injuries and performance in elite and competitive athletes, especially professional soccer teams, triathletes and soldiers.<sup>11,15,28</sup>

## 2. Muscular injuries and regeneration

### Description of sport injuries

Several intrinsic and extrinsic risk factors are involved in the occurrence of muscle injury. Chronological age, previous injuries history, poor flexibility, decreased muscle strength or strength imbalance are intrinsic risk factors involved in lower extremity muscle injuries in soccer players particularly.<sup>11,19</sup> The muscle stiffness/flexibility seems to be an important common functional risk factor. Finally, it is apparent that genetic polymorphisms may play role in the inter-individual variability of the response to exercise-induced muscle damage.<sup>29</sup> It included ACTN3, the gene that encodes the  $\alpha$ -actinin-3 protein, TNF- $\alpha$  and IL-6, the pro-

inflammatory cytokines, and IGF-2. The genetic may also exert protection against muscle injury, by lowering muscle stiffness particularly, as was found for the estrogen receptor (ESR)-1 gene.<sup>30</sup> Among extrinsic risk factors, inadequate nutrition, poor hydration, equipment use, and influences of training and competition / match-related factors (late match, international competition) on muscle injury occurrence have been extensively analysed, while the contribution of sleep loss has been considered for less than 10 years.<sup>22</sup>

Muscle injuries frequently occur during sport practice and represent 30–50% of all injuries in professional football.<sup>31</sup> Typically, muscle injuries are categorized into direct or indirect depending on their etiology. Direct lesions derive from a direct trauma, which involves the direct action of a reasonable external force. Muscle injuries from indirect trauma are the result of a more complex mechanism that doesn't involve an external force but are the result of a more complex mechanism of forces intrinsic to the muscle itself. However, the biological repair phases of direct and indirect injuries do not differ substantially.

There is a certain lexical confusion in the literature regarding the classification of indirect muscle injuries. In fact, different classifications have been presented, generating a substantial interpretative confusion.<sup>32</sup> Considering how the classification may impact the rehabilitation, it is of utmost importance to standardize definitions and methodologies. Classifications are based on etiological, clinical or radiological criteria. In general, grade 0 lesions don't imply an alteration of the muscle anatomy. Fibers lesions are present in grade I, II and III lesions, which are progressively more extensive, with the third grade providing a functional impairment of the muscle itself. There is evidence that the classification can have a prognostic validity for return to play.<sup>33</sup> In general, muscle injuries imply an absence that may vary from few days in grade 0 to few months (3–5) in grade 3.

The diagnosis of a muscle injury is essentially clinical but often is supported by radiological exams. Imaging plays an essential part in the examination of muscle injuries due to the ability to identify and follow up lesions effectively. Although ultrasound has been utilized for approximately 35 years and despite the increasingly frequent use of MRI in muscle lesions, there has been a new activity in ultrasound for some reasons. In fact, if MRI is considered the gold standard, ultrasound can produce similar results when focusing on muscle injuries. Moreover, it is dynamic, very helpful characteristic when evaluating tears. The correlation between ultrasound and MRI with return to play is still debated.<sup>34</sup>

The immediate treatment of muscle injuries involves immobilization and RICE (Rest, Ice, Compression, Elevation) protocol. Immobilization is required to protect the new granulation tissue and can be achieved simply by applying rigid adhesive taping. The use of crutches may also be recommended in cases of important lesions. After the first few days, early mobilization should start for a better capillary development, regeneration of muscle fibers, and more parallel orientation of the regenerating myofibers in the injured area.<sup>35</sup> The rationale behind the RICE treatment is mainly to reduce hemorrhage. The use of NSAIDs is controversial. Their short-term use reduces pain and the time to return to full activity. However, they may possibly predispose to injury recurrence as a result of pain masking and, on a pure biological level, some basic science researches proved that NSAIDs may inhibit muscle regeneration in the first stages of healing, which is dependent on the inflammatory process.<sup>36</sup>

Finally, numerous injection protocols have been suggested for the treatment of muscle injuries. Corticosteroid, prolotherapy, classic mesotherapy, mesotherapy with omeopathic products, PRP (platelet rich plasma) and others have been advocated. However, no protocol has robust scientific evidence, although anecdotal clinical observations and expert opinions can be observed on each practice.<sup>37</sup>

### Muscle regeneration

Despite muscle injuries are various in localization and pathological mechanisms, the process of muscle regeneration shares some

similarities. Indeed, numerous injury models (myotoxins, chemical or mechanical agents) were used to investigate the main cellular and molecular players involved in skeletal muscle repair.<sup>38,39</sup> In the previous studies, while muscle regeneration has been extensively studied in animal and cell culture models, less data are available in the adult human skeletal muscle. Interestingly, *in vivo* myogenesis in human has been recently documented in detail using microscopy of single muscle fibers in three dimensions, highlighting the importance of the basement membrane in the process of regeneration.<sup>40</sup>

The healing capacity of skeletal muscle tissue firstly and mainly relies on resident muscle stem cells (MuSC) termed satellite cells. These cells are located in a specific microenvironment between the cell membrane of myofibers and the basement membrane (a thin layer of extracellular matrix). After an injury, a process of muscle repair takes place with interrelated phases: myofiber necrosis and acute inflammation then a restorative phase, and finally a tissue remodeling/maturation. At a cellular level, satellite cells are activated by the muscle lesion and massively proliferated to generate myogenic progenitors. Then, they differentiate and fuse to form new myofibers. A subset of activated progenitors returns to quiescence to replenish the stem cell pool to preserve long term repair abilities. This coordinated myogenesis needs specific structural and trophic cues from the microenvironment provided by both the immune response and other resident cells.

The immune response is complex. The neutrophils are the first cells invading the injured area producing cytokines such as Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). They provide a sterile inflammatory environment to recruit additional immune cells such as circulating monocytes which differentiate into macrophages, key modulators of myogenesis process. Initially, macrophages hold a proinflammatory M1 profile producing cytokines such as IL-6, IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  in order to stimulate MuSC activation and proliferation. After the phagocytosis of necrotic cells and metabolic modifications, these M1 macrophages skew to a pro-regenerative M2 profile and participate to stimulation of muscle progenitor differentiation and fusion by secreting other molecules such as growth differentiation factor (GDF)-3 while they continue to produce IGF-I and low level of TNF- $\alpha$ . In fact, the M1/M2 macrophages shift and control of the macrophages phenotype seem to be a critical part of the muscle regeneration. Indeed, high concentrations of TNF- $\alpha$  and IL-6 signaling via the transcriptional regulator STAT3 and the classical NF- $\kappa$ B pathway stimulate myoblast proliferation but inhibit subsequent differentiation through the degradation and destabilization of the myogenic regulatory factors MyoD and myogenin.<sup>41</sup> In contrast, low levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  are necessary to facilitate later stages of myogenesis by stimulating myoblast differentiation and fusion.

Other infiltrated cells such as eosinophils and regulatory T cells also participate to myogenesis. Fibro-adipogenic progenitors (FAPs) are a muscle interstitial mesenchymal cell population, which secrete signaling molecules acting on myogenic cells such as IGF-I and IL-6. They also produce an optimal acting by its composition and stiffness or by modifying activities of several growth factors. The number of these cells is regulated via apoptosis by TNF- $\alpha$  from inflammatory macrophages whereas during the regenerative phase, macrophages stimulate their extracellular matrix secretion via TGF $\beta$ . MuSC and adjacent vessels display reciprocal interactions to repair in a coordinated manner while endothelial cells promote muscle proliferation then their differentiation via growth factors such as IGF-I and hepatocyte growth factor (HGF). Re-innervation is also essential since nerves are damaged during muscle injury despite a majority of mature motoneurons survives at distal axotomy, in close contact with Schwann cells.

The resolution of inflammation is an active process based on different soluble mediators including cytokines and growth factors mainly IGF-I produced by multiple cell types at a local level as well as acting by a systemic action. Despite IGF-I is principally synthesized in the liver, it is also produced locally in skeletal muscle tissue. During muscle repair, IGF-1 is produced all during the process by multiple cells

(myogenic, immune and stromal cells) and under several IGF-1 isoforms that could be acting at specific myogenesis stage, both on proliferation and differentiation of MuSC.<sup>42</sup>

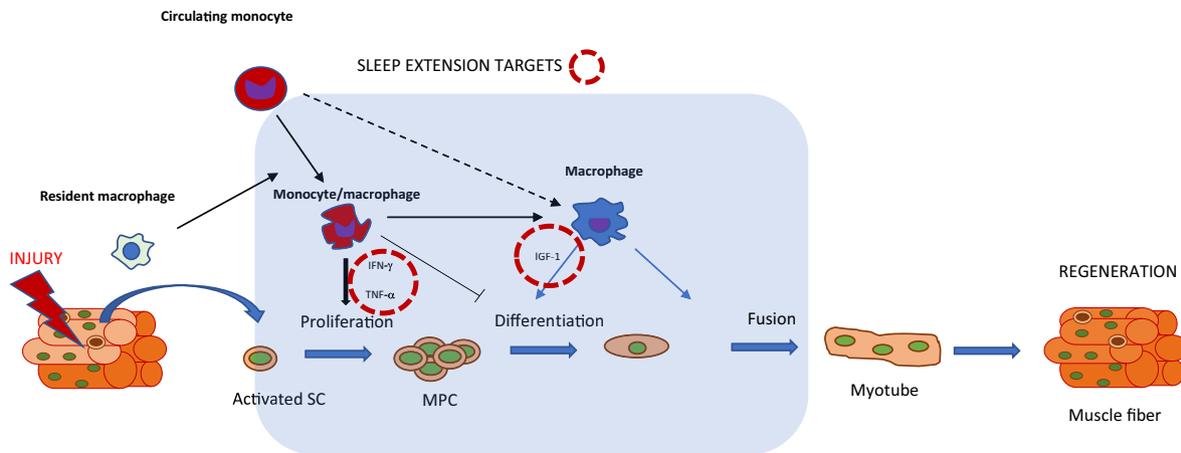
Finally, depending on the type of injury, muscle regeneration could be more or less effective due to alterations in the extracellular matrix (ECM) structure, the inflammatory response, the revascularization and reinnervation. One or multiple modifications in this complex temporal and spatial process lead to fat and fibrotic tissue deposition which are observed during aging and pathologic processes. Excess of ECM, caused pro-fibrotic molecules such TGF $\beta$  and myostatin, will lead to a gradual impairment of muscle function.

### 3. Sleep time and muscle regeneration: what is known from sleep deprivation and hypothetic effect of sleep extension

Muscle cell proliferation, differentiation, and growth following injury are controlled by a vast number of soluble factors, including several cytokines and growth factors and hormones.<sup>42</sup> The skeletal muscle, like virtually all cells in the body, has circadian rhythms, and recent studies have begun to demonstrate that disruptions in circadian rhythms (as sometimes encountered by elite and competitive athletes) can be detrimental to skeletal muscle health.<sup>43</sup> Thus, a key clock regulator, BMAL1, has been shown to play a critical role in regulating muscle stem cell expansion to impact muscle regeneration.<sup>44</sup> The repair of exercise-induced muscle injuries will need a clean and fast response from biological factors, for elite and military tactical athletes particularly. Since sleep and circadian systems act as important regulators of the hormonal and immune systems, sleep time may play a crucial role in muscle repair.

Several rodent and human studies have described how acute total sleep deprivation or chronic sleep restriction induced a catabolic hormonal signature (i.e. blood increases of cortisol levels and decreases of the anabolic testosterone and IGF-I) with low-grade inflammation (i.e. mainly increases of TNF- $\alpha$ ), vascular damages and endothelial dysfunction.<sup>3,45</sup> In the athlete, sleep deprivation increases basal and post-exercise serum levels of skeletal muscle enzymes or proteins which are accurate indicators of muscle damage, such as creatine kinase (CK), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), C-reactive protein (CRP) and myoglobin.<sup>46</sup> In a mouse model, this catabolic environment is associated with muscle impairment (i.e. increase of muscle TNF- $\alpha$  levels),<sup>47</sup> which may slow the regeneration process after muscle injury. Indeed, the catabolic hormonal and inflammatory responses induced by sleep deprivation may result in a highly proteolytic environment characterized by decreased protein synthesis and increased degradation which contribute to an increased risk of muscle injury.<sup>48</sup>

Even if we lack scientific evidence on the relationship between sleep and recovery of muscle injury, it has been interestingly demonstrated in a rodent model that muscle regeneration after experimental injury (cryolesion) is impaired after 96 h of sleep deprivation with reduced muscle IGF-1 and plasma testosterone levels, and that 96 h of sleep recovery is not sufficient to normalize muscle regeneration or IGF-1 levels.<sup>49</sup> In humans, the potential value of sleep interventions to promote an anabolic hormonal profile has been demonstrated by sleep extension. Increasing daily total sleep time by less than 1 h during seven days increases circulating concentration of IGF-1 before and during total sleep deprivation in young healthy men.<sup>50</sup> In the rodent, fourteen days of sleep extension increase circulating IGF-I levels, interestingly coupled with increases in the skeletal muscle and frontal cortex tissues.<sup>51</sup> In comparison, pharmacological interventions using exogenous administration of IGF-I have been one way of showing that increasing IGF-I levels may have favorable effects on muscle (cardiac) damage induced by sleep deprivation.<sup>52</sup> After five days of sleep deprivation, myocardial damage occurred accompanied by elevated levels of cardiomyocyte apoptosis and inflammation including IL-6 and IL-1 $\beta$  production, and all symptoms were ameliorated by daily administration



**Fig. 2.** The mechanistic pathways involved in exercise-induced muscle injuries: possible beneficial effects of sleep extension. Like SCs, resident macrophages are in a quiescent state in healthy muscle but are rapidly activated by exercise-induced injury. Macrophages control proliferation, differentiation and maturation of myocytes during regeneration. Macrophage-derived IGF-1 has been shown a potent coordinator of myogenesis and inflammation in regenerating muscle.<sup>42</sup> We previously evidenced that sleep extension increases blood and skeletal muscle levels of IGF-1,<sup>51</sup> the origin being possibly from resident macrophages. In addition, daily administration of IGF-1 reduced pro-inflammatory cytokines expression in injured myocardium tissue after sleep deprivation.<sup>52</sup> We hypothesized that sleep extension may have beneficial effects on muscle regeneration after injury through IGF-1 and the control of local inflammation. SC: satellite cell, MPC: myogenic precursor cell. Adapted from Oishi and Manabe, 2018<sup>62</sup>

of IGF-1. Authors demonstrated that the global protective effect of IGF-1 implicated the PI3K/Akt pathway, which enhances protein synthesis when activated.

With respect to the effects of sleep interventions on the inflammation induced by various environmental stressors (i.e., sleep deprivation, muscle injuries after exercise), there is no data in healthy humans. A recent review elegantly demonstrated that high concentrations of TNF- $\alpha$  and IL-6 signaling's stimulate myoblast proliferation but inhibit subsequent differentiation through the degradation and destabilization of the myogenic regulatory factors MyoD and myogenin, while low concentrations are necessary to facilitate later stages of myogenesis by stimulating myoblast differentiation and fusion.<sup>41</sup> Perandini et al.<sup>53</sup> added the interest of chronic physical exercise in restoring the M1 and M2 macrophage balance and consequently, the satellite cell niche to improve skeletal muscle regeneration after injury. We hypothesized that sleep extension may have beneficial effects on muscle regeneration after injury comparable to those of exercise. Future studies on rodents are needed to delineate for example if sleep extension before or after muscle injury may improve the different phases of muscle regeneration and repair. Fig. 2.

Finally, it is interesting to note that several studies have highlighted the beneficial effects of sleep extension or napping on pain sensitivity,<sup>54,55</sup> which may be necessary for recovery from exercise-induced muscle injuries. There is a reciprocal relationship between sleep and pain, with pain disrupting sleep and sleep deprivation or disturbance increasing pain.<sup>56</sup> We can assume that this vicious circle can thus delay the repair of the damaged muscle by limiting early muscle remobilization and preventing good quality of sleep. Pain reduction through sleep interventions and their additional beneficial effects (on alertness, motivation, mood)<sup>57–60</sup> may help elite and military tactical athletes to be diligent in remobilization and medical treatment after muscle injuries and thus indirectly serve the recovery.

#### Funding information

This work did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

#### Declaration of interest

No conflicts of interest declared.

#### Confirmation of ethical compliance

Not applicable.

#### Consent for publication

Not applicable.

#### Authors' contributions

All authors were involved in writing, reviewing and editing the manuscript.

#### References

- Eugene AR, Masiak J. The neuroprotective aspects of sleep. *Medtube Sci* 2015;3(1): 35–40.
- Léger D, Debellemanniere E, Rabat A et al. Slow-wave sleep: from the cell to the clinic. *Sleep Med Rev* 2018;41:113–132. doi:10.1016/j.smrv.2018.01.008.
- Chennaoui M, Léger D, Gomez-Merino D. Sleep and the GH/IGF-1 Axis: consequences and countermeasures of sleep loss/disorders. *Sleep Med Rev* 2020;49:101223. doi: 10.1016/j.smrv.2019.101223. Epub 2019 Nov 1.
- Carskadon MA, Dement WC. *Monitoring and staging human sleep*. In: Kryger MH, Roth T, Dement WC, eds. *Principles and practice of sleep medicine*, 5th edition., St. Louis, Elsevier Saunders, 2011. p. 16–26.
- Morris CJ, Daniel Aeschbach A, Scheer FAJL. Circadian system, sleep and endocrinology. *Mol Cell Endocrinol* 2012;349(1):91–104. doi:10.1016/j.mce.2011.09.003. Epub 2011 Sep 10.
- Steiger A. *Endocrine and metabolic changes during sleep*. In: Montagna P, Chokroverty S, eds. *Handbook of clinical neurology vol. 98 (3rd series). Sleep Disorders, Part 1*, 2011.
- Besedovsky L, Lange T, Haack M. The sleep-immune crosstalk in health and disease. *Physiol Rev* 2019;99(3):1325–1380. doi:10.1152/physrev.00010.2018.
- Irwin MR, Opp MR. Sleep health: reciprocal regulation of sleep and innate immunity. *Neuropsychopharmacology* 2017;42(1):129–155. doi:10.1038/npp.2016.148. Epub 2016 Aug 11.
- Kelley GA, Kelley KS. Exercise and sleep: a systematic review of previous meta-analyses. *J Evid Based Med* 2017;10(1):26–36. doi:10.1111/jebm.12236.
- Chennaoui M, Arnal PJ, Sauvet F et al. Sleep and exercise: a reciprocal issue? *Sleep Med Rev* 2015;20:59–72. doi:10.1016/j.smrv.2014.06.008. Epub 2014 Jun 30.
- Nédélec M, Halson S, Abaidia AE et al. Stress, sleep and recovery in elite soccer: a critical review of the literature. *Sports Med* 2015;45(10):1387–1400. doi:10.1007/s40279-015-0358-z.
- Lastella L, Vincent GE, Duffield R et al. Can sleep be used as an Indicator of overreaching and overtraining in athletes? *Front Physiol* 2018;9:436. doi:10.3389/fphys.2018.00436. eCollection 2018.
- Vrijotte S, Bart Roelands B, Nathalie Pattyn N et al. The overtraining syndrome in soldiers: insights from the sports domain. *Mil Med* 2019;184(5–6):e192–e200. doi: 10.1093/milmed/usy274.

