



HAL
open science

Etude de la fragmentation du sommeil d'un modèle murin : impact comportemental, inflammatoire et neuroinflammatoire chez le rat jeune et âgé

Chloé Mounichetty

► **To cite this version:**

Chloé Mounichetty. Etude de la fragmentation du sommeil d'un modèle murin : impact comportemental, inflammatoire et neuroinflammatoire chez le rat jeune et âgé. Médecine humaine et pathologie. Université Jean Monnet - Saint-Etienne, 2022. Français. NNT : 2022STET0032 . tel-04579324

HAL Id: tel-04579324

<https://theses.hal.science/tel-04579324>

Submitted on 17 May 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.



N° d'ordre NNT : 2022STET0032

THÈSE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ JEAN MONNET SAINT-ÉTIENNE

Membre de la COMUE de LYON

École Doctorale EDSIS 488
Ecole doctorale sciences-ingénierie-santé de Lyon

Spécialité / discipline de doctorat : Neurophysiologie

Soutenue publiquement le 02/11/2022, par :
Chloé Mounichetty

Etude de la fragmentation du sommeil d'un modèle murin : impact comportemental, inflammatoire et neuroinflammatoire chez le rat jeune et âgé

Devant le jury composé de :

Sauvet Fabien, MD PhD HDR, Université Paris Descartes

Président

Seugnet Laurent, Chercheur, Chargé de Recherche, Université Lyon 1

Rapporteur

Sauvet Fabien, MD PhD HDR, Université Paris Descartes

Rapporteur

Pichavant Rafini Karine, Professeur, Université de Bretagne Occidentale

Examinatrice

Mouhli-Gasmi Lytissia, CCA, CHU Hôpital Nord de Saint Etienne

Examinatrice

Roche Frédéric, Professeur des Universités, Praticien hospitalier Université
Jean-Monnet

Directeur

Perek Nathalie, Professeur, Université Jean Monnet

Co-directrice

Remerciements

A mes directeurs de thèse,

Les professeurs **Frédéric Roche** et **Nathalie Perek**, je tenais à vous remercier pour m'avoir permis d'intégrer l'équipe SNA (à l'époque) du laboratoire Sainbiose. Merci pour l'opportunité que vous m'avez donné de pouvoir faire une thèse et de toute l'expérience scientifique et de rédaction apportée.

A mes rapporteurs,

Le professeur **Fabien Sauvet** et le docteur **Laurent Seugnet**, c'est un grand honneur pour moi de vous compter dans mon jury de thèse. Je vous remercie encore d'avoir accepté de rapporter mon manuscrit. Merci de me faire bénéficier de vos connaissances et de votre expertise.

A mes examinatrices,

La professeure **Karine Pichavant-Raffini**, je tenais sincèrement à vous remercier d'avoir accepté d'être examinatrice pour ma thèse. Cela représente une belle continuité au Master dont vous vous occupiez et que j'ai eu plaisir à faire. J'espère que ce travail sera à la hauteur de ce que vous nous avez appris.

La docteure **Lytissia Mouhli-Gasmi**, merci d'avoir accepté d'être dans mon jury de thèse en tant qu'examinatrice, vos connaissances dans le domaine de la neurologie seront un plus.

A toutes les personnes qui m'ont aidé,

Je voudrais également remercier **Florian Chouchou** pour toute l'aide que tu m'as apportée lors de l'écriture de la revue. Sans toi elle n'aurait jamais autant évolué. Et c'est sincèrement que je te remercie pour les centaines de commentaires laissés à chaque relecture, c'est grâce à eux que j'ai pu progresser et m'améliorer.

Merci à **Fabien Forest**, avec qui j'ai pu m'initier à la morphométrie. Plus que ça, merci pour ces discussions que nous avons eues et qui m'ont apporté beaucoup, autant d'un point de vue humain que scientifique. Grâce à toi, je vais pouvoir apporter de la granularité à mes résultats !

Je tiens particulièrement à remercier **Christian Moritz**, grand chercheur du laboratoire SYNATAC, laboratoire voisin au SNA, pour beaucoup de choses (plus que tu ne le penses). Tout d'abord pour le western blot, j'ai appris du plus grand ;) Pour toutes les discussions que nous avons eues. Tu as toujours été là pour répondre à mes questionnements, et ce, quel que soit le moment. Tu es le collègue/ami idéal et j'ai été ravie de te côtoyer.

Je remercie **Léonard Féasson** de m'avoir permis de donner cours aux kinés et d'avoir accepté que je vienne emprunter le matériel de l'IRMIS.

Je remercie également **Arnaud VDB**, pour le support scientifique que vous m'avez apporté, tout particulièrement en expérimentation animale. Jamais à court d'idées, j'ai apprécié de vous croiser dans les couloirs du labo ou de l'animalerie pour que nous discussions des améliorations de manips qui auraient pu être faites dans un monde idéal.

Tant que je suis sur la partie expérimentations animales, merci les filles du PLEXAN, **Valentine, Diane** et **Ghislaine**, pour votre support technique et moral tout le long de ma thèse. Le PLEXAN est devenu mon deuxième bureau durant cette thèse !

Merci à **Leslie Renouard**, de m'avoir appris à pratiquer l'implantation d'électrodes EEG. Même si mes implantations n'ont pas donné le résultat escompté, c'était une très belle expérience.

Je remercie **Yannick Tholance** et le plateau de bio pour les dosages protéiques qui m'ont permis d'écarter des hypothèses durant ma thèse.

Merci à **Flo**, pour ta bonne humeur et ton smile qui permettaient de passer une bonne journée !

Merci à **Cindy** et **Anne Cloé** de m'avoir tout appris concernant le fonctionnement du laboratoire, de m'avoir accueillie à bras ouverts et d'avoir répondu à mes questions avec toute votre sagesse de doctorante !

A **Roukia**, qui a été ma première vraie stagiaire, je ne pouvais pas espérer mieux !

A **Amandine**, qui a été ma deuxième vraie stagiaire, merci pour l'énergie que tu as apportée sur la fin de mon projet, bon courage pour la suite. J'en profite pour remercier **Léo** avec qui j'ai co-encadré Amandine et lui souhaiter bon courage pour la fin de sa thèse.

A SYNATAC, **François, Karine**, et tous les stagiaires que j'ai eu l'occasion de croiser, merci pour cette bonne entente et cette bonne ambiance. Dédicace spéciale à **Virginie** ;D

A **Pauline**, la meilleure collègue que je puisse jamais avoir. Merci pour tous les debriefs que nous avons faits ensemble pour relâcher la pression. Mes deux dernières années de thèse auraient été tristes sans ton énergie, ton humour et nos discussions. Je te souhaite le meilleur pour la fin de ta thèse et tu sais que je serai toujours là si tu as besoin !

A **Coco**. Amie avant d'être collègue, heureusement qu'il y avait une personne aussi folle que moi dans le labo, ça a rendu les journées beaucoup plus amusantes ! Merci aux pauses 10h et midi, et merci à « un gars une fille » de nous avoir tenu aussi longtemps !!!! En ce qui concerne le reste, pas besoin de le mettre dans les remerciements d'une thèse publique, je suis trop pudique pour ça et de toute façon tu connais le plus important !

A ma **maman**, qui a toujours été là pour me soutenir et qui me connaît mieux que je ne me connais moi-même, merci !

A **Paul**, l'Homme que j'ai rencontré durant la thèse. Finalement elle m'a apporté beaucoup plus que je ne pensais. Je n'ai pas besoin d'écrire pourquoi je te remercie, tu le sais déjà <3

Et enfin, un grand merci général à tous les acteurs de ma thèse qui m'ont permis de vivre 3 années très enrichissantes d'un point de vue personnel et professionnel.

Liste des publications, des communications et encadrements de stagiaire

Article en cours de soumission

Importance of sleep fragmentation on development of neurodegenerative diseases. Chloé Mounichetty, Florian Chouchou, Nathalie Perek, Frédéric Roche

Article en cours de rédaction

Evolution of glia with aging in a rat Wistar model in the hippocampus. Correlation with IL-17 and aquaporin-4 brain levels. Chloé Mounichetty, Fabien Forest, Nathalie Perek, Frédéric Roche.

Ultrasonic vocalizations of rat during sleep fragmentation. Chloé Mounichetty, Léo Perrier, Amandine Cascarino, Florence Levrero, Nathalie Perek, Nicolas Mathevon, Frédéric Roche.

Congrès

26th Congress of the European sleep research society, du 27/09/22 au 30/09/22, Athènes, Grèce.

Congrès du Sommeil SFRMS 2022 :

Importance of sleep fragmentation on development of neurodegenerative diseases. Chloé Mounichetty, Florian Chouchou, Nathalie Perek, Frédéric Roche.

Communication orale

L'importance du sommeil. Chloé Mounichetty

Fête de la science. Intervention auprès d'une classe de 4^{ème} en 2021 et de 2^{nde} et 1^{ère} en 2022.

Communication orale avec poster

Fragmentation du sommeil d'un modèle murin : impact sur la Barrière Hémato-Encéphalique. Chloé Mounichetty, Nathalie Perek, Frédéric Roche.

10.06.2021 : Journée de la recherche de l'ED SIS, Université Jean Monnet de Saint Etienne.

Impact of sleep fragmentation on glia: pilot study. Chloé Mounichetty, Fabien Forest.

30.06.2022 : PhDay's au campus santé innovation, Université Jean Monnet de Saint Etienne.

Encadrement de stagiaire

Roukia Badra : étudiante en Licence 3^{ème} année (3 semaines en janvier 2022) : Déterminer la présence de certaines protéines chez le rat Wistar à la suite d'une fragmentation de sommeil.

Co-encadrement de stagiaire

Amandine Souchon : étudiante en 1^{ère} année de Master (3 mois de stage de mars à mai 2022) : Etude de l'effet de la fragmentation de sommeil sur les productions vocales chez le rat (*Rattus norvegicus*). En co-encadrement avec Léo Perrier, Doctorant au laboratoire de l'ENES, Université Jean Monnet de Saint Etienne.

Résumé

Mots clés : fragmentation de sommeil, vocalisation, glie, neuroinflammation.

La fragmentation de sommeil consiste en l'interruption répétée du cycle de sommeil. L'étude des conséquences directes de la fragmentation de sommeil est un enjeu de santé puisque celle-ci est le symptôme de nombreuses pathologies telles que l'apnée du sommeil, le bruxisme, l'insomnie, Alzheimer, etc. Il existe peu de littérature sur la fragmentation de sommeil pure. Pourtant, l'étudier pourrait amener des pistes thérapeutiques importantes. L'environnement neuronal est composé de nombreuses sous-unités qui maintiennent l'homéostasie cérébrale en condition physiologique : la glie et la barrière hémato-encéphalique (BHE). La glie est composée d'astrocytes, de la microglie et des oligodendrocytes. L'activation gliale est le signe d'une neuroinflammation. C'est notamment le cas dans un contexte d'hypoxie intermittente et la maladie d'Alzheimer. La BHE est une interface sang cerveau qui régule finement les échanges de l'un à l'autre. Les protéines de jonctions serrées sont les gardiennes de cette BHE. Parmi elles, nous y retrouvons notamment la claudine-5 et l'occludine. L'expression de ces deux protéines tend à diminuer lors d'une neuroinflammation suite à une hypoxie intermittente par exemple (travaux antérieurs du laboratoire). D'autres molécules interviennent également lors d'une inflammation : les interleukines.

Dans ce travail de thèse, nous avons émis l'hypothèse que la fragmentation de sommeil touche différemment les populations jeunes et les populations âgées au travers de deux études sur un modèle de rat Wistar : une étude *in vivo* où ont été développés des courbes de poids, des tests de mémoire et des enregistrements de vocalisations (sur une étude pilote de 8 rats âgés) ; et une étude *in vitro* dans laquelle nous nous sommes intéressés à la glie, à la perméabilité de la BHE avec l'expression de la claudine-5 et l'occludine, à l'inflammation avec des cytokines pro-inflammatoires, l'IL-6, l'IL-1 β et l'IL-17, l'aquaporine-4 pour les mouvements d'eau au niveau cérébral, et les protéines précurseurs des amyloïdes, marqueur d'une neuroinflammation.

Notre protocole de fragmentation de sommeil de 1 mois a eu très peu de conséquences au niveau comportemental. Aucune différence n'a été observée au niveau du test de mémoire. Les rats âgés au sommeil fragmenté (SF) ont perdu du poids par rapport aux contrôles. Et les deux conditions (contrôle et SF) ont vu leurs vocalisations diminuer dès le début du protocole. Au niveau des marqueurs inflammatoires, nous avons observé une augmentation significative de la concentration cérébrale en IL-17 chez le groupe de rats âgés comparé aux rats jeunes. Nous avons également observé cette augmentation pour l'occludine et l'aquaporine-4. D'autres marqueurs ont été moins sensibles à l'âge et au protocole comme l'IL-6, l'IL-1 β et la claudine-5. Cependant, la concentration en APP était significativement moins importante chez les rats jeunes SF que chez les contrôles. De plus, chez les rats âgés, la quantité d'APP était significativement plus importante. Nous avons observé un impact de notre protocole de fragmentation sur l'activation de la microglie et des astrocytes. L'ensemble de ces travaux de thèse permet d'émettre l'hypothèse que la glie et l'accumulation d'APP seraient deux conséquences précoces des changements au niveau cérébral lors d'une fragmentation de sommeil sévère. Il est à noter que l'âge a une influence importante sur ces marqueurs.

Abstract

Keywords : sleep fragmentation, vocalization, glia, neuro-inflammation

Sleep fragmentation is the repeated interruption of the sleep cycle. The study of the direct consequences of sleep fragmentation is a health issue since it is a symptom of many pathologies such as sleep apnea, bruxism, insomnia, Alzheimer, etc. There is little literature on pure sleep fragmentation. However, studying it could lead to important therapeutic leads. The neuronal environment is composed of many subunits that maintain brain homeostasis in physiological conditions: the glia and the blood-brain barrier (BBB). Glia is composed of astrocytes, microglia and oligodendrocytes. Glial activation is a sign of neuroinflammation. This is particularly the case in the context of intermittent hypoxia and Alzheimer's disease. The BBB is a blood-brain interface that finely regulates the exchanges from one to the other. The tight junction proteins are the guardians of this BBB. Among them, we find claudin-5 and occludin. The expression of these two proteins tends to decrease during neuroinflammation following intermittent hypoxia for example (previous work of the laboratory). Other molecules are also involved in inflammation: interleukins.

In this thesis work we hypothesized that sleep fragmentation affects young and old populations differently through two studies on a Wistar rat model: an in vivo study where weight curves, memory tests and vocalizations recordings were developed (on a pilot study of 8 elderly rats); and an in vitro study in which we were interested in the glia, the permeability of the blood-brain barrier (BBB) with the expression of claudin-5 and occludin, inflammation with pro-inflammatory cytokines, IL-6, IL-1 β and IL-17, aquaporin-4 for water movement in the brain, and amyloid precursor proteins, a marker of neuro-inflammation.

Our 1-month sleep fragmentation protocol had very little impact on behavior. No difference was observed in the memory test. Aged rats in the fragmented sleep (FS) condition lost weight compared to controls. And both conditions (control and FS) had a decrease in vocalizations from the beginning of the protocol. In terms of inflammatory markers, we observed a significant increase in brain IL-17 concentration in the group of aged rats compared to young rats. We also observed this increase for occludin and aquaporin-4. Other markers were less sensitive to age and protocol such as IL-6, IL-1 β , and claudin-5. However, APP concentration was significantly lower in young SF rats than in controls. In addition, in aged rats, the amount of APP was significantly higher. We observed an impact of our fragmentation protocol on the activation of microglia and astrocytes. Taken together, this thesis work suggests that glia and APP accumulation are two early consequences of brain-level changes during severe sleep fragmentation. It should be noted that age has an important influence on these markers.

Table des matières

CHAPITRE 1 : LE SOMMEIL	17
1 . DEFINITION PHYSIOLOGIQUE DU SOMMEIL	17
1.1 ARCHITECTURE DU SOMMEIL	18
1.2 SOMMEIL ET SYSTEME NERVEUX AUTONOME (SNA)	20
2 . LES BIENFAITS DU SOMMEIL	22
2.1 LA MEMORISATION.....	22
2.2 LA CLAIRANCE METABOLIQUE	23
2.3 SECRETION HORMONALE.....	26
3 . LE SOMMEIL ET L'AGE	28
4 . ALTERATION DU SOMMEIL : RESTRICTION, PRIVATION ET FRAGMENTATION DE SOMMEIL	29
CHAPITRE 2 : LA FRAGMENTATION DE SOMMEIL	32
1 . DEFINITION PHYSIOLOGIQUE	39
2 . RETENTISSEMENT CEREBRAL ASSOCIE A LA FRAGMENTATION DE SOMMEIL 40	
2.1 LES PATHOLOGIES NEURODEGENERATIVES	40
2.1.1 <i>Déficience cognitive légère (DCL) et fragmentation de sommeil</i>	41
2.1.2 <i>La maladie d'Alzheimer et la fragmentation de sommeil</i>	42
2.1.3 <i>La maladie de Parkinson et la fragmentation de sommeil</i>	44
2.2 NEUROINFLAMMATION.....	45
2.2.1 <i>La BHE</i>	45
2.2.2 <i>Inflammation : les interleukines</i>	54
2.2.3 <i>Neuroinflammation</i>	56
CHAPITRE 3 : MODELES ANIMAUX	59
1 . MODELES D'ETUDE DANS LA LITTERATURE	59
1.1 LA DROSOPHILE	59
1.2 LE MODELE MURIN	60
1.3 EVOLUTION DU PROTOCOLE DE FRAGMENTATION	62
1.4 CHEZ L'HOMME.....	65
2 . VOCALISATIONS	70
3 . L'ETUDE DE LA MEMOIRE	72
ETUDE 1 : ETUDE COMPORTEMENTALE DE LA FRAGMENTATION DE SOMMEIL	78
1 . INTRODUCTION	78
2 . MATERIELS ET METHODES	83
3 . RESULTATS	89
4 . DISCUSSION	101
5 . CONCLUSION	106
ETUDE 2 : IMPACT DE LA FRAGMENTATION DE SOMMEIL SUR L'ENVIRONNEMENT NEURONAL	109

1	. INTRODUCTION	109
2	. MATERIELS ET METHODES	113
3	. RESULTATS	122
3.1	LA GLIE.....	122
3.2	. LES DOSAGES PROTEIQUES.....	134
4	. DISCUSSION	140
5	. CONCLUSION	145
	DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	149
	BIBLIOGRAPHIE.....	157
	REVIEW.....	171

Table des figures et tableaux

<i>Figure 1 : Caractéristiques des EEG et hypnogramme des stades de sommeil. Le côté droit de la figure est un hypnogramme qui décrit les différents stades de sommeil durant une nuit de 8h. les caractéristiques EEG de chaque stade de sommeil sont listées à gauche. REM : rapid eye movement ; N1 : sommeil non-REM de stade 1 ; N2 : sommeil non-REM de stade 2 ; N3 : sommeil non-REM de stade 3. (Pan et al. 2021)</i>	19
<i>Figure 2: Systèmes nerveux central et périphérique. (d'après http://activateanddominate.com)</i>	20
<i>Figure 3: Hypothetical mechanisms by which altered brain insulin signaling induced by sleep restriction may promote the development of Alzheimer's disease. The illustration shows the possible changes in the access of metabolic signals into the brain (e.g., hippocampus) during normal sleep and sleep restriction. D'après (García-Aviles et al. 2021)</i>	25
<i>Figure 4: hypnograms for a normal sleep and b fragmented sleep (Swarnkar et al. 2009)</i>	31
<i>Figure 5: Metabolic, inflammatory and neuronal consequences of sleep fragmentation and the potential link with neurodegenerative diseases. Aβ: amyloid β; GLUT-1: glucose transporter 1; IL-6: interleukin-6; NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; ROS: reactive oxygen species.</i>	45
<i>Figure 6: Structure et fonction de la BHE. A : barrière cérébrale. B : structure de la BHE. C : transporteurs de la BHE. D : jonctions serrées. D'après Aday et al. 2016.</i>	46
<i>Figure 7: Structure de la claudine-5 d'après Greene et al. (Greene, Hanley, and Campbell 2019)</i>	48
<i>Figure 8: Structure de l'occludine d'après Feldman et al. (Feldman, Mullin, and Ryan 2005)</i>	49
<i>Figure 9: Structure de la VE-cadhérine d'après Vincent et al. (Vincent et al. 2004).</i>	50
<i>Figure 10: Différents types d'interaction de la glie (astrocytes, microglie, et oligodendrocytes) avec des neurones ou entourant un vaisseau sanguin. D'après (Allen and Barres 2009).</i>	51
<i>Figure 11: Role de l'IL-17 (entouré en rouge) dans les pathologies inflammatoires du système nerveux central. D'après (Milovanovic et al. 2020).</i>	55
<i>Figure 12: rôles physiologiques et pathologiques des β-amyloïdes. D'après (Morley and Farr 2014).</i>	57
<i>Figure 13: Cage de fragmentation utilisée lors de ma thèse (photo personnelle)</i>	62
<i>Figure 14: répartition des différents protocoles au cours de mes trois années de thèse.</i>	64
<i>Figure 15: Les différentes catégories de vocalisations chez les rats et les études qui y ont été associées (Simola 2022).</i>	71
<i>Figure 16: Résultat du test de mémoire entre rats contrôles (bleu) et rats avec lésion de l'hippocampe (en rouge). (Eichenbaum 2000)</i>	73
<i>Figure 17: Test du labyrinthe en Y pour la mémoire spatiale selon l'alternance des bras (Kraeuter, Guest, and Sarnyai 2019).</i>	75
<i>Figure 18: Test du labyrinthe en Y pour la mémoire spatiale selon la méthode du bras non exploré (Kraeuter, Guest, and Sarnyai 2019).</i>	75
<i>Figure 19: Classification simplifiée des vocalisations en ultrasons (USV) de rats adultes.</i>	81

- Figure 20: Cage de fragmentation (photo personnelle) _____ 84
- Figure 21: cycle de rotation des cages (A) contrôle et (B) sommeil fragmenté sur 24h. L'inversion du cycle jour nuit de la salle des animaux a permis de calquer leur rythme éveil/sommeil au nôtre. En rouge, les moments de rotation de la cage sous le cycle 9 sec. ON et 110 sec. OFF _____ 85
- Figure 22: Représentation des combinaisons correctes et incorrectes selon la méthode des bras alternés. _____ 86
- Figure 23: AudioMoth v1.2.0. (1) Microcarte SD, (2) Micro, (3) Emplacement des 3 piles « AA » (image : Amandine Cascarino) _____ 87
- Figure 24: variation du poids des rats jeunes à partir du début de protocole de fragmentation de sommeil (J0). n=12 chez les ctrl et n=14 chez les SF. ctrl: contrôle; SF: sommeil fragmenté. *p-value < 0.05 _____ 89
- Figure 25: variation du poids des rats âgés à partir du début de protocole de fragmentation de sommeil (J0). n=10 chez les ctrl et n=12 chez les SF. ctrl: contrôle; SF: sommeil fragmenté. *p-value<0.05; **p-value<0.01; ***p-value<0.001 _____ 90
- Figure 26: Pourcentage de réponses correctes lors du labyrinthe en Y pour les rats jeunes. n=10 pour les ctrl et n=10 pour les SF. 19h correspond à avant leur période active et 7h après leur période active. ctrl : groupe contrôle ; SF : groupe au sommeil fragmenté. _____ 91
- Figure 27: Nombre d'entrées effectué lors du labyrinthe en Y pour les rats jeunes. n=10 pour les ctrl et n=10 pour les SF. 19h correspond à avant leur période active et 7h après leur période active. ctrl : groupe contrôle ; SF : groupe au sommeil fragmenté. _____ 92
- Figure 28: Pourcentage de combinaisons correctes lors du labyrinthe en Y pour les rats âgés. n=10 pour les ctrl et n=7 pour les SF. 9h correspond à avant leur période active et 19h après leur période active. ctrl : groupe contrôle ; SF : groupe au sommeil fragmenté. _____ 93
- Figure 29: Nombre d'entrées effectué lors du labyrinthe en Y pour les rats âgés. n=10 pour les ctrl et n=10 pour les SF. 9h correspond à avant leur période active et 19h après leur période active. ctrl : groupe contrôle ; SF : groupe au sommeil fragmenté. _____ 93
- Figure 30: Comparaison du pourcentage de réponses correctes entre les groupes de rats jeunes et âgés. _____ 94
- Figure 31: Comparaison du nombre d'entrées entre rats jeunes et rats âgés. **p-value<0.01; ***p-value<0.001 _____ 95
- Figure 32: Nombre de vocalisations de catégories 22 kHz (en rose) et 50 kHz (en rouge), lors du test du labyrinthe en Y, selon la condition des individus. n=4 ctrl et n=4 SF. **p-value < 0.01 _____ 96
- Figure 33: (A) Nombre de vocalisations pendant la période active (9h - 21h) et (B) pendant la période dormante (21h - 9h) en fonction du groupe (contrôle ou fragmenté). n=4 ctrl et n=4 SF. ***p-value < 0.001 _____ 97
- Figure 34: Vocalisations pendant la période active (9h - 21h) pendant l'acclimatation et le protocole de fragmentation en fonction du groupe des individus (contrôles en vert foncé, fragmentés en vert clair). n=4 ctrl et n=4 SF. * p-value < 0.05, ** p-value < 0.01, *** p-value < 0.001 _____ 97
- Figure 35: Nombre de vocalisations, pendant les trois derniers jours d'acclimatation (en foncé) et les trois premiers jours de protocole de fragmentation (en clair), lors de la période active, en fonction du groupe des individus. n=4 ctrl et n= 4 SF. NS : non significatif, * p-value < 0.05 _____ 98
- Figure 36 : Nombre de vocalisations de catégories 22 kHz (en rose) et 50 kHz (en rouge), avant et pendant le protocole de fragmentation, chez les individus contrôles. n=4 ctrl et n=4 SF. _____ 99

<i>Figure 37: Nombre de vocalisations de catégories 22 kHz (en rose) et 50 kHz (en rouge), avant et pendant le protocole de fragmentation, chez les individus au sommeil fragmenté. n=4 ctrl et n=4 SF.</i>	99
<i>Figure 38: Cage de fragmentation (photo personnelle)</i>	115
<i>Figure 39: cycle de rotation des cages (A) contrôle et (B) sommeil fragmenté sur 24h. L'inversion du cycle jour nuit de la salle des animaux a permis de calquer leur rythme éveil/sommeil au nôtre. En rouge, les moments de rotation de la cage sous le cycle 9 sec. ON et 110 sec. OFF</i>	116
<i>Figure 40 : Schéma d'un cerveau de rat vu du dessous. Découpage des blocs 1 à 6 pour l'inclusion en paraffine. Notre zone d'intérêt, l'hippocampe, se trouve au niveau du bloc 3 (en rouge).</i>	119
<i>Figure 41: Détermination des trois aires de l'hippocampe. D'après (Selakovic et al. 2019)</i>	119
<i>Figure 42 : Exemple du calcul des différences Δ (moyenne rats jeunes - moyenne rats âgés) en fonction de la zone (ici CA1) et du marqueur (ici astrocytaire).</i>	120
<i>Figure 43 : Nombre d'astrocytes par μm^2 selon l'aire de l'hippocampe. ctrl: contrôle; SF: sommeil fragmenté. ctrl n=3; SF n=6</i>	122
<i>Figure 44: Nombre d'astrocytes par rapport au nombre de cellules total dans différentes aires de l'hippocampe. Ctrl : contrôle ; SF : sommeil fragmenté. ctrl n=3 ; SF n=6.</i>	123
<i>Figure 45: Nombre de cellules microgliales par μm^2 selon l'aire de l'hippocampe. ctrl: contrôle; SF: sommeil fragmenté. ctrl n=3; SF n=6</i>	123
<i>Figure 46: Nombre de cellules microgliales par rapport au nombre de cellules total dans différentes aires de l'hippocampe. Ctrl : contrôle ; SF : sommeil fragmenté. ctrl n=3 ; SF n=6</i>	124
<i>Figure 47: Nombre de vaisseaux par μm^2 selon l'aire de l'hippocampe chez le rat jeune. ctrl: contrôle; SF: sommeil fragmenté. ctrl n=3; SF n=6</i>	124
<i>Figure 48: Nombre de vaisseaux par rapport au nombre total de cellules dans différentes aires de l'hippocampe chez le rat jeune. Ctrl : contrôle ; SF : sommeil fragmenté. ctrl n=3 ; SF n=6.</i>	125
<i>Figure 49: Nombre total de cellules par μm^2 de l'hippocampe chez le rat jeune âgé de 7 semaines. ctrl: contrôle; SF: sommeil fragmenté. ctrl n=3; SF n=6</i>	126
<i>Figure 50: concentration en aquaporine-4 dans les cerveaux de rats jeunes de 7 semaines et âgés de 1 an, contrôles et SF. SF: sommeil fragmenté. ctrl : n=10 ; SF : n=12 (2 manipulations indépendantes). * p-value < 0.05 ; ** p-value < 0.01</i>	127
<i>Figure 51: Nombre d'astrocytes par μm^2 selon l'aire de l'hippocampe chez les rats âgés de 1 an. A gauche est représentée l'aire CA2/3. A droite sont représentées les zones CA1 et DG. ctrl: contrôle; SF: sommeil fragmenté. ctrl n=9; SF n=11.</i>	128
<i>Figure 52: Nombre d'astrocytes par rapport au nombre total de cellules dans différentes aires de l'hippocampe chez les rats âgés de 1 an. Ctrl : contrôle ; SF : sommeil fragmenté. ctrl n=9 ; SF n=11.</i>	128
<i>Figure 53: Nombre de cellules microgliales par μm^2 selon l'aire de l'hippocampe chez les rats âgés de 1 an. A gauche est représentée l'aire CA2/3. A droite sont représentées les zones CA1 et DG. ctrl: contrôle; SF: sommeil fragmenté. ctrl n=9; SF n=11.</i>	129
<i>Figure 54: Nombre de cellules microgliales par rapport au nombre total de cellules dans différentes aires de l'hippocampe chez les rats âgés de 1 an. Ctrl : contrôle ; SF : sommeil fragmenté. ctrl n=9 ; SF n=11.</i>	129

Figure 55: Nombre de vaisseaux par μm^2 selon l'aire de l'hippocampe chez le rat âgé de 1 an. A gauche est représentée l'aire CA2/3. A droite sont représentées les zones CA1 et DG. ctrl: contrôle; SF: sommeil fragmenté. ctrl n=9; SF n=10 _____ 130

Figure 56: Nombre de vaisseaux par rapport au nombre de cellules total dans différentes aires de l'hippocampe chez les rats âgés de 1 an. Ctrl : contrôle ; SF : sommeil fragmenté. ctrl n=9 ; SF n=10. _____ 131

Figure 57: Nombre de cellules total par μm^2 de l'hippocampe chez le rat âgé de 1 an. Ctrl: contrôle; SF: sommeil fragmenté. ctrl n=6; SF n=8 _____ 131

Figure 58: Delta obtenu en soustrayant la moyenne du nombre d'astrocytes comptés chez les rats jeunes à la moyenne du nombre d'astrocytes comptés chez les rats âgés. Delta en fonction de l'aire de l'hippocampe. A gauche les aires CA1 et DG et à droite l'aire CA2/3. ctrl : contrôle ; SF : sommeil fragmenté. _____ 132

Figure 59: Delta obtenu en soustrayant la moyenne du nombre de cellules microgliales comptées chez les rats jeunes à la moyenne du nombre de cellules microgliales comptées chez les rats âgés. Delta en fonction de l'aire de l'hippocampe. A gauche les aires CA1 et DG et à droite l'aire CA2/3. ctrl : contrôle ; SF : sommeil fragmenté. _____ 133

Figure 60: Delta obtenu en soustrayant la moyenne du nombre de vaisseaux comptés chez les rats jeunes à la moyenne du nombre de vaisseaux comptés chez les rats âgés. Delta en fonction de l'aire de l'hippocampe. A gauche les aires CA1 et DG et à droite l'aire CA2/3. ctrl : contrôle ; SF : sommeil fragmenté _____ 133

Figure 61: Western Blot sur les protéines de jonctions serrées et adhérentes. A : Western Blot sur vaisseaux cérébraux isolés chez les rats jeunes de 7 semaines pour un protocole de deux semaines de fragmentation du sommeil à gauche et 1 mois de fragmentation du sommeil à droite. B : Western Blot sur broyats de cerveaux chez les rats âgés de 1 an pour un protocole de fragmentation de sommeil d'1 mois. Ctrl : contrôle ; SF : sommeil fragmenté. n=2 pour chaque groupe (2 manipulations indépendantes). _____ 135

Figure 62: concentration en claudine-5 dans les cerveaux de rats jeunes de 7 semaines et âgés de 1 an, contrôles et SF. SF: sommeil fragmenté. ctrl : n=10 ; SF : n=12 (2 manipulations indépendantes). * p-value < 0.05 _____ 136

Figure 63: concentration en occludine dans les cerveaux de rats jeunes de 7 semaines et âgés de 1 an, contrôles et SF. SF: sommeil fragmenté. ctrl : n=10 ; SF : n=12 (2 manipulations indépendantes). * p-value < 0.05 ; ** p-value < 0.01 _____ 136

Figure 64: concentration en IL-6 (à gauche) et en IL-1 β (à droite) dans les cerveaux de rats jeunes de 7 semaines et âgés de 1 an, contrôles et SF. SF: sommeil fragmenté. ctrl : n=10 ; SF : n=12 (2 manipulations indépendantes). _____ 137

Figure 65: concentration en IL-17 dans les cerveaux de rats jeunes de 7 semaines et âgés de 1 an, contrôles et SF. SF: sommeil fragmenté. ctrl : n=10 ; SF : n=12 (2 manipulations indépendantes). *** p-value < 0.001 _____ 138

Figure 66: concentration en protéines précurseurs des amyloïdes (APP) dans les cerveaux de rats jeunes de 7 semaines et âgés de 1 an, contrôles et SF. SF: sommeil fragmenté. ctrl : n=10 ; SF : n=12 (2 manipulations indépendantes). * p-value < 0.05 ; ** p-value < 0.01 _____ 139

Tableau 1 : Comparaison des hypnogrammes de la littérature des différentes perturbations de sommeil : privation (totale), restriction et fragmentation. 32

Tableau 2: Exemple de pathologies associées à de la fragmentation de sommeil chez l'Homme et leur impact sur l'architecture du sommeil. NREM : Non-rapid eye movement ; REM : rapid eye movement ; SWS : slow wave sleep.36

Tableau 3: Studies on different experimental methods of sleep fragmentation.67

Tableau 4: Impact de la fragmentation de sommeil expérimentale "pure" sur l'architecture du sommeil du rongeur.....69

Tableau 5: Anticorps primaires utilisés lors des analyses western blot. WB: western blot..... 117

Table des abréviations

AASM : american academy of sleep medicine

AI : arousal index

AM : audiomoth

APP : protéine précurseur des amyloïdes

AQP4 : aquaporine 4

A β : β -amyloïde

BHE : barrière hématoencéphalique

Ctrl : contrôle

DCL: déficience cognitive légère

EEG : électroencéphalogramme

GH: hormone de croissance

IL-17 : interleukine 17

IL-1 β : interleukine 1 β

IL-6 : interleukine 6

LCR: liquide céphalo-rachidien

LTD: dépression à long terme

LTP: potentialisation à long terme

MCI-R : critère révisé du diagnostic de déficience cognitive légère

MP : maladie de Parkinson

NREM : non-rapid eye movement

REM: rapid eye movement

SF : sommeil fragmenté

SNA : système nerveux autonome

SNC : système nerveux central

USV : vocalisations en ultrasons

ZO : Zonula occludens

Chapitre 1 : Le sommeil

“Dormir est une perte de temps”, combien de fois ai-je entendu cette phrase? On pourrait croire que le tiers de notre vie que nous passons à dormir pourrait être exploité différemment et de manière plus efficace. Cependant, dormir est vital pour l’Homme : la vie sans temps de sommeil est impossible. En effet, nous pouvons littéralement mourir par manque de sommeil (p. ex. l’insomnie fatale familiale). Mais que se passe-t-il durant la nuit qui puisse expliquer cet impératif de notre physiologie? Contrairement à la croyance commune ancienne, « le corps et l’esprit » ne se mettent pas en pause pendant que nous dormons.

1 . Définition physiologique du sommeil

Le sommeil est vital pour beaucoup d’organismes vivants dont l’Homme. Des expériences effectuées sur des rats ont montré que la privation totale de sommeil entraînait effectivement la mort de l’animal (Everson, Bergmann, and Rechtschaffen 1989). Pour priver les rats de sommeil, les auteurs ont utilisé un système de privation de sommeil dans lequel un rat expérimental et un rat témoin sont logés de part et d’autre d’un disque divisé suspendu au-dessus d’une eau peu profonde. Lorsque le rat expérimental entre dans un stade de sommeil "interdit", le disque tourne automatiquement, ce qui oblige le rat expérimental à marcher pour éviter d’être entraîné dans l’eau. Le rat témoin reçoit la même stimulation physique, mais peut dormir à volonté lorsque le disque est immobile. Sur 10 rats ayant subi une privation totale de sommeil par un appareil à disque, 7 ont été sacrifiés quand la mort semblait imminente, 1 est mort après 11 jours de privation. Le 9^{ème} devait servir à étudier la récupération post-privation de sommeil, mais il semble qu’il ait passé le point de non-retour et a donc été sacrifié. Le 10^{ème} est mort accidentellement. La durée de survie de ces 9 rats s’étendait de 11 jours à 32 jours après le début du

protocole de privation. Au moment du sacrifice, les 9 rats présentaient les signes suivants : extrême faiblesse sur le plan physique, notes de 5.5-6 sur l'échelle d'évaluation de l'apparence (allant de 1 à 6), 7 des 9 rats ont montré une température corporelle inférieure aux contrôles, une augmentation de l'appétit avec une perte de poids, des œdèmes aux pattes, une faiblesse de l'activité motrice et/ou de l'ataxie (trouble de la coordination motrice). Cette étude montre de façon explicite les effets de la privation de sommeil. Tous ces signes tendent à montrer que le sommeil a un rôle vital pour l'organisme.

Fuller, Gooley et Saper ont proposé en 2006 une définition du sommeil comme étant une réduction volontaire de l'activité motrice, une diminution de la réponse à la stimulation (p. ex. augmentation du seuil d'excitation/éveil) et une posture stéréotypée. La différence principale entre sommeil et coma ou anesthésie est le fait que cet état « physiologique » est facilement réversible et autorégulé (Fuller, Gooley, and Saper 2006).

Ce sommeil est structuré en plusieurs cycles dans lesquels sont présentes différentes phases qui ont été décrites depuis les années 1950. Nous parlons alors d'architecture du sommeil.

1.1 Architecture du sommeil

L'architecture du sommeil se réfère à l'organisation structurelle basique d'un sommeil « normal ». Il y a pour les Anglo-Saxons deux types de sommeil : le sommeil non-rapid-eye-movement (NREM) et le sommeil rapid eye-movement (REM). Pendant un cycle de sommeil, les sommeils NREM et REM alternent de façon cyclique (Colten, Altevogt, and Research 2006). Cette architecture du sommeil est visible qualitativement et quantitativement sur l'électroencéphalogrammes pluri-dérivations (EEG). Ce sont ces voies/dérivations EEG qui permettent de différencier un sommeil dit physiologique d'un sommeil dit pathologique.

Chez l'Homme, les recommandations récentes décrivent la phase NREM composée de 3 stades. Le stade 1, pendant lequel la conscience de l'environnement extérieur disparaît graduellement, l'EEG ralentit. Le stade 2 est « typique » par la perte complète de conscience du monde extérieur ainsi que de l'apparition de « spindles » et de « K-complex » dans l'EEG (Figure 1). Durant la phase 3 du sommeil, plus communément appelée sommeil profond, des vagues deltas apparaissent sur l'EEG. L'augmentation de l'intensité de sommeil est donc définie par l'augmentation du pouvoir, de l'amplitude et de l'incidence des vagues deltas sur l'EEG cortical durant les phases NREMs (Fuller, Gooley, and Saper 2006).

Les phases REMs, lesquelles sont périodiquement cycliques et suivent les phases NREMs, sont caractérisées par des transitions EEG à une haute fréquence et par une activité de faible amplitude qui ressemble à un motif désynchronisé du stade 1 de sommeil et éveil chez l'Homme. De façon similaire aux rongeurs, les oscillations thêta ont été détectées durant les REMs dans l'hippocampe humain. Cependant, contrairement aux rongeurs, l'activité thêta n'est pas continue durant les REMs (Fuller, Gooley, and Saper 2006).

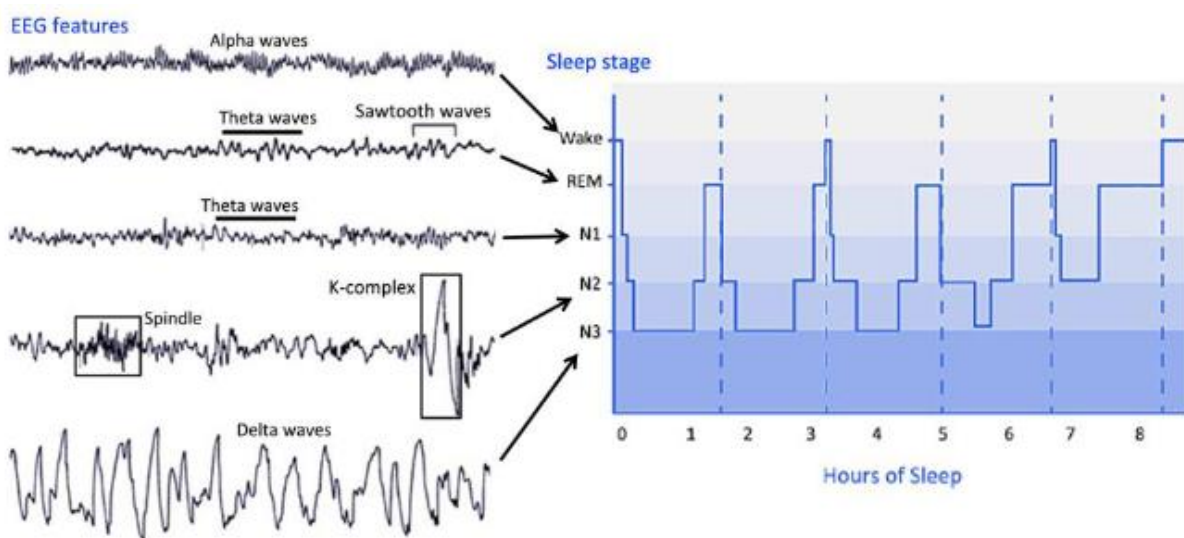


Figure 1 : Caractéristiques des EEG et hypnogramme des stades de sommeil. Le côté droit de la figure est un hypnogramme qui décrit les différents stades de sommeil durant une nuit de 8h. les caractéristiques EEG de chaque stade de sommeil sont listées à gauche. REM : rapid eye movement ; N1 : sommeil non-REM de stade 1 ; N2 : sommeil non-REM de stade 2 ; N3 : sommeil non-REM de stade 3. (Pan et al. 2021)

En 2007, le Manuel AASM (American Academy of Sleep Medicine) pour le codage du sommeil et événements associés a été publié proposant un nouveau standard à la définition des stades de sommeil. Ils sont divisés en 5 stades : éveil, REM, stade N1 (stade 1 du NREM), stade N2 (stade 2 du NREM) et N3 (stade 3 du NREM) (Pan et al. 2021).

Durant ces phases de sommeil, plusieurs processus liés au système nerveux autonome (SNA) se mettent en place successivement.

1.2 Sommeil et système nerveux autonome (SNA)

Le système nerveux autonome est un réseau diffus qui régule virtuellement tous les mécanismes homéostatiques inconscients du corps humain (Figure 2, encadré en rouge).

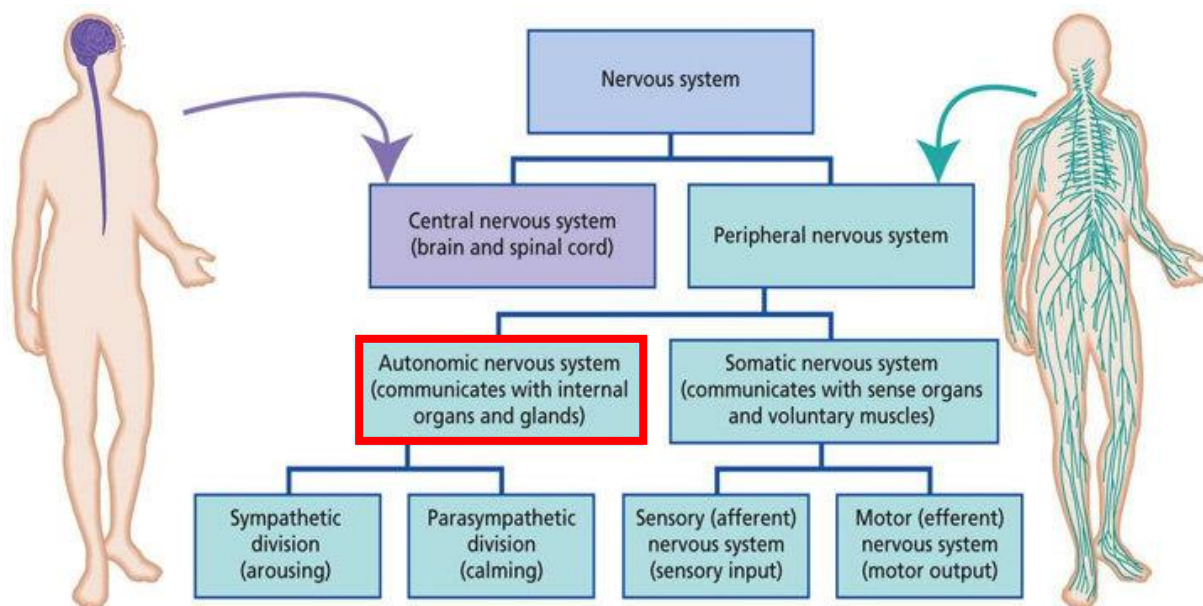


Figure 2: Systèmes nerveux central et périphérique. (d'après <http://activateanddominate.com>)

Dans le cadre du sommeil NREM, on observe une diminution équilibrée de l'activation sympathique et une augmentation de l'activité parasympathique (Stanley 2005). L'activation sympathique excessive, que ce soit d'origine endogène comme dans les états d'anxiété, ou d'origine exogène avec l'utilisation de caféine ou nicotine, peut avoir un effet négatif sur le début du sommeil, donc l'endormissement. Pour réutiliser les termes de McCorry,

le système sympathique contrôle les réponses de type « fight or flight » (en français « combattre ou fuir ») et le système parasympathique régule les fonctions « rest and digest » (en français « repos et digestion ») (McCorry 2007). Quand le sommeil est interrompu, nombre de ces fonctions homéostatiques, telles que la sudation et la thermorégulation, la pression artérielle systémique et la variabilité du rythme cardiaque, ainsi que les fonctions intestinales et vésicales, peuvent être affectées (Miglis 2017).

Les populations cellulaires qui régulent la fonction autonome et le sommeil utilisent certains neurotransmetteurs identiques, tels que la norépinephrine et l'acétylcholine (Miglis 2017, 12). Lorsque l'Homme passe de l'état de veille à la somnolence et au sommeil, le tonus vagal parasympathique augmente et le tonus sympathique diminue. Au fur et à mesure que l'on passe du stade 1 du sommeil NREM aux stades plus profonds du sommeil NREM 2 et 3, le tonus vagal parasympathique augmente encore plus. Le résultat net est une réduction de la fréquence cardiaque, de la pression artérielle et du débit cardiaque. Dans le même temps, le tonus sympathique continue de diminuer, entraînant une réduction des résistances vasculaires périphériques et de la pression artérielle (Miglis 2017). Les barorécepteurs - des récepteurs situés dans la voûte de l'arche aortique et les sinus carotidiens qui contribuent à réguler la pression artérielle - deviennent plus sensibles aux variations « relatives » de la pression artérielle, ce qui favorise un état de respiration et d'échanges gazeux réguliers. La pression artérielle à ce stade est généralement inférieure de 10 à 20 % à la pression artérielle systémique à l'éveil. La fréquence cardiaque atteint également son point le plus bas au stade 3 du sommeil NREM. Pour ces raisons, le sommeil NREM peut être considéré comme un état de dominance parasympathique, de stabilité autonome et de récupération métabolique (Miglis 2017). Durant le sommeil REM, on observe une atonie musculaire qui inhibe les mouvements et la traduction motrice que l'on pourrait avoir durant nos rêves.

Il se passe ainsi beaucoup de choses durant la nuit dans la régulation de notre Corps. Nous avons énuméré dans la partie ci-dessus quelques mécanismes physiologiques liés au SNA qui se mettent en place durant le sommeil. Mais il existe également d'autres processus physiologiques importants, en parallèle de ceux du SNA, qui se mettent en place durant le sommeil.

2 . Les bienfaits du sommeil

On reconnaît également trois grands rôles au sommeil : l'aide à la mémorisation, la clairance métabolique et la sécrétion hormonale liée au rythme veille/sommeil.

2.1 La mémorisation

La capacité de mémoriser est un avantage stratégique critique d'adaptation aux changements environnementaux pour un organisme. La mémoire comprend trois processus majeurs : l'encodage, la consolidation et la récupération (Rasch and Born 2013). Durant l'encodage, la perception du stimulus résulte en la formation d'une nouvelle trace de mémoire, laquelle est initialement très sensible aux influences perturbatrices (interférences) et au déclin. Durant la consolidation, la mémoire labile (mémoire peu fidèle) est graduellement stabilisée en impliquant possiblement plusieurs vagues de procédés de consolidation à court et long terme, lesquelles servent à renforcer et intégrer la mémoire dans un réseau de connaissances préexistant. Pendant la récupération, la mémoire stockée reste accessible et peut être rappelée.

Au niveau neuronal, la formation de la mémoire est supposée se baser sur le changement de force des connexions synaptiques dans le réseau responsable de la mémoire. L'encodage induit la potentialisation à long terme (LTP) ou la dépression à long terme (LTD) synaptiques comme formes majeures de plasticité synaptique induite par l'apprentissage.

En neuropsychologie clinique, on distingue les mémoires déclarative et non-déclarative (capacité d'apprentissage non consciente) dépendant de l'implication critique des régions du lobe temporal médial, particulièrement de l'hippocampe, dans l'acquisition de la mémoire. La mémoire déclarative regroupe (i) la mémoire épisodique pour les événements qui sont intégrés dans un contexte spatiotemporel (dont la mémoire autobiographique) et (ii) la mémoire sémantique pour les faits qui sont indépendamment stockés de la connaissance contextuelle (la mémoire des mots, des concepts, des connaissances générales sur le monde) (Squire and Zola 1996).

Il est maintenant clair que le sommeil joue un rôle déterminant dans la consolidation de la mémoire déclarative et non déclarative (Diekelmann and Born 2010). Le rôle du sommeil, en particulier du sommeil lent, dans la consolidation de la mémoire, est étayé par des résultats expérimentaux. Par exemple, des études d'imagerie cérébrale ont montré une réactivation de l'hippocampe pendant le sommeil lent durant la nuit suivant le processus d'apprentissage (Alger, Lau, and Fishbein 2012) ou qu'une sieste contenant du sommeil lent tendent à améliorer la consolidation de la mémoire (Alger, Lau, and Fishbein 2012). Il a été démontré que l'induction d'oscillations lentes par stimulation électrique transcrânienne augmentait l'activité oscillatoire lente spontanée pendant le sommeil et améliorait la consolidation de la mémoire déclarative (Marshall et al. 2006).

Le sommeil est donc vital dans les processus de mémorisation avec une structure cérébrale particulièrement active dans ce processus : l'hippocampe. Au niveau cérébral, un autre mécanisme se met en place : la clairance métabolique.

2.2 La clairance métabolique

Un autre mécanisme central reliant le sommeil et la mémoire semble être l'élimination nocturne des toxines accumulées dans le cerveau au cours de la journée précédente (L. Xie et al. 2013). Les activités physiologiques produisent des déchets métaboliques par dégradation des molécules ou par

réaction d'oxydoréduction (Spinelli and Haigis 2018). Tous ces déchets métaboliques sont évacués du cerveau par la circulation sanguine, mécanisme essentiel pour conserver l'homéostasie cérébrale (Albrecht and Ripperger 2018). Cette activité est plus importante pendant le sommeil que pendant l'éveil (L. Xie et al. 2013). Il est intéressant de noter que la voie glymphatique, une voie d'évacuation des fluides cérébraux, semble favoriser l'écoulement du liquide céphalo-rachidien (LCR) vers les vaisseaux de drainage lymphatique cervicaux (Mendelsohn and Larrick 2013). Cette voie glymphatique semble principalement active pendant le sommeil, lorsque **la clairance des métabolites tels que l'A β et Tau** augmente considérablement par rapport à l'éveil (Figure 3, A β encadré en rouge) (L. Xie et al. 2013). Des dysfonctionnements de la clairance glymphatique et métabolique ont été mis en évidence dans des modèles animaux de la maladie d'Alzheimer et chez des patients (Rasmussen, Mestre, and Nedergaard 2018; Hladky and Barrand 2019).

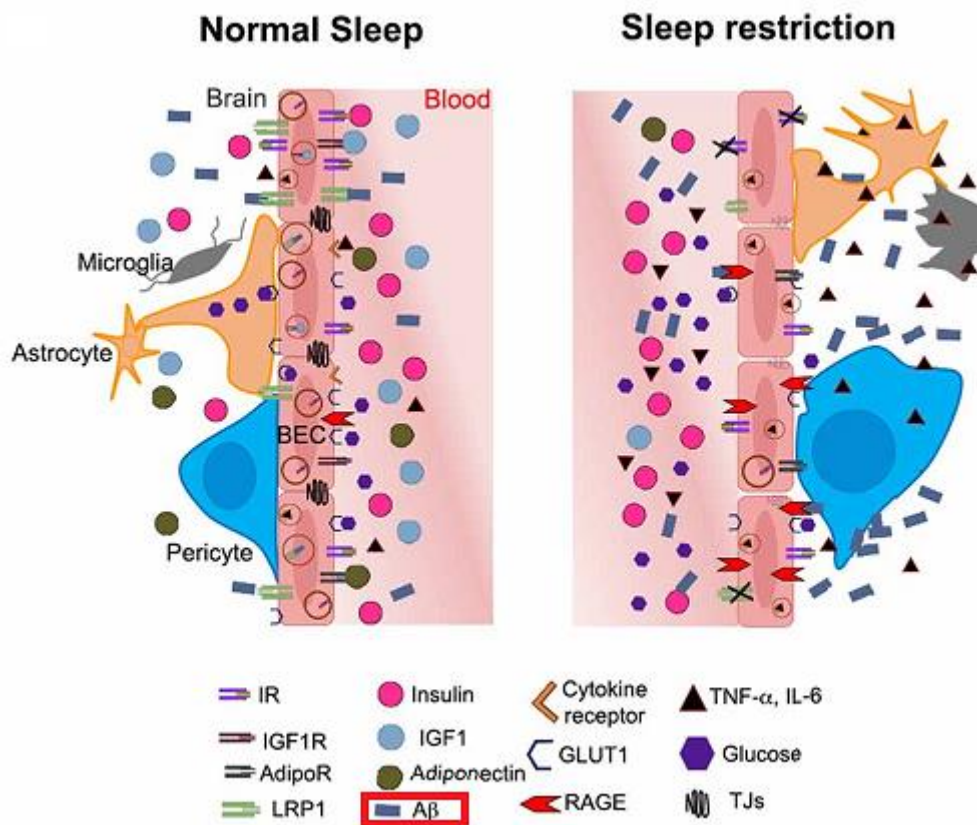


Figure 3: Hypothetical mechanisms by which altered brain insulin signaling induced by sleep restriction may promote the development of Alzheimer's disease. The illustration shows the possible changes in the access of metabolic signals into the brain (e.g., hippocampus) during normal sleep and sleep restriction. D'après (García-Aviles et al. 2021)

Le sommeil est donc fondamental pour le métabolisme neuronal. Les troubles du sommeil ou la fragmentation de sommeil peuvent donc avoir des conséquences majeures sur le métabolisme neuronal et le fonctionnement cérébral diurne.

Une étude a été effectuée chez la Drosophile (van Alphen et al., 2021). Ils ont démontré que l'extension et la rétractation de la trompe de façon répétée durant le sommeil étaient le signe d'un sommeil profond discret non identifié jusqu'à présent. Ce stade est caractérisé par une augmentation du seuil d'excitation et de la régulation circadienne et homéostatique. Pour découvrir ce rôle, les auteurs ont privé les mouches de sommeil en utilisant le SNAP (sleep nullifying apparatus) pendant les 12h de nuit. Cet appareil consiste en un stimulus de géotaxie négative (éloignement d'un être vivant par rapport au centre de la Terre) toutes les 10 secondes. Les mouches ont ensuite été anesthésiées. Le groupe contrôle a eu un point de glue sur la

tête et l'autre groupe a eu la trompe collée tout en permettant à la mouche de se nourrir. Empêcher l'extension de la trompe ralentit la clairance du colorant injecté et de la luciférine ingérée de l'hémolymphe et augmente la mortalité après une grave blessure, indiquant que l'extension de la trompe durant le sommeil a un rôle dans la clairance des déchets métaboliques. Cette découverte indique une conservation durant l'évolution de la clairance métabolique durant le sommeil chez un ancêtre commun de la mouche et de l'Homme. Les mouches et les humains semblent avoir indépendamment des mécanismes évolués pour maintenir cette fonction en prenant compte de leur anatomie et d'autres fonctionnalités du sommeil.

Un troisième rôle majeur du sommeil, la sécrétion hormonale, va être développé ci-après.

2.3 Sécrétion hormonale

Pour comprendre la régulation hormonale, il est important de bien différencier la régulation liée au rythme circadien (rythme jour/nuit) de celle liée au sommeil (rythme veille/sommeil). En effet, même si la majorité des êtres humains dorment quand la nuit est installée, ce n'est pas le cas de tout le monde. Certaines personnes telles que les travailleurs de nuit, les marins, les personnels de garde, soignants, etc. dorment durant la journée. Certaines hormones ne seront donc pas régulées de la même façon entre ces deux catégories de ces personnes.

Le glucose, source principale d'énergie du corps et du cerveau, fait partie des biosystèmes dont les hormones de contrôle sont régulées par le rythme veille/sommeil. L'utilisation du glucose par le cerveau représente 50% de l'utilisation totale du glucose dans l'organisme pendant le jeûne et de 20 à 30 % après le repas (Leprout and Van Cauter 2010). Pendant le sommeil, malgré une longue période de jeûne, les niveaux de glucose restent stables ou ne chutent que très peu, contrastant avec une diminution nette durant un jeûne éveillé. Des mécanismes doivent donc se mettre en place durant la nuit pour prévenir d'une telle chute du niveau de glucose. Durant la

première partie de la nuit, la diminution de la tolérance au glucose est due à la diminution de l'utilisation du glucose par les tissus périphériques et le cerveau, comme démontré par les études d'imagerie nucléaire par émission de positron ou PET (Nofzinger et al. 2002) qui montre une réduction de 30-40% de la prise de glucose durant le stade N3 (stade 3 du NREM) comparé à l'éveil ou au sommeil REM. Durant la seconde partie de la nuit, ces effets s'atténuent au fur et à mesure que le sommeil NREM et le sommeil REM dominant. Les réveils sont plus probables, l'hormone de croissance (GH) n'est plus sécrétée et la sensibilité à l'insuline augmente et un effet retardé et de faibles niveaux de cortisol sont observés pendant la soirée et le début de la nuit (Leprout and Van Cauter 2010).

L'influence du sommeil sur la GH a été détaillée par l'équipe (Takahashi, Kipnis, and Daughaday 1968). Ces chercheurs ont étudié les niveaux de GH, glucose, insuline et cortisol en fonction des conditions de sommeil (normal, retardé/décalé, interrompu). Ils ont clairement mis en évidence un pic de GH plasmatique qui atteint son maximum environ 70 minutes après le début du sommeil. Les expériences où le sommeil était retardé ou interrompu ont donné des preuves fortes que les pics de GH sont liés au sommeil et non au rythme circadien. Ce schéma de réponse est en contradiction avec la sécrétion nocturne de cortisol, lequel n'est pratiquement pas influencé par le changement d'heure de sommeil et d'éveil.

Les hormones sexuelles et le sommeil : (Axelsson et al. 2005) ont travaillé sur le lien entre sommeil et sécrétion de testostérone. Chez les hommes jeunes, les niveaux de testostérone augmentent et atteignent un pic durant le sommeil, indépendamment du fait que le sujet dorme la journée ou la nuit. D'autres études ont montré que chez les adultes et les hommes âgés, une qualité de sommeil plus pauvre est associée à une diminution des concentrations en testostérone, quel que soit l'âge que ce soit la régulation endocrine ou le sommeil.

Une des actions les plus manifestes des hormones non stéroïdiennes est leur influence sur la régulation du sommeil. Des preuves solides ont été générées durant les dernières décennies indiquant que le cycle veille/sommeil est particulièrement perturbé en conditions physiologique et pathologique souligné par des troubles hormonaux (Teran-Perez et al., 2012).

La régulation du cortisol (régulation de la glycémie), de la leptine (hormone de satiété) et de la ghréline (hormone de faim) dépendent du rythme circadien et ne seront donc pas développées dans ce chapitre.

Comme souligné dans cette partie, le sommeil joue un rôle important dans la régulation de certaines hormones. Les troubles du sommeil, et en particulier la privation de sommeil, sont associés à un risque accru d'obésité, de diabète et d'altération de la sensibilité à l'insuline, ainsi qu'à un dérèglement de la leptine et de la ghréline, qui ont un impact négatif sur la santé humaine (Kim, Jeong, and Hong 2015).

