



HAL
open science

Détermination du rôle de la plasticité morphologique des astrocytes dans la régulation du sommeil

Augustin Walter

► **To cite this version:**

Augustin Walter. Détermination du rôle de la plasticité morphologique des astrocytes dans la régulation du sommeil. Neurosciences [q-bio.NC]. Sorbonne Université, 2023. Français. NNT : 2023SORUS209 . tel-04630057

HAL Id: tel-04630057

<https://theses.hal.science/tel-04630057>

Submitted on 1 Jul 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.

Détermination du rôle de la plasticité morphologique des astrocytes dans la régulation du sommeil

Thèse de doctorat en Neurosciences

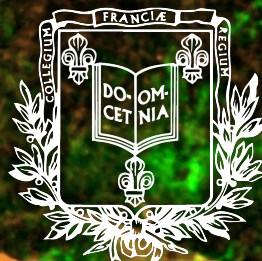
Pour obtenir le grade de
Docteur de Sorbonne Université

Présentée par
Augustin Walter

Soutenue publiquement le 29 juin 2023 au Collège de France

Devant un jury composé de :

Pr. Stéphane Charpier	Président
Pr. Micaela Galante	Rapporteur
Dr. Laurent Seugnet	Rapporteur
Pr. Sylvie Granon	Examinatrice
Dr. Véronique Fabre	Examinatrice
Dr. Armelle Rancillac	Directrice de thèse



Sorbonne Université

Thèse de doctorat en Neurosciences

Ecole doctorale 158, Cerveau, Cognition et Comportement (ED3C)

Centre Interdisciplinaire de Recherche en Biologie (CIRB) – Collège de France
Équipe du Dr. N. Rouach : Interactions Neurogliales dans la Physiopathologie Cérébrale

Détermination du rôle de la plasticité morphologique des astrocytes dans la régulation du sommeil

Présentée par
Augustin Walter

Dirigée par Armelle Rancillac

Soutenue publiquement le 29 juin 2023 au Collège de France

Devant un jury composé de :

Pr. Stéphane Charpier PU, Sorbonne Université	Président
Pr. Micaela Galante PU, Paris-Saclay	Rapporteur
Dr. Laurent Seugnet CR, CNRS	Rapporteur
Pr. Sylvie Granon PU, Paris-Saclay	Examinatrice
Dr. Véronique Fabre CR, Inserm	Examinatrice
Dr. Armelle Rancillac CR, Inserm	Directrice de thèse

A la mémoire d'Hervé Daniel

REMERCIEMENTS

Toute thèse se conclut par la remise d'un manuscrit et une soutenance au sein desquels les travaux menés pendant ces quelques années de notre existence sont présentés et discutés. Cependant, cette conclusion ne serait pas complète sans remercier l'ensemble des personnes qui, chacune à leur échelle, m'ont permis de mener à bien cette aventure.

*Tout d'abord, je tiens à remercier l'ensemble des membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mes travaux. Je remercie particulièrement le Dr. **Laurent Seugnet** et la Pre. **Micaela Galante** d'avoir accepté d'être mes rapporteurs. Merci également au Dr. **Véronique Fabre** et aux Pr. **Sylvie Granon** et **Stéphane Charpier** d'avoir accepté d'être mes examinateurs. J'espère que vous aurez apprécié la lecture de ce manuscrit.*

*Je tiens ensuite à remercier ma directrice de thèse, **Armelle Rancillac**, pour m'avoir tout d'abord permis d'effectuer mon stage de master 2 au Collège de France, sur ce petit noyau hypothalamique si compliqué à étudier qu'est le VLPO ! Merci de m'avoir fait confiance pour poursuivre en thèse et pour m'avoir laissé une grande autonomie dans la réalisation de nos expériences et dans l'analyse des résultats. Je te remercie pour ton aide au cours de ma thèse et à la correction de ce manuscrit et pour les précieux conseils que tu m'as donnés.*

*Naturellement, je remercie infiniment **Nathalie Rouach** de m'avoir accueilli dans son équipe et d'avoir financé mes trois premières années de thèse. Tu m'as offert une opportunité unique en m'ouvrant les portes de ton laboratoire où j'ai pu m'épanouir et découvrir les nombreux et grands projets que tu mènes avec l'équipe.*

*A toi mon petit **Fred**. Tu m'as accueilli à Brétoche, à l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées pour que je puisse enregistrer le sommeil de mes souris au calme. J'ai passé de superbes moments avec toi, **Emma** et ton équipe à l'IRBA, surtout lors de nos petits footings à 8 h du mat' en hiver sur la piste d'atterrissage de l'ancienne base aérienne 217, ça nous donnait un bon coup de fouet avant de commencer la journée ! Tu es la grande rencontre de ma thèse, j'ai trouvé en toi un mentor et surtout un ami. Tu as été là pour me conseiller, me guider, me soutenir. Merci à toi, grimpeur invétéré. D'ailleurs, depuis le temps que tu me tannes pour que je vienne grimper avec toi, je vais m'y remettre pour que tu m'emmènes grimper le Viaduc des Fauvettes.*