14. Simpson NS, Gibbs EL, Matheson GO. Optimizing sleep to maximize performance: implications and recommendations for elite athletes. *Scand J Med Sci Sports* 2017;27(3):266–274. doi:10.1111/sms.12703. Epub 2016 Jul 1.
15. Good CH, Brager AJ, Capaldi VF et al. Sleep in the United States military. *Neuropsychopharmacol* 2020;45(1):176–191. doi:10.1038/s41386-019-0431-7. Epub 2019 Jun 11.
16. Leeder J, Glaister M, Pizzoferrero K et al. Sleep duration and quality in elite athletes measured using wristwatch actigraphy. *J Sports Sci* 2012;30(6):541–545. doi:10.1080/02640414.2012.660188. Epub 2012 Feb 14.
17. Knufinke M, Nieuwenhuys A, Geurts SAE et al. Self-reported sleep quantity, quality and sleep hygiene in elite athletes. *J Sleep Res* 2018;27(1):78–85. doi:10.1111/jsr.12509. Epub 2017 Mar 8.
18. Gupta L, Morgan K, Gilchrist S. Does elite sport degrade sleep quality? A systematic review. *Sports Med* 2017;47(7):1317–1333. doi:10.1007/s40279-016-0650-6.
19. Nedelec M, Aloulou A, Duforez F et al. The variability of sleep among elite athletes. *Sports Med Open* 2018;4(1):34. doi:10.1186/s40798-018-0151-2.
20. Smith RS, Efron B, Mah CD et al. The impact of circadian misalignment on athletic performance in professional football players. *Sleep* 2013;36(12):1999–2001. doi:10.5665/sleep.3248.
21. Nédélec M, Leduc C, Dawson B et al. Case study: sleep and injury in elite soccer—a mixed method approach. *J Strength Cond Res* 2019;33(11):3085–3091. doi:10.1519/JSC.0000000000002251.
22. Milewski MD, Skaggs DL, Bishop GA et al. Chronic lack of sleep is associated with increased sports injuries in adolescent athletes. *J Pediatr Orthop* 2014;34(2):129–133. doi:10.1097/BPO.0000000000000151.
23. Gouttebauge V, Aoki H, Ekstrand J et al. Are severe musculoskeletal injuries associated with symptoms of common mental disorders among male European professional footballers? *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2016;24(12):3934–3942. doi:10.1007/s00167-015-3729-y. Epub 2015 Aug 2.
24. Grier T, Dinkeloo E, Reynolds M et al. Sleep duration and musculoskeletal injury incidence in physically active men and women: a study of U.S. Army special operation forces soldiers. *Sleep Health* 2020. doi:10.1016/j.sleh.2020.01.004. S2352-7218(20)30006-1, Online ahead of print.
25. von Rosen P, Frohm A, Kottorp A et al. Multiple factors explain injury risk in adolescent elite athletes: applying a biopsychosocial perspective. *Scand J Med Sci Sports* 2017;27(12):2059–2069. doi:10.1111/sms.12855. Epub 2017 Mar 29.
26. Skein M, Duffield R, Edge J et al. Intermittent-sprint performance and muscle glycogen after 30 h of sleep deprivation. *Med Sci Sports Exerc* 2011;43(7):1301–1311. doi:10.1249/MSS.0b013e31820abc5a.
27. Roberts SSH, Teo WP, Warmington SA. Effects of training and competition on the sleep of elite athletes: a systematic review and meta-analysis. *Br J Sports Med* 2019;53(8):513–522. doi:10.1136/bjsports-2018-099322. Epub 2018 Sep 14.
28. Hotfiel T, Mayer I, Huettel M et al. Accelerating recovery from exercise-induced muscle injuries in triathletes: considerations for Olympic distance races. *Sports (Basel)* 2019;7(6):143. doi:10.3390/sports7060143.
29. Baumert P, Lake MJ, Stewart CE et al. Genetic variation and exercise-induced muscle damage: implications for athletic performance, injury and ageing. *Eur J Appl Physiol* 2016;116(9):1595–1625. doi:10.1007/s00421-016-3411-1. Epub 2016 Jun 13.
30. Kumagai H, Miyamoto-Mikami E, Hirata K et al. ESR1 rs2234693 polymorphism is associated with muscle injury and muscle stiffness. *Med Sci Sports Exerc* 2019;51(1):19–26. doi:10.1249/MSS.0000000000001750.
31. Bengtsson H, Ekstrand J, Waldén M et al. Muscle injury rate in professional football is higher in matches played within 5 days since the previous match: a 14-year prospective study with more than 130 000 match observations. *Br J Sports Med* 2018;52(17):1116–1122. doi:10.1136/bjsports-2016-097399. Epub 2017 Nov 3.
32. Mueller-Wohlfahrt HW, Haensel L, Mithoefer K et al. Terminology and classification of muscle injuries in sport: the Munich consensus statement. *Br J Sports Med* 2013;47(6):342–350. doi:10.1136/bjsports-2012-091448.
33. Ekstrand J, Askling C, Magnusson H et al. Return to play after thigh muscle injury in elite football players: implementation and validation of the Munich muscle injury classification. *Br J Sports Med* 2013;47:769–774. doi:10.1136/bjsports-2012-092092.
34. van der Made AD, Almusa E, Whiteley R et al. Intramuscular tendon involvement on MRI has limited value for predicting time to return to play following acute hamstring injury. *Br J Sports Med* 2018;52(2):83–88. doi:10.1136/bjsports-2017-097659.
35. Järvinen TAH, Järvinen TLN, Kääriäinen M et al. Muscle injury. Biology and treatment. *Am J Sports Med* 2005;33(5):745–764. doi:10.1177/0363546505274714.
36. Mishra DK, Fridén J, Schmitz MC et al. Anti-inflammatory medication after muscle injury: a treatment resulting in short-term improvement but subsequent loss of muscle function. *J Bone Joint Surg* 1995;77A:1510–1519. doi:10.2106/00004623-199510000-00005.
37. Orchard JW, Best TM, Mueller-Wohlfahrt HW et al. The early management of muscle strains in the elite athlete: best practice in a world with a limited evidence basis. *Br J Sports Med* 2008;42:158–159. doi:10.1136/bjism.2008.046722.
38. Chargé SBP, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 2004;84(1):209–238. doi:10.1152/physrev.00019.2003.
39. Wosczyzna MN, Rando TA. A muscle stem cell support group: coordinated cellular responses in muscle regeneration. *Dev Cell* 2018;46(2):135–143. doi:10.1016/j.devcel.2018.06.018.
40. Mackey AL, Kjaer M. The breaking and making of healthy adult human skeletal muscle in vivo. *Skelet Muscle* 2017;7(1):24. doi:10.1186/s13395-017-0142-x.
41. Howard EE, Pasiakos SM, Blesso CN et al. Divergent roles of inflammation in skeletal muscle recovery from injury. *Front Physiol* 2020;11:87. doi:10.3389/fphys.2020.00087. eCollection 2020.
42. Tidball JG. Regulation of muscle growth and regeneration by the immune system. *Nat Rev Immunol* 2017;17(3):165–178. doi:10.1038/nri.2016.150. Epub 2017 Feb 6.
43. Andrews JL, Zhang X, McCarthy JJ et al. CLOCK and BMAL1 regulate MyoD and are necessary for maintenance of skeletal muscle phenotype and function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(44):19090–19095. doi:10.1073/pnas.1014523107. Epub 2010 Oct 18.
44. Chatterjee S, Yin H, Nam D et al. Brain and muscle Arnt-like 1 promotes skeletal muscle regeneration through satellite cell expansion. *Exp Cell Res* 2015;331(1):200–210. doi:10.1016/j.yexcr.2014.08.041. Epub 2014 Sep 9.
45. Chennaoui M, Sauvet F, Drogou C et al. Effect of one night of sleep loss on changes in tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) levels in healthy men. *Cytokine* 2011;56(2):318–324. doi:10.1016/j.cyto.2011.06.002. Epub 2011 Jul 6.
46. Mejri MA, Yousfi N, Hammouda O et al. One night of partial sleep deprivation increased biomarkers of muscle and cardiac injuries during acute intermittent exercise. *J Sports Med Phys Fitness* 2017;57(5):643–651. doi:10.23736/S0022-4707.16.06159-4.
47. Yang DF, Shen YL, Wu C et al. Sleep deprivation reduces the recovery of muscle injury induced by high-intensity exercise in a mouse model. *Life Sci* 2019;235:116835. doi:10.1016/j.lfs.2019.116835. Epub 2019 Sep 4.
48. Carbone JW, McClung JP, Pasiakos SM. Skeletal muscle responses to negative energy balance: effects of dietary protein. *Adv Nutr* 2012;3(2):119–126. doi:10.3945/an.111.001792.
49. Mónico-Neto M, Dáttilo M, Ribeiro DA et al. REM sleep deprivation impairs muscle regeneration in rats. *Growth Factors* 2017;35(1):12–18. doi:10.1080/08977194.2017.1314277.
50. Chennaoui M, Arnal PJ, Drogou C et al. Sleep extension increases IGF-I concentrations before and during sleep deprivation in healthy young men. *Appl Physiol Nutr Metab* 2016;41(9):963–970. doi:10.1139/apnm-2016-0110.
51. Chennaoui M, Arnal PJ, Dorey R et al. Changes of cerebral and/or peripheral adenosine A1 receptor and IGF-I concentrations under extended sleep duration in rats. *Int J Mol Sci* 2017;18(11):1–10. doi:10.3390/ijms18112439.
52. Chen H, Zhao Z, Zheng J et al. The effect of IGF-1 on symptoms of sleep deprivation in a rat model of inflammatory heart disease and metabolic syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;446(4):843–849. doi:10.1016/j.bbrc.2014.02.123.
53. Perandini LA, Chhimin P, da Silva LD et al. Chronic inflammation in skeletal muscle impairs satellite cells function during regeneration: can physical exercise restore the satellite cell niche? *FEBS J* 2018;285(11):1973–1984. doi:10.1111/febs.14417. Epub 2018 Mar 8.
54. Faraut B, Léger D, Medkour T et al. Napping reverses increased pain sensitivity due to sleep restriction. *PLoS ONE* 2015;10(2):1–16. doi:10.1371/journal.pone.0117425.
55. Simonelli G, Mantua J, Gad M et al. Sleep extension reduces pain sensitivity. *Sleep Med* 2019;54:172–176. doi:10.1016/j.sleep.2018.10.023.
56. Stroemel-Scheder C, Kundermann B, Lautenbacher S. The effects of recovery sleep on pain perception: a systematic review. *Neurosci Biobehav Rev* 2020;113:408–425. doi:10.1016/j.neubiorev.2020.03.028. Epub 2020 Apr 8.
57. Arnal PJ, Sauvet F, Leger D et al. Benefits of sleep extension on sustained attention and sleep pressure before and during total sleep deprivation and recovery. *Sleep* 2015;38(12):1935–1943. doi:10.5665/sleep.5244.
58. Arnal PJ, Lapole T, Erblang M et al. Sleep extension before sleep loss: effects on performance and neuromuscular function. *Med Sci Sports Exerc* 2016;48(8):1595–1603. doi:10.1249/MSS.0000000000000925.
59. Ritland B, Simonelli M, Gentili G et al. Effects of sleep extension on cognitive/motor performance and motivation in military tactical athletes. *Sleep Med* 2019;58:48–55. doi:10.1016/j.sleep.2019.03.013.
60. Halson SL. Sleep in elite athletes and nutritional interventions to enhance sleep. *Sports Med* 2014;44(Suppl 1):S13–S23. doi:10.1007/s40279-014-0147-0.
61. Lange T, Dimitrov S, Born J. Effects of sleep and circadian rhythm on the human immune system. *Ann N Y Acad Sci* 2010;1193:48–59. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.05300.x.
62. Oishi Y, Manabe I. Macrophages in inflammation, repair and regeneration. *Int Immunol* 2018;30(11):511–528. doi:10.1093/intimm/dxy054.

## Original Article

# Muscle injury induces an increase in total and non-rapid eye movement sleep time

T. Vanneau<sup>1,2,\*</sup>, M. Quiquempoix<sup>1,2</sup>, M.-C. Erkel<sup>1,2</sup>, C. Drogou<sup>1,2</sup>, A. Trignol<sup>1,2</sup>, F. Sauvet<sup>1,2</sup>, D. Léger<sup>2,3</sup>, D. Gomez-Merino<sup>1,2</sup> and M. Chennaoui<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>French Armed Forces Biomedical Research Institute (IRBA), Brétigny-sur-Orge, France,

<sup>2</sup>Université Paris Cité, VIFASOM (URP 7330 Vigilance, Fatigue, Sommeil et Santé Publique), Paris, France and

<sup>3</sup>APHP, APHP-Centre Université de Paris, Hôtel-Dieu, Centre du Sommeil et de la Vigilance, Paris, France

\*Corresponding authors: Mounir Chennaoui, Fatigue and Vigilance Unit, French Armed Forces Biomedical Institute (IRBA), 1 place du Général Valérie André, Brétigny-sur-Orge 91220, France. Email: [mounirchennaoui@gmail.com](mailto:mounirchennaoui@gmail.com); Théo Vanneau, Fatigue and Vigilance Unit, French Armed Forces Biomedical Institute (IRBA), 1 place du Général Valérie André, Brétigny-sur-Orge 91220, France. Email: [theo.vanneau@gmail.com](mailto:theo.vanneau@gmail.com).

### Abstract

**Study Objectives:** This study describes macro- and micro-sleep responses to a myotoxic skeletal muscle injury and investigates possible mechanisms.

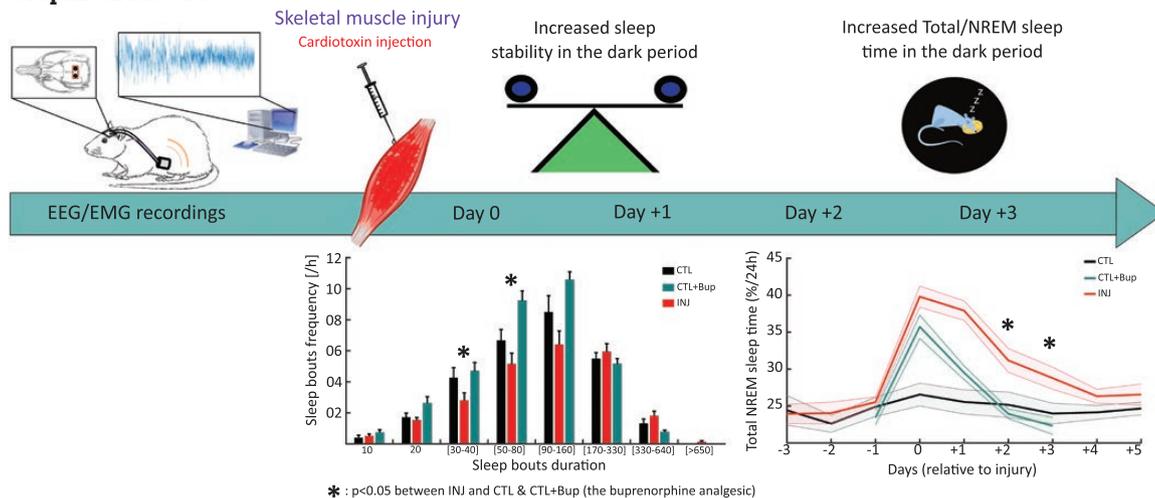
**Methods:** We recorded the electroencephalogram (EEG)/electromyogram (EMG) of 24 Wistar rats before and after induction of tibialis anterior muscle injury ( $n = 8$  per group: control, control + buprenorphine and injured). A top-down analysis of sleep characteristics was processed from total sleep time (TST), sleep stages, sleep stability, spectral analysis, and spindles. To further investigate the mechanisms involved, we analyzed the protein level of sleep regulatory molecules including tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ), insulin-like growth factor-1 (IGF-1), and brain and muscle ARNT-like 1 (BMAL1) in plasma, frontal cortex, hippocampus, and tibialis anterior, collected at day +2 after injury from non-EEG/EMG implanted rats.

**Results:** Muscle injury induces a significant increase in TST at 48 and 72 h post-injury, specific to non-rapid eye movement (NREM) sleep. These increases occur during the dark period and are associated with the higher stability of sleep over 24 h, without change in the different power/frequency spectral bands of NREM/REM sleep. There was no corresponding sleep increase in slow-wave activity or spindle density, nor were there changes in brain levels of the sleep-regulating proinflammatory cytokine IL- $1\beta$ , which is otherwise involved in the local response to injury. Conversely, decreased protein levels of brain IGF-1 and muscle BMAL1, a core circadian clock gene, after injury may play a role in increased sleep time.

**Conclusion:** Muscle injury induces an increase in total sleep time at 48- and 72-h post-injury, specific to NREM sleep during the dark period in rats and is associated with higher sleep stability over 24 h.

**Key words:** muscle injury; sleep; photoperiod; spindles; sleep regulating molecules; circadian clock

### Graphical Abstract



### Statement of Significance

We described for the first time the changes in the macro- and micro-structure of sleep following the induction of muscle injury. We have shown that muscle injury induces a significant increase in TST at 48 and 72 h post-injury, especially during NREM sleep. These increases occur specifically during the dark period and are associated with higher stability of sleep over the first 24 h after muscle injury. Understanding the impact of post-injury processes on sleep characteristics can help tailoring recovery protocols and optimizing muscle repair, as well as deciphering the mechanisms of sleep regulation.

## Introduction

Sleep is a particular and crucially necessary physiological state for mammals. Sleep duration and quality have an important impact on physical and mental health [1–3] and chronic sleep loss is a risk factor for diabetes [4], obesity [5], cardiovascular diseases [6], and neurodegenerative diseases [7]. Several studies have also related sleep debt to the occurrence of musculoskeletal injuries in athletes, but the mechanisms that can lead to this are not entirely clear [8, 9]. Thus, understanding the mechanisms of sleep regulation is a major societal challenge to control and limit the harmful effects of sleep deprivation.

Sleep is subject to circadian and homeostatic regulatory processes [10]. The circadian process (also called process C) which is under the control of the suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus, that allows the optimization of internal temporal order and the control of the peripheral clock according to the ambient 24 h light-dark cycle [11]. The peripheral clock is driven by a heterodimer composed of circadian locomotor output cycles kaput (Clock) and brain and muscle Arnt like protein-1 (BMAL1) involved in the expression of its own inhibitors (cryptochrome and period) to generate a circadian feedback loop and participate in the regulation of many physiological processes such as aging, development, metabolism, and sleep [12–15]. Whole body knockout (KO) of the circadian clock gene BMAL1 in mice induces an increase in non-rapid eye movement (NREM) sleep time and loss of diurnal rhythm of sleep [16]. Rescue of BMAL1 expression in skeletal muscle but not in the brain restores daily sleep quantity, highlighting the involvement of skeletal muscle BMAL1 expression in sleep regulation [16].

The homeostatic process (also called process S), which can be represented by the pressure of sleep that builds up during wakefulness and intensifies as one remains awake [17]. Sleep is also associated with changes in the expression of many molecules, some of which are directly involved in sleep regulation. Among the sleep regulatory molecules, the two major pro-inflammatory mediators, the tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and interleukin (IL)-1 $\beta$  cytokines, participate in the homeostatic sleep/wake regulation [18]. Other cytokines, including interferons (IFNs), IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, IL-15, and IL-18 also appear to have some sleep regulatory properties. Also, several data in rodents and humans have indicated interrelations between sleep, the central nervous system, and the somatotrophic axis (i.e. GHRH/GH/IGF-1, growth hormone releasing hormone/growth hormone/insulin-like growth factor) [19–22]. In mice, IGF-1 has recently been shown to modulate sleep architecture through hypothalamic orexin neurons [22]. In this study, we analyzed the first-time sleep characteristics in response to a skeletal muscle injury in rats.

Muscle injuries are very common in both professional and amateur athletes [23, 24] but sleep management in response to these injuries is unclear and often poorly considered [9]. Regardless of the type of muscle injury and its location, the overall dynamics of the phases of muscle healing are similar in different mammals (e.g.

mouse, rat, and human) and can be monitored at the morphological, molecular, and functional levels [25, 26]. After an injury, a process of muscle repair takes place with interrelated phases beginning by myofiber necrosis and an acute pro-inflammatory phase with cytokine production such as IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and IL-6. Then a phase of regeneration and remodeling sets in with a shift to an anti-inflammatory profile associated with the secretion of anti-inflammatory cytokines (e.g. IL-10) and growth factors such as IGF-1, growth differentiation factor 3, and TGF- $\beta$ , that act in a paracrine and/or autocrine manner and contribute to the cellular repair environment [26]. However, the kinetics and amplitude of these procedural steps may vary, even within the same organism, depending on the extent of the injury [27]. One of the experimental procedures adopted to induce skeletal muscle damage in murine models is the injection of the myotoxic agent cardiotoxin (CTX), preferably into hindlimb muscles such as the tibialis anterior muscle or Gastrocnemius [27]. In this model, the acute pro-inflammatory response lasts 3–4 days, and the kinetics of the repair processes are more defined and staggered if compared to other models of injury [28, 29].

In the present study, we sought to characterize the effects of skeletal muscle injury on sleep characteristics in rats. Understanding the impact of post-injury processes on sleep characteristics can help tailor recovery protocols and optimize muscle repair, as well as understand the mechanisms of sleep regulation. We secondarily analyzed the molecules presented as sleep regulators, in brain, bloodstream, and muscle (the latter because of injury location).

## Methods

### Experimental procedure and injury induction

The experiment was performed using 40 male Wistar rats (Charles Rivers Laboratory, France), 4 weeks old, and weighing 200–220 g on their arrival. After 1 week of habituation, animals were housed in four per cage (612 × 435 × 216 mm) on a 12 h light and 12 h dark cycle (lights on from 08:00 h to 20:00 h) with food and water available ad libitum in a temperature (21°C ± 2°C) and ventilated (ACH 70) controlled environment. Animals were separated into two main groups, one group for sleep analysis (SA group,  $n = 24$ ) and one group for biological assays (BA group,  $n = 16$ ). Animals for sleep analysis were implanted with telemetry transmitters to record EEG/EMG/Temperature. After surgery, animals were individually housed in a ventilated cabinet (BIO-C36, Tecniplast; Buguggiate, Italy) and had a 10-day recovery period. Implanted animals were separated into three groups: the control group (CTL), the control group injected with the buprenorphine analgesic (CTL + Bup; because buprenorphine has been described to induce acute sleep deprivation [30, 31]) and the injured group (INJ) which also received buprenorphine. Transmitter and video recordings started for 3 days (baseline) before cardiotoxin injection for the CTL and INJ groups and only for 1 day before injection for the CTL + Bup group (Figure 1). Animals in the INJ

group were anesthetized for 10 min under vetflurane (1%–2%) before cardiotoxin injection, animals in the CTL group and in the CTL + Bup group were also anesthetized to evaluate the effects of this anesthesia on wake/sleep parameters. The injured animals received, at 08:00 on day 0, a 400  $\mu$ L (10  $\mu$ M) injection of cardiotoxin (Latoxan, France) in the right tibialis anterior (TA) (without opening the skin) and a single subcutaneous injection of buprenorphine (0.05 mg/kg) for analgesia. The CTL + Bup group received a single subcutaneous injection of buprenorphine (0.05 mg/kg). Animals for the biological analysis (without telemetry implantation) were separated into two groups of eight animals, the control group (CTL) and the injured group (INJ) submitted to the same procedure than CTL and INJ groups in the SA. Groups for BA assays were euthanized 2 days after the induction of injury (at 08:00) and we collected blood, right and left TA muscle, frontal cortex, and the two hippocampi. SA groups were euthanized 14 days after the injury induction, and we collected right and left TA muscles. The study was approved by the institutional animal ethics committee (Protocol DAP\_11-2019).