Nous venons de voir dans ces différentes parties l'importance d'avoir une bonne nuit de sommeil afin que les processus physiologiques liés au sommeil (mémorisation, clairance métabolique, sécrétion d'hormones, mise au repos du corps) puissent se mettre en place. Or, les personnes âgées se plaignent d'un sommeil non réparateur.

3 . Le sommeil et l'âge

Le vieillissement physiologique est associé à une capacité réduite à initier et maintenir le sommeil (Mander, Winer, and Walker 2017). Au-delà de la 50aine, on observe de nombreux changements dans l'architecture du sommeil très bien caractérisés : (1) une synchronisation avancée du sommeil (c'est-à-dire des heures de coucher et de lever plus précoces), (2) une latence d'endormissement plus longue (c'est-à-dire un temps d'endormissement plus long), (3) une durée globale du sommeil plus courte, (4) une fragmentation accrue du sommeil (c'est-à-dire un sommeil

moins consolidé avec davantage de réveils, d'éveils ou de transitions vers des stades de sommeil plus légers), (5) un sommeil plus fragile (c'est-à-dire une probabilité plus élevée d'être réveillé par des stimuli sensoriels externes), (6) une réduction de la quantité de sommeil profond NREM connu sous le nom de sommeil lent (NREM 3), (7) une augmentation du temps passé dans les stades légers NREM 1 et 2, (8) des cycles de sommeil NREM-REM plus courts et moins nombreux, et (9) une augmentation du temps passé éveillé pendant la nuit (Mander, Winer, and Walker 2017).

Certaines études montrent que les changements dus à l'âge dans la durée et la structure du sommeil sont graduels, arrivent chez des personnes saines, et ne sont pas nécessairement associés à des plaintes (Dijk and Duffy 1999). Il est cependant intéressant de noter que la prévalence des pathologies présentant des troubles du sommeil, telles que l'apnée du sommeil ou les myoclonies nocturnes (contraction brève et brusque d'un muscle ou d'un groupe musculaire), est plus grande de façon dépendante de l'âge (Dijk and Duffy 1999).

Il existe cependant une question dans le domaine scientifique qui n'a pas de réponse : les sujets âgés dorment-ils moins parce qu'ils ont besoin de moins de sommeil ou ont-ils besoin de plus de sommeil qu'ils ne peuvent en avoir, étant incapables de générer ce dont ils ont encore besoin (Mander, Winer, and Walker 2017)? L'équipe de Mander et al. en 2017 ont résumé les pour et les contres de cette fameuse question dans leur revue.

Après avoir défini l'importance d'avoir un sommeil sain, nous allons développer les principaux troubles du sommeil afin de bien situer le contexte de la thèse.

4 . Altération du sommeil : restriction, privation et fragmentation de sommeil

Il est plus facile de trouver dans la littérature des études sur la privation et la restriction que sur la fragmentation de sommeil. Il est également possible de voir le terme perturbation ou interruption du sommeil (en anglais « sleep disturbance » et « sleep disruption »). Dans cette partie je vais définir ces termes afin de bien les différencier et pour justifier les expérimentations animales que nous avons pu réaliser.

La restriction de sommeil représente une nuit plus courte que la durée habituelle ou de la quantité de sommeil nécessaire pour maintenir une performance optimale (Reynolds and Banks 2010). C'est certainement la forme de dyssomnie la plus fréquemment expérimentée dans la vie quotidienne (Banks and Dinges 2007). C'est un phénomène commun comme le sommeil est affecté par une multitude de paramètres tels que les responsabilités sociales, les exigences de travail (amplitudes, placements des heures de travail sur le nycthémère) et les pathologies (Reynolds and Banks 2010). On le retrouve lorsque les heures de travail s'éternisent, mais également dans les métiers à roulement (par exemple, le travail posté). Les principales conséquences de la restriction de sommeil sont les changements d'humeur et de sociabilité, l'exacerbation des symptômes psychosomatiques tels que les douleurs musculaires, nausées, céphalées et douleurs diffuses (Haack et al. 2009).

La privation de sommeil représente une élimination des phases de sommeil pour une période (au moins une nuit) d'éveil prolongé. Les premières recherches sur les effets de la privation de sommeil datent des années 1990 (Patrick and Gilbert 1896). Ils ont étudié l'effet de 90h d'éveil et ont observé une diminution de la capacité d'attention, de la mémoire et de la préhension. Depuis ces études, une nouvelle aire de recherche s'est ouverte. Etant donné le nombre de métiers concernés par la privation de sommeil (conducteurs(rices) de poids lourds, infirmier(e), anesthésistes, pilotes d'avion, militaire,...), la privation de sommeil totale est devenue un enjeu majeur de la recherche en laboratoire (Reynolds and Banks 2010). Certaines études ont comparé les effets de la privation de sommeil avec les

effets de l'intoxication à l'alcool et ont trouvé que la performance était altérée de manière équivalente dans les deux conditions (Dawson and Reid 1997). Dans l'étude de Dawson et Reid, il a été trouvé qu'après 17h d'éveil, les performances sur les tâches cognitives étaient équivalentes à une concentration en alcool dans le sang de 0.05% et qu'après une nuit blanche, à 8h, c'était équivalent à 0.1%.

La fragmentation de sommeil, qui est au cœur de ma thèse, représente un sommeil interrompu de façon répétée (Figure 4). La fragmentation peut être considérée comme sévère si les interruptions sont supérieures à 30 microéveils par heure (arousal index (AI) >30). Une définition plus précise sera proposée dans le chapitre suivant.

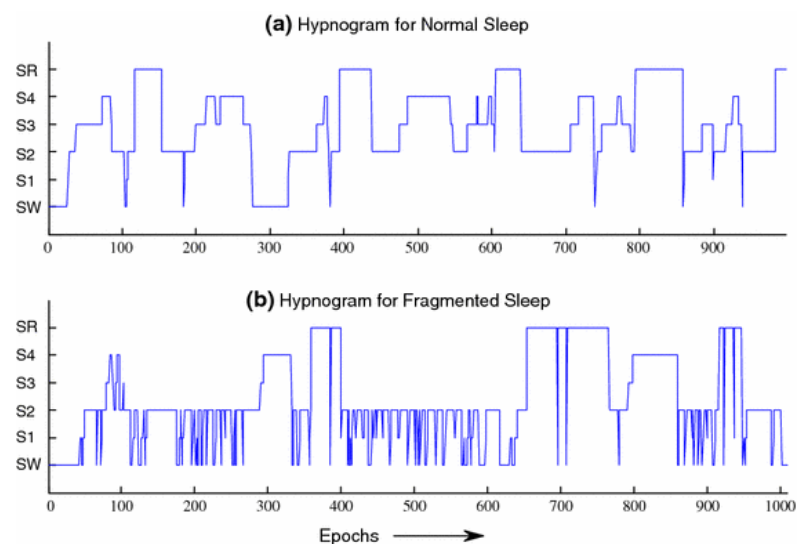
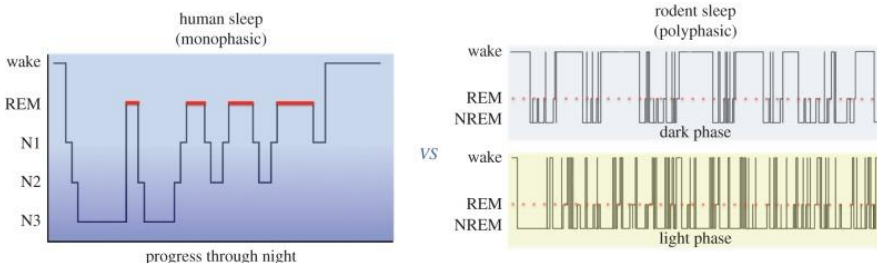
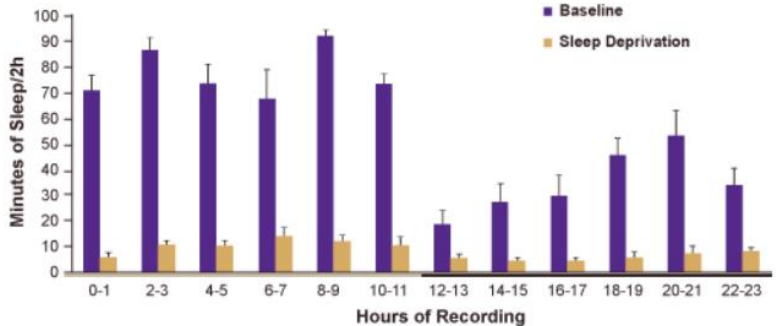
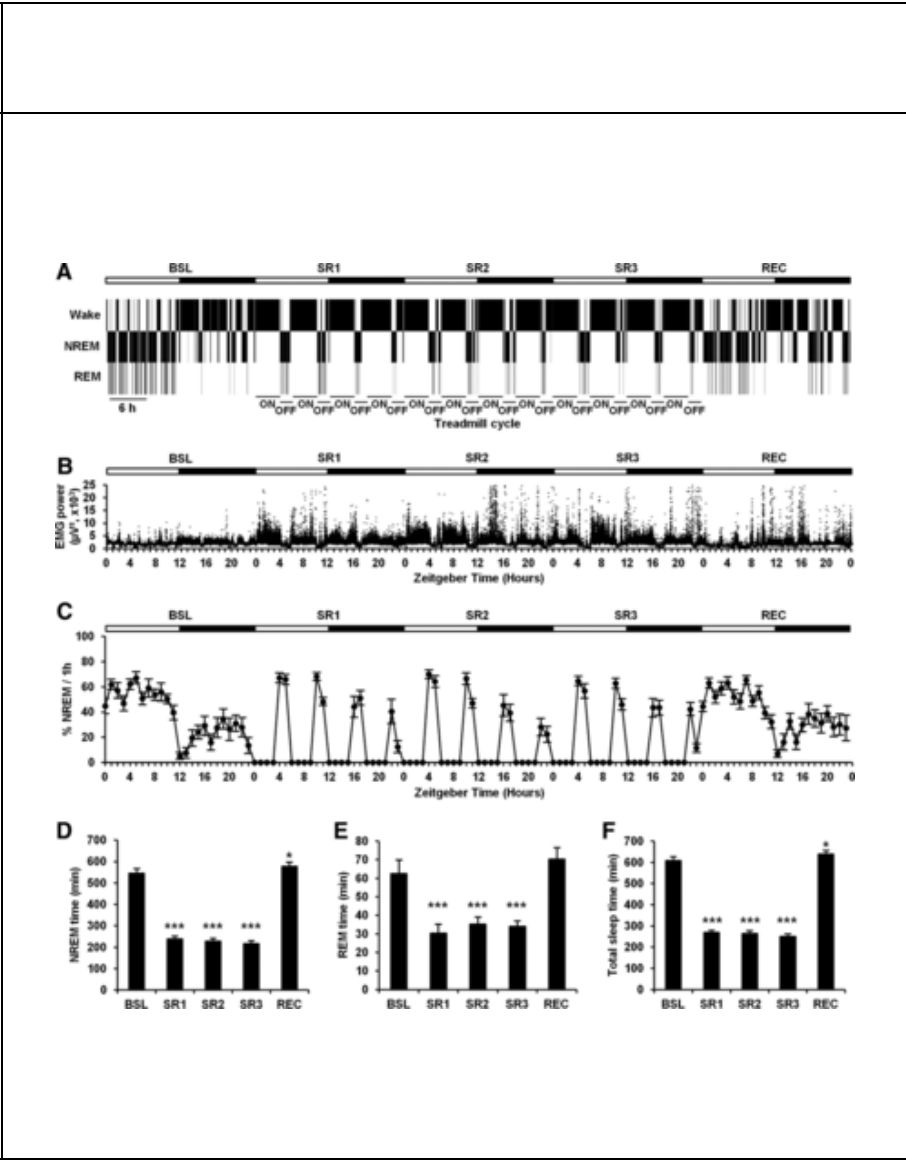


Figure 4: hypnograms for **a** normal sleep and **b** fragmented sleep (Swarnkar et al. 2009)

Tableau 1 : Comparaison des hypnogrammes de la littérature des différentes perturbations de sommeil : privation (totale), restriction et fragmentation.

Condition de sommeil	Hypnogramme	Légende/Auteur
<p>Normal (sain) Humain/rat</p>	 <p>The figure contains two hypnograms. The left one, labeled 'human sleep (monophasic)', shows a single period of sleep during the night, progressing through stages N3, N2, N1, and REM before waking. The right one, labeled 'rodent sleep (polyphasic)', shows multiple short periods of sleep (REM and NREM) occurring throughout both the 'dark phase' and 'light phase'.</p>	<p>Comparison of hypnograms representing typical sleep patterns in humans and rodents. Human sleep is monophasic and normally consists of three to five cycles of the sleep stages throughout the night. Longer bouts of NREMS stage N3 or SWS occur earlier in the night while REMS increases in duration and frequency as the night progresses. Rodent sleep is polyphasic, with wake, NREMS and REMS occurring throughout the light and dark phases. More sleep is acquired in the light phase, while the dark phases consist of consolidated periods of wake.</p> <p>Mong, Jessica A., and Danielle M. Cusmano. 2016. 'Sex Differences in Sleep: Impact of Biological Sex and Sex Steroids'. <i>Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences</i> 371 (1688): 20150110. https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0110.</p>
<p>Privation de sommeil</p>	 <p>The bar chart shows 'Minutes of Sleep/2h' on the y-axis (0-100) and 'Hours of Recording' on the x-axis (0-1 to 22-23). Purple bars represent 'Baseline' sleep, and gold bars represent 'Sleep Deprivation'. Sleep time is significantly higher in the baseline condition across all bins, with a peak around 8-9 hours. Sleep deprivation results in very low sleep minutes, mostly below 10 minutes per 2-hour bin.</p>	<p>Comparison of baseline sleep (purple bars) with a 24-hour sleep deprivation period (gold bars). Six mice (male, C57BL/6J) were maintained on a 12-hour lights-on (horizontal tan)/ 12-hour lights-off (horizontal black) schedule. EEG and EMG activity were recorded for 24 hours (baseline). During the following 24 hours, each animal was sleep deprived by programming the system to rotate the bar within ten seconds of the mouse entering a sleep-like state, as determined by active EEG feedback. Vertical bars represent sleep time in 2-hour bins.</p>

Restriction de sommeil

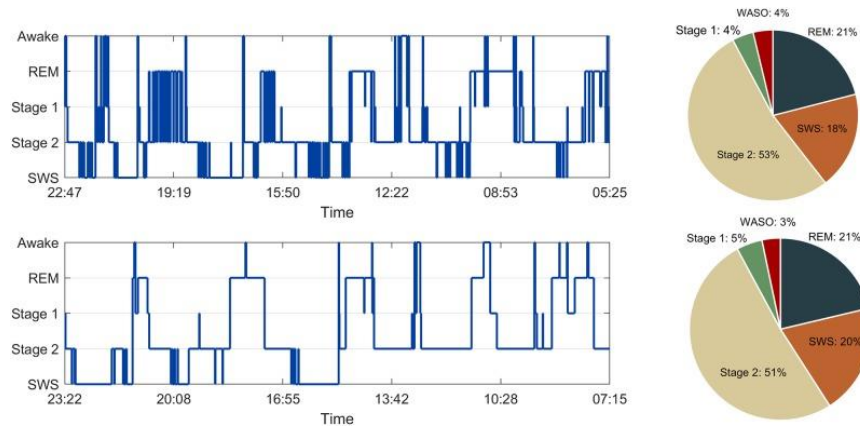


<https://www.pinnaclet.com/sleep-deprivation.html> (consulté le 15/11/2022).

Chronic sleep restriction affects sleep architecture. **A**, Representative hypnogram of a mouse housed on a treadmill during baseline day (BSL), three consecutive days of sleep restriction (SR1, SR2, and SR3) and recovery day (REC). The slow-moving treadmill was on for 4 h (ON) and off for 2 h (OFF) for a total of 12 complete 6 h cycles. Mice were maintained on a 12 h light (open 12 h horizontal bar)/dark (filled 12 h horizontal bar). Note the disruption of the diurnal pattern of the NREM sleep during the three consecutive days of sleep restriction compared with the BSL and REC days. **B**, Analysis of EMG power from the mouse presented in **A**. Note the increase in EMG power during the corresponding periods of spontaneous and enforced wakefulness. **C**, Percentage average of the time spent in NREM sleep per hour during the 5 d of the experiment on the treadmill ($n = 11$ animals). **D**, **E**, Averaged amount of time spent in NREM sleep (**D**) and REM sleep (**E**) during each 24 h of the experiment. **F**, The averaged amount of total sleep time (NREM + REM) during each 24 h of the experiment was significantly decreased during the 3 d period of chronic sleep restriction. Error bars represent SEM.

Clasadonte, Jerome, Sally R. McIver, Luke I. Schmitt, Michael M. Halassa, and Philip G. Haydon. 2014. 'Chronic Sleep Restriction Disrupts Sleep Homeostasis and Behavioral Sensitivity to Alcohol by Reducing the Extracellular Accumulation of Adenosine'. *Journal of Neuroscience* 34 (5): 1879–91. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2870-12.2014>.

Fragmentation de sommeil



Hypnogram and corresponding stage proportions of fragmented sleep (top) and normal sleep (bottom).

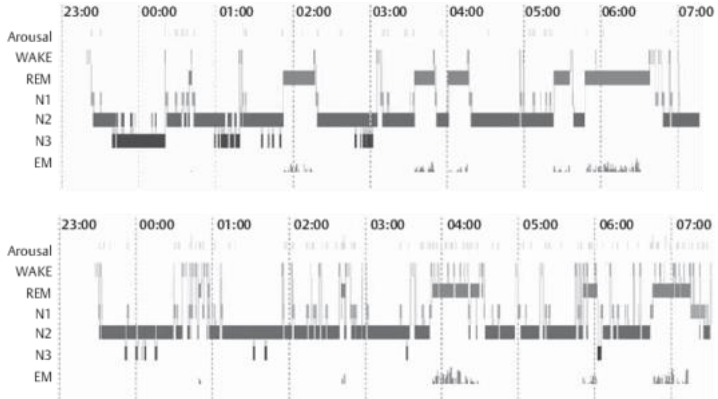
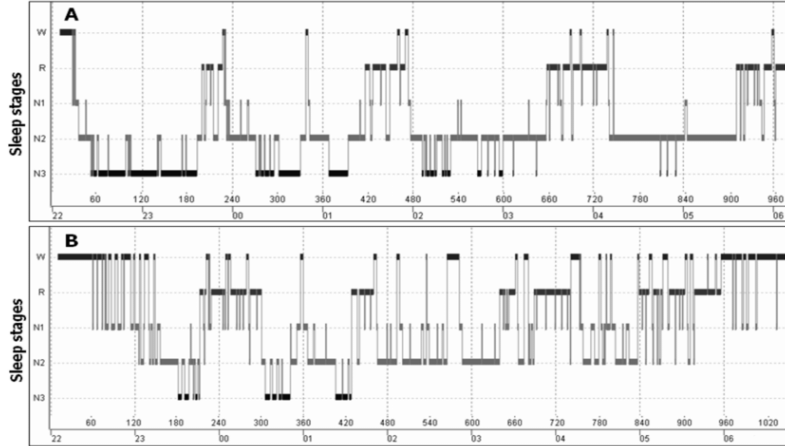
Stage proportions are the minutes in each stage normalized by total sleep time. REM: rapid eye movement sleep; SWS: slow wave sleep; WASO: wake after sleep onset.

Yetton, Benjamin D., Elizabeth A. McDevitt, Nicola Cellini, Christian Shelton, and Sara C. Mednick. 2018. 'Quantifying Sleep Architecture Dynamics and Individual Differences Using Big Data and Bayesian Networks'. *PLoS ONE* 13 (4): e0194604. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194604>.

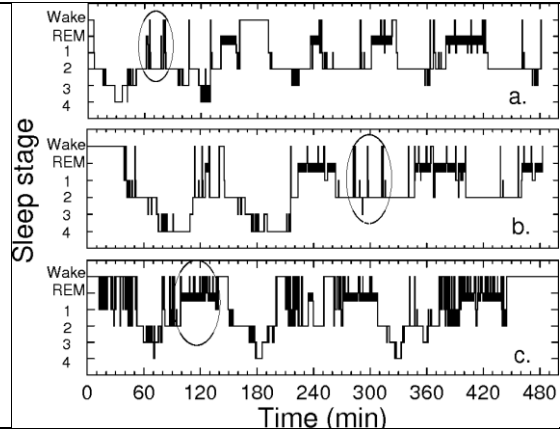
Le tableau 1 résume les différences principales entre un sommeil sain et un sommeil perturbé. Les principales formes de sommeil perturbé sont la privation, la restriction et la fragmentation de sommeil. La privation de sommeil, dans le sens total du terme, est un état d'éveil permanent. C'est considéré comme la forme la plus traumatisante de perturbation de sommeil. En effet, une privation de sommeil totale est délétère. Le record actuel de privation de sommeil est de 11 jours. Il existe également la restriction de sommeil (ou privation partielle de sommeil). Comme montré dans les résultats présentés à la ligne 3 du tableau 1, la restriction de sommeil se caractérise par une diminution de la durée de sommeil, du temps passé en REM (sommeil paradoxal) et NREM. La fragmentation de sommeil, ligne 4 du tableau, ne montre pas de différence significative dans le pourcentage de temps passé dans les différents stades de sommeil. Cependant les alternances entre sommeil léger et profond se passent de façon plus rapprochée que lors d'un sommeil sain.

Les perturbations et les interruptions de sommeil peuvent représenter ces trois conditions (privation, restriction et fragmentation de sommeil). Il est donc important de bien lire dans les articles scientifiques du domaine le protocole qui a été utilisé afin de déterminer si la recherche s'est focalisée sur une restriction, sur une privation ou sur une fragmentation de sommeil.

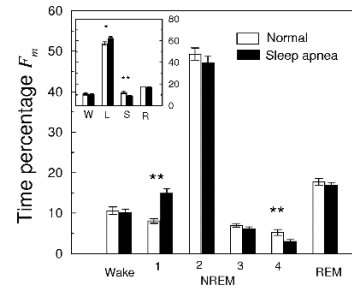
Tableau 2: Exemple de pathologies associées à de la fragmentation de sommeil chez l'Homme et leur impact sur l'architecture du sommeil. NREM : Non-rapid eye movement ; REM : rapid eye movement ; SWS : slow wave sleep.

Pathologie	Architecture sommeil	Quantité de sommeil	Auteurs
Insomnie	<p style="text-align: center;">Polysomnographic profile of a good sleeper (upper panel) and a patient with primary insomnia (lower panel)</p>  <p>Fig. 2 Comparison of the polysomnographic profiles of a good sleeper (upper panel) and an age- and gender-matched patient with chronic primary insomnia (lower panel). Both subjects were drug-free for at least 2 weeks. Please note the fragmented REM sleep periods, characterized by increased micro-arousals (according to ASDA, 1992) and wake periods throughout the night in the patient with insomnia.</p>	<p>↓ quantité de sommeil ↑ micro- et macro-arousals durant le sommeil REM</p>	(D. Riemann et al. 2012)
Dépression	 <p>A. sommeil sain B. sommeil d'une personne diagnostiquée en dépression</p>	<p>Perturbations de la continuité du sommeil ↑ du nombre et de la durée des éveils ↓ SWS Phases REM altérées</p>	(Wichniak, Wierzbicka, and Jernajczyk 2012)

Apnée du sommeil



a. et b. : patient sain
c. : patient souffrant d'apnée du sommeil



↑ nombre d'éveils
↓ SWS

(Lo et al. 2003)

Le tableau 2 montre trois pathologies dans lesquelles la fragmentation de sommeil fait partie du tableau clinique. Ces pathologies, associées à la fragmentation de sommeil, ont toutes pour point commun une augmentation du nombre d'éveils et d'une diminution du temps passé en phase SWS (sommeil profond) durant la période de sommeil. Elles diffèrent cependant au niveau de l'architecture de sommeil. Là où l'apnée du sommeil ne semble pas avoir de conséquences sur le temps passé en phase REM, la dépression et l'insomnie tendent à montrer une altération de la phase REM (qui correspond au sommeil paradoxal). Il semble donc que la définition de la fragmentation de sommeil soit dépendante du contexte dans lequel elle est étudiée. Cependant, à titre d'exemple, le degré de sévérité de l'apnée de sommeil peut être déterminée par le nombre de micro-éveils par heure. En effet, les praticiens utilisent la polysomnographie pour cela. Lorsque le nombre de micro-éveils est inférieur à 5 par heure, on considère que le patient est en bonne santé, entre 5 et 15, que l'apnée du sommeil est à un degré léger, entre 15 et 30, qu'elle est modérée, et supérieure à 30, qu'elle est sévère. Pour résumer, cela signifie qu'au-delà de 30 interruptions de sommeil par heure, soit 30 fragmentations de sommeil par heure, l'apnée du sommeil est considérée comme sévère. Pour supprimer ces épisodes de fragmentation de sommeil, les patients souffrants d'apnée du sommeil peuvent porter un masque CPAP (pression positive continue dans les voies aériennes) qui favorise une respiration régulière, empêchant l'obstruction des voies aériennes, évitant ainsi les microéveils. Dans le cadre de la dépression, la diminution du temps passé en sommeil REM est un signe de bon fonctionnement de l'antidépresseur (Dieter Riemann et al. 2020). En prenant ces deux exemples en considération, il semble important et nécessaire d'étudier en profondeur le sommeil des patients pour déterminer si la fragmentation de sommeil est présente, et si oui, si le traitement apporté est pertinent dans la diminution des épisodes de fragmentation de sommeil afin de soigner certains symptômes précoces.

Chapitre 2 : La fragmentation de sommeil

1. Définition physiologique

Comme dit précédemment, le sommeil est essentiel pour le métabolisme neuronal. Par conséquent, des perturbations du sommeil, telles que la fragmentation de sommeil, peuvent avoir des conséquences majeures sur le métabolisme neuronal et le fonctionnement cérébral durant la journée.

Les éveils (arousals en anglais) sont caractérisés par des interruptions abruptes et temporaires du sommeil, produisant des accélérations EEG avec des changements concomitants dans les fonctions physiologiques sous contrôle autonome telles que le cœur (M. H. Bonnet and Arand 1997), les activités vasculaires (pression sanguine) (Carrington and Trinder 2008a) et ventilatoires (Trinder et al. 2001), qui sont associées à une augmentation du tonus musculaire durant le sommeil REM (Berry et al., 2015). Contrairement à la restriction de sommeil, qui est une réduction de la quantité de sommeil, la fragmentation de sommeil est associée à des microéveils (qui durent entre 3-15sec), des éveils (durée>15sec) (Berry et al., 2015) et des phases d'activation transitoires (Sforza, Jouny, and Ibanez 2000). Ils sont caractérisés par une augmentation abrupte de l'activité EEG durant les phases d'activation transitoires, avec une augmentation du tonus musculaire et présence de tachycardie. Quelle que soit leur durée, tous ces changements EEG indiqueraient une activation corticale venant d'un stimulus excitateur généré par le système nerveux périphérique (somatosensoriel ou stimulations auditives) ou venant de structures du tronc cérébral (Sforza, Jouny, and Ibanez 2000). Par conséquent, les éveils et la fragmentation de sommeil marqués par des changements EEG, représentent une activation corticale transitoire et récurrente durant le sommeil. Cependant, les termes d'excitation « autonome » et « subcorticale » sont utilisés pour les paramètres cliniques et

expérimentaux pour identifier les évènements transitoires sans changements sur EEG (ou durant moins de 3 secondes) (Redolfi and Philippe 2014), mais associés à une réactivité cardiovasculaire (Chouchou et al. 2014). Finalement, en évaluation clinique, la fragmentation de sommeil est donc la conséquence de nombreuses pathologies telles que l'apnée/hypopnée obstructive du sommeil (Kimoff 1996), le bruxisme (Alóe 2009), et le syndrome de la jambe sans repos/ mouvements périodiques des membres inférieurs (Ting and Malhotra 2005). Récemment, des études ont montré un potentiel lien entre ces troubles du sommeil et l'installation des maladies neurodégénératives, dont la déficience cognitive légère (DCL) (Pak et al. 2020), Alzheimer (Pak et al. 2020; Brzecka et al. 2018) et Parkinson (Kutscher, Farshidpanah, and Claassen 2014). Cependant, cette dernière ne sera pas développée compte tenu de la complexité et la multiplicité des troubles du sommeil rencontrés dans cette pathologie (et pas uniquement la fragmentation).

Mais quelles sont les conséquences au niveau physiopathologique liées à cette fragmentation de sommeil ?

2. Retentissement cérébral associé à la fragmentation de sommeil

Une étude a montré que la fragmentation de sommeil avait un impact vasculaire (Carreras et al. 2014). Cependant, ce point ne sera pas développé dans le cadre de ma thèse puisque nous nous sommes concentrés sur les conséquences neurologiques de la fragmentation de sommeil.

2.1 Les pathologies neurodégénératives

Parmi les nombreux facteurs affectant l'apparition et la progression des maladies neurodégénératives, il a été démontré que les troubles du

sommeil jouent un rôle important dans les premiers stades de développement de ces troubles neurodégénératifs (Abbott and Videnovic 2016). Chez les patients atteints de DCL et de la maladie d'Alzheimer, le sommeil est très souvent perturbé, ce qui peut contribuer à des troubles cognitifs et à une somnolence diurne excessive (Peter-Derex et al. 2015). Ces troubles du sommeil sont similaires à ceux observés chez les personnes âgées normales, comme l'augmentation de la latence d'endormissement, la difficulté à maintenir le sommeil, les réveils fréquents la nuit et tôt le matin, mais ils sont exacerbés (Peter-Derex et al. 2015). Les patients atteints de la maladie de Parkinson semblent également souffrir de problèmes de sommeil d'un autre spectre : les troubles du comportement en phase de sommeil paradoxal, le syndrome des jambes sans repos, la perturbation du rythme circadien et comme dit précédemment, la fragmentation du sommeil (Sohail et al. 2017).

2.1.1 Déficience cognitive légère (DCL) et fragmentation de sommeil

On peut rencontrer plusieurs formes de pathologies neurodégénératives. La première dont nous allons parler est le déficit cognitif léger (DCL). Le DCL est une réduction acquise, significative et progressive des capacités dans un ou plusieurs domaines cognitifs. Ce déclin cognitif est persistant, non expliqué par une dépression ou des troubles psychotiques, et souvent associé à un changement de comportement, de personnalité (Boyer et al., 2016). On parle de DCL amnésique si le dysfonctionnement de la mémoire prédomine, et de DCL non-amnésique si d'autres caractéristiques cognitives, comme le langage par exemple, sont touchées et dominant le tableau clinique (Ronald C. Petersen et al. 2018). Les études épidémiologiques indiquent une large gamme de prévalence du DCL. En 2003, en Allemagne, Busse et al. ont trouvé une prévalence de 3% chez 929 personnes âgées de plus de 60 ans selon les critères de Peterson et al. (1999) (R. C. Petersen et al. 1999; Busse et al. 2003). En Finlande, la prévalence globale du DCL est de 5,3 % chez 806 personnes âgées de 60 à 76 ans, sur la base de tests neuropsychologiques et d'un entretien structuré

incluant les critères de « mild cognitive impairment » modifiés (Roberts and Knopman 2013). Aux Etats-Unis, l'incidence du DCL est de 28,3% chez 1315 participants âgés de plus de 65 ans, selon les critères de Peterson et al. (2001) pour tous les sous-types de DCL (Manly et al. 2005; R. C. Petersen et al. 2001). Pour la même tranche d'âge en France, sur 6892 participants, l'incidence du DCL est d'environ 42% en utilisant le MCI-R (Artero et al. 2008). Ces données convergent vers une prévalence du DCL de 3 à 42 % chez les personnes âgées de plus de 65 ans.

Certaines études traitent de la DCL et des troubles du sommeil (Pak et al. 2020; Palmer et al. 2018). Palmer et al. ont travaillé sur 141 personnes âgées de plus de 52 ans dont 69 personnes atteintes de DCL et 72 témoins en bonne santé cognitive appariés par le sexe. Les comportements de sommeil ont été évalués pendant l'évaluation clinique à l'aide de l'échelle SCADS (sleep continuity scale in Alzheimer disease). Cette échelle comprend neuf questions autorapportées concernant la durée et la qualité du sommeil, les réveils pendant la nuit et les difficultés à s'endormir. Il y a 4 réponses possibles. Le score 1 indique qu'il n'y a pas de problème et le score 4 qu'il est très mauvais. Leur étude a démontré que les personnes atteintes de DCL sont plus de trois fois plus susceptibles d'avoir un mauvais sommeil général que les témoins. Il est intéressant de noter que le seul symptôme spécifiquement lié au DCL est le réveil pendant la nuit. Cela confirme que les perturbations se produisent dans les phases prodromiques de la maladie d'Alzheimer, ce qui permettrait de prédire la démence ultérieure (Palmer et al. 2018).

2.1.2 La maladie d'Alzheimer et la fragmentation de sommeil

La maladie d'Alzheimer est la forme la plus courante de maladie neurodégénérative (Weller and Budson 2018) représentant 80 % des diagnostics de démence (Weller and Budson 2018). Le principal symptôme de cette maladie est la perte progressive de la capacité de mémoire. D'autres symptômes connus sont des changements d'humeur, d'anxiété et

des troubles du sommeil (avec une fragmentation accrue du rythme global veille-sommeil, une augmentation du sommeil pendant la journée, une fréquence accrue des réveils nocturnes et une diminution du sommeil lent et du sommeil paradoxal) (Atri 2019; Abbott and Videnovic 2016). La progression de la maladie entraîne une confusion et une altération du jugement, et se termine par des changements comportementaux majeurs et des symptômes neuropsychiatriques (délires et hallucinations) (Atri 2019). Il y a 35 millions de patients atteints de la maladie d'Alzheimer dans le monde. Aux États-Unis, 10 % des personnes âgées de 65 ans ou plus souffrent de la maladie d'Alzheimer, ce qui représente 5,6 millions de patients (Hebert et al. 2003). C'est la sixième cause de décès aux États-Unis. En 2004, en France, le nombre estimé de personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer était de 850000 (Helmer, Pasquier, and Dartigues 2006). Elle atteint un pic d'incidence à 80 ans avec 15%. Ces chiffres progresseront pour atteindre environ 2 millions en 2040 (Helmer, Pasquier, and Dartigues 2006).

Au cours de la dernière décennie, certaines études ont porté sur la relation entre la fragmentation de sommeil et la maladie d'Alzheimer (Lim et al. 2013; Vanderheyden et al. 2018). Lim et al. ont inclus 737 participants sans démence dans une étude longitudinale. Tous les participants ont été soumis à un accéléromètre de type montre-bracelet comme actigraphe pendant 10 jours. Pour quantifier la fragmentation de sommeil, ils ont utilisé une approche probabiliste de transition d'état récemment développée qui produit une seule métrique : k_{RA} . En bref, k_{RA} représente la probabilité, par tranche de 15 secondes, d'avoir une excitation, indiquée par un mouvement (c'est-à-dire un compte d'activité non nul), après une longue (~5 min) période de repos (c'est-à-dire de sommeil). Plus le k_{RA} est élevé, plus les épisodes de sommeil/repos se terminent rapidement par des éveils et donc plus le degré de fragmentation du sommeil est important (Lim et al. 2013). Pour déterminer si le sujet était atteint de la maladie d'Alzheimer, ils ont utilisé les critères NINDS-ADRDA (qui spécifient huit domaines cognitifs

pouvant être altérés dans la maladie d'Alzheimer : mémoire, langage, capacités perceptives, attention, capacités constructives, orientation, résolution de problèmes et capacités fonctionnelles). Un peu plus de trois ans après la construction de la cohorte, 13% des personnes ont développé une maladie d'Alzheimer. On s'attend à ce que les personnes ayant une fragmentation de sommeil "élevée" aient un risque 1,5 fois plus élevé de développer la maladie d'Alzheimer qu'une personne ayant une fragmentation de sommeil "faible". En conclusion, les chercheurs ont constaté qu'une mesure objective d'un niveau élevé de fragmentation de sommeil était associée à un risque plus élevé de développer ultérieurement la maladie d'Alzheimer. Cette étude soulève la possibilité que les interventions visant à améliorer la continuité du sommeil pourraient offrir une stratégie potentiellement utile pour réduire le poids des troubles cognitifs et de la démence chez les personnes âgées (Lim et al. 2013).

2.1.3 La maladie de Parkinson et la fragmentation de sommeil

La maladie de Parkinson (MP) est la deuxième maladie neurodégénérative la plus fréquente (Poewe et al. 2017). Cette pathologie touche 1/1000 de la population mondiale et 1% de la population de plus de 60 ans (Tysnes and Storstein 2017). Pendant longtemps, il y avait quatre signes cardinaux de la MP : le tremblement (plus important au repos), la rigidité, la bradykinésie/ akinésie et l'instabilité posturale (Tysnes and Storstein 2017; Balestrino and Schapira 2020). Ce dernier point a été écarté lorsque les critères de diagnostic clinique de la MP ont été révisés. Désormais, le diagnostic de "MP cliniquement établie" requiert au moins deux critères de soutien, l'absence de critères d'exclusion absolus et aucun drapeau rouge. Tous ces critères sont résumés dans Tysnes et Storstein, 2017. Comme expliqué dans l'introduction de ce chapitre, nous avons décidé d'écarter la maladie de Parkinson de la thèse puisque la complexité des mécanismes liés à cette pathologie écarte tout travail sur les effets de la fragmentation de sommeil pure.

La Figure 5 résume les conséquences métaboliques, inflammatoires et neuronales de la fragmentation de sommeil et du lien potentiel avec les pathologies neurodégénératives.

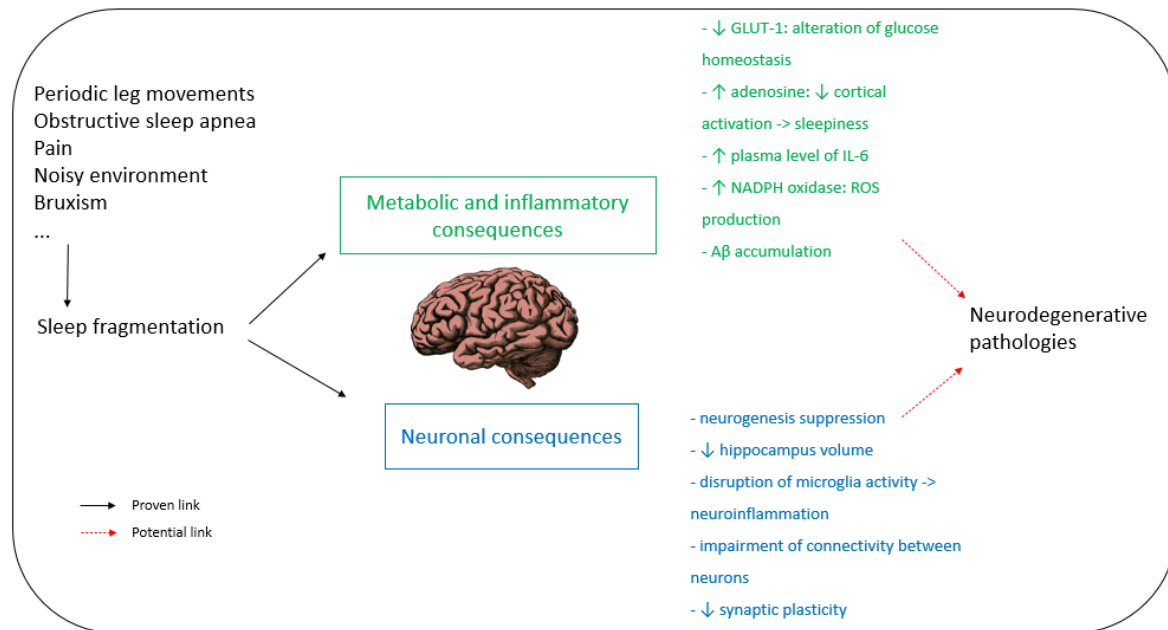


Figure 5: Metabolic, inflammatory and neuronal consequences of sleep fragmentation and the potential link with neurodegenerative diseases. Aβ: amyloid β; GLUT-1: glucose transporter 1; IL-6: interleukin-6; NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; ROS: reactive oxygen species.

Afin d'étudier les conséquences cérébrales de la fragmentation du sommeil, nous avons décidé de travailler sur la neuroinflammation.

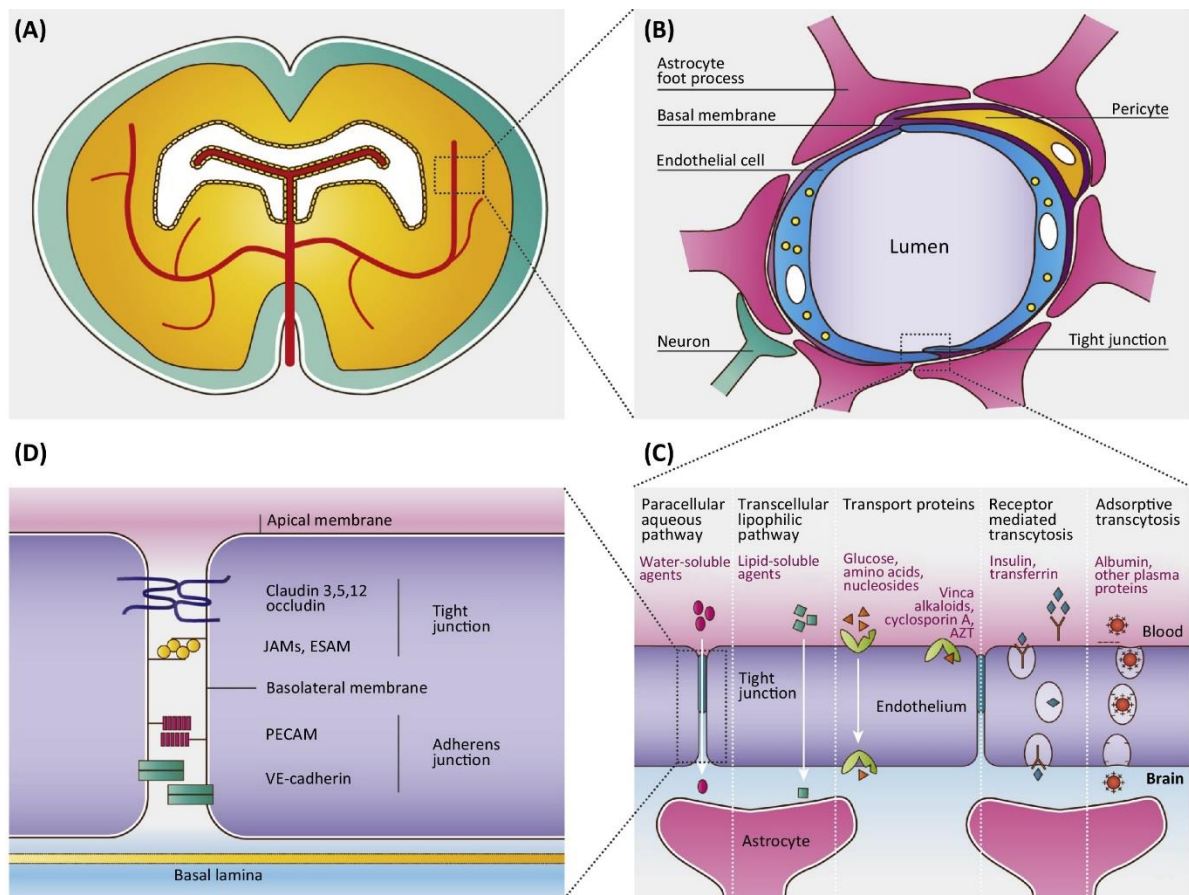
2.2 Neuroinflammation

2.2.1 La BHE

La barrière hémato-encéphalique (BHE) est une interface active entre la circulation sanguine et le système nerveux central (SNC) qui restreint le mouvement libre de différentes substances entre ces deux compartiments et joue un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie du SNC. La BHE a un double rôle : barrière et transport (Wilhelm, Fazakas, and Krizbai 2011). La fonction barrière signifie que la BHE restreint le transport de substances potentiellement toxique et dangereuse du sang vers le cerveau. En plus de cette fonction barrière, elle possède une fonction de transport qui permet le transport de nutriments vers le cerveau et l'élimination de métabolites.

Les petites molécules lipidiques solubles et les gaz sanguins tels que l'oxygène et le dioxyde de carbone diffusent passivement à travers le BHE, tandis que les nutriments essentiels tels que le glucose et acides aminés requièrent des protéines de transport spécifiques (transporteurs de soluté, ABC transporteur, SLC transporteurs) afin d'arriver au cerveau (Wilhelm, Fazakas, and Krizbai 2011).

La perméabilité sélective de la BHE joue un rôle important. Cependant, il y a beaucoup de pathologies neurologiques comme l'ischémie, les traumatismes crâniens, des tumeurs, des pathologies neurodégénératives qui augmentent la perméabilité de la BHE (Weiss et al. 2009; Wilhelm, Fazakas, and Krizbai 2011).



Trends in Biotechnology

Figure 6: Structure et fonction de la BHE. A : barrière cérébrale. B : structure de la BHE. C : transporteurs de la BHE. D : jonctions serrées. D'après Aday et al. 2016.

La BHE est composée de plusieurs types cellulaires au niveau cérébral (astrocytes, péricytes, neurones) et au niveau vasculaire (cellules endothéliales) (Figure 6). Chacune a son rôle à jouer pour maintenir l'homéostasie du cerveau. On dit que l'ensemble forme l'unité neurovasculaire (Figure 6B). Les protéines de jonctions serrées (Figure 6D) limitent fortement la pénétration des composés hydrosolubles dans le cerveau et permettent donc une régulation très fine des transports entre sang et cerveau (Aday et al. 2016).

2.2.1.1 Protéines de jonctions serrées et adhérentes

Les jonctions entre cellules endothéliales présentent un réseau particulièrement complexe de protéines d'adhésion qui sont liées à des partenaires intracellulaires du cytosquelette et de la signalisation. Ces protéines sont organisées en structures distinctes appelées jonctions serrées et jonctions adhérentes (Dejana, Orsenigo, and Lampugnani 2008).

Ne seront développées dans cette partie que les protéines étudiées lors de ma thèse.

Claudine-5

Le mot claudine vient du latin « *claudere* » qui signifie fermer. Par recherche dans une base de données et de clonage ADNc et génomique, la famille des claudines s'étend à 24 membres (González-Mariscal et al. 2003). Les claudines font entre 20 et 27 kDa avec 4 domaines transmembranaires, 2 boucles extracellulaires où la première est plus longue que la deuxième, et une petite queue intracellulaire carboxylique (González-Mariscal et al. 2003) (Figure 7). La claudine 5 (également connue sous le nom de protéine transmembranaire absente dans le syndrome velo-cardio-facial TMVCF) joue un rôle clé dans la barrière paracellulaire aux petites molécules. La transfection de claudine-5 dans des cellules Caco-2 a contribué à la fonction barrière. L'expression exogène de la claudine-5 dans les cultures de cellules endothéliales cérébrales de rats réduisait la perméabilité à l'insuline.

L'utilisation des animaux knockouts (KO) a révélé que la claudine-5 a des propriétés de sélection de taille. Des souris claudine-5 KO ont permis une extravasation des traceurs avec des poids moléculaires inférieurs à 800Da du compartiment intravasculaire. Cependant, la barrière est restée imperméable à la microperoxidase (1.9kDa). Toutes les souris KO en claudine-5 sont mortes dans les 10h suivant la naissance. Malgré cela, la jonction serrée est restée intacte dans les souris KO. L'exposition des souris hétérozygotes en claudine-5 à de faibles doses de radiation ultraviolette a révélé une inflammation de la peau exacerbée et des fuites des vaisseaux lymphatiques. Le double KO de claudine-5 avec de l'occludine facilite l'augmentation de la perméabilité des traceurs moléculaires entre 3 et 10kDa (Greene, Hanley, and Campbell 2019).

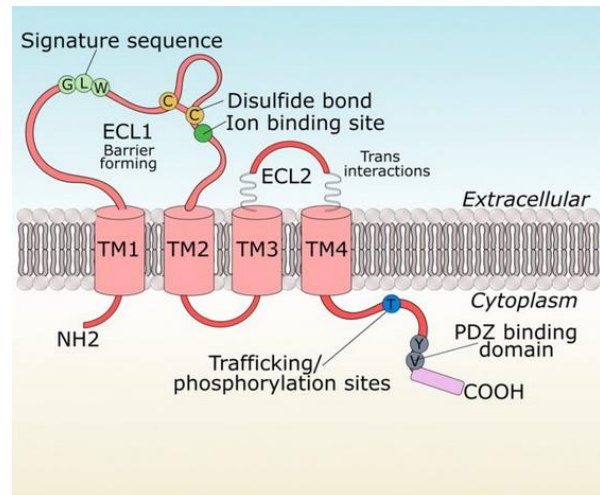


Figure 7: Structure de la claudine-5 d'après Greene et al. (Greene, Hanley, and Campbell 2019)

Occludine

L'occludine est une protéine de 58 à 75 kDa. C'est une protéine comprenant 3 domaines cytoplasmiques, 4 domaines transmembranaires ainsi que des terminaisons N et C intracellulaires (Feldman, Mullin, and Ryan 2005) (Figure 8). Il a été observé que la concentration en occludine dans le cerveau augmentait avec le temps. La protéine est faiblement exprimée dans les cellules endothéliales cérébrales de rats âgés de 8 jours comparés à celles de rats de 70 jours. Il a été suggéré que l'occludine pouvait servir de marqueur sensible et consistant des protéines de jonction à la BHE (Feldman, Mullin, and Ryan 2005). Il a été montré que la terminaison étendue était essentielle aux interactions avec ZO-1, qui module son trafic intracellulaire vers la membrane plasmique du site des jonctions serrées.

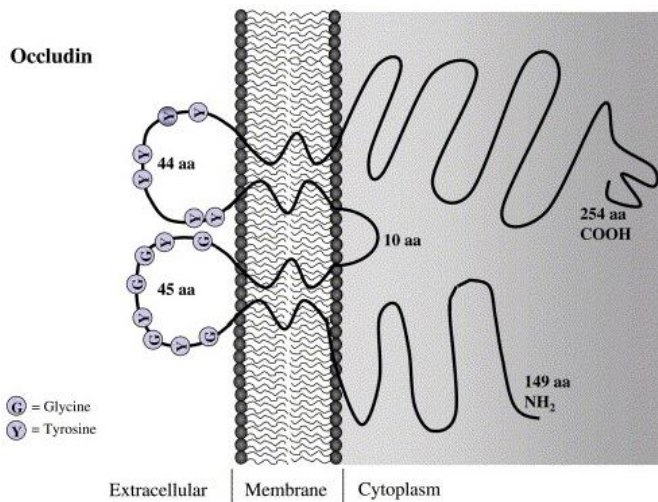


Figure 8: Structure de l'occludine d'après Feldman et al. (Feldman, Mullin, and Ryan 2005)

Des investigations ont aussi confirmé son rôle dans la stabilité des jonctions serrées grâce aux boucles extracellulaires et au moins un domaine transmembranaire. D'autres preuves pointent aussi une possible copolymérisation de l'occludine avec claudine(s) pour une bonne stabilisation des brins des jonctions serrées

(Cummins 2012).

Zonula occludens -1 (ZO-1)

ZO-1 est une protéine de 210-255 kDa trouvée dans les domaines sous-membranaires des jonctions serrées dans l'épithélium et l'endothélium (González-Mariscal et al. 2003). Elle peut donc se lier à la claudine et à l'occludine notamment. Son extrémité C-terminale est reliée au cytosquelette permettant de contrôler la perméabilité endothéliale (Fanning et al. 1998).

Chez la drosophile, un homologue de ZO-1 appelé Tamou, est impliqué dans la voie cellulaire qui active l'expression du gène répresseur *emc* qui participe au développement neuronal (Takahisa et al. 1996).

VE-cadhérine

Contrairement à la claudine-5, l'occludine et ZO-1 vus précédemment, la VE-cadhérine est une protéine de jonctions adhérentes (Figure 9). Quel que soit le mécanisme d'action, l'association de la VE-cadhérine avec les caténines est certainement nécessaire au contrôle cellulaire complet de la

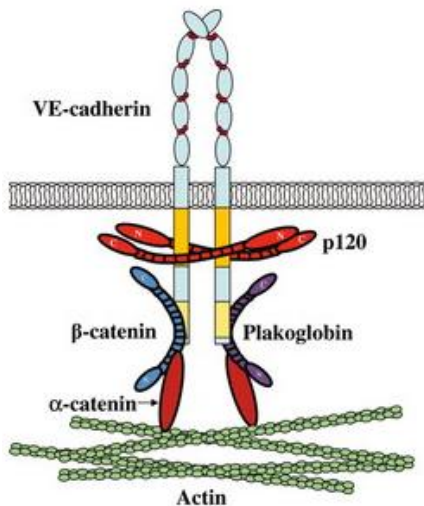


Figure 9: Structure de la VE-cadhérine d'après Vincent et al. (Vincent et al. 2004).

perméabilité endothéliale et de la stabilisation de la jonction. Une forme mutante de VE-cadhérine qui est tronquée dans le domaine responsable de la liaison à la β -caténine ou à la plakoglobine forme toujours des structures intercellulaires de type fermeture éclair par le regroupement latéral du domaine extracellulaire, mais la force des jonctions est fortement diminuée (Navarro et al. 1995). Il est important de noter que l'induction d'une mutation similaire de la VE-cadhérine chez la souris entraîne une létalité fœtale due à des altérations majeures du remodelage vasculaire ;

cet effet est comparable à ceux provoqués par l'inactivation du gène entier (Carmeliet et al. 1999). Chez la souris adulte, une indication de l'importance de la VE-cadhérine dans le maintien de l'intégrité vasculaire est l'observation que l'administration d'anticorps anti-VE-cadhérine conduit à une augmentation dramatique de la perméabilité, de la fragilité vasculaire et des hémorragies (Dejana, Orsenigo, and Lampugnani 2008; Corada et al. 1999).

Nous avons dit précédemment que l'environnement cellulaire de la BHE était important. En effet, il permet de maintenir l'homéostasie cérébrale. Nous allons ici décrire deux des cellules faisant partie de la glie : la microglie et les astrocytes (Figure 10).

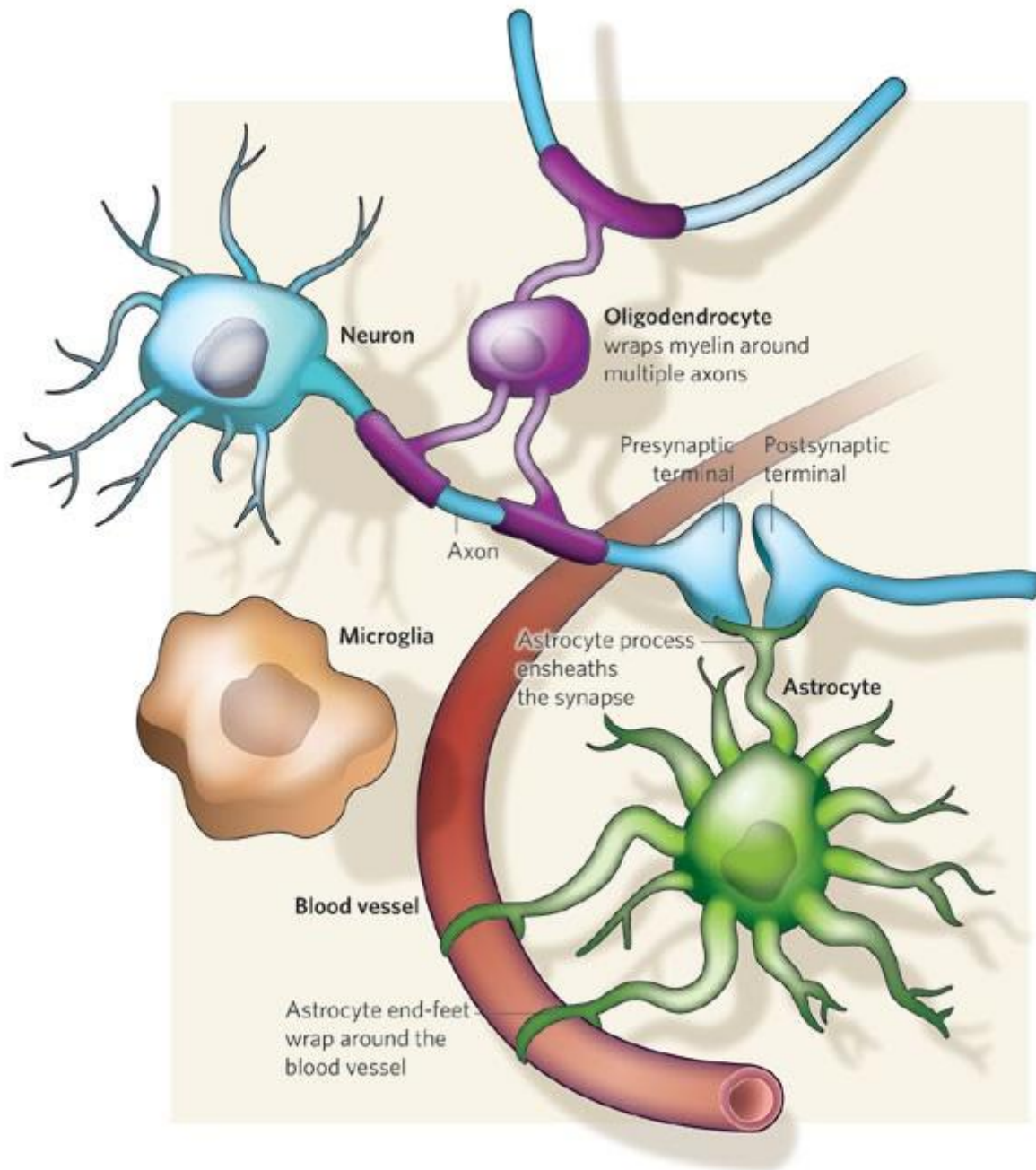


Figure 10: Différents types d'interaction de la glie (astrocytes, microglie, et oligodendrocytes) avec des neurones ou entourant un vaisseau sanguin. D'après (Allen and Barres 2009).

2.2.1.2 Microglie

Kaneshwaran et al. (2019) ont travaillé sur l'effet de la fragmentation de sommeil sur la microglie chez les personnes âgées (Kaneshwaran et al. 2019). La microglie est reconnue comme étant la résidence des cellules immunitaires innées du système nerveux central (Kaneshwaran et al.

2019). L'un de leurs rôles est la phagocytose des débris apoptotiques qui sont activés lors d'une inflammation (Tremblay et al. 2011). Ils ont quantifié la fragmentation de sommeil par actigraphie et l'expression génétique du cortex préfrontal dorsolatéral post mortem par séquençage de l'ARN pour déterminer l'activation de la microglie. Ils ont observé que la fragmentation de sommeil active la microglie. Ils ont suggéré que les dysfonctionnements de la microglie pourraient avoir un lien avec la fragmentation de sommeil, le déclin cognitif et la démence chez les personnes âgées, lié à cette perturbation de l'activité microgliale (Kaneshwaran et al. 2019). Dans une autre étude, des souris ont été soumises à de la fragmentation de sommeil chronique pendant 2 mois (Y. Xie et al. 2020). Les auteurs ont utilisé deux marqueurs, parmi d'autres, de l'activation de la microglie: Iba⁺, qui est un marqueur de la microglie (plus l'activation microgliale est importante, plus l'expression d'Iba⁺ est élevée) ; et CD68, un marqueur de phagocytose. Ce dernier était surexprimé dans l'hippocampe des souris soumises à la fragmentation de sommeil chronique. Ce marqueur était exprimé dans les microglies activées. Ils ont observé qu'il y avait plus d'Iba⁺ et de CD68 dans l'hippocampe des souris ayant subi une fragmentation de sommeil chronique et ont conclu que l'hippocampe est plus vulnérable à la neuroinflammation que les zones du cortex chez les souris ayant eu 2 mois de fragmentation de sommeil (Y. Xie et al. 2020).

Les astrocytes

Les astrocytes sont les cellules les plus communes du cerveau. Elles forment une unité appelée la glie avec les oligodendrocytes et la microglie (Cabezas *et al.*, 2014). Leur bouton terminal (endfeet en anglais) enveloppe la synapse neuronale permettant la modulation à la fois de l'activité neuronale et du flux sanguin cérébral suivant une élévation du Ca²⁺ intracellulaire de cet endfeet. Les astrocytes expriment des molécules très spécialisées telles que les aquaporines 4, permettant la régulation ionique au sein de la BHE, mais également des transporteurs tels que les transporteurs de glucose par exemple (GLUT-1). De plus, les astrocytes jouent un rôle important dans le

développement et l'entretien des caractéristiques de la BHE dans les cellules endothéliales à travers la libération de facteur de croissance comme VEGF, glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), basic fibroblast growth factor (bFGF) et ANG-1 (Alvarez, Katayama, and Prat 2013).

Il existe de nombreux transporteurs au sein de la BHE (Figure 4C), mais nous avons décidé de nous concentrer sur l'aquaporine 4.

2.2.1.3 L'aquaporine 4

En 1992, Agre et ses collègues (Preston et al. 1992) ont découvert que les globules rouges contiennent une protéine membranaire qui leur confère une grande perméabilité à l'eau. Cette protéine, appelée par la suite aquaporine-1 (AQP1), s'est avérée être un membre d'une grande famille de protéines de canaux d'eau qui permettent le transport bidirectionnel de l'eau à travers la bicouche phospholipidique de la membrane plasmique (King, Kozono, and Agre 2004). L'AQP4 a été immunolocalisée aux épendymocytes et aux astrocytes dans tout le cerveau. Les données accumulées suggèrent que l'AQP4 est impliquée dans le contrôle des changements de volume extracellulaire de base et dynamiques (Nagelhus and Ottersen 2013).

Les rôles physiologiques de l'AQP4 se sont révélés nombreux et divers. Les données les plus solides sont celles qui mettent en évidence un rôle de l'AQP4 dans la clairance du liquide interstitiel du système nerveux central (Nagelhus and Ottersen 2013). Les récentes données montrant un retard dans la clairance des peptides amyloïdes et du mannitol appliqués par voie intracérébrale chez les souris *Aqp4^{-/-}* témoignent de cette dernière fonction (Iloff et al. 2012).