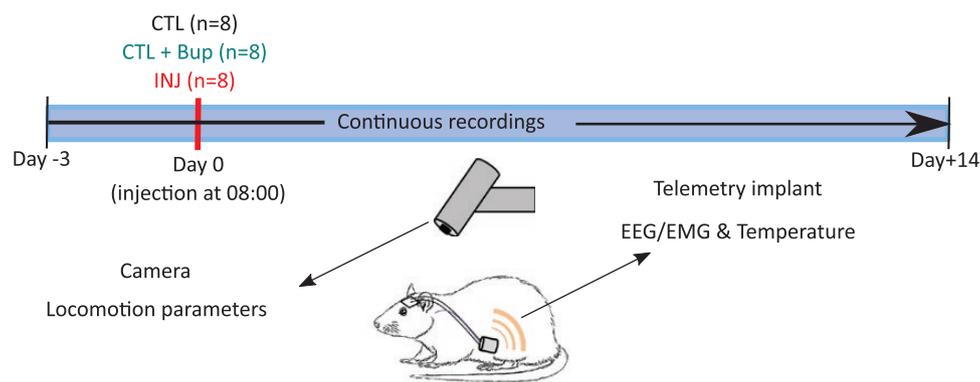
### Telemetry surgical implantation

Animals were implanted with transmitters for the recording of EEG/EMG/Temperature (HD-X02, Data Sciences International, St Paul, USA). Rats were pre-medicated with a single sub-cutaneous injection of buprenorphine (0.05 mg/kg). Then 40 min after they received an intra-peritoneal injection of ketamine (25 mg/kg, infra-anesthetic) and dexmedetomidine (0.04 mg/kg). Vetflurane (1%–2%) was delivered to adjust the animal's physiological parameters (breathing rate, heart rate, and temperature) if needed. The transmitter was slipped under the skin and placed in a dorsal position, 400  $\mu$ L of duplomycline (400  $\mu$ L, MSD) was injected to prevent infection. One pair of electrodes was placed in the neck muscle using a needle to record EMG. Two other electrodes were implanted on two brain skull holes ( $-2$  mm A/P,  $\pm 2$  mm lateral from bregma). Electrodes were fixed with screws (0–80  $\times$  1/16, Phymep, France) and dental cement (TempBond, Kerr, USA) to the skull.

### Sacrifice, histological analysis, and biological assays

Rats were sacrificed by decapitation, trunk blood was collected and centrifuged at 3000 g for 10 min to separate plasma, and

aliquoted plasma was frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. The TA muscles were harvested and frozen by dipping them in isopentane ( $-100^{\circ}\text{C}$ ) and 8  $\mu\text{m}$  cryocuts were realized on Cryostat (CryoStar NX70, Eprelia). Laminin/Dapi immunolabelling were made by a first 1-h blockade with Emerald anti-body (#936B-08 Sigma-Aldrich, USA). Then muscle cuts were incubated with primary antibody ([1/200] Rabbit IgG Anti-laminin #ab11575, Abcam) overnight,  $+4^{\circ}\text{C}$ . After a wash, a secondary antibody ([1/500] Goat anti Rabbit IgG Alexa Fluor 488 #A21039 ThermoFisher) were added to the muscle cut for 1 h, room temperature (RT). We used a mounting medium with Dapi (#ab104139, Abcam). Slides were then scanned (10X, Axioscan Z1, Zeiss, Germany) and injured area was calculated manually on FIJI (Image) as the total area with centro-nuclei muscle fibers/total muscle area. Hemalun-Phloxin-Safran coloration was made by dipping slides in Hemalun (For 100 mL: 0.2 g Hematein, 5 g Potassium Alun, 2 mL of Acetic acid, 98 mL distilled water), Phloxin (0.5 g/100 mL), and Safran (2 g/100 mL) interspersed with washings in water and alcohol (70, 95, and 100%). The frontal cortex and hippocampus were dissected immediately after sacrifice on a cold plate and deep-frozen in liquid nitrogen. Brain areas were homogenized in 2 mL Precellys CK14 tubes containing 5 V of Hepes buffer (Hepes 25 mM, pH 7.4; Chaps 0.1%;  $\text{MgCl}_2$  5 mM and protease inhibitor cocktail Sigma P2714, Isère, France) using Precellys Evolution (Berting Technologies, France). Two cycles of 20 s at 5500 rpm were performed with the Precellys Homogenizer, and tubes were placed on ice within the two cycles. Muscle tissues were homogenized in 10 V of Hepes buffer (Hepes 25 mM, pH 7.4; Chaps 0.1%;  $\text{MgCl}_2$  5mM and protease inhibitor cocktail Sigma P8340) in 7 mL CK28 tubes twice for 20 s at 8000 rpm. The homogenates were centrifuged for 20 min at 12 000 g ( $+4^{\circ}\text{C}$ ). Total protein concentrations were measured in each supernatant using a UV micro-volume spectrophotometer (Biodrop, Cambridge, UK). Levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, C-X-C Motif Chemokine Ligand 1 (CXCL1), IL-2, and IL-10 were measured using multiplex ELISA (Simoa Planar Array Assay Rat Cytokines Panel 1, SP-X, Quanterix). Levels of IGF-1, transforming growth factor beta (TGF $\beta$ ) free and total, vascular endothelial growth factor (VEGF) and Brain and muscle ARNT-like 1 (BMAL1) were quantified using ELISA kits (IGF-1: MG100, R&D systems; TGF $\beta$  Free: Legend Max, BioLegend; TGF $\beta$  Total: Legend Max, BioLegend; VEGF: ERVEGFA, Invitrogen, BMAL1 MBS1607686, MyBioSource) in anterior tibialis, frontal cortex, hippocampus, and plasma (not for BMAL1).



**Figure 1.** Summary diagram of the experimental protocol. Recordings of EEG/EMG and Temperature were made with a telemetry implant with simultaneous video monitoring to measure locomotion parameters. Animals were separated into three groups ( $n = 8$  per group): a control group without any injection (CTL), a control group with a buprenorphine injection (CTL + Bup) and an injury group with cardiotoxin and buprenorphine injection (INJ). Injections (buprenorphine and CTX) were performed at 08:00 at day 0. The recordings start 3 days before injury and last 14 days after the induction of injury (only from days  $-1$  to  $+3$  for the CTL + Bup group).

## EEG/EMG/Temperature signals, and visual scoring

We recorded EEG/EMG/Temperature signals using Neuroscore 6.0 (DSI, St Paul, MN, USA). EEG/EMG signals were sampled at 500 Hz, while temperature signals were sampled at 10 Hz. EEG signals were filtered with a bandpass (0.3–49 Hz) and classified as Wake, NREM sleep, and rapid eye movement (REM) sleep for each 10-s epoch from 3 days before muscle injury to 7 days after. Visual classification has been made according to McShane *et al.* principles [32]. Total sleep time (TST) was calculated each hour as NREM + REM duration. For each hour, the duration of each episode of Sleep (NREM + REM) or Wake was calculated and adjusted by the time spent in the corresponding state, allowing us to calculate sleep/wake bouts duration per hour of sleep/wake state.

## EEG signals analysis

Time–frequency Fast-Fourier transform with a Pwelch method was made (2-s window with 50% overlap). For NREM, REM, and Wake we identified delta band (0.5–4 Hz); theta band (4–8 Hz); alpha band (8–12 Hz); beta band (12–35 Hz). For each state and each associated bands, we calculated: absolute power, relative power, average frequency, and maximum power spectral density value and its corresponding frequency. Spindles detection was made using the automatic detection spindle algorithm described by Uygun *et al.* [33]. Spindle density was calculated as the number of spindles per minute of NREM sleep. Spindle duration as the duration of the spindle, integrated spindle activity was calculated as cumulated amplitude divided by the length of each spindle. Spindle instantaneous frequency was calculated with Hilbert's transformation [34].

## Video recordings and video analysis

Video recordings (30 FPS, 1920 × 1080 px) were made with an Axis P1365 Mk II camera (Axis communications AB, Sweden, Lund) using a RayTec infrared illuminator (VAR2-IA-1C, RayTec, Ashington, UK). Analysis was performed with EthoVision (EthoVision XT 15.0, Noldus, Wageningen, Netherlands). An automatic animal detection based on image contrast allows the software to calculate the position of the animal for each frame. The software calculated the total distance traveled and the percent body fill movement per hour.

## Statistics

We used ANOVA (classical or Friedman if the data are not normal, the normality was tested by a Shapiro-Wilk test) on all the analysis except for the video and temperature data. For post-hoc tests, we used Tukey test after ANOVA and Durbin-conover test after Friedman ANOVA. For video and temperature analysis we performed the cluster-based permutations approach from permutation statistic described in Marris *et al.* [35]. We used the statistic from a Student t-test with 1000 iterations of permutation. For each permutation cycle we took the sum of the t value for each significant cluster, also called  $t_{\text{mass}}$  method. For analysis of biological assays, we used Student t-test if the data followed the normal distribution and variance homogeneity. If not, we used the non-parametric Mann-Whitney test.

## Results

### Muscle injury checking

To validate our model of muscle injury in the tibialis anterior (TA) harvested 14 days after the injection, we realized immunostaining of muscles fibers membranes with Laminin coupled with

Dapi labeling of the nuclei. Injected muscle fibers are smaller and have a central nuclear, which is characteristic of a muscle fiber under repair (Supplementary Figure 1, A and B). Staining with HPS confirms this result of typical smaller fibers with a central nuclear (Supplementary Figure 1, C and D). The size of muscle lesion is variable between the eight cardiotoxin-injected animals (Supplementary Figure 1, e) from 60 to 90% of the total muscle area. The median is at 71%. The weight of injured TA in the injury (INJ) group is significantly lower than the weight of healthy TA in the control (CTL) group (Supplementary Figure 1, F).

### Muscle injury induces an adaptive sleep response at 48- and 72-h post-injury

To understand the adaptive sleep response following muscle injury, we analyzed sleep time as well as the time spent in each sleep stages following injury. The daily sleep time values are in Supplementary Table 1. There is a common decrease in TST per day for the INJ and the CTL + Bup groups compared to the CTL group on the day of injection (day 0; Figure 2, A). Following this decrease, there is an increase in TST per day at day +1 for the INJ and the CTL + Bup groups compared to the CTL group, and at days +2 and +3 for the INJ group (Figure 2, A). The decrease of TST per day at day 0 for the INJ and the CTL + Bup groups is related to a decrease in both NREM and REM sleep (Figure 2, D and G). The increase of TST at day +1 is also related to an increase in both NREM and REM sleep for the INJ and the CTL + Bup groups (Figure 2, D and G) whereas the increase of TST at days +2 and +3 for the INJ group is only associated with an increase in NREM sleep. To assess differences in sleeping behavior as a function of the photoperiod, we analyzed sleep by separating the light and dark periods (Light: from 08:00 to 20:00; Dark: from 20:00 to 08:00). For the TST in dark period, there is a common increase at days 0 and +1 for the INJ and the CTL + Bup group and an increase at days +2 and +3 only for the INJ group (Figure 2, B). For the NREM sleep in dark period there is also a common increase at days 0 and +1 for the INJ and the CTL + Bup group compared to the CTL group, but the total NREM sleep time is higher for the INJ group compared to the CTL + Bup group at day +1 and the total NREM sleep time is higher for the INJ group at day +2, day +3 (Figure 2, E). The total REM sleep time is higher for both the INJ and the CTL + Bup group at days 0, +1, and +2 compared to the CTL group (Figure 2, H). For the TST in light period, there is a common decrease for the INJ and the CTL + Bup group at day 0 followed by an increase at day +1 compared to the CTL group (Figure 2, C). The total NREM sleep time follow the same pattern with a decrease at day 0 and an increase at day +1 for both the INJ and the CTL + Bup groups (Figure 2, F). The total REM sleep time is also decreased at day 0 for the INJ and the CTL + Bup groups but there is an increase at day +1 followed by a decrease at day +2 only for the INJ group (Figure 2, I).

### Increased sleep stability in the dark period for 24 h post-injury

The duration of each episode of sleep and wakefulness gives an indication of the stability of the stage considered.

Short-bouts duration (20 to 160 s) was associated with unstable sleep/wake and long-bouts duration (330 to >650 s) with sleep/wake stability. As the number of bouts is related to the total duration of sleep or wakefulness, we expressed the number of sleep and wake bouts per hour spent in the considered stage.

We calculated the number of sleep/wake bouts per day for the dark period from days -1 to +2 for each group of animals. At day -1 there is no difference between the CTL and the INJ groups but the CTL + Bup group showed a higher frequency of sleep bouts of 20 s and a lower frequency of sleep bouts of [170–330] and [ >650] s compared to the CTL group (Figure 3, A). On the day of injury (day 0), the INJ group has a lower frequency of sleep bouts of [50–80] s compared to the CTL and CTL + Bup groups, and a higher frequency of sleep bouts of [330–640] s compared to the CTL and CTL + Bup groups (Figure 3, B). At day +1 of post-injury, the INJ group exhibited a lower frequency of sleep bouts of [30–40] and [50–80] s compared to the CTL and CTL + Bup groups, INJ groups also show a decrease for sleep bouts of [90–160] s and an increase in sleep bouts of [330–640] s compared to the CTL + Bup group (Figure 3, C). At days +2 and +3 of post-injury, there is no difference between our three groups of animals (Figure 3, D and E).

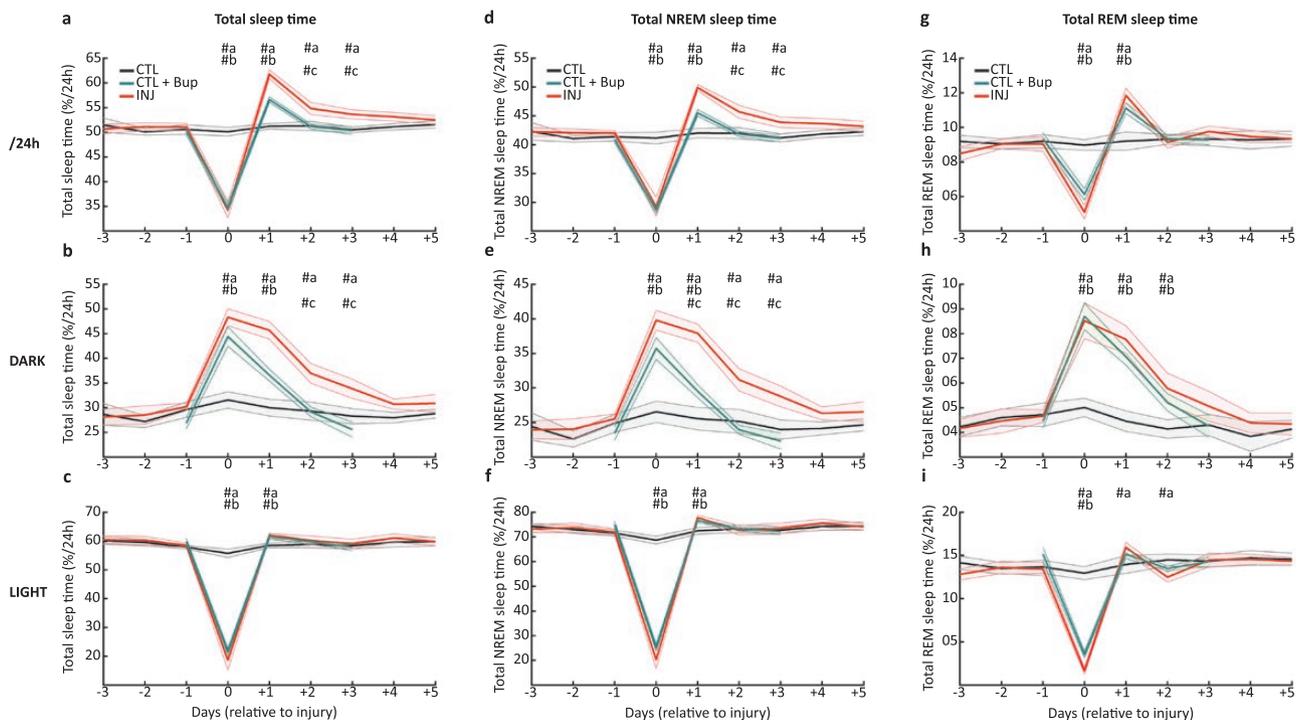
### Absence of significant pain markers in injured animals

Pain and muscle injury are inseparable. However, to limit the effects of pain on sleep we conducted behavioral and physiological evaluations to determine if the pain is severe. The evolution of the body weight during the whole experiment procedure is no different between CTL and INJ groups after the induction of the injury (Figure 4, A; the detailed values are in Supplementary Table 2). Subcutaneous temperature kinetics over 3 days show an alternation of high sleep propensity (i.e. during light photoperiod) with lower temperature and low sleep propensity (i.e. during dark photoperiod)

that induces a temperature increase for the INJ and CTL groups (Figure 4, B). However, INJ animals have significantly higher temperature levels on the day of injury (day 0, injury at 08:00) from 11:00 to 19:00 (Figure 1, B; green boxes indicated statistical differences), compared with CTL animals. In addition, INJ animals show lower temperature levels during the two following dark periods. To evaluate the effects of the activity on temperature but also on pain-related levels, we measured the locomotor activity of the animals continuously in their living cage. In terms of distance traveled per hour, there is a higher distance traveled on the afternoon of the injection day (day 0) in INJ compared with CTL animals, which could explain the higher temperature level, but after that, there is no difference between the two groups of animals (Figure 4, C). To assess how the animal moves, we evaluated the percentage of the body that was in motion when the animal moved, which is called the "Mobility body fill" (Figure 4, D). Again, INJ animals show greater mobility body fill for 2 h from 13:00 to 15:00 at day 0 with no other difference. Because the gamma band is associated with pain level, we analyzed the frequency of the gamma band (60–90 Hz) and the power in gamma oscillations during wakefulness from days -3 to +7 for CTL and INJ animals. There is no difference nor for the frequency (Figure 4, E) or for the power (Figure 4, F) of the gamma band between the CTL and INJ groups.

### No change in sleep pressure in response to muscle injury

To identify the possible mechanisms responsible for the increase of the TST after injury, we have evaluated the homeostatic sleep

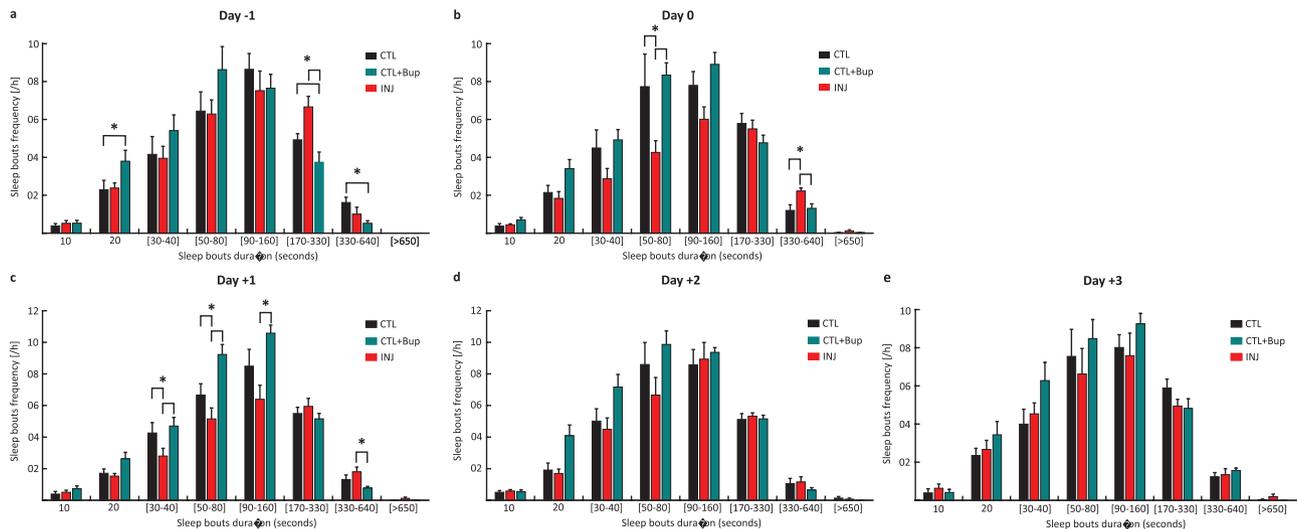


**Figure 2.** Muscle injury increases the TST and NREM sleep time in the dark period. (A) Percent of TST per day, (B) during dark period (from 20:00 to 08:00) and (C) during light period (from 08:00 to 20:00) in the control (CTL, black line), the control with buprenorphine (CTL + Bup, blue line) and the injured (INJ, red line) groups. (D) Percent of Total NREM sleep time per day, (E) during dark and (F) light periods; (G) Percent of total REM sleep time per day, (H) during dark and (I) during light periods. These data are expressed before injury (days -3, -2, and -1), the day of injury (day 0) and after injury (from days +1 to +5) for INJ and CTL animals; they are expressed before injury (day -1), the day of injection (day 0) and after injection (from days +1 to +3) for CTL + Bup animals. SEM in corresponding shaded area; #a:  $p < .05$  between CTL and INJ; #b:  $p < .05$  between CTL and CTL + Bup groups; #c:  $p < .05$  between CTL + Bup and INJ groups. Statistical differences were assessed by a Friedman ANOVA followed by Durbin-conover post-hoc test ( $\alpha = 0.05$ ).  $n = 8$  per group.

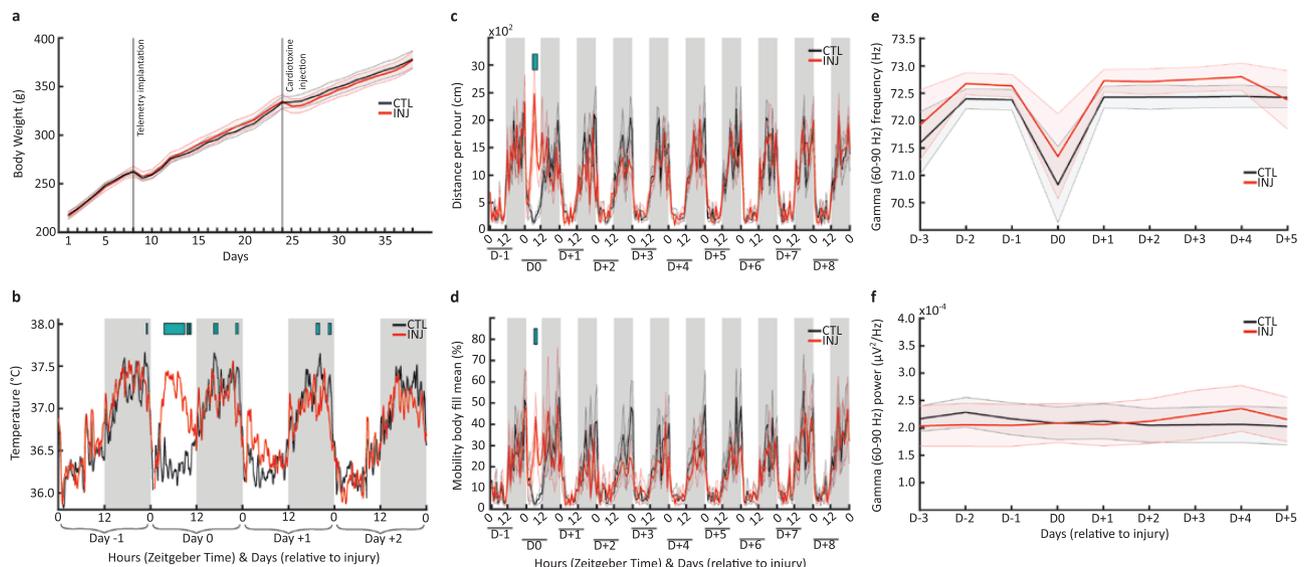
pressure from days 0 to +3 by analyzing the slow-wave activity (SWA) of NREM sleep. On the day of injection (day 0), we observe higher SWA in the INJ and CTL + Bup groups compared to the CTL group (Supplementary Figure 2, A, between 15:00 and 20:00 for the INJ group) associated with a decrease in TST for the INJ group (-66.97%). During the following dark period, the SWA is similar in both groups whereas the TST of the INJ group is increased by +51.23%. At days +1, +2, and +3 there is no SWA difference between groups, although the TST of the INJ group is still increased during the dark period (Supplementary Figure 2, B-D).

## NREM and REM sleep spectral analysis and spindles parameters in response to muscle injury

To go into more detail in the sleep micro-architecture, we conducted a spectral analysis of NREM and REM sleep and spindles characteristics. We have chosen to represent only delta and theta bands in light and dark periods (Supplementary Figure 3), but we have analyzed all the bands frequencies (Delta/Theta/Alpha/Beta) for each state (NREM/REM/WAKE) in details (data not shown, see "Methods"). Of all these analyses there were no differences



**Figure 3.** Increased sleep stability after muscle injury. a Number of sleep bouts (categories: [10, [20, [30–40, [50–80, [90–160, [170–320, [330–640, >650 s) per hour of sleep for the control (CTL, black bar), the control + buprenorphine (CTL + Bup, blue bar) and the injured (INJ, red bar) groups in the dark period at day -1. b at day 0 (injection at 08:00), c at day +1, d at day +2. Errorbar are SEM. \*:  $p < .05$ . Statistical differences were assessed by a Friedman ANOVA followed by Durbin-conover post-hoc test ( $\alpha = 0.05$ ).  $n = 8$  per group.



**Figure 4.** Evolution of indirect pain markers after induction of injury. (A) Body weight evolution of control (CTL, black line) and injured (INJ, red line) animals, during the whole experimental procedure. (B) Circadian temperature rhythm for the control group (CTL, black line) and the injured group (INJ, red line; injection at 8:00 day 0). (C) Distance traveled per hour for the control (CTL, black line) and the injured (INJ, red line) groups and (D) Mobility body fill mean in %/h between for both groups. (E) mean gamma (60–90 Hz) frequency for control (CTL, black line) and injury (INJ, red line) groups, f gamma power for both groups. (B–D) Green boxes indicated statistical differences between groups ( $p < .05$ ) assessed by cluster-based permutations (see "Methods" section). SEM in shaded area of corresponding colors.  $n = 8$  per group.

between the two groups for relative power or frequency. About spindles parameters, the spindle density (number of spindles per minute of sleep) per day is increased the day of injection (day 0) for the CTL + Bup and the INJ groups (Supplementary Figure 4, A) but it is decreased 24 h after the injury for both groups. In dark period, there is only a decrease in spindle density 24 h after the injury (Supplementary Figure 4, B) for the CTL + Bup and the INJ groups while there is an increase at day 0 in the light period for both groups (Supplementary Figure 4, C) followed by a decrease at day +1 only for the INJ group. For the spindle duration, there is no difference when considering 24-h periods (Supplementary Figure 4, D) or the dark/light period (Supplementary Figure 4, E and F). The spindle integrated activity (IAS) is also not significantly different for the three groups when considering 24-h period (Supplementary Figure 4, G) or for the dark period (Supplementary Figure 4, H) and the light period (Supplementary Figure 4, I). Spindle frequency per day is higher for the CTL + Bup group compared to the CTL group at day +1 (Supplementary Figure 4, J). For the dark period the spindle frequency is higher for the INJ group compared to the CTL group at day 0 and higher for the CTL + Bup group at day +1 (Supplementary Figure 4, K). For the light period, the spindle frequency is higher for the CTL + Bup group compared to the CTL group at day +1 (Supplementary Figure 4, L). In term of spindles number for the dark period, we observe higher spindles in the CTL + Bup and the INJ groups compared to the CTL group at day 0 and at days +1 and +2 only for the INJ group (Supplementary Figure 5, A). From days 0 to +3 in dark periods, the number of spindles is negatively correlated with short sleep bouts (20–160 s) in the INJ group and not in both CTL groups (Supplementary Figure 5, B). For long sleep bouts (330–640 s), the number of spindles is positively correlated in the INJ group whereas there is no significant correlation in the CTL groups (Supplementary Figure 5, C). The spindle number is also positively correlated with TST in the INJ and in the CTL+Bup groups but not in the CTL group (Supplementary Figure 5, D). In addition, the TST is itself negatively correlated with short sleep bouts (Supplementary Figure 5, E) and positively correlated with long sleep bouts (Supplementary Figure 5, F) for all groups.

### Analysis of protein levels of sleep regulatory molecules after muscle injury

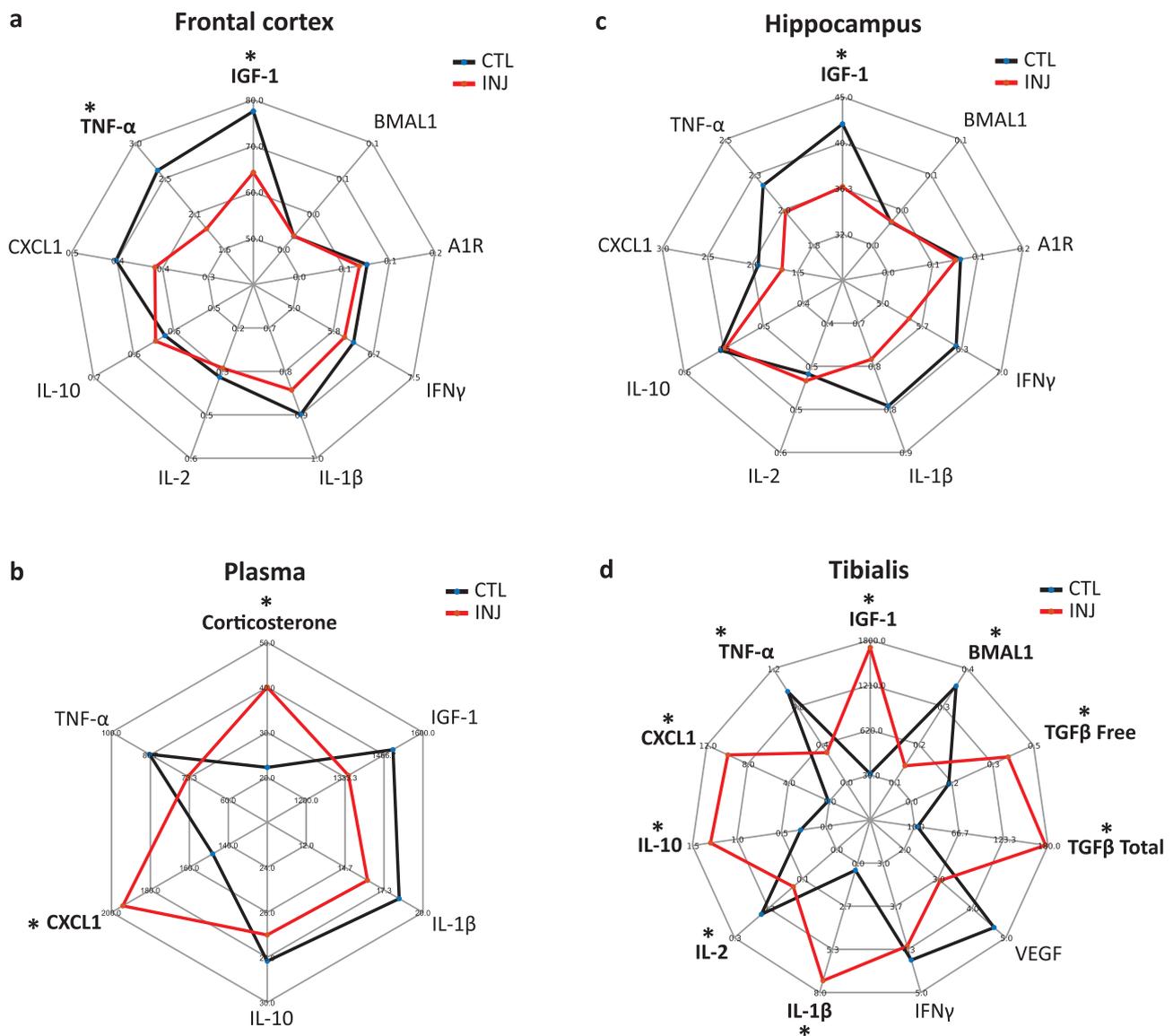
To analyze several molecules implicated both in the response to injury and sleep regulation, we realized biochemical analysis in the frontal cortex and hippocampus tissues, tibialis anterior (TA) muscle, and plasma, harvested 2 days after the induction of the injury (at 08:00). In brain tissues, there was only a lower concentration of TNF- $\alpha$  in the frontal cortex on day 2 post-injury (day +2) for INJ compared to CTL group, and no difference in IL-1 $\beta$  or other cytokines in the two brain areas, frontal cortex, and hippocampus (Figure 5, A and C). In these two brain areas, IGF-1 is lower in the INJ compared to the CTL group, whereas the core circadian clock gene, BMAL1, and the A1 adenosine receptor (A1R) were not statistically different. The A1 receptor is widely expressed in the brain in the cortex, thalamus, hippocampus, and basal ganglia, and is thought to contribute to sleep induction in a brain-region-dependent manner [36]. In plasma, IGF-1 concentrations were not statistically different between INJ and CTL groups, while those of the chemoattractant chemokine CXCL-1 and corticosterone are higher in the INJ group (Figure 5, B). In the injured TA, we observed very high concentrations of IGF-1 in the INJ compared to the CTL group (Figure 5, D). Higher concentrations of free and total TGF $\beta$  were also observed, with no significant difference for VEGF. The levels of the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and CXCL1 were

higher, while those of TNF- $\alpha$  and IL-2 were lower, and the anti-inflammatory cytokine IL-10 was higher. The BMAL1 level is lower in the INJ compared to the CTL group (the average concentrations are detailed in Supplementary Table 3).

## Discussion

To understand the adaptive response of sleep to a muscle injury in rats, we recorded the temperature, the locomotor activity, and the electroencephalogram (EEG)/electromyogram (EMG) before and after injury induction of the tibialis anterior (TA) muscle. We first characterized the histological muscle lesions and their onset of repair, showing that the injured area averaged 71% of the total muscle area, with the presence of typical smaller fibers with central nuclei [27, 37]. We then conducted a top-down analysis from sleep macro-parameters (TST, time per stages, sleep bouts duration) to sleep micro-parameters (spectral and spindles analysis). We performed these analyses in three groups of animals: a group injured by injection of cardiotoxin associated with the analgesic buprenorphine, a control group with an injection of buprenorphine alone (to assess its effects on sleep per se), a control group without any injection. As our objective was not to compare the effects of cardiotoxin by itself nor the injection process but rather the effects of an injury, we chose not to inject the control group with saline as previously described by our group [38]. To the best of our knowledge, we have shown for the first time that muscle injury induces an increase in total and NREM sleep time during the dark period (i.e. the preferred activity period) with the higher stability of sleep, and without significant changes in sleep micro-parameters. The increase in total and NREM sleep time is observed at 48 h and 72 h post-injury in the dark period, while the increase observed at 24 h post-injury cannot be dissociated from the effect of buprenorphine. Moreover, the higher sleep stability is observed from the day of the injury to 24 h post-injury and is highlighted primarily by a lower frequency of short sleep bouts in the injured group compared to the two other groups. The main result of an increase in total and NREM sleep time after muscle injury is in agreement with the study by Singh and Donlea [39] that shows a temporal increase of sleep in *Drosophila* following neural damage (i.e. antennal removal). As in our study, the sleep response depends on the light/dark period.

The increase in total and NREM sleep time at day +1 is observed in both the INJ and CTL + Bup groups and regardless the expression of the data (per day, and dark and light periods), and is preceded by a sharp decrease on the day of injury especially during the light period. The buprenorphine analgesic has been previously shown to increase time spent awake (sleep deprivation-like effect) [30, 31]. In our animals, even if the quantity of buprenorphine injected in our study (0.05 mg/kg) is lower than in the two studies (1 mg/kg [30] and 0.3 mg/kg [31]) and the route of injection was different (sub-cutaneous, intra-peritoneal, and intra-venous), we observed the same effect on sleep, that is, sleep deprivation for 4 to 8 h after the injection. The increase in total and NREM sleep time at day +1 for the CTL + Bup is likely a rebound response to this sleep-deprivation effect. We can notice that this effect of buprenorphine lasts for REM sleep for up to 48 h in the dark period, which has not been studied in the two cited studies [30, 31], and which perhaps deserves to be investigated on a larger number of animals. Regarding total and NREM sleep time on days +2 and +3 (i.e. 48 h and 72 h post-injury), they returned to baseline levels in the CTL + Bup group, while they remained higher in the injured animals compared to the CTL + Bup and CTL



**Figure 5.** Analysis of sleep regulatory molecules after muscle injury. Protein content levels at day +2 post-injury of pro- and anti-inflammatory cytokines, brain and muscle ARNT-like 1 (BMAL1) and growth factors in a frontal cortex, (B) hippocampus, (C) plasma and (D) tibialis anterior muscle for control animals (CTL, black line) and injured (INJ, red line). Pro-inflammatory cytokines: tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-1 $\beta$ , interferon (IFN)- $\gamma$ , chemokine C-X-C motif ligand (CXCL)-1, IL-2; anti-inflammatory cytokines: IL-10; growth factors: insulin-like growth factor (IGF)-1, vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factor (TGF)- $\beta$  free and total; the adenosine A1 receptor (A1R) and plasma corticosterone; clock protein: BMAL1. Sampling at 8:00, 2 days after injury (day +2) in non-implanted animals (see “Methods” section). \*:  $p < .05$ .  $n = 8$  animals per group (control and injured).

groups. These results show that the increase in total and NREM sleep time at 48 h and 72 h post-injury is specific to the muscle injury and not due to the buprenorphine injection and its related sleep deprivation at day 0.

Interestingly, the significant increase in TST at 48 and 72 h post-injury is specific to the period of low sleep propensity and high locomotor activity (dark period). Similarly, the 12 h increase in TST in *Drosophila* after removal of antennae occurs if the antennae are removed at the beginning of the active period (light for flies), but if the antennae are removed at the beginning of the sleep period (darkness for flies), there is no difference with the control group and the increase in sleep time is delayed until the next active-period [39]. In this sense, previous studies showed that there was no increase in the TST in the light period after sleep deprivation in the dark [40], although there is an increase in slow wave sleep activity (SWA, delta power EEG during NREM)

during the first 2 h [41]. In parallel with the increase in TST at 48 h and 72 h post-injury, we observed a decrease in short sleep bouts in the dark period on days 0 and +1 associated with an increase in long sleep bouts duration only in injury animals whereas there is no change in sleep bouts frequency dynamics for CTL + Bup animals. This decrease in short sleep bouts is expressed as a number per hour of sleep and therefore does not consider TST and can be interpreted as a decrease in sleep fragmentation (or alternatively an increase in sleep stability) in response to muscle injury.

In our study, the major confounding factor to consider is pain related to muscle injury. In our injured animals compared to control animals, there was no difference in the evolution of body weight, whereas the literature states that significant pain is associated with a cessation or decrease in weight gain [42–44]. We also do not observe any major difference in locomotor activity or subcutaneous temperature that would suggest that our injured animals are particularly

painful. To complement these results, the gamma band, which is increased in condition of pain [45, 46] is not different between controls and injured animals. However, if we observe no apparent signs of excessive pain, it is certain that the muscle injury is classically associated with pain. Therefore, for ethical reasons, we performed a single injection of buprenorphine during the induction of the muscle injury. Although this analgesic induces a sleep rebound for 24 h [30, 31], we observe injury-related sleep effects at 48 h and 72 h post-injury. Thus, pain associated with muscle injury cannot be completely dissociated from other mechanisms induced by a muscle injury that led to increased sleep time. Nevertheless, the sleep response to a muscle injury that we observe, characterized by an increase in total and NREM sleep time and a decrease in sleep fragmentation, is very different from the effects of pain on sleep [47–50]. Indeed, several studies have shown that muscle pain, which is rather chronic, induces sleep fragmentation [51–54] with, depending on the chronic pain model used, a decrease in NREM sleep time [51, 53].

Because muscle injury is a physiological constraint leading to an increase in TST, we wanted to know if this can be associated with a change in sleep pressure. We observed that SWA is significantly higher in INJ and CTL + Bup animals (compared with CTL animals) on day 0 between 15:00 and 20:00, so this increase extends after the 4- to 8-h period of buprenorphine-induced sleep deprivation. This SWA increase at day 0 is associated with increased TST during the following dark period. However, there was no difference in SWA at days +1, +2, or +3 preceding the dark period between the three groups of animals, suggesting that the increase in TST on those days in the dark period (+44.62%, +21.59%, and 13.62%, as indicated in [Supplementary Figure 2](#)) is independent of sleep pressure.

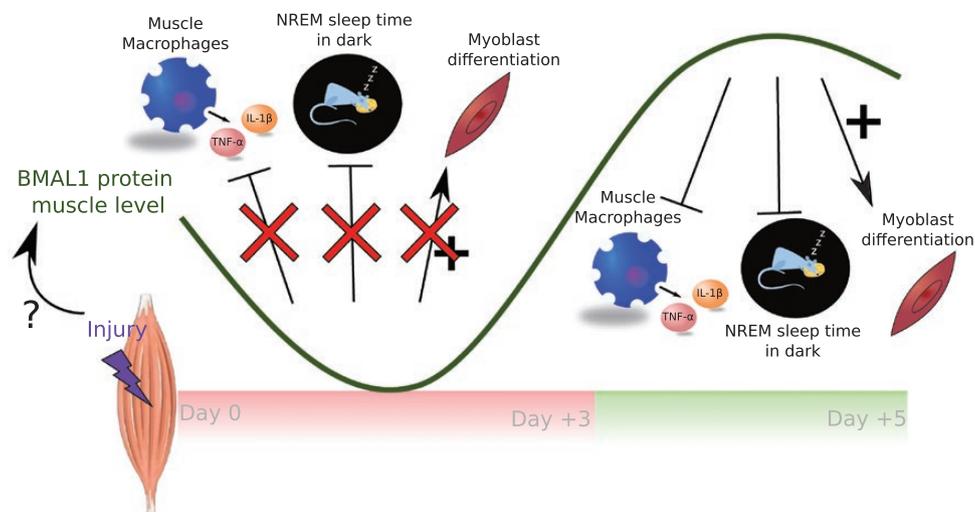
Another mechanistic hypothesis regarding the increase in sleep stability and the increase in TST after muscle injury could involve sleep spindles (i.e. spindles). In humans and rodents, spindles have been shown to protect NREM sleep from disruption, using arousability tests, precisely for the onset of the NREM sleep and during the N2 and N3 sleep stages [55]. In KO mice, NREM sleep disturbances occurred with reduced spindles [56–59] and optogenetic induction of sleep spindles increased NREM sleep duration [60]. Regarding the number of spindles per minute of NREM sleep (spindle density), we observed a significant increase at day 0 (expressed per day and in light period) for both INJ and CTL + Bup animals, followed by a significant decrease at day +1 regardless of its expression (per day, and in dark/light periods) for injured animals only, and no statistical difference between the three groups of animals at days +2 and +3. This last observation underlines that the observed increase in total and NREM sleep time at 48 h and 72 h post-injury is not explained by the increase in spindle density. On the other hand, the increase in spindle density at day 0 in the light period for both injured and control+buprenorphine animals remained surprising, because studies conducted on sleep deprivation have shown that spindle density decreased during the first hours of recovery sleep after sleep deprivation [61–63]. We thus suggested that increased spindle density at day 0 may be due to the buprenorphine rather than to the sleep-deprivation effects.