Nous avons décidé de nous intéresser à l'étude de l'AQP4 dans le cadre de ma thèse, car il est noté dans les études que l'expression sérique d'AQP4 était diminuée chez les patients avec une insomnie chronique (Yang et al. 2022). D'autres travaux du laboratoire ont été faits sur cette molécule dans

la cadre de l'hypoxie intermittente (une composante de l'apnée du sommeil) et nous voulions déterminer si l'AQP4 est un marqueur d'intérêt dans le cadre de la fragmentation de sommeil (deuxième composante de l'apnée du sommeil).

Après avoir déterminé l'impact de la fragmentation du sommeil sur la glie, il était intéressant si des processus inflammatoires cérébraux se mettaient en place.

2.2.2 Inflammation : les interleukines

Les interleukines (IL) sont des facteurs solubles qui stimulent les activités liées à la croissance des leucocytes ainsi que d'autres types de cellules. Ils favorisent la prolifération et la différenciation cellulaires, la synthèse de l'ADN, la sécrétion d'autres molécules biologiquement actives et les réponses aux stimuli immunitaires et inflammatoires (d'après la définition MeSH - Medical Subject Headings - PubMed).

La plus connue, et certainement la plus étudiée, est l'IL-6. Cette IL pro-inflammatoire joue un rôle important dans l'homéostasie du cerveau. Des niveaux élevés d'IL-6 sont liés à une fatigue et une somnolence excessive durant la journée. De même chez les insomniaques, les perturbations du sommeil provoquent une augmentation des concentrations en IL-6 (Hong et al. 2005). D'autre part, une surproduction d'IL-6 dans le cerveau pourrait être une prémisse de la neurodégénérescence.

La fragmentation de sommeil à long terme chez la souris induit une augmentation du taux plasmatique d'IL-6 (Carreras et al. 2014). Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus chez des enfants souffrant de troubles respiratoires du sommeil modérés à sévères (Tauman, O'Brien, and Gozal 2007). Le même résultat a été observé dans la maladie d'Alzheimer et Parkinson, notamment le taux d'IL-6 dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) qui apparaît élevé (Erta, Quintana, and Hidalgo 2012). En outre, l'IL-1 β , une autre cytokine pro-inflammatoire, et l'IL-6 sont des cytokines dont

la surproduction peut entraîner une neuroinflammation. Des taux sanguins élevés de ces cytokines au milieu de la vie prédisent un déclin cognitif 10 ans plus tard (Blum-Degen et al. 1995).

Comme ces résultats convergent, nous avons décidé d'étudier une IL proinflammatoire connue pour avoir un rôle dans l'immunité et dans les maladies neurologiques (maladie d'Alzheimer, sclérose en plaques, ...) (Figure 11).

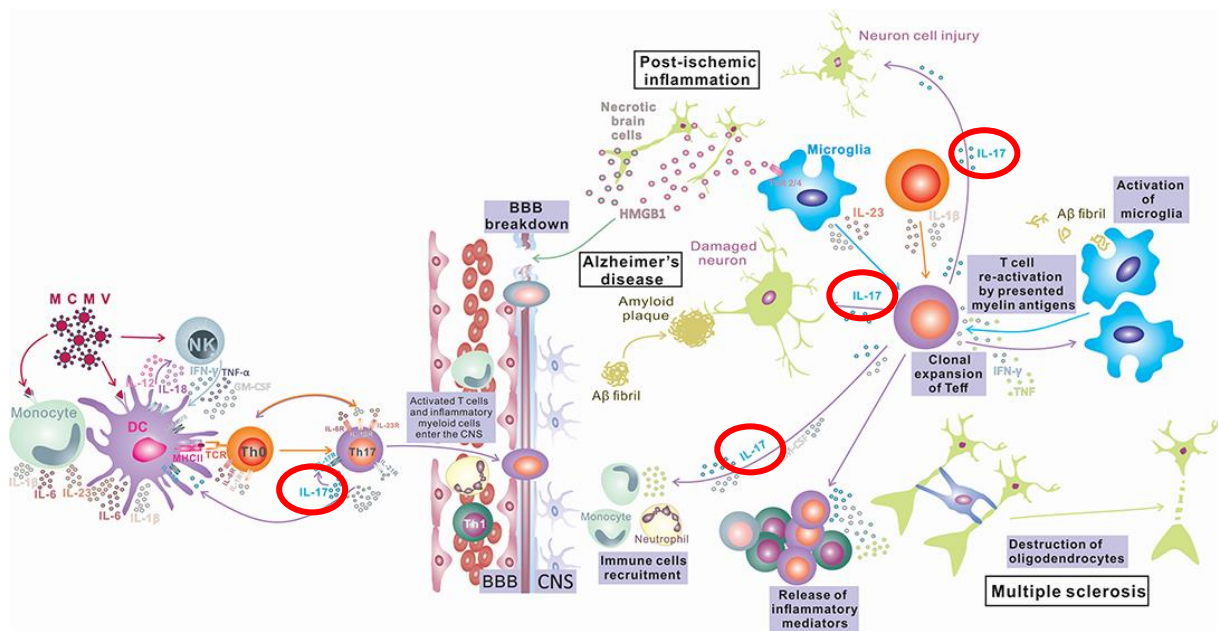


Figure 11: Role de l'IL-17 (entouré en rouge) dans les pathologies inflammatoires du système nerveux central. D'après (Milovanovic et al. 2020).

Cependant, elle n'a pas été étudiée, à notre connaissance, dans un contexte de fragmentation de sommeil pure : l'IL-17. Une étude portant sur la privation de sommeil a montré une augmentation de l'expression d'IL-17A et F dans l'hippocampe. Leurs résultats suggèrent que la privation de sommeil paradoxal aiguë supprime la prolifération des cellules progénitrices neurales de l'hippocampe chez les adultes par un mécanisme impliquant, entre autres, l'IL-17 (Cui et al. 2019). De plus, en lien avec la glie, des auteurs ont également prouvé le rôle important de l'IL-17 au niveau astrocytaire (Ma et al. 2010). En effet, ils ont trouvé que l'IL-17 renforce une boucle de rétroaction positive de l'expression de l'IL-6. Les fonctions de l'IL-17 sont particulièrement étudiées dans le contexte de patients atteints

de sclérose en plaques. L'ARNm et les protéines de l'IL-17 sont augmentés à la fois dans les lésions cérébrales et dans les cellules mononucléaires isolées du sang et du LCR (Ma et al. 2010).

En parallèle de l'étude de l'inflammation, la neuroinflammation a été étudiée à travers Tau et les β -amyloïdes.

2.2.3 Neuroinflammation

2.2.3.1 Protéine Tau

La protéine Tau est une protéine cytoplasmique abondante associée aux microtubules dans les neurones (Buée et al. 2000). Dans les maladies appelées tauopathies, qui comprennent des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer, la protéine Tau est hyperphosphorylée et s'agrège dans des structures telles que les enchevêtrements neurofibrillaires. L'agrégation de la protéine Tau dans le cerveau est corrélée à la perte neuronale et synaptique. Il a été démontré qu'une fois que l'agrégation de la protéine Tau se produit, elle peut se propager d'une région synaptiquement connectée à une autre (Clavaguera et al. 2009; Iba et al. 2013; de Calignon et al. 2012; Liu et al. 2012). La protéine Tau se trouve principalement dans le cytoplasme, car elle est libérée par les neurones dans l'espace extracellulaire. Il n'y a pas beaucoup d'études mettant en relation la fragmentation de sommeil et Tau. Dans une étude, les auteurs ont travaillé sur des souris AD (Alzheimer's Disease) doublement transgéniques et leur type sauvage, répartis aléatoirement sur trois groupes de souris : contrôle, hypoxie intermittente et sommeil fragmenté (SF). Ils n'ont trouvé qu'un seul résultat significatif avec tau : l'hyperphosphorylation de tau dans l'hippocampe était significativement plus élevée dans le groupe SF de type sauvage par rapport au groupe témoin de type sauvage (Almendros et al. 2018).

2.2.3.2 β -amyloïde ($A\beta$)

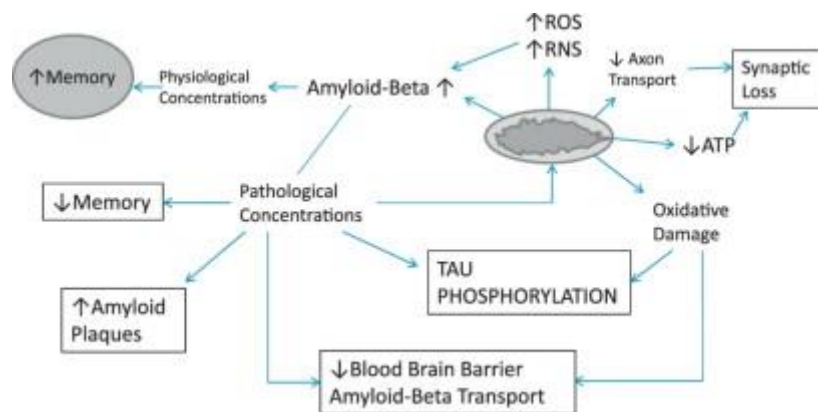


Figure 12: rôles physiologiques et pathologiques des β -amyloïdes. D'après (Morley and Farr 2014).

Le B-amyloïde ($A\beta$) est un peptide produit par la transformation protéolytique d'une protéine transmembranaire, la protéine précurseur amyloïde (APP), par les β - et γ -sécrétases. Ses rôles physiologiques et pathologiques sont résumés dans la Figure 12. Il est connu que l'accumulation d' $A\beta$ et la mauvaise qualité du sommeil, comme la privation de sommeil, est fortement corrélée (C. Wang and Holtzman 2020). Un sommeil perturbé et un temps d'éveil intra-sommeil accru entraînent une augmentation de la production d' $A\beta$ et une diminution de la clairance d' $A\beta$, tandis que l'agrégation et le dépôt d' $A\beta$ sont renforcés par un temps d'éveil augmenté de manière chronique dans des modèles animaux. Une fois que l' $A\beta$ s'accumule, il est prouvé, tant chez la souris que chez l'homme, que ces modifications cérébrales contribuent à leur tour à la perturbation du sommeil. L'agrégation d' $A\beta$ peut être constatée près de 15 à 20 ans avant les premiers symptômes cognitifs de la maladie d'Alzheimer (Holtzman, Morris, and Goate 2011). La modification du sommeil peut commencer au stade préclinique de la maladie d'Alzheimer et constitue un facteur de risque prédictif de la neurodégénérescence et du développement du déclin cognitif. Le rôle de la qualité du sommeil dans la pathogenèse amyloïde a été bien documenté par des études sur la privation de sommeil chez l'homme et les modèles animaux. Cependant, seules quelques études décrivent la relation entre la fragmentation de sommeil et l' $A\beta$. Duncan et al. (2022) ont travaillé sur un modèle de souris de la maladie d'Alzheimer : la souris 3xTg-AD

(Duncan et al. 2022). Ils ont travaillé sur un groupe contrôle et un groupe avec un sommeil fragmenté 5 jours par semaine pendant 4 semaines en utilisant une cage avec une barre de balayage. Ils ont trouvé des niveaux hippocampiques d'A β 40 et A β 42 plus élevés pour le groupe sommeil fragmenté que pour le groupe contrôle. De manière surprenante, ils n'ont pas trouvé de différence dans le niveau de Tau hippocampique entre les deux groupes. Une autre équipe, Minakawa et al. ont montré une corrélation positive significative entre l'accumulation d'A β et la sévérité de la fragmentation de sommeil dans un modèle de souris (Minakawa et al. 2017).

En conclusion, la relation entre la perturbation du sommeil ou du rythme veille/sommeil et le dépôt d'A β s'avère bidirectionnelle. Les modifications de la régulation veille-sommeil augmentent l'accumulation d'A β , et les dépôts d'A β provoquent des troubles du sommeil chez l'Homme. Dans un modèle murin d'amyloïdose A β , les auteurs ont constaté qu'une détérioration significative de la quantité et de la qualité du sommeil suivait de près l'émergence des agrégats A β . Cette constatation était corrélée à la progression de la pathologie A β (C. Wang and Holtzman 2020).

Afin de pouvoir étudier les conséquences de la fragmentation de sommeil, il est nécessaire de travailler sur modèles animaux. De la mouche à l'Homme, il est important de bien choisir son modèle. Ceux-ci permettent d'évaluer l'impact sur la mémoire grâce à des tests de mémoire. Ils permettent également d'évaluer si le protocole induit une modification dans la communication à travers l'étude des vocalisations.

Chapitre 3 : Modèles animaux

1 . Modèles d'étude dans la littérature

L'étude de la fragmentation du sommeil remonte aux années 1980. Depuis, les méthodes et les techniques n'ont cessé de progresser. Je vais décrire dans cette partie différents modèles d'induction de la fragmentation de sommeil proposés sur différents modèles animaux.

1.1 La drosophile

Nous n'avons trouvé qu'une seule étude où la fragmentation de sommeil a été **induite** sur un modèle de mouche (Williams et al. 2016) en utilisant une ampoule à spectre complet à 600 lux 30 minutes par heure, une fois par heure, pendant les 12h de nuit de la mouche. Un groupe a été fragmenté pendant 4 nuits. Un autre groupe a été fragmenté pendant 4 nuits avec une période de récupération de 4 jours. Ils ont utilisé 90 mouches pour chaque groupe. Le sommeil total, la durée moyenne du sommeil et les périodes moyennes de sommeil ont été calculés sur la base de la définition standard du sommeil comme une période de 5 minutes ou plus d'inactivité (Williams et al. 2016).

Une étude a également montré que la fragmentation de sommeil semble être une conséquence du vieillissement (Vienne et al. 2016). Ils ont voulu faire un parallèle avec l'Homme. Ils ont comparé le sommeil de mouches jeunes, d'âge moyen et des mouches âgées avec deux génotypes différents, w1118 et Canton S. Les deux souches ont montré une diminution significative de la durée du sommeil (sommeil total) et une augmentation de la fragmentation du sommeil en fonction de l'âge. Ils ont également constaté une différence entre les deux génotypes.

Les mouches à fruits ont un système nerveux développé et présentent des comportements complexes tels que l'apprentissage et la mémoire, ce qui

en fait des modèles solides pour étudier le sommeil et ses conséquences neuronales (Chan and Bonini 2000). De plus, il est facile de travailler sur des individus âgés, car leur durée de vie est courte (2-3 mois) et il n'est pas coûteux de travailler sur ce modèle (Sun et al. 2013). Cependant, il est difficile de rapprocher la physiologie de la mouche à celle de l'Homme. Phylogénétiquement, ces deux espèces restent éloignées l'une de l'autre.

Pour se rapprocher de la physiologie humaine, il est possible de fragmenter le sommeil de mammifères murins.

1.2 Le modèle murin

Il existe de multiples façons d'induire une fragmentation de sommeil chez les rongeurs. Tout d'abord, elle peut être induite par des stimuli auditifs. Les rats et les souris sont réveillés par un son répété. Par exemple, une équipe a exposé ses animaux à un bruit environnemental tel qu'un klaxon de véhicule, une sirène, une alarme, etc., d'une durée de 15 min, et ce bruit a été répété 8 heures par période de sommeil pendant 9 jours. Pour éviter une acclimatation par le rongeur, les événements sonores, la fréquence du son (800-20 000 Hz) et l'amplitude (85-100 dB) ont été randomisés comme l'intervalle entre les bruits (Mavanji et al. 2013). Ils ont comparé trois groupes : rats partiellement privés de sommeil (équivalent du SF au regard du protocole), rats résistants à l'obésité et rats témoins. Les auteurs voulaient contrôler la prise alimentaire et le poids corporel des animaux. Le résultat principal a été une prise alimentaire et un poids corporel plus élevés chez les rats au sommeil fragmenté par rapport aux témoins.

Par ailleurs, la fragmentation peut être provoquée par des stimuli physiques. Ici, les rongeurs peuvent être placés dans une cage motorisée, constituée d'un cylindre en plexiglas divisé en deux hémicylindres par une plaque transparente de séparation. Dans certaines expériences, le disque situé au fond de la cage tourne lentement dans une direction aléatoire (Tartar et al. 2006a; Trammell, Verhulst, and Toth 2014). Il existe de nombreux protocoles. Le premier utilise un rythme marche/arrêt différent :

9s on et 110s off pendant 12 h, avec une variation de la vitesse de rotation, du temps d'exposition à la fragmentation de sommeil selon le protocole (1 jour à 20 semaines) (Baud et al. 2016). L'objectif est de reproduire au mieux la fragmentation de sommeil chez l'Homme. D'autres expériences induisent la fragmentation de sommeil en utilisant une barre horizontale motorisée se déplaçant d'un côté à l'autre de la cage. Le contact avec la barre réveille les rongeurs et les oblige à bouger (Ramesh, Kaushal, and Gozal 2009). Ces deux méthodes évitent le contact humain, préviennent l'isolement social de l'animal et diminuent le stress des rongeurs (Ramesh, Kaushal, and Gozal 2009).

Les rongeurs ont été beaucoup étudiés dans le cadre de la fragmentation de sommeil. Leur principal avantage est la facilité avec laquelle on peut obtenir des données biologiques. De nombreux articles scientifiques ont utilisé les rats pour étudier le comportement, le sommeil, la génétique... La principale limite à l'utilisation des rongeurs pour étudier la fragmentation de sommeil est l'impossibilité de reproduire les contraintes socioprofessionnelles humaines par exemple et leurs conséquences. En outre, les rats s'acclimatent et ont des réponses stéréotypées en raison de leurs conditions de vie en laboratoire, alors que le sommeil est sous l'influence de facteurs génétiques et extrinsèques (par exemple, environnementaux) (McKillop and Vyazovskiy 2020).

Nous avons décidé de travailler avec des cages de fragmentation cylindrique (Figure 9). Ce modèle a été développé, optimisé et validé dans le cadre de la privation de sommeil du rat par l'institut néerlandais de neuroscience en collaboration avec le laboratoire HP2 (hypoxie et physiopathologies) et le laboratoire du sommeil de Grenoble, l'INSERM U1042 (Leenaars et al. 2011). En utilisant ce type de dispositif, ils n'ont trouvé aucune conséquence majeure sur le taux de corticostérone (hormone de stress) et sur l'activité locomotrice (l'activité locomotrice maximale pendant la privation de sommeil ne dépassait pas de manière significative les niveaux rencontrés pendant un cycle lumière-obscurité de 24 heures sans

perturbation.). Cet appareil a également été utilisé dans le cadre de la fragmentation de sommeil et le protocole de fragmentation a été validé par EEG (Ringgold et al. 2013).

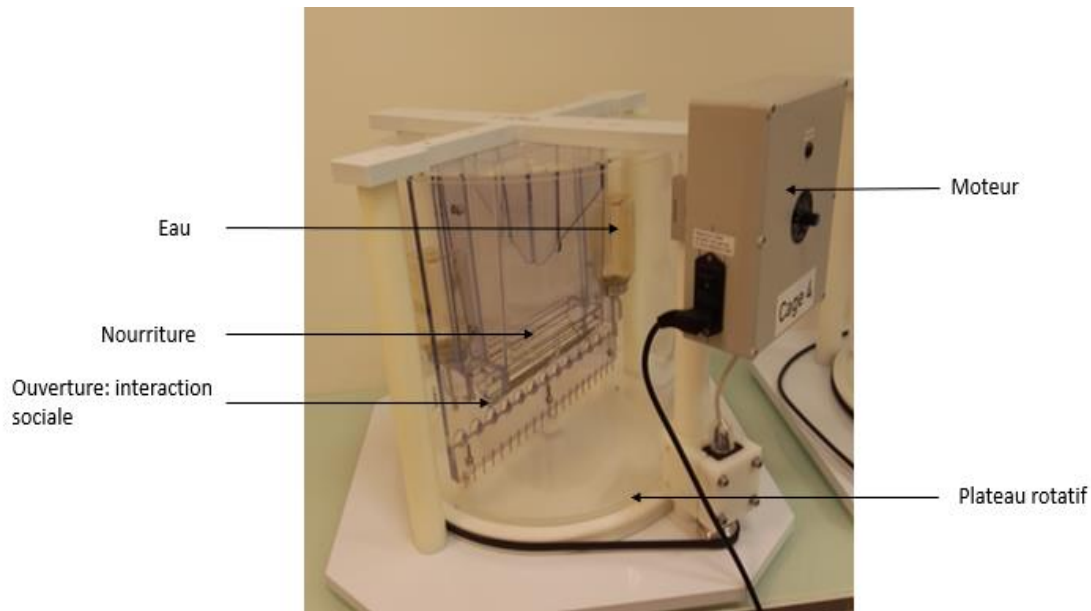


Figure 13: Cage de fragmentation utilisée lors de ma thèse (photo personnelle)

Le modèle de cage que nous avons utilisé est représenté en Figure 13. Nous possédions 4 cages pouvant contenir chacune 2 rats, faisant un total de 8 rats par expérience.

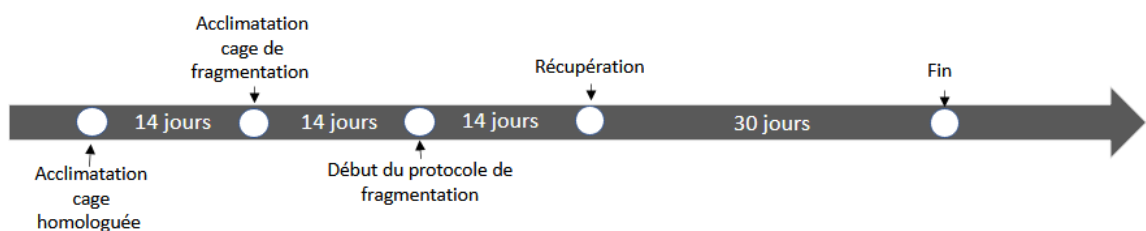
Après avoir déterminé la méthode de fragmentation de sommeil, il a fallu mettre en place un protocole.

1.3 Evolution du protocole de fragmentation

Quel que soit le protocole de fragmentation, les animaux utilisés étaient tous des rats Wistar mâles des laboratoires Janvier.

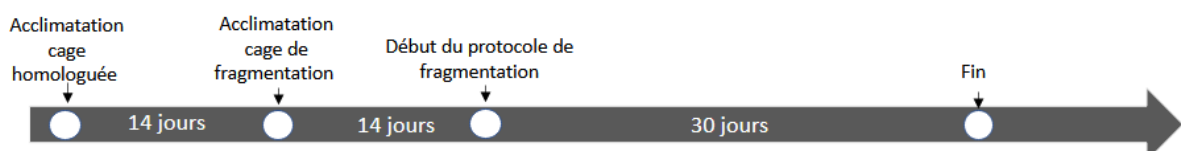
En nous basant sur la littérature, nous avons commencé par travailler sur rats jeunes (7 semaines) avec deux semaines de fragmentation, temps d'exposition largement utilisé par nombre d'auteurs (Kaushal, Ramesh, and Gozal 2012; Baud, Magistretti, and Petit 2013; Nair et al. 2011). Nair et al.

2011 ont d'ailleurs montré un effet de leur protocole sur la mémoire à travers l'utilisation du test de la piscine de Morris. Nous avons quatre groupes au total : 1) contrôle qui restait 14 jours en cage de fragmentation sans que celle-ci ne tourne ; 2) sommeil fragmenté dont la cage tournait durant la période dormante ; 3) contrôle dans la cage de fragmentation pendant 14 jours puis 30 jours en cage homologuée ; 4) sommeil fragmenté pendant 14 jours puis 30 jours de récupération en cage homologuée. Le protocole était le suivant :



Ce protocole ne montrait aucune différence entre les rats contrôles et les rats fragmentés que ce soit au niveau du poids, ou au niveau des dosages moléculaires (de la claudine-5, de l'IL-17 et de l'APP). Cependant, il nous a permis de voir une inversion du rythme jour/nuit pour les rats. En effet, grâce à une caméra infrarouge, nous avons observé que pendant leur période active, les rats du groupe « sommeil fragmenté » dormaient là où les rats du groupe contrôle faisaient leur toilette, interagissaient, etc.

Suite à l'absence de résultats, il a donc été décidé de supprimer la période de récupération et d'augmenter la période de fragmentation à 30 jours. De plus, nous avons créé une pression durant la journée (rotation de la cage pour éviter une inversion de cycle jour/nuit :



Afin de comparer les résultats de ce protocole sur rats jeunes, nous avons décidé d'appliquer le même protocole à des rats d'âge moyen (1an). La

répartition des différents protocoles durant ma thèse s'est faite comme suit (Figure 14) :

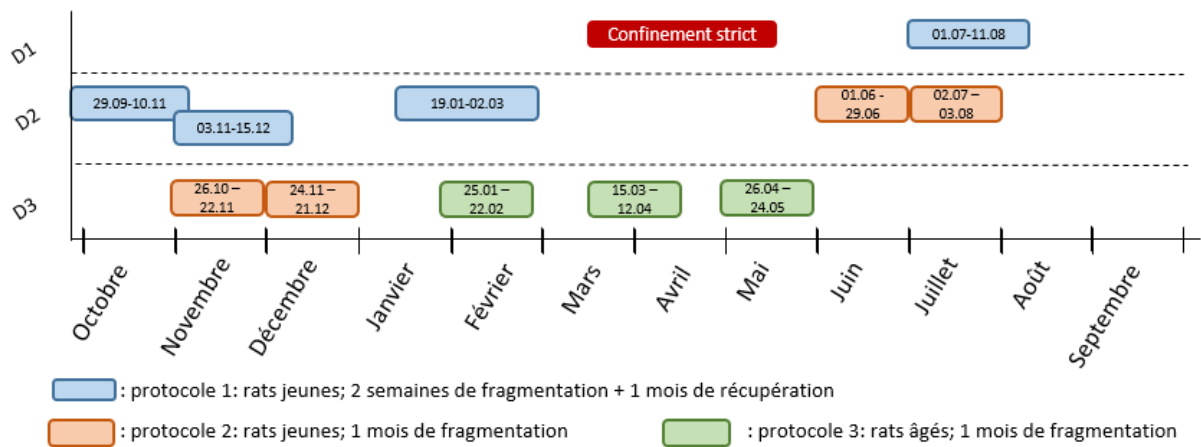


Figure 14: répartition des différents protocoles au cours de mes trois années de thèse.

Nous avons ainsi obtenu :

Protocole 1 (rats jeunes) :

n=8 pour le groupe contrôle avec 14 jours en cage de fragmentation

n=8 pour le groupe sommeil fragmenté durant 2 semaines

n=8 pour le groupe contrôle 14 jours cage de fragmentation + 30 jours cages classiques homologuées en animalerie

n=8 pour le groupe sommeil fragmenté 14 jours + 30 jours de récupération en cage homologuée

Protocole 2 (rats jeunes):

n=12 pour groupe contrôle

n=14 pour le groupe sommeil fragmenté

Protocole 3 (rats âgés) :

n=10 pour le groupe contrôle

n=12 pour le groupe sommeil fragmenté

1.4 Chez l'Homme

En 1989, Michael H. Bonnet (H. Bonnet, 1989) a expérimenté les conséquences de la fragmentation de sommeil chez l'Homme pendant 2 nuits suivies de 2 jours de récupération. Il a induit la fragmentation de sommeil par une stimulation acoustique de tonalités de 1000 Hz (équivalent au miaulement du chat) pendant 20 minutes. Il s'agissait d'alterner 10 min de sommeil et 20 min de stimuli auditifs pendant le temps de sommeil. Il a travaillé sur deux groupes, des adultes jeunes et âgés. Il a évalué le sommeil et les performances. Les individus âgés semblent moins sensibles avec une moindre détérioration des performances due à la fragmentation de sommeil que les jeunes adultes. Cette méthode a été critiquée parce qu'elle provoque un éveil complet, au lieu d'un microéveil, ce qui conduit à une accumulation d'éveils qui ne se produit pas pendant le sommeil fragmenté ou plutôt « micro-fragmenté » (Stepanski 2002).

Le modèle humain est bien sûr le plus solide pour étudier les conséquences de la fragmentation de sommeil sur l'Homme. L'une des principales remarques est qu'il n'existe que des études sur la fragmentation de sommeil aiguë. Il n'y a pas d'étude où la fragmentation de sommeil a été induite plus de 72h. Nous pouvons faire l'hypothèse que travailler sur la fragmentation de sommeil chronique (semaines, mois de fragmentation de sommeil) n'est pas éthiquement possible. En effet, travailler sur la fragmentation de sommeil chez l'Homme implique de provoquer volontairement les conséquences connues de la fragmentation de sommeil : problèmes de mémoire, troubles de l'humeur, possibles désordres métaboliques ...

Quelques études sur la fragmentation de sommeil ont été résumées dans le tableau 3. Ces études ont montré certaines conséquences de la fragmentation de sommeil et la méthodologie utilisée pour les obtenir. Des exemples ayant été apportés sur la fragmentation de sommeil chez l'Homme en Ch.1 paragraphe 4, je vais me concentrer dans le tableau 4 sur

l'impact de la fragmentation du sommeil sur l'architecture du sommeil chez le rongeur.

Comme chez l'Homme, nous observons dans le tableau 4 que les rongeurs souffrant de fragmentation de sommeil semblent être plus souvent et plus longtemps éveillés. La durée de sommeil en phase SWS (sommeil profond) tend à diminuer et le sommeil REM (paradoxal) n'est pas le même en fonction des dispositifs. Selon celui-ci, le sommeil REM peut être aboli ou diminué. Se pose alors la question chez l'Homme comme chez le rongeur de savoir à quel point les processus qui se mettent en place durant le sommeil paradoxal, tel que le travail de mémoire, sont impactés par la fragmentation de sommeil et surtout la fragmentation de sommeil chronique. La même question se pose pour les processus qui se mettent en place durant le sommeil profond tels que la récupération physique, la sécrétion d'hormones de croissance mais également la clairance métabolique (plus efficace durant le sommeil profond).

Tableau 3: Studies on different experimental methods of sleep fragmentation.

References	Methods of Sleep Fragmentation	Sp.	Protocols	Main results
(Williams et al. 2016)	Young and middle-aged male <i>CSORC</i> wildtype strain Light of 600 lux	F	4 d; 4 d + 4 d of recovery 30 min on / 30 min off	SF increased neuroprotection and protection against reactive oxygen species
(McCoy et al. 2007)#	Adult male Fischer Brown Norway F1 rats; treadmill cage in which the floor was a horizontal belt	R	24 h 30 s on / 90 s off	Attentional set-shifting was impaired "Spatial memory consolidation is more susceptible to sleep disruption than is spatial learning"
(McKenna et al. 2007)#	Adult male Sprague Dawley rats; treadmill cage in which the floor was a horizontal belt	R	6-24-30 h + 3-6 h of recovery 30 s on / 90 s off	Basal forebrain adenosine levels were correlated with daytime sleepiness
(Tartar et al. 2006a)#	Young male Sprague Dawley rats; treadmill cage in which the floor was a horizontal belt	R	24 or 72 h 30 s on / 90 s off	Spatial learning impacted negatively "Loss of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-dependent LTP in the hippocampal CA1 region may be one mechanism involved in this deficit"
(Baud, Magistretti, and Petit 2013) (Baud et al. 2016)	Adult male C57BL6 mice; cylindrical plexiglas cage with inner dividing walls and a mobile circular floor	M	24 h for 1 d or 14 d 20 s on / 40 s off	Crucial role of sleep fragmentation in metabolic effect of obstructive sleep apnea Impairment of cerebral cortex and hippocampus metabolism
(Carreras et al. 2014)*	Adult male C57BL/6J mice; cage with sweep bar	M	12 h (light period) for 20 weeks 9 s on / 120 s off	Vascular endothelial dysfunction and mild blood pressure increased Recruitment of inflammatory cells increased
(Kaushal, Ramesh, and Gozal 2012)*	Male C57BL/6J mice and TNF α receptor double knockout mice; cage with sweep bar	M	12 h (light period) for 15 d 9 s on / 120 s off	Preserved sleep duration and architecture. Activation of TNF α pathways may explain excessive sleepiness caused by recurrent arousals.
(Li et al. 2014)	Adult male C57Bl/6J mice; cage on an orbital shaker	M	4 weeks 4 weeks+ 2 weeks of recovery 10 s on / 110 s off	Reduction of wake neuron projections and locus coeruleus neuronal excitability after SF Impairments in hypercapnic arousals. Not entirely recovered after 2 weeks.
(Nair et al. 2011)*	C57BL6/J mice and gp91phox ^{-Y} mice; cage with sweep bar	M	12 h (light period) for 14 d	"Important role for NADPH oxidase in hippocampal memory impairments induced by sleep fragmentation"

(Ramesh, Kaushal, and Gozal 2009)*	Male C57BL6/J mice; cage with sweep bar	M	6 h (light period) for 35 d 9 s on / 120 s off	Validation of SF model Importance of social interactions during SF and recovery
(Ramesh et al. 2012)*	Male C57BL/6 J mice TNF α receptor double knockout mice; cage with sweep bar	M	12 h (light period) for 15 d	Crucial role of TNF α
(H. Bonnet, 1989)	Males humans; auditory stimuli	H	2 nights + 2 nights recovery 20 min on / 10 min off 1000 Hz tones	Different reaction to SF between young and old adults Older adults react better and are more operational after SF
(Carrington and Trinder 2008b)	Male and female humans; auditory stimuli	H	2 nights Minimum: 70 dB during 5 s	Cardiovascular activation after repetitive arousals from sleep Elevations in blood pressure due to repetitive arousals during the night
(Lim et al. 2013)	Human cohort study with SF	H	SF quantified during 10 d	"Sleep fragmentation in older adults is associated with incident AD and the rate of cognitive decline"

*F: flies; H: humans; M: mice; R: rats; Sp.: Species; #: Harvard Medical School and VA Boston Healthcare System, Laboratory of Neuroscience, Research 151-C, 940 Belmont Street, Brockton, MA 02301, USA ; *: Department of Pediatrics, Pritzker School of Medicine, University of Chicago, IL*

Tableau 4: Impact de la fragmentation de sommeil expérimentale "pure" sur l'architecture du sommeil du rongeur.

Auteurs	Conséquences sur l'architecture du sommeil																																																																																																																																																													
(McCoy et al. 2007)	Temps de NREMs sur 24h	50%		33%																																																																																																																																																										
	REMs	7%		0%																																																																																																																																																										
	Awake	43%		67%																																																																																																																																																										
(McKenna et al. 2007)	During SI Exposure																																																																																																																																																													
	% Wake	% NREM	% REM	Ave NREM																																																																																																																																																										
6 h SI, rec dark	29.2%BL to 65.0%*	62.0%BL to 34.7%SI*	8.8%BL to 0.2%SI*	178s BL to 56s SI*																																																																																																																																																										
6 h SI, rec light	32.7%BL to 58.3%*	59.8%BL to 41.3%SI*	7.5%BL to 0.3%SI*	133s BL to 67s SI*																																																																																																																																																										
24-30 hr SI	49.8%BL to 66.3%*	44.0%BL to 32.7%SI*	6.2%BL to 0.7%SI*	125s BL to 58s SI*																																																																																																																																																										
	During the Recovery Period																																																																																																																																																													
	NREM delta	Ave NREM	Sleep Latency																																																																																																																																																											
6 h SI, rec dark	Increase*	92s BL to 135s SI*	13:35m BL to 5:43m SI*																																																																																																																																																											
6 h SI, rec light	Increase*	125s BL to 200s SI*	7:22m BL to 4:31m SI*																																																																																																																																																											
24-30 hr SI	Increase*	125s BL to 199s SI*	6:53m BL to 3:04m SI*																																																																																																																																																											
(Baud, Magistretti, and Petit 2013)	<p>Table 1 Sleep parameters</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2"></th> <th colspan="3">D1</th> <th colspan="3">D7</th> <th colspan="3">D14</th> </tr> <tr> <th>QC</th> <th>MC</th> <th>F</th> <th>QC</th> <th>MC</th> <th>F</th> <th>QC</th> <th>MC</th> <th>F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td colspan="10">SWS time</td> </tr> <tr> <td>D</td> <td>158 ± 10</td> <td>101 ± 9[†]</td> <td>123 ± 7</td> <td>156 ± 14</td> <td>108 ± 6[†]</td> <td>139 ± 10</td> <td>163 ± 10</td> <td>121 ± 10[†]</td> <td>149 ± 9</td> </tr> <tr> <td>L</td> <td>359 ± 4</td> <td>375 ± 9</td> <td>297 ± 10*</td> <td>368 ± 15</td> <td>376 ± 9</td> <td>311 ± 8*</td> <td>377 ± 6</td> <td>393 ± 10</td> <td>309 ± 4*</td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>517 ± 9</td> <td>476 ± 13</td> <td>420 ± 12*</td> <td>524 ± 16</td> <td>484 ± 13</td> <td>449 ± 15[†]</td> <td>540 ± 15</td> <td>513 ± 18</td> <td>458 ± 12[†]</td> </tr> <tr> <td colspan="10">PS time</td> </tr> <tr> <td>D</td> <td>20 ± 3</td> <td>7 ± 2[†]</td> <td>1 ± 0.1*</td> <td>12 ± 3</td> <td>7 ± 1</td> <td>10 ± 1</td> <td>11 ± 2</td> <td>6 ± 2</td> <td>13 ± 2</td> </tr> <tr> <td>L</td> <td>59 ± 4</td> <td>60 ± 2</td> <td>25 ± 3*</td> <td>59 ± 6</td> <td>53 ± 3</td> <td>35 ± 2*</td> <td>62 ± 5</td> <td>61 ± 3</td> <td>41 ± 2*</td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>79 ± 6</td> <td>66 ± 3[†]</td> <td>27 ± 3*</td> <td>70 ± 4</td> <td>60 ± 3[†]</td> <td>46 ± 3*</td> <td>73 ± 3</td> <td>66 ± 4</td> <td>54 ± 2*</td> </tr> <tr> <td colspan="10">SWS bouts</td> </tr> <tr> <td>Number D</td> <td>104 ± 11</td> <td>116 ± 15</td> <td>220 ± 14*</td> <td>81 ± 15</td> <td>102 ± 17</td> <td>223 ± 15*</td> <td>120 ± 22</td> <td>137 ± 20</td> <td>253 ± 12*</td> </tr> <tr> <td>Number L</td> <td>181 ± 12</td> <td>202 ± 21</td> <td>522 ± 20*</td> <td>138 ± 4</td> <td>164 ± 6</td> <td>488 ± 9*</td> <td>158 ± 8</td> <td>162 ± 13</td> <td>480 ± 5*</td> </tr> <tr> <td>Duration D</td> <td>1.6 ± 0.2</td> <td>1 ± 0.1[†]</td> <td>0.7 ± 0.01*</td> <td>2.2 ± 0.3</td> <td>1.3 ± 0.2[†]</td> <td>0.8 ± 0.03*</td> <td>1.6 ± 0.3</td> <td>1 ± 0.1[†]</td> <td>0.7 ± 0.02*</td> </tr> <tr> <td>Duration L</td> <td>2 ± 0.1</td> <td>2 ± 0.1</td> <td>0.7 ± 0.01*</td> <td>2.7 ± 0.1</td> <td>2.3 ± 0.1</td> <td>0.8 ± 0.02*</td> <td>2.4 ± 0.1</td> <td>2.5 ± 0.2</td> <td>0.8 ± 0.01*</td> </tr> </tbody> </table> <p>For each day (D1, D7 and D14), the SWS and PS time expressed in minutes during the dark period (D) and the light period (L) and summed over 24 h. Individual SWS bout mean duration and their number are also reported. Number of mice for QC (n = 6), MC (n = 9) and F (n = 11). <i>Post hoc</i> multiple comparisons using Bonferroni correction were calculated when the group effect of the two-way ANOVA was positive (P < 0.05). F, sleep-fragmented group; MC, motor control group; PS, paradoxical sleep; QC quiet control group; SWS, slow-wave sleep. [†]F different from QC and MC; [†]F different from QC but not from MC; a: MC different from QC.</p>										D1			D7			D14			QC	MC	F	QC	MC	F	QC	MC	F	SWS time										D	158 ± 10	101 ± 9 [†]	123 ± 7	156 ± 14	108 ± 6 [†]	139 ± 10	163 ± 10	121 ± 10 [†]	149 ± 9	L	359 ± 4	375 ± 9	297 ± 10*	368 ± 15	376 ± 9	311 ± 8*	377 ± 6	393 ± 10	309 ± 4*	Total	517 ± 9	476 ± 13	420 ± 12*	524 ± 16	484 ± 13	449 ± 15 [†]	540 ± 15	513 ± 18	458 ± 12 [†]	PS time										D	20 ± 3	7 ± 2 [†]	1 ± 0.1*	12 ± 3	7 ± 1	10 ± 1	11 ± 2	6 ± 2	13 ± 2	L	59 ± 4	60 ± 2	25 ± 3*	59 ± 6	53 ± 3	35 ± 2*	62 ± 5	61 ± 3	41 ± 2*	Total	79 ± 6	66 ± 3 [†]	27 ± 3*	70 ± 4	60 ± 3 [†]	46 ± 3*	73 ± 3	66 ± 4	54 ± 2*	SWS bouts										Number D	104 ± 11	116 ± 15	220 ± 14*	81 ± 15	102 ± 17	223 ± 15*	120 ± 22	137 ± 20	253 ± 12*	Number L	181 ± 12	202 ± 21	522 ± 20*	138 ± 4	164 ± 6	488 ± 9*	158 ± 8	162 ± 13	480 ± 5*	Duration D	1.6 ± 0.2	1 ± 0.1 [†]	0.7 ± 0.01*	2.2 ± 0.3	1.3 ± 0.2 [†]	0.8 ± 0.03*	1.6 ± 0.3	1 ± 0.1 [†]	0.7 ± 0.02*	Duration L	2 ± 0.1	2 ± 0.1	0.7 ± 0.01*	2.7 ± 0.1	2.3 ± 0.1	0.8 ± 0.02*	2.4 ± 0.1	2.5 ± 0.2	0.8 ± 0.01*
	D1			D7			D14																																																																																																																																																							
	QC	MC	F	QC	MC	F	QC	MC	F																																																																																																																																																					
SWS time																																																																																																																																																														
D	158 ± 10	101 ± 9 [†]	123 ± 7	156 ± 14	108 ± 6 [†]	139 ± 10	163 ± 10	121 ± 10 [†]	149 ± 9																																																																																																																																																					
L	359 ± 4	375 ± 9	297 ± 10*	368 ± 15	376 ± 9	311 ± 8*	377 ± 6	393 ± 10	309 ± 4*																																																																																																																																																					
Total	517 ± 9	476 ± 13	420 ± 12*	524 ± 16	484 ± 13	449 ± 15 [†]	540 ± 15	513 ± 18	458 ± 12 [†]																																																																																																																																																					
PS time																																																																																																																																																														
D	20 ± 3	7 ± 2 [†]	1 ± 0.1*	12 ± 3	7 ± 1	10 ± 1	11 ± 2	6 ± 2	13 ± 2																																																																																																																																																					
L	59 ± 4	60 ± 2	25 ± 3*	59 ± 6	53 ± 3	35 ± 2*	62 ± 5	61 ± 3	41 ± 2*																																																																																																																																																					
Total	79 ± 6	66 ± 3 [†]	27 ± 3*	70 ± 4	60 ± 3 [†]	46 ± 3*	73 ± 3	66 ± 4	54 ± 2*																																																																																																																																																					
SWS bouts																																																																																																																																																														
Number D	104 ± 11	116 ± 15	220 ± 14*	81 ± 15	102 ± 17	223 ± 15*	120 ± 22	137 ± 20	253 ± 12*																																																																																																																																																					
Number L	181 ± 12	202 ± 21	522 ± 20*	138 ± 4	164 ± 6	488 ± 9*	158 ± 8	162 ± 13	480 ± 5*																																																																																																																																																					
Duration D	1.6 ± 0.2	1 ± 0.1 [†]	0.7 ± 0.01*	2.2 ± 0.3	1.3 ± 0.2 [†]	0.8 ± 0.03*	1.6 ± 0.3	1 ± 0.1 [†]	0.7 ± 0.02*																																																																																																																																																					
Duration L	2 ± 0.1	2 ± 0.1	0.7 ± 0.01*	2.7 ± 0.1	2.3 ± 0.1	0.8 ± 0.02*	2.4 ± 0.1	2.5 ± 0.2	0.8 ± 0.01*																																																																																																																																																					

2. Vocalisations

La communication est la base de toute interaction entre individus. Chez les modèles animaux de stress, d'anxiété, de douleur ou de comportement sexuel, mais aussi dans les études de bien-être animal, les ultrasons servent d'indicateurs pour le statut émotionnel et motivationnel de l'animal, en particulier du rongeur. Dans cette thèse nous nous sommes intéressés aux communications chez le rat. On distingue différents types de vocalisations chez le rat (Wöhr and Schwarting 2013). Certaines, dans le rang des ultrasons (USVs), sont inaudibles pour l'Homme. Ils sont divisés en 3 catégories : (1) les USVs émis par les ratons durant l'isolement social après avoir été séparés de la mère et des frères et sœurs ; (2) les USVs émis par les juvéniles ou les adultes dans des situations aversives, comme l'exposition à un prédateur et le combat ou durant le sevrage médicamenteux (22 kHz USV) ; (3) les USVs émis par les juvéniles et les adultes dans des situations appétitives, comme le jeu, l'accouplement ou en réponse à des abus de drogues, par ex. amphétamines (50 kHz USV) (Wöhr and Schwarting 2013).

Sur ces bases, la mesure de l'émission des USV apparaît de plus en plus comme un marqueur utile dans les études sur les rats qui évaluent le comportement émotionnel et les facteurs susceptibles de modifier l'état émotionnel, tant dans des conditions physiologiques que dans des modèles expérimentaux de maladies cérébrales.

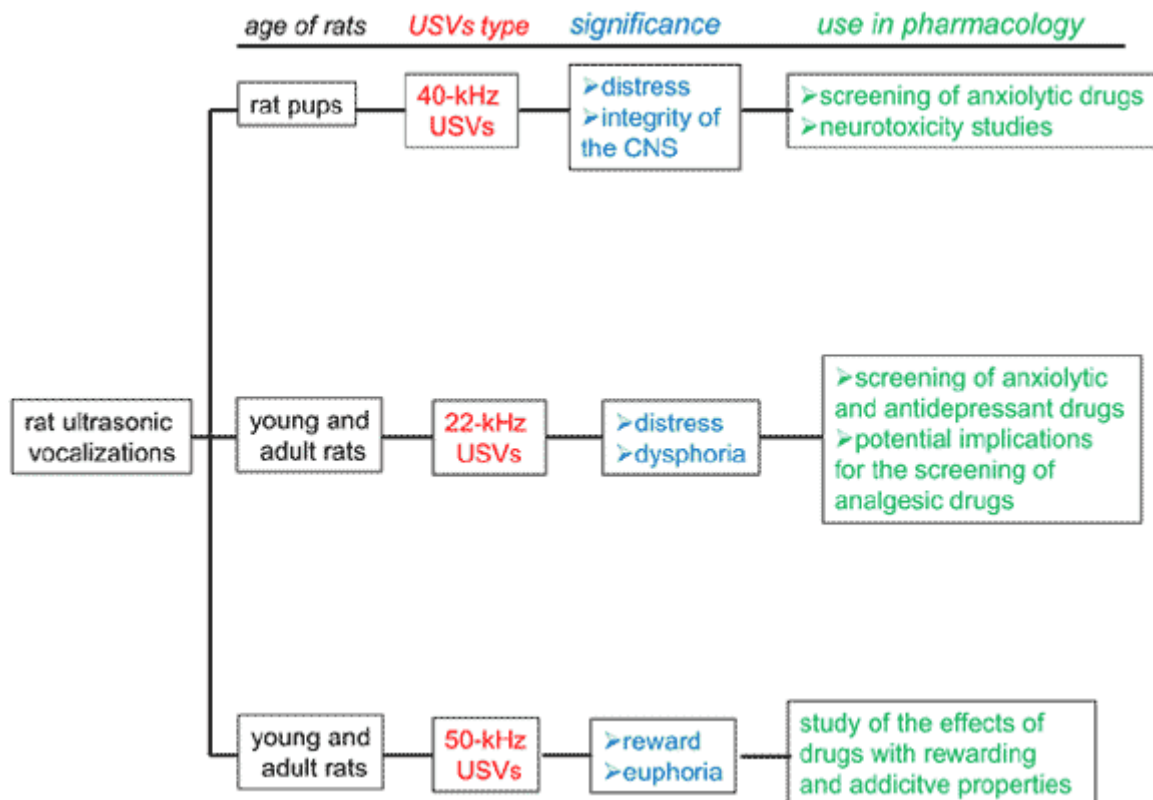


Figure 15: Les différentes catégories de vocalisations chez les rats et les études qui y ont été associées (Simola 2022).

La communication affective par ultrasons offre donc un outil translationnel pour étudier la neurobiologie qui sous-tend la communication socioaffective (Figure 15). Ceci est particulièrement pertinent pour les modèles rongeurs de troubles neurodéveloppementaux (Wöhr and Schwarting 2013). En effet, la communication socioaffective est gravement altérée dans un certain nombre de troubles neuropsychiatriques humains, notamment l'autisme et la schizophrénie. Grâce à des études de neuro-imagerie humaine, de telles déficiences ont été associées à plusieurs reprises à des réponses aberrantes de l'amygdale pendant le traitement des émotions, tant dans la schizophrénie (Gur et al. 2002) que dans l'autisme (Critchley et al. 2000). La fragmentation du sommeil ayant des conséquences sur l'humeur, l'étude de la communication murine dans ce contexte semble tout indiquée. De plus, cette étude a été faite en collaboration avec le laboratoire de l'ENES (Equipe de Neuro-Ethologie Sensorielle), Faculté de Sciences et Techniques de l'Université Jean Monnet, Université de Lyon, expert international dans ce domaine.

En plus de troubles de l'humeur, la fragmentation de sommeil est également connue pour causer des troubles de la mémoire. Pour étudier les conséquences de la fragmentation de sommeil sur la mémoire, il existe différentes méthodes.

3 . L'étude de la mémoire

Les techniques développées dans cette partie sont principalement utilisées sur modèle murin c'est-à-dire rats ou souris.

Piscine de Morris

La piscine de Morris est certainement la plus connue des méthodes d'évaluation de la mémoire (Figure 16). Elle permet d'évaluer la mémoire spatiale. Cette technique consiste à mettre une plateforme dans une piscine. Cette piscine est entourée de repères colorés et de forme différente. Il s'agit de mettre un animal (rat ou souris) dans la piscine et de calculer le temps et la distance qu'il parcourt avant d'atteindre la plateforme. Ce processus sera répété 10 fois. Chez un animal contrôle, le temps et la distance parcourue tendent à diminuer avec les répétitions. Cependant, lorsque l'hippocampe (qui est, rappelons-le, une structure essentielle dans les processus de la mémoire) est lésé, ces répétitions ne changent rien au temps et à la distance parcourus.

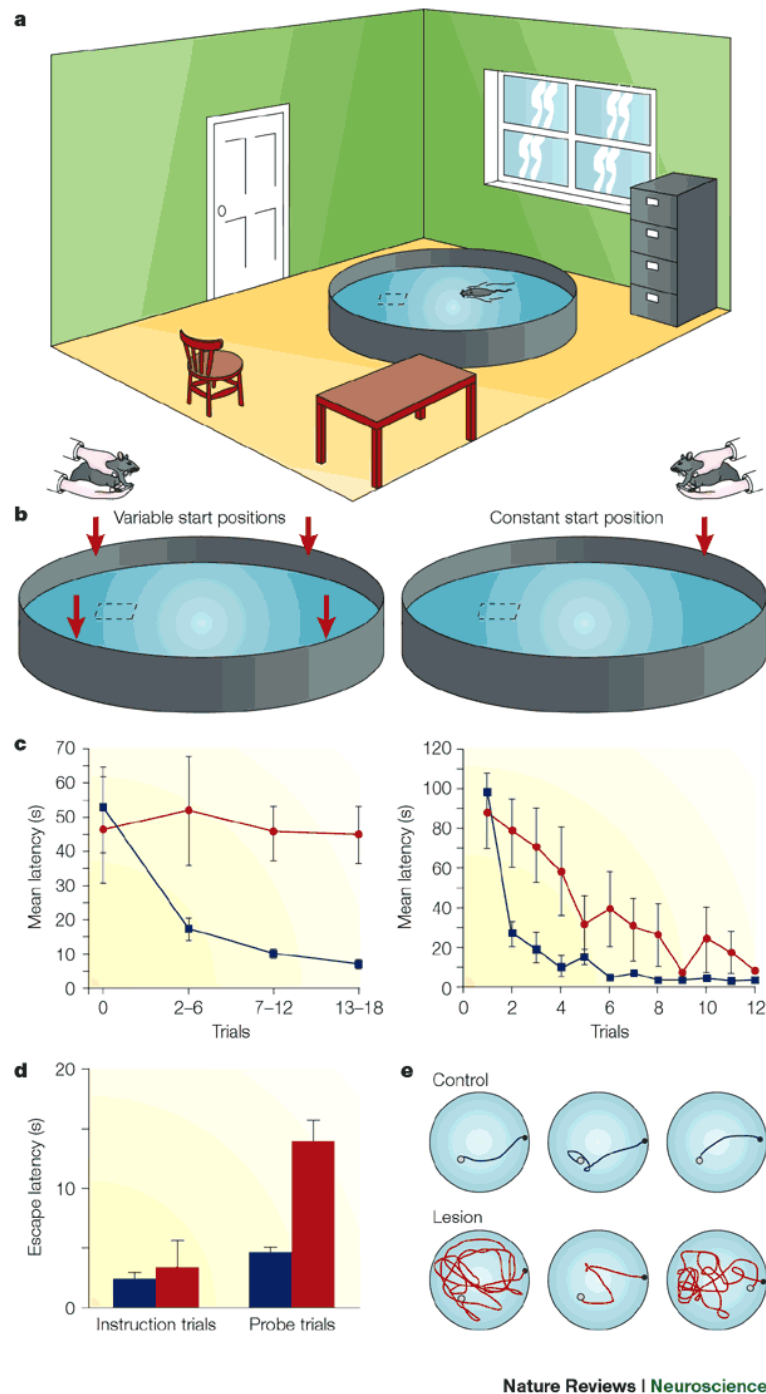


Figure 16: Résultat du test de mémoire entre rats contrôles (bleu) et rats avec lésion de l'hippocampe (en rouge). (Eichenbaum 2000)

Cette méthode nécessite beaucoup de place au sein de l'animalerie et tend à provoquer du stress chez l'animal (Harrison, Hosseini, and McDonald 2009). Afin d'éviter de provoquer du stress à des rats ayant déjà un sommeil perturbé, nous avons choisi le test de mémoire spatiale du labyrinthe en Y.

Le labyrinthe en Y

Le test du labyrinthe en Y permet d'évaluer la mémoire à court terme du rongeur. L'alternance spontanée, une mesure de la mémoire de travail spatial, peut être évaluée en permettant à l'animal d'explorer les 3 bras du labyrinthe et est conduite par une curiosité innée du rongeur à explorer des endroits non visités (Figure 17). Un rongeur avec une mémoire de travail intact, et donc des fonctions corticales préfrontales intactes, se souviendra des bras précédemment visités et montre une tendance à entrer dans le bras le moins récemment visité. La mémoire de référence spatiale, qui est prise en charge par l'hippocampe, peut aussi être testée en plaçant le rongeur dans le labyrinthe en Y avec un bras fermé durant l'entraînement. Après un intervalle d'environ 1h par exemple, le rongeur devra se souvenir du bras non exploré précédemment et devrait le visiter plus souvent (Figure 18) (Kraeuter, Guest, and Sarnyai 2019).

Pour ma thèse, j'ai choisi la méthode d'alternance des bras (Figure 17) en calculant le nombre d'entrées et le pourcentage de combinaisons correctes de mes rats jeunes et âgés, contrôles et fragmentés. Nous retrouvons cette méthode dans la littérature (Plucinska et al. 2020).

Le calcul utilisé pour déterminer le pourcentage de combinaisons correctes, correspondant au nombre d'alternances d'exploration de bras, est le suivant :

$$\% \text{ alternations} = \frac{\text{total number of alternations}}{\text{number of arms entered}} \times 100 \%$$

L'avantage de ce protocole est sa simplicité d'utilisation. De plus, il demande peu de ressources, incluant l'entraînement de l'animal et sa sortie, et peu de contact avec l'expérimentateur.

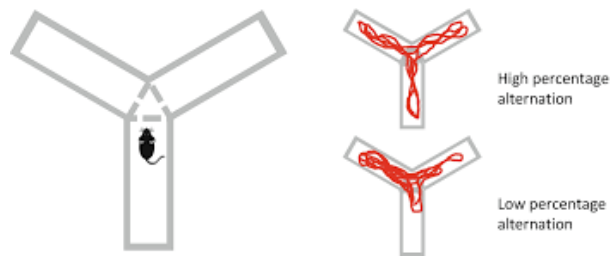


Figure 17: Test du labyrinthe en Y pour la mémoire spatiale selon l'alternance des bras (Kraeuter, Guest, and Sarnyai 2019).

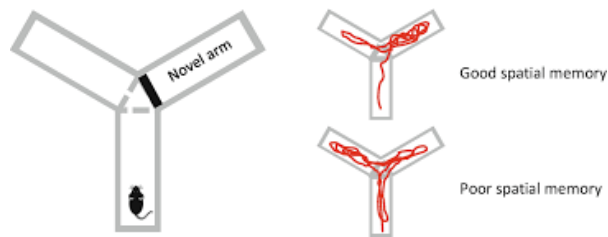


Figure 18: Test du labyrinthe en Y pour la mémoire spatiale selon la méthode du bras non exploré (Kraeuter, Guest, and Sarnyai 2019).

Ce même test a également été étudié dans le cadre de l'étude des vocalisations de rats induites par ce test. Le protocole d'alternance des bras a été utilisé. Il a été montré que les rats appréciaient ce test. Ils émettent des vocalisations à 50kHz qui indiquent une situation positive (corrélation entre 50kHz et activité locomotrice ?) (Costa, Serra, and Simola 2021). Ce protocole a donc été utilisé lors de ma thèse (puisqu'en accord avec le bien-être animal).

Conclusion de la revue bibliographique et objectifs

Bien dormir est essentiel pour avoir une bonne qualité de vie et une efficacité neurocomportementale en période d'activité. Le sommeil est divisé en différents stades et se structure en cycles successifs. Chaque stade a plusieurs rôles physiologiques à jouer. Les principaux mécanismes qui ont lieu durant le sommeil sont la mémorisation, des régulations hormonales et la clairance métabolique. Une nuit de sommeil sans interruption est essentielle pour que ces processus se mettent en place. Malheureusement, tout le monde n'a pas un sommeil dit « sain ». En effet, de nombreux patients souffrent de fragmentation du sommeil.

La fragmentation du sommeil est l'interruption répétée du cycle de sommeil provoquée par des microéveils de durée allant de 3 à 15 sec. Les personnes souffrant de fragmentation de sommeil sévère peuvent avoir leur cycle de sommeil interrompu plus de 30 fois/ heure. Elle est présente dans de nombreuses pathologies telles que l'insomnie chronique, le bruxisme, l'apnée du sommeil, les pathologies motrices des membres et les pathologies neurodégénératives. Afin de pouvoir étudier ses effets, il est indispensable de travailler sur modèle animal.

La BHE est un élément important du bon fonctionnement du SNC. En effet, sa composition cellulaire et moléculaire lui confère des propriétés de barrière, mais également de transporteur entre compartiment cérébral et compartiment sanguin. Elle est de plus en plus étudiée dans le cadre de son implication dans les processus de la neuroinflammation.

Ce travail de thèse va permettre d'étudier les effets de la fragmentation du sommeil sur un modèle murin à trois niveaux différents :

- L'échelle macroscopique, avec l'évolution des courbes pondérales, les tests de mémoire et les vocalisations (comportement/ interactions sociales).
- L'échelle cellulaire, avec l'étude de la glie.
- L'échelle moléculaire avec différents acteurs de la BHE, tels que les protéines de jonctions, l'inflammation systémique et de la neuroinflammation.

Etude 1 : étude comportementale de la fragmentation de sommeil

1. Introduction

La fragmentation du sommeil est un symptôme retrouvé dans de nombreuses pathologies telles que l'apnée du sommeil (Kimoff 1996), l'insomnie (Lavie 2007), le bruxisme (Alóe 2009), le syndrome de la jambe sans repos associé aux mouvements périodiques des membres (Ting and Malhotra 2005). Elle consiste en l'interruption répétée du cycle de sommeil et perturbe donc la continuité de ce dernier. La sévérité de la fragmentation de sommeil est représentée par le nombre de microéveils (d'une durée comprise entre 3 et 15 s), d'éveil (d'une durée ≥ 15 s) (Berry et al. 2015) et les phases d'activation transitoire (Sforza, Jouny, and Ibanez 2000) caractérisés par une augmentation brutale de l'activité électroencéphalographique (EEG), avec pour les phases d'activation transitoire une augmentation du tonus musculaire et une tachycardie. Quelle que soit leur durée, tous ces changements EEG indiqueraient une activation corticale à partir d'un stimulus d'éveil généré par le système nerveux périphérique (stimulations somatosensorielles ou auditives) ou par les structures du tronc cérébral (Sforza, Jouny, and Ibanez 2000). Ces interruptions sont relevées et comptées grâce à l'EEG pluripolaire. Elles seront ensuite classées grâce à l'indice d'excitation (en anglais « arousal index », AI) pour déterminer le degré de sévérité. Avec un $AI < 5$, la fragmentation est considérée comme faible, un AI entre 5 et 30, comme modérée et au-delà de 30 comme sévère. On distingue également les fragmentations de sommeil dites aiguës de celles dites chroniques.