Our results also indicated a similar pattern of decreased spindle density at day +1, regardless of expression (per day and in light/dark periods) both for injured and control+buprenorphine animals, but which is significant only for the injured. The lack of significance in the control + buprenorphine animals could be explained by the small number of animals per group and should be investigated on a larger number. As the analgesic effect

of buprenorphine wanes after 6 to 8 h, the decrease at day +1 in spindle density in injured animals (which had also received buprenorphine together with cardiotoxin) is not dissociable from a potential buprenorphine effect. This is supported by the pattern of spindle frequency at day +1 which is the opposite of spindle density, with increased frequency at day +1 (per day and in light/dark periods) which is significant for control + buprenorphine animals only.

Because spindles occur during NREM sleep, when we examine the total number of spindles per hour in the dark period, the dynamic response is broadly like that of TST in dark period, with an increase at day 0 both for injured and control + buprenorphine animals, and over 72 h in the injured animals (always compared to control group). It is interesting to observe that TST is positively correlated with the number of spindles for the three groups of animals. Furthermore, TST significantly correlated respectively with short (negatively) and long (positively) sleep periods in injured and control + buprenorphine animals, whereas these correlations were present only for injured animals with respect to spindle number per hour. We could thus suggest that spindles functional implication in sleep stabilization is greater in the condition of an injury-induced increase in TST. To help us conclude on their implications in increasing TST in response to muscle injury, local field potential recording of the thalamus and cortex could provide additional details on spindle parameters, and optogenetic manipulation of spindles could tell us whether they are required for TST increase.

An additional hypothesis for understanding the effects of muscle injury on TST and NREM sleep is the relationship with sleep-regulating molecules. In the case of an infectious challenge, the increase in NREM sleep amount or intensity (i.e. increased SWA) and the increase in TST appear to be induced by an immune-inflammatory response involving increased production of the proinflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  through upstream or downstream signaling molecules [64]. Because muscle injury induces a local invasion of inflammatory cells and an immune cell activation resulting in cytokine release in a time-dependent manner, we secondarily analyzed the tissue content of proinflammatory cytokines in brain tissue and the bloodstream, with the goal of understanding the effects of injury and associated muscle repair processes on sleep. Tissue and blood were sampled on day +2 at 08:00, after the dark period on day +1. In the injured muscle, repair processes are well present with increased concentrations of pro- (IL-1 $\beta$ , IL-2, and CXCL1) and anti-inflammatory molecules (IL-10) as well as growth factors, mainly IGF-1 and TGF $\beta$ . Nevertheless, it is important to keep in mind that the cell composition of an injured muscle and a control muscle may be different (i.e. due to post-injury macrophage recruitment and presence of necrotic muscle fibers), which needs to be taken into account for the interpretation of the results. At the brain level, TNF- $\alpha$  concentration was lower in the frontal cortex of injured compared with control animals, and no significant difference for all other pro- and anti-inflammatory cytokines ([Figure 5](#)). The lower TNF- $\alpha$  level in the frontal cortex of injured animals is thus observed after the day +1 dark period when the TST and NREM sleep were increased (i.e. by about 45% for TST, as indicated in [Supplementary Figure 2](#)). It can be hypothesized that this lower level in the frontal cortex, an area of the brain involved in mediating normal sleep physiology and sleep deprivation phenomena [65], is secondary to the increase in TST in the dark period that precedes [66, 67]. Indeed, TNF- $\alpha$  is a key signal in the bidirectional crosstalk between sleep and the immune system; brain levels



**Figure 6.** Hypothetic role of muscle BMAL1 in sleep and responses to injury. In response to muscle injury, there is a first phase associated with a decrease in BMAL1 protein levels (which may be related to the loss of muscle activity). Decreasing levels of BMAL1 helps to lift the inhibition that BMAL1 exerts on the production of pro-inflammatory cytokines by macrophages and on sleep in the dark period. This also avoids the stimulatory effect of BMAL1 on myoblast differentiation which must occur late. In fact, after 3–4 days, the switch to an anti-inflammatory environment is associated with an increase in the level of BMAL1 protein to limit the secretion of pro-inflammatory cytokines, to stimulate myoblast differentiation and to bring the sleep time in the dark back to a normal level.

fluctuate with the sleep–wake cycle, with a peak at the beginning of the rest period and a trough after sleep ends [68, 69].

Furthermore, the fact that IGF-1 levels in the brain areas, frontal cortex, and hippocampus, are lower in injured animals is surprising, as this corresponds to the end of the dark period on day +1 that increased TST and NREM (thus potentially GHRH). Circulating and tissue IGF-1 production follows an increase in GH after induction by GHRH [70]. GHRH exerts a simultaneous stimulation of NREMS and GH secretion [20]. These lower levels of IGF-1 underscore one limitation of our goal, which was to make connections between the effects of injury on sleep and sleep-regulating molecules. To answer this question more precisely, the tissue sampling should have been done just before the dark period, that is, at 20:00 on day +2, or at 20:00 on days +1 or +3 (the TST being increased by 45% and 25% respectively for the latter two). It would thus be interesting in our future studies to investigate whether links exist between the increase in TST following muscle injury and orexin neurons as recently evidenced by Zegarra-Valdivia *et al.* [22]. These authors demonstrated that mice with genetic inactivation of IGF-1 receptor activity in orexin neurons have lower levels of orexin in the hypothalamus, predominantly slow wave activity in the EEG, and reduced sleep onset latency.

Another interesting result is the lower protein level of the core circadian clock gene BMAL1 in TA muscle of injured animals 2 days after injury. BMAL1 is involved in maintaining the integrity of skeletal muscle type and function [71] and a positive regulator of myogenesis [72, 73]. BMAL1 activity is regulated by its inhibitors cryptochrome (CRY) and period (PER), and its expression is also subjected to a circadian rhythm with an increase during the dark period and a decrease during the light period [74, 75]. Sampling at 08:00, just after the end of the dark period, allows to be close to the maximum point of BMAL1 circadian expression. BMAL1 was shown to be highly upregulated 5 days after induction of a TA muscle injury by cardiotoxin, and presented as a key component of the pro-myogenic response [76]. On the other hand, BMAL1 has been described to influence the inflammatory responses of macrophages by

inhibiting the production of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  [77, 78] showing clear anti-inflammatory functions. Thus, considering the result of Chatterjee *et al.* [76], it can be hypothesized that an initial downregulation of muscle BMAL1 levels allows to facilitate the early pro-inflammatory response to injury (day +2 in our study), followed by an upregulation during the transition to an anti-inflammatory phase and myoblast proliferation/differentiation (day +5 in the Chatterjee study). In addition to this anti-inflammatory role, BMAL1 is also associated with locomotor activity and sleep regulation [16, 72, 79]. A whole-body KO of the BMAL1 in mice is associated with reduced locomotor activity [72], increased NREM sleep intensity, and increased total sleep amount during the dark period; the rescue of BMAL1 expression in the muscle (not in the brain) decreases NREM sleep time in dark [16]. Moreover, BMAL1 muscle-overexpressed mice had less NREM recovery after sleep deprivation [16]. Thus, lower levels of muscle BMAL1 in injured animals could play a role in increased NREM sleep time in the dark period in response to injury, ultimately promoting the muscle repair process (as proposed in Figure 6). Since BMAL1 is an intracellular transcription factor involved in the regulation of many genes, further studies are needed to determine which signaling pathways and which type of extracellular messengers are involved to induce an increase in NREM sleep time.

To conclude, our results indicate that muscle injury induces an increase in total and NREM sleep time at 48 h and 72 h post-injury, associated with an increase in sleep stability at 24 h, and particularly in the dark period which is the preferred period of activity for rats. This increase in TST seems to be independent of the homeostatic sleep pressure on one hand, and even if the sleep spindles are impacted, they do not seem to be responsible. Future studies on the sleep regulatory molecules, pro-inflammatory TNF- $\alpha$ , growth factor IGF-1, and the core circadian clock BMAL1, in brain and muscle, will provide insight into the complex mechanisms and dynamics underlying the links between sleep, muscle injury, and repair processes. Our results must be confirmed in human research. However, if they are confirmed, they would potentially modulate the early management of sleep of patients with muscle injuries.

## Supplementary material

Supplementary material is available at *SLEEP* online.

## Acknowledgments

We are grateful to the “Imaging and Cytometry Core Facility” of Genethon for technical support. We thank the IRBA animal facility team and the IRBA imaging department, Natalie Guatto, Xavier Butigieg, Cédric Castellarin headed by Dr A-L. Favier.

## Funding

Financial supports were provided by the French Directorate General for Armament, Ministry of the Armies, Contract N°: SAN-1-0514.

## Disclosure Statement

Financial disclosure: None.

Non-financial disclosure: None.

## References

- Ben Simon E, et al. Sleep loss causes social withdrawal and loneliness. *Nat Commun*. 2018;**9**(1). doi:10.1038/s41467-018-05377-0
- Kecklund G, et al. Health consequences of shift work and insufficient sleep. *BMJ*. 2016;**355**:1–13. doi:10.1136/bmj.i5210
- Grandou C, et al. The effects of sleep loss on military physical performance. *Sport Med*. 2019;**49**(8):1159–1172. doi:10.1007/s40279-019-01123-8
- Spiegel K, et al. Sleep loss: a novel risk factor for insulin resistance and Type 2 diabetes. *J Appl Physiol*. 2005;**99**(5):2008–2019. doi:10.1152/jappphysiol.00660.2005
- Spiegel K, et al. Effects of poor and short sleep on glucose metabolism and obesity risk. *Nat Rev Endocrinol*. 2009;**5**(5):253–261. doi:10.1038/nrendo.2009.23
- Tobaldini E, et al. Short sleep duration and cardiometabolic risk: from pathophysiology to clinical evidence. *Nat Rev Cardiol*. 2019;**16**(4):213–224. doi:10.1038/s41569-018-0109-6
- Krause AJ, et al. The sleep-deprived human brain. *Nat Rev Neurosci*. 2017;**18**(7):404–418. doi:10.1038/nrn.2017.55
- Yang DF, et al. Sleep deprivation reduces the recovery of muscle injury induced by high-intensity exercise in a mouse model. *Life Sci*. 2019;**235**:116835. doi:10.1016/j.lfs.2019.116835
- Chennaoui M, et al. How does sleep help recovery from exercise-induced muscle injuries? *J Sci Med Sport*. 2021;**24**(10):982–987. doi:10.1016/j.jsams.2021.05.007
- Borbély AA. A two process model of sleep regulation. *Hum Neurobiol*. 1982;**1**:195–204.
- Ueyama T, et al. Suprachiasmatic nucleus: a central autonomic clock. *Nat Neurosci*. 1999;**2**(12):1051–1053. doi:10.1038/15973
- Gekakis N, et al. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* (80-). 1998;**280**(5369):1564–1569. doi:10.1126/science.280.5369.1564
- Okamura H, et al. Mammalian circadian clock system: molecular mechanisms for pharmaceutical and medical sciences. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010;**62**(9-10):876–884. doi:10.1016/j.addr.2010.06.004
- Kondratov RV, et al. Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock. *Genes Dev*. 2006;**20**(14):1868–1873. doi:10.1101/gad.1432206
- Marcheva B, et al. Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. *Nature*. 2010;**466**(7306):627–631. doi:10.1038/nature09253
- Ehlen JC, et al. Bmal1 function in skeletal muscle regulates sleep. *Elife*. 2017;**6**:1–14. doi:10.7554/elife.26557
- Borbély AA, et al. The two-process model of sleep regulation: a reappraisal. *J Sleep Res*. 2016;**25**(2):131–143. doi:10.1111/jsr.12371
- Krueger J. The role of cytokines in sleep regulation. *Curr Pharm Des*. 2008;**14**(32):3408–3416. doi:10.2174/138161208786549281
- Chennaoui M, et al. SLEEP AND THE GH/IGF-1 AXIS: consequences and countermeasures of sleep loss/disorders. *Sleep Med Rev*. 2020;**49**:101223. doi:10.1016/j.smrv.2019.101223
- Obal F, et al. GHRH and sleep. *Sleep Med Rev*. 2004;**8**(5):367–377. doi:10.1016/j.smrv.2004.03.005
- Van Cauter E, et al. Interrelations between sleep and the somatotropic axis. *Sleep*. 1998;**21**(6):553–566. doi:10.1093/sleep/21.6.553
- Zegarra-Valdivia JA, et al. Insulin-like growth factor I modulates sleep through hypothalamic orexin neurons. *FASEB J*. 2020;**34**(12):15975–15990. doi:10.1096/fj.202001281RR
- Brooks JHM, et al. Incidence, risk, and prevention of hamstring muscle injuries in professional rugby union. *Am J Sports Med*. 2006;**34**(8):1297–1306. doi:10.1177/0363546505286022
- Dyson R, et al. Incidence of sports injuries in elite competitive and recreational windsurfers. *Br J Sports Med*. 2006;**40**(4):346–350. doi:10.1136/bjism.2005.023077
- Mann CJ, et al. Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. *Skelet Muscle*. 2011;**1**(1):21. doi:10.1186/2044-5040-1-21
- Wosczyzna MN, et al. A muscle stem cell support group: coordinated cellular responses in muscle regeneration. *Dev Cell*. 2018;**46**(2):135–143. doi:10.1016/j.devcel.2018.06.018
- Forcina L, et al. Mechanisms regulating muscle regeneration: insights into the interrelated and time-dependent phases of tissue healing. *Cells*. 2020;**9**(5):1297. doi:10.3390/cells9051297
- Glynnis A, et al. Cardiotoxin induced injury and skeletal muscle regeneration. *Methods Mol Biol*. 2016;**1460**(1):191–208. doi:10.1007/978-1-4939-3810-0
- Hardy D, et al. Comparative study of injury models for studying muscle regeneration in mice. *PLoS One*. 2016;**11**(1):e01471981–e01471924. doi:10.1371/journal.pone.0147198
- Gauthier EA, et al. Buprenorphine disrupts sleep and decreases adenosine concentrations in sleep-regulating brain regions of Sprague Dawley rat. *Anesthesiology*. 2011;**115**(4):743–753. doi:10.1097/aln.0b013e31822e9f85
- O'Brien CB, et al. Opioids cause dissociated states of consciousness in C57BL/6J mice. *J Neurophysiol*. 2021;**126**(4):1265–1275. doi:10.1152/jn.00266.2021
- McShane BB, et al. Characterization of the bout durations of sleep and wakefulness. *J Neurosci Methods*. 2010;**193**(2):321–333. doi:10.1016/j.jneumeth.2010.08.024
- Uygun DS, et al. Validation of an automated sleep spindle detection method for mouse electroencephalography. *Sleep*. 2019;**42**(2):1–13. doi:10.1093/sleep/zsy218
- Cohen MX. Fluctuations in oscillation frequency control spike timing and coordinate neural networks. *J Neurosci*. 2014;**34**(27):8988–8998. doi:10.1523/jneurosci.0261-14.2014
- MARIS E, et al. Nonparametric statistical testing of EEG- and MEG-data. *J Neurosci Methods*. 2007;**164**(1):177–190. doi:10.1016/j.jneumeth.2007.03.024
- Holst SC, et al. Sleep homeostasis, metabolism, and adenosine. *Curr Sleep Med Rep*. 2015;**1**(1):27–37. doi:10.1007/s40675-014-0007-3
- Guardiola O, et al. Induction of acute skeletal muscle regeneration by cardiotoxin injection. *J Vis Exp*. 2017(119):1–6. doi:10.3791/54515

38. Bigard AX, et al. Myosin heavy chain composition of regenerated soleus muscles during hindlimb suspension. *Acta Physiol Scand*. 1997;**161**(1):23–30. doi:10.1046/j.1365-201x.1997.00193.x
39. Singh P, et al. Bidirectional regulation of sleep and synapse pruning after neural injury. *Curr Biol*. 2020;**30**(6):1063–1076.e3. doi:10.1016/j.cub.2019.12.065
40. Lancel M, et al. Effects of repeated sleep deprivation in the dark- or light-period on sleep in rats. *Physiol Behav*. 1989;**45**(2):289–297. doi:10.1016/0031-9384(89)90130-3
41. Vyazovskiy VV, et al. Sleep homeostasis in the rat in the light and dark period. *Brain Res Bull*. 2007;**74**(1-3):37–44. doi:10.1016/j.brainresbull.2007.05.001
42. Hestehave S, et al. Is there a reasonable excuse for not providing post-operative analgesia when using animal models of peripheral neuropathic pain for research purposes? *PLoS One*. 2017;**12**(11):e01881131–e01881123. doi:10.1371/journal.pone.0188113
43. Wuarin L, et al. Hyperalgesia in spontaneous and experimental animal models of diabetic neuropathy. *Diabetologia*. 1987;**30**:653–658.
44. Mogil JS. Animal models of pain: progress and challenges. *Nat Rev Neurosci*. 2009;**10**(4):283–294. doi:10.1038/nrn2606
45. Peng W, et al. Brain oscillations reflecting pain-related behavior in freely moving rats. *Pain*. 2018;**159**(1):106–118. doi:10.1097/j.pain.0000000000001069
46. Wang J, et al. Enhanced Gamma oscillatory activity in rats with chronic inflammatory pain. *Front Neurosci*. 2016;**10**:1–8. doi:10.3389/fnins.2016.00489
47. Schütz TCB, et al. The influence of orofacial pain on sleep pattern: a review of theory animal models and future directions. *Sleep Med*. 2009;**10**(8):822–828. doi:10.1016/j.sleep.2008.09.018
48. Silva A, et al. Sleep pattern in an experimental model of osteoarthritis. *Pain*. 2008;**140**(3):446–455. doi:10.1016/j.pain.2008.09.025
49. Babiloni AH, et al. Sleep and pain: recent insights, mechanisms, and future directions in the investigation of this relationship. *J Neural Transm*. Published online 2019;**4**: 647–660. doi:10.1007/s00702-019-02067-z
50. Frange C, et al. Fibromyalgia and sleep in animal models: a current overview and future directions. *Curr Pain Headache Rep*. 2014;**18**(8):434. doi:10.1007/s11916-014-0434-3
51. Silva A, et al. Sex differences in sleep pattern of rats in an experimental model of osteoarthritis. *Eur J Pain*. 2011;**15**(6):545–553. doi:10.1016/j.ejpain.2010.10.009
52. Sutton BC, et al. Musculoskeletal Sensitization and sleep: chronic muscle pain fragments sleep of mice without altering its duration. *Sleep*. 2014;**37**(3):505–513. doi:10.5665/sleep.3486
53. Andersen ML, et al. Sleep patterns over 21-day period in rats with chronic constriction of sciatic nerve. *Brain Res*. 2003;**984**(1-2):84–92. doi:10.1016/s0006-8993(03)03095-6
54. Cardis R, et al. Cortico-autonomic local arousals and heightened somatosensory arousability during nrems of mice in neuropathic pain. *Elife*. 2021;**10**:1–27. doi:10.7554/eLife.65835
55. Fernandez LMJ, et al. Sleep Spindles: mechanisms and Functions. *Physiol Rev*. 2020;**100**(2):805–868. doi:10.1152/physrev.00042.2018
56. Lee J, et al. Lack of delta waves and sleep disturbances during non-rapid eye movement sleep in mice lacking  $\alpha$ 1G-subunit of T-type calcium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;**101**(52):18195–18199. doi:10.1073/pnas.0408089101
57. Anderson MP, et al. Thalamic Cav3.1 T-type Ca<sup>2+</sup> channel plays a crucial role in stabilizing sleep. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;**102**(5):1743–1748. doi:10.1073/pnas.0409644102
58. Blethyn KL, et al. Neuronal basis of the slow (<1 Hz) oscillation in neurons of the nucleus reticularis thalami in vitro. *J Neurosci*. 2006;**26**(9):2474–2486. doi:10.1523/jneurosci.3607-05.2006
59. Cueni L, et al. T-type Ca<sup>2+</sup> channels, SK2 channels and SERCAs gate sleep-related oscillations in thalamic dendrites. *Nat Neurosci*. 2008;**11**(6):683–692. doi:10.1038/nn.2124
60. Kim A, et al. Optogenetically induced sleep spindle rhythms alter sleep architectures in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;**109**(50):20673–20678. doi:10.1073/pnas.1217897109
61. Dijk DJ, et al. Dynamics of electroencephalographic sleep spindles and slow wave activity in men: effect of sleep deprivation. *Brain Res*. 1993;**626**(1-2):190–199. doi:10.1016/0006-8993(93)90579-c
62. Curcio G, et al. Effect of total sleep deprivation on the landmarks of stage 2 sleep. *Clin Neurophysiol*. 2003;**114**(12):2279–2285. doi:10.1016/s1388-2457(03)00276-1
63. Vyazovskiy VV, et al. The dynamics of spindles and EEG slow-wave activity in NREM sleep in mice. *Arch Ital Biol*. 2004;**142**(4):511–523.
64. Besedovsky L, et al. The sleep-immune crosstalk in health and disease. *Physiol Rev*. 2019;**99**(3):1325–1380. doi:10.1152/physrev.00010.2018
65. Muzur A, et al. The prefrontal cortex in sleep. *Trends Cogn Sci*. 2002;**6**(11):475–481. doi:10.1016/s1364-6613(02)01992-7
66. Dimitrov S, et al. Differential acute effects of sleep on spontaneous and stimulated production of tumor necrosis factor in men. *Brain Behav Immun*. 2015;**47**:201–210. doi:10.1016/j.bbi.2014.11.017
67. Rockstrom MD, et al. Tumor necrosis factor alpha in sleep regulation. *Sleep Med Rev*. 2018;**40**:69–78. doi:10.1016/j.smrv.2017.10.005
68. Floyd RA, et al. Diurnal variation of TNF $\alpha$  in the rat brain. *Neuroreport*. 1997;**8**(4):915–918. doi:10.1097/00001756-199703030-00020
69. Krueger JM, et al. A physiologic role for IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . *Ann NY Acad Sci*. 1998;**856**:148–159. doi:10.1111/j.1749-6632.1998.tb08323.x
70. Giustina A, et al. Pathophysiology of the neuroregulation of growth hormone secretion in experimental animals and the human. *Endocr Rev*. 1998;**19**(6):717–797. doi:10.1210/edrv.19.6.0353
71. Andrews JL, et al. CLOCK and BMAL1 regulate MyoD and are necessary for maintenance of skeletal muscle phenotype and function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;**107**(44):19090–19095. doi:10.1073/pnas.1014523107
72. McDearmon EL, et al. Dissecting the functions of the mammalian clock protein BMAL1 by tissue-specific rescue in mice. *Science* (80-). 2006;**314**:1304–1308.
73. Chatterjee S, et al. Brain and muscle Arnt-like 1 is a key regulator of myogenesis. *J Cell Sci*. 2013;**126**(10):2213–2224. doi:10.1242/jcs.120519
74. Nakao R, et al. The skeletal muscle circadian clock: current insights. *ChronoPhysiology Ther*. 2017;**7**:47–57. doi:10.2147/cpt.s116569
75. Qiu Z, et al. Roles of HDAC3-orchestrated circadian clock gene oscillations in diabetic rats following myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Cell Death Dis*. Published online 2021;**1**:43. doi:10.1038/s41419-020-03295-y
76. Chatterjee S, et al. Brain and muscle Arnt-like 1 promotes skeletal muscle regeneration through satellite cell expansion. *Exp Cell Res*. 2015;**331**(1):200–210. doi:10.1016/j.yexcr.2014.08.041
77. Curtis AM, et al. Circadian control of innate immunity in macrophages by miR-155 targeting Bmal1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;**112**(23):7231–7236. doi:10.1073/pnas.1501327112
78. Oishi Y, et al. Bmal1 regulates inflammatory responses in macrophages by modulating enhancer RNA transcription. *Sci Rep*. 2017;**7**(1):1–14. doi:10.1038/s41598-017-07100-3
79. Schiaffino S, et al. The functional significance of the skeletal muscle clock: lessons from Bmal1 knockout models. *Skeletal Muscle*. 2016;**6**(1):1–9. doi:10.1186/s13395-016-0107-5

## RESEARCH ARTICLE

# Determination of the sleep–wake pattern and feasibility of NREM/REM discrimination using the non-invasive piezoelectric system in rats

Théo Vanneau<sup>1,2</sup>  | Michael Quiquempoix<sup>1,2</sup> | Aurélie Trignol<sup>1,2</sup> | Charles Verdonk<sup>3</sup> | Pascal Van Beers<sup>1,2</sup> | Fabien Sauvet<sup>1,2</sup>  | Danielle Gomez-Merino<sup>1,2</sup> | Mounir Chennaoui<sup>1,2</sup> 

<sup>1</sup>Unité Fatigue et Vigilance, Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA), Brétigny-sur-Orge, France

<sup>2</sup>EA7330 VIFASOM, Université de Paris, Paris, France

<sup>3</sup>Unité Neurophysiologie du Stress, Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA), Brétigny-sur-Orge, France

## Correspondence

Mounir Chennaoui, I.R.B.A., 1 place du général Valéri, 91220 Brétigny sur orge, France.

Email: mounirchennaoui@gmail.com

## Funding information

This research has been funded in operating cost by the DGA (General Directorate for Armament, Ministry of the Armies) (contract SAN-1-0514).

## Summary

The piezoelectric cage-floor sensors have been used to successfully dissect sleep patterns in mice based on signal features related to respiration and body movements. We studied performance of the piezoelectric system to quantify the sleep–wake pattern in the rat over 7 days of recording compared with a visual electroencephalogram/electromyogram scoring, and under two light/dark (LD12:12 and LD16:8) photoperiods leading to change in the 24-hr sleep characteristics ( $N = 7$  per group). The total sleep time (%/24 hr) over the 7 days recording and hourly sleep time over the last 24-hr recording were not statistically different between methods under the two photoperiods. Both methods detected higher total sleep time with the LD16:8 photoperiod compared with LD12:12 ( $p < .05$ ), and correlated significantly ( $p < .001$ ) at light and dark periods during each photoperiod. The accuracies for discrimination of sleep–wake patterns between methods were 81.9% and 84.9% for LD12:12 and LD16:8, respectively. In addition, spectral analysis of the respiratory signal given by piezo during all 10-s periods of the corresponding non-rapid eye movement and rapid eye movement sleep periods recorded by electroencephalogram/electromyogram resulted in selection of 36 features that could be inserted in an automated non-rapid eye movement sleep and rapid eye movement sleep classification, with 90% accuracy with the electroencephalogram/electromyogram visual scoring. The piezo system proved to be a reliable non-invasive alternative to electroencephalogram recording to study total sleep time in rat, with feasibility to discriminate between non-rapid eye movement and rapid eye movement sleep stages. This will be interesting in pharmacological or bio-behavioural studies evaluating sleep patterns or the restorative functions of sleep in the body and the brain.

## KEYWORDS

automated, electroencephalogram, non-invasive sleep scoring, photoperiod, piezoelectric, rat

## 1 | INTRODUCTION

An alternation of sleep–wake episodes is observed in mammals, but variations between species exist with multiple short periods of sleep in rodents while humans are monophasic sleepers. Rats sleep in three basic distinguished states: wakefulness; non-rapid eye movement (NREM) sleep; and rapid eye movement (REM) sleep (Franken et al., 1995; Sauvet et al., 2018). In research studies on rodents, the accurate characterization of sleep duration and architecture can help to understand the role of sleep on health, memory or recovery from injury (Chennaoui et al., 2020; Eugene & Masiak, 2015; Rasch & Born, 2013).

The gold-standard method for sleep analysis in mammals is polysomnography (electroencephalogram [EEG] and electromyogram [EMG] recording), allowing characterization of sleep quantity and architecture by manual scoring or by software programs (Campbell, 2009; Deboer, 2007; Saper, 1890). Limitations of this method are specific and lengthy surgery and postoperative side-effects (e.g. infection or oedema) that require recovery time, and may induce bias in studies investigating peripheral and cerebral responses after manipulation of sleep time or environmental constraints for example (Woalder, 2017).

Non-invasive techniques to investigate sleep have been developed particularly in mice (Fisher et al., 1990; McShane et al., 2012; Pack et al., 2007; Tang & Sanford, 2002), and one of the most promising is the piezoelectric (piezo) system. This system uses a piezoelectric polymer film to transform mechanical pressure into electrical signals with voltage, which are proportional to the compressive strength. It was designed originally to detect motor activity in a neuropharmacological study (Megens et al., 1987), but piezo sensors can also detect breathing movements with a high sensitivity. During sleep, the respiratory rate is provided by the frequency of extension of the animal's chest wall, which exerts significant pressure on the piezoelectric sensors and produces a rhythmic signal generally between 1 and 3 Hz (Carnevali et al., 2013). This regular signal appears as soon as the animal rests and cannot be distinguished from other signals emitted during the awakening (locomotor activity, climbing, eating, grooming). The combined data of motor activity and respiratory rate allow to discriminate and evaluate the phases of wakefulness and sleep in mice with a high degree of accuracy (Flores et al., 2007; Mang et al., 2014). In addition, Mang et al. (2014) have shown a clear difference in the regularity of the breathing signal between NREM and REM sleep states using the piezo-derived decision statistic, but without sufficient predictive power to automatically distinguish the two states. From there, a recent study has demonstrated that the piezoelectric method dissected sleep based on breathing regularity into states strongly correlated with REM and NREM sleep, but with a tendency to underestimate NREM sleep (Yaghouby et al., 2016).

No comparison between the piezoelectric system and EEG/EMG recording has been performed in rats, whereas a non-invasive method to quantify sleep duration or even to discriminate between NREM and REM sleep states would be interesting. To our knowledge, Zeng et al. (2012) are the only ones to have constructed a

non-contact monitoring system to measure movement and respiratory activity using signals acquired with pulse Doppler radar in the rats. These authors developed and validated a method for automated scoring of wakefulness, and NREM and REM sleep using a support vector machine, which is in good agreement with visual EEG scored sleep.

This study aims to compare sleep and wake data obtained by the piezoelectric method with those obtained by the gold-standard EEG/EMG technique analysing the signal by visual scoring, in the rat. To validate the piezo system, we tested two different light/dark (LD) photoperiods inducing two different states of sleep duration, the habitual LD12:12 photoperiod and the LD16:8 photoperiod known to increase total sleep time (TST; Sauvet et al., 2018). This will test whether the piezo system is capable of assessing the sleep time of rats under positive disturbance. We additionally performed the spectral analysis of the respiratory signal given by the piezo system during the corresponding NREM and REM sleep periods recorded by EEG/EMG in the objective to test the piezo capacity to non-invasively evaluate NREM and REM sleep states in rats.

## 2 | METHODS

### 2.1 | Animals

The experiment was performed using 14 male Wistar rats (Charles Rivers Laboratory, France) aged 4 weeks and weighing 200–220 g on their arrival. For 1 week, animals were housed 4 per cage (612 × 435 × 216 mm) on a 12 hr light and 12 hr dark cycle (LD12:12, lights on from 08:00 hours to 20:00 hours) in a temperature-controlled (21°C ± 2°C) environment, with water and food available ad libitum. The study was approved by the institutional animal ethics committee (Protocol DAP\_11-2019).

### 2.2 | Experimental procedure

Seven days after arriving at the laboratory, transmitters for the recording of EEG/EMG were surgically implanted in rats (HD-X02, Data Sciences International, St Paul, USA). The surgical implantation and analgesic procedure have been described in our previous study (Sauvet et al., 2018). After surgery, animals were individually housed in a ventilated cabinet (BIO-C36, Tecniplast, Buguggiate, Italy) and had a 10-day recovery period in the habitual LD12:12 photoperiod. After these 10 days, rats were placed in the piezoelectric (piezo) device (Signal Solutions, LLC, Lexington, KY, USA) and simultaneously recorded with EEG/EMG and the piezo system. The piezoelectric cages are standard individual cages (435 × 290 × 150 mm) that consist of a first polycarbonate cage in which a carpet filled with sensors is placed. A second, thinner cage is then placed on top of this mat and filled with litter. The cages are transparent and there are two per floor, which limits isolation. The habitual control group stayed under a LD12:12 photoperiod, while the extended light group underwent

a LD16:8 photoperiod (light on at 08:00 hours–00:00 hours). During this time, animals are left alone, and were disturbed only to monitor water and food.

## 2.3 | Data acquisition and scoring

### 2.3.1 | Piezoelectric system

The sensor hardware system is PiezoSleep 2.0, and the software analysis is a MatLab toolbox: PiezoSleepStats (Signal Solutions, LLC, Lexington, KY, USA). The system is well described in Mang et al. (2014). To summarize, a mat filled with piezoelectric sensors is placed under the animal cage. These piezo sensors will emit an electrical signal proportional to each physical deformation that they will undergo. The signal corresponding to a waking period is associated with irregular high amplitude and, conversely, sleep stage is characterized by a low-amplitude regular signal. Successive recordings over 24 hr allow the Piezosleepstats software to make a daily adjustment of the threshold, which limits the inter-day variability of the sleep-wake discrimination.

### 2.3.2 | EEG/EMG visual scoring

The EEG/EMG was recorded using the Neuroscore version 6.0 software (DSI, St Paul, MN, USA). EEG signals sampled at 500 Hz were filtered (0.3–49 Hz bandpass) and classified as Wake, NREM and REM sleep using visual 10-s epoch (as described previously by McShane et al., 2010). TST was calculated as REM + NREM duration. During these 7 days, each 10-s epoch was scored for the 14 animals, and allowed us to calculate the TST for the total recording time, per 24 hr and hourly.

## 2.4 | Data analysis

### 2.4.1 | Wake and sleep

The state (wake or sleep) of the animal is evaluated every 10 s for the visual scoring of EEG/EMG and automatically for the piezo system. We choose 10-s epochs because we consider that is sufficient to study sleep stability while allowing manual reading for 7 days. For the TST, we evaluated the percentage of sleep per day during the 7 days of recording (a total of 823,359 epochs after removing some epochs classified as illegible on EEG/EMG). We calculated the sensitivity, specificity and accuracy of the piezo system on all epochs for both photoperiods. The sensitivity is the ability of the method to correctly identify Sleep epochs (also called True positive). The specificity is the ability of the method to correctly identify Wake (also called True negative). Accuracy is the proportion of true results, either true positive (Sleep) or true negative (Wake). The hour-by-hour sleep kinetic was analysed. On the basis of the 10-s epoch state,

we also examined sleep quality by measurement of sleep and wake bouts frequencies per hour over eight consecutive episode duration categories (10, 20, 30–40, 50–80, 90–160, 170–320, 330–640, > 640 s).

### 2.4.2 | Features extraction

While we used the automated piezo scoring given by the piezo software to discriminate between Wake and Sleep periods, here we worked only on the raw signal (RS) recorded by the piezo mat, and we considered only the control group (LD12:12,  $n = 7$ ). We designed our own algorithms in Matlab to do the features extraction. One way to reduce stationary noise and to highlight characteristic oscillations from these signals is to take the autocorrelation of the signal (AS). The autocorrelation function is a method (Donohue et al., 2008) successfully used for respiratory signals (Zeng et al., 2012), which allows us to highlight the difference between NREM and REM sleep. From these two types of signal (RS and AS), we extracted the Kurtosis, the standard deviation, the mean, the root mean square and the envelope variation. The spectral analysis of RS and AS is done with FFT using Pwelch (Pw) method (5 s hamming window with 50% overlap). From this spectral analysis, we extracted the frequency at maximum between 0–8 Hz and 1–3 Hz; the maximum power spectral density (PSD; 0–8 Hz and 1–3 Hz); the weighted average frequency between 0–1 Hz, 1–3 Hz, 3–5 Hz, 5–7 Hz; some PSD ratios: 1.4/1.6 Hz–1.6/1.8 Hz–1.4/1.8 Hz–2.2/2.4 Hz–2/5 Hz; and the area under the curve between 1–3 Hz and 3–5 Hz). We also calculated the instantaneous frequency ( $F_{q\_inst}$ ) of the RS, with Hilbert's transformation (Cohen, 2014), to precisely evaluate frequency changes inside a 10-s epoch of REM and NREM sleep. We investigated the standard deviation of the  $F_{q\_inst}$ , the mean, and the envelope variation.

### 2.4.3 | Features selection

For feature selection, the method used to establish the set of relevant features for estimation of the sleep state (response variable) comprises two steps: (a) ranking the candidate features in order of decreasing relevance to the response variable using the Orthogonal Forward Regression (OFR) algorithm; and (b) eliminating irrelevant features by the random probe method.

#### *OFR algorithm*

The OFR algorithm (Chen et al., 1988) operates iteratively, given the feature vectors  $f_k$ ,  $k \in [1 \dots N]$  ( $N$  being the number of candidate features) and the response variable vector  $\Omega$  (Figure S1). All vectors are defined in observation space, whose dimension is equal to the number of examples. First, all candidate features (including the “probe” vectors defined below) are ranked according to their correlations to the response variable. In the observation space, the correlation  $c_k$  between the feature vector  $f_k$  and the response variable is the square cosine of the angle between the feature and

the response variable:  $c_k = \cos^2(f_k, \Omega)$ . The most correlated feature (with the maximum square cosine) is ranked first. Then, all remaining features and the response variable are orthogonalized with respect to the first feature, in order to eliminate the contribution of the latter to the response variable. The first feature is then stored and removed from the set, and the algorithm is iterated on the remaining orthogonalized features, until all candidate features are ranked.

#### Random probe method

After feature ranking, feature selection was performed by the random probe method (Stoppiglia et al., 2003). Specifically, 100 randomly drawn “probe” vectors were appended to the set of candidate features, and ranked together with the latter as described above. The higher the probability for a probe to rank better than a candidate feature, the lower the relevance of that candidate feature. For each candidate feature  $i$ , the cumulative probability  $P_p(i)$  for a probe  $p$  to rank better than that feature was computed;  $P_p(i)$  can be interpreted as the risk of keeping feature  $i$  although it is irrelevant. All candidate features for which that risk is larger than a user-defined threshold were discarded. Here, the threshold was chosen to be 0.01.

## 2.5 | Statistics

All data are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean, and were analysed using Matlab (Statistics toolbox, 2019b, Mathworks, Natick, MA, USA). The normality of each distribution is tested with a Shapiro test. If they are normally distributed, we perform a  $F$ -test of equality of variances. TST values evaluated on the 7 days recording for the LD12:12 and LD16:8 groups, with the EEG/EMG and the piezo system, were normally distributed. A two-way repeated-measures analysis of variance was performed, including the method (piezo system versus EEG/EMG) as a within-animal factor and the photoperiod (LD12:12 versus LD16:8 groups) as a between-animal factor. For the post hoc test, we applied Bonferroni correction for multiple comparisons. As values were not distributed normally for the 24-hr sleep distribution during the last 24 hr recording, a Friedman test was performed with two factors (method [piezo and EEG/EMG] and hour [24 levels]) for the LD12:12 and the LD16:8 groups, respectively. A Spearman correlation analysis was performed between sleep time recorded by the piezo system and EEG/EMG. The Friedman test compares the means of percentage of TST evaluated by the piezo system or EEG/EMG for each hour during the last 24-hr recording.

## 3 | RESULTS

### 3.1 | Piezo and EEG/EMG signals

Sleep recording of 14 non-congenic rats was realized simultaneous by the piezo system and by EEG/EMG telemetry, seven rats were under the Habitual Photoperiod (LD12:12) and seven were under an

extended Long Photoperiod (LD16:8) during 7 days without interruption. The quality of the piezo system for identifying sleep and wake states is shown over a 30-min recording, with high and low sleep propensity corresponding to a light and dark photoperiod, respectively (Figure 1a1,b1), with illustration of a short 20-s transition from sleep to wake (Figure 1a2) and from wake to sleep (Figure 1b2).

### 3.2 | Total sleep time

A total of 823,359 (419,806 for the LD12:12 group and 403,553 for the LD16:8 group) sleep–wake epochs were compared between the two methods. The TST per day (%/24 hr) evaluated with the piezo system and the EEG/EMG are significantly higher in the LD16:8 compared with the LD12:12, and there is no significant difference between the two methods for the same photoperiod group (LD12:12 or LD16:8; Table 1).

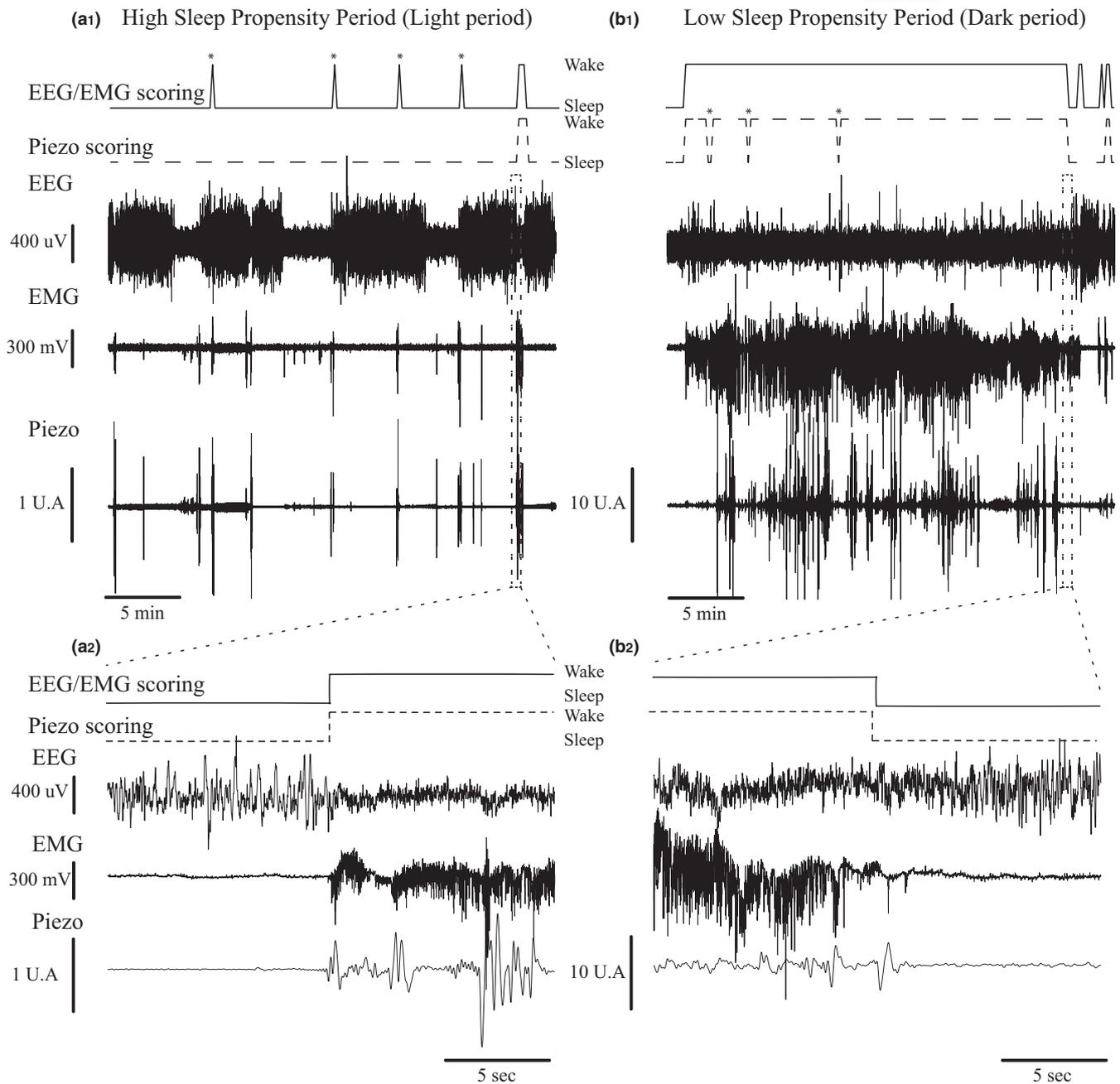
The confusion matrix between the two methods for the sleep–wake epochs scoring and for LD12:12 and LD16:8 photoperiods is described in Table 2. For the LD12:12 group, the sensitivity was 84.8% and the specificity was 78.4% with 81.9% accuracy. For the LD16:8 group, the sensitivity was 90.5% and the specificity was 76.3% with 84.9% accuracy. The overall correspondence for the 823,359 epochs is 83.4% (686,426 same epochs).