Chez l'animal, il est habituel de dire que l'aiguë concerne les fragmentations qui durent moins de 72h (ou de 72h) et les formes chroniques de plus de 72h. Ces interruptions ont de nombreuses conséquences, notamment au niveau comportemental. Elles induisent souvent des troubles de l'humeur,

une irritabilité, de la fatigue et des problèmes de fonctionnement de la mémoire (Michael H. Bonnet and Arand 2003).

De nombreuses méthodes permettent de mesurer ces troubles du comportement. Parmi elles, il existe les tests de mémoire. En effet, le sommeil étant impliqué dans le processus de mémorisation, il a déjà été démontré que la fragmentation de sommeil impactait de façon négative les processus de mémorisation spatiale (Tartar et al. 2006a; Ward, McCarley, and Strecker 2009). Le plus étudié chez le rongeur est certainement le test de mémoire spatiale de la piscine de Morris (12692 résultats sur Pubmed « Morris water maze » contre 4547 pour le labyrinthe en Y « Y maze » le 07/06/2022). Il s'agit de mettre le rat dans une piscine pleine d'eau entourée de repères géographiques. Dans cette piscine il y a une plateforme. Le but est pour le rat d'atteindre cette plateforme. L'objectif va être de mettre le rat dans la piscine et de calculer le temps et la distance parcourus par le rat avant d'atteindre la plateforme. Au fur et à mesure des essais, ceux-ci tendent à diminuer (puisque le rat a retenu où était la plateforme grâce aux repères). Cependant, la structure accueillant les animaux de laboratoire n'avait pas la place suffisante dans la Faculté de Médecine pour développer une telle méthode. De plus, une étude a comparé les réponses au stress lié à différents tests, dont la piscine de Morris (Harrison, Hosseini, and McDonald 2009). Ils ont comparé le taux de corticostérone de trois groupes de 10 souris : test de la piscine de Morris, le labyrinthe de Barnes et naïves (qui n'effectuent aucun test). Ils ont trouvé un stress plus important chez les souris soumises à la piscine de Morris comparé à celles soumises au labyrinthe de Barnes. De façon surprenante, cette augmentation du niveau de stress s'accompagnait d'une meilleure capacité à retenir et donc d'une mémorisation plus rapide (Harrison, Hosseini, and McDonald 2009). Pour ces deux raisons, manque de place et stress induit par la méthode, nous avons décidé de ne pas utiliser la piscine de Morris comme test de mémoire. Nous avons choisi d'utiliser le labyrinthe en Y. Cette méthode a déjà été utilisée dans un contexte de privation de

sommeil aiguë (Lima et al. 2014). Ils ont effectué le test du labyrinthe en Y sur des souris contrôles, privées de sommeil pendant 48h et pendant 72h. Les résultats tendent à montrer que la mémoire des souris soumises à la privation de sommeil était altérée. De plus, une étude sur les vocalisations émises par des rats lors du labyrinthe en Y a été faite (Costa, Serra, and Simola 2021). Les résultats montrent que les rats émettent des vocalisations à 50kHz (à valence positive) et pas de 22kHz (à valence négative) durant le test. Il semble donc que ce test, peu ou non stressant, soit approprié chez le rongeur. De plus, il entraîne peu de manipulations par l'expérimentateur et peu d'entraînement.

L'étude de la communication animale via l'analyse des ultrasons est de plus en plus répandue (522 résultats sur PubMed entre 1961 et 2000 ; 1611 résultats entre 2000 et 2022 pour le terme « ultrasonic vocalizations »). Les rats émettent des vocalisations inaudibles pour l'Homme que l'on appelle vocalisations en ultrasons (USV) (Anderson 1954). Il a été prouvé que les vocalisations de fréquences dites « 22kHz » sont préférentiellement émises lors de situations « négatives » comme une défaite lors d'un duel reproductif, des frustrations... (S. M. Brudzynski et al. 1993) Ce type de vocalisation est compris entre 18 et 32 kHz et peut être séparé en deux sous-catégories : les « long calls », avec une durée comprise entre 301ms et 600ms, sans réel pic de fréquence, et les « short calls » entre 20 et 300 ms avec généralement un pic de fréquence autour de 150 ms (Figure 19). Il existe aussi des vocalisations dites « 50 kHz ». Elles sont émises lors de situations considérées comme positives pour l'animal, au moment d'une récompense par exemple ou lors d'interactions sociales via des « contact calls ». Elles reflètent donc un état émotionnel associé au plaisir chez le rat (Burgdorf and Moskal 2010; Saito, Tachibana, and Okanoya 2019). Elles sont divisées en deux sous-catégories: les vocalisations « FM » soit « Frequency Modulated » (Figure 19), impliquant une variation de fréquence au cours de la vocalisation incluant 13 catégories, et les vocalisations dites « flat » (Figure 19), n'impliquant aucune variation de

fréquence au cours de leur émission, soit 14 types au total. Les catégories les plus courantes sont les « flat » (correspondant à des vocalisations sans grande variation de fréquence avec discontinuité), les « trills » (correspondant à des modulations de fréquence sans discontinuité), les « step » (correspondant à une variation brusque de fréquence dans la vocalisation), et les « step-trills » (soit l’alternance d’une « flat » et d’une « trill ») (Stefan M. Brudzynski 2013). La durée des vocalisations serait un indicatif de l’intensité de l’émotion ressentie par le rat. Ainsi, dans la catégorie des 22kHz, les « long calls » reflètent une émotion plus négative que les « short calls » et de la même façon les vocalisations « FM » reflètent une émotion plus positive que les « flat », dans la catégorie des 50 kHz (Barker 2018). Dans notre étude, nous nous intéresserons uniquement à distinguer les communications dites 22kHz de celles dites 50kHz.

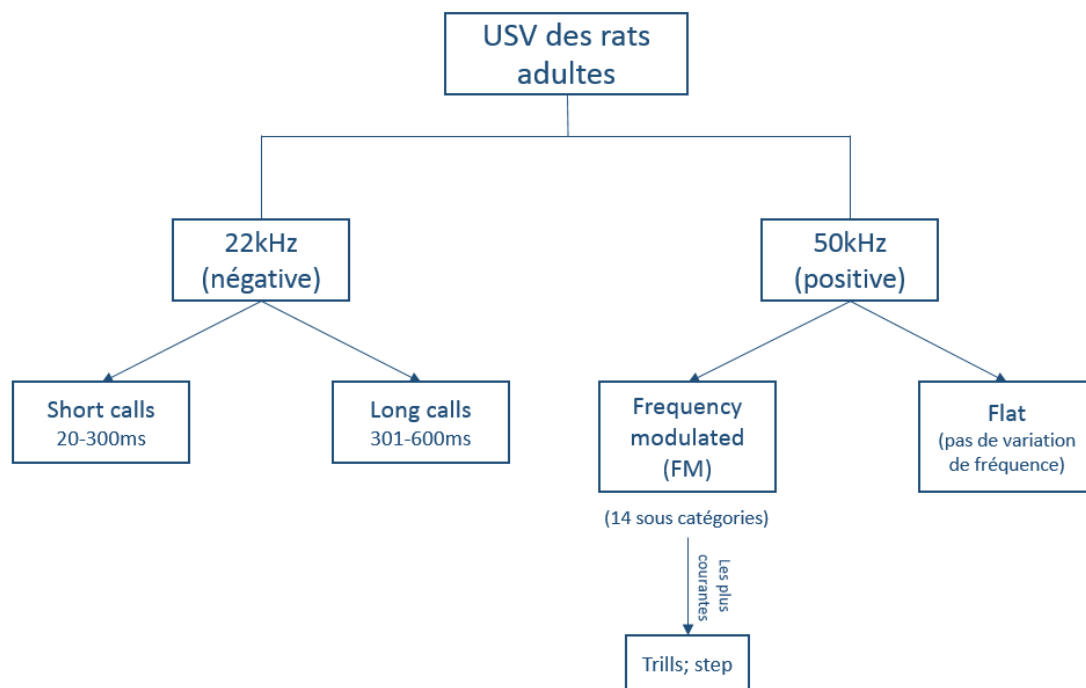


Figure 19: Classification simplifiée des vocalisations en ultrasons (USV) de rats adultes.

Pour cette étude, nous nous sommes basés sur la littérature pour émettre l’hypothèse que la fragmentation de sommeil aurait un impact sur le comportement des rats, et ce, quel que soit l’âge. Nous pensons qu’elle

aura un impact négatif sur la mémoire, avec une moins bonne mémorisation, et sur la communication, avec une diminution du nombre de vocalisations totales et une augmentation du nombre de vocalisations aversives à 22kHz.

2. Matériels et méthodes

L'utilisation d'animaux vivants

Les différents protocoles incluant des animaux ont été approuvés par le Ministère de l'enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (MESRI). Ceux-ci ont été faits en respect du bien-être animal (n°DAP rats jeunes : #23970-2020010711388451 version 5 ; rats âgés : #33280-2021092909367318 version 4).

Tous les animaux ont été hébergés dans les mêmes conditions au PLEXAN (plateforme expérimentations et analyses), Faculté de Médecine J. Lisfranc, Université Jean Monnet de Saint Etienne (France), sous environnement contrôlé (cycle jour/nuit de 12h/12h, température 19-21°C). Quel que soit le protocole, l'animal avait de l'eau et de la nourriture *ad libitum*.

Les rats mâles Wistar ont été fournis par les laboratoires Janvier (France). Afin d'étudier les effets de la fragmentation de sommeil sur le comportement, des rats jeunes de 7 semaines ont été choisis dans un premier temps, et des rats d'âge moyen de 1 an ont été sélectionnés dans un deuxième temps.

Afin d'avoir un suivi de l'animal durant le protocole, deux pesées étaient effectuées par semaine.

Les animaux sont répartis dans deux groupes : contrôle (ctrl) et sommeil fragmenté (SF).

Méthode de fragmentation de sommeil

Une méthode utilisée et approuvée dans le cadre d'une privation de sommeil a été utilisée par d'autres auteurs (Leenaars et al. 2011). Elle consiste en un cylindre divisé en deux par une paroi (Figure 20). Chaque cage peut ainsi accueillir 2 rats. Le plateau de ces cages est entouré d'une courroie reliée à un moteur permettant le mouvement rotatif aléatoire du sol de la cage. La vitesse de rotation peut être réglée de telle façon que le rat soit obligé de buter contre la paroi ce qui va provoquer un microéveil. Ce système évite

ainsi les manipulations de l'homme et peut fonctionner en parfaite autonomie.



Figure 20: Cage de fragmentation (photo personnelle)

Elle fonctionne selon le cycle 9 sec. ON et 110 sec. OFF afin de mimer une fragmentation de sommeil sévère (chez l'Homme). Les animaux du groupe SF vont voir les cages tourner durant leur 12h de sommeil selon ce cycle (Figure 21). Afin d'éviter toute inversion de cycle jour/nuit ou un décalage de phase avec récupération, les cages tourneront également 15 minutes toutes les 45 minutes durant les 12h d'activité du rat selon le même cycle que la nuit (Figure 21).

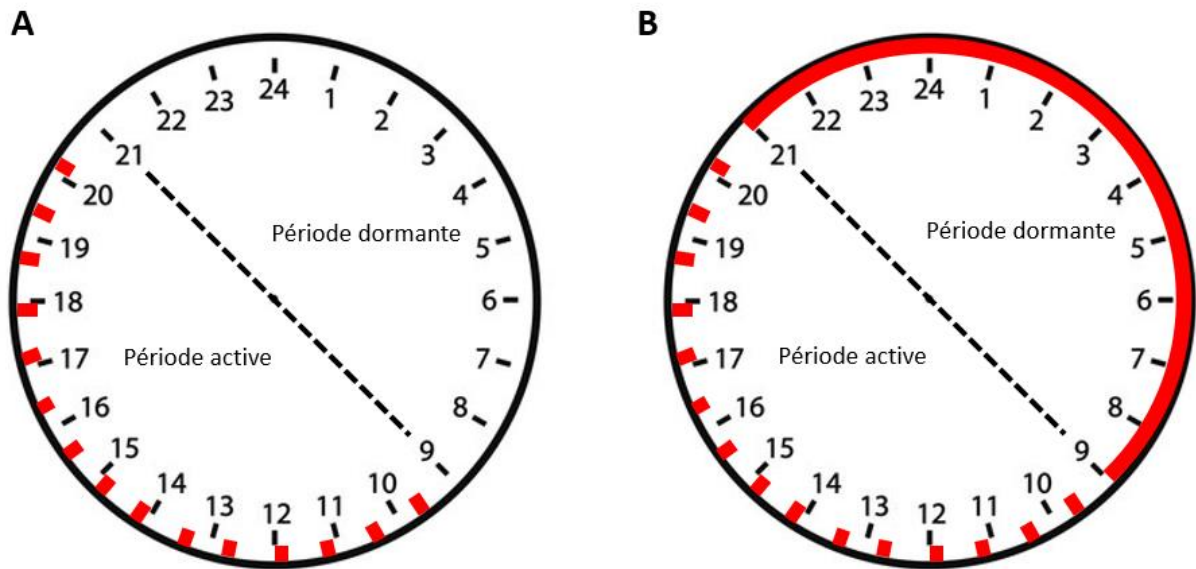
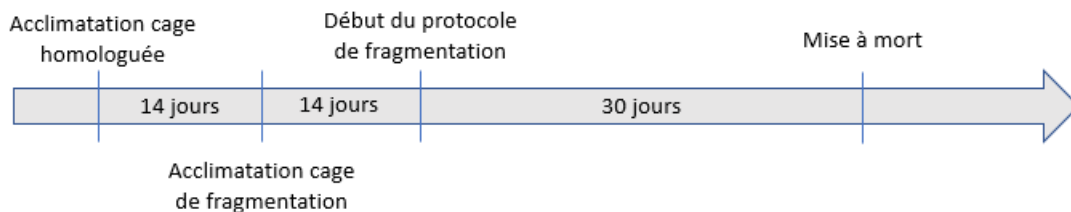


Figure 21: cycle de rotation des cages (A) contrôle et (B) sommeil fragmenté sur 24h. L'inversion du cycle jour nuit de la salle des animaux a permis de calquer leur rythme éveil/sommeil au nôtre. En rouge, les moments de rotation de la cage sous le cycle 9 sec. ON et 110 sec. OFF

Les cages du groupe contrôle ne tourneront pas la nuit, par contre la pression durant la période d'activité sera la même que pour le groupe SF.

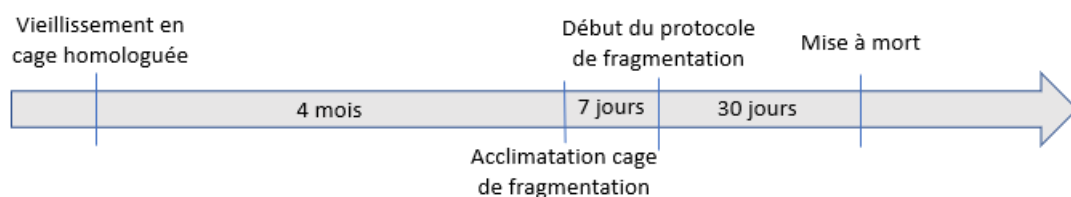
Les expériences ont suivi deux protocoles :

Protocole 1 : rats jeunes de 7 semaines à leur arrivée à l'animalerie.



Dans le protocole 1 nous avons obtenu un $n = 12$ pour les rats du groupe contrôle et $n = 14$ pour ceux du groupe SF.

Protocole 2 : rats âgés de 8 mois à leur arrivée à l'animalerie.



Pour le protocole 2 nous avons un $n = 10$ pour le groupe contrôle et $n = 12$ pour le groupe SF.

Test de mémoire spatiale : le labyrinthe en Y

Afin d'évaluer des différences comportementales entre les deux groupes, et plus particulièrement au niveau de la mémoire dans l'espace, le labyrinthe en Y a été utilisé. Il consiste en 3 bras reliés par le centre et à 120° les uns des autres. Les bras mesurent 45cm*10cm*35cm (L*I*h).

Pendant les 3 jours précédant le test, le rat est placé dans le labyrinthe pendant 5 minutes : c'est la phase d'acclimatation. Le jour du test, il est placé dans le labyrinthe pendant 10 minutes. Tous les rats sont placés au même endroit au début du test. Ses mouvements sont filmés par GoPro avec l'expérimentateur à l'extérieur de la salle. Les tests sont réalisés à la 2^{ème} semaine du protocole, avant leur période d'activité, et à la 3^{ème} semaine de protocole, avant qu'ils dorment. Les bras du Y seront appelés A, B et C. L'alternance et le nombre d'entrées dans les bras seront notés. Si les 3 lettres sortent à la suite (ABC, ACB, BCA, BAC, CBA, CAB), la réponse est correcte (Figure 22). Si lors de la combinaison des trois lettres il y a une erreur, la réponse est considérée comme inadaptée ou fausse.

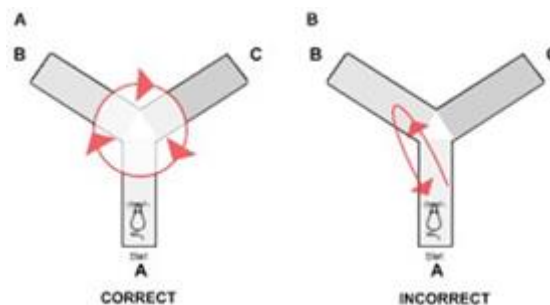


Figure 22: Représentation des combinaisons correctes et incorrectes selon la méthode des bras alternés.

Ex: rat 30 (SF): B A C B C B A B C A C B C A B C 9 combinaisons correctes

Nous aurons ainsi deux données : le déplacement des rats représenté par le nombre d'entrées (dans l'exemple, n=16) et le pourcentage de réponses correctes données par la formule :

$$\text{Pourcentage de combinaisons correctes} = \frac{\text{Nb de combinaisons correctes}}{\text{Nb de combinaisons totales}} \times 100$$

Les rats ayant effectué moins de 5 entrées ont été écartés pour le calcul de pourcentage de combinaisons correctes (décision basée sur la difficulté de représentativité d'un calcul de pourcentage avec seulement 3 combinaisons possibles).

2 séries de labyrinthes en Y ont été effectuées. La première après deux semaines de protocole avant leur période active. La deuxième après trois semaines de protocole après la période active.

Détection des vocalisations : étude pilote sur 8 rats du protocole 2 « rats âgés »

Les rats âgés ont été enregistrés pendant 15 minutes toutes les heures. Un micro AudioMoth (AM) version 1.2.0 est posé sur chaque cage. Chaque AM

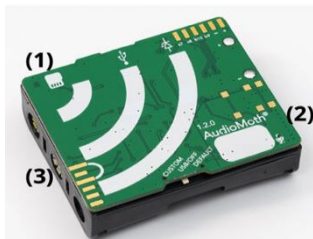


Figure 23: AudioMoth v1.2.0.
(1) Microcarte SD, (2) Micro, (3)
Emplacement des 3 piles « AA »
(image : Amandine Cascarino)

fonctionne avec 3 piles « AA » et une microcarte SD (Figure 23). Chaque AM a un micro-logiciel 1.7.1. Ils ont été configurés avec une fréquence d'échantillonnage égale à 250 kHz et le gain est réglé sur « medium ». Pour une question de praticité, les données des AM sont recueillies deux fois par semaine, au moment des changes de litières et des pesées, soit le mardi et le vendredi. De plus, lors de ces changements, l'AM est changé de place afin d'enregistrer l'autre rat du binôme, pour chaque cage de fragmentation. Ils ont été enregistrés pendant 4 jours selon ce protocole, avant le début de la fragmentation. Ces données sont utilisées comme contrôle.

Les vocalisations ont été détectées via le logiciel Deepsqueak v3.0.1 utilisable sur Matlab.

Analyses statistiques

Les statistiques ont été effectuées sur R. Après vérification de la normalité des données avec le test de Shapiro et de l'homoscédasticité des variances avec le test de Bartlett, j'ai effectué des tests paramétriques avec le test de

Student si je n'avais que deux groupes à comparer et l'ANOVA si j'avais plus de deux groupes et les tests non paramétriques de Wilcoxon et de Kruskal Wallis. Une p-value < 0.05 est considérée comme significative.

3 . Résultats

Fragmentation de sommeil et poids

Nous avons étudié l'évolution du poids des animaux au cours de la fragmentation. Nous l'avons représentée sur les graphes suivants.

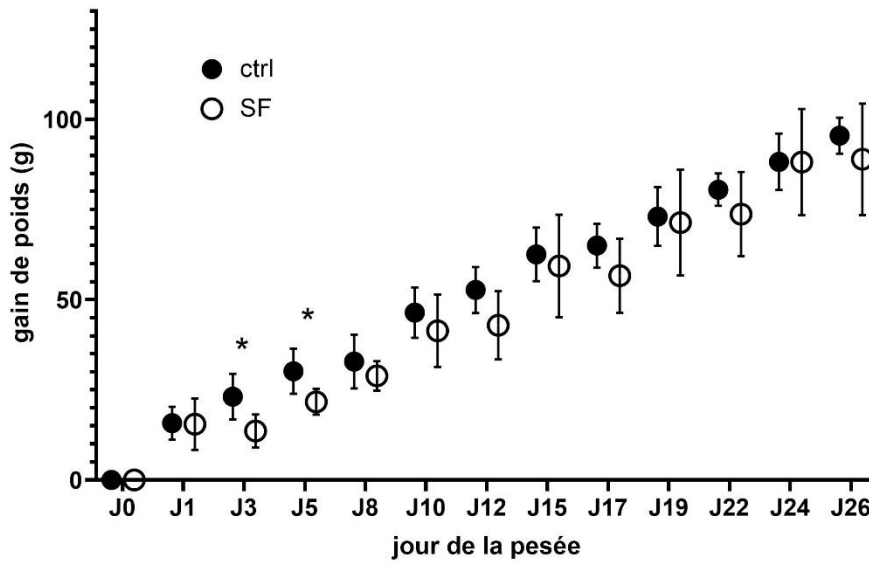


Figure 24: variation du poids des rats jeunes à partir du début de protocole de fragmentation de sommeil (J0). n=12 chez les ctrl et n=14 chez les SF. ctrl: contrôle; SF: sommeil fragmenté. *p-value < 0.05

La figure 24 montre l'évolution du poids des rats jeunes en fonction de leur condition contrôle ou SF. Mis à part à J3 et J5, il n'y a aucune différence dans l'évolution du poids selon le groupe.

Observons si la fragmentation de sommeil a un impact sur le poids des rats âgés.

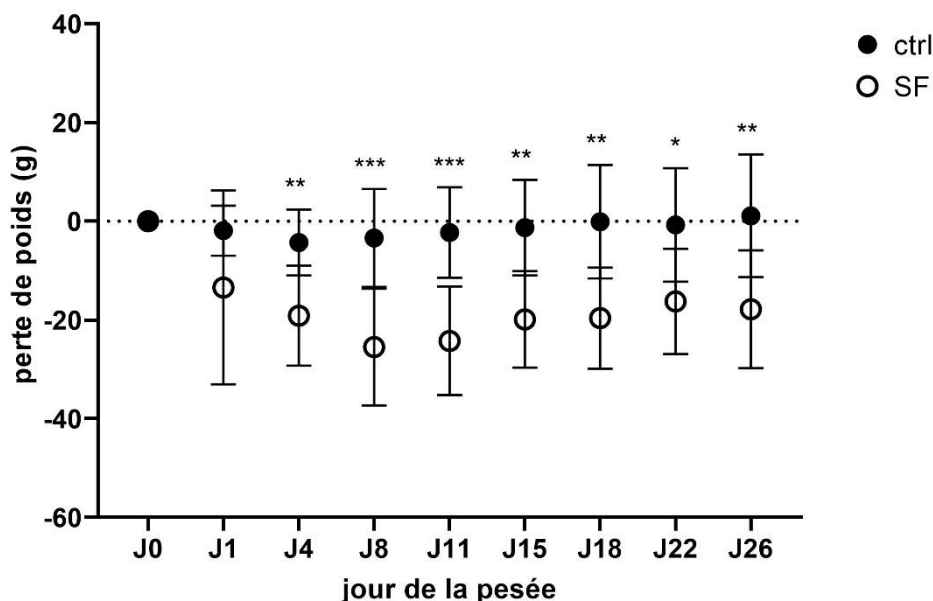


Figure 25: variation du poids des rats âgés à partir du début de protocole de fragmentation de sommeil (J0). n=10 chez les ctrl et n=12 chez les SF. ctrl: contrôle; SF: sommeil fragmenté. *p-value<0.05; **p-value<0.01; ***p-value<0.001

La figure 25 montre l'évolution du poids des rats âgés en fonction de leur groupe contrôle ou SF. A J4, on observe une différence significative de l'évolution du poids. Les rats SF perdent plus de poids durant le protocole que les rats âgés contrôles. Ils perdent en moyenne entre 20 et 30 grammes en comparaison des rats contrôles ce qui représente environ 3 à 5% de leur poids. Nous considérons qu'à partir de 10% de perte de poids par rapport au poids de départ, le rat est euthanasié (car en trop grande souffrance). (Cela n'a pas été nécessaire durant mes protocoles).

Dans un second temps, nous avons évalué l'effet de la fragmentation de sommeil sur la mémoire spatiale à l'aide du labyrinthe en Y.

Labyrinthe en Y : rats jeunes

Nous avons obtenu deux types de mesures qui renseignent :

- Sur la mémoire spatiale du rat avec le pourcentage de combinaisons correctes
- Sur sa mobilité avec le nombre d'entrées effectué.

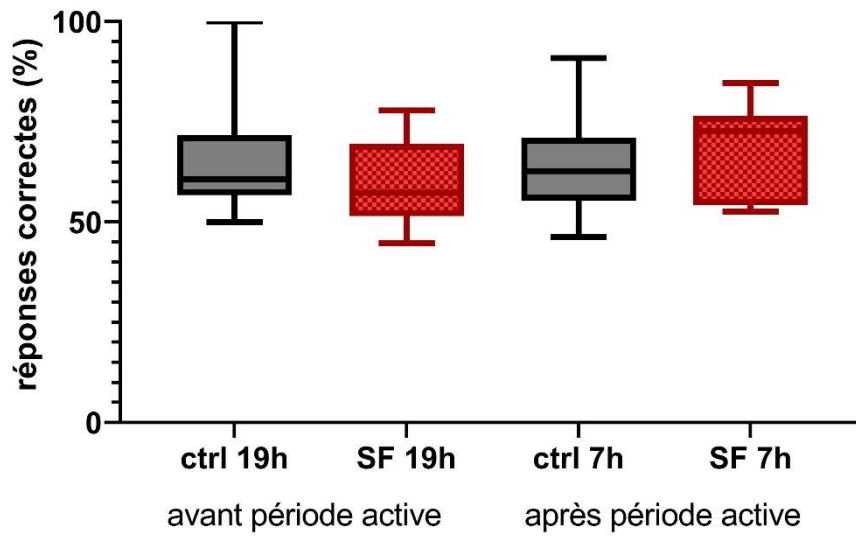


Figure 26: Pourcentage de réponses correctes lors du labyrinthe en Y pour les rats jeunes. $n=10$ pour les ctrl et $n=10$ pour les SF. 19h correspond à avant leur période active et 7h après leur période active. ctrl : groupe contrôle ; SF : groupe au sommeil fragmenté.

La figure 26 montre les résultats du labyrinthe en Y chez les rats jeunes contrôles et fragmentés en fonction de l'heure à laquelle a été fait le test. Aucune différence significative n'a été relevée. Le pourcentage de réponse correcte est d'environ 65%, quels que soient le groupe et l'heure de réalisation du test.

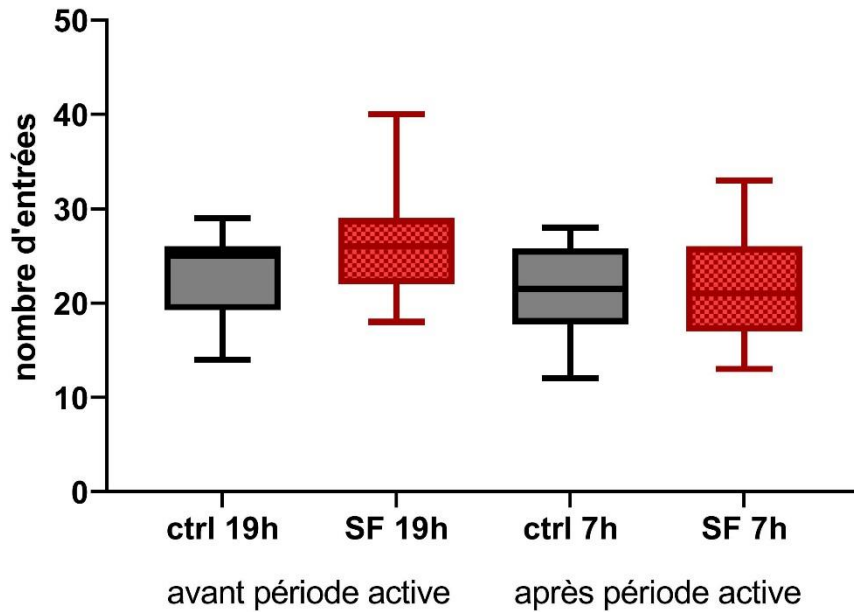


Figure 27: Nombre d'entrées effectué lors du labyrinthe en Y pour les rats jeunes. $n=10$ pour les ctrl et $n=10$ pour les SF. 19h correspond à avant leur période active et 7h après leur période active. ctrl : groupe contrôle ; SF : groupe au sommeil fragmenté.

La figure 27 montre le nombre d'entrées du labyrinthe en Y chez les rats jeunes contrôles et fragmentés en fonction de l'heure à laquelle a été faite le test. Aucune tendance ne ressort de ce test. Le nombre d'entrées est approximativement le même, quels que soient le groupe et l'heure du test.

Labyrinthe en Y : rats âgés

Suite au protocole 1 effectué sur rats jeunes, nous avons effectué les mêmes tests sur des rats âgés de 1 an. Ci-après sont présentés les résultats obtenus.

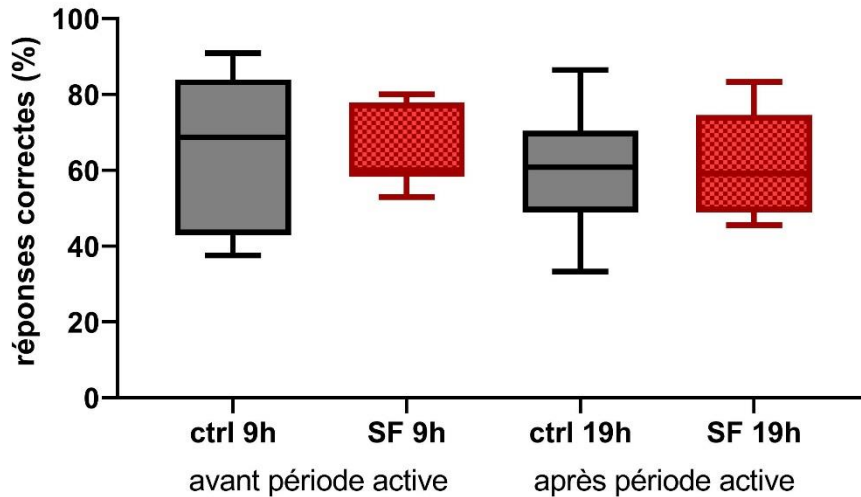


Figure 28: Pourcentage de combinaisons correctes lors du labyrinthe en Y pour les rats âgés. $n=10$ pour les ctrl et $n=7$ pour les SF. 9h correspond à avant leur période active et 19h après leur période active. ctrl : groupe contrôle ; SF : groupe au sommeil fragmenté.

Nous n’observons aucune différence significative de pourcentage de réponses correctes entre les groupes contrôles et fragmentés des rats âgés, et ce, quelle que soit l’heure de réalisation du test (Figure 28).

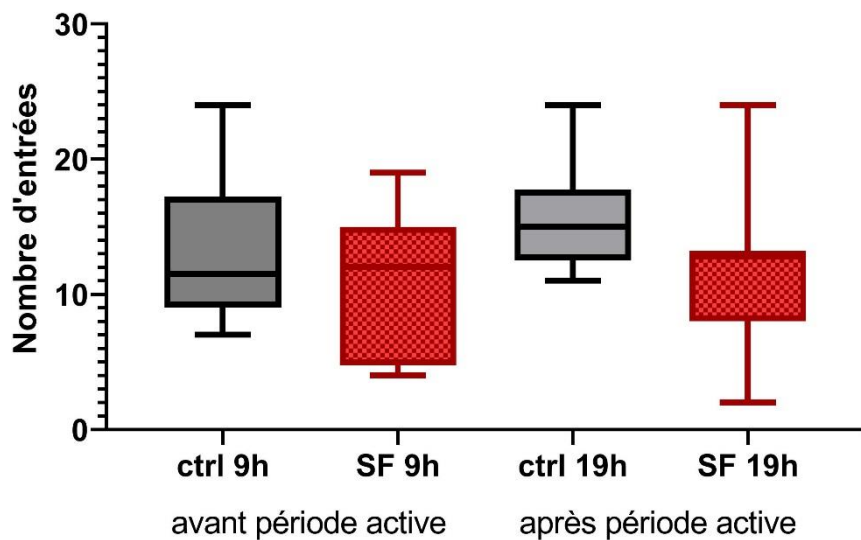


Figure 29: Nombre d’entrées effectué lors du labyrinthe en Y pour les rats âgés. $n=10$ pour les ctrl et $n=10$ pour les SF. 9h correspond à avant leur période active et 19h après leur période active. ctrl : groupe contrôle ; SF : groupe au sommeil fragmenté.

Nous n’observons aucune différence significative du nombre d’entrées entre les groupes contrôles et fragmentés des rats âgés, et ce, quelle que soit l’heure du test (Figure 29). Nous pouvons cependant noter que le groupe

SF à 19h a une amplitude de variation du nombre d'entrées plus importante que les autres groupes. Toutefois, cette variation n'est pas significative.

Labyrinthe en Y : comparaison jeunes et âgés

Après avoir obtenu les résultats des labyrinthes en Y chez les rats jeunes et âgés, nous avons comparé les résultats des deux protocoles.

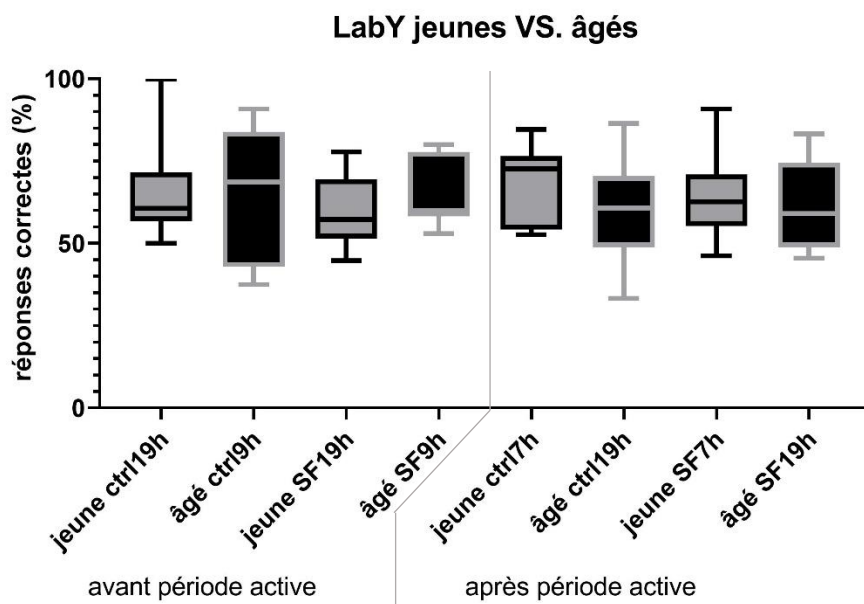


Figure 30: Comparaison du pourcentage de réponses correctes entre les groupes de rats jeunes et âgés.

Les pourcentages de réponses correctes ont été comparés entre rats âgés et rats jeunes qui ont fait le « même » test de labyrinthe en Y (les contrôles avant période active, les SF avant période active, les contrôles après période active et les SF après période active) (Figure 30). On ne voit aucune différence entre les groupes.

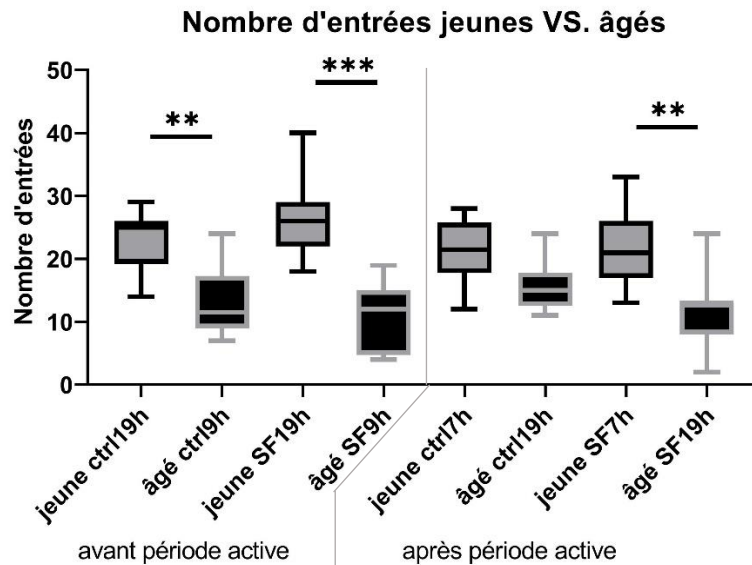


Figure 31: Comparaison du nombre d'entrées entre rats jeunes et rats âgés. **p-value<0.01; ***p-value<0.001

Une comparaison du nombre d'entrées entre les rats jeunes et les rats âgés a été effectuée. Cette comparaison est faite uniquement entre les différents groupes qui correspondent au même type de test de labyrinthe en Y (les contrôles avant période active, les SF avant période active, les contrôles après période active et les SF après période active). Nous pouvons voir que de manière générale les rats âgés font moins de déplacement dans le labyrinthe et de manière significative entre tous les groupes sauf les contrôles après période active (Figure 31).

Afin de compléter les données comportementales obtenues avec le labyrinthe en Y, nous avons enregistré, sur une étude pilote de 8 rats du protocole 2 (soit des rats âgés uniquement), les données bioacoustiques lors de ces mêmes tests de labyrinthe en Y.

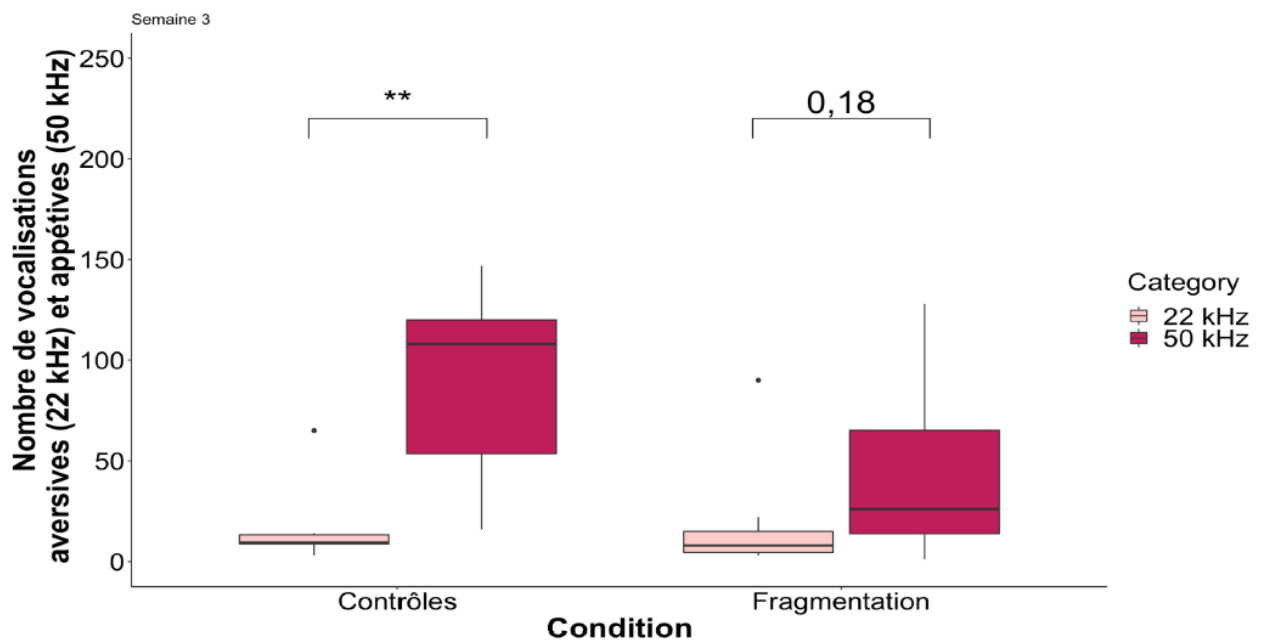


Figure 32: Nombre de vocalisations de catégories 22 kHz (en rose) et 50 kHz (en rouge), lors du test du labyrinthe en Y, selon la condition des individus. $n=4$ ctrl et $n=4$ SF. $**p\text{-value} < 0.01$

Sur la Figure 32, nous pouvons voir un nombre plus important de vocalisations à valence positive qui est significatif chez les contrôles, et non significatif chez les SF, par rapport aux vocalisations aversives lors du labyrinthe en Y.

Vocalisations

Sur cette même étude pilote de 8 rats âgés du protocole 2, des enregistrements bioacoustiques ont été effectués pendant le protocole afin de déterminer l'impact de la fragmentation de sommeil sur la communication. Deux types de données en sont sortis : le nombre de vocalisations émises par les rats contrôles et SF, et le nombre de vocalisations à valence positive (50 kHz) et négative (22 kHz) pour les deux groupes.

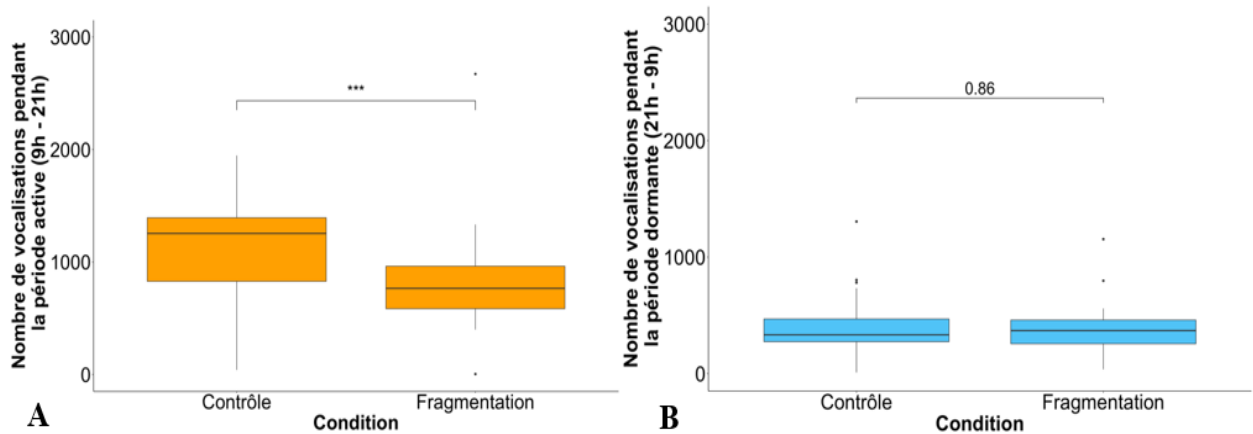


Figure 33: (A) Nombre de vocalisations pendant la période active (9h - 21h) et (B) pendant la période dormante (21h - 9h) en fonction du groupe (contrôle ou fragmenté). $n=4$ ctrl et $n=4$ SF. *** p -value < 0.001

La figure 33 montre le nombre de vocalisations émises par le rat pendant les périodes « de sommeil » et active. Lors de cette dernière, nous observons que les rats contrôles émettent significativement plus de vocalisations que les SF. Cette tendance n'est pas observée en période théorique de sommeil.

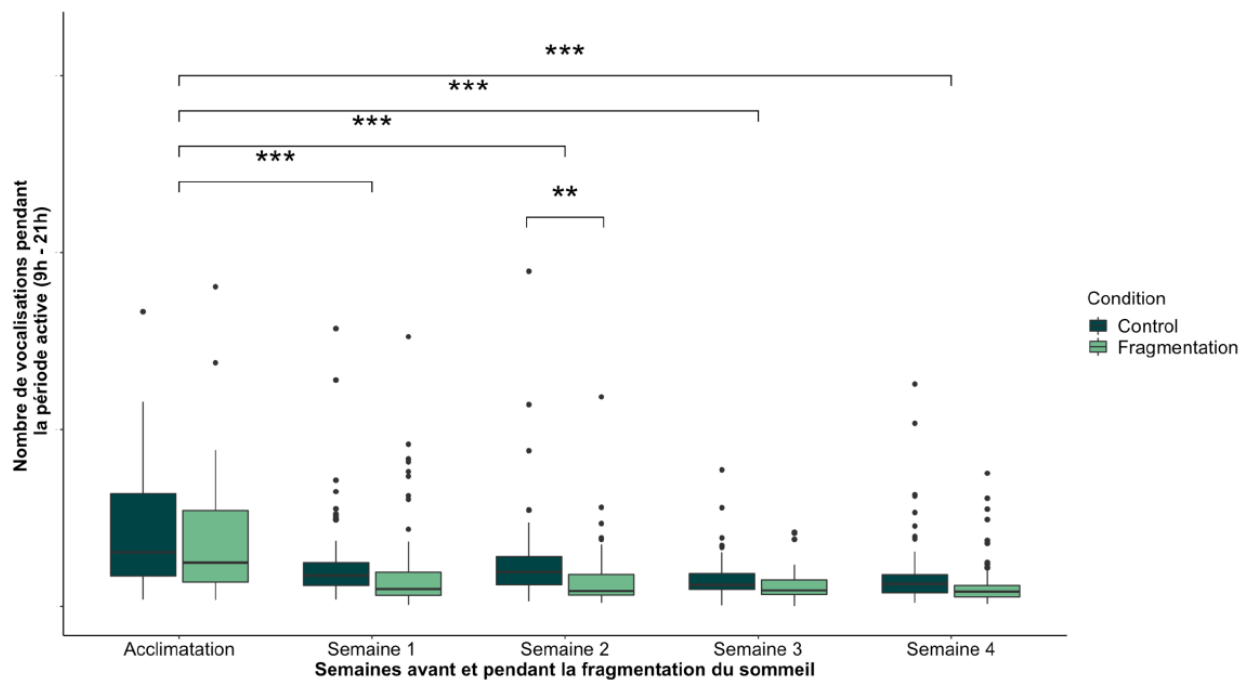


Figure 34: Vocalisations pendant la période active (9h - 21h) pendant l'acclimatation et le protocole de fragmentation en fonction du groupe des individus (contrôles en vert foncé, fragmentés en vert clair). $n=4$ ctrl et $n=4$ SF. * p -value < 0.05, ** p -value < 0.01, *** p -value < 0.001

Nous pouvons voir sur la Figure 34 le nombre de vocalisations émises par les rats de l'acclimatation à la dernière semaine de protocole. Celles-ci

diminuent significativement entre l'acclimatation et toutes les semaines du protocole. Aucune différence significative n'a été observée entre les groupes sauf durant la semaine 2 du protocole où les contrôles émettent plus de vocalisations que les SF.

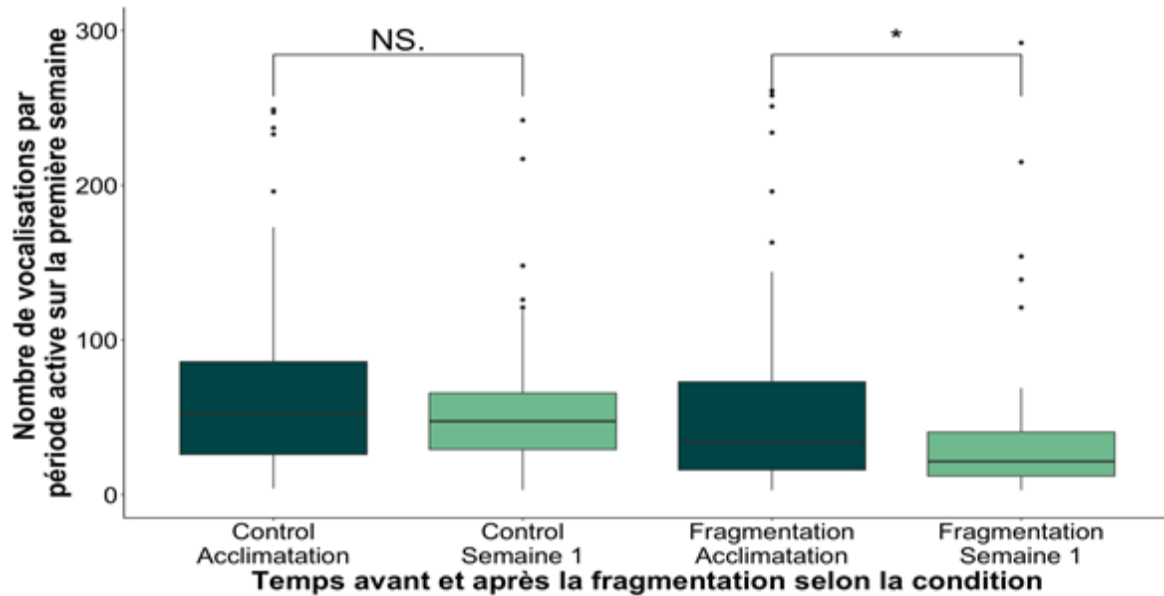


Figure 35: Nombre de vocalisations, pendant les trois derniers jours d'acclimatation (en foncé) et les trois premiers jours de protocole de fragmentation (en clair), lors de la période active, en fonction du groupe des individus. $n=4$ ctrl et $n=4$ SF. NS : non significatif, * p -value < 0.05

La Figure 35 représente le nombre de vocalisations durant les trois derniers jours d'acclimatation et les trois premiers jours du protocole de fragmentation entre les rats contrôles et les rats SF. Nous pouvons voir que le nombre de vocalisations ne changent pas de façon significative chez le groupe contrôle. Par contre chez le groupe SF nous pouvons voir qu'il y a une diminution significative du nombre de vocalisations entre l'acclimatation et le début du protocole.

Afin de déterminer l'évolution du type de communication (22kHz et 50kHz) au fil du protocole, nous avons calculé le nombre de vocalisations émises dans chaque catégorie.

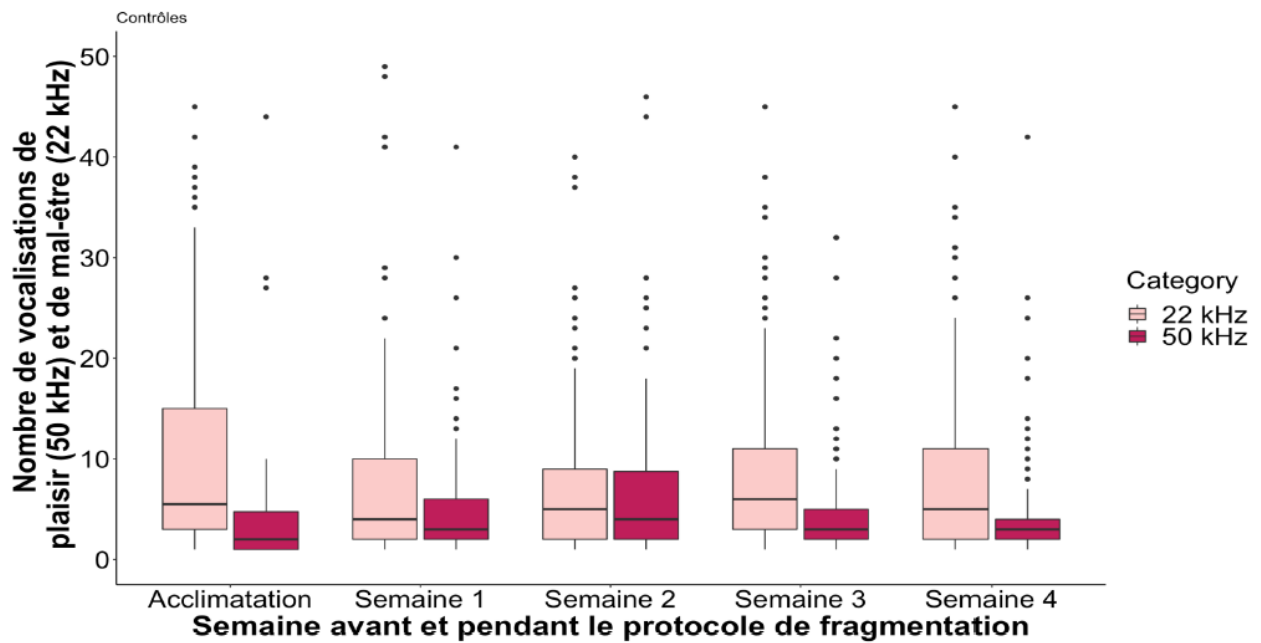


Figure 36 : Nombre de vocalisations de catégories 22 kHz (en rose) et 50 kHz (en rouge), avant et pendant le protocole de fragmentation, chez les individus contrôles. $n=4$ ctrl et $n=4$ SF.

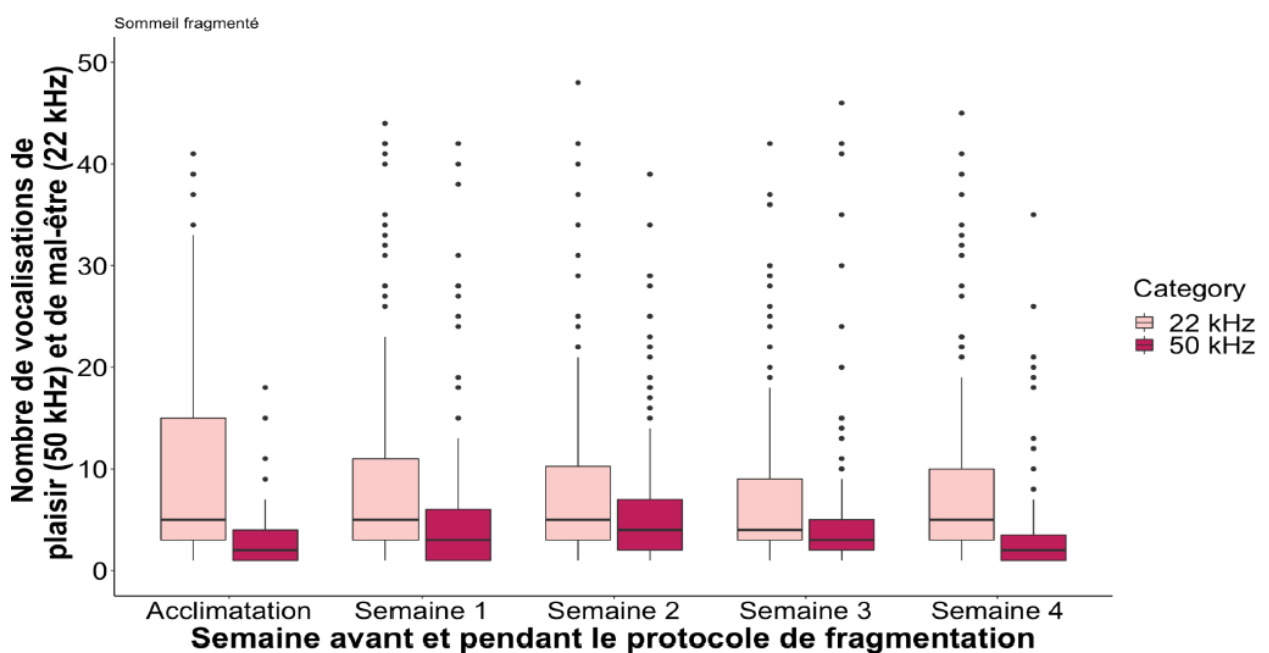


Figure 37: Nombre de vocalisations de catégories 22 kHz (en rose) et 50 kHz (en rouge), avant et pendant le protocole de fragmentation, chez les individus au sommeil fragmenté. $n=4$ ctrl et $n=4$ SF.

Les figures 36 et 37 montrent le nombre de vocalisations 22kHz et 50kHz en fonction de l'avancé du protocole chez les contrôles et les SF respectivement. Nous pouvons noter une diminution globale du nombre de

vocalisations et une tendance à avoir moins de vocalisations à 50kHz qu'à 22kHz. Cependant, ces résultats ne sont pas significatifs.

4 . Discussion

Courbe de poids

Les pesées ont eu pour objectif premier de servir d'indice direct de l'état des rats. En effet, des rats en mauvaise santé tendent à perdre du poids. La courbe pondérale est d'ailleurs un indicateur du bien-être animal. Au-delà de 10% de perte de poids par rapport au poids initial, le rat peut être écarté du protocole et euthanasié. Nous nous sommes rendu compte au fur et à mesure des pesées qu'il était intéressant d'exploiter ces résultats au sein de notre étude. Aucune différence majeure dans la prise alimentaire n'a été décelée tout au long du protocole. Nous avons également fait des dosages de cortisol (hormone du stress) (voir annexe 1) dans le sérum des 6 premiers rats âgés du protocole 2 afin de voir si notre protocole provoquait un stress chez nos animaux. Si ça avait été le cas, la concentration en cortisol dans le sérum de nos rats SF aurait été plus importante que chez nos rats contrôles. Or le taux de cortisol était approximativement le même chez tous les rats.

Nous nous attendions à ce que la fragmentation de sommeil ait un impact négatif sur le poids des rats : un retard de croissance pour les jeunes et un gain de poids pour les âgés. En effet, dans la littérature, il est clair que l'hormone de croissance (GH) est sécrétée durant la nuit et que cette sécrétion n'est pas linéaire (Takahashi, Kipnis, and Daughaday 1968). Il est nécessaire d'avoir une nuit composée de cycles de sommeil passant par les 4 stades de sommeil (NREM 1, 2 et 3 et REM) pour une régulation optimale de la GH. Nous pensions qu'une interruption répétée du cycle de sommeil engendrée par la fragmentation de sommeil aurait un effet visible sur la croissance. Mis à part un léger décalage de croissance à J3 et J5, il n'y a pas de différence entre le groupe contrôle et le groupe SF. Une explication serait un protocole potentiellement inadapté ou alors que les rats ont une certaine résilience à ce stress.

Cependant, chez les rats âgés, nous observons une perte de poids significative des rats SF par rapport aux contrôles. Ce résultat n'est pas en accord avec ce qui est décrit dans la littérature. En effet on remarque plutôt une prise de poids chez les sujets atteints de SF (Y. Wang et al. 2014). Une étude effectuée sur des souris jeunes adultes a montré une prise de poids plus importante pour les souris soumises à la fragmentation de sommeil que pour les contrôles. Les souris ont été mises dans des cages avec une barre qui balaie le sol de la cage toutes les 2 minutes. Le protocole a duré 8 semaines. La nourriture consommée a été pesée et les souris également. Le résultat était une consommation plus importante de nourriture et une augmentation de la masse adipeuse pour les souris SF par rapport aux contrôles (Y. Wang et al. 2014).

Il est important de noter que la fragmentation de sommeil n'a pas fragilisé les rats au point qu'ils dépassent le seuil de "non-retour". Le protocole n'a pas été traumatisant au point de devoir retirer des rats du protocole. Cependant, à la lecture des résultats obtenus et la littérature, on peut se demander si c'est bien la fragmentation de sommeil qui leur a fait perdre du poids ou l'activité motrice supplémentaire engendrée par la rotation du plateau de la cage de fragmentation ? En sachant que la concentration en cortisol dans le sérum ne diffère pas entre les rats contrôles et les rats SF, nous pourrions émettre l'hypothèse que c'est l'exercice physique dû à la rotation de la cage qui est à l'origine de la perte de poids des rats âgés. Cette hypothèse confirmerait également pourquoi nous n'observons aucun retard de croissance chez les rats jeunes SF.

Test de mémoire spatiale : le labyrinthe en Y

Il est connu que la fragmentation de sommeil a un impact sur le processus de mémorisation (Tartar et al. 2006b; Ward, McCarley, and Strecker 2009). Pour déterminer cet impact, il est nécessaire d'utiliser des outils qui permettent l'évaluation de la mémoire. Une étude chez l'Homme a été faite chez de patients contrôles et des patients souffrant d'apnée du sommeil. Rappelons qu'une des composantes de l'apnée du sommeil est la

fragmentation de sommeil. Des tests de mémoires ont été effectués avant et après la nuit de sommeil. Les résultats indiquent des courbes d'apprentissage de la « mirror tracing task » aplaties le soir et le matin et un taux de rétention verbale significativement plus faible du soir au matin chez les patients apnéiques (Kloepfer et al. 2009). C'est pour cela que nous avons décidé d'effectuer un test avant et un test après la période active.

Nous nous attendions à ce que les rats SF aient moins de réponses correctes que les contrôles avec le même déplacement, signe d'une détérioration de la mémoire spatiale. Or chez les rats jeunes ou les rats âgés, nous n'observons pas de différence entre les groupes que ce soit avant ou après la période active. De la même façon, le pourcentage de réponses correctes est sensiblement le même entre les rats jeunes et les rats âgés, quelle que soit l'heure de passation du test. Par contre, le nombre d'entrées, qui sert de référentiel de déplacements, n'est pas le même en fonction de l'âge. En effet, avant la période active, nous observons une différence significative du nombre d'entrées entre les rats jeunes et les rats âgés avec moins de déplacements pour ces derniers.

Ce résultat est cohérent avec ce que l'on peut retrouver chez l'Homme. En effet, avec l'âge, on observe une diminution des déplacements pour un test d'exploration comme le labyrinthe en Y.

Les résultats du labyrinthe en Y sont donc ambigus. D'un côté, nous n'observons pas de différence au niveau de l'évaluation de la mémoire. Par contre, les résultats sont cohérents pour l'âge pour le nombre d'entrées. Ces résultats tendent à indiquer que ce test est pertinent et que ce protocole de fragmentation sur 4 semaines de fragmentation n'impacte pas la mémoire spatiale explorée par le test du labyrinthe en Y et ceci, quel que soit l'âge de ce modèle murin.

De plus, les rats ont un sommeil naturellement fragmenté selon plusieurs cycles de 10 à 14 minutes durant les 12-15h de sommeil (Toth and Bhargava 2013). Cette étude est en contradiction avec ce qui a été trouvé

sur enregistrements EEG. Des études EEG montrent que les rats partagent des similarités importantes avec l'Homme en termes de sommeil. Les principales similarités entre personnes âgées et rats âgés sont une diminution de la durée moyenne des épisodes de sommeil, une augmentation du nombre d'épisodes de sommeil et une réduction modeste du sommeil paradoxal (Rosenberg, Zepelin, and Rechtschaffen 1979). Une étude a travaillé sur des rats jeunes (3mois), jeunes adultes (12 mois) et âgés (24mois). Ils ont trouvé des différences et des similarités entre l'âge et le sommeil des rats et des Hommes (Mendelson and Bergmann 1999). Les analyses de variance n'ont révélé aucun changement lié à l'âge dans le sommeil total, le sommeil NREM ou REM, le temps d'éveil après le début du sommeil ou trois mesures différentes de l'amplitude du rythme circadien veille/sommeil. Ils ont toutefois observé des réductions significatives liées à l'âge du sommeil NREM, de la durée moyenne des épisodes de sommeil et de la durée de l'apparition du sommeil paradoxal. Ces réductions ont été observées chez les rats âgés d'un an, ce qui indique que les changements observés chez les animaux plus âgés étaient déjà évidents au milieu de la vie.

En ce qui concerne le labyrinthe en Y, il a été choisi parce qu'il montrait un protocole facile d'utilisation, très peu de manipulations de l'animal et peu de stress traduit par des vocalisations à valence positive dans la littérature (Costa, Serra, and Simola 2021). Nos résultats vont dans le même sens que cet article (Figure 14).

L'étude des vocalisations est de plus en plus utilisée pour déterminer des troubles de la communication, ou encore si la situation à laquelle est soumise l'animal provoque de l'inconfort ou non.

Les vocalisations

Des études ont montré que le labyrinthe en Y n'induisait pas de stress chez le rat. Une équipe a travaillé sur les vocalisations de rats émises lors du test

et a montré des vocalisations de 50kHz, positives, durant le test comparé au niveau basal (Costa, Serra, and Simola 2021).

Nous nous attendions à ce que les rats contrôles ne montrent aucun changement quant aux nombres de vocalisations durant le protocole, puisqu'ils ne subissent que la pression journalière (avec la mobilisation des cages), sans la fragmentation de sommeil. Nous pensions également que chez les rats SF nous aurions une diminution du nombre de vocalisations au fur et à mesure du protocole, signe que la fragmentation de sommeil impacte la communication. De manière générale, le nombre de vocalisations diminue significativement entre l'acclimatation et le protocole, et ce, sans différence entre les groupes. Aucune différence intergroupe n'est observée sauf en semaine 2. En semaine 2, les rats contrôles émettent significativement plus de vocalisations que les rats SF. Ce résultat est à prendre avec précaution puisque cette semaine de protocole coïncide avec l'arrivée de rats de 7 jours dans la même pièce que mes rats. Malgré un mur acoustique séparant les rats de la cage contrôle la plus proche, il est possible qu'ils aient pu communiquer avec les rats du protocole et ainsi biaiser les résultats obtenus.

Le fait que le nombre de vocalisations diminue de la même façon pour les contrôles que pour les SF, montre un protocole potentiellement inadapté pour les contrôles. En effet, à la toute première mise en place de protocole de fragmentation sur rats jeunes, nous nous étions rendu compte, grâce à des caméras infrarouges, que durant la période active des rats (soit la nuit d'où les enregistrements infrarouge), le groupe SF avait fortement tendance à dormir... beaucoup... là où les contrôles font leurs toilettes et vivent leur vie de rat. De plus, leur position de sommeil n'était pas celle classique d'un rat, c'est-à-dire roulé en boule, mais plutôt étalé de tout son long. C'est pour ça que nous avons décidé d'appliquer une pression durant leur période active. Afin d'avoir uniquement les effets de la fragmentation de sommeil, nous avons décidé d'appliquer cette pression au groupe contrôle également. Peut-être que cette pression s'avère trop importante au point que même

les rats contrôles, qui ont un sommeil non dérangé, soient impactés. C'est ce que pourraient indiquer les résultats sur le nombre de vocalisations.

Cette hypothèse semble se confirmer avec les résultats des figures 18 et 19 qui montrent la valence de vocalisations positives (50 kHz) et négatives (22kHz) chez les rats contrôles et SF au cours du protocole. Le nombre de vocalisations à 22kHz a tendance à être plus important que celles à 50kHz chez les rats contrôles et SF. Nous nous attendions à avoir une différence plus importante chez les SF que chez les contrôles, ce qui n'est pas le cas. De plus, nous pensions qu'il y aurait plus de vocalisations « positives » à 50kHz que négative chez les rats contrôles, puisqu'ils ont un meilleur sommeil que les SF. Cependant, ce n'est pas le cas. Ces résultats tendent à indiquer un mal-être de l'animal à travers ses vocalisations que celui-ci soit contrôle ou non. Ce mal-être transparaît sur la courbe de poids des SF uniquement.

5 . Conclusion

L'absence de différence entre les groupes contrôles et SF au niveau du test de mémoire spatiale et des vocalisations tend à indiquer que le protocole de fragmentation de sommeil n'a pas de conséquences sur cette fonction mémoire et la communication. Or ce sont deux symptômes majeurs d'une mauvaise qualité de sommeil. Les résultats des courbes de poids et notamment sur celles des rats âgés sont en désaccord avec la littérature. Ce résultat renforce l'hypothèse d'un protocole inadaptée. Pour les prochains protocoles, il serait intéressant de faire des enregistrements EEG avec le protocole actuel pour voir la sévérité de la fragmentation du sommeil et contrôler la présence ou non de sommeil en période active. Evaluer les vocalisations si nous diminuons la pression journalière pourrait également être un plus. Augmenter la durée du protocole en temps d'exposition et travailler sur des rats de 2 ans pourraient également être des pistes complémentaires.

Il est cependant à noter que la différence due à l'âge du nombre d'entrées dans le labyrinthe en Y montre que les rats jeunes et âgés ne subissent pas les tests de la même façon (même s'il n'y a pas de différence sur le pourcentage de combinaisons correctes entre les deux groupes). Nous n'avons pas d'enregistrements des vocalisations sur rats jeunes, puisque ce travail sur les vocalisations a fait l'objet d'un stage de Master 1 de trois mois et que les expérimentations sur rats jeunes avaient déjà été faites.

Au vu des résultats obtenus, nous avons décidé de chercher des marqueurs qui indiqueraient une mise en place de processus inflammatoires non visibles au niveau comportemental. Nous partons de l'hypothèse que ces processus pourraient être précurseurs et ne pas être encore visibles d'un point de vue comportemental. Pour cela, nous avons travaillé sur l'impact de la fragmentation du sommeil du rat jeune et du rat âgé sur des marqueurs de la barrière hémato-encéphalique (claudine-5, occludine et aquaporine 4), de la glie (astrocyte et microglie), de l'inflammation (IL-17), et de neuroinflammation (protéines précurseurs des amyloïdes). Les résultats de ce travail font l'objet de la 2^{ème} étude de ma thèse.

Reconnaissance

Le travail sur les vocalisations a été fait en collaboration avec Léo Perrier, en thèse (au moment de l'écriture) au laboratoire de l'ENES, Université Jean Monnet de Saint Etienne, et Amandine Cascarino, en Master 1 éthologie parcours écologie de l'Université Jean Monnet de Saint Etienne.

Annexe

Annexe 1 : Dosage de cortisol (hormone de stress) dans le sérum des 6 premiers rats âgés du protocole 2.

Rats	Conditions	[protéines totales] (g/L)	[cortisol] (nmol/L)
63	Contrôle	62	23
64	Contrôle	61.4	23.7
65	Contrôle	70.7	32.7
66	Contrôle	66.9	28.6
67	Sommeil Fragmenté	64.3	27.2
68	Sommeil Fragmenté	72.8	22.1

Etude 2 : Impact de la fragmentation de sommeil sur l'environnement neuronal

1 . Introduction

Dans notre précédente étude, nous avons évalué le retentissement de la fragmentation du sommeil dans notre modèle de rats jeunes et âgés sur le comportement. Nous avons donc étudié l'évolution du poids pendant la durée du protocole, les conséquences de notre protocole de fragmentation de sommeil sur la mémoire spatiale avec le labyrinthe en Y et enfin sur les communications avec les vocalisations en ultrasons (sur 8 rats âgés uniquement, 4 contrôles et 4 au sommeil fragmenté). Nous avons ainsi observé une perte de poids pour les rats au sommeil fragmenté comparé aux contrôles chez les rats âgés. Aucune différence n'a été observée dans la courbe de croissance de nos rats jeunes. Nous avons également remarqué que l'étude des vocalisations donnait des informations novatrices relatives au protocole. Nous avons remarqué que les rats **âgés** contrôles et au sommeil fragmenté vocalisaient moins dès le début du protocole de fragmentation et que les vocalisations étaient plus souvent des vocalisations de mal-être à 22kHz. Les vocalisations nous ont également permis de confirmer que la méthode du labyrinthe en Y ne stressait pas les rats, au contraire, ils émettent plus de vocalisations à 50kHz, vocalisations à valence positive, spécialement chez les rats âgés contrôle.

La thématique principale de notre équipe est l'apnée du sommeil. Le syndrome d'apnée obstructive du sommeil (SAOS) est un trouble respiratoire caractérisé par la répétition de l'arrêt partiel (hypopnée) ou complet (apnée) de la respiration. Il est provoqué par le blocage des voies aériennes supérieures pendant au moins 10 secondes durant le sommeil. Il induit une augmentation des risques de morbidité, tant sur le plan cardiovasculaire que neurocognitif et métabolique (Khalyfa, Kheirandish-Gozal, and Gozal 2018).

Le SAOS comprend 3 composantes : l'hypoxie intermittente, l'hypercapnie et la **fragmentation du sommeil**. Jusque maintenant, notre équipe s'est concentrée sur l'étude l'hypoxie intermittente et son impact sur la BHE. Pour être en continuité avec les travaux antérieurs de mon laboratoire, nous avons décidé d'étudier les mêmes marqueurs.

Dans cette seconde étude, nous avons pour **objectif d'étudier les retentissements de la fragmentation du sommeil dans notre modèle de rats jeunes et âgés sur l'altération gliale (microgiale et astrocytaire), la barrière hémato-encéphalique (BHE) ainsi que sur le métabolisme.**

L'occludine (Anne-Cloe Voirin 2019), la claudine-5 (Anne-Cloe Voirin 2019), l'IL-17 (Anne-Cloe Voirin 2019; Anne-Cloé Voirin, Perek, and Roche 2020) et l'aquaporine 4 ont déjà été étudiées dans notre laboratoire lors d'une hypoxie intermittente *in vitro* dans le cadre de la compréhension de l'impact des apnées obstructives du sommeil. Ils ont observé qu'en présence d'IL-6, une cytokine pro-inflammatoire, la perméabilité de la BHE augmentait et que la concentration en protéine de jonctions serrées telles que la claudine-5 et l'occludine diminuait. Les mêmes résultats sont obtenus exacerbés en combinant plusieurs cytokines inflammatoires dans le milieu : l'IL-6, l'IL-17 et TNF- α . Nous avons donc décidé dans ce travail de thèse d'étudier l'expression de claudine-5 et l'occludine pour déterminer si notre protocole avait un impact sur les protéines de jonctions serrées de la BHE. En parallèle, nous avons testé 3 cytokines inflammatoires : l'IL-1 β , l'IL-6 et l'IL-17.

L'IL-6 est une cytokine pro-inflammatoire. Un niveau élevé de cytokine est signe d'une inflammation. Des niveaux élevés d'IL-6 sont associés à un sommeil perturbé et à des plaintes de fatigue et de somnolence chez les personnes souffrant de troubles du sommeil (Hong et al. 2005). Leurs résultats confirment l'association entre des taux élevés d'IL-6 et une qualité

de sommeil moindre (" une mauvaise nuit de sommeil "), même chez les individus asymptomatiques et en bonne santé.

L'IL-1 β est également une cytokine inflammatoire. Moins étudiée dans la fragmentation de sommeil, une étude a démontré des niveaux augmentés en IL-1 β dans la graisse de souris ayant subi une fragmentation de sommeil aiguë (24h) (Dumaine and Ashley 2015).

Aucune étude n'a été trouvée concernant les conséquences de la fragmentation de sommeil sur l'IL-17. Cependant, cette cytokine est très étudiée dans le contexte du SAOS chez les enfants. En effet, des niveaux anormaux d'IL-17 ont été retrouvés chez les enfants souffrant de SAOS (Huang et al. 2016).

Les cytokines inflammatoires ont été largement étudiées dans la littérature dans le cadre de l'apnée du sommeil et de l'hypoxie intermittente, mais finalement très peu dans le cadre de la fragmentation de sommeil chronique. Les quantifications de ces marqueurs inflammatoires dans mon protocole seront mises en parallèle des marqueurs de la perméabilité de la BHE : la claudine-5 et l'occludine.

Ces deux protéines de jonctions ont été étudiées dans un contexte de SAOS modéré et sévère chez des patients apnéiques (Anne-Cloé Voirin et al. 2020). Il semblerait que la claudine-5 soit plus sensible au SAOS que l'occludine. En effet, les sera de patients SAOS sévères avaient des concentrations en claudine-5 significativement plus faibles que les patients SAOS modéré. Ces protéines seront donc étudiées également dans un contexte de fragmentation de sommeil pure.

De manière complémentaire aux jonctions serrées, il est important de voir si la fragmentation peut s'accompagner de mouvement d'eau. Pour cela, nous allons travailler sur l'aquaporine-4 (AQP4). L'AQP4 est l'une des molécules les plus abondantes dans le cerveau et est particulièrement présente dans les membranes astrocytaires aux interfaces sang-cerveau et

cerveau-liquide (Nagelhus and Ottersen 2013). Elle joue un rôle dans la clairance métabolique. Elle a également un rôle important dans la résolution d'œdème suite à une lésion cérébrale (Badaut et al. 2007).

Associé à cette étude de l'impact du protocole sur la BHE, nous avons décidé de travailler sur un aspect plus axé sur le milieu neuronal avec l'étude de la glie (microglie et astrocytes). Rappelons que la microglie est la principale défense immunitaire du système nerveux central et les astrocytes apportent nutriments et support aux neurones. Une collaboration de notre Laboratoire avec l'Equipe Inserm HP2 (Université Grenoble Alpes) avait montré que l'hypoxie intermittente chronique avait un impact sur la microglie de l'hippocampe grâce à des marquages sur lames immunohistochimiques avec Iba1 (Sapin et al. 2015). Dans une autre étude, les auteurs ont montré qu'une importante fragmentation de sommeil était liée à des changements morphologiques de la microglie et que cette microglie avait des caractéristiques semblables à une microglie « âgée » (Kaneshwaran et al. 2019a). Wu a montré qu'une fragmentation du sommeil importante était associée à une plus grande expression des gènes marqueurs des astrocytes activés, qui était à son tour associée à une moins bonne cognition (Wu, 2021).

La fragmentation du sommeil étant associée à des troubles cognitifs, nous avons complété nos données avec une donnée neurocognitive avec le dosage de la protéine précurseur des amyloïdes (APP). Les protéines β -amyloïdes, qui lorsqu'elles forment des plaques, sont reconnues comme signe précurseur d'Alzheimer, sont dérivées de ces APP. Plusieurs équipes de chercheurs travaillent sur le rôle de la microglie dans la clairance des β -amyloïdes. Une étude a ainsi déterminé que, même si la microglie n'était pas le principal mécanisme physiopathologique, elle jouait tout de même un rôle dans l'élimination de ces β -amyloïdes (Garcia-Alloza et al. 2007). Dans un contexte de fragmentation de sommeil, Minakawa et al. ont montré que la sévérité des dépôts d'amyloïde β présentait une corrélation positive

significative avec l'étendue de la fragmentation du sommeil (Minakawa et al. 2017).

L'objectif de cette étude est de voir l'impact de la fragmentation de sommeil en fonction de l'âge sur des marqueurs inflammatoires systémiques, neuroinflammatoires et de fonction de la BHE. Les hypothèses que nous pouvons émettre au regard de la bibliographie sont une augmentation des marqueurs inflammatoires et neuroinflammatoires et une diminution des protéines de jonctions serrées, signe d'un dysfonctionnement de la BHE. **Ces deux approches (dosages des molécules inflammatoires et étude de la glie) seront mises en œuvre et permettront de déterminer des facteurs précoces de perturbations physiopathologiques neurologiques liées à la fragmentation du sommeil, composante du SAOS.**

2 . Matériels et méthodes

Modèle in vivo

Les différents protocoles incluant des animaux ont été approuvés par le Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation. Ceux-ci ont été faits en respect du bien-être animal. (n° DAP rats jeunes : #23970-2020010711388451 v5 ; rats âgés : #33280-2021092909367318 v4)

Tous les animaux ont été hébergés dans les mêmes conditions au PLEXAN (plateforme expérimentations et analyses, Faculté de Médecine J Lisfranc, UJM, Saint Etienne), sous environnement contrôlé (cycle jour/nuit de 12h/12h, température 19-21°C). Quel que soit le protocole, l'animal avait de l'eau et de la nourriture *ad libitum*.

Les rats mâles Wistar ont été fournis par les laboratoires Janvier (France). Afin d'étudier les effets de la fragmentation de sommeil sur la BHE, des rats

âgés de 9 semaines ont été choisis dans un premier temps et des rats d'âge moyen de 1 an ont été sélectionnés dans un deuxième temps.

Afin d'avoir un suivi régulier de santé de l'animal durant le protocole, deux pesées étaient effectuées par semaine.

Les animaux sont répartis dans deux groupes: contrôle et sommeil fragmenté (SF).

À la fin du protocole, l'animal est anesthésié sous isoflurane et exsanguiné par prélèvement en intracardiaque.

Le cerveau est isolé de la boîte crânienne. Un hémisphère sera placé dans du formol. Cet hémicerveau servira pour l'immunohistochimie. L'autre hémisphère sera mis dans du PBS 1X puis broyé à l'ultrathurax. Il sera conservé à -80°C en attendant d'être utilisé pour des mesures biochimiques par kits ELISA.

Des cerveaux de l'étude pilote (4 rats : 2 contrôles et 2 SF) ont permis d'isoler des vaisseaux cérébraux. Ceux-ci ont été pesés, puis mis dans du tampon de dénaturation (20mg de tissus pour 200µL de tampon), broyés à l'ultrathurax, sonifiés puis conservés au -80°C pour les western blot.

Protocole de fragmentation du sommeil

Une méthode utilisée et validée dans le cadre d'une privation de sommeil a été utilisée (Leenaars et al. 2011). Elle consiste en un cylindre divisé en deux par une paroi (Figure 38). Chaque cage peut ainsi accueillir 2 rats. Le plateau de ces cages est entouré d'une courroie reliée à un moteur permettant le mouvement rotatif aléatoire du plateau de la cage. La vitesse de rotation peut être réglée de telle façon que le rat soit obligé de buter

contre la paroi ce qui va provoquer un microéveil. Ce système évite ainsi les manipulations de l'homme et peut fonctionner en parfaite autonomie.



Figure 38: Cage de fragmentation (photo personnelle)

Elle fonctionne selon le cycle 9 sec. ON et 110 sec. OFF, afin de mimer une fragmentation de sommeil sévère (chez l'Homme). Les animaux du groupe SF vont voir les cages tourner durant leur 12h de sommeil selon ce cycle (Figure 39). Afin d'éviter toute inversion de cycle jour/nuit, les cages tourneront également 15 minutes toutes les 45 minutes durant les 12h d'activité du rat selon le même cycle que la nuit (Figure 39).

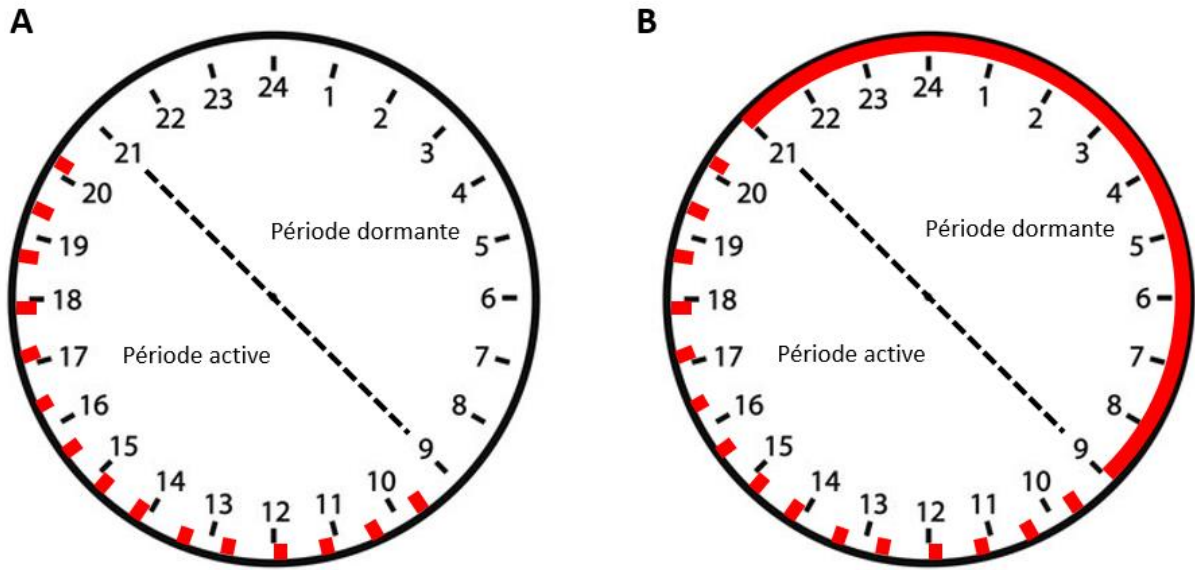
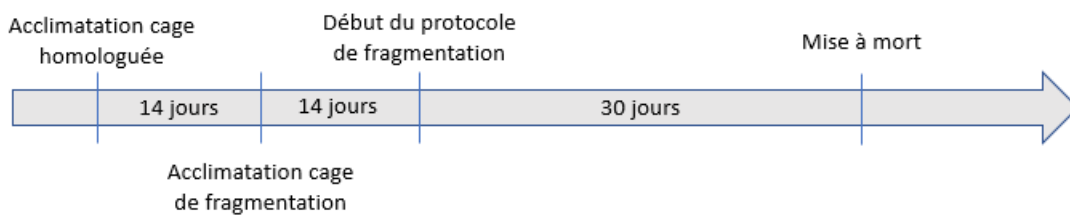


Figure 39: cycle de rotation des cages (A) contrôle et (B) sommeil fragmenté sur 24h. L'inversion du cycle jour nuit de la salle des animaux a permis de calquer leur rythme éveil/sommeil au nôtre. En rouge, les moments de rotation de la cage sous le cycle 9 sec. ON et 110 sec. OFF

Les cages du groupe contrôle ne tourneront pas la nuit, par contre la pression durant la période d'activité sera la même que pour le groupe SF.

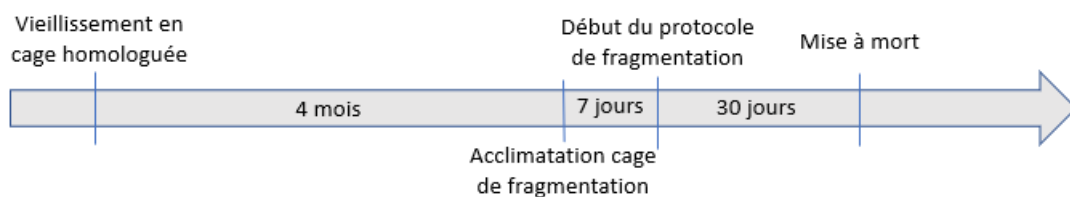
Les expériences ont suivi deux protocoles en fonction de l'âge des rats exposés :

Protocole 1 : rats jeunes de 7 semaines à leur arrivée à l'animalerie.



Dans le protocole 1 nous avons obtenu un n=12 pour les rats du groupe contrôle et n=14 pour ceux du groupe SF.

Protocole 2 : rats âgés de 8 mois à leur arrivée à l'animalerie.



Pour le protocole 2 nous avons un n=10 pour le groupe contrôle et n=12 pour le groupe SF.

Dosages protéiques

Les dosages protéiques des broyats cérébraux se sont faits avec le *BCA protein assay kit for low concentrations* de chez Abcam (réf : ab207002) en suivant les recommandations du fabricant.

Détection des protéines de jonctions serrées et adhérentes par Immunoblotting

L'expression des protéines de jonction serrée claudine-5, occludine, ZO-1 et VE-cadhérine a été évaluée par technique de Western Blot (tableau 1). La protéine β -actine a été utilisée en tant que contrôle positif. L'anticorps secondaire utilisé lors des Western Blot était le goat anti-rabbit IgG (ref 12-348, fournisseur Millipore).

Les vaisseaux cérébraux ont été isolés sur glace puis homogénéisés dans un tampon de lyse. Les protéines ont été dénaturées par un tampon Laemmli 2X. 30 μ g de protéines ont été déposés par puits. Après migration sur un gel de concentration à 4%, et un gel de séparation de 8 ou 12% (selon la protéine d'intérêt), les protéines ont été transférées sur une membrane PVDF. Les anticorps primaires ont été posés puis incubés une nuit à 4°C. L'anticorps secondaire a été déposé puis la membrane a incubé pendant 3h à 4°C. La révélation s'est faite au DAB/H₂O₂.

Tableau 5: Anticorps primaires utilisés lors des analyses western blot. WB: western blot

Protéine cible	Espèce	Type	Référence	Fournisseur	Dilution en WB
β -actine	Lapin	Polyclonal	PA1-183	Invitrogen	1:1000
Claudine-5	Lapin	Polyclonal	PA5-99415	Invitrogen	1:1000
Occludine	Lapin	Polyclonal	71-1500	Invitrogen	1:125
VE-cadhérine	Lapin	Polyclonal	36-1900	Invitrogen	1:125
ZO-1	Lapin	Polyclonal	61-7300	Invitrogen	1:250

Dans les premières expériences, nous avons effectué les Western Blot sur les vaisseaux cérébraux isolés afin de travailler uniquement sur les protéines présentes au niveau des cellules endothéliales vasculaires. Cependant, la quantité d'échantillons obtenus ne nous permettait pas d'effectuer tous les Western Blot et tous les dosages ELISA nécessaires à cette thèse. Nous avons donc déterminé si travailler sur cerveaux entiers ne nous faisait pas perdre trop d'informations. Nous sommes passés d'un volume total d'échantillons vasculaires cérébraux de 300µL à 5mL pour les cerveaux entiers.

ELISA : quantification des protéines

La quantification protéique par ELISA s'est faite via des kits (tableau 2). Chaque kit a été effectué deux fois pour chaque échantillon. La concentration protéique dans les broyats de cerveaux entiers a été ajustée à 8 µg/mL pour chaque puits (8 µg/mL correspondant à la valeur la plus basse de tous les dosages protéiques).

Tableau 2: kits ELISA utilisés pour la quantification de protéines dans les broyats de cerveaux.

Kits testés	Référence	Fournisseur	Rôle
Rat IL-17	ER-0035	Fine test	Inflammation
Rat IL-6	RAB0311	Sigma Aldrich	Inflammation
Rat IL-1 β	RAB0278	Sigma Aldrich	Inflammation
Rat occludine	NBP2-80306	Novus biologicals	Protéine de jonctions serrées
Rat aquaporine-4	NBP2-69853	Novus biologicals	Transporteur d'eau au niveau de la BHE
Rat APP	NBP2-78747	Novus biologicals	Neuroinflammation
Rat claudine-5	NBP2-75333	Novus biologicals	Protéine de jonctions serrées

Etude immunohistochimique

Les hémisphères de cerveaux (dépourvus de cervelet) conservés dans le formol ont été inclus en paraffine dans les 7 jours (maximum) après la mise à mort.

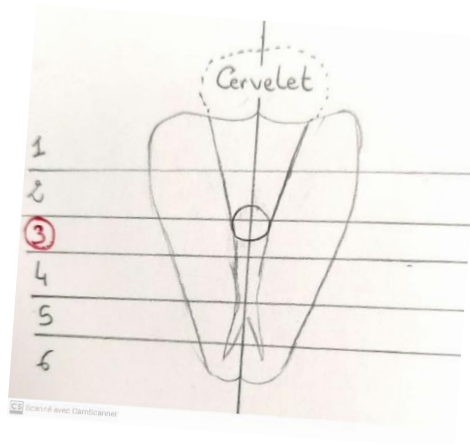


Figure 40 : Schéma d'un cerveau de rat vu du dessous. Découpage des blocs 1 à 6 pour l'inclusion en paraffine. Notre zone d'intérêt, l'hippocampe, se trouve au niveau du bloc 3 (en rouge).

Des coupes de 4 μ m ont été effectuées au niveau du bloc 3 (Figure 40). L'immunohistochimie a été réalisée sur l'automate OMNIS (Dako-Agilent) avec révélation par le DAB. Trois anticorps ont été utilisés, testant les astrocytes, les vaisseaux cérébraux et la microglie (tableau 3).

Tableau 3: références des anticorps utilisés lors des coupes immunohistologiques.

Anticorps	Référence	Fournisseur	Marquage
GFAP	M0761	Agilent	Astrocytes
CD31	PA5-32321	Thermofisher	Vaisseaux
Iba1	PA5-27436	Thermofisher	Microglie

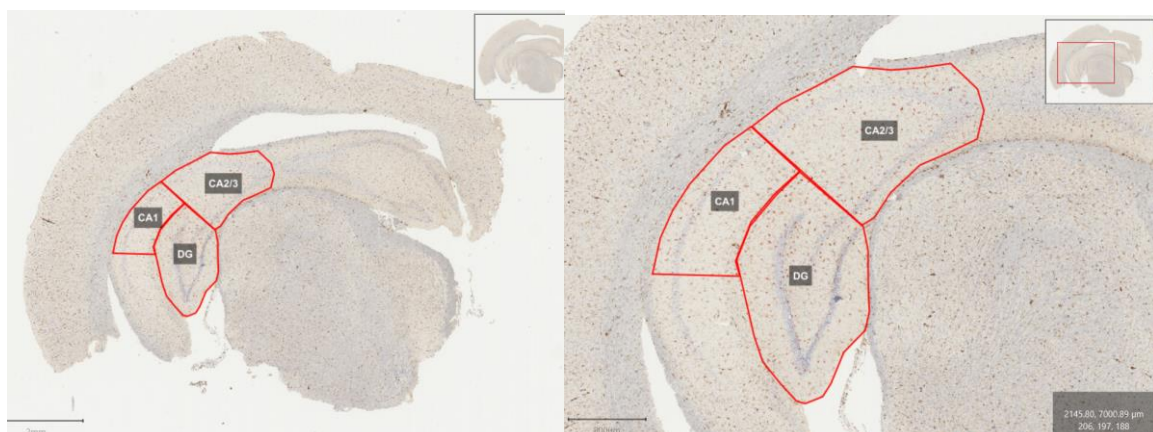


Figure 41: Détermination des trois aires de l'hippocampe. D'après (Selakovic et al. 2019)

Les trois aires CA1, CA2/3 et dentate gyrus (DG) de l'hippocampe ont été déterminées comme montré en Figure 41.

Les cellules ont été comptées avec le logiciel QuPath-0.3.2. Le logiciel a compté le nombre de cellules totales en excluant les cellules marquées au DAB.

Les résultats ont été exploités en double aveugle en comptant le nombre de cellules marquées par μm^2 des aires CA1, CA2/3 et DG et du nombre de cellules marquées par rapport au nombre de cellules total (cellules bleues rondes sur les coupes représentant les neurones hippocampiques) dans ces mêmes aires. Rapporter le nombre de cellules marquées par rapport au nombre de cellules totales (neurones hippocampiques) permet de mettre en avant la présence d'œdème interstitiel.

Nous avons complété ces résultats avec une analyse à partir de différences (Figure 42). Nous obtenons donc ainsi des données relatives entre les conditions contrôle et SF selon l'aire de l'hippocampe (CA1, CA2/3 et DG) et les cellules concernées (microgliales, astrocytaires, vasculaires).

Astrocytes en zone CA1 chez les rats contrôles

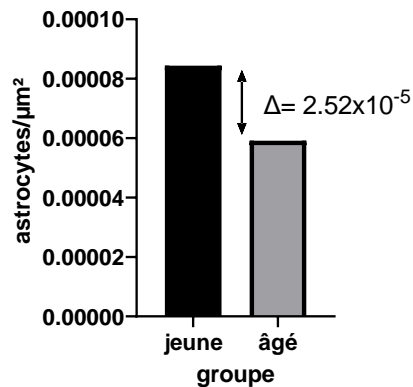


Figure 42 : Exemple du calcul des différences Δ (moyenne rats jeunes – moyenne rats âgés) en fonction de la zone (ici CA1) et du marqueur (ici astrocytaire).

Cette méthode va nous permettre de mettre en valeur les effets du protocole de fragmentation dissociés de ceux de l'âge.

Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été faites avec le logiciel R Studio. Un test de normalité a été effectué avec le shapiro.test. Si la p-value est inférieure 0,05, les données sont considérées comme ne suivant pas une loi normale.

Dans ces cas-là nous avons utilisé des tests non paramétriques de Wilcoxon si deux groupes sont à comparer, et Kruskal Wallis si la comparaison se fait sur plus de deux groupes.

3 . Résultats

3.1 . La glie

Etude sur modèle de rat fragmenté âgé de 7 semaines

Afin d'évaluer l'effet de la fragmentation du sommeil, dans notre modèle de rats jeunes et vieux, nous avons dénombré le nombre d'astrocytes/ μm^2 , puis par rapport au nombre de cellules totales au niveau de l'hippocampe, zone directement associée aux troubles cognitifs associés à l'apnée du sommeil (Sforza and Roche 2012). Le marqueur utilisé est la GFAP, marqueur classique des astrocytes.

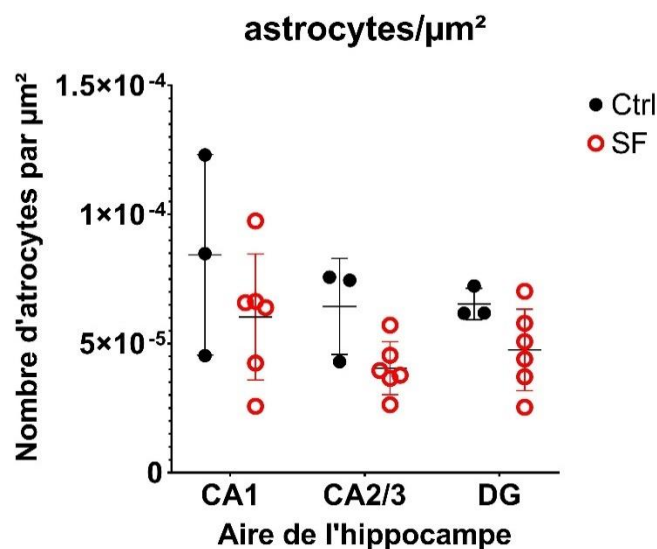


Figure 43 : Nombre d'astrocytes par μm^2 selon l'aire de l'hippocampe. ctrl: contrôle; SF: sommeil fragmenté. ctrl n=3; SF n=6

Nous observons une grande variabilité avec une tendance avec moins d'astrocytes pour les rats SF par rapport au groupe contrôle en aires CA2/3 et DG mais aucune différence significative n'apparaît (Figure 43).

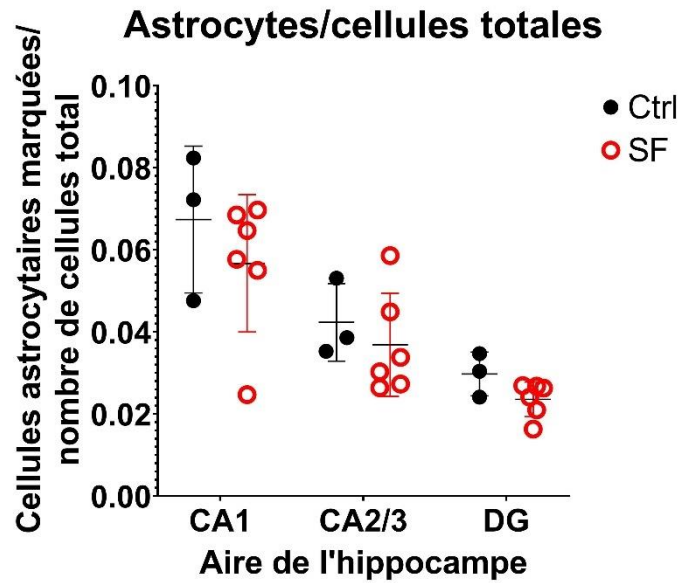


Figure 44: Nombre d'astrocytes par rapport au nombre de cellules total dans différentes aires de l'hippocampe. Ctrl : contrôle ; SF : sommeil fragmenté. ctrl n=3 ; SF n=6.

Nous observons des chiffres relativement proches pour le nombre d'astrocytes marqués par rapport au nombre total de cellules (Figure 44).

Nous avons effectué les mêmes comptages pour la microglie.

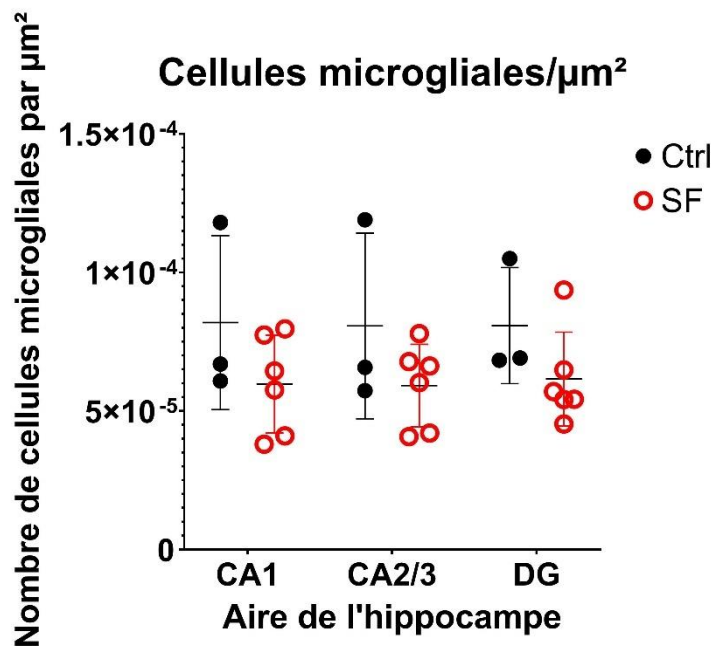


Figure 45: Nombre de cellules microgliales par μm^2 selon l'aire de l'hippocampe. ctrl: contrôle; SF: sommeil fragmenté. ctrl n=3; SF n=6

Nous observons une baisse tendancielle des cellules microgliales chez le groupe SF, mais sans différence significative (Figure 45).

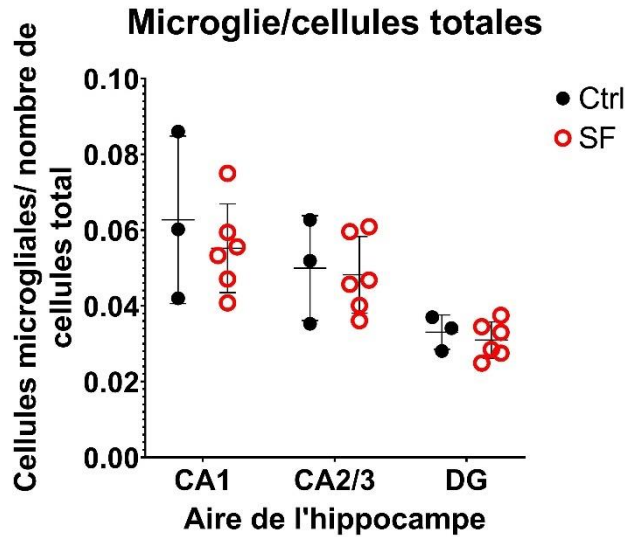


Figure 46: Nombre de cellules microgliales par rapport au nombre de cellules total dans différentes aires de l'hippocampe. Ctrl : contrôle ; SF : sommeil fragmenté. ctrl n=3 ; SF n=6

Il n'y a pas de différence entre les groupes contrôle et SF concernant le nombre de cellules microgliales rapporté au nombre total de cellules (Figure 46).

Pour compléter ces résultats, nous avons effectué les mêmes comptages pour les vaisseaux sanguins.

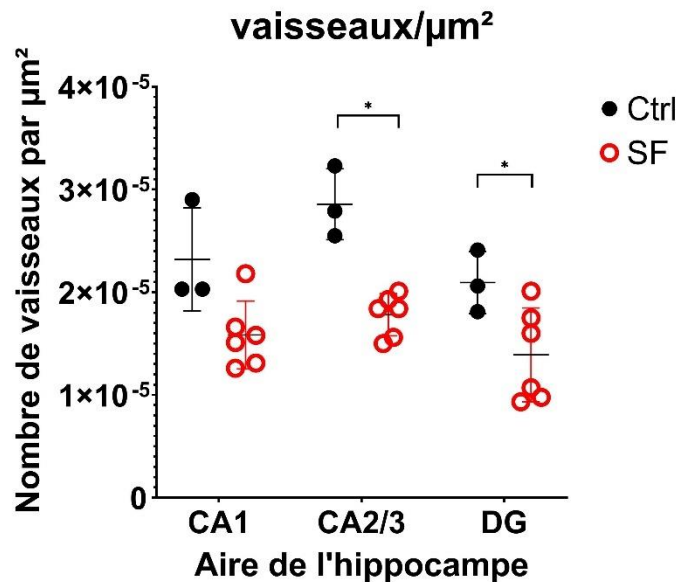


Figure 47: Nombre de vaisseaux par μm^2 selon l'aire de l'hippocampe chez le rat jeune. ctrl: contrôle; SF: sommeil fragmenté. ctrl n=3; SF n=6

Nous observons sur la Figure 47 un nombre moins important de vaisseaux chez les rats exposés au stress de SF comparé aux rats contrôles. Ceci est significatif sur deux aires hippocampiques CA2/3 et DG. Un effectif plus

important aurait certainement permis d'observer cette significativité également dans la zone CA1.

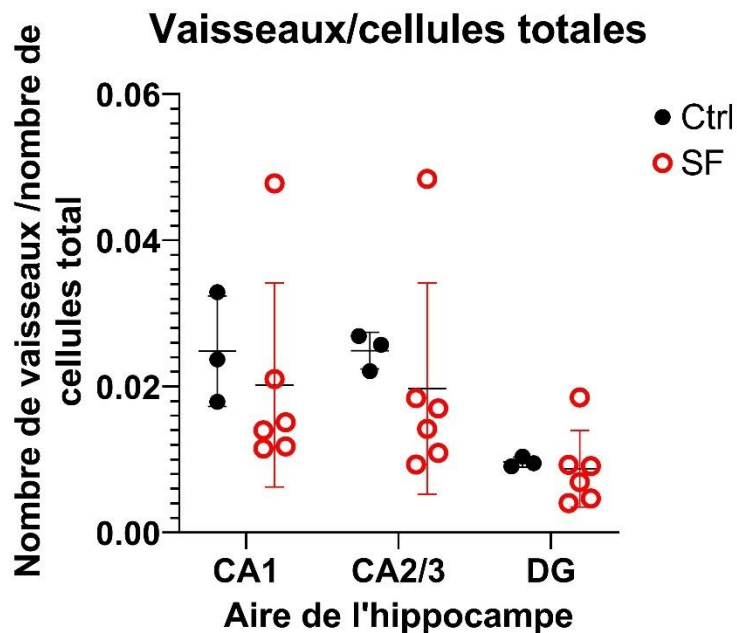


Figure 48: Nombre de vaisseaux par rapport au nombre total de cellules dans différentes aires de l'hippocampe chez le rat jeune. Ctrl : contrôle ; SF : sommeil fragmenté. ctrl n=3 ; SF n=6.

Nous observons sur la Figure 48 un écart-type important pour les rats au SF. Il n'y a pas de différences significatives entre le groupe contrôle et le groupe SF.

Ces résultats nous interrogent : pourquoi observe-t-on une diminution globale du nombre de microvaisseaux hippocampiques chez les individus jeunes SF, alors que le nombre de cellules marquées par rapport au nombre de cellules total est probablement inchangé ? Une hypothèse serait qu'il y a moins de cellules totales chez les individus SF, signe potentiel d'œdème interstitiel. Pour vérifier notre hypothèse, nous avons déterminé le nombre de cellules total par μm^2 .

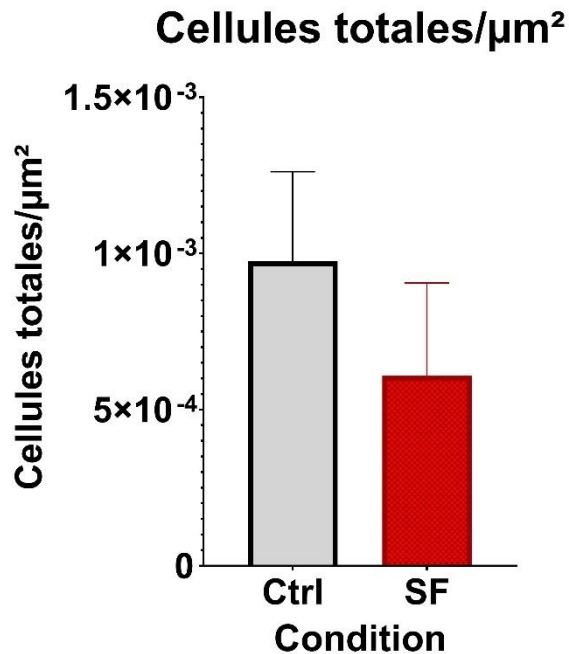


Figure 49: Nombre total de cellules par μm^2 de l'hippocampe chez le rat jeune âgé de 7 semaines. ctrl: contrôle; SF: sommeil fragmenté. ctrl n=3; SF n=6

La figure 49 nous montre le nombre total de cellules par aire totale de l'hippocampe. Nous observons une tendance à avoir moins de cellules chez les fragmentés que chez les contrôles, mais de manière non significative. L'hypothèse de la présence d'œdème interstitiel suite à la fragmentation de sommeil est intéressante, mais reste à confirmer. Pour cela, nous avons dosé l'aquaporine-4 dans nos cerveaux entiers chez les rats jeunes, mais également âgés.

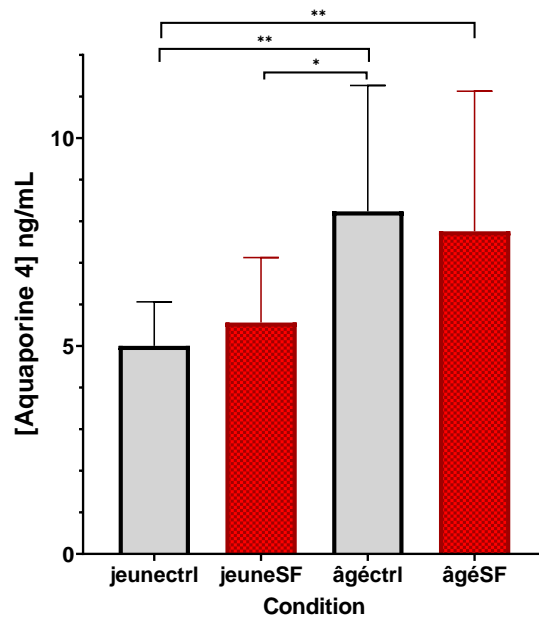


Figure 50: concentration en aquaporine-4 dans les cerveaux de rats jeunes de 7 semaines et âgés de 1 an, contrôles et SF. SF: sommeil fragmenté. ctrl : n=10 ; SF : n=12 (2 manipulations indépendantes). * p-value < 0.05 ; ** p-value < 0.01

Nous observons une concentration en AQP4 moins importante chez les rats jeunes que chez les rats d'âges. Cette différence est significative entre les rats âgés du groupe contrôle et les rats jeunes des deux groupes et entre les rats âgés SF et les rats jeunes contrôles (Figure 50). Ces résultats indiquent que la présence potentielle d'un œdème interstitielle n'est pas confirmée sur les dosages en AQP4.

Dans un second temps, nous avons comparé les résultats obtenus avec les rats jeunes et ceux obtenus sur le modèle de rats plus âgés. Nous souhaitons déterminer si la fragmentation de sommeil affecte de façon similaire les rats jeunes et les rats âgés.

Etude sur modèle de rat fragmenté âgé de 1 an (protocole 2)

Nous allons, comme dans le protocole 1, dans un premier temps, étudier le nombre d'astrocytes par μm^2 puis le nombre d'astrocytes en fonction du nombre total de cellules.

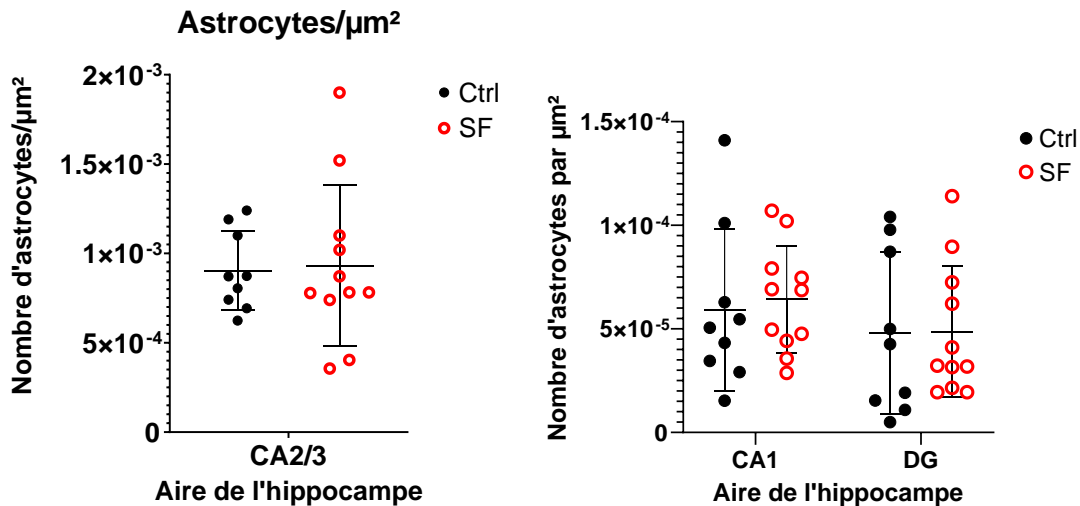


Figure 51: Nombre d'astrocytes par μm^2 selon l'aire de l'hippocampe chez les rats âgés de 1 an. A gauche est représentée l'aire CA2/3. A droite sont représentées les zones CA1 et DG. ctrl: contrôle; SF: sommeil fragmenté. ctrl n=9; SF n=11.

Nous n'observons aucune différence entre nos groupes contrôle et SF et ce quel que soit l'aire de l'hippocampe (Figure 51).

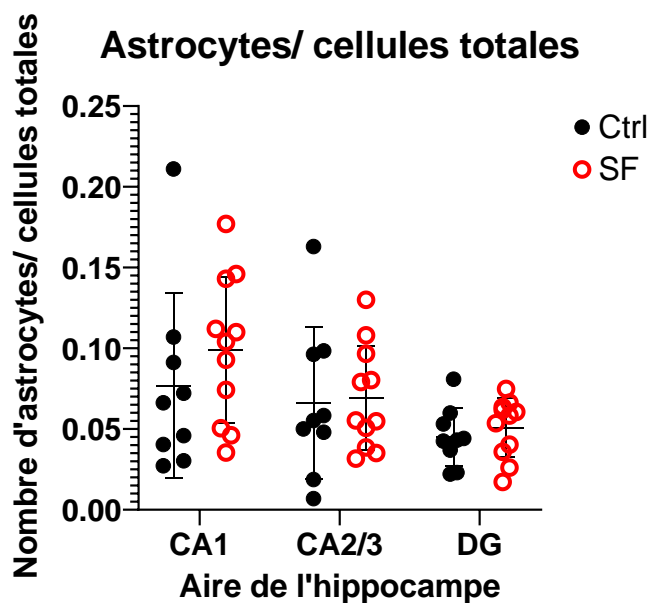


Figure 52: Nombre d'astrocytes par rapport au nombre total de cellules dans différentes aires de l'hippocampe chez les rats âgés de 1 an. Ctrl : contrôle ; SF : sommeil fragmenté. ctrl n=9 ; SF n=11.

La Figure 52 nous montre le nombre d'astrocytes en fonction du nombre total cellules par aire de l'hippocampe. Nous n'observons aucune différence entre le groupe contrôle et le groupe SF.

Dans une seconde partie, et toujours en continuité de ce qui a été fait sur le rat jeune, nous allons étudier l'impact de la fragmentation de sommeil au niveau de la microglie.

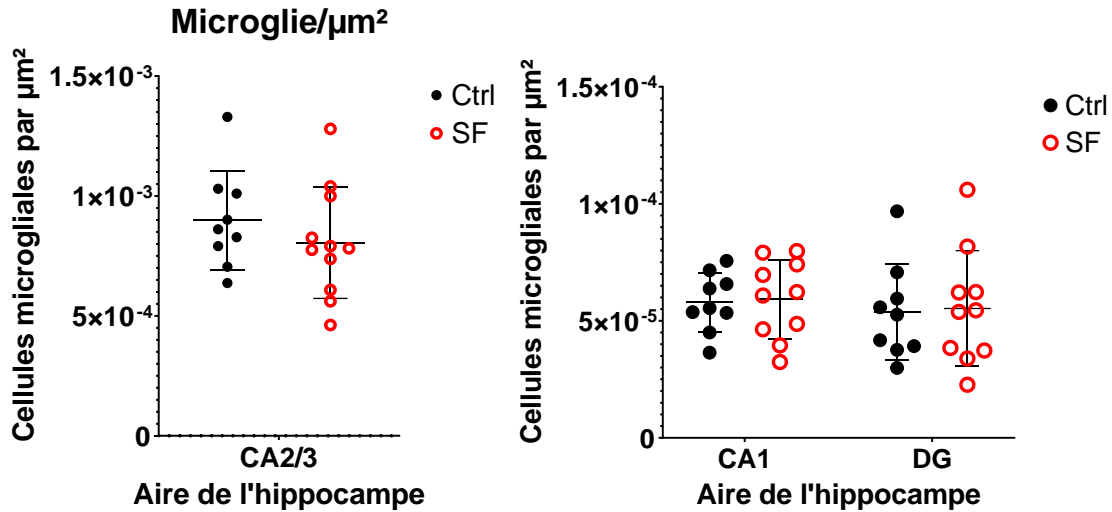


Figure 53: Nombre de cellules microgliales par μm^2 selon l'aire de l'hippocampe chez les rats âgés de 1 an. A gauche est représentée l'aire CA2/3. A droite sont représentées les zones CA1 et DG. ctrl: contrôle; SF: sommeil fragmenté. ctrl n=9; SF n=11.

Nous n'observons pas de différences entre les groupes contrôle et SF pour le nombre de cellules microgliales par μm^2 et ce quel que soit l'aire de l'hippocampe (Figure 53).

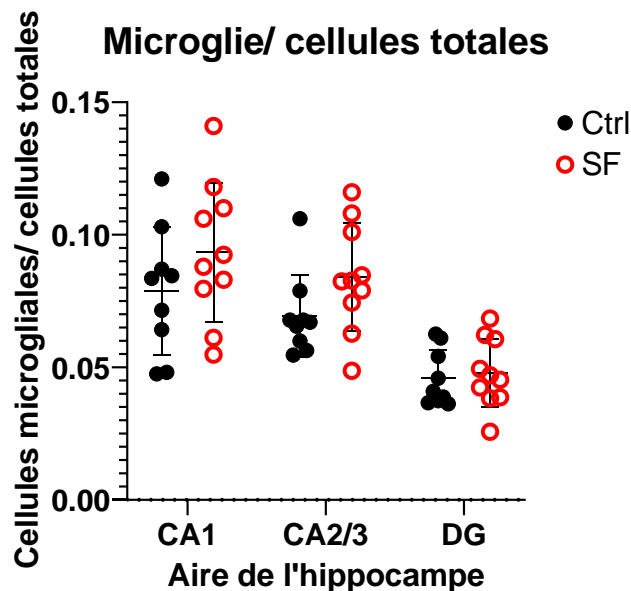


Figure 54: Nombre de cellules microgliales par rapport au nombre total de cellules dans différentes aires de l'hippocampe chez les rats âgés de 1 an. Ctrl : contrôle ; SF : sommeil fragmenté. ctrl n=9 ; SF n=11.

La Figure 54 nous montre que le nombre de cellules microgliales marquées en fonction du nombre total de cellules est le même chez les fragmentés que chez les contrôles.

Nous allons maintenant montrer les résultats obtenus sur les vaisseaux au niveau de l'hippocampe.

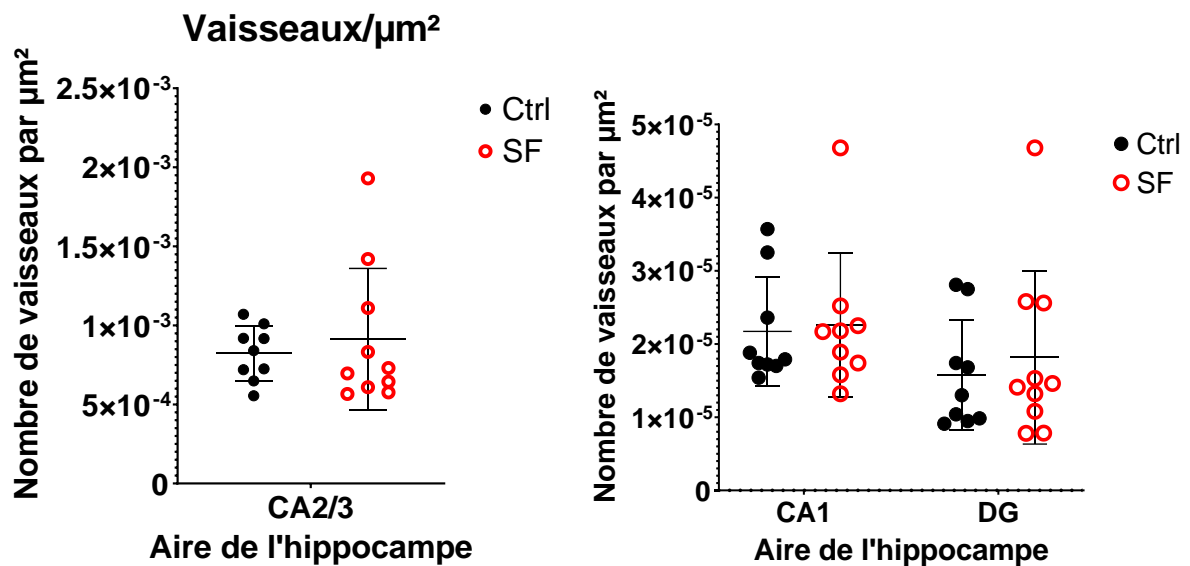


Figure 55: Nombre de vaisseaux par μm^2 selon l'aire de l'hippocampe chez le rat âgé de 1 an. A gauche est représentée l'aire CA2/3. A droite sont représentées les zones CA1 et DG. ctrl: contrôle; SF: sommeil fragmenté. ctrl n=9; SF n=10

Nous n'observons aucune différence entre le groupe de rats SF et le groupe de rats contrôles (Figure 55).

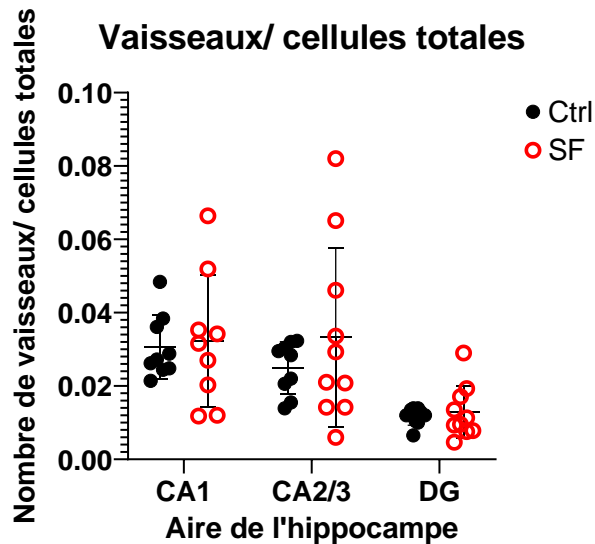


Figure 56: Nombre de vaisseaux par rapport au nombre de cellules total dans différentes aires de l'hippocampe chez les rats âgés de 1 an. Ctrl : contrôle ; SF : sommeil fragmenté. ctrl n=9 ; SF n=10.

Nous observons une légère tendance à retrouver plus de vaisseaux en fonction du nombre de cellules total chez les rats SF dans la zone CA2/3 (Figure 56). Cette tendance n'est pas significative.

Afin de déterminer si la fragmentation de sommeil participait à la formation d'œdème, nous avons comparé le nombre de cellules totales par μm^2 d'une aire donnée entre les rats contrôles et les rats.

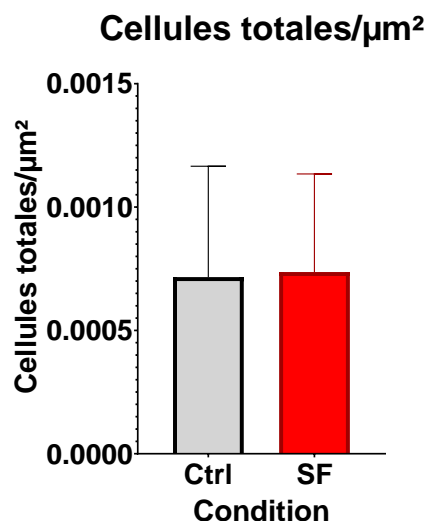


Figure 57: Nombre de cellules total par μm^2 de l'hippocampe chez le rat âgé de 1 an. Ctrl: contrôle; SF: sommeil fragmenté. ctrl n=6; SF n=8

Nous n'observons aucune différence entre les groupes contrôle et SF (Figure 57).