### 3.3 | Hourly sleep time

We have investigated the temporal evaluation hour by hour of the TST during the last 24 hr of the recording time (between day 6 and day 7). No statistical difference is observed between the piezo system and the visual scoring for the LD12:12 group (Friedman test,  $p = .82$ ), or for the LD16:8 group (Friedman test,  $p = .08$ ; Figure 2a1,b1). Sudden changes in sleep time per hour were well tracked by the piezo system (Figure 2a1, as shown for the 15-hr time point). At light and dark periods, there are significant positive correlations between TST evaluated by the piezo system and by EEG/EMG for LD12:12 and LD16:8 groups (Figure 2a2,b2). There was a main significant effect of photoperiod for the means of TST during the 24-hr recording with higher TST in the LD16:8 compared with LD12:12 group, without method effect (Figure 2c).

### 3.4 | Sleep quality

The quality of sleep has been investigated by analysis of sleep and wake bouts frequencies per hour (10 s to < 640 s). There were no significant differences for sleep bouts between EEG/EMG scoring and the piezo system for the LD12:12 and LD16:8 groups (Figure S2A<sub>1</sub>,B<sub>1</sub>), while there were statistical differences for wake bouts in the LD12:12 group only (Figure S2A<sub>2</sub>). The piezo system under-estimated wake bouts < 30 s and, conversely, overestimated wake bouts lasting 50–640 s (Figure S2A<sub>2</sub>).



**FIGURE 1** Electroencephalogram (EEG)/electromyogram (EMG)/Piezo signals simultaneously recorded for: (a<sub>1</sub>) 30 min of high sleep propensity period corresponding to a light period; and (b<sub>1</sub>) 30 min of low sleep propensity period corresponding to a dark period. The filled line just below represents the scoring for the EEG/EMG method (Sleep on top, Wake on bottom). Dashed line represents the scoring of the piezo system. (\*) illustrates differences in scoring. a<sub>2</sub> and b<sub>2</sub>: zooms of 20 s on the corresponding marked area illustrating a transition from sleep to wake (a<sub>2</sub>) or from wake to sleep (b<sub>2</sub>) with EEG/EMG/Piezo signals (corresponding scoring at the top)

### 3.5 | Features selection and classification of NREM and REM

Our results showed the sensitivity of the piezo system to detect breathing signal differences corresponding to NREM and REM sleep states scored with the EEG/EMG method, as visually illustrated in Figure 3(a1) (NREM sleep) and (a2) (REM sleep) with the RS and the corresponding autocorrelation (Figure 3b1,b2). The boxplot in Figure 3(a3) outlines the absolute amplitude difference for all NREM

and REM sleep epochs calculated with RS, with REM sleep epochs taking higher value. There is a frequency increase during REM sleep compared with NREM sleep with higher values at maximum (Figure 4a1,a2; 1.50 Hz for NREM sleep, 1.79 Hz for REM sleep), but lower PSD (Figure 4a1,a3). Features that were selected as relevant to estimate the sleep state (as described in the Feature Selection section) are presented in Table 3. Unselected features were: maximum frequency (1–3 Hz, RS); PSD ratio (1.4/1.8 Hz, RS; 1.4/1.6 Hz AC; 1.6/1.8 Hz AC; 2/5 Hz AS); mean PSD (0–1 Hz, RS); mean PSD

**TABLE 1** TST evaluated by EEG/EMG method and the piezoelectric system for LD12:12 and LD16:8 photoperiod groups ( $n = 7$ , respectively, two-way ANOVA with factor Method and Photoperiod:  $p = .97$  for Methods,  $p < .001$  for Photoperiod,  $p = .35$  for interaction; post hoc Student's *t*-test with Bonferroni correction (#):  $p = .01$  for EEG/EMG between LD12:12 and LD16:8;  $p = .002$  for Piezo between LD12:12 and LD16:8)

	TST (%/24 hr)	
	LD12:12	LD16:8
EEG/EMG	54.8 ± 1.7 #	60.7 ± 3.0
Piezo	56.3 ± 3.2 #	64.3 ± 4.9

EEG, electroencephalogram; EMG, electromyogram; LD, light/dark; TST, total sleep time.

(3–5 Hz, RS); standard deviation (RS); mean (AS); envelope variation (RS). Using these 35 informative features and after training our algorithm (see Methods) we obtained, with 129,700 epochs of NREM sleep and 24,303 epochs of REM sleep for the testing set, 92.5% sensitivity, 75.5% specificity and 89.8% accuracy (Table 4). Indeed, 120,000 epochs of NREM sleep (/129,700) were well classified, corresponding to 92.5%, when 9,700 epochs were wrongly classified as REM sleep (7.5%). For REM sleep, 18,349 epochs (/24,303) were properly classified, corresponding to 75.5%, when 5,954 epochs were wrongly classified as NREM sleep.

## 4 | DISCUSSION

This study has demonstrated the relevance of using the non-invasive piezoelectric system to investigate sleep quantity and quality in the rat model during 7 days under the habitual light/dark LD12:12 sleep-wake rhythm, as well as under a positive perturbation of the sleep rhythm (LD16:8). Our results also showed the feasibility to discriminate REM and NREM sleep stages using the piezo system as a whole (hardware + software, resumed in Figure 5). The piezo non-invasive, automated method provided a robust analysis of the mean percentage of TST per 24 hr recorded over 7 days or the last 7 days (in terms of mean or hourly sleep kinetic), similarly to the gold-standard EEG/EMG telemetry. The mean accuracy of the two LD photoperiods on

the percentage of TST per 24 hr between the piezoelectric system and the EEG/EMG method is 83.4%, which is close to that of mice (90%), considering that most of the studies on mice were performed for a maximum of 48 hr (Flores et al., 2007; Mang et al., 2014). The confusion matrix analysis evidenced high levels of sensitivity and specificity between the two methods for the scoring of sleep and wake epochs, i.e. 84.8% and 78.4% for the habitual LD12:12 sleep-wake rhythm. Finally, when compared with the EEG/EMG method, the discrimination between NREM and REM sleep is feasible with an acceptable accuracy (92.5% sensitivity and 75.5% specificity) using the piezo system and a boosting algorithm.

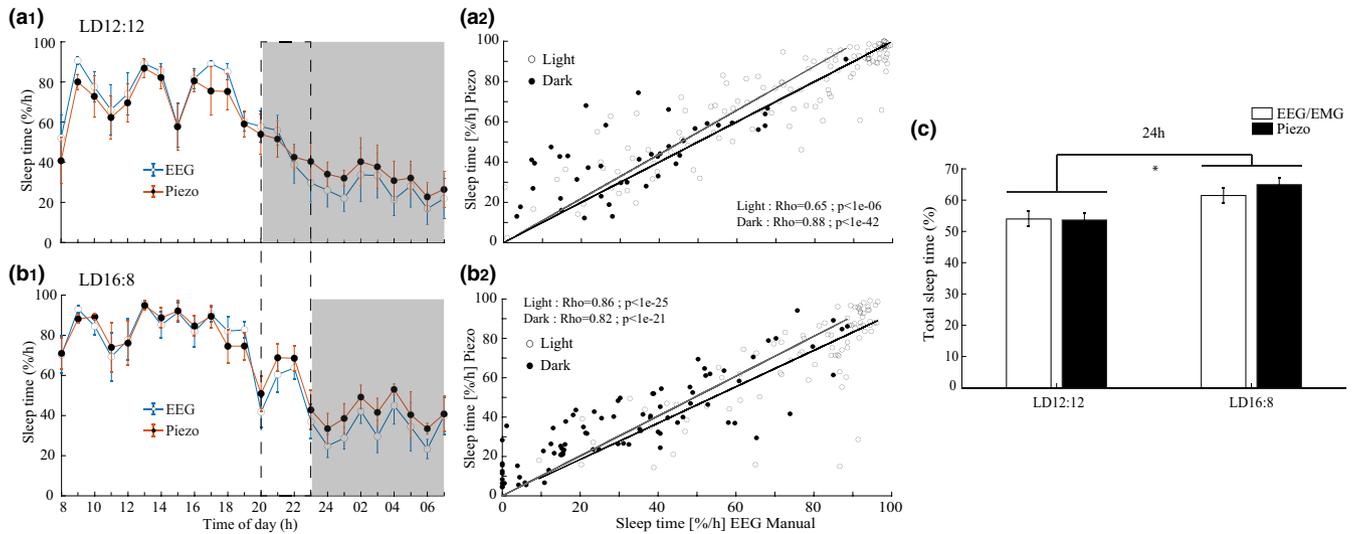
The piezoelectric system can be compared with acute actimetry because it records almost every movement of the animal (Flores et al., 2007; Mang et al., 2014; Yaghouby et al., 2016), and we illustrated the high level of similarity between the EMG and the piezo systems through a 30-min typical recording during a high and low sleep propensity period (Figure 1a1,b1), underlined by the 20-s zoom made on transitions between sleep and wake (Figure 1a2,b2). This illustration of the synchronization between methods also showed failure of the piezo on wake scoring during the light period when compared with the EEG/EMG signal, i.e. false positive, and also during the dark period as piezo scored sleep instead of wake. However, this false positive scoring of piezo does not have any statistical consequences between the two methods on the mean percentage TST per 24 hr over the 7 days of recording or on the last 7 days (in terms of mean or hourly kinetics). This only underscores the trend towards a higher frequency of short sleep periods compared with the EEG/EMG method over the 7 days, as observed in Figure S2(A<sub>1</sub>).

In this study, we tested the efficiency of the non-invasive piezo system for discrimination of sleep and wake states under an experimental condition of extended sleep duration. The results showed significant higher mean percentages of TST per 24 hr during the LD16:8 compared with the habitual LD12:12 photoperiod with the piezo as well as with the EEG/EMG method, and this is observed when considering the 7 days of recording and the last 24 hr of recording. There was no statistical difference between the two methods on the hourly sleep time during the last 24 hr for the two photoperiods, and the two methods are in significant positive correlation at light and dark periods. These results confirm

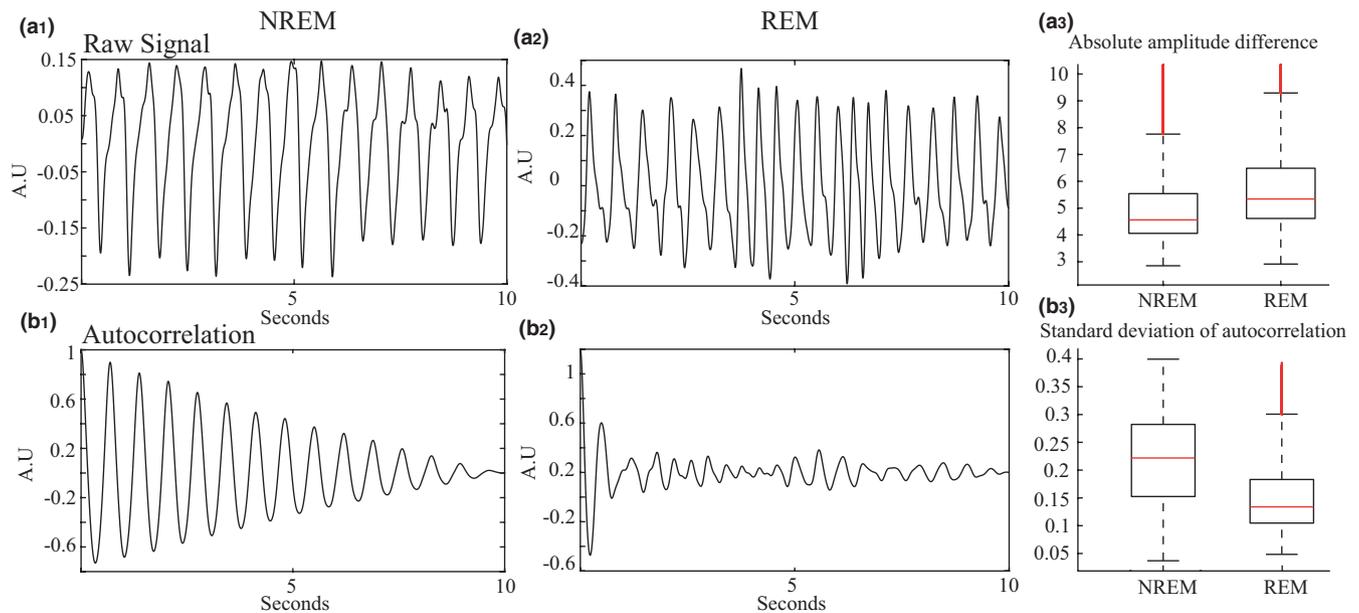
**TABLE 2** Confusion matrix for Wake/Sleep scoring with EEG/EMG and the piezo system for all 10-s epochs (419,722 epochs for the LD12:12 group [ $n = 7$ ] and 403,547 epochs for the LD16:8 group [ $n = 7$ ]) expressed as percentage

		LD12:12				LD16:8	
		EEG/EMG (10-s epochs)				EEG/EMG (10-s epochs)	
		Sleep	Wake			Sleep	Wake
Piezo	Sleep	84.8% (sensitivity)	21.6%	Piezo	Sleep	90.5% (sensitivity)	23.7%
	Wake	15.2%	78.4% (specificity)		Wake	9.5%	76.3% (specificity)
Accuracy	81.9%			Accuracy	84.9%		

EEG, electroencephalogram; EMG, electromyogram; LD, light/dark.



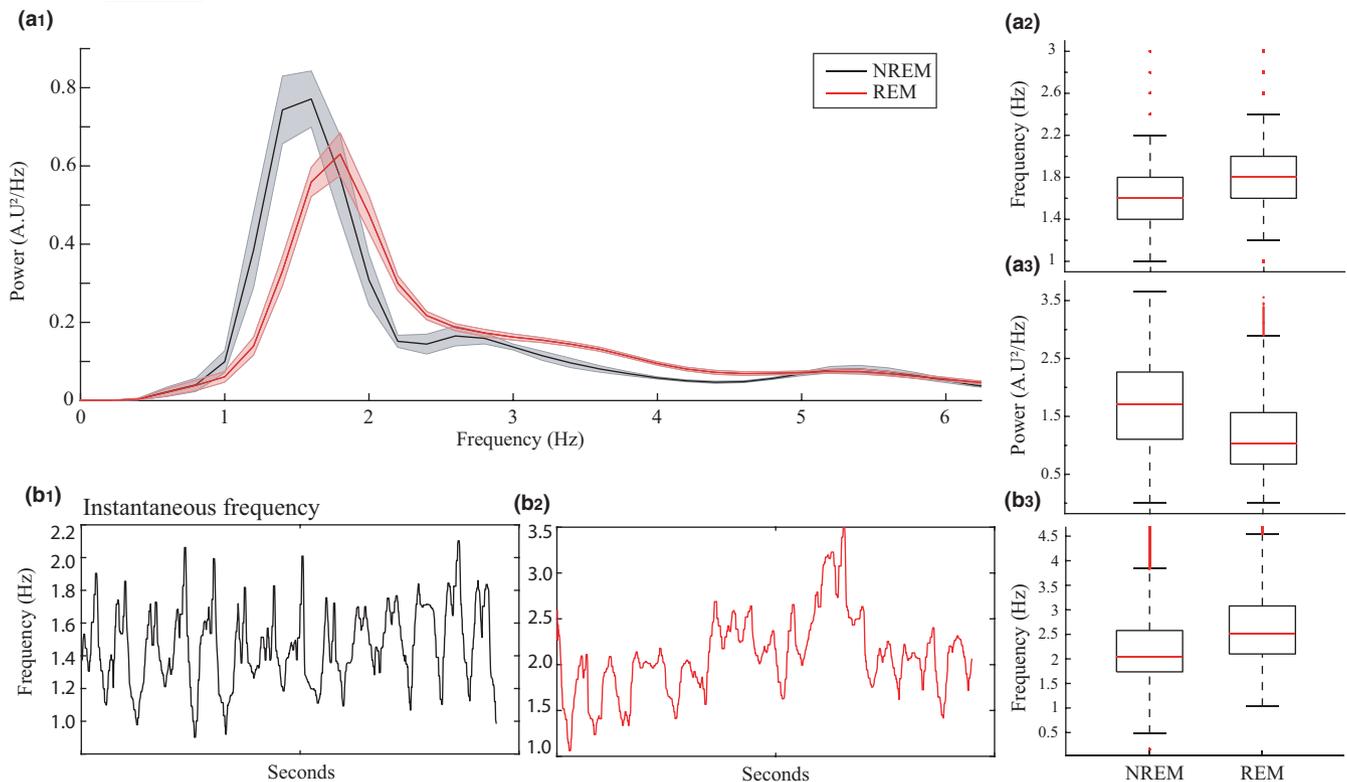
**FIGURE 2** Hourly sleep amount for the LD12:12 (a<sub>1</sub>) and LD16:8 (b<sub>1</sub>) groups evaluated by the piezo system (orange line, filled circle) and electroencephalogram (EEG)/electromyogram (EMG) method (blue line, open circle;  $n = 7$ , respectively) during the last 24 hr of recording. The dark period is represented by the shaded area ( $p = .8244$  between methods for LD12:12 group,  $p = .0875$  for the LD16:8 group, Friedman ANOVA). a<sub>2</sub> and b<sub>2</sub>: correlation analysis between sleep times evaluated with piezo (y-axis) and EEG/EMG (x-axis) in the LD12:12 and LD 16:8 groups, respectively. The Spearman correlation data are:  $Rho = 0.65$  with  $p < 1e-06$ ,  $Rho = 0.88$  with  $p < 1e-42$  for the LD12:12 group (light and dark period, respectively), and  $Rho = 0.86$  with  $p < 1e-25$ ,  $Rho = 0.82$  with  $p < 1e-21$  for the LD16:8 group (light and dark period, respectively). The means of total sleep time (TST) during the 24 hr are significantly different between LD12:12 and LD16:8 groups (c,  $p < .001$ , Friedman ANOVA). There is no statistical difference between piezo and EEG/EMG using Wilcoxon tests:  $p = .8490$  (LD12:12 group) and  $p = .4065$  (LD16:8 group)



**FIGURE 3** Example of signals recorded with the piezo system during non-rapid eye movement (NREM) (a<sub>1</sub>) and rapid eye movement (REM) (a<sub>2</sub>). a<sub>3</sub>: boxplot of absolute amplitude difference of the piezo signal calculated on all NREM and REM epochs (157,080 for NREM and 35,440 for REM,  $n = 7$ ). b<sub>1</sub> and b<sub>2</sub>: corresponding autocorrelation from the raw signal for (see Methods for details). b<sub>3</sub>: standard deviation of autocorrelation for all epochs of NREM and REM sleep

our previous study on the effects of extended photoperiod on the TST parameter scored by the EEG/EMG method in the rat (Sauvet et al., 2018), and also underline that there is no derivation of the piezoelectric signal over 7 days of recording. The results are encouraging for future pharmacological and bio-behavioural studies

regarding the non-invasive scoring of sleep and wake durations in rats with the piezo system (Chennaoui et al., 2017; Dworak et al., 2017; Franken et al., 1995). To our knowledge, there is only one study on the non-invasive assessment of sleep and wake scoring in rats, and it is based on respiratory activity through the



**FIGURE 4** Spectral analysis of the piezo signal during non-rapid eye movement (NREM) and rapid eye movement (REM) sleep.  $a_1$ : mean FFT for all epochs of NREM and REM (157,080 for NREM and 35,440 for REM,  $n = 7$ ).  $a_2$ : boxplot of frequency at maximum for NREM and REM (all epochs).  $a_3$ : maximum power spectral density (PSD) for NREM and REM sleep (all epochs).  $b_1$ : examples of instantaneous frequency during NREM ( $b_1$ ) and REM ( $b_2$ ) sleep, see Methods for details.  $b_3$ : boxplot of mean instantaneous frequency between NREM and REM sleep (on all epochs)

development of a prototype Doppler radar sensor that remains commercially unavailable (Zeng et al., 2012). In this study, agreement between the automated sleep scoring system and EEG/EMG was approximately 91% for wakefulness on 8 hr of recording. In our study, agreement levels between piezo and EEG/EMG methods are at 82% and 85% for habitual and extended photoperiods, but for 7 days of recording.

With respect to the relative distribution for sleep and wake over eight consecutive time bins (from 10 to > 640 s) by the two methods, our results indicated lower wake bouts of 10–40 s detected by the piezo system (as shown in Figure S2 and illustrated in Figure 1a1) and overestimation of wake bouts between 50 and 640 s, reaching statistical significance during the habitual LD12:12 photoperiods particularly. One possible explanation for the underestimation of wake bouts could be that if the animal wakes up but does not make any movement, variations in the EEG may identify a short awakening while the EMG alone or the piezo system cannot. Another explanation could be that, because the piezoelectric system uses a fixed threshold, even if a movement is recorded by the system, it may not be important enough to cross the threshold value. This can lead to an underestimation of short wake bouts, but also allows the system to not take all the parasitic movements occurring during sleep as short awakenings.

The second part of our study was to test the feasibility to discriminate REM and NREM sleep stages with the piezo system (lower part of the diagram in Figure 5). Identifying the specific characteristics of NREM and REM sleep from movement and therefore primarily breathing rate is a challenge that has already been explored. The respiratory rhythm in NREM sleep is known to be highly regular, while earlier studies have stated the increase in frequency and variability occurring with REM sleep (Snyder et al., 1964). Based on these results, NREM and REM sleep classification with a piezo system has been already studied in mice (Yaghouby et al., 2016). These authors chose not to focus on the frequency difference but rather on the instability of breathing during REM sleep, and their results show good classification performance compared with manual EEG/EMG scoring (Wake 89%/96%, NREM 51%/96%, REM 73%/75%, for sensitivity/specificity, respectively), but sensitivity is low for NREM sleep. Zeng et al. (2012) used a Doppler radar coupled with digitized video to analyse breathing in rats, and they built a support-vector-machine (SVM) to automatically classify Wake, NREM and REM sleep in rats. The main feature used for REM sleep identification was the breathing rate, and authors principally extract features from a spectral analysis of the signal. In our study, we performed a complete spectral analysis of the signal ( $F_{max}$ , PSD...) with description of the signal shape (Env\_Var, TKEO...). Features were then chosen to

**TABLE 3** List of the features used in RUSBoost for automated scoring of NREM and REM

Label	Signal type	Description
F_max	PwRS	Frequency at maximum
Max_PSD	PwRS, PwAS	Maximum PSD
F_max_1-3	PwRS, PwAS	Maximum frequency between 1 and 3 Hz
Max_PSD_1-3	PwRS, PwAS	Maximum PSD between 1 and 3 Hz
R_PSD_1	PwRS, PwAS	Ratio PSD: 1.4/1.6 Hz
R_PSD_2	PwRS, PwAS	Ratio PSD: 1.6/1.8 Hz
R_PSD_3	PwRS	Ratio PSD: 1.4/1.8 Hz
R_PSD_4	PwAS	Ratio PSD: 2.2/2.4 Hz
R_PSD_5	PwRS	Ratio PSD: 2/5 Hz
MPSD_1	PwRS, PwAS	Weighted average PSD between 0.1 and 1 Hz
MPSD_1_3	PwRS, PwAS	Weighted average PSD between 1 and 3 Hz
MPSD_3_5	PwRS, PwAS	Weighted average PSD between 3 and 5 Hz
MSPD_5_7	PwRS, PwAS	Weighted average PSD between 5 and 7 Hz
AUC_PSD_1_3	PwRS, PwAS	Area under the curve between 1 and 3 Hz
AUC_PSD_3_5	PwRS	Area under the curve between 3 and 5 Hz
Kt	RS, AS	Kurtosis
Std	RS, AS, Fq_inst	Standard deviation
Mn	RS, Fq_inst	Mean
RMS	RS	Root Mean Square
Env_Var	RS, AS, Fq_inst	Envelope variation
TKEO	RS, AS	Teager-Kaiser energy operator

Signal type indicates on what type of signal features are extracted.

AS, autocorrelation signal; PSD, power spectral density; PwAS, Welch of the autocorrelation signal; PwRS, Welch of the raw signal; RS, raw signal.

**TABLE 4** Confusion matrix for NREM/REM classification with the EEG/EMG visual scoring and the piezo automatic scoring with RUSBoost (129,700 epochs for NREM and 24,303 for REM,  $n = 7$  during 6 days)

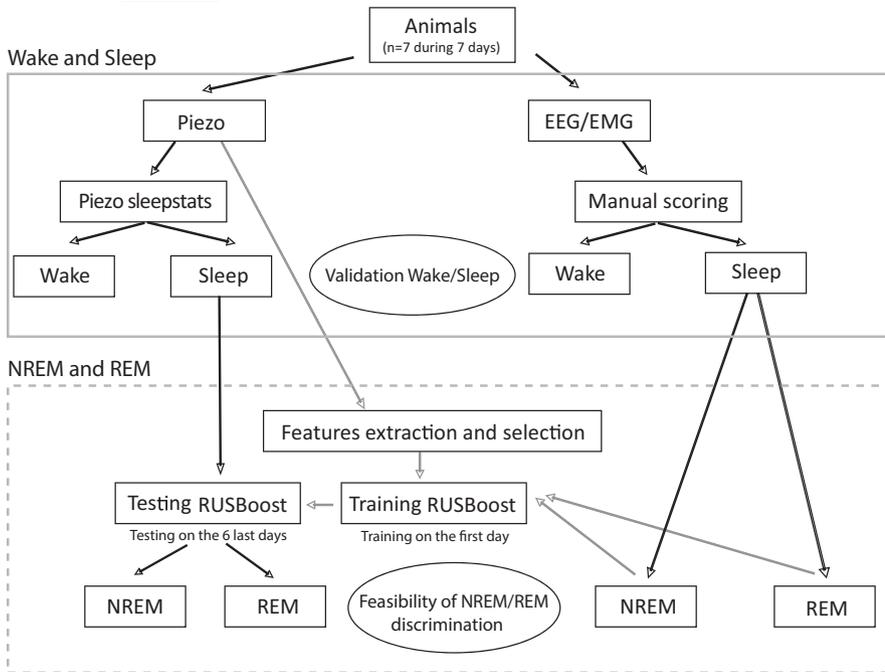
		EEG/EMG	
		NREM	REM
Piezo	NREM	92.5% (sensitivity)	24.5%
	REM	7.5%	75.5% (specificity)
Accuracy		89.8%	

EEG, electroencephalogram; EMG, electromyogram; NREM, non-rapid eye movement; REM, rapid eye movement.

highlight the difference between the high stability we found during NREM sleep versus the REM sleep instability (Figure 3), and the difference in frequency between the two states (Figure 4).

The higher peak frequency on the FFT of the piezo signal in REM compared with NREM sleep (Figure 4) seems to confirm the significant higher mean respiratory rate previously observed for REM than NREM sleep (2.06 Hz versus 1.59 Hz; Zeng et al., 2012), but the difference is subtle in our recording (1.88 Hz for REM versus 1.64 Hz for NREM sleep). This could be due to the difference in recording time (56 hr for Zeng et al., and 7 days here), but also to a lack of sensitivity for the piezo system. However, these

frequencies come from a FFT analysis (Welch method) with a 5-s window (50% overlap), limiting identification of phasic burst of short duration of 1–2 s. Instantaneous frequency (Fq\_inst) calculated from Hilbert transformation (Cohen, 2014) can give us a detailed view on frequency change. The addition of this frequency analysis increases the performance of the classification (+4% for REM sleep), which shows the complementarity between this type of analysis and a more classical FFT approach. Another method we have used to highlight the irregularity of breathing during REM sleep is to apply the autocorrelation method to the piezo signal. The autocorrelation for a stable signal decreases gradually, while for an irregular signal the amplitude decreases rapidly and oscillates around 0 on the x-axis, as shown in Figure 3. A spectral description of the autocorrelation associated with parameters such as Kurtosis, standard deviation, Envelope variation and Teager-Kaiser energy allowed us to highlight the difference in the regularity of breathing. The visual scoring of REM sleep epoch depends mainly on the power in the 5–8 Hz theta wave band, associated with a flat EMG. The automated scoring of REM sleep epoch with RUSBoost is mainly based on breathing rate and irregular respiration; however, it is possible that their changes are less robust than the theta waveband on the EEG. Using 36 features from the whole piezo system, the discrimination between NREM and REM sleep classification is feasible with a good accuracy (89.8%) and good sensitivity/specificity (92.5%/75.5%) in



**FIGURE 5** Diagram illustrating the process of the validation for the piezo system for the sleep-wake pattern in the rat (upper part with solid line), using the piezo software. The lower part of the diagram (lower part with dashed line) resumes steps carried out for the feasibility of non-rapid eye movement (NREM) and rapid eye movement (REM) sleep discrimination with RUSBoost

comparison to the EEG/EMG method. However, we observed that the breathing rate during REM sleep is more unstable and faster than in NREM sleep, and that there is an alternation of periods of high variability, such as burst, and periods of stability. It would be interesting to understand the physiological basis of these mechanisms, and we suggest that 10-s epochs may not be the right duration to make the decision on REM or NREM sleep. In addition, with visual scoring, evaluators make a decision based on the signal of the epoch under consideration, but they can also use information from the previous or next epoch, which can result in less fragmented recordings. There is also physiological evidence that indicates that the likelihood of being in REM sleep is greater when you were in REM sleep a few seconds before and if you will be in REM a few seconds later (Vivaldi et al., 2005). It is to implement this physiological reality in our model that we take the average of the soft score based on the current epoch, the previous epoch and the next epoch to make a decision between NREM and REM sleep for the epoch considered (Zeng et al., 2012).

It will be interesting in future studies to add other non-invasive recorded signals or parameters to increase performance with the aim of automatically discriminating Wake, and NREM and REM sleep. A high-quality infrared camera can potentially detect state-related changes of skin surface temperature (Lindert & Van Someren, 2018). Another possibility comes from the fact that in mice, the atonia associated with NREM sleep to REM sleep transition induces a subtle change in the area and the shape of the mouse assessed by video data analysis (McShane et al., 2012). Changes in the shape and surface of the rat or mouse can potentially be detected by a piezoelectric system.

The piezo sleep-wake scoring has inherent limitations when used with rats. As our results show, the piezo underestimated the waking phase with a level of specificity lower than the sensitivity,

suggesting caution in pharmacological studies related to sleep or wakefulness due to overestimation of sleep (i.e. caffeine administration). In addition, any pharmacological agent (or stress-related psychophysiological effect) without impact on the animal's mobility will not decrease the performance of the piezo system to discriminate sleep from wake. Conversely, a pharmacological agent that induces paralysis (or muscle twitching during sleep) is not compatible with the piezo system. If any breathing effect affects NREM and REM discrimination, an EEG/EMG recording will be necessary to validate whether our feature set is still effective or whether other features need to be identified based on the perturbation induced by the pharmacological agent. Another limitation point to take into account is that the manual scoring of EEG/EMG was done by a single scorer.

In conclusion, our results indicate that the piezo system seems to be a reliable alternative to EEG/EMG method in the study of sleep/wake pattern in rat as demonstrated by inducing experimental positive change of the photoperiod, and over 7 days of recording (upper part of the diagram in Figure 5). The piezo system may thus be used for the study of bio-behavioural sleep effects. As an example, we previously showed that 14 days under an extended LD16:8 photoperiod compared with the habitual LD12:12 favour anabolic peripheral and cerebral responses in the rat (Chennaoui et al., 2017). The feasibility to discriminate REM and NREM sleep in the rat using piezo in the whole and a boosting algorithm highlights the interest to develop machine learning from analysis of the piezo raw signal.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the contribution of their animal facility team, and Cedric Thepenier for his help about theoretical machine learning approaches.

**CONFLICT OF INTEREST**

No conflicts of interest declared.

**AUTHOR CONTRIBUTIONS**

MC, FS, TV: designed the study; TV, MQ: analysed the data; TV: acquired the data; DG, MQ, AT, CV, FS, MC: corrected the manuscript; TV, DG, MQ, AT, CV: wrote the manuscript.

**DATA AVAILABILITY STATEMENT**

Data available on request due to privacy/ethical restrictions.

**ORCID**

Théo Vanneau  <https://orcid.org/0000-0002-5750-7051>

Fabien Sauvet  <https://orcid.org/0000-0002-4298-2319>

Mounir Chennaoui  <https://orcid.org/0000-0002-4409-813X>

**REFERENCES**

- Campbell, I. G. (2009). EEG recording and analysis for sleep research. *Current Protocols in Neuroscience*, 49(1), 10.2.1–10.2.19. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns1002s49>
- Carnevali, L., Sgoifo, A., Trombini, M., Landgraf, R., Neumann, I. D., & Nalivaiko, E. (2013). Different patterns of respiration in rat lines selectively bred for high or low anxiety. *PLoS One*, 8(5), e64519. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064519>
- Chen, S., Billings, S. A., & Luo, W. (1988). *Orthogonal least squares methods and their application to nonlinear system identification*. White Rose. Retrieved from <http://eprints.whiterose.ac.uk/78100/>
- Chennaoui, M., Arnal, P., Dorey, R., Sauvet, F., Ciret, S., Gallopin, T., Leger, D., Drogou, C., & Gomez-Merino, D. (2017). Changes of cerebral and/or peripheral adenosine A1receptor and IGF-I concentrations under extended sleep duration in rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11), 1–10. <https://doi.org/10.3390/ijms18112439>
- Chennaoui, M., Léger, D., & Gomez-Merino, D. (2020). SLEEP AND THE GH/IGF-1 AXIS: Consequences and countermeasures of sleep loss/disorders. *Sleep Medicine Reviews*, 49, 101223. <https://doi.org/10.1016/j.smrv.2019.101223>
- Cohen, M. X. (2014). Fluctuations in oscillation frequency control spike timing and coordinate neural networks. *Journal of Neuroscience*, 34(27), 8988–8998. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0261-14.2014>
- Deboer, T. (2007). Technologies of sleep research. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(10), 1227–1235. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-6533-0>
- Donohue, K. D., Medonza, D. C., Crane, E. R., & O'Hara, B. F. (2008). Assessment of a non-invasive high-throughput classifier for behaviours associated with sleep and wake in mice. *BioMedical Engineering Online*, 7, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1475-925X-7-14>
- Dworak, M., Kim, T., Mccarley, R. W., & Basheer, R. (2017). Creatine supplementation reduces sleep need and homeostatic sleep pressure in rats. *Journal of Sleep Research*, 26(3), 377–385. <https://doi.org/10.1111/jsr.12523>
- Eugene, A. R., & Masiak, J. (2015). The neuroprotective aspects of sleep. *MEDtube science*, 3(1), 35–40.
- Fisher, S. P., Godinho, S. I. H., Potheary, C. A., Hankins, M. W., Foster, R. G., & Peirson, S. N. (1990). Rapid assessment of sleep/wake behaviour in mice Simon. *Theriogenology*, 33(3), 723–732. <https://doi.org/10.1177/0748730411431550>. Rapid
- Flores, A. E., Flores, J. E., Deshpande, H., Picazo, J. A., Xinmin Xie, Franken, P., Heller, H. C., Grahn, D. A., & O'Hara, B. F. (2007). Pattern recognition of sleep in rodents using piezoelectric signals generated by gross body movements. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 54(2), 225–233. <https://doi.org/10.1109/TBME.2006.886938>
- Franken, P., Tobler, I., & Borbely, A. A. (1995). Varying photoperiod in the laboratory rat: Profound effect on 24-h sleep pattern but no effect on sleep homeostasis. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 269(3), 38–43. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1995.269.3.r691>
- Lindert, B. T., & Van Someren, E. J. (2018). Skin temperature, sleep and vigilance. *Handbook of Clinical Neurology*, 156, 353–365.
- Mang, G. M., Nicod, J., Emmenegger, Y., Donohue, K. D., O'Hara, B. F., & Franken, P. (2014). Evaluation of a piezoelectric system as an alternative to electroencephalogram/electromyogram recordings in mouse sleep studies. *Sleep*, 37(8), 1383–1392. <https://doi.org/10.5665/sleep.3936>
- McShane, B. B., Galante, R. J., Biber, M., Jensen, S. T., Wyner, A. J., & Pack, A. I. (2012). Assessing REM sleep in mice using video data. *Sleep*, 35(3), 433–442. <https://doi.org/10.5665/sleep.1712>
- McShane, B. B., Galante, R. J., Jensen, S. T., Naidoo, N., Pack, A. I., & Wyner, A. (2010). Characterization of the bout durations of sleep and wakefulness. *Journal of Neuroscience Methods*, 193(2), 321–333. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.08.024>
- Megens, A. A. H. P., Voeten, J., Rombouts, J., Meert, T. F., & Niemegeers, C. J. E. (1987). Behavioural activity of rats measured by a new method based on the piezo-electric principle. *Psychopharmacology (Berl)*, 93(3), 382–388. <https://doi.org/10.1007/BF00187261>
- Pack, A. I., Galante, R. J., Maislin, G., Cater, J., Metaxas, D., Lu, S., Zhang, L., Smith, R. V., Kay, T., Lian, J., Svenson, K., & Peters, L. L. (2007). Novel method for high-throughput phenotyping of sleep in mice. *Physiological Genomics*, 28(2), 232–238. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00139.2006>
- Rasch, B., & Born, J. (2013). About sleep's role in memory. *Physiological Reviews*, 93(2), 681–766. <https://doi.org/10.1152/physrev.00032.2012>
- Saper, C. B. (1890). *The neurobiology of sleep* (pp. 19–31).
- Sauvet, F., Gomez-Merino, D., Dorey, R., Ciret, S., Gallopin, T., Drogou, C., Arnal, P. J., & Chennaoui, M. (2018). Lengthening of the photoperiod influences sleep characteristics before and during total sleep deprivation in rat. *Journal of Sleep Research*, 28, e12709. <https://doi.org/10.1111/jsr.12709>
- Snyder, F., Hobson, J. A., Morrison, D. F., & Goldfrank, F. (1964). Change in respiration, heart rate, and systolic blood pressure in human sleep. *Journal of Applied Physiology*, 13(3), 417–439. <https://doi.org/10.1152/jappl.1964.19.3.417>
- Stoppiglia, H., Dreyfus, G., Dubois, R., & Ouassar, Y. (2003). Raking a random feature for variable and feature selection. *Journal of Machine Learning Research*, 1, 1399–1414. <https://doi.org/10.1162/153244303322753733>
- Tang, X., & Sanford, L. D. (2002). Telemetric recording of sleep and home cage activity in mice. *Sleep*, 25(6), 691–699. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12224849>. <https://doi.org/10.1093/sleep/25.6.677>
- Vivaldi, E. A., Ocampo-Garcés, A., & Villegas, R. (2005). Short-term homeostasis of REM sleep throughout a 12:12 light:Dark schedule in the rat. *Sleep*, 28(8), 931–943. <https://doi.org/10.1093/sleep/28.8.931>
- Woalder, (2017). Confounding effect of EEG implantation surgery: Inadequacy of surgical control in a two hit model of temporal lobe epilepsy. *Physiology & Behavior*, 176(1), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Yaghouby, F., Donohue, K. D., O'Hara, B., & Sunderam, S. (2016). Noninvasive dissection of mouse sleep using a piezoelectric motion sensor. *Journal of Neuroscience Methods*, 259(12), 90–100. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2016.03.040>
- Zeng, T., Mott, C., Mollicone, D., & Sanford, L. D. (2012). Automated determination of wakefulness and sleep in rats based on non-invasively

acquired measures of movement and respiratory activity. *Journal of Neuroscience Methods*, 204(2), 276–287. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2011.12.001>

#### SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

**How to cite this article:** Vanneau T, Quiquempoix M, Trignol A, et al. Determination of the sleep–wake pattern and feasibility of NREM/REM discrimination using the non-invasive piezoelectric system in rats. *J Sleep Res*. 2021;00:e13373. <https://doi.org/10.1111/jsr.13373>



# RÉSUMÉ

---

**Français :** Au cours de cette thèse, nous avons étudié les interactions entre le sommeil et la blessure musculaire. Nous avons tout d'abord caractérisé les modifications des paramètres du sommeil à la suite de l'induction d'une blessure musculaire chez le rat. Nos résultats ont mis en évidence une augmentation du temps de sommeil lent, 48 et 72h après l'induction de la blessure, spécifique à la période d'obscurité et associée à une meilleure stabilité du sommeil durant les 24 premières heures post-blessure. Ensuite, nous avons démontré qu'il est possible de potentialiser cette réponse adaptative du sommeil en augmentant le temps de sommeil des animaux avec de l'extension de sommeil induit par allongement de la photopériode. Cette potentialisation permet de limiter l'augmentation de sensibilité à la douleur induite par la blessure et accélère la récupération des niveaux de sensibilité mesurés avant blessure. En revanche, aucun effet significatif de l'allongement de la photopériode n'a été mis en évidence sur les paramètres biologiques et histologiques de la réparation musculaire. Afin d'évaluer le temps de sommeil des animaux sans avoir à implanter des électrodes EEG/EMG, nous avons également validé l'utilisation d'une nouvelle méthode non invasive pour étudier le sommeil des animaux : le système piézoélectrique.

Mots clés : Sommeil – Blessure musculaire – Douleur – Photopériode – EEG – Inflammation

**Anglais :** During this thesis we studied the interactions between sleep and muscle injury. We first characterized the changes in sleep parameters following the induction of a muscle injury in rats. Our results showed an increase in slow-wave sleep time at 48 and 72 h after injury induction, specific to the dark period and associated with a better sleep stability during the first 24 h post-injury. Next, we demonstrated that it is possible to potentiate this adaptive sleep response by increasing the sleep time of the animals with sleep extension induced by lengthening the photoperiod. This potentiation limits the injury-induced increase in pain sensitivity and accelerates the recovery of sensitivity levels measured before injury. On the other hand, no significant effect of photoperiod extension was found in the biological and histological parameters of muscle repair. To evaluate the sleep time of the animals without having to implant EEG/EMG electrodes, we also validated the use of a new non-invasive method to study the sleep of the animals: the piezoelectric system.

Keywords: Sleep – Muscle injury – Pain – Photoperiod – EEG – Inflammation