Analyse des résultats de la glie par évolution relative

Afin de compléter les résultats obtenus sur la glie, nous avons décidé de montrer des résultats comparant le nombre de cellules marquées des groupes contrôle et SF en faisant une différence (Δ) entre les cellules comptées chez les rats jeunes et les rats âgés. Nous avons obtenu les résultats suivants sur chaque marqueur et chaque aire :

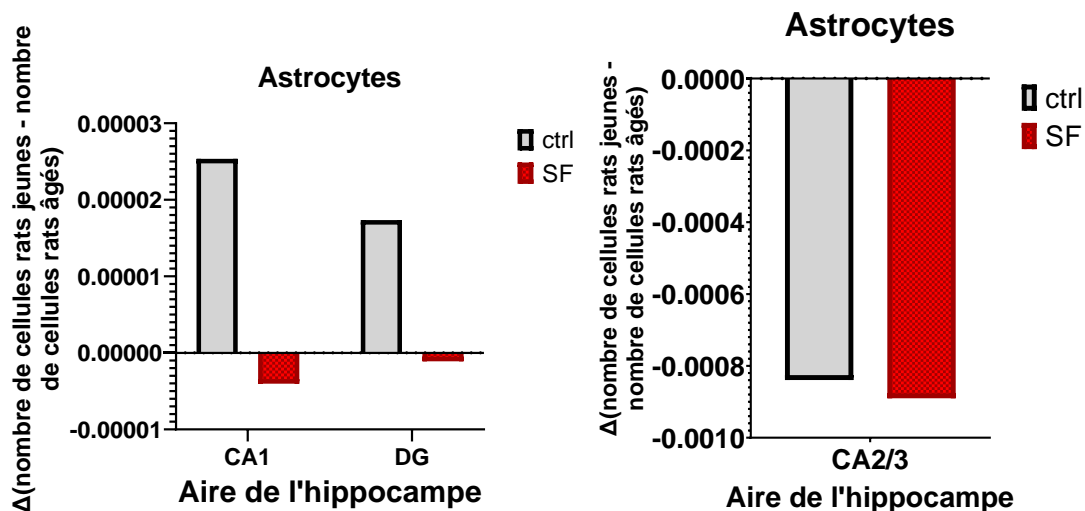


Figure 58: Delta obtenu en soustrayant la moyenne du nombre d'astrocytes comptés chez les rats jeunes à la moyenne du nombre d'astrocytes comptés chez les rats âgés. Delta en fonction de l'aire de l'hippocampe. A gauche les aires CA1 et DG et à droite l'aire CA2/3. ctrl : contrôle ; SF : sommeil fragmenté.

La Figure 58 nous montre que les rats jeunes contrôles ont plus d'astrocytes dans les aires CA1 et DG que les rats âgés contrôles ($\Delta > 0$). Nous ne retrouvons pas ces résultats chez les rats SF. Au contraire, nous observons moins d'astrocytes chez les rats jeunes SF comparés aux rats âgés SF ($\Delta < 0$). Nous n'observons pas d'impact du protocole de fragmentation de sommeil sur l'aire CA2/3.

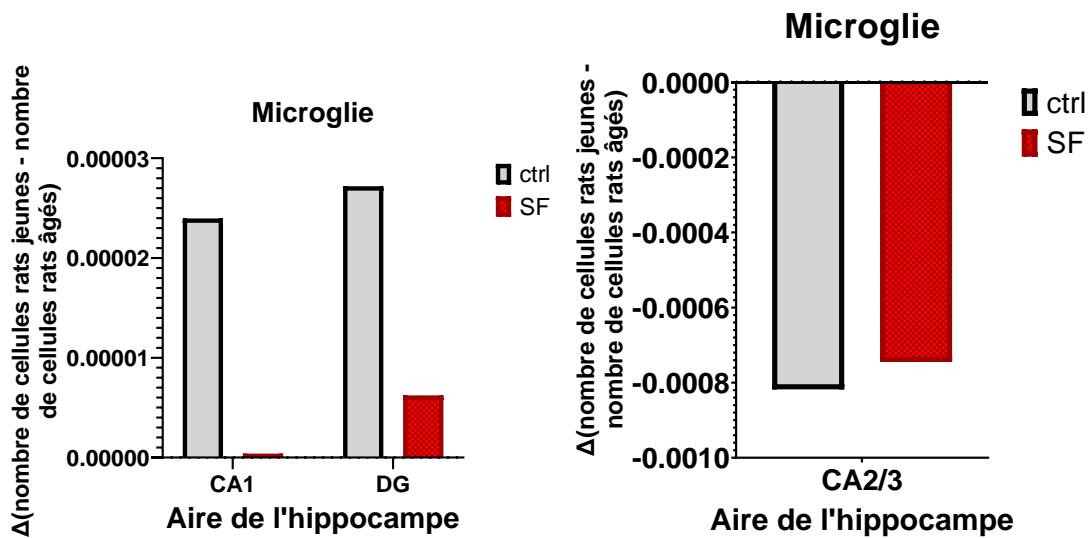


Figure 59: Delta obtenu en soustrayant la moyenne du nombre de cellules microgliales comptées chez les rats jeunes à la moyenne du nombre de cellules microgliales comptées chez les rats âgés. Delta en fonction de l'aire de l'hippocampe. A gauche les aires CA1 et DG et à droite l'aire CA2/3. ctrl : contrôle ; SF : sommeil fragmenté.

La Figure 59 nous montre que les rats jeunes contrôles ont plus de cellules microgliales dans les aires CA1 et DG que les rats âgés contrôles ($\Delta > 0$). Nous ne retrouvons pas ces résultats chez les rats SF. Nous observons légèrement plus de cellules microgliales chez les rats jeunes SF comparé aux rats âgés SF ($\Delta > 0$). Nous n'observons pas d'impact du protocole de fragmentation de sommeil sur l'aire CA2/3.

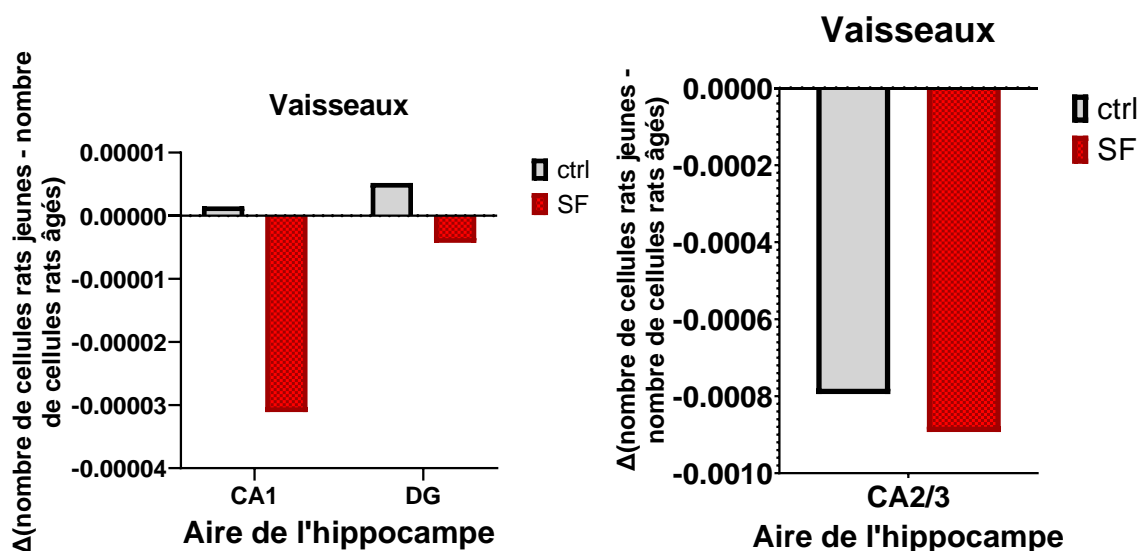


Figure 60: Delta obtenu en soustrayant la moyenne du nombre de vaisseaux comptés chez les rats jeunes à la moyenne du nombre de vaisseaux comptés chez les rats âgés. Delta en fonction de l'aire de l'hippocampe. A gauche les aires CA1 et DG et à droite l'aire CA2/3. ctrl : contrôle ; SF : sommeil fragmenté

La Figure 60 nous montre que les rats jeunes contrôles ont légèrement plus de vaisseaux cérébraux dans les aires CA1 et DG que les rats âgés contrôles ($\Delta > 0$). Au contraire, chez les rats SF nous observons que les rats âgés présentent plus de vaisseaux cérébraux que les rats jeunes sur ces mêmes aires ($\Delta < 0$). Nous n'observons pas d'impact du protocole de fragmentation de sommeil sur l'aire CA2/3.

3.2 . Expression des protéines de jonctions serrées de la BHE et de l'inflammation

Les protéines de jonctions serrées

Avant d'effectuer des dosages protéiques par kit ELISA, nous avons voulu optimiser le protocole de Western Blot. En effet, nous avons commencé par faire ces analyses sur des vaisseaux cérébraux isolés. Malgré une très bonne qualité d'échantillon, la quantité prélevée était trop faible (300 μ L) pour effectuer à la fois les Western Blot et utiliser les différents kits ELISA. Nous avons alors choisi de travailler sur hémicerveaux broyés. Si la perte d'information n'est pas trop importante, cela permettra d'avoir une quantité

d'échantillons suffisante, permettant ainsi d'effectuer toutes les manipulations nécessaires. La Figure 60 nous montre les résultats obtenus :

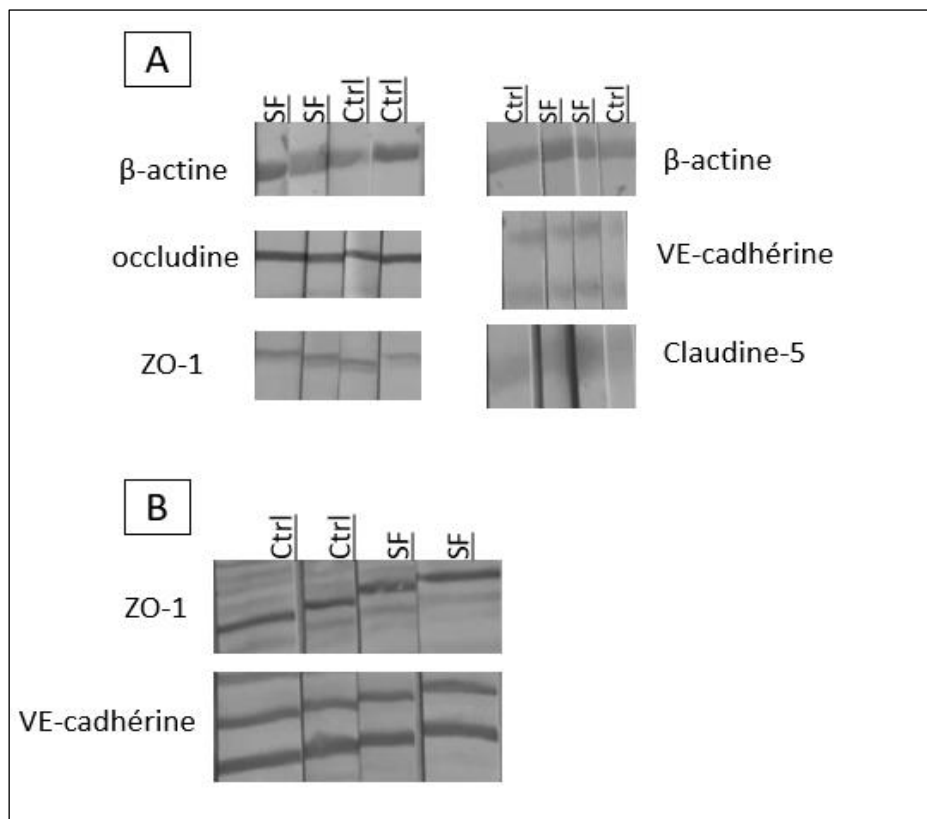


Figure 61: Western Blot sur les protéines de jonctions serrées et adhérentes. A : Western Blot sur vaisseaux cérébraux isolés chez les rats jeunes de 7 semaines pour un protocole de deux semaines de fragmentation du sommeil à gauche et 1 mois de fragmentation du sommeil à droite. B : Western Blot sur broyats de cerveaux chez les rats âgés de 1 an pour un protocole de fragmentation de sommeil d'1 mois. Ctrl : contrôle ; SF : sommeil fragmenté. n=2 pour chaque groupe (2 manipulations indépendantes).

Nous pouvons voir sur la Figure 61A le marquage qualitatif des protéines de jonction de la BHE, obtenus à partir de vaisseaux cérébraux isolés de rats jeunes de 7 semaines. En Figure 61B sont représentés des Western Blot sur broyats de cerveaux sur des rats âgés de 1an.

Nous avons par la suite dosé la claudine-5 et l'occludine, protéines étudiées antérieurement par le laboratoire dans la cadre d'une hypoxie intermittente, au niveau cérébral afin de déterminer l'impact de ce protocole de fragmentation sur l'ouverture potentielle de la BHE.

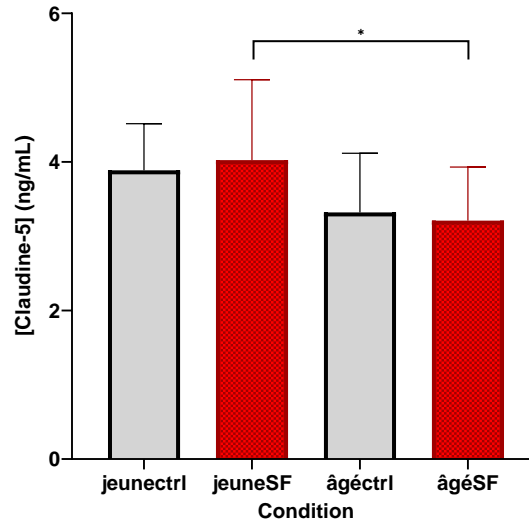


Figure 62: concentration en claudine-5 dans les cerveaux de rats jeunes de 7 semaines et âgés de 1 an, contrôles et SF. SF: sommeil fragmenté. ctrl : n=10 ; SF : n=12 (2 manipulations indépendantes). * p-value < 0.05

Nous pouvons voir que la concentration en claudine-5 ne varie pas avec l'âge ni la condition sauf entre les rats fragmentés jeunes et âgés. Nous observons une concentration significativement plus importante chez les rats jeunes SF et les rats âgés SF (Figure 62).

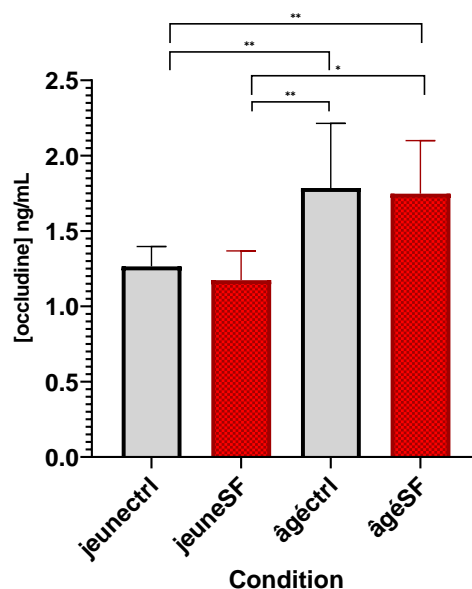


Figure 63: concentration en occludine dans les cerveaux de rats jeunes de 7 semaines et âgés de 1 an, contrôles et SF. SF: sommeil fragmenté. ctrl : n=10 ; SF : n=12 (2 manipulations indépendantes). * p-value < 0.05 ; ** p-value < 0.01

Nous observons une concentration en occludine significativement plus basse chez les rats jeunes par rapport aux rats âgés sans que la condition n'ait d'influence sur cette concentration (Figure 63).

Les cytokines pro-inflammatoires

Compte tenu des observations sur coupes et en complément des résultats sur les protéines de jonctions serrées, nous avons poursuivi nos investigations en mesurant l'expression de cytokines inflammatoires qui ont été décrites dans la pathologie de l'apnée du sommeil : l'IL-6, l'IL-1 β et l'IL-17 chez les rats jeunes de 7 semaines et âgés de 1 an et en comparant les deux.

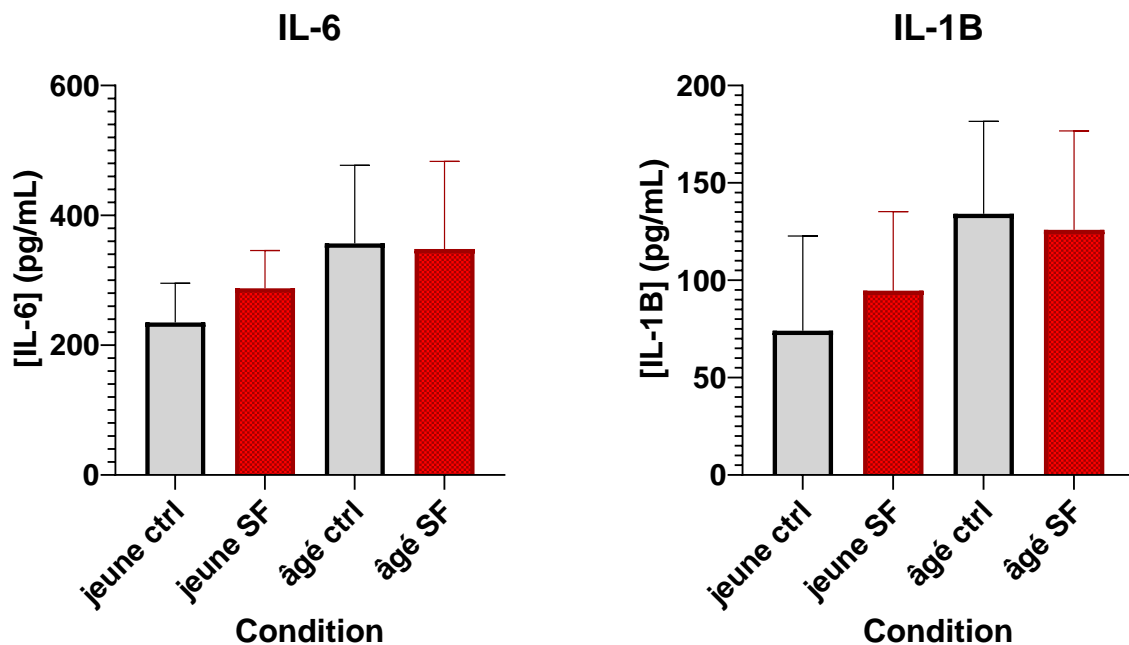


Figure 64: concentration en IL-6 (à gauche) et en IL-1 β (à droite) dans les cerveaux de rats jeunes de 7 semaines et âgés de 1 an, contrôles et SF. SF: sommeil fragmenté. ctrl : n=10 ; SF : n=12 (2 manipulations indépendantes).

La Figure 64 nous montre qu'il n'y a pas de différence significative dans les concentrations cérébrales en IL-6 et IL-1 β entre les rats contrôle et SF et entre rats jeunes et âgés. Pour compléter ces résultats, nous avons dosé les concentrations cérébrales en IL-17.

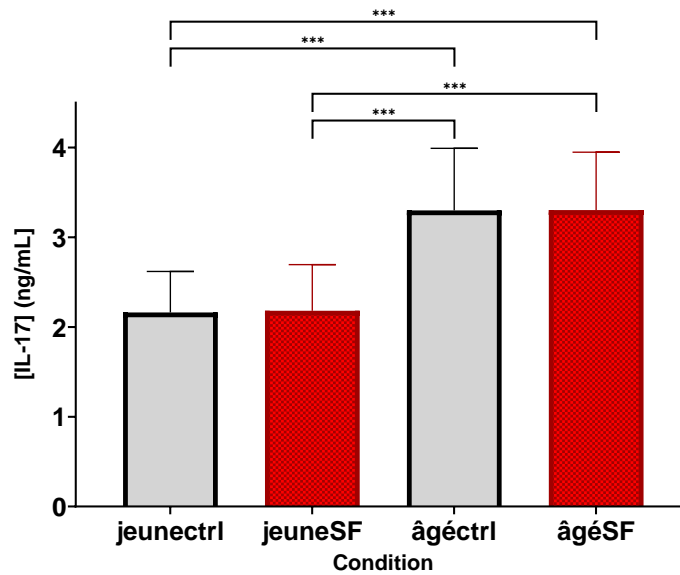


Figure 65: concentration en IL-17 dans les cerveaux de rats jeunes de 7 semaines et âgés de 1 an, contrôles et SF. SF: sommeil fragmenté. ctrl : n=10 ; SF : n=12 (2 manipulations indépendantes).
*** p-value < 0.001

La Figure 65 montre une concentration en IL-17 significativement moins importante chez mes rats jeunes que chez les rats âgés, quelle que soit la condition.

3.3 . Effet de la fragmentation sur la clairance métabolique

En parallèle de l'état de la BHE, de la glie et des cytokines inflammatoires, nous avons dosé une protéine précurseur des pathologies neurodégénératives : l'APP.

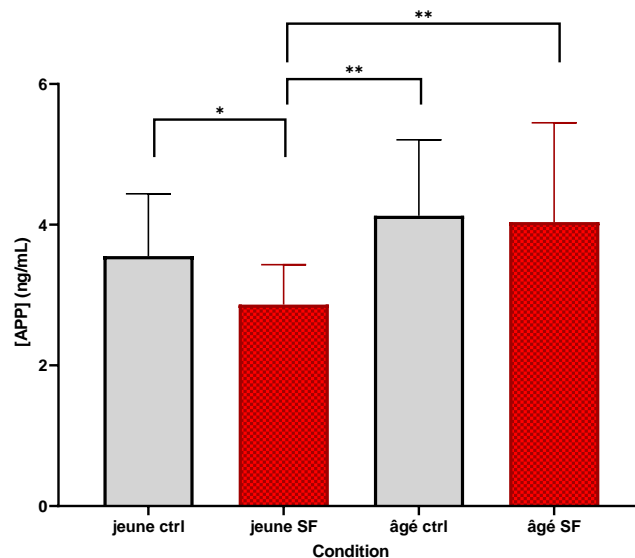


Figure 66: concentration en protéines précurseurs des amyloïdes (APP) dans les cerveaux de rats jeunes de 7 semaines et âgés de 1 an, contrôles et SF. SF: sommeil fragmenté. ctrl : n=10 ; SF : n=12 (2 manipulations indépendantes). * p-value < 0.05 ; ** p-value < 0.01

La Figure 66 montre une concentration en APP significativement plus basse chez les rats jeunes SF comparé au groupe contrôle chez les rats jeunes (protocole 1). Cette différence n'est pas observée chez les rats âgés (protocole 2). Cependant, nous observons une différence significative entre les rats jeunes et les rats âgés avec plus d'APP chez les rats âgés du protocole 2.

4 . Discussion

L'objectif de cette étude était de voir l'impact de la fragmentation de sommeil, composante du SAOS (thématique de notre laboratoire), en fonction de l'âge sur des marqueurs inflammatoires systémiques, neuroinflammatoires et de fonction de la BHE. Les hypothèses que nous avons émises étaient une augmentation des marqueurs inflammatoires et neuroinflammatoires et une diminution de l'expression des protéines de jonctions serrées, signe d'un dysfonctionnement au niveau de la BHE ainsi qu'une activation gliale.

Rappelons que la glie représente l'environnement des neurones. Les principales cellules la composant sont les astrocytes, les oligodendrocytes et la microglie. Nous avons émis l'hypothèse que la fragmentation de sommeil aurait tendance à diminuer le nombre d'astrocytes, qui servent de protection aux neurones, à augmenter le nombre de cellules microgliales ou au moins un changement de morphologie, signe d'une activation microgliale (Chanal, 2010). Kaneshwaran et al. ont travaillé sur une cohorte de 685 adultes de plus de 65 ans, 285 atteints d'Alzheimer et 420 sains (Kaneshwaran et al. 2019b). La quantification *antemortem* de la fragmentation de sommeil a été réalisée par actigraphie. Ils ont trouvé qu'une fragmentation du sommeil plus importante était associée à une plus forte expression des gènes caractéristiques de la microglie des personnes âgées et à une plus grande densité de microglie morphologiquement activée. Les changements transcriptionnels étaient indépendants de l'âge chronologique, de la densité de la microglie et des pathologies cérébrales liées à la démence, et n'étaient pas complètement expliqués par la densité accrue de microglie morphologiquement activée. De plus, une plus grande expression des gènes caractéristiques de la microglie âgée était associée à une cognition altérée et expliquait partiellement l'association entre la fragmentation du sommeil et les capacités cognitives. Ces résultats soulèvent l'hypothèse que le vieillissement accéléré et l'activation de la

microglie puissent être une conséquence de la fragmentation du sommeil et puissent expliquer partiellement le lien entre la fragmentation du sommeil à la baisse des performances cognitives chez les sujets âgés (Kaneshwaran et al. 2019b). En prenant ces résultats en compte, nous avons émis l'hypothèse que nous aurions une microglie activée avec l'âge chez nos rats, mais également que cette activation et ces changements morphologiques seraient exacerbés chez les rats du groupe SF. Nous avons dans ce travail étudié les effets de la fragmentation du sommeil dans un modèle de rats jeunes et âgés. Nous nous sommes intéressés à l'hippocampe, car cette zone a été étudiée dans le contexte du SAOS (Sforza and Roche 2012). Cette zone a également été étudiée dans le contexte de fragmentation de sommeil (Tartar et al. 2006; Guzman-Marin et al. 2007). L'analyse **relative** des résultats a permis de mettre en valeur les conséquences du protocole. Nous avons notamment observé que toutes les zones de l'hippocampe (CA1, CA2/3, DG) ne réagissaient pas de la même façon au protocole de fragmentation. En effet, le nombre d'astrocytes et de cellules microgliales n'est pas impacté par le ce protocole en zone CA2/3 alors que les autres zones le sont.

Les astrocytes, la microglie et leurs interactions contrôlent la physiologie du SNC dans les situations pathologiques et de stress auxquels le cerveau est soumis au quotidien (Linnerbauer, Wheeler, and Quintana 2020; Rothhammer et al. 2018). Les astrocytes jouent des rôles multiples pendant les phases d'inflammation touchant le SNC. D'une part, ils peuvent limiter l'afflux de cellules immunitaires périphériques dans le SNC, tout en produisant des facteurs neurotrophiques pour favoriser la réparation des tissus neuronaux. D'autre part, les astrocytes peuvent favoriser la neurodégénérescence et l'inflammation par le recrutement de cellules inflammatoires périphériques, par l'activation de la microglie résidant dans le SNC et par leurs propres activités neurotoxiques intrinsèques (Linnerbauer, Wheeler, and Quintana 2020). Cette étude montre une corrélation entre le nombre de cellules microgliales et le nombre de cellules

astrocytaires. Dans notre étude, nous retrouvons ces paramètres-là. Les résultats du comptage cellulaire et les différences obtenues avec la méthode des différences nous ont montré que si les niveaux astrocytaires restaient les mêmes, c'était également le cas des cellules microgliales. Les zones CA1 et DG semblent plus sensibles au protocole que la zone CA2/3. Cependant, les résultats obtenus avec les différences sont à interpréter avec précaution. En effet, nous comparons deux moyennes. Cela permet de donner une idée générale des résultats. La méthode des différences permet la mise en valeur des effets du protocole de fragmentation de sommeil chronique dissociés de ceux de l'âge. Pour compléter les données obtenues sur la glie, il faudrait réaliser des marquages d'activation microgliale pour savoir si la glie est dans un état M1 (pro-inflammatoire) ou M2 (anti-inflammatoire). L'activation microgliale pourrait également être mesurée en déterminant les « aires » d'occupation de la microglie.

Nos expérimentations de fragmentation du sommeil ont été faites sur rats jeunes avant d'être répétées sur rats âgés. Afin de compléter les résultats obtenus sur la microglie, et la potentielle présence d'œdème interstitielle, nous avons dosé l'AQP4, complexe responsable du transport d'eau au niveau de la BHE et du SNC. Sa localisation au niveau des pieds astrocytaires en fait une cible de choix pour étudier l'impact de la fragmentation de sommeil sur l'environnement neuronal. Pour l'AQP4, nous n'avons retrouvé aucune différence entre groupes contrôle et SF et ce quel que soit l'âge. Nous avons une différence modérée liée à l'âge. Ce qui est intéressant à relever c'est l'importance de variation interindividus, malgré un n=10 pour les contrôles et un n=12 pour les SF. Ceci se retrouve au niveau des résultats sur la microglie, notamment pour les rats âgés. Cela prouve encore une fois que les rats âgés répondent certainement avec une forte disparité à la fragmentation de sommeil. Nous n'avons pas retrouvé d'autres explications pour comprendre cette différence entre individus : pas de pathologie tumorale décelée, pas de pathologie infectieuse.

Pour compléter le travail effectué par mon laboratoire sur le SAOS, nous avons travaillé sur la claudine-5 et l'occludine. Ces deux protéines sont des protéines de jonctions serrées de la BHE. Voirin et al. avaient démontré qu'un SAOS sévère entraînait une diminution de claudine-5 significative et d'occludine non significative comparée à un SAOS modéré (Anne-Cloé Voirin et al. 2020). Comme dans le SAOS, nous pensions que la BHE serait altérée de manière fonctionnelle plus qu'anatomique par le protocole de fragmentation. Cette altération aurait pu être traduite par une diminution de la concentration en protéines de ces jonctions serrées. Cette hypothèse était confortée par le fait que la réponse microgliale était différente entre les deux conditions (contrôle et SF). Les résultats pour la claudine-5 n'ont montré aucune différence, que ce soit entre les rats contrôles et les SF, animaux jeunes et animaux âgés. L'âge ne semble pas influencer la concentration en claudine-5 au niveau cérébral. Comme notre laboratoire avait obtenu des résultats significatifs pour la claudine-5, nous pensions qu'elle serait plus susceptible au protocole et au vieillissement que l'occludine. Les résultats obtenus ont démenti cette hypothèse. En effet, le vieillissement semble avoir une influence sur la concentration en occludine. La concentration en occludine au niveau cérébral est plus importante chez les rats âgés comparée à ce qui est retrouvé chez les rats jeunes. Mooradian et al. ont travaillé sur les expressions cérébrales d'occludine chez des rats Fisher de 3, 12 et 24 mois (Mooradian, Haas, and Chehade 2003). Ils n'ont trouvé aucune différence entre les rats de 3 et 12 mois. Par contre, il y avait une diminution significative de la concentration en occludine chez le rat de 24 mois. La diminution de l'expression de protéines de jonctions serrées est le signe d'une BHE perturbée. Or nous obtenons le résultat contraire. Cependant, nous n'avons pas de différence entre les groupes contrôle et SF. Soit la durée du protocole de fragmentation n'est pas suffisamment longue pour que les protéines de jonctions serrées en soient impactées, soit l'âge des rats n'est pas encore suffisant.

Nos expérimentations de fragmentation du sommeil ont été faites sur rats jeunes avant d'être répétées sur rats âgés. Afin de préciser les résultats obtenus sur la microglie, nous avons effectué plusieurs dosages de biomarqueurs inflammatoires. Nous avons d'abord dosé l'IL-6, l'IL-1 β et l'IL-17, trois cytokines pro-inflammatoires connues pour avoir une expression plus importante en cas d'inflammation systémique (Unnikrishnan, Jun, and Polotsky 2015; Ng et al. 2018). Nous n'avons pas observé d'induction de cytokines inflammatoires avec notre protocole de fragmentation que ce soit dans le modèle de rat jeune ou âgé. L'IL17, IL retrouvée au niveau astrocytaire (Ma et al. 2010) n'a pas non plus montré de différence contrairement aux attendus de la littérature. En revanche, nous avons observé une différence significative liée à l'âge. Les rats âgés ont plus d'IL-17 que les rats jeunes. Cette différence indique que le niveau basal d'IL-17 est plus important avec l'âge. Nous retrouvons le même résultat dans la littérature chez l'Homme (De Angulo et al. 2015). L'augmentation de l'IL-17 avec l'âge pourrait-elle avoir un impact sur la fragilité du cerveau à des stress oxydants ou à l'exposition à des toxiques ? L'augmentation de cette interleukine pourrait-elle favoriser chez certains patients la survenue de maladie neurodégénérative ? Ces questions restent à explorer et sont à notre sens importantes. En effet, l'IL-17A est reconnue comme une cytokine effectrice clé impliquée dans de multiples maladies inflammatoires chroniques et la neutralisation de l'IL-17A est une approche efficace, démontrée dans le traitement de nombreuses inflammations chroniques (Miossec 2016). Pour répondre à cette question, il faudrait travailler sur des rats plus âgés. La difficulté principale de la mise en place d'un tel protocole est le pourcentage de perte important avec l'âge, mais également le coût d'un tel projet.

Pour finir, nous avons donc décidé de doser les APP, protéine précurseur des amyloïdes, responsables de la formation des β -amyloïdes. En condition physiologique, ces protéines β -amyloïdes sont éliminées plus efficacement durant la nuit (Semyachkina-Glushkovskaya et al. 2021) à travers la BHE

pour rejoindre la circulation sanguine ou par le LCR. En condition pathologique, ceux-ci forment des plaques qui sont néfastes pour les neurones. Ces plaques sont le signe du développement de la maladie d'Alzheimer. Nous avons émis l'hypothèse que ce système de drainage des APP serait perturbé par la fragmentation de sommeil. Nous nous attendions à avoir une accumulation d'APP chez les rats SF, qu'ils soient jeunes ou âgés. Or nous avons obtenu les résultats opposés chez les rats jeunes et pas d'impact de la fragmentation de sommeil chez les rats âgés. En effet, le groupe SF « jeune » présentait significativement moins d'APP que le groupe contrôle. Il n'y a eu aucune différence entre groupe chez les rats âgés. Les résultats obtenus tendent à montrer qu'il y a un mécanisme compensatoire qui se met en place et est efficace chez les rats jeunes. Ce même mécanisme n'est pas observé chez les rats âgés.

5 . Conclusion

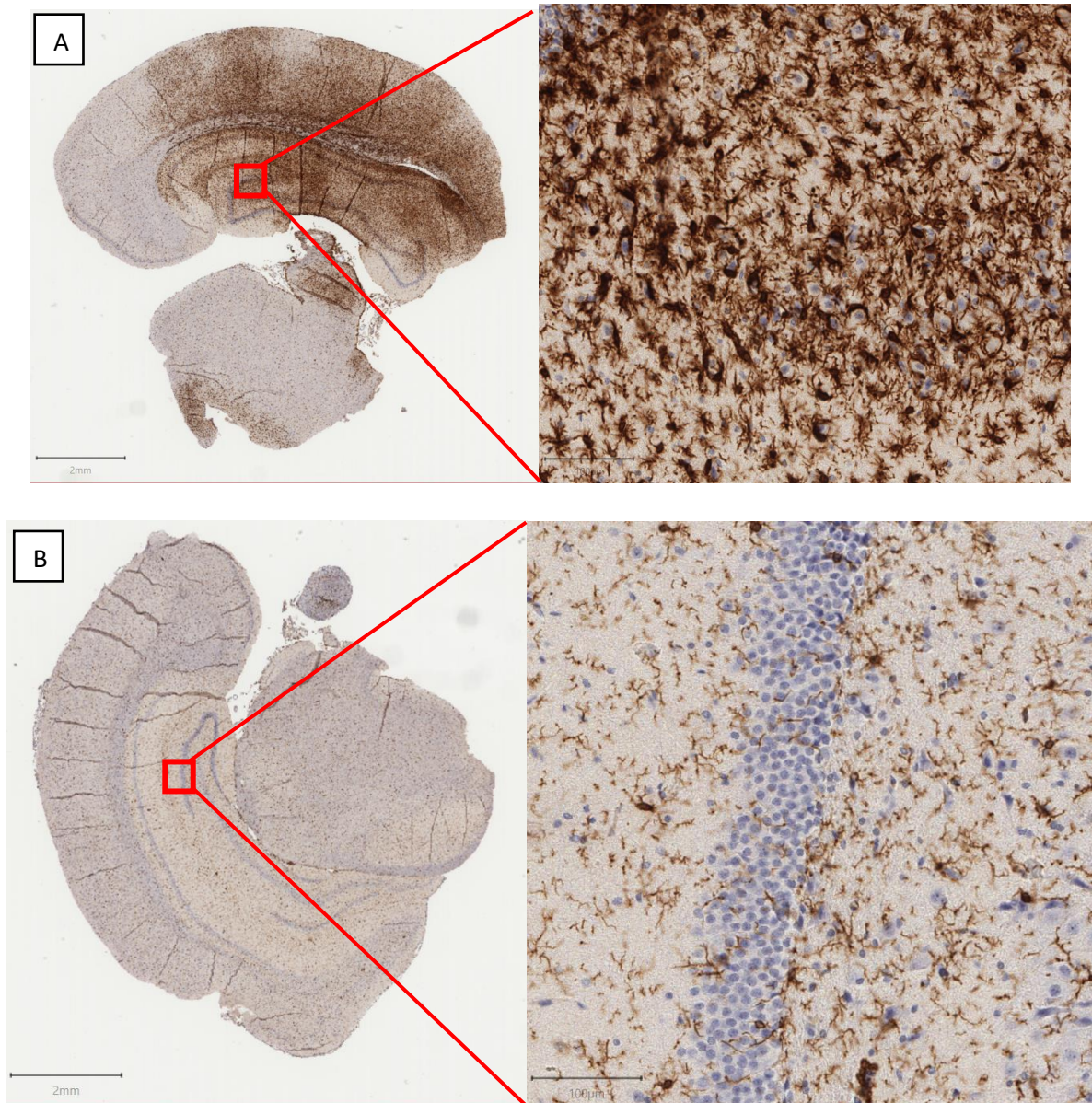
Certains résultats tendent à montrer un impact plus important à la fragmentation de sommeil chez les rats jeunes comparé aux rats âgés notamment au niveau des vaisseaux de l'hippocampe et de la concentration en APP. D'autres résultats ne montrent pas de différence entre les groupes. Se pose la question de savoir pourquoi. Nous pouvons émettre quelques hypothèses. Premièrement, peut-être y a-t-il des marqueurs plus sensibles que d'autres à la fragmentation de sommeil (par exemple la glie et la concentration d'APP). Deuxièmement, nous pouvons penser que notre temps d'exposition ou le nombre d'animaux inclus n'étaient pas suffisants. Peut-être qu'en l'augmentant nous aurions pu diminuer les écart-types observés pour plusieurs paramètres. Nous pouvons aussi nous demander si nous avons deux types de réponses à ce stress en fonction de l'individu, forte et faible, même si nous augmentons le n, l'écart-type restera le même. Travailler sur des rats plus âgés (2 ans et plus) serait également un axe de recherche très intéressant pour isoler le rôle spécifique de la fragilité liée à l'âge dans ce domaine des stress de neuroinflammation de bas grade. Il

faut faire attention au pourcentage de perte qui ne serait pas négligeable et au coût important que cela représenterait. Pour conclure, les résultats obtenus sur la glie, mais également ceux liés à l'âge sont très intéressants. Il faudrait continuer à creuser cette piste pour déterminer si les premiers signes de la fragmentation de sommeil ne se retrouveraient pas au niveau de la glie. Nous pourrions compléter ces données avec des données sur le système glymphatique, puisque le LCR est connu pour être également un système de clairance métabolique (entre autres).

Remerciements

Toutes les coupes IHC ont été effectuées par l'équipe de Fabien Forest, MCUPH du laboratoire anatomie et cytologie pathologique du CHU de Saint Etienne. L'analyse des résultats de ces coupes s'est faite en collaboration avec Fabien Forest.

Annexe



Annexe 1: Lames histologiques marquées à Iba1 (cellules microgliales en marron). A. Rat 61 : rat âgé de 1 an au sommeil fragmenté. B. Rat 62 : rat âgé de 1 an au sommeil fragmenté. Les coupes de gauche sont à une échelle de 2mm et les coupes de droite sont des grossissements avec une échelle de 100µm.

L'annexe 1 met en parallèle deux coupes immunohistochimiques marquées avec l'anticorps Iba1. Ces deux lames viennent de deux rats de 1 an au sommeil fragmenté qui ont partagé la même cage de fragmentation. Autrement dit, ils ont eu exactement le même protocole. Or l'annexe 1 montre une variabilité interindividuelle importante. Cela explique pourquoi nous avons obtenu des écart-types importants : les rats répondent différemment au protocole de fragmentation du sommeil.

Discussion générale et perspectives

La fragmentation du sommeil est impliquée dans de nombreuses pathologies telles que l'apnée du sommeil (Kimoff 1996), le bruxisme (Alóe 2009) et les pathologies neurodégénératives (Sohail et al. 2017; Peter-Derex et al. 2015). Elle a donc un impact considérable sur la société. Mieux la comprendre et ses conséquences est un enjeu thérapeutique. Il y a peu de littérature sur la fragmentation de sommeil pure. Elle est très souvent associée à d'autres facteurs.

La fragmentation de sommeil consiste en l'interruption répétée du cycle de sommeil. Ces interruptions peuvent avoir lieu plus de 30 fois par heure pour les cas sévères, et durent entre 3 et 15 secondes. Elles provoquent des microéveils, également appelés excitation ou « arousal » en anglais. Ces pics d'excitation provoquent une interruption du cycle de sommeil. La personne souffrant de fragmentation de sommeil voit donc ses cycles de sommeil perturbés. Or des cycles de sommeil complets et répétés sont essentiels à la mise en place des processus majeurs du sommeil, à avoir l'élimination des déchets accumulés dans le cerveau durant la journée, la récupération physique et la mémorisation. Si les cycles ne sont pas complets, ces processus ne peuvent pas se mettre en place de façon optimale. Les conséquences majeures de la fragmentation de sommeil sont les troubles de l'humeur, des problèmes dans le processus de mémorisation à court terme et l'accumulation de toxines dans le compartiment cérébral.

Mon laboratoire travaille sur les modèles cellulaires associés à l'hypoxie intermittente, et j'ai démarré ce projet de recherche sur la fragmentation qui était une nouvelle approche dans l'équipe. Il a fallu mettre en place un protocole de fragmentation de sommeil dans le cadre de ma thèse. Nous avons commencé par imposer 14 jours de fragmentation à des rats Wistar mâles de 7 semaines, avec pour la moitié des animaux 30 jours de récupération. En observant l'absence de différence entre groupe contrôle et groupe sommeil fragmenté, nous avons augmenté la période de

fragmentation à 1 mois sans période de récupération à la fin du protocole, toujours sur des rats Wistar mâles de 7 semaines. En voyant que les rats supportaient bien le protocole (pas de détérioration de l'état physique), nous trouvions intéressant d'appliquer le même protocole sur des rats âgés de 1 an et de comparer les résultats obtenus entre les groupes d'âge. Deux groupes étaient comparés : le groupe contrôle dans lequel le rat avait une nuit de sommeil « normale », et un groupe sommeil fragmenté qui subissait 30 interruptions de sommeil/heure. Notre méthode de fragmentation consistait en un cylindre divisé en deux par une paroi et reposant sur une plateforme rotative liée à un moteur. Ce dispositif a d'abord été utilisé dans le cadre de la privation de sommeil, mais a également été validé par EEG dans un protocole de fragmentation de sommeil (Leenaars et al. 2011; Ringgold et al. 2013).

Deux études se sont alors mises en place en parallèle :

1. Une étude *in vivo* comportemental, dans laquelle nous avons effectué des courbes pondérales, des tests de mémoire spatiale avec le labyrinthe en Y et sur 8 rats âgés de 1 an, des enregistrements de vocalisations.
2. Une étude *in vitro* sur cerveaux, où nous avons optimisé un protocole de western blot, effectué des tests ELISA sur des protéines de jonction de la barrière hémato-encéphalique, de l'inflammation et de la neuroinflammation, et des coupes immunohistochimiques en marquant des cellules de la glie (microglie et astrocytes).

Lors de l'étude *in vivo* nous avons fait des pesées 2 fois par semaine (lors des changes des cages) pour voir l'évolution du poids. Il avait déjà été montré dans la littérature que la fragmentation de sommeil provoquait une prise de poids chez les souris jeunes adultes (Y. Wang et al. 2014). Sur les rats jeunes, il n'y a pas eu d'impact sur la croissance. Par contre, chez les rats âgés de 1 an, nous avons observé une perte de poids des animaux au sommeil fragmenté. Or c'est plutôt le contraire qui est observé dans la

littérature (Y. Wang et al. 2014). Lors de ces différents protocoles, nous avons également testé la mémoire spatiale des rats à travers des tests de labyrinthe en Y. Ce dispositif est reconnu pour ne pas induire de stress à l'animal durant le test (Costa, Serra, and Simola 2021). Aucune différence n'a été observée relativement au nombre de combinaisons correctes que ce soit entre groupe contrôle et sommeil fragmenté et entre jeunes et âgés. Cependant, en ce qui concerne le nombre d'entrées, c'est-à-dire le nombre de bras dans lequel sont allés les rats, on observe une différence entre groupes d'âge, les rats âgés ont tendance à moins se déplacer que les rats jeunes. J'ai également observé que les rats âgés se déplaçaient moins au bout de 7 minutes de tests. Il pourrait être intéressant de diviser les résultats en deux périodes : les 5 premières minutes et les 5 dernières minutes. Lors du dernier protocole *in vivo*, nous avons voulu déterminer l'impact du protocole de fragmentation de sommeil sur les vocalisations de rats. Cette étude **pilote** a été faite sur 4 rats contrôles âgés et 4 rats au sommeil fragmenté âgés. Je n'ai pas trouvé dans la littérature d'autres exemples de protocoles de perturbation de sommeil (que ce soit privation, restriction ou fragmentation) où les vocalisations ont été enregistrées. Les vocalisations étaient enregistrées durant 15 minutes toutes les heures, soit 24 enregistrements en une journée, soit 672 enregistrements par cage sur le protocole de 1 mois. De ces enregistrements ont été isolés le nombre de vocalisations émises, mais également leur catégorie : 22kHz pour des vocalisations dites de mal-être et 50kHz pour des vocalisations dites positives. Nous n'avons pas observé de différences entre groupe contrôle et SF. Cependant, l'enregistrement de ces vocalisations nous a montré qu'après le début du protocole, le nombre de vocalisations diminuait de façon significative et que les vocalisations à 22kHz était plus présente. De plus, les enregistrements effectués dans le labyrinthe en Y durant les tests de mémoire spatiale, ont montré que les rats n'étaient pas stressés par cette méthode puisque les vocalisations qui prédominaient étaient à 50kHz, ce qui confirme ce qui a été trouvé dans la littérature (Costa, Serra, and Simola 2021).

Au vu des résultats obtenus, nous nous sommes interrogés sur le fait que les modifications qui surviennent en conséquence de la fragmentation du sommeil apparaissent d'abord sur un plan métabolique. Pour cela, nous avons effectué des coupes de cerveaux en paraffine. Nous avons marqué 3 types cellulaires : les astrocytes, la microglie et les cellules endothéliales vasculaires. Ces 3 cellules donnent des informations sur l'état de la glie. La glie représente l'environnement des neurones. Les astrocytes apportent support et nutriments aux neurones et la microglie est le siège principal de l'immunité du système nerveux central. D'après les résultats obtenus, il semblerait que les rats jeunes supportent moins bien le protocole de fragmentation que les rats âgés. En effet, même si les différences ne sont pas significatives, les rats jeunes contrôles présentent plus d'astrocytes et de vaisseaux par μm^2 de surface de l'hippocampe. Pourtant, lorsque nous regardons la répartition cellulaire en faisant le rapport des cellules marquées (astrocytes, microglie ou cellules endothéliales vasculaires) sur les cellules totales (neurones hippocampiques), nous n'observons pas de différence entre groupe contrôle et groupe au sommeil fragmenté. Nous nous attendions à ce qu'il y ait moins de cellules marquées par rapport au nombre total de cellules pour le groupe sommeil fragmenté, ça aurait été cohérent avec les résultats précédents. Une hypothèse que nous avons voulu vérifier est la présence possible d'œdème interstitiel. S'il y avait présence d'œdème, la quantité de cellules totale (ou neurones hippocampiques) aurait été moins importante puisque l'infiltration d'eau dans l'hippocampe aurait pris leur place (Neri et al. 2018). Nous avons donc calculé le nombre de cellules marquées par μm^2 d'hippocampe. Malgré l'absence de significativité, nous avons observé une quantité totale de cellules par μm^2 moins importante chez les rats jeunes au sommeil fragmenté que chez ceux du groupe contrôle. En ce qui concerne les rats âgés, nous n'avons pas observé de différence entre les groupes. Cependant, nous avons remarqué une forte disparité dans les réponses des rats au sommeil fragmenté comparé aux contrôles. Certains sont très sensibles au protocole de fragmentation tandis que d'autres ne le sont presque pas.

Cette situation est assez représentative de ce que l'on peut trouver chez l'Homme. En effet, les différences interindividuelles sont très importantes. En réunissant ces résultats, nous pouvons définir que ce qu'il se passe au niveau de la glie pourrait être une des premières altérations consécutives à la fragmentation du sommeil. Afin de déterminer si notre protocole de fragmentation a provoqué une activation microgliale, nous pourrions déterminer si la microglie est différente entre les groupes contrôles et SF des rats jeunes et âgés (aire occupée, différence morphologique ...). Il serait également intéressant de savoir si la microglie est dans un état M1 (proinflammatoire) et M2 (anti-inflammatoire) (Tang and Le 2016).

Pour compléter nos données sur la présence d'éventuels œdèmes interstitiels, nous avons également testé l'aquaporine-4 cérébrale. En effet, comme il s'agit d'un canal hydrique et que nous avons décelé de potentiels œdèmes interstitiels cérébraux, nous trouvons intéressant de doser cette molécule. Malheureusement, aucune différence entre groupe contrôle et sommeil fragmenté n'a été décelée. Par contre, nous observons toujours cette différence liée à l'âge avec plus d'aquaporine-4 chez les rats âgés comparés aux rats jeunes.

Pour compléter ces résultats, et en continuité de ce qui a été fait dans notre laboratoire auparavant, nous avons étudié le dysfonctionnement de la BHE.

Nous avons d'abord étudié l'expression de deux protéines de jonctions serrées : la claudine-5 et l'occludine afin de déterminer l'état d'ouverture de la BHE. Nous n'avons observé aucune différence entre les différents groupes contrôle/sommeil fragmenté, jeunes/âgés pour les concentrations cérébrales de claudine-5. En revanche, nous avons observé une différence significative entre rats jeunes et rats âgés pour la concentration cérébrale en occludine. La concentration en occludine augmente avec l'âge, contrairement à la claudine-5. Dans la littérature il a été montré que la concentration en occludine diminuait entre des rats de 12 et 24 mois (Mooradian, Haas, and Chegade 2003). Cependant, nous comparons des rats qui ont 13 semaines et 13 mois à la fin du protocole de fragmentation.

Il est donc difficile d'extrapoler ces résultats à notre étude. Nous avons complété ce travail avec l'étude de cytokines pro-inflammatoires qui pourrait être la résultante du stress occasionné par la fragmentation. Nous avons également dosé l'IL-17 pour déterminer s'il y avait une inflammation cérébrale. Cette molécule, à laquelle s'était intéressée mon laboratoire, n'a montrée aucune différence entre groupe contrôle et groupe sommeil fragmenté, mais une différence significative entre rats jeunes et rats âgés, avec plus d'IL-17 chez ces derniers. Ce résultats est cohérent avec celui retrouvé chez l'Homme (De Angulo et al. 2015). La dernière molécule testée a été la protéine précurseur des amyloïdes. Cette protéine peut devenir par la suite une molécule β -amyloïde. En cas d'accumulation au niveau neuronal, cette protéine peut être à l'origine des pathologies telles qu'Alzheimer par exemple. Nous avons observé plus d'APP chez les rats jeunes contrôles que chez les rats jeunes au sommeil fragmenté. Ce résultat pourrait être l'expression de processus d'élimination des toxines cérébrales compensatoires et boostés chez les rats jeunes au sommeil fragmenté. Cette différence n'est pas visible chez les rats âgés. Ce résultat conforte ceux obtenus sur la glie qui tendait à montrer que les rats jeunes semblent moins bien subir le protocole de fragmentation que les rats âgés. La question se pose de savoir si, comme chez l'Homme (Tel 2013), le sommeil du rat âgé ne se détériore-t-il pas naturellement. Dans ce cas-là, ils subiraient la fragmentation du sommeil différemment des rats jeunes et peut-être que les effets de celle-ci mettraient beaucoup plus de temps à être visibles ?

Des travaux complémentaires sur le modèle de fragmentation ont été effectués au laboratoire sur le remodelage vasculaire et l'étude de biomarqueurs sanguins exosomaux de type neuronal et de type vasculaires. Ces deux approches ont été mises en œuvre et pour déterminer des facteurs précoces de perturbations physiopathologiques cardiovasculaires et neurologiques liées à la fragmentation du sommeil dans le contexte de l'apnée obstructive du sommeil. Nous avons choisi le CD31 comme

biomarqueur de modifications endothéliales précoces. Nous avons obtenu des résultats semblables dans notre modèle de rats jeunes/âgés fragmentés à ceux de Morales-Prieto *et al.*, 2022 qui a montré que les souris âgées exprimaient plus de marqueurs de cellules endothéliales CD31 par rapport aux souris jeunes (Morales-Prieto *et al.* 2022). Dans la littérature, il a été démontré que le contenu exosomal en CD31 chez les patients hypertendus était augmenté avec la pression systolique (Zhu *et al.* 2021). Le CD31 pourrait être d'intérêt en montrant les signes précoces de perturbations vasculaires. On observe une augmentation de CD31 entre les rats jeunes et âgés. En revanche aucune différence n'est observée entre les rats fragmentés et les rats contrôles. Une étude montre que l'émergence de perturbation vasculaire importante commence aux alentours de 8 à 9 semaines de fragmentation (Carreras *et al.* 2014). En revanche, nous avons observé des signes précoces de modifications vasculaires avec l'augmentation du diamètre de l'aorte après nos 4 semaines de fragmentation dans le modèle de rats âgés. Nous avons choisi d'évaluer le contenu exosomal de la protéine Tau comme biomarqueur car bien décrit dans la littérature associé à la dysfonction neurocognitive (Fiandaca *et al.* 2015; Hornung, Dutta, and Bitan 2020; Zou *et al.* 2022). Nous avons observé que la quantité de Tau augmente avec l'âge et à tendance à augmenter avec la fragmentation du sommeil mais cette tendance reste à confirmer. Ce dernier résultat est assez complémentaire de ce que nous observons avec les APP. Les résultats montrent que cette fragmentation du sommeil induit une communication par les exosomes et un changement structural vasculaire précoce comme une augmentation du diamètre des aortes, cet aspect doit être pris en compte dans les perspectives de ce travail de thèse.

En vue d'améliorer le protocole et éventuellement obtenir des résultats plus concluants, il faudrait déterminer si les cycles de fragmentation présentés dans la littérature sont cohérents. En effet, il existe des différences majeures entre le sommeil humain et celui des rats. Ce dernier est

polyphasique et naturellement fragmenté. Se pose donc la question de savoir si 30 interruptions/heure, qui, je le rappelle, représente une fragmentation de sommeil sévère chez l'homme ont le même impact chez les rats. Après avoir répondu à cette question, nous pourrions adapter le protocole. Il pourrait également être intéressant de travailler sur des rats plus âgés, par exemple de 2 ans, en prenant en compte le pourcentage de perte qui pourrait être important.

Pour conclure, ce travail sur la fragmentation a montré des résultats auxquels nous ne nous attendions pas. Nous pensions que les rats âgés montreraient des perturbations métaboliques et cognitives plus importantes, or il semblerait que ce soit l'inverse. La différence entre groupes contrôle et sommeil fragmenté n'est pas aussi nette que nous le pensions. Les conséquences de la fragmentation de sommeil chronique pure semblent subtiles et mettent du temps à se mettre en place. Cependant, elles sont bien présentes. Mieux comprendre quand et comment elles se mettent en place, et comment elles évoluent avec l'âge serait une piste prometteuse pour déterminer la place de la fragmentation de sommeil chronique dans la mise en place et/ou dans l'aggravation de pathologies telles que l'apnée du sommeil et Alzheimer.

Bibliographie

- Abbott, Sabra M., and Aleksandar Videnovic. 2016. 'Chronic Sleep Disturbance and Neural Injury: Links to Neurodegenerative Disease'. *Nature and Science of Sleep* 8: 55–61. <https://doi.org/10.2147/NSS.S78947>.
- Aday, S., R. Cecchelli, D. Hallier-Vanuxeem, M. P. Dehouck, and L. Ferreira. 2016. 'Stem Cell-Based Human Blood–Brain Barrier Models for Drug Discovery and Delivery'. *Trends in Biotechnology* 34 (5): 382–93. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.01.001>.
- Albrecht, Urs, and Jürgen A. Ripperger. 2018. 'Circadian Clocks and Sleep: Impact of Rhythmic Metabolism and Waste Clearance on the Brain'. *Trends in Neurosciences, Special Issue: Time in the Brain*, 41 (10): 677–88. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2018.07.007>.
- Alger, Sara E., Hiuyan Lau, and William Fishbein. 2012. 'Slow Wave Sleep during a Daytime Nap Is Necessary for Protection from Subsequent Interference and Long-Term Retention'. *Neurobiology of Learning and Memory* 98 (2): 188–96. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2012.06.003>.
- Allen, Nicola J., and Ben A. Barres. 2009. 'Glia — More than Just Brain Glue'. *Nature* 457 (7230): 675–77. <https://doi.org/10.1038/457675a>.
- Almendros, Isaac, Maria José Menal, David Gozal, Anna Colell, and Ramon Farré. 2018. 'Late Breaking Abstract - Differential Effect of Intermittent Hypoxia and Sleep Fragmentation in the Progression of Alzheimer Disease in a Mouse Model of Obstructive Sleep Apnea'. *European Respiratory Journal* 52 (suppl 62). <https://doi.org/10.1183/13993003.congress-2018.OA3284>.
- Alóe, Flávio. 2009. 'Sleep bruxism neurobiology'. *Sleep Science* 2 (1): 40–48.
- Alphen, Bart van, Evan R. Semenza, Melvyn Yap, Bruno van Swinderen, and Ravi Allada. n.d. 'A Deep Sleep Stage in Drosophila with a Functional Role in Waste Clearance'. *Science Advances* 7 (4): eabc2999. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abc2999>.
- Alvarez, Jorge Ivan, Takahiro Katayama, and Alexandre Prat. 2013. 'Glial Influence on the Blood Brain Barrier'. *Glia* 61 (12): 1939–58. <https://doi.org/10.1002/glia.22575>.
- Anderson, J. W. 1954. 'The Production of Ultrasonic Sounds by Laboratory Rats and Other Mammals'. *Science (New York, N.Y.)* 119 (3101): 808–9. <https://doi.org/10.1126/science.119.3101.808>.
- Artero, S., M.-L. Ancelin, F. Portet, A. Dupuy, C. Berr, J.-F. Dartigues, C. Tzourio, et al. 2008. 'Risk Profiles for Mild Cognitive Impairment and Progression to Dementia Are Gender Specific'. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 79 (9): 979–84. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2007.136903>.
- Atri, Alireza. 2019. 'The Alzheimer's Disease Clinical Spectrum: Diagnosis and Management'. *Medical Clinics* 103 (2): 263–93. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2018.10.009>.
- Axelsson, John, Michael Ingre, Torbjörn Åkerstedt, and Ulf Holmbäck. 2005. 'Effects of Acutely Displaced Sleep on Testosterone'. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 90 (8): 4530–35. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-0520>.

- Balestrino, R., and A. H. V. Schapira. 2020. 'Parkinson Disease'. *European Journal of Neurology* 27 (1): 27–42. <https://doi.org/10.1111/ene.14108>.
- Banks, Siobhan, and David F. Dinges. 2007. 'Behavioral and Physiological Consequences of Sleep Restriction'. *Journal of Clinical Sleep Medicine : JCSM : Official Publication of the American Academy of Sleep Medicine* 3 (5): 519–28.
- Barker, David J. 2018. 'Ultrasonic Vocalizations as an Index of Positive Emotional State'. In *Handbook of Behavioral Neuroscience*, 25:253–60. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809600-0.00024-X>.
- Baud, Maxime O., Pierre J. Magistretti, and Jean-Marie Petit. 2013. 'Sustained Sleep Fragmentation Affects Brain Temperature, Food Intake and Glucose Tolerance in Mice'. *Journal of Sleep Research* 22 (1): 3–12. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2869.2012.01029.x>.
- Baud, Maxime O., Julia Parafita, Audrey Nguyen, Pierre J. Magistretti, and Jean-Marie Petit. 2016. 'Sleep Fragmentation Alters Brain Energy Metabolism without Modifying Hippocampal Electrophysiological Response to Novelty Exposure'. *Journal of Sleep Research* 25 (5): 583–90. <https://doi.org/10.1111/jsr.12419>.
- Berry, RB, R Brooks, CE Gamaldo, SM Harding, RM Lloyd, CL Marcus, and BV Vaughn. n.d. 'The AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events: Rules, Terminology and Technical Specifications, Version 2.2.' *Darien, Illinois: American Academy of Sleep Medicine, 2015*.
- Blum-Degen, D., T. Müller, W. Kuhn, M. Gerlach, H. Przuntek, and P. Riederer. 1995. 'Interleukin-1 Beta and Interleukin-6 Are Elevated in the Cerebrospinal Fluid of Alzheimer's and de Novo Parkinson's Disease Patients'. *Neuroscience Letters* 202 (1–2): 17–20. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(95\)12192-7](https://doi.org/10.1016/0304-3940(95)12192-7).
- Bonnet, H. n.d. 'The Effect of Sleep Fragmentation on Sleep and Performance in Younger and Older Subjects', 5.
- Bonnet, M. H., and D. L. Arand. 1997. 'Heart Rate Variability: Sleep Stage, Time of Night, and Arousal Influences'. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* 102 (5): 390–96. [https://doi.org/10.1016/s0921-884x\(96\)96070-1](https://doi.org/10.1016/s0921-884x(96)96070-1).
- Bonnet, Michael H., and Donna L. Arand. 2003. 'Clinical Effects of Sleep Fragmentation versus Sleep Deprivation'. *Sleep Medicine Reviews* 7 (4): 297–310. <https://doi.org/10.1053/smr.2001.0245>.
- Boyer, P, M Crocq, J Guelfi, C Pul, and M Pull-Erpelding. n.d. *Mini DSM5 Critères Diagnostiques*. 2016th ed. Paris: Elsevier Masson.
- Brudzynski, S. M., F. Bihari, D. Ociepa, and X. W. Fu. 1993. 'Analysis of 22 KHz Ultrasonic Vocalization in Laboratory Rats: Long and Short Calls'. *Physiology & Behavior* 54 (2): 215–21. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(93\)90102-l](https://doi.org/10.1016/0031-9384(93)90102-l).
- Brudzynski, Stefan M. 2013. 'Ethotransmission: Communication of Emotional States through Ultrasonic Vocalization in Rats'. *Current Opinion in Neurobiology* 23 (3): 310–17. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2013.01.014>.

- Brzecka, Anna, Jerzy Leszek, Ghulam Md Ashraf, Maria Ejma, Marco F. Ávila-Rodríguez, Nagendra S. Yarla, Vadim V. Tarasov, et al. 2018. 'Sleep Disorders Associated With Alzheimer's Disease: A Perspective'. *Frontiers in Neuroscience* 12 (May). <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00330>.
- Buée, Luc, Thierry Bussi re, Val rie Bu e-Scherrer, André Delacourte, and Patrick R. Hof. 2000. 'Tau Protein Isoforms, Phosphorylation and Role in Neurodegenerative Disorders' These Authors Contributed Equally to This Work.' *Brain Research Reviews* 33 (1): 95–130. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(00\)00019-9](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(00)00019-9).
- Burgdorf, Jeffrey, and Joseph R. Moskal. 2010. 'Chapter 6.2 - Frequency Modulated 50 KHz Ultrasonic Vocalizations Reflect a Positive Emotional State in the Rat: Neural Substrates and Therapeutic Implications'. In *Handbook of Behavioral Neuroscience*, edited by Stefan M. Brudzynski, 19:209–14. Handbook of Mammalian Vocalization. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374593-4.0021-8>.
- Busse, Anja, Jeannette Bischkopf, Steffi G. Riedel-Heller, and Matthias C. Angermeyer. 2003. 'Mild Cognitive Impairment: Prevalence and Incidence According to Different Diagnostic Criteria: Results of the Leipzig Longitudinal Study of the Aged (LEILA75+)'. *The British Journal of Psychiatry* 182 (5): 449–54. <https://doi.org/10.1192/bjp.182.5.449>.
- Calignon, Alix de, Manuela Polydoro, Marc Suárez-Calvet, Christopher William, David H. Adamowicz, Kathy J. Kopeikina, Rose Pitstick, et al. 2012. 'Propagation of Tau Pathology in a Model of Early Alzheimer's Disease'. *Neuron* 73 (4): 685–97. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.11.033>.
- Carmeliet, P., M. G. Lampugnani, L. Moons, F. Breviario, V. Compernelle, F. Bono, G. Balconi, et al. 1999. 'Targeted Deficiency or Cytosolic Truncation of the VE-Cadherin Gene in Mice Impairs VEGF-Mediated Endothelial Survival and Angiogenesis'. *Cell* 98 (2): 147–57. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81010-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81010-7).
- Carreras, Alba, Shelley X. Zhang, Eduard Peris, Zhuanhong Qiao, Alex Gileles-Hillel, Richard C. Li, Yang Wang, and David Gozal. 2014. 'Chronic Sleep Fragmentation Induces Endothelial Dysfunction and Structural Vascular Changes in Mice'. *Sleep* 37 (11): 1817–24. <https://doi.org/10.5665/sleep.4178>.
- Carrington, Melinda J., and John Trinder. 2008a. 'Blood Pressure and Heart Rate During Continuous Experimental Sleep Fragmentation in Healthy Adults'. *Sleep* 31 (12): 1701–12.
- . 2008b. 'Blood Pressure and Heart Rate During Continuous Experimental Sleep Fragmentation in Healthy Adults'. *Sleep* 31 (12): 1701–12.
- Chan, H. Y. E., and N. M. Bonini. 2000. 'Drosophila Models of Human Neurodegenerative Disease'. *Cell Death & Differentiation* 7 (11): 1075–80. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400757>.
- Chouchou, Florian, Vincent Pichot, Jean-Claude Barthélémy, Hélène Bastuji, and Frédéric Roche. 2014. 'Cardiac Sympathetic Modulation in Response to Apneas/Hypopneas through Heart Rate Variability Analysis'. *PloS One* 9 (1): e86434. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086434>.
- Clavaguera, Florence, Tristan Bolmont, R. Anthony Crowther, Dorothee Abramowski, Stephan Frank, Alphonse Probst, Graham Fraser, et al. 2009. 'Transmission and Spreading of Tauopathy in Transgenic Mouse Brain'. *Nature Cell Biology* 11 (7): 909–13. <https://doi.org/10.1038/ncb1901>.

- Colten, Harvey R., Bruce M. Altevogt, and Institute of Medicine (US) Committee on Sleep Medicine and Research. 2006. *Sleep Physiology*. National Academies Press (US). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19956/>.
- Corada, M., M. Mariotti, G. Thurston, K. Smith, R. Kunkel, M. Brockhaus, M. G. Lampugnani, et al. 1999. 'Vascular Endothelial-Cadherin Is an Important Determinant of Microvascular Integrity in Vivo'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (17): 9815–20. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.17.9815>.
- Costa, Giulia, Marcello Serra, and Nicola Simola. 2021. 'Association between Novel Object Recognition/Spontaneous Alternation Behavior and Emission of Ultrasonic Vocalizations in Rats: Possible Relevance to the Study of Memory'. *Brain Sciences* 11 (8): 1053. <https://doi.org/10.3390/brainsci11081053>.
- Critchley, H. D., E. M. Daly, E. T. Bullmore, S. C. Williams, T. Van Amelsvoort, D. M. Robertson, A. Rowe, et al. 2000. 'The Functional Neuroanatomy of Social Behaviour: Changes in Cerebral Blood Flow When People with Autistic Disorder Process Facial Expressions'. *Brain: A Journal of Neurology* 123 (Pt 11) (November): 2203–12. <https://doi.org/10.1093/brain/123.11.2203>.
- Cui, Linyang, Rong Xue, Xuan Zhang, Shuli Chen, Yahui Wan, and Wei Wu. 2019. 'Sleep Deprivation Inhibits Proliferation of Adult Hippocampal Neural Progenitor Cells by a Mechanism Involving IL-17 and P38 MAPK'. *Brain Research* 1714 (July): 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.01.024>.
- Cummins, Philip M. 2012. 'Occludin: One Protein, Many Forms'. *Molecular and Cellular Biology* 32 (2): 242–50. <https://doi.org/10.1128/MCB.06029-11>.
- Dawson, Drew, and Kathryn Reid. 1997. 'Fatigue, Alcohol and Performance Impairment'. *Nature* 388 (6639): 235–235. <https://doi.org/10.1038/40775>.
- De Angulo, Alejandra, Robert Faris, Benjamin Daniel, Christopher Jolly, and Linda deGraffenried. 2015. 'Age-Related Increase in IL-17 Activates pro-Inflammatory Signaling in Prostate Cells'. *The Prostate* 75 (5): 449–62. <https://doi.org/10.1002/pros.22931>.
- Dejana, Elisabetta, Fabrizio Orsenigo, and Maria Grazia Lampugnani. 2008. 'The Role of Adherens Junctions and VE-Cadherin in the Control of Vascular Permeability'. *Journal of Cell Science* 121 (13): 2115–22. <https://doi.org/10.1242/jcs.017897>.
- Diekelmann, Susanne, and Jan Born. 2010. 'The Memory Function of Sleep'. *Nature Reviews Neuroscience* 11 (2): 114–26. <https://doi.org/10.1038/nrn2762>.
- Dijk, Derk-Jan, and Jeanne F Duffy. 1999. 'Circadian Regulation of Human Sleep and Age-Related Changes in Its Timing, Consolidation and EEG Characteristics'. *Annals of Medicine* 31 (2): 130–40. <https://doi.org/10.3109/07853899908998789>.
- Duncan, M.J., L.E. Guerriero, K. Kohler, L.E. Beechem, B.D. Gillis, F. Salisbury, C. Wessel, et al. 2022. 'Chronic Fragmentation of the Daily Sleep-Wake Rhythm Increases Amyloid-Beta Levels and Neuroinflammation in the 3xTg-AD Mouse Model of Alzheimer's Disease'. *Neuroscience* 481 (January): 111–22. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2021.11.042>.
- Erta, María, Albert Quintana, and Juan Hidalgo. 2012. 'Interleukin-6, a Major Cytokine in the Central Nervous System'. *International Journal of Biological Sciences* 8 (9): 1254–66. <https://doi.org/10.7150/ijbs.4679>.

- Everson, Carol A., Bernard M. Bergmann, and Allan Rechtschaffen. 1989. 'Sleep Deprivation in the Rat: III. Total Sleep Deprivation'. *Sleep* 12 (1): 13–21. <https://doi.org/10.1093/sleep/12.1.13>.
- Fanning, A. S., B. J. Jameson, L. A. Jesaitis, and J. M. Anderson. 1998. 'The Tight Junction Protein ZO-1 Establishes a Link between the Transmembrane Protein Occludin and the Actin Cytoskeleton'. *The Journal of Biological Chemistry* 273 (45): 29745–53. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.45.29745>.
- Feldman, Gemma J., James M. Mullin, and Michael P. Ryan. 2005. 'Occludin: Structure, Function and Regulation'. *Advanced Drug Delivery Reviews*, Adhesion Proteins in Cellular Tight Junctions: Critical Components in the Modulation of Paracellular Permeability, 57 (6): 883–917. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.01.009>.
- Fiandaca, Massimo S., Dimitrios Kapogiannis, Mark Mapstone, Adam Boxer, Erez Eitan, Janice B. Schwartz, Erin L. Abner, et al. 2015. 'Identification of Preclinical Alzheimer's Disease by a Profile of Pathogenic Proteins in Neurally Derived Blood Exosomes: A Case-Control Study'. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association* 11 (6): 600-607.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2014.06.008>.
- Fuller, Patrick M., Joshua J. Gooley, and Clifford B. Saper. 2006. 'Neurobiology of the Sleep-Wake Cycle: Sleep Architecture, Circadian Regulation, and Regulatory Feedback'. *Journal of Biological Rhythms* 21 (6): 482–93. <https://doi.org/10.1177/0748730406294627>.
- García-Aviles, Jesús Enrique, Rebeca Méndez-Hernández, Mara A. Guzmán-Ruiz, Miguel Cruz, Natalí N. Guerrero-Vargas, Javier Velázquez-Moctezuma, and Gabriela Hurtado-Alvarado. 2021. 'Metabolic Disturbances Induced by Sleep Restriction as Potential Triggers for Alzheimer's Disease'. *Frontiers in Integrative Neuroscience* 15 (September): 722523. <https://doi.org/10.3389/fnint.2021.722523>.
- González-Mariscal, L, A Betanzos, P Nava, and B. E Jaramillo. 2003. 'Tight Junction Proteins'. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 81 (1): 1–44. [https://doi.org/10.1016/S0079-6107\(02\)00037-8](https://doi.org/10.1016/S0079-6107(02)00037-8).
- Greene, Chris, Nicole Hanley, and Matthew Campbell. 2019. 'Claudin-5: Gatekeeper of Neurological Function'. *Fluids and Barriers of the CNS* 16 (1): 3. <https://doi.org/10.1186/s12987-019-0123-z>.
- Gur, Raquel E., Claire McGrath, Robin M. Chan, Lee Schroeder, Travis Turner, Bruce I. Turetsky, Christian Kohler, et al. 2002. 'An FMRI Study of Facial Emotion Processing in Patients with Schizophrenia'. *The American Journal of Psychiatry* 159 (12): 1992–99. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.159.12.1992>.
- Haack, Monika, Erin Lee, Daniel A. Cohen, and Janet M. Mullington. 2009. 'Activation of the Prostaglandin System in Response to Sleep Loss in Healthy Humans: Potential Mediator of Increased Spontaneous Pain'. *Pain* 145 (1–2): 136–41. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2009.05.029>.
- Harrison, F.E., A.H. Hosseini, and M.P. McDonald. 2009. 'Endogenous Anxiety and Stress Responses in Water Maze and Barnes Maze Spatial Memory Tasks'. *Behavioural Brain Research* 198 (1): 247–51. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.10.015>.

- Hebert, Liesi E., Paul A. Scherr, Julia L. Bienias, David A. Bennett, and Denis A. Evans. 2003. 'Alzheimer Disease in the US Population: Prevalence Estimates Using the 2000 Census'. *Archives of Neurology* 60 (8): 1119–22. <https://doi.org/10.1001/archneur.60.8.1119>.
- Helmer, Catherine, Florence Pasquier, and Jean-François Dartigues. 2006. 'Épidémiologie de la maladie d'Alzheimer et des syndromes apparentés'. *médecine/sciences* 22 (3): 288–96. <https://doi.org/10.1051/medsci/2006223288>.
- Hladky, Stephen B., and Margery A. Barrand. 2019. 'Metabolite Clearance During Wakefulness and Sleep'. *Handbook of Experimental Pharmacology* 253: 385–423. https://doi.org/10.1007/164_2017_37.
- Holtzman, David M., John C. Morris, and Alison M. Goate. 2011. 'Alzheimer's Disease: The Challenge of the Second Century'. *Science Translational Medicine* 3 (77): 77sr1. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002369>.
- Hong, Suzi, Paul J. Mills, Jose S. Loredó, Karen A. Adler, and Joel E. Dimsdale. 2005. 'The Association between Interleukin-6, Sleep, and Demographic Characteristics'. *Brain, Behavior, and Immunity* 19 (2): 165–72. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2004.07.008>.
- Hornung, Simon, Suman Dutta, and Gal Bitan. 2020. 'CNS-Derived Blood Exosomes as a Promising Source of Biomarkers: Opportunities and Challenges'. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2020.00038>.
- Iba, Michiyo, Jing L. Guo, Jennifer D. McBride, Bin Zhang, John Q. Trojanowski, and Virginia M.-Y. Lee. 2013. 'Synthetic Tau Fibrils Mediate Transmission of Neurofibrillary Tangles in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's-like Tauopathy'. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 33 (3): 1024–37. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2642-12.2013>.
- Iliff, Jeffrey J., Minghuan Wang, Yonghong Liao, Benjamin A. Plogg, Weiguo Peng, Georg A. Gundersen, Helene Benveniste, et al. 2012. 'A Paravascular Pathway Facilitates CSF Flow through the Brain Parenchyma and the Clearance of Interstitial Solutes, Including Amyloid β '. *Science Translational Medicine* 4 (147): 147ra111. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003748>.
- Kaneshwaran, Kirusanthi, Marta Olah, Shinya Tasaki, Lei Yu, Elizabeth M. Bradshaw, Julie A. Schneider, Aron S. Buchman, David A. Bennett, Philip L. De Jager, and Andrew S. P. Lim. 2019. 'Sleep Fragmentation, Microglial Aging, and Cognitive Impairment in Adults with and without Alzheimer's Dementia'. *Science Advances* 5 (12): eaax7331. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax7331>.
- Kaushal, Navita, Vijay Ramesh, and David Gozal. 2012. 'TNF- α and Temporal Changes in Sleep Architecture in Mice Exposed to Sleep Fragmentation'. *PLoS ONE* 7 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045610>.
- Kim, Tae Won, Jong-Hyun Jeong, and Seung-Chul Hong. 2015. 'The Impact of Sleep and Circadian Disturbance on Hormones and Metabolism'. *International Journal of Endocrinology* 2015 (March): e591729. <https://doi.org/10.1155/2015/591729>.
- Kimoff, R. John. 1996. 'Sleep Fragmentation in Obstructive Sleep Apnea'. *Sleep* 19 (suppl_9): S61–66. https://doi.org/10.1093/sleep/19.suppl_9.S61.

- King, Landon S., David Kozono, and Peter Agre. 2004. 'From Structure to Disease: The Evolving Tale of Aquaporin Biology'. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 5 (9): 687–98. <https://doi.org/10.1038/nrm1469>.
- Kloepfer, Corinna, Dieter Riemann, Eric A. Nofzinger, Bernd Feige, Josef Unterrainer, 'Hara Ruth O, Stephan Sorichter, and Christoph Nissen. 2009. 'Memory Before and After Sleep in Patients with Moderate Obstructive Sleep Apnea'. *Journal of Clinical Sleep Medicine* 05 (06): 540–48. <https://doi.org/10.5664/jcsm.27655>.
- Kraeuter, Ann-Katrin, Paul C. Guest, and Zoltán Sarnyai. 2019. 'The Y-Maze for Assessment of Spatial Working and Reference Memory in Mice'. In *Pre-Clinical Models: Techniques and Protocols*, edited by Paul C. Guest, 105–11. *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_10.
- Kutscher, Scott J., Siavash Farshidpanah, and Daniel O. Claassen. 2014. 'Sleep Dysfunction and Its Management in Parkinson's Disease'. *Current Treatment Options in Neurology* 16 (8): 304. <https://doi.org/10.1007/s11940-014-0304-7>.
- Lavie, Peretz. 2007. 'Insomnia and Sleep-Disordered Breathing'. *Sleep Medicine* 8 (December): S21–25. [https://doi.org/10.1016/S1389-9457\(08\)70005-4](https://doi.org/10.1016/S1389-9457(08)70005-4).
- Leenaars, Cathalijn H. C., Maurice Dematteis, Ruud N. J. M. A. Joosten, Leslie Eggels, Hans Sandberg, Mischa Schirris, Matthijs G. P. Feenstra, and Eus J. W. Van Someren. 2011. 'A New Automated Method for Rat Sleep Deprivation with Minimal Confounding Effects on Corticosterone and Locomotor Activity'. *Journal of Neuroscience Methods* 196 (1): 107–17. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2011.01.014>.
- Leproult, Rachel, and Eve Van Cauter. 2010. 'Role of Sleep and Sleep Loss in Hormonal Release and Metabolism'. *Endocrine Development* 17: 11–21. <https://doi.org/10.1159/000262524>.
- Li, Yanpeng, Lori A. Panossian, Jing Zhang, Yan Zhu, Guanxia Zhan, Yu-Ting Chou, Polina Fenik, et al. 2014. 'Effects of Chronic Sleep Fragmentation on Wake-Active Neurons and the Hypercapnic Arousal Response'. *Sleep* 37 (1): 51–64. <https://doi.org/10.5665/sleep.3306>.
- Lim, Andrew S. P., Matthew Kowgier, Lei Yu, Aron S. Buchman, and David A. Bennett. 2013. 'Sleep Fragmentation and the Risk of Incident Alzheimer's Disease and Cognitive Decline in Older Persons'. *Sleep* 36 (7): 1027–32. <https://doi.org/10.5665/sleep.2802>.
- Lima, Alisson Menezes Araujo, Veralice Meireles Sales de Bruin, Emiliano Ricardo Vasconcelos Rios, and Pedro Felipe Carvalhedo de Bruin. 2014. 'Differential Effects of Paradoxical Sleep Deprivation on Memory and Oxidative Stress'. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 387 (5): 399–406. <https://doi.org/10.1007/s00210-013-0955-z>.
- Liu, Li, Valerie Drouet, Jessica W. Wu, Menno P. Witter, Scott A. Small, Catherine Clelland, and Karen Duff. 2012. 'Trans-Synaptic Spread of Tau Pathology in Vivo'. *PLoS One* 7 (2): e31302. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031302>.
- Lo, Chung-Chuan, Plamen Ch. Ivanov, Lus A. Nunes Amaral, Thomas Penzel, Claus F. Vogelmeier, and H. Eugene Stanley. 2003. 'Quantification of Sleep Fragmentation Through the Analysis of Sleep-Stage Transitions'. <https://doi.org/10.48550/ARXIV.COND-MAT/0305660>.

- Ma, Xiangyu, Stephanie L. Reynolds, Brandi J. Baker, Xingang Li, Ety N. Benveniste, and Hongwei Qin. 2010. 'IL-17 Enhancement of the IL-6 Signaling Cascade in Astrocytes'. *The Journal of Immunology* 184 (9): 4898–4906. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000142>.
- Mander, Bryce A., Joseph R. Winer, and Matthew P. Walker. 2017. 'Sleep and Human Aging'. *Neuron* 94 (1): 19–36. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.02.004>.
- Manly, Jennifer J., Sandra Bell-McGinty, Ming-X. Tang, Nicole Schupf, Yaakov Stern, and Richard Mayeux. 2005. 'Implementing Diagnostic Criteria and Estimating Frequency of Mild Cognitive Impairment in an Urban Community'. *Archives of Neurology* 62 (11): 1739–46. <https://doi.org/10.1001/archneur.62.11.1739>.
- Marshall, Lisa, Halla Helgadóttir, Matthias Mölle, and Jan Born. 2006. 'Boosting Slow Oscillations during Sleep Potentiates Memory'. *Nature* 444 (7119): 610–13. <https://doi.org/10.1038/nature05278>.
- Mavanji, Vijayakumar, Jennifer A. Teske, Charles J. Billington, and Catherine M. Kotz. 2013. 'Partial Sleep Deprivation by Environmental Noise Increases Food Intake and Body Weight in Obesity Resistant Rats'. *Obesity (Silver Spring, Md.)* 21 (7): 1396–1405. <https://doi.org/10.1002/oby.20182>.
- McCorry, Laurie Kelly. 2007. 'Physiology of the Autonomic Nervous System'. *American Journal of Pharmaceutical Education* 71 (4): 78.
- McCoy, John G., Jaime L. Tartar, Alaina C. Bebis, Christopher P. Ward, James T. McKenna, Mark G. Baxter, Jill McGaughy, Robert W. McCarley, and Robert E. Strecker. 2007. 'Experimental Sleep Fragmentation Impairs Attentional Set-Shifting in Rats'. *Sleep* 30 (1): 52–60. <https://doi.org/10.1093/sleep/30.1.52>.
- McKenna, J. T., J. L. Tartar, C. P. Ward, M. M. Thakkar, J. W. Cordeira, R. W. McCarley, and R. E. Strecker. 2007. 'Sleep Fragmentation Elevates Behavioral, Electrographic and Neurochemical Measures of Sleepiness'. *Neuroscience* 146 (4): 1462–73. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.03.009>.
- McKillop, Laura E, and Vladyslav V Vyazovskiy. 2020. 'Sleep and Ageing: From Human Studies to Rodent Models'. *Current Opinion in Physiology, Physiology of sleep*, 15 (June): 210–16. <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2020.03.004>.
- Mendelsohn, Andrew R., and James W. Larrick. 2013. 'Sleep Facilitates Clearance of Metabolites from the Brain: Glymphatic Function in Aging and Neurodegenerative Diseases'. *Rejuvenation Research* 16 (6): 518–23. <https://doi.org/10.1089/rej.2013.1530>.
- Mendelson, Wallace B., and Bernard M. Bergmann. 1999. 'Age-Related Changes in Sleep in the Rat'. *Sleep* 22 (2): 145–50. <https://doi.org/10.1093/sleep/22.2.145>.
- Miglis, M. G. 2017. 'Chapter 12 - Sleep and the Autonomic Nervous System'. In *Sleep and Neurologic Disease*, edited by Mitchell G. Miglis, 227–44. San Diego: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804074-4.00018-2>.
- Milovanovic, Jelena, Aleksandar Arsenijevic, Bojana Stojanovic, Tatjana Kanjevac, Dragana Arsenijevic, Gordana Radosavljevic, Marija Milovanovic, and Nebojsa Arsenijevic. 2020. 'Interleukin-17 in Chronic Inflammatory Neurological Diseases'. *Frontiers in Immunology* 11 (June): 947. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00947>.

- Minakawa, Eiko N., Koyomi Miyazaki, Kazushi Maruo, Hiroko Yagihara, Hiromi Fujita, Keiji Wada, and Yoshitaka Nagai. 2017. 'Chronic Sleep Fragmentation Exacerbates Amyloid β Deposition in Alzheimer's Disease Model Mice'. *Neuroscience Letters* 653 (July): 362–69. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.05.054>.
- Mooradian, Arshag D., Michael J. Haas, and Joe M. Chehade. 2003. 'Age-Related Changes in Rat Cerebral Occludin and Zonula Occludens-1 (ZO-1)'. *Mechanisms of Ageing and Development* 124 (2): 143–46. [https://doi.org/10.1016/s0047-6374\(02\)00041-6](https://doi.org/10.1016/s0047-6374(02)00041-6).
- Morales-Prieto, Diana M., José M. Murrieta-Coxca, Milan Stojiljkovic, Celia Diezel, Priska E. Streicher, Julian A. Henao-Restrepo, Franziska Röstel, et al. 2022. 'Small Extracellular Vesicles from Peripheral Blood of Aged Mice Pass the Blood-Brain Barrier and Induce Glial Cell Activation'. *Cells* 11 (4): 625. <https://doi.org/10.3390/cells11040625>.
- Morley, John E., and Susan A. Farr. 2014. 'The Role of Amyloid-Beta in the Regulation of Memory'. *Biochemical Pharmacology, Alzheimer's Disease – Amyloid, Tau and Beyond*, 88 (4): 479–85. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.12.018>.
- Nagelhus, Erlend A., and Ole P. Ottersen. 2013. 'Physiological Roles of Aquaporin-4 in Brain'. *Physiological Reviews* 93 (4): 1543–62. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2013>.
- Nair, Deepti, Shelley X. L. Zhang, Vijay Ramesh, Fahed Hakim, Navita Kaushal, Yang Wang, and David Gozal. 2011. 'Sleep Fragmentation Induces Cognitive Deficits via Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase-Dependent Pathways in Mouse'. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 184 (11): 1305–12. <https://doi.org/10.1164/rccm.201107-1173OC>.
- Navarro, P., L. Caveda, F. Breviario, I. Mândoteanu, M. G. Lampugnani, and E. Dejana. 1995. 'Catenin-Dependent and -Independent Functions of Vascular Endothelial Cadherin'. *The Journal of Biological Chemistry* 270 (52): 30965–72. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.52.30965>.
- Neri, Margherita, Alessandro Frati, Emanuela Turillazzi, Santina Cantatore, Luigi Cipolloni, Marco Di Paolo, Paola Frati, et al. 2018. 'Immunohistochemical Evaluation of Aquaporin-4 and Its Correlation with CD68, IBA-1, HIF-1 α , GFAP, and CD15 Expressions in Fatal Traumatic Brain Injury'. *International Journal of Molecular Sciences* 19 (11): 3544. <https://doi.org/10.3390/ijms19113544>.
- Nofzinger, Eric A., Daniel J. Buysse, Jean M. Miewald, Carolyn C. Meltzer, Julie C. Price, Robert C. Sembrat, Hernando Ombao, et al. 2002. 'Human Regional Cerebral Glucose Metabolism during Non-rapid Eye Movement Sleep in Relation to Waking'. *Brain* 125 (5): 1105–15. <https://doi.org/10.1093/brain/awf103>.
- Pak, Victoria M., S.-Hakki Onen, Donald L. Bliwise, Nancy G. Kutner, Katherine L. Russell, and Fannie Onen. 2020. 'Sleep Disturbances in MCI and AD: Neuroinflammation as a Possible Mediating Pathway'. *Frontiers in Aging Neuroscience* 12. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.00069>.
- Palmer, Katie, Micaela Mitolo, Francesca Burgio, Francesca Meneghello, and Annalena Venneri. 2018. 'Sleep Disturbance in Mild Cognitive Impairment and Association With Cognitive Functioning. A Case-Control Study'. *Frontiers in Aging Neuroscience* 10. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00360>.

- Pan, Jiahui, Jianhui Wu, Jie Liu, Jiawu Wu, and Fei Wang. 2021. 'A Systematic Review of Sleep in Patients with Disorders of Consciousness: From Diagnosis to Prognosis'. *Brain Sciences* 11 (8): 1072. <https://doi.org/10.3390/brainsci11081072>.
- Patrick, G. T. W., and J. Allen Gilbert. 1896. 'Studies from the Psychological Laboratory of the University of Iowa: On the Effects of Loss of Sleep.' *Psychological Review* 3 (5): 469–83. <https://doi.org/10.1037/h0075739>.
- Peter-Derex, Laure, Pierre Yammine, H el ene Bastuji, and Bernard Croisile. 2015. 'Sleep and Alzheimer's Disease'. *Sleep Medicine Reviews* 19 (February): 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.smrv.2014.03.007>.
- Petersen, R. C., R. Doody, A. Kurz, R. C. Mohs, J. C. Morris, P. V. Rabins, K. Ritchie, M. Rossor, L. Thal, and B. Winblad. 2001. 'Current Concepts in Mild Cognitive Impairment'. *Archives of Neurology* 58 (12): 1985–92. <https://doi.org/10.1001/archneur.58.12.1985>.
- Petersen, R. C., G. E. Smith, S. C. Waring, R. J. Ivnik, E. G. Tangalos, and E. Kokmen. 1999. 'Mild Cognitive Impairment: Clinical Characterization and Outcome'. *Archives of Neurology* 56 (3): 303–8. <https://doi.org/10.1001/archneur.56.3.303>.
- Petersen, Ronald C., Oscar Lopez, Melissa J. Armstrong, Thomas S.D. Getchius, Mary Ganguli, David Gloss, Gary S. Gronseth, et al. 2018. 'Practice Guideline Update Summary: Mild Cognitive Impairment'. *Neurology* 90 (3): 126–35. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000004826>.
- Plucinska, Kaja, Nimesh Mody, Ruta Dekeryte, Kirsty Shearer, George Mcilroy, Mirela Delibegovic, and Bettina Platt. 2020. 'High-Fat Diet Exacerbates Cognitive and Metabolic Abnormalities in Neuronal BACE1 Knock-in Mice – Partial Prevention by Fenretinide'. *Nutritional Neuroscience* 25 (August): 1–18. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2020.1806190>.
- Poewe, Werner, Klaus Seppi, Caroline M. Tanner, Glenda M. Halliday, Patrik Brundin, Jens Volkman, Anette-Eleonore Schrag, and Anthony E. Lang. 2017. 'Parkinson Disease'. *Nature Reviews Disease Primers* 3 (1): 1–21. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.13>.
- Preston, G. M., T. P. Carroll, W. B. Guggino, and P. Agre. 1992. 'Appearance of Water Channels in Xenopus Oocytes Expressing Red Cell CHIP28 Protein'. *Science (New York, N.Y.)* 256 (5055): 385–87. <https://doi.org/10.1126/science.256.5055.385>.
- Ramesh, Vijay, Navita Kaushal, and David Gozal. 2009. 'Sleep fragmentation differentially modifies EEG delta power during slow wave sleep in socially isolated and paired mice'. *Sleep Science* 2 (2): 64–75.
- Ramesh, Vijay, Deepti Nair, Shelley X. L. Zhang, Fahed Hakim, Navita Kaushal, Foaz Kayali, Yang Wang, Richard C. Li, Alba Carreras, and David Gozal. 2012. 'Disrupted Sleep without Sleep Curtailment Induces Sleepiness and Cognitive Dysfunction via the Tumor Necrosis Factor-  Pathway'. *Journal of Neuroinflammation* 9 (1): 91. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-91>.
- Rasch, Bj orn, and Jan Born. 2013. 'About Sleep's Role in Memory'. *Physiological Reviews* 93 (2): 681–766. <https://doi.org/10.1152/physrev.00032.2012>.
- Rasmussen, Martin Kaag, Humberto Mestre, and Maiken Nedergaard. 2018. 'The Glymphatic Pathway in Neurological Disorders'. *The Lancet. Neurology* 17 (11): 1016–24. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30318-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30318-1).

- Redolfi, S., and C. Philippe. 2014. 'Nouvelles règles pour scorer les événements respiratoires du sommeil chez l'adulte : rapport de l'American Academy of Sleep Medicine 2013'. *Médecine du Sommeil* 11 (2): 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.msom.2014.03.001>.
- Reynolds, Amy C., and Siobhan Banks. 2010. 'Total Sleep Deprivation, Chronic Sleep Restriction and Sleep Disruption'. In *Progress in Brain Research*, edited by Gerard A. Kerkhof and Hans P. A. van Dongen, 185:91–103. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53702-7.00006-3>.
- Riemann, D., K. Spiegelhalder, C. Nissen, V. Hirscher, C. Baglioni, and B. Feige. 2012. 'REM Sleep Instability--a New Pathway for Insomnia?' *Pharmacopsychiatry* 45 (5): 167–76. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1299721>.
- Riemann, Dieter, Lukas B. Krone, Katharina Wulff, and Christoph Nissen. 2020. 'Sleep, Insomnia, and Depression'. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 45 (1): 74–89. <https://doi.org/10.1038/s41386-019-0411-y>.
- Ringgold, Kristyn M., R. Paulien Barf, Amrita George, Blair C. Sutton, and Mark R. Opp. 2013. 'Prolonged Sleep Fragmentation of Mice Exacerbates Febrile Responses to Lipopolysaccharide'. *Journal of Neuroscience Methods* 219 (1): 104–12. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2013.07.008>.
- Roberts, Rosebud, and David S. Knopman. 2013. 'Classification and Epidemiology of MCI'. *Clinics in Geriatric Medicine* 29 (4). <https://doi.org/10.1016/j.cger.2013.07.003>.
- Saito, Yumi, Ryosuke O. Tachibana, and Kazuo Okanoya. 2019. 'Acoustical Cues for Perception of Emotional Vocalizations in Rats'. *Scientific Reports* 9 (1): 10539. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46907-0>.
- Sforza, E., C. Jouny, and V. Ibanez. 2000. 'Cardiac Activation during Arousal in Humans: Further Evidence for Hierarchy in the Arousal Response'. *Clinical Neurophysiology: Official Journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology* 111 (9): 1611–19. [https://doi.org/10.1016/s1388-2457\(00\)00363-1](https://doi.org/10.1016/s1388-2457(00)00363-1).
- Simola, Nicola. 2022. 'Rat Ultrasonic Vocalizations and Behavioral Neuropharmacology: From the Screening of Drugs to the Study of Disease'. *Current Neuropharmacology* 13 (2): 164–79.
- Sohail, Shahmir, Lei Yu, Julie A. Schneider, David A. Bennett, Aron S. Buchman, and Andrew S.P. Lim. 2017. 'Sleep Fragmentation and Parkinson's Disease Pathology in Older Adults Without Parkinson's Disease'. *Movement Disorders : Official Journal of the Movement Disorder Society* 32 (12): 1729–37. <https://doi.org/10.1002/mds.27200>.
- Spinelli, Jessica B., and Marcia C. Haigis. 2018. 'The Multifaceted Contributions of Mitochondria to Cellular Metabolism'. *Nature Cell Biology* 20 (7): 745–54. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0124-1>.
- Squire, Larry R., and Stuart M. Zola. 1996. 'Structure and Function of Declarative and Nondeclarative Memory Systems'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 (24): 13515–22. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.24.13515>.
- Stanley, Neil. 2005. 'The Physiology of Sleep and the Impact of Ageing'. *European Urology Supplements* 3 (6): 17–23. [https://doi.org/10.1016/S1569-9056\(05\)80003-X](https://doi.org/10.1016/S1569-9056(05)80003-X).
- Stepanski, Edward J. 2002. 'The Effect of Sleep Fragmentation on Daytime Function'. *Sleep* 25 (3): 268–76. <https://doi.org/10.1093/sleep/25.3.268>.

- Sun, Yaning, Jason Yolitz, Cecilia Wang, Edward Spangler, Ming Zhan, and Sige Zou. 2013. 'Aging Studies in *Drosophila Melanogaster*'. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1048: 77–93. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-556-9_7.
- Swarnkar, Vinayak, Udantha R. Abeyratne, Craig Hukins, and Brett Duce. 2009. 'A State Transition-Based Method for Quantifying EEG Sleep Fragmentation'. *Medical & Biological Engineering & Computing* 47 (10): 1053. <https://doi.org/10.1007/s11517-009-0524-2>.
- Takahashi, Y., D. M. Kipnis, and W. H. Daughaday. 1968. 'Growth Hormone Secretion during Sleep'. *The Journal of Clinical Investigation* 47 (9): 2079–90. <https://doi.org/10.1172/JCI105893>.
- Takahisa, M., S. Togashi, T. Suzuki, M. Kobayashi, A. Murayama, K. Kondo, T. Miyake, and R. Ueda. 1996. 'The *Drosophila* Tamou Gene, a Component of the Activating Pathway of Extramacrochaetae Expression, Encodes a Protein Homologous to Mammalian Cell-Cell Junction-Associated Protein ZO-1.' *Genes & Development* 10 (14): 1783–95. <https://doi.org/10.1101/gad.10.14.1783>.
- Tang, Yu, and Weidong Le. 2016. 'Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases'. *Molecular Neurobiology* 53 (2): 1181–94. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-9070-5>.
- Tartar, Jaime L., Christopher P. Ward, James T. McKenna, Mahesh Thakkar, Elda Arrigoni, Robert W. McCarley, Ritchie E. Brown, and Robert E. Strecker. 2006a. 'Hippocampal Synaptic Plasticity and Spatial Learning Are Impaired in a Rat Model of Sleep Fragmentation'. *The European Journal of Neuroscience* 23 (10): 2739–48. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04808.x>.
- . 2006b. 'Hippocampal Synaptic Plasticity and Spatial Learning Are Impaired in a Rat Model of Sleep Fragmentation'. *The European Journal of Neuroscience* 23 (10): 2739–48. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04808.x>.
- Tauman, Riva, Louise M. O'Brien, and David Gozal. 2007. 'Hypoxemia and Obesity Modulate Plasma C-Reactive Protein and Interleukin-6 Levels in Sleep-Disordered Breathing'. *Sleep and Breathing* 11 (2): 77–84. <https://doi.org/10.1007/s11325-006-0085-7>.
- Tel, Hatice. 2013. 'Sleep Quality and Quality of Life among the Elderly People'. *Neurology, Psychiatry and Brain Research* 19 (1): 48–52. <https://doi.org/10.1016/j.npbr.2012.10.002>.
- Teran-Perez, G., Y. Arana-Lechuga, E. Esqueda-Leon, R. Santana-Miranda, J. A. Rojas-Zamorano, and J. Velazquez Moctezuma. n.d. 'Steroid Hormones and Sleep Regulation'. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 12 (11): 1040–48.
- Ting, Leon, and Atul Malhotra. 2005. 'Disorders of Sleep: An Overview'. *Primary Care* 32 (2): 305–v. <https://doi.org/10.1016/j.pop.2005.02.004>.
- Trammell, Rita A., Steve Verhulst, and Linda A. Toth. 2014. 'Effects of Sleep Fragmentation on Sleep and Markers of Inflammation in Mice'. *Comparative Medicine* 64 (1): 13–24.
- Tremblay, Marie-Ève, Beth Stevens, Amanda Sierra, Hiroaki Wake, Alain Bessis, and Axel Nimmerjahn. 2011. 'The Role of Microglia in the Healthy Brain'. *The Journal of Neuroscience* 31 (45): 16064–69. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4158-11.2011>.

- Trinder, John, Jan Kleiman, Melinda Carrington, Simon Smith, Sibilah Breen, Nellie Tan, and Young Kim. 2001. 'Autonomic Activity during Human Sleep as a Function of Time and Sleep Stage'. *Journal of Sleep Research* 10 (4): 253–64. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2869.2001.00263.x>.
- Tysnes, Ole-Bjørn, and Anette Storstein. 2017. 'Epidemiology of Parkinson's Disease'. *Journal of Neural Transmission* 124 (8): 901–5. <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1686-y>.
- Vanderheyden, William M., Miranda M. Lim, Erik S. Musiek, and Jason R. Gerstner. 2018. 'Alzheimer's Disease and Sleep–Wake Disturbances: Amyloid, Astrocytes, and Animal Models'. *Journal of Neuroscience* 38 (12): 2901–10. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1135-17.2017>.
- Vienne, Julie, Ryanne Spann, Fang Guo, and Michael Rosbash. 2016. 'Age-Related Reduction of Recovery Sleep and Arousal Threshold in Drosophila'. *Sleep* 39 (8): 1613–24. <https://doi.org/10.5665/sleep.6032>.
- Wang, Chanung, and David M. Holtzman. 2020. 'Bidirectional Relationship between Sleep and Alzheimer's Disease: Role of Amyloid, Tau, and Other Factors'. *Neuropsychopharmacology* 45 (1): 104–20. <https://doi.org/10.1038/s41386-019-0478-5>.
- Wang, Yang, Alba Carreras, SeungHoon Lee, Fahed Hakim, Shelley X. Zhang, Deepti Nair, Honggang Ye, and David Gozal. 2014. 'Chronic Sleep Fragmentation Promotes Obesity in Young Adult Mice'. *Obesity (Silver Spring, Md.)* 22 (3): 758–62. <https://doi.org/10.1002/oby.20616>.
- Ward, Christopher P., Robert W. McCarley, and Robert E. Strecker. 2009. 'Experimental Sleep Fragmentation Impairs Spatial Reference but Not Working Memory in Fischer/Brown Norway Rats'. *Journal of Sleep Research* 18 (2): 238–44. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2869.2008.00714.x>.
- Weiss, Nicolas, Florence Miller, Sylvie Cazaubon, and Pierre-Olivier Couraud. 2009. 'The Blood-Brain Barrier in Brain Homeostasis and Neurological Diseases'. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1788 (4): 842–57. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.10.022>.
- Weller, Jason, and Andrew Budson. 2018. 'Current Understanding of Alzheimer's Disease Diagnosis and Treatment'. *F1000Research* 7. <https://doi.org/10.12688/f1000research.14506.1>.
- Wichniak, Adam, Aleksandra Wierzbicka, and Wojciech Jernajczyk. 2012. 'Sleep and Antidepressant Treatment'. *Current Pharmaceutical Design* 18 (36): 5802–17. <https://doi.org/10.2174/138161212803523608>.
- Wilhelm, Imola, Csilla Fazakas, and Istvan A. Krizbai. 2011. 'In Vitro Models of the Blood-Brain Barrier'. *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 71 (1): 113–28.
- Williams, Michael J., Emelie Perland, Mikaela M. Eriksson, Josef Carlsson, Daniel Erlandsson, Loora Laan, Tabusi Mahebal, et al. 2016. 'Recurrent Sleep Fragmentation Induces Insulin and Neuroprotective Mechanisms in Middle-Aged Flies'. *Frontiers in Aging Neuroscience* 8 (August). <https://doi.org/10.3389/fnagi.2016.00180>.
- Wöhr, Markus, and Rainer K. W. Schwarting. 2013. 'Affective Communication in Rodents: Ultrasonic Vocalizations as a Tool for Research on Emotion and Motivation'. *Cell and Tissue Research* 354 (1): 81–97. <https://doi.org/10.1007/s00441-013-1607-9>.

- Xie, Lulu, Hongyi Kang, Qiwu Xu, Michael J. Chen, Yonghong Liao, Meenakshisundaram Thiyagarajan, John O'Donnell, et al. 2013. 'Sleep Drives Metabolite Clearance from the Adult Brain'. *Science (New York, N.Y.)* 342 (6156). <https://doi.org/10.1126/science.1241224>.
- Xie, Yi, Li Ba, Min Wang, Sai-Yue Deng, Si-Miao Chen, Li-Fang Huang, Min Zhang, Wei Wang, and Feng-Fei Ding. 2020. 'Chronic Sleep Fragmentation Shares Similar Pathogenesis with Neurodegenerative Diseases: Endosome-Autophagosome-Lysosome Pathway Dysfunction and Microglia-Mediated Neuroinflammation'. *CNS Neuroscience & Therapeutics* 26 (2): 215–27. <https://doi.org/10.1111/cns.13218>.
- Yang, Shuai, Xiao-Yi Kong, Ting Hu, Yi-Jun Ge, Xue-Yan Li, Jun-Tao Chen, Shuo He, Ping Zhang, and Gui-Hai Chen. 2022. 'Aquaporin-4, Connexin-30, and Connexin-43 as Biomarkers for Decreased Objective Sleep Quality and/or Cognition Dysfunction in Patients With Chronic Insomnia Disorder'. *Frontiers in Psychiatry* 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpsy.2022.856867>.
- Zhu, Zhidong, Yanyun Shen, Yunfeng Chen, Haiming Shi, and Yun Shi. 2021. 'The Exosome of Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM1) Protein'. *Medicine* 100 (4): e21370. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000021370>.
- Zou, Yutong, Danni Mu, Xiaoli Ma, Danchen Wang, Jian Zhong, Jing Gao, Songlin Yu, and Ling Qiu. 2022. 'Review on the Roles of Specific Cell-Derived Exosomes in Alzheimer's Disease'. *Frontiers in Neuroscience* 16. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2022.936760>.

Review :

**The importance of sleep
fragmentation on the development
of neurodegenerative diseases**

Importance of sleep fragmentation on development of neurodegenerative diseases

Chloé Mounichetty ¹, Florian Chouchou ², Nathalie Perek ¹, Frédéric Roche ^{1,3}

Affiliations

¹ INSERM, U1059, Sainbiose, Dysfonction Vasculaire et Hémostase, Université de Lyon, Université Jean Monnet, Saint-Etienne, France

² EA4075 Laboratoire IRISSE, UFR SHE, Université de La Réunion, Le Tampon, France

³ Service de Physiologie Clinique et de l'Exercice, Centre VISAS, CHU, Saint-Etienne, France

Acknowledgements

The authors thank the doctoral school ED SIS (Université Jean Monnet, Saint-Etienne, France) for the support/doctoral training contract obtained by Chloe Mounichetty. We also wish to thank the research association "SYNAPSE" and its successive presidents (Michel Segura, Charles Travaglini). Frederic Roche and Nathalie Perek are supported in their research program by Université Jean Monnet and INSERM.

Conflicts of interest

No conflicts of interest, financial or otherwise, have been declared by the authors.

Abstract

Sleep represents a major physiological process in the functioning of an organism and quality of life. Sleep pathologies and disruptions that affect sleep macroarchitecture and microarchitecture have severe diurnal clinical and functional consequences. Among them, sleep fragmentation, frequent in the elderly, appears as one mechanism of microarchitecture having a neurological diurnal impact. In this review, we are interested in the relationship between sleep fragmentation and neurodegenerative diseases such as moderate cognitive disorders and Alzheimer's disease. This narrative review provides a comprehensive definition of sleep fragmentation, followed by a description of methods inducing sleep fragmentation in both animals and humans; some aspects of the relationship between sleep fragmentation and neurodegenerative diseases such as moderate cognitive impairment and Alzheimer's disease are discussed. Specifically, we have focused on common neurological and metabolic consequences. These data should allow to better understand the importance of sleep fragmentation in the evolution of neurodegenerative diseases at the initial stage, as well as at the more advanced stages of neurological pathology. The final objective would be to consider these sleep disorders and disruptions in the management of these neurodegenerative diseases.

Keywords: sleep fragmentation, neurodegenerative disease, Alzheimer's disease, mild cognitive impairment

AD: Alzheimer's disease

REM: rapid eye movement

A β : amyloid β

ROS: reactive oxygen species

BBB: blood-brain barrier

SCADS: sleep continuity scale in
Alzheimer's disease scale

CDR: clinical dementia rating

SF: sleep fragmentation

CF: cerebrospinal fluid

TNF α : tumor necrosis factor α

CSF: chronic sleep fragmentation

EEG: electroencephalographic

GLUT1: glucose transporter 1

IL-6: interleukin 6

ISF: interstitial fluid

LC: locus coeruleus

LTP: long-term potentiation

MCI: mild cognitive impairment

MCI-R: revised criteria for MCI

NADPH: nicotinamide adenine
dinucleotide phosphate

Nrf2: nuclear factor erythroid 2-related
factor 2

1. Introduction

Neurodegenerative diseases represent a real plight of modern times (Scheltens et al. 2021). For the entourage of the patient and society, it is an emotional and financial burden (Scheltens et al. 2021). Indeed, as its name suggests, these are pathologies that induce a progressive structural and functional degradation of the central and peripheral nervous systems. This degradation is due to protein accumulation (such as amyloid β ($A\beta$)) leading to anatomic and functional vulnerability (Dugger and Dickson 2017). Neurocognitive skills are affected through neural dysfunctions unpinned by uncompensated apoptosis and neuronal deaths (Dugger and Dickson 2017).

Several forms of neurodegenerative cognitive diseases may be encountered. The first we will discuss is mild cognitive impairment (MCI). MCI is an acquired, significant and progressive reduction of abilities in one or more cognitive domains. This cognitive decline is persistent, not explained by depression or psychotic disorders, often associated with a change in behavior and personality (Boyer et al., 2016) . We use the term of amnesic MCI if memory dysfunction predominates and nonamnesic MCI if other cognitive features, such as language, is more prominent (Ronald C. Petersen et al. 2018). Epidemiological studies indicate a large range of MCI prevalence. In 2003 in Germany, Busse et al. found a prevalence of 3% from 929 people older than 60 years according to the clinical dementia rating (CDR) of Peterson et al. (R. C. Petersen et al. 1999; Busse et al. 2003). In Finland, there was an overall prevalence of 5.3% of MCI in 806 individuals between 60-76 years old based neuropsychological tests and a structured interview including the modified CDR (Hänninen et al. 2002). In the USA, there was a MCI incidence of 28.3% in 1315 participants older than 65 using criteria from Peterson et al. for all MCI subtypes (Manly et al. 2005; R. C. Petersen et al. 2001). For the same age range in France from 6892 participants, MCI incidence was about 42% using revised criteria (MCI-R)

(Artero et al. 2008). These data converge towards MCI having a prevalence from 3% to 42% in people over 65 years old.

AD is the most common form of neurodegenerative disorder (Weller and Budson 2018). As such, 80% of all dementia diagnoses are AD (Weller and Budson 2018). The main AD symptoms is progressive loss of memory capacity. Others known symptoms are changes in mood, anxiety and sleep (with increased fragmentation of the overall sleep–wake pattern, increased sleep during daytime, increased frequency of nocturnal awakenings, and a decrease in both slow wave and rapid eye movement (REM) sleep) (Atri 2019; Abbott and Videnovic 2016). The progression of the disease leads to confusion and impaired judgement, ending with major behavioural changes and neuropsychiatric symptoms (delusions and hallucinations) (Atri 2019). There are 35 million AD patients worldwide. In the USA, 10% of individuals aged 65 years or older suffer from AD, accounting for 5.6 million patients (Hebert et al. 2003). It is the sixth leading cause of death in the USA. In 2004 in France, the estimated number of people having AD was 850,000 (Helmer, Pasquier, and Dartigues 2006). It reaches a peak at 80 years old with 15%. Those numbers will progress to an estimated 2 million in 2040 (Helmer, Pasquier, and Dartigues 2006).

Among the many factors affecting the onset and progression of neurodegenerative diseases, sleep disturbances have been shown to play an important role in the early stages of development of these neurodegenerative disorders (Abbott and Videnovic 2016). For patients with MCI and AD, sleep is very often disturbed, potentially contributing to cognitive impairment and excessive daytime sleepiness (Peter-Derex et al. 2015). These sleep disturbances are similar to those observed in the normal elderly, such as an increase in sleep latency, difficulty with sleep maintenance, and frequent nighttime and early morning awakenings, but more severe (Peter-Derex et al. 2015).

SF is also a consequence of many sleep diseases including bruxism (Alóe 2009), obstructive sleep apnea or hypopnea (Kimoff 1996), or periodic leg movements (Ting and Malhotra 2005). In this review, we will focus on SF and its potential relationship with neurodegenerative processes, and finally with neurodegenerative diseases such as MCI and AD. The aim of this review is to highlight the relationship between SF and neurodegenerative pathologies in order to better understand their interactions. Parkinson's disease is also a neurodegenerative disease where sleep is reported as fragmented but these patients suffered from more varied forms of sleep troubles including insomnia or sleep apnea/hyponea (Sohail et al. 2017). It therefore seems difficult to attribute the evolution to sleep fragmentation rather than to other sleep troubles in Parkinson's disease. For these reasons, Parkinson's disease does not belong to the scope of this review.

To do this, we searched the term “neurodegenerative pathologies” associated with “sleep fragmentation” or “sleep disruption”. However, vocabulary for indexing articles for PubMed (Medical Subject Headings – MeSH) does not consider these last two terms, so we had to manually select appropriate articles about sleep fragmentation and exclude articles about notably sleep deprivation. For the neuropathological aspect, some specifications were used such as “Alzheimer's disease” and “mild cognitive impairment”. All animal and human data were considered.

2. Sleep Fragmentation

Sleep is a natural and unavoidable state characterized by decreases in consciousness and behavioural responsiveness (Boly et al. 2008). In animals, reduced responsiveness to potentially threatening stimuli during sleep is a danger, but sleep deprivation during several weeks induces death (Rechtschaffen and Bergmann 1995). Therefore, sleep is one of the most important

physiological processes for health. Insufficient or disturbed sleep in humans is marked by an increased risk of chronic cardiovascular (F. Chouchou et al. 2013), metabolic (Griggs et al. 2021) or psychological (Tsuno, Besset, and Ritchie 2005) diseases. Sleep has been proposed to serve an energy saving function (Berger and Phillips 1995), thermoregulation (Rechtschaffen and Bergmann 1995), reparation of cell tissue (Oswald 1980), cardiovascular and metabolic regulation (Knutson et al. 2007), or immune functions (Haack et al. 2009). However, decreased responsiveness to the external environment during sleep strongly argues in favour of the notion that sleep is essential for brain functions. Several hypotheses to explain the role of sleep in memorization have been proposed, such as trace reactivation, the systems consolidation or the synaptic homeostasis hypotheses (Rasch and Born 2013; Tononi and Cirelli 2014). It is now clear that sleep plays an important role in declarative and nondeclarative memory consolidation (Diekelmann and Born 2010). The role of sleep, especially slow-wave sleep, in memory consolidation is supported by experimental findings. For example, brain imaging studies have shown hippocampal reactivation during slow-wave sleep in the night following the learning process (Alger, Lau, and Fishbein 2012), nap containing slow-wave sleep improved memory consolidation (Alger, Lau, and Fishbein 2012), or instrumental manipulation of sleep oscillations: it has been demonstrated that the induction of slow oscillations by transcranial electrical stimulation increased spontaneous slow oscillatory activity during sleep and improved declarative memory consolidation (Marshall et al. 2006).

Another pivotal mechanism connecting sleep and memory seems to be the nightly elimination of toxins accumulated in the brain during the previous day (L. Xie et al. 2013). Physiological activities produce metabolic waste through molecule degradation or redox reaction (Spinelli and Haigis 2018). All these metabolic waste products are evacuated from the brain by the blood circulation. This activity is more important during sleep than during wakefulness (L. Xie et al. 2013). Interestingly, the glymphatic pathway, a brain fluid clearance pathway, seems to

promote the flow of cerebrospinal fluid to cervical lymphatic drainage vessels (Mendelsohn and Larrick 2013). This glymphatic pathway seems predominantly active during sleep, when the clearance of metabolites such as A β and Tau dramatically increase in comparison to wakefulness (L. Xie et al. 2013). Glymphatic and metabolic clearance dysfunctions have been shown in animal models of AD and in patients (Rasmussen, Mestre, and Nedergaard 2018; Hladky and Barrand 2019). Therefore, sleep is fundamental to neural metabolism. Sleep disturbances or SF can thus have major consequences on neural metabolism and diurnal brain functioning.

Arousals are characterized by abrupt and temporary interruptions of sleep, producing electroencephalographic (EEG) acceleration with concomitant changes in physiologic functions under autonomic control, such as heart (M. H. Bonnet and Arand 1997), vascular (blood pressure) (Carrington and Trinder 2008) and ventilator (Trinder et al. 2001) activities, that are associated with an increase in muscle tone during REM sleep (Berry et al., 2015). Contrary to sleep restriction, which is a reduction of the amount of sleep, SF represents microarousals (with a duration between 3-15 s), arousal (with a duration ≥ 15 s) (Berry et al., 2015) and phases of transitory activation (Sforza, Jouny, and Ibanez 2000), all characterized by an abrupt increase in EEG activity during phases of transitory activation with a muscular rise and tachycardia. Whatever their duration, all these EEG changes would indicate a cortical activation from an arousing stimulus generated from the peripheral nervous system (somatosensorial or auditive stimulations) or from brainstem structures (Sforza, Jouny, and Ibanez 2000). Therefore, arousals and SF marked by EEG changes represent transit and recurrent cortical activation during sleep. However, the terms “autonomic” and “subcortical” arousals are used in clinical and experimental settings to identify transient events without any EEG changes longer than 3 s (Redolfi and Philippe 2014) but associated with cardiovascular reactivity (Florian Chouchou et al. 2014). In clinical evaluation SF is therefore a consequence

of many diseases, such as sleep apnea or hypopnea (Kimoff 1996), bruxism (Alóe 2009), and periodic limb movements (Ting and Malhotra 2005). Recently, studies have highlighted the potential link between these sleep disorders and the onset of neurodegenerative diseases, including MCI (Pak et al. 2020) and AD (Brzecka et al. 2018; Pak et al. 2020).

3. Experimental methods on SF: interests and limits

SF has been studied since the 1980s. Since then, models and techniques to explore the effects of SF have evolved. Before beginning this part, it is important to define all the terms surrounding the study of SF. Firstly we have to distinguish acute SF from chronic SF. According to authors, acute SF, is when the protocol includes 3 consecutive disturbed nights (McCoy et al. 2007; Ward et al. 2009). More than that is considered as chronic SF (Carreras et al. 2014; Y. Li et al. 2014; Minakawa et al. 2017; Trammell, Verhulst, and Toth 2014). Secondly, we have to identify if the method used studies direct SF consequences or indirect. This part will cover an overview of them.

3.1. Knockout genes leading to SF

There are some studies where SF is one of the consequences of knockout genes. The consequences of SF come along with other consequences. However, it is important to know that some genes are related to SF.

Genome-wide association studies have identified mutations in *BTBD9* conferring a higher risk of restless leg movement. The main consequences are SF and motor restlessness (DeAndrade et al. 2012). Teams targeted this homolog gene in mice and flies to study mimicking effects of restless leg syndrome.

Drosophila, also known as fruit flies: To examine the phenotypic consequences of loss of *dBTD9* (*Drosophila* homolog of human *BTBD9*), Freeman et al. selected mutant flies

(Freeman et al. 2012). To confirm the effect of *dBTD9* loss on sleep, they made hypnograms. Those hypnograms showed no difference in sleep duration. In contrast, there was an increase in the number of sleep bouts and the amount of wake after sleep onset, and a decrease in average bout lengths. Taken together, those results showed that *dBTD9* loss causes SF (Freeman et al. 2012). They wanted to confirm the interest of using animal models to explore the consequences of restless leg syndrome by knocking out *BTBD9* homolog gene in *Drosophila*.

Mice: Always in the restless leg syndrome context, *BTBD9* homolog gene in mice (*mBTBD9*) was suppressed (DeAndrade et al. 2012). The authors measured hyperactivity related to restless leg syndrome and sleep. They found that homozygous *BTBD9* mutant mice were more hyperactive than wild type. Homozygous *BTBD9* mutant mice also had a decrease in amount of slow-wave sleep and an increase in awake time, arousals and finally signs of SF.

Zebrafish: Yokogawa et al. in 2007 made a deep study of sleep in zebrafish (Yokogawa et al. 2007). They tested different ways to wake up zebrafishes and observed acclimation to noise and tapping on the wall of the aquarium. They tried to use light (150 lux light during the late 6 h of sleep) and found a nearly total suppression of sleep. Then they wanted to find the conservation of sleep neurotransmitter in zebrafish. They anatomically and functionally studied the hypocretin system, the only known system to cause a primary sleep disorder (narcolepsy) in mammals. The hypocretin system is mainly involved in sleep–wake regulation, and also in reward mechanisms, food intake or metabolism (Fronczek et al. 2021). Narcolepsy is a condition characterized by recurrent episodes of daytime sleepiness and abnormal REM sleep (Mignot 1998). They found a single hypocretin receptor: *hcrtr* (also known as *hcrtr2*) and they created a *hcrtr* null mutant (Yokogawa et al. 2007). They targeted a stop codon (R168 to stop), so they called their line *hcrtr*¹⁶⁸ homozygous zebrafish. No obvious mutant phenotype was noticed nor differences in activity monitoring. However, during sleep period, a sleep amount

decrease of 20-30%, an increase of 60-70% in the number of sleep-wake transitions and a decrease of 60% in sleep bout length are all indicators of SF in *hcrtr*¹⁶⁸ (Yokogawa et al. 2007).

Genetic modification is a powerful tool to explore gene roles. In our context, it provides a lot of information, including SF, on the pathology studied by gene deletion/mutation. However, it is not pure SF because in those studies SF is one of the consequences of the mutation. If one wants the consequences of SF and only SF, it has to be induced.

3.2. Methods to induce SF

3.2.1. Studies on animals

Drosophila: We found only one study where chronic SF was induced in a fly model (Williams et al. 2016) using a full spectrum bulb at 600 lux once an hour for 30 min during the 12-h night of the fly. One group was fragmented during 4 nights; another was during 4 nights with a recovery period of 4 d. They used 90 flies for each group. Total sleep, average sleep length and average sleep bouts were calculated based on the standard sleep definition as a period of 5 or more minutes of inactivity (Williams et al. 2016).

There was also a study where SF appeared to be a consequence of aging (Vienne et al. 2016). They wanted to make a parallel comparison with humans. They compared sleep in young, middle-aged and older flies with two different genotypes, *w*¹¹¹⁸ and *Canton S*. Both strains showed a significant decrease of sleep duration (total sleep) and an increase in SF as a function of age. They also found a difference between the two genotypes.

Fruit flies have a complex nervous system and display complex behaviors, such as learning and memory, that make them strong models to study sleep and its neuronal consequences (Chan and Bonini 2000). It is also easy to work on older flies because their lifespan is short (2-3 months) and it is not costly to work on them (Sun et al. 2013). The main limit of using

Drosophila as a model is the phylogenetical distance between them and humans. The generalization of those results is still debated between scientists.

SF in rodents: There are multiple ways to induce SF in rodents. It can be induced by auditory stimuli, where rats and mice are awakened by a repeated sound. For example, a team exposed their animals to environmental noise such as a vehicle horn, siren, alarm, etc., 15 min long, and this noise was repeated 8 h per night during 9 d. To avoid an acclimation by the rodent, the noise events, frequency of sound (800-20 000 Hz) and amplitude (85-100 dB) were randomized as the internoise interval (Mavanji et al. 2013). They compared three groups: partial sleep deprived (equivalent of chronic SF in view of the protocol), obesity resistant and control rat. They wanted to control food intake and body weight. The result was greater food intake and body weight compared to controls.

Alternatively, fragmentation can be provoked by physical manipulations. Here, rodents can be placed in a motorized cage consisting of a plexiglas cylinder divided diagonally in half by a divider bar. In some experiments, the disk at the bottom of the cage rotates slowly in a random direction (Trammell, Verhulst, and Toth 2014; Tartar et al. 2006). There are many different protocols. The first one uses a different on/off rhythm: 9 s on and 110 s off during 12 h, with variation in speed of rotation, time of exposure to SF according to the protocol (1 d to 20 weeks) (Baud et al. 2016). The goal is to mimic SF in humans as well as possible. Other experiments induce SF using a motorized horizontal bar moving from one side of the cage to the other. Contact with the bar wakes the rodents and forces them to move (Ramesh, Kaushal, and Gozal 2009). These two methods avoid the need for human contact, prevent social isolation and decrease rodent stress (Ramesh, Kaushal, and Gozal 2009).

Rodents have been studied a lot in the context of SF. Its main advantage is the easiness to have information about it. A lot of papers have been written on rats whether it is on the behaviour, sleep, genetics, etc. The main limitation to use rodents to study SF is the difference in sleep

cycle. Human sleep tends to be consolidated and normally mono- or diphasic, whereas rodent sleep is polyphasic and relatively fragmented (Toth and Bhargava 2013). Plus it would be impossible to mimic human socioprofessional constraints for example. Furthermore, rats are acclimated and have stereotype responses due to their living condition in labs; yet sleep is under the influence of both genetic and extrinsic factors (for example, environmental) (McKillop and Vyazovskiy 2020).

3.2.2. *Studies on humans*

SF in humans: In 1989, Michael H. Bonnet (H. Bonnet, 1989) experimented on SF in humans for 2 nights followed by 2 d of recovery. He induced acute SF with acoustic stimulation of 1000 Hz tones for 20 min. This involved alternating 10 min of sleep and 20 min of auditory stimuli during sleep time. He worked on two groups, young and aged adults. He assessed sleep and performance. Older individuals seemed less sensitive with less performance deterioration due to SF than young adults. This method has been criticized because it causes full awakening, instead of microwakenings, leading to a wakefulness accumulation that does not occur during SF (Stepanski 2002).

A human model is the strongest one to study the consequences of SF on humans. One principle remark is that there are only studies on acute SF. There are no studies where SF has been induced more than 72 h. We can hypothesize that working on induced chronic SF (CSF) (weeks, months of SF) is not ethically possible. Indeed, working on human SF involves provoking voluntarily the known consequences of SF: memory issues, mood disorders, etc.

Some studies on SF has been summarized in Table 1. These studies showed some consequences of SF and the methodology used to obtain them.

4. Implication of SF in neurodegenerative disorders

Based on these different methodologies, recent studies have highlighted that SF could be involved as a possible cause or consequence of other disorders such as MCI, AD and PD (Bennett et al. 2012).

MCI and SF: Some studies address MCI and sleep disorders (Pak et al. 2020; Palmer et al. 2018). Palmer et al. worked on 141 persons older than 52 years: 69 persons with MCI and 72 sex-matched cognitively healthy controls. Sleeping behaviour's were assessed during clinical evaluation using sleep continuity scale in AD scale (SCADS). The scale includes nine self-reported questions regarding length and quality of sleep, waking during the night, and difficulties in getting to sleep. There are four possible answers. Score 1 indicates no problem and score 4 indicates very poor. Their study demonstrated that persons with MCI are more than three times more likely to have overall poor sleep than controls. Interestingly, the only symptom found to be specifically related to MCI was waking during the night. It supports that disruptions occurs in the prodromal phases of AD, predicting subsequent dementia (Palmer et al. 2018).

AD and SF: In the last decade, some studies focused on the relationship between SF and AD (Lim et al. 2013; Vanderheyden et al. 2018). Lim et al. included 737 participants without dementia in a longitudinal study. All participants were submitted to a wristwatch-like accelerometer as actigraph during 10 d. To quantify SF, they used a recently developed probabilistic state transition approach which produced a single metric k_{RA} . Briefly, k_{RA} represents the probability per 15-se epoch of having an arousal, as indicated by movement (i.e., a nonzero activity count), after a long (~5 min) period of rest (i.e., sleep). The higher the k_{RA} , the more quickly bouts of sleep/rest end in arousals, and hence the greater the degree of SF (Lim et al. 2013). To determine whether the subject had AD, they used NINDS-ADRDA criteria (8 cognitive domains that may be impaired in AD: memory, language, perceptual skills, attention, constructive abilities, orientation, problem solving, and functional abilities). 3.3 years

after the creation of the cohort, 13% people developed AD. Individuals with “high” SF would be expected to have a 1.5-fold increased risk for developing AD compared to an individual with “low” SF. To conclude, they found that an objective measure of increased SF was associated with higher risk for subsequent development of AD. The possibility arose that interventions to improve sleep continuity may offer a potentially useful strategy for reducing the burden of cognitive impairment and dementia in old age (Lim et al. 2013). Several clinical follow-up studies have reported that cognitively normal elderly people with high sleep fragmentation had a 1.5-fold increased risk of AD development (Lim et al. 2013).

In order to see more precisely the links between SF and neurodegenerative pathologies, we will develop in this section three aspects at three different scales:

- The cerebral consequences, including neurogenesis, microglia and neuronal dysfunction
- The metabolic and inflammatory consequences that could be at the origin of these cerebral consequences. Glucose, adenosine, TNF- α , IL-6 and NADPH oxidase will be developed here.
- Finally, changes in cytoprotective systems will be discussed, including Tau and β -amyloid.

All these aspects are treated with the effect of SF on the one hand and the effect of neurodegenerative pathologies on the other, which are often common.

4.1. Brain consequences

Functional consequences could be explained by what happened at the neuronal level. In fact, some consequences of SF can be observed in neurogenesis, synaptic plasticity, and neuronal and astrocytic functions.

4.1.1. Neurogenesis

Neurogenesis is the genesis of neurons. In mammal adults, this physiological process is documented in two particular areas of the hippocampus: the subgranular zone in the dentate gyrus where new dentate granule neurones are generated; and in the subventricular zone of the lateral ventricles where new neurons are generated and then migrate to the olfactory bulb (Winner and Winkler 2015). Neurogenesis is impaired in neurodegenerative diseases (Winner and Winkler 2015). As described before, neurodegenerative diseases imply loss of neurons and neuronal functions.

In the study by Guzman-Marin et al., there was a decrease in cell proliferation in the dentate gyrus of the hippocampus after 4 and 7 d of SF in adult rats (Guzman-Marin et al. 2007). They found a suppression of adult neurogenesis that accounted for the decrease in hippocampal volume. However, after a few days of normal sleep following SF, there was a partial recovery of cell proliferation and differentiation. In another study, Sportiche et al. showed a change in rodent search strategies using the Barnes Maze memory test, which they attributed to a change in neurogenesis (Sportiche et al. 2010). The Barnes maze is used to study spatial learning. If the hippocampus, seat of neurogenesis and memory, is impaired, it can explain the difficulty for the rat to remember the pathways already used. These two studies showed that SF induced issue in spatial learning due to an impairment of the hippocampus.

4.1.2. Microglia

Kaneshwaran et al. worked on the effect of SF on microglia in elderly persons (Kaneshwaran et al. 2019). Microglia are recognized as the resident innate immune cells of the central nervous system (Kaneshwaran et al. 2019). One of their roles is phagocytosis of apoptotic debris that is activated during inflammation (Tremblay et al. 2011). They quantified SF by actigraphy and postmortem dorsolateral prefrontal cortex gene expression by RNA sequencing to determine

the activation of microglia. They observed that SF activated and participated in microglia aging. They suggested that dysfunctions in microglia could be a link between SF, cognitive decline and dementia in the elderly related to this disruption of microglial activity (Kaneshwaran et al. 2019). In another study, mice were submitted to CSF for 2 months (Y. Xie et al. 2020). The authors used two markers, among others, of microglia activation: Iba⁺, which is a microglia marker (the more microglial activation there was, the more Iba⁺ was found); and CD68, a phagocytosis marker. The latter was upregulated in the hippocampus of CSF mice. This marker was expressed in activated microglia. They observed that there was more Iba⁺ and CD68 in the hippocampus of CSF mice and concluded that the hippocampus was more vulnerable to neuroinflammation than the cortex region in mice with 2 months of CSF (Y. Xie et al. 2020).

4.1.3. Long-term potentiation (LTP)

Long-term potentiation (LTP) is a principal form of synaptic plasticity in the mammalian brain, thought to underlie learning and memory and, more generally stated, enduring experience-dependent enhancement of synaptic transmission (Encyclopaedia of Basic Epilepsy Research, 2009). Tartar et al. showed a reduction in LTP after a sleep fragmentation. There was also a reduction of LTP in region 22 of the CA1 hippocampus (Tartar et al. 2006). This alteration was caused by postsynaptic mechanisms leading to a decrease in input resistance of the pyramidal neuron CA1 (Tartar et al. 2010).

4.1.4. Neuronal dysfunction

Li et al. worked on the effect of CSF on wake-active neurons and the hypercapnic arousal response (Y. Li et al. 2014). They submitted the mice to 4 weeks of SF. *c-fos* is a gene that indirectly allows to assess neuronal activity. It was used in this study to detect wake-active neurons (orexinergic, locus coeruleus (LC), serotonergic, histaminergic and cholinergic neurons). SF mice had a loss of LC and orexinergic labeled axons. They hypothesized CSF

induced axonopathy through metabolic/oxidative stress mechanisms that were repeatedly activated upon arousals. Axonopathy has consequences on neuronal function and CSF seems to cause axonopathy (Y. Li et al. 2014). We can make a parallel between this study and neurodegenerative diseases because loss of LC neurons is also related to neurodegenerative pathologies (Janitzky 2020).

Blood-brain barrier (BBB): BBB is a dynamic component of the brain-vascular interface that maintains brain homeostasis and regulates solute permeability to brain tissue. The expression of tight junction proteins between adjacent endothelial cells and the presence of efflux proteins prevents entry of foreign substances into the brain parenchyma. BBB dysfunction, however, is evident in many neurological disorders. SF may lead to age-related disruption of the BBB's ability to block proinflammatory compounds (Atienza, Ziontz, and Cantero 2018). A study used a cylindrical plexiglas chamber divided into two separate compartments (Opp et al. 2015). To fragment sleep, the floor of this cage rotated at specific intervals causing the mouse to wake up. Disc rotations were confined to the 12-h light period, and consisted of an 8-s rotation once every 30 s, on average for 3 d (Opp et al. 2015). Increased BBB permeability in aging may augment low-grade inflammation on cerebral integrity and mediate the relationship between disrupted sleep, dysfunctional adiposity, and impaired cognition (Atienza, Ziontz, and Cantero 2018).

4.2. Metabolic and inflammatory consequences

Some studies have focused on the causes of neuronal dysfunction with metabolic changes, in particular glucose and adenosine fluctuation, and the inflammatory pathway with tumor necrosis factor α (TNF α), interleukin 6 (IL-6) and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase.

4.2.1. Glucose

Glucose is the main source of energy of the brain. In the adult brain, neurons have the highest consumption of glucose. The passage of glucose through the BBB is a facilitative transport mediated by glucose transporter 1 (GLUT1) (Maher, Vannucci, and Simpson 1994). This transporter is found at the apical pole of brain endothelial cells.

A downregulation of GLUT1 has been observed in mice submitted to SF (He et al. 2014). Moreover, Stamatakis and Punjabi used an intravenous glucose tolerance test to work on the effect of SF on glucose metabolism. This test was made one night after uninterrupted sleep and two nights of SF. Those on SF showed a reduction in insulin sensitivity and spontaneous elimination of glucose by itself by 20-25% in human experiments (Stamatakis and Punjabi 2010). This study illustrated that SF can alter glucose homeostasis. GLUT1 deficiency has also been seen in patients suffering from cognitive impairment (Pearson et al. 2013). Reduced GLUT1 levels were found in AD as well and represent lower energy demands in a degenerating brain (Keaney and Campbell 2015).

4.2.2. *Adenosine*

Adenosine plays a role in sleep homeostasis by regulating sleep-wake behavior (Bjorness and Greene 2009). McKenna et al. studied adenosine concentration following SF. They showed an increase in adenosine in basal forebrain after only 6 h of SF. Wake promoting neuron activity from this basal forebrain was inhibited, which caused a decrease in cortical activation. The final consequence was an increase in sleepiness (McKenna et al. 2007). It also inhibited excitatory projection from basal forebrain to frontal cortex and hippocampus (Ward, McCarley, and Strecker 2009).

4.2.3. *TNF α*

TNF is a cytokine involved in many pathological processes like inflammation or immune disease (Chu 2013). A physiological level of TNF α is necessary to activate some pathway involved in apoptosis or embryogenesis (Chu 2013). It also activates adenosine A1 receptors, which play a role in sleep regulation (Q. Li and Zheng 2017). Ramesh et al. found that TNF α cortical levels increased in mice.

4.2.4. *IL-6*

IL-6 is a pro-inflammatory cytokine. It has an important role in brain homeostasis. An upregulation of IL-6 leads to brain injuries and a sleep behavioral change (Kumar et al. 2015). On the other hand, an overproduction of IL-6 in the brain could be a premise of neurodegeneration. Long-term SF induces an increased plasma level of IL-6 (Carreras et al. 2014). These results were consistent with those obtained in children suffering from moderate-severe sleep disordered breathing (Tauman, O'Brien, and Gozal 2007). The same result has been observed in AD and PD, especially the IL-6 level in cerebrospinal fluid (Erta, Quintana, and Hidalgo 2012). Furthermore, IL-1 β , another pro-inflammatory cytokine, and IL-6 are cytokines of which overproduction can lead to neuroinflammation. Elevated levels in midlife predict cognitive decline 10 years later and are elevated in the cerebrospinal fluid (CF) and plasma of individuals with AD as well as de novo PD (Blum-Degen et al. 1995).

4.2.5. *NADPH oxidase*

NADPH oxidase is one of the enzymes responsible for reactive oxygen species (ROS) production. Like TNF α , it has both physiological and pathophysiological roles in mammalian cells (Nair et al. 2011). Nair et al. showed for the first time that 14 d of SF induced increased expression and activation of NADPH oxidase, without consequences on sleepiness (Nair et al. 2011). However, it might explain the cognitive and behavioral deficits occurring in chronic SF.

ROS production has been involved in multiple contexts such as in mice with tumors and SF (Zheng et al. 2015), or in fruit flies submitted to SF (Williams et al. 2016).

Increased production in ROS causes oxidation of biological macromolecules and the expression of inflammatory mediators and genes, ultimately leading to an increase in the risk of neurodegenerative diseases. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) is known as a critical regulator of endogenous inducible defence systems in the brain to defend against oxidative stress. In a recent paper, Nrf2 expression has been associated with SF (Williams et al. 2016). SF generated higher levels of ROS and activation of Nrf2 pathway in flies, disorders which persisted after sleep recovery. Continual elevated levels of cellular ROS in older individuals due to increased SF might eventually lead to neuronal injury.

4.3.The cytoprotective system changes in response to sleep fragmentation

A hypothesis has emerged that a bidirectional relationship exists between sleep and neuropathologies. Few papers based on SF can be found, and most studies are on sleep restriction and concern AD. Several authors have postulated a bidirectional relationship between sleep and the neuropathological hallmarks, particularly the accumulation of A β and Tau. It has been reported that extracellular levels of both A β and Tau are modified during the normal sleep–wake cycle (Wang and Holtzman 2020).

4.3.1. Tau protein

Tau proteins are microtubule associated proteins mainly expressed in neurons in humans (Buée et al. 2000). In diseases called taupathies that include neurodegenerative diseases like AD, tau protein is found hyperphosphorylated and aggregates in structures such as neurofibrillary tangles. The aggregation of Tau protein in the brain correlates with neuronal SF and neurodegenerative diseases and synaptic loss. It has been demonstrated that once Tau aggregation occurs, it can spread from one synaptically connected region to another

(Clavaguera et al. 2009; Iba et al. 2013; de Calignon et al. 2012; Liu et al. 2012). Tau protein is found predominantly in cytoplasm because it is released by neurons into the extracellular space. There are not a lot of studies relating SF and Tau. On a study, they worked on double transgenic AD mice and their wild type, randomly distributed on three groups of mice: control, intermittent hypoxia and SF. They only found one significant result with tau: tau hyperphosphorylation in the hippocampus was significantly higher in the SF group of wild type compared to control wild type (Almendros et al. 2018).

4.3.2 A β peptides

It is known that poor sleep quality, like sleep deprivation or poor sleep efficiency, is strongly correlated with A β accumulation (Wang and Holtzman 2020). Disturbed sleep and increased wakefulness lead to increased A β production and decreased A β clearance; whereas A β aggregation and deposition is enhanced by chronic increased wakefulness in animal models. Once A β accumulates, there is evidence in both mice and humans that these results contribute to disturbed sleep. A β aggregation may be found almost 15-20 years before cognitive symptoms in AD (Holtzman, Morris, and Goate 2011). Sleep modification can begin in the preclinical stage of AD and are a predictive risk factor for neurodegeneration and development of cognitive decline. The role of sleep quality in amyloid pathogenesis has been well documented with sleep deprivation studies in human and animal models. Only few studies describe the relationship between SF and A β . Duncan et al. (2022) worked on a mice model of AD: the 3xTg-AD mouse (Duncan et al. 2022). They worked on a control group and a group with fragmented sleep 5 days a week for 4 weeks using a cage with a sweeping bar. They found hippocampal levels of A β ₄₀ and A β ₄₂ higher for the SF group than the control. Surprisingly they did not find a difference in hippocampal Tau level between the two groups. Another team, Minakawa et al. showed a significant positive correlation between A β accumulation and SF severity in a mouse

model (Minakawa et al. 2017). They worked on 3 groups of mice with one control group, one group in wheel cage and the last one with fragmented sleep using wheel cage during 27 days. To conclude, the relationship between sleep–wake disruption and A β deposition is found to be bidirectional. Modifications in sleep–wake regulation increase A β accumulation, and A β deposits that in turn, provoke sleep disturbances in humans. In a murine model of A β amyloidosis, the authors found a significant deterioration in sleep amount and quality, closely followed the emergence of A β aggregates. This finding was correlated with the progression of A β pathology (Wang and Holtzman 2020).

5. Perspectives

The writing of this review required a great effort to take only the studies concerning SF and only these. Indeed, it is easier to find literature on sleep restriction and sleep deprivation, the consequences of which are quickly visible. The study of SF is more complex and yet its consequences, as developed in this review, are harmful to health. This point is supported by the fact that there is a link, a bidirectional relationship, between SF and neurodegenerative pathologies, such as AD and MCI. It is therefore important to continue to study SF to determine whether a therapy to treat this aspect would be useful or whether it is already too late when it is diagnosed.

6. Conclusion

Figure 1 summarizes the neuronal, metabolic and inflammatory consequences of SF. Any sleep pathology due to a fragmenting pathology (whatever its cause) has objectively adverse consequences on sleep (Medic, Wille, and Hemels 2017). In this review, we summarise recent biological and physiological arguments showing SF contribution in neurodegenerative processes: the diminution of neurogenesis and the increase in A β and Tau for SF models would be the main ones (Minakawa et al. 2017). At this stage, further studies are needed to document the precise role of SF in the genesis or evolution of these neurodegenerative diseases. For now,

the bidirectional relationship between SF and neurodegenerative diseases is in searchers mind but no clear response can be made (Wang and Holtzman 2020). However, authors found studies that seemed to indicate that people with a high SF were 1.5 times more likely to develop AD, so the SF study is an interesting lead in the development of neurodegenerative pathologies (Lim et al. 2013). Treating SF to prevent or delay neurodegenerative disease apparition could be an interesting therapeutic target.

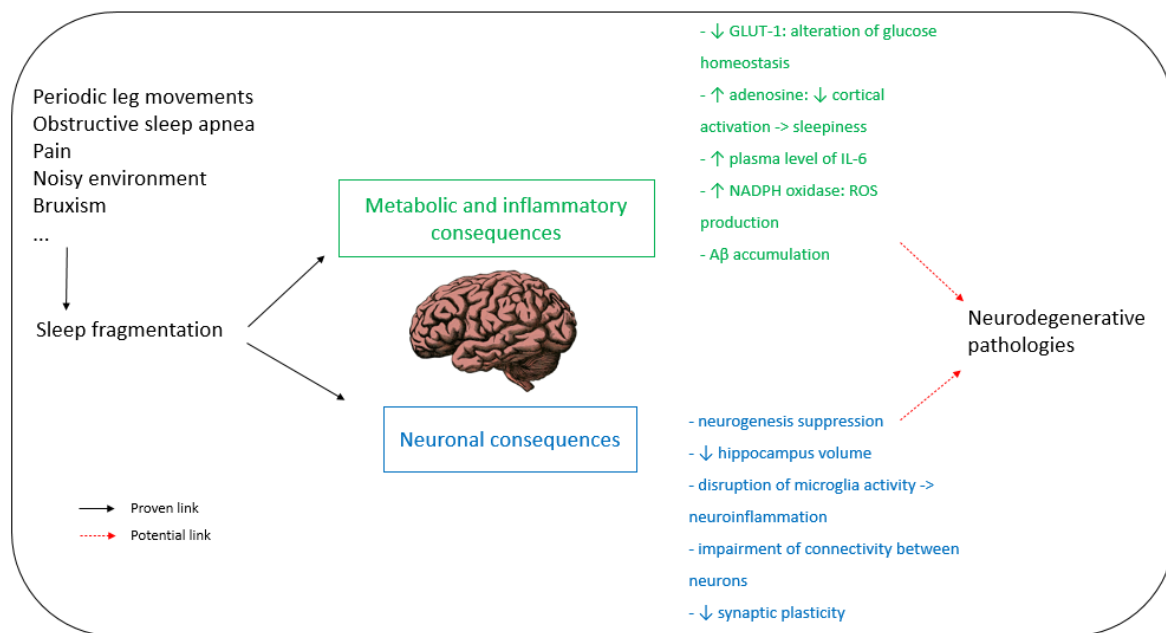


Figure 1: Metabolic, inflammatory and neuronal consequences of sleep fragmentation and the potential link with neurodegenerative diseases. Aβ: amyloid β; GLUT-1: glucose transporter 1; IL-6: interleukin-6; NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; ROS: reactive oxygen species.

References

- Abbott, Sabra M., and Aleksandar Videnovic. 2016. "Chronic Sleep Disturbance and Neural Injury: Links to Neurodegenerative Disease." *Nature and Science of Sleep* 8: 55–61. <https://doi.org/10.2147/NSS.S78947>.
- Alger, Sara E., Hiuyan Lau, and William Fishbein. 2012. "Slow Wave Sleep during a Daytime Nap Is Necessary for Protection from Subsequent Interference and Long-Term Retention." *Neurobiology of Learning and Memory* 98 (2): 188–96. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2012.06.003>.
- Alóe, Flávio. 2009. "Sleep bruxism neurobiology." *Sleep Science* 2 (1): 40–48.
- Artero, S., M.-L. Ancelin, F. Portet, A. Dupuy, C. Berr, J.-F. Dartigues, C. Tzourio, et al. 2008. "Risk Profiles for Mild Cognitive Impairment and Progression to Dementia Are Gender Specific." *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 79 (9): 979–84. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2007.136903>.
- Atienza, Mercedes, Jacob Ziontz, and Jose L. Cantero. 2018. "Low-Grade Inflammation in the Relationship between Sleep Disruption, Dysfunctional Adiposity, and Cognitive Decline in Aging." *Sleep Medicine Reviews* 42 (December): 171–83. <https://doi.org/10.1016/j.smrv.2018.08.002>.
- Atri, Alireza. 2019. "The Alzheimer's Disease Clinical Spectrum: Diagnosis and Management." *Medical Clinics* 103 (2): 263–93. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2018.10.009>.
- Baud, Maxime O., Pierre J. Magistretti, and Jean-Marie Petit. 2013. "Sustained Sleep Fragmentation Affects Brain Temperature, Food Intake and Glucose Tolerance in Mice." *Journal of Sleep Research* 22 (1): 3–12. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2869.2012.01029.x>.
- Baud, Maxime O., Julia Parafita, Audrey Nguyen, Pierre J. Magistretti, and Jean-Marie Petit. 2016. "Sleep Fragmentation Alters Brain Energy Metabolism without Modifying Hippocampal Electrophysiological Response to Novelty Exposure." *Journal of Sleep Research* 25 (5): 583–90. <https://doi.org/10.1111/jsr.12419>.
- Bennett, David A., Julie A. Schneider, Aron S. Buchman, Lisa L. Barnes, Patricia A. Boyle, and Robert S. Wilson. 2012. "Overview and Findings from the Rush Memory and Aging Project." *Current Alzheimer Research* 9 (6): 646–63.
- Berger, Ralph J., and Nathan H. Phillips. 1995. "Energy Conservation and Sleep." *Behavioural Brain Research, The Function of Sleep*, 69 (1): 65–73. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(95\)00002-B](https://doi.org/10.1016/0166-4328(95)00002-B).
- Berry, RB, R Brooks, CE Gamaldo, SM Harding, RM Lloyd, CL Marcus, and BV Vaughn. 2015. "The AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events: Rules, Terminology and Technical Specifications, Version 2.2." *Darien, Illinois: American Academy of Sleep Medicine, 2015*.
- Bjorness, Theresa E, and Robert W Greene. 2009. "Adenosine and Sleep." *Current Neuropharmacology* 7 (3): 238–45. <https://doi.org/10.2174/157015909789152182>.
- Blum-Degen, D., T. Müller, W. Kuhn, M. Gerlach, H. Przuntek, and P. Riederer. 1995. "Interleukin-1 Beta and Interleukin-6 Are Elevated in the Cerebrospinal Fluid of Alzheimer's and de Novo

- Parkinson's Disease Patients." *Neuroscience Letters* 202 (1–2): 17–20. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(95\)12192-7](https://doi.org/10.1016/0304-3940(95)12192-7).
- Boly, M., C. Phillips, L. Tshibanda, A. Vanhaudenhuyse, M. Schabus, T. T. Dang-Vu, G. Moonen, R. Hustinx, P. Maquet, and S. Laureys. 2008. "Intrinsic Brain Activity in Altered States of Consciousness: How Conscious Is the Default Mode of Brain Function?" *Annals of the New York Academy of Sciences* 1129: 119–29. <https://doi.org/10.1196/annals.1417.015>.
- Bonnet, H. 1989. "The Effect of Sleep Fragmentation on Sleep and Performance in Younger and Older Subjects," 5.
- Bonnet, M. H., and D. L. Arand. 1997. "Heart Rate Variability: Sleep Stage, Time of Night, and Arousal Influences." *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* 102 (5): 390–96. [https://doi.org/10.1016/s0921-884x\(96\)96070-1](https://doi.org/10.1016/s0921-884x(96)96070-1).
- Boyer, P, M Crocq, J Guelfi, C Pul, and M Pull-Erpelding. n.d. *Mini DSM5 Critères Diagnostiques*. 2016thed. Paris: Elsevier Masson.
- Brzecka, Anna, Jerzy Leszek, Ghulam Md Ashraf, Maria Ejma, Marco F. Ávila-Rodríguez, Nagendra S. Yarla, Vadim V. Tarasov, et al. 2018. "Sleep Disorders Associated With Alzheimer's Disease: A Perspective." *Frontiers in Neuroscience* 12 (May). <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00330>.
- Buée, Luc, Thierry Bussi re, Val rie Bu e-Scherrer, André Delacourte, and Patrick R. Hof. 2000. "Tau Protein Isoforms, Phosphorylation and Role in Neurodegenerative disorders11These Authors Contributed Equally to This Work." *Brain Research Reviews* 33 (1): 95–130. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(00\)00019-9](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(00)00019-9).
- Busse, Anja, Jeannette Bischof, Steffi G. Riedel-Heller, and Matthias C. Angermeyer. 2003. "Mild Cognitive Impairment: Prevalence and Incidence according to Different Diagnostic Criteria: Results of the Leipzig Longitudinal Study of the Aged (LEILA75+)." *The British Journal of Psychiatry* 182 (5): 449–54. <https://doi.org/10.1192/bjp.182.5.449>.
- Calignon, Alix de, Manuela Polydoro, Marc Suárez-Calvet, Christopher William, David H. Adamowicz, Kathy J. Kopeikina, Rose Pitstick, et al. 2012. "Propagation of Tau Pathology in a Model of Early Alzheimer's Disease." *Neuron* 73 (4): 685–97. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.11.033>.
- Carreras, Alba, Shelley X. Zhang, Eduard Peris, Zhuanhong Qiao, Alex Gileles-Hillel, Richard C. Li, Yang Wang, and David Gozal. 2014. "Chronic Sleep Fragmentation Induces Endothelial Dysfunction and Structural Vascular Changes in Mice." *Sleep* 37 (11): 1817–24. <https://doi.org/10.5665/sleep.4178>.
- Carrington, Melinda J., and John Trinder. 2008. "Blood Pressure and Heart Rate During Continuous Experimental Sleep Fragmentation in Healthy Adults." *Sleep* 31 (12): 1701–12.
- Chan, H. Y. E., and N. M. Bonini. 2000. "Drosophila Models of Human Neurodegenerative Disease." *Cell Death & Differentiation* 7 (11): 1075–80. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400757>.
- Chouchou, F., V. Pichot, J.L. P pin, R. Tamisier, S. Celle, D. Maudoux, A. Garcin, et al. 2013. "Sympathetic Overactivity due to Sleep Fragmentation Is Associated with Elevated Diurnal Systolic Blood Pressure in Healthy Elderly Subjects: The PROOF-SYNAPSE Study." *European Heart Journal* 34 (28): 2122–31. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/eh208>.

- Chouchou, Florian, Vincent Pichot, Jean-Claude Barthélémy, Hélène Bastuji, and Frédéric Roche. 2014. "Cardiac Sympathetic Modulation in Response to Apneas/hypopneas through Heart Rate Variability Analysis." *PLoS One* 9 (1): e86434. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086434>.
- Chu, Wen-Ming. 2013. "Tumor Necrosis Factor." *Cancer Letters* 328 (2): 222–25. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.10.014>.
- Clavaguera, Florence, Tristan Bolmont, R. Anthony Crowther, Dorothee Abramowski, Stephan Frank, Alphonse Probst, Graham Fraser, et al. 2009. "Transmission and Spreading of Tauopathy in Transgenic Mouse Brain." *Nature Cell Biology* 11 (7): 909–13. <https://doi.org/10.1038/ncb1901>.
- DeAndrade, Mark P., Russell L. Johnson, Erica L. Unger, Li Zhang, Thomas van Groen, Karen L. Gamble, and Yuqing Li. 2012. "Motor Restlessness, Sleep Disturbances, Thermal Sensory Alterations and Elevated Serum Iron Levels in Btd9 Mutant Mice." *Human Molecular Genetics* 21 (18): 3984–92. <https://doi.org/10.1093/hmg/dd221>.
- Diekelmann, Susanne, and Jan Born. 2010. "The Memory Function of Sleep." *Nature Reviews Neuroscience* 11 (2): 114–26. <https://doi.org/10.1038/nrn2762>.
- Dugger, Brittany N., and Dennis W. Dickson. 2017. "Pathology of Neurodegenerative Diseases." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 9 (7). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028035>.
- Duncan, M.J., L.E. Guerriero, K. Kohler, L.E. Beechem, B.D. Gillis, F. Salisbury, C. Wessel, et al. 2022. "Chronic Fragmentation of the Daily Sleep-Wake Rhythm Increases Amyloid-Beta Levels and Neuroinflammation in the 3xTg-AD Mouse Model of Alzheimer's Disease." *Neuroscience* 481 (January): 111–22. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2021.11.042>.
- Erta, María, Albert Quintana, and Juan Hidalgo. 2012. "Interleukin-6, a Major Cytokine in the Central Nervous System." *International Journal of Biological Sciences* 8 (9): 1254–66. <https://doi.org/10.7150/ijbs.4679>.
- Freeman, Amanda, Elaine Pranski, R. Daniel Miller, Sara Radmard, Doug Bernhard, Hyder Jinnah, Ranjita Betarbet, David B. Rye, and Subhabrata Sanyal. 2012. "Sleep Fragmentation and Motor Restlessness in a Drosophila Model of Restless Legs Syndrome." *Current Biology* 22 (12): 1142–48. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.04.027>.
- Fronczek, Rolf, Mink Schinkelshoek, Ling Shan, and Gert Jan Lammers. 2021. "The Orexin/hypocretin System in Neuropsychiatric Disorders: Relation to Signs and Symptoms." *Handbook of Clinical Neurology* 180: 343–58. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820107-7.00021-5>.
- Gauthier, Serge, Barry Reisberg, Michael Zaudig, Ronald C Petersen, Karen Ritchie, Karl Broich, Sylvie Belleville, et al. 2006. "Mild Cognitive Impairment." *The Lancet* 367 (9518): 1262–70. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68542-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68542-5).
- Griggs, Stephanie, Ronald L. Hickman, Kingman P. Strohl, Nancy S. Redeker, Sybil L. Crawford, and Margaret Grey. 2021. "Sleep-Wake Characteristics, Daytime Sleepiness, and Glycemia in Young Adults with Type 1 Diabetes." *Journal of Clinical Sleep Medicine: JCSM: Official Publication of the American Academy of Sleep Medicine*, May. <https://doi.org/10.5664/jcsm.9402>.
- Guzman-Marin, Ruben, Tariq Bashir, Natalia Suntsova, Ronald Szymusiak, and Dennis McGinty. 2007. "Adult Hippocampal Neurogenesis Is Reduced by Sleep Fragmentation in the Adult Rat." *Neuroscience* 148 (1): 325–33. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.05.030>.

- Haack, Monika, Erin Lee, Daniel A. Cohen, and Janet M. Mullington. 2009. "Activation of the Prostaglandin System in Response to Sleep Loss in Healthy Humans: Potential Mediator of Increased Spontaneous Pain." *Pain* 145 (1–2): 136–41. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2009.05.029>.
- Hänninen, T., M. Hallikainen, S. Tuomainen, M. Vanhanen, and H. Soininen. 2002. "Prevalence of Mild Cognitive Impairment: A Population-Based Study in Elderly Subjects." *Acta Neurologica Scandinavica* 106 (3): 148–54. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0404.2002.01225.x>.
- He, Junyun, Hung Hsueh, Yi He, Abba J. Kastin, Yuping Wang, and Weihong Pan. 2014. "Sleep Restriction Impairs Blood-Brain Barrier Function." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 34 (44): 14697–706. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2111-14.2014>.
- Hebert, Liesi E., Paul A. Scherr, Julia L. Bienias, David A. Bennett, and Denis A. Evans. 2003. "Alzheimer Disease in the US Population: Prevalence Estimates Using the 2000 Census." *Archives of Neurology* 60 (8): 1119–22. <https://doi.org/10.1001/archneur.60.8.1119>.
- Helmer, Catherine, Florence Pasquier, and Jean-François Dartigues. 2006. "Épidémiologie de la maladie d'Alzheimer et des syndromes apparentés." *médecine/sciences* 22 (3): 288–96. <https://doi.org/10.1051/medsci/2006223288>.
- Hladky, Stephen B., and Margery A. Barrand. 2019. "Metabolite Clearance During Wakefulness and Sleep." *Handbook of Experimental Pharmacology* 253: 385–423. https://doi.org/10.1007/164_2017_37.
- Holtzman, David M., John C. Morris, and Alison M. Goate. 2011. "Alzheimer's Disease: The Challenge of the Second Century." *Science Translational Medicine* 3 (77): 77sr1. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002369>.
- Iba, Michiyo, Jing L. Guo, Jennifer D. McBride, Bin Zhang, John Q. Trojanowski, and Virginia M.-Y. Lee. 2013. "Synthetic Tau Fibrils Mediate Transmission of Neurofibrillary Tangles in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's-like Tauopathy." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 33 (3): 1024–37. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2642-12.2013>.
- Janitzky, Kathrin. 2020. "Impaired Phasic Discharge of Locus Coeruleus Neurons Based on Persistent High Tonic Discharge—A New Hypothesis With Potential Implications for Neurodegenerative Diseases." *Frontiers in Neurology* 11 (May): 371. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00371>.
- Kaneshwaran, Kirusanthi, Marta Olah, Shinya Tasaki, Lei Yu, Elizabeth M. Bradshaw, Julie A. Schneider, Aron S. Buchman, David A. Bennett, Philip L. De Jager, and Andrew S. P. Lim. 2019. "Sleep Fragmentation, Microglial Aging, and Cognitive Impairment in Adults with and without Alzheimer's Dementia." *Science Advances* 5 (12): eaax7331. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax7331>.
- Kaushal, Navita, Vijay Ramesh, and David Gozal. 2012. "TNF- α and Temporal Changes in Sleep Architecture in Mice Exposed to Sleep Fragmentation." *PLoS ONE* 7 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045610>.
- Keaney, James, and Matthew Campbell. 2015. "The Dynamic Blood–brain Barrier." *The FEBS Journal* 282 (21): 4067–79. <https://doi.org/10.1111/febs.13412>.

- Kimoff, R. John. 1996. "Sleep Fragmentation in Obstructive Sleep Apnea." *Sleep* 19 (suppl_9): S61–66. https://doi.org/10.1093/sleep/19.suppl_9.S61.
- Knutson, Kristen L., Karine Spiegel, Plamen Penev, and Eve Van Cauter. 2007. "The Metabolic Consequences of Sleep Deprivation." *Sleep Medicine Reviews* 11 (3): 163–78. <https://doi.org/10.1016/j.smr.2007.01.002>.
- Kumar, R. G., M. L. Diamond, J. A. Boles, R. P. Berger, S. A. Tisherman, P. M. Kochanek, and A. K. Wagner. 2015. "Acute CSF Interleukin-6 Trajectories after TBI: Associations with Neuroinflammation, Polytrauma, and Outcome." *Brain, Behavior, and Immunity* 45 (March): 253–62. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.12.021>.
- Li, Qingsheng, and Xin Zheng. 2017. "Tumor Necrosis Factor Alpha Is a Promising Circulating Biomarker for the Development of Obstructive Sleep Apnea Syndrome: A Meta-Analysis." *Oncotarget* 8 (16): 27616–26. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15203>.
- Li, Yanpeng, Lori A. Panossian, Jing Zhang, Yan Zhu, Guanxia Zhan, Yu-Ting Chou, Polina Fenik, et al. 2014. "Effects of Chronic Sleep Fragmentation on Wake-Active Neurons and the Hypercapnic Arousal Response." *Sleep* 37 (1): 51–64. <https://doi.org/10.5665/sleep.3306>.
- Lim, Andrew S. P., Matthew Kowgier, Lei Yu, Aron S. Buchman, and David A. Bennett. 2013. "Sleep Fragmentation and the Risk of Incident Alzheimer's Disease and Cognitive Decline in Older Persons." *Sleep* 36 (7): 1027–32. <https://doi.org/10.5665/sleep.2802>.
- Liu, Li, Valerie Drouet, Jessica W. Wu, Menno P. Witter, Scott A. Small, Catherine Clelland, and Karen Duff. 2012. "Trans-Synaptic Spread of Tau Pathology in Vivo." *PloS One* 7 (2): e31302. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031302>.
- Maher, F., S. J. Vannucci, and I. A. Simpson. 1994. "Glucose Transporter Proteins in Brain." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 8 (13): 1003–11. <https://doi.org/10.1096/fasebj.8.13.7926364>.
- Manly, Jennifer J., Sandra Bell-McGinty, Ming-X. Tang, Nicole Schupf, Yaakov Stern, and Richard Mayeux. 2005. "Implementing Diagnostic Criteria and Estimating Frequency of Mild Cognitive Impairment in an Urban Community." *Archives of Neurology* 62 (11): 1739–46. <https://doi.org/10.1001/archneur.62.11.1739>.
- Marshall, Lisa, Halla Helgadóttir, Matthias Mölle, and Jan Born. 2006. "Boosting Slow Oscillations during Sleep Potentiates Memory." *Nature* 444 (7119): 610–13. <https://doi.org/10.1038/nature05278>.
- Mavanji, Vijayakumar, Jennifer A. Teske, Charles J. Billington, and Catherine M. Kotz. 2013. "Partial Sleep Deprivation by Environmental Noise Increases Food Intake and Body Weight in Obesity Resistant Rats." *Obesity (Silver Spring, Md.)* 21 (7): 1396–1405. <https://doi.org/10.1002/oby.20182>.
- McCoy, John G., Jaime L. Tartar, Alaina C. Bebis, Christopher P. Ward, James T. McKenna, Mark G. Baxter, Jill McGaughy, Robert W. McCarley, and Robert E. Strecker. 2007. "Experimental Sleep Fragmentation Impairs Attentional Set-Shifting in Rats." *Sleep* 30 (1): 52–60. <https://doi.org/10.1093/sleep/30.1.52>.
- McKenna, J. T., J. L. Tartar, C. P. Ward, M. M. Thakkar, J. W. Cordeira, R. W. McCarley, and R. E. Strecker. 2007. "Sleep Fragmentation Elevates Behavioral, Electrographic and Neurochemical Measures

- of Sleepiness.” *Neuroscience* 146 (4): 1462–73.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.03.009>.
- McKillop, Laura E, and Vladyslav V Vyazovskiy. 2020. “Sleep and Ageing: From Human Studies to Rodent Models.” *Current Opinion in Physiology, Physiology of sleep*, 15 (June): 210–16.
<https://doi.org/10.1016/j.cophys.2020.03.004>.
- Medic, Goran, Micheline Wille, and Michiel EH Hemels. 2017. “Short- and Long-Term Health Consequences of Sleep Disruption.” *Nature and Science of Sleep* 9 (May): 151–61.
<https://doi.org/10.2147/NSS.S134864>.
- Mendelsohn, Andrew R., and James W. Larrick. 2013. “Sleep Facilitates Clearance of Metabolites from the Brain: Glymphatic Function in Aging and Neurodegenerative Diseases.” *Rejuvenation Research* 16 (6): 518–23. <https://doi.org/10.1089/rej.2013.1530>.
- Mignot, E. 1998. “Genetic and Familial Aspects of Narcolepsy.” *Neurology* 50 (2 Suppl 1): S16-22.
https://doi.org/10.1212/wnl.50.2_suppl_1.s16.
- Minakawa, Eiko N., Koyomi Miyazaki, Kazushi Maruo, Hiroko Yagihara, Hiromi Fujita, Keiji Wada, and Yoshitaka Nagai. 2017. “Chronic Sleep Fragmentation Exacerbates Amyloid β Deposition in Alzheimer’s Disease Model Mice.” *Neuroscience Letters* 653 (July): 362–69.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.05.054>.
- Nair, Deepti, Shelley X. L. Zhang, Vijay Ramesh, Fahed Hakim, Navita Kaushal, Yang Wang, and David Gozal. 2011. “Sleep Fragmentation Induces Cognitive Deficits via Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase-Dependent Pathways in Mouse.” *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 184 (11): 1305–12.
<https://doi.org/10.1164/rccm.201107-1173OC>.
- Opp, Mark R., Amrita George, Kristyn M. Ringgold, Kim M. Hansen, Kristin M. Bullock, and William A. Banks. 2015. “Sleep Fragmentation and Sepsis Differentially Impact Blood-Brain Barrier Integrity and Transport of Tumor Necrosis Factor- α in Aging.” *Brain, Behavior, and Immunity* 50 (November): 259–65. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.07.023>.
- Oswald, I. 1980. “Sleep as Restorative Process: Human Clues.” *Progress in Brain Research* 53: 279–88.
[https://doi.org/10.1016/s0079-6123\(08\)60069-2](https://doi.org/10.1016/s0079-6123(08)60069-2).
- Pak, Victoria M., S.-Hakki Onen, Donald L. Bliwise, Nancy G. Kutner, Katherine L. Russell, and Fannie Onen. 2020. “Sleep Disturbances in MCI and AD: Neuroinflammation as a Possible Mediating Pathway.” *Frontiers in Aging Neuroscience* 12. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.00069>.
- Palmer, Katie, Micaela Mitolo, Francesca Burgio, Francesca Meneghello, and Annalena Venneri. 2018. “Sleep Disturbance in Mild Cognitive Impairment and Association With Cognitive Functioning. A Case-Control Study.” *Frontiers in Aging Neuroscience* 10.
<https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00360>.
- Pearson, Toni S., Cigdem Akman, Veronica J. Hinton, Kristin Engelstad, and Darryl C. De Vivo. 2013. “Phenotypic Spectrum of Glucose Transporter Type 1 Deficiency Syndrome (Glut1 DS).” *Current Neurology and Neuroscience Reports* 13 (4): 342. <https://doi.org/10.1007/s11910-013-0342-7>.

- Peter-Derex, Laure, Pierre Yammine, Hélène Bastuji, and Bernard Croisile. 2015. "Sleep and Alzheimer's Disease." *Sleep Medicine Reviews* 19 (February): 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.smr.2014.03.007>.
- Petersen, R. C., R. Doody, A. Kurz, R. C. Mohs, J. C. Morris, P. V. Rabins, K. Ritchie, M. Rossor, L. Thal, and B. Winblad. 2001. "Current Concepts in Mild Cognitive Impairment." *Archives of Neurology* 58 (12): 1985–92. <https://doi.org/10.1001/archneur.58.12.1985>.
- Petersen, R. C., G. E. Smith, S. C. Waring, R. J. Ivnik, E. G. Tangalos, and E. Kokmen. 1999. "Mild Cognitive Impairment: Clinical Characterization and Outcome." *Archives of Neurology* 56 (3): 303–8. <https://doi.org/10.1001/archneur.56.3.303>.
- Petersen, Ronald C., Oscar Lopez, Melissa J. Armstrong, Thomas S.D. Getchius, Mary Ganguli, David Gloss, Gary S. Gronseth, et al. 2018. "Practice Guideline Update Summary: Mild Cognitive Impairment." *Neurology* 90 (3): 126–35. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000004826>.
- Ramesh, Vijay, Navita Kaushal, and David Gozal. 2009. "Sleep fragmentation differentially modifies EEG delta power during slow wave sleep in socially isolated and paired mice." *Sleep Science* 2 (2): 64–75.
- Ramesh, Vijay, Deepti Nair, Shelley X. L. Zhang, Fahed Hakim, Navita Kaushal, Foaz Kayali, Yang Wang, Richard C. Li, Alba Carreras, and David Gozal. 2012. "Disrupted Sleep without Sleep Curtailment Induces Sleepiness and Cognitive Dysfunction via the Tumor Necrosis Factor- α Pathway." *Journal of Neuroinflammation* 9 (1): 91. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-91>.
- Rasch, Bj  rn, and Jan Born. 2013. "About Sleep's Role in Memory." *Physiological Reviews* 93 (2): 681–766. <https://doi.org/10.1152/physrev.00032.2012>.
- Rasmussen, Martin Kaag, Humberto Mestre, and Maiken Nedergaard. 2018. "The Glymphatic Pathway in Neurological Disorders." *The Lancet. Neurology* 17 (11): 1016–24. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30318-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30318-1).
- Rechtschaffen, A., and B. M. Bergmann. 1995. "Sleep Deprivation in the Rat by the Disk-over-Water Method." *Behavioural Brain Research* 69 (1–2): 55–63. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(95\)00020-t](https://doi.org/10.1016/0166-4328(95)00020-t).
- Redolfi, S., and C. Philippe. 2014. "Nouvelles règles pour scorer les   v  nements respiratoires du sommeil chez l'adulte : rapport de l'American Academy of Sleep Medicine 2013." *Médecine du Sommeil* 11 (2): 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.msom.2014.03.001>.
- Roberts, Rosebud, and David S. Knopman. 2013. "Classification and Epidemiology of MCI." *Clinics in Geriatric Medicine* 29 (4). <https://doi.org/10.1016/j.cger.2013.07.003>.
- Scheltens, Philip, Bart De Strooper, Miia Kivipelto, Henne Holstege, Gael Ch  telat, Charlotte E. Teunissen, Jeffrey Cummings, and Wiesje M. van der Flier. 2021. "Alzheimer's Disease." *The Lancet* 0 (0). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32205-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32205-4).
- Sforza, E., C. Jouny, and V. Ibanez. 2000. "Cardiac Activation during Arousal in Humans: Further Evidence for Hierarchy in the Arousal Response." *Clinical Neurophysiology: Official Journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology* 111 (9): 1611–19. [https://doi.org/10.1016/s1388-2457\(00\)00363-1](https://doi.org/10.1016/s1388-2457(00)00363-1).

- Sohail, Shahmir, Lei Yu, Julie A. Schneider, David A. Bennett, Aron S. Buchman, and Andrew S.P. Lim. 2017. "Sleep Fragmentation and Parkinson's Disease Pathology in Older Adults Without Parkinson's Disease." *Movement Disorders : Official Journal of the Movement Disorder Society* 32 (12): 1729–37. <https://doi.org/10.1002/mds.27200>.
- Spinelli, Jessica B., and Marcia C. Haigis. 2018. "The Multifaceted Contributions of Mitochondria to Cellular Metabolism." *Nature Cell Biology* 20 (7): 745–54. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0124-1>.
- Sportiche, Noemie, Natalia Suntsova, Melvi Methippara, Tariq Bashir, Ben Mitrani, Ron Szymusiak, and Dennis McGinty. 2010. "Sustained Sleep Fragmentation Results in Delayed Changes in Hippocampal-Dependent Cognitive Function Associated with Reduced Dentate Gyrus Neurogenesis." *Neuroscience* 170 (1): 247–58. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.06.038>.
- Stamatakis, Katherine A., and Naresh M. Punjabi. 2010. "Effects of Sleep Fragmentation on Glucose Metabolism in Normal Subjects." *Chest* 137 (1): 95–101. <https://doi.org/10.1378/chest.09-0791>.
- Stepanski, Edward J. 2002. "The Effect of Sleep Fragmentation on Daytime Function." *Sleep* 25 (3): 268–76. <https://doi.org/10.1093/sleep/25.3.268>.
- Sun, Yaning, Jason Yolitz, Cecilia Wang, Edward Spangler, Ming Zhan, and Sige Zou. 2013. "Aging Studies in *Drosophila Melanogaster*." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1048: 77–93. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-556-9_7.
- Tartar, Jaime L., James T. McKenna, Christopher P. Ward, Robert W. McCarley, Robert E. Strecker, and Ritchie E. Brown. 2010. "Sleep Fragmentation Reduces Hippocampal CA1 Pyramidal Cell Excitability and Response to Adenosine." *Neuroscience Letters* 469 (1): 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.11.032>.
- Tartar, Jaime L., Christopher P. Ward, James T. McKenna, Mahesh Thakkar, Elda Arrigoni, Robert W. McCarley, Ritchie E. Brown, and Robert E. Strecker. 2006. "Hippocampal Synaptic Plasticity and Spatial Learning Are Impaired in a Rat Model of Sleep Fragmentation." *The European Journal of Neuroscience* 23 (10): 2739–48. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04808.x>.
- Tauman, Riva, Louise M. O'Brien, and David Gozal. 2007. "Hypoxemia and Obesity Modulate Plasma C-Reactive Protein and Interleukin-6 Levels in Sleep-Disordered Breathing." *Sleep and Breathing* 11 (2): 77–84. <https://doi.org/10.1007/s11325-006-0085-7>.
- Ting, Leon, and Atul Malhotra. 2005. "Disorders of Sleep: An Overview." *Primary Care* 32 (2): 305–v. <https://doi.org/10.1016/j.pop.2005.02.004>.
- Tononi, Giulio, and Chiara Cirelli. 2014. "Sleep and the Price of Plasticity: From Synaptic and Cellular Homeostasis to Memory Consolidation and Integration." *Neuron* 81 (1): 12–34. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.12.025>.
- Toth, Linda A, and Pavan Bhargava. 2013. "Animal Models of Sleep Disorders." *Comparative Medicine* 63 (2): 91–104.
- Trammell, Rita A., Steve Verhulst, and Linda A. Toth. 2014. "Effects of Sleep Fragmentation on Sleep and Markers of Inflammation in Mice." *Comparative Medicine* 64 (1): 13–24.

- Tremblay, Marie-Ève, Beth Stevens, Amanda Sierra, Hiroaki Wake, Alain Bessis, and Axel Nimmerjahn. 2011. "The Role of Microglia in the Healthy Brain." *The Journal of Neuroscience* 31 (45): 16064–69. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4158-11.2011>.
- Trinder, John, Jan Kleiman, Melinda Carrington, Simon Smith, Sibilah Breen, Nellie Tan, and Young Kim. 2001. "Autonomic Activity during Human Sleep as a Function of Time and Sleep Stage." *Journal of Sleep Research* 10 (4): 253–64. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2869.2001.00263.x>.
- Tsuno, Norifumi, Alain Besset, and Karen Ritchie. 2005. "Sleep and Depression." *The Journal of Clinical Psychiatry* 66 (10): 0–0.
- Vanderheyden, William M., Miranda M. Lim, Erik S. Musiek, and Jason R. Gerstner. 2018. "Alzheimer's Disease and Sleep–Wake Disturbances: Amyloid, Astrocytes, and Animal Models." *Journal of Neuroscience* 38 (12): 2901–10. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1135-17.2017>.
- Vienne, Julie, RYanne Spann, Fang Guo, and Michael Rosbash. 2016. "Age-Related Reduction of Recovery Sleep and Arousal Threshold in *Drosophila*." *Sleep* 39 (8): 1613–24. <https://doi.org/10.5665/sleep.6032>.
- Wang, Chanung, and David M. Holtzman. 2020. "Bidirectional Relationship between Sleep and Alzheimer's Disease: Role of Amyloid, Tau, and Other Factors." *Neuropsychopharmacology* 45 (1): 104–20. <https://doi.org/10.1038/s41386-019-0478-5>.
- Ward, Christopher P., Robert W. McCarley, and Robert E. Strecker. 2009. "Experimental Sleep Fragmentation Impairs Spatial Reference but Not Working Memory in Fischer/Brown Norway Rats." *Journal of Sleep Research* 18 (2): 238–44. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2869.2008.00714.x>.
- Ward, Christopher P., John G. McCoy, James T. McKenna, Nina P. Connolly, Robert W. McCarley, and Robert E. Strecker. 2009. "Spatial Learning and Memory Deficits Following Exposure to 24 Hours of Sleep Fragmentation or Intermittent Hypoxia in a Rat Model of Obstructive Sleep Apnea." *Brain Research* 1294 (October): 128–37. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.07.064>.
- Weller, Jason, and Andrew Budson. 2018. "Current Understanding of Alzheimer's Disease Diagnosis and Treatment." *F1000Research* 7. <https://doi.org/10.12688/f1000research.14506.1>.
- Williams, Michael J., Emelie Perland, Mikaela M. Eriksson, Josef Carlsson, Daniel Erlandsson, Loora Laan, Tabusi Mahebal, et al. 2016. "Recurrent Sleep Fragmentation Induces Insulin and Neuroprotective Mechanisms in Middle-Aged Flies." *Frontiers in Aging Neuroscience* 8 (August). <https://doi.org/10.3389/fnagi.2016.00180>.
- Winner, Beate, and Jürgen Winkler. 2015. "Adult Neurogenesis in Neurodegenerative Diseases." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7 (4): a021287. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021287>.
- Xie, Lulu, Hongyi Kang, Qiwu Xu, Michael J. Chen, Yonghong Liao, Meenakshisundaram Thiyagarajan, John O'Donnell, et al. 2013. "Sleep Drives Metabolite Clearance from the Adult Brain." *Science (New York, N.Y.)* 342 (6156). <https://doi.org/10.1126/science.1241224>.
- Xie, Yi, Li Ba, Min Wang, Sai-Yue Deng, Si-Miao Chen, Li-Fang Huang, Min Zhang, Wei Wang, and Feng-Fei Ding. 2020. "Chronic Sleep Fragmentation Shares Similar Pathogenesis with Neurodegenerative Diseases: Endosome-Autophagosome-Lysosome Pathway Dysfunction

and Microglia-Mediated Neuroinflammation.” *CNS Neuroscience & Therapeutics* 26 (2): 215–27. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/cns.13218>.

Yokogawa, Tohei, Wilfredo Marin, Juliette Faraco, Guillaume Pézeron, Lior Appelbaum, Jian Zhang, Frédéric Rosa, Philippe Mourrain, and Emmanuel Mignot. 2007. “Characterization of Sleep in Zebrafish and Insomnia in Hypocretin Receptor Mutants.” *PLoS Biology* 5 (10): e277. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050277>.

Zheng, Jiamao, Isaac Almendros, Yang Wang, Shelley X Zhang, Alba Carreras, Zhuanhong Qiao, and David Gozal. 2015. “Reduced NADPH Oxidase Type 2 Activity Mediates Sleep Fragmentation-Induced Effects on TC1 Tumors in Mice.” *Oncolmmunology* 4 (2): e976057. <https://doi.org/10.4161/2162402X.2014.976057>.

Table 1: Studies on different experimental methods of sleep fragmentation (SF).

References	Methods of Sleep Fragmentation	Sp.	Protocols	Main results
Williams et al. (2016)	Young and middle-aged male <i>CSORC</i> wildtype strain Light of 600 lux	F	4 d; 4 d + 4 d of recovery 30 min on / 30 min off	SF increased neuroprotection and protection against reactive oxygen species
McCoy et al. (2007)#	Adult male Fischer Brown Norway F1 rats; treadmill cage in which the floor was a horizontal belt	R	24 h 30 s on / 90 s off	Attentional set-shifting was impaired “Spatial memory consolidation is more susceptible to sleep disruption than is spatial learning”
McKenna et al. (2007)#	Adult male Sprague Dawley rats; treadmill cage in which the floor was a horizontal belt	R	6-24-30 h + 3-6 h of recovery 30 s on / 90 s off	Basal forebrain adenosine levels were correlated with daytime sleepiness
Tartar et al. (2006)#	Young male Sprague Dawley rats; treadmill cage in which the floor was a horizontal belt	R	24 or 72 h 30 s on / 90 s off	Spatial learning impacted negatively “Loss of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-dependent LTP in the hippocampal CA1 region may be one mechanism involved in this deficit”
Baud et al. (2013) Baud et al. (2016)	Adult male C57BL6 mice; cylindrical plexiglas cage with inner dividing walls and a mobile circular floor	M	24 h for 1 d or 14 d 20 s on / 40 s off	Crucial role of sleep fragmentation in metabolic effect of obstructive sleep apnea Impairment of cerebral cortex and hippocampus metabolism
Carreras et al. (2014)*	Adult male C57BL/6J mice; cage with sweep bar	M	12 h (light period) for 20 weeks 9 s on / 120 s off 12 h (light period) for 15 d	Vascular endothelial dysfunction and mild blood pressure increased Recruitment of inflammatory cells increased
Kaushal et al. (2012)*	Male C57BL/6J mice and TNF α receptor double knockout mice; cage with sweep bar	M	9 s on / 120 s off	Preserved sleep duration and architecture. Activation of TNF α pathways may explain excessive sleepiness caused by recurrent arousals.

Li et al. (2014)	Adult male C57BL/6J mice; cage on an orbital shaker	M	4 weeks 4 weeks+ 2 weeks of recovery 10 s on / 110 s off	Reduction of wake neuron projections and locus coeruleus neuronal excitability after SF Impairments in hypercapnic arousals. Not entirely recovered after 2 weeks.
Nair et al. (2011)*	C57BL/6J mice and gp91phox ^{-Y} mice; cage with sweep bar	M	12 h (light period) for 14 d	“Important role for NADPH oxidase in hippocampal memory impairments induced by sleep fragmentation”
Ramesh et al. (2009)*	Male C57BL/6J mice; cage with sweep bar	M	6 h (light period) for 35 d 9 s on / 120 s off	Validation of SFmodel Importance of social interactions during SF and recovery
Ramesh et al. (2012)*	Male C57BL/6 J mice TNF α receptor double knockout mice; cage with sweep bar	M	12 h (light period) for 15 d	Crucial role of TNF α
Bonnet (1989)	Males humans; auditory stimuli	H	2 nights + 2 nights recovery 20 min on / 10 min off 1000 Hz tones	Different reaction to SF between young and old adults Older adults react better and are more operational after SF
Carrington and Trinder (2008)	Male and female humans; auditory stimuli	H	2 nights Minimum: 70 dB during 5 s	Cardiovascular activation after repetitive arousals from sleep Elevations in blood pressure due to repetitive arousals during the night
Lim et al. (2013)	Human cohort study with SF	H	SF quantified during 10 d	“Sleep fragmentation in older adults is associated with incident AD and the rate of cognitive decline”

*F: flies; H: humans; M: mice; R: rats; #: Harvard Medical School and VA Boston Healthcare System, Laboratory of Neuroscience, Research 151-C, 940 Belmont Street, Brockton, MA 02301, USA ; *: Department of Pediatrics, Pritzker School of Medicine, University of Chicago, IL 60637, USA.*