*Je souhaite remercier les membres de mon comité de suivi de thèse Dr. **Véronique Fabre** et Dr. **Sophie Pezet**, d'avoir suivi mes travaux et mon évolution au cours de ces 4 années de thèse. Mes CSI étaient toujours un peu longs, mais riches en échange d'idées. Vos conseils m'ont apporté une aide précieuse. Encore merci pour votre disponibilité et votre réactivité tout au long de ces 4 ans.*

Je voudrais remercier toutes les merveilleuses personnes que j'ai rencontré au Collège de France :

Ô mon grand PASCAL ! On t'en a fait voir de toutes les couleurs, mais tu verras ça te manquera. Je ne pourrais jamais te témoigner toute ma reconnaissance, tu m'as quasiment tout appris, tu as toujours été présent pour m'aider, même pour certaines manips foireuses. Mais au-delà du pilier central du labo, j'ai trouvé un ami. Au cours de ces 4 années, j'ai apprécié chaque minute avec toi à discuter, à imaginer et rêver et à rigoler. Nos longues séances de footing du mercredi et vendredi midi ont été une véritable bouffée d'oxygène (malgré l'air de Paris). Je n'ai pas compté combien de kilomètres on a parcouru ensemble, mais ça doit faire un sacré bout de chemin ! La réussite de cette thèse je te la dois. Cependant, ne te crois pas sauvé pour autant, même loin du Collège je serai toujours présent.

Juju MB, mon voisin de Chilly-Mazarin, terre des Grimaldi, Grand Mestre de la Confrérie secrète des Totems. Sans toi je serai devenu fou, ou alors suis-je devenu fou à cause de toi ? Je ne pense pas que l'on connaîtra un jour la réponse. Nous sommes les vagabonds du labo, des nomades. On a changé tellement de fois de bureau, mais jamais nous n'avons pu recréer notre cher bureau du RDC. Je te suis mille fois reconnaissant pour tous ces bons moments passés ensemble, toutes ces discussions, scientifiques, philosophiques, personnelles. Tu as été présent à chaque fois que j'avais besoin. J'ai beaucoup appris à tes côtés. On s'est aussi bien amusé, c'était vraiment branlecouillesque (si tu me pardonnes l'expression). J'aurai encore beaucoup à dire, mais tu le sais déjà. Pascal m'a dit qu'il nous attend avec impatience à Zanzibar.

Edmond, mon compère de bidouille. Lors de mes nombreux déménagements de bureau, j'ai atterri (et posé tout mon bazar) juste à côté de toi, dans l'aquarium du 2^e étage. Je me suis tout de suite bien entendu avec toi. J'ai apprécié chacune de nos discussions, scientifiques, comme électronique ou Hifi et je sais qu'elles continueront après mon départ. Nos petites sessions de démontage/réparation d'objets en tout genre m'ont beaucoup aidé à relativiser et à me changer les idées, ça a contribué à ma bonne santé mentale ! Merci pour tout.

Rachel, comme j'ai un peu traîné pour commencer ma thèse, on s'est retrouvés à commencer en même temps notre première année (presque, on est pas à 5 mois près). Heureusement que tu étais là pour penser à organiser nos afterworks du jeudi ! Mais plus sérieusement je te remercie énormément d'avoir toujours su m'écouter avec bienveillance quand j'avais besoin. Tu m'as toujours soutenu et tu as toujours été disposée à m'aider. J'apprécie particulièrement nos discussions scientifiques ou non, mais toujours passionnantes et également pour l'aide que tu m'as apportée lorsque je rédigeais ce manuscrit. Ce sera bientôt ton tour et je serai là pour t'aider et te soutenir dans cette dernière ligne droite. Tu vas voir comme ça fait du bien de voir le bout du tunnel 😊.

***Eléonore**, aka (phD) princesse, in the lab. On a partagé une directrice de thèse, mais surtout de bons moments au labo ou autour d'une bière avec les copains. Merci pour les coups de main que tu m'as donnés au cours de ma thèse et pour ta bienveillance.*

***Belén**, tu fais partie des belles rencontres que j'ai fait au Collège. Au-delà de la scientifique passionnée, intègre et humble, ta gentillesse, ta bienveillance et ta générosité m'ont été bénéfique tout au long de ma thèse. Tu as aussi grandement contribué à ma réussite grâce aux triptans que tu me prescrites. Toi aussi c'est bientôt ton tour de soutenir, courage pour la dernière ligne droite !*

Je tiens à faire des remerciements tous particuliers à deux membres de notre club élitiste dit « les Débiles » :

***Jeff**, on t'avait croisé il y a quelques années quand tu étais de passage au labo, mais c'est quand tu nous as rejoints que j'ai vraiment appris à te connaître. J'espère que Pascal nous fera, un jour, visiter le Temple de Tissia ! Je ne peux pas en dire plus sans fermer « la porte qui jase » 😊*

*Et mon **Giampaolo**, mon super copain du labo et partenaire de café. C'est pour toi ça : 🍷. Plus sérieusement merci pour tout, notamment pour toute l'aide que tu m'as apportée sur les cultures cellulaires d'hIPS et le MEA (et aussi pour les taralli). Et ne t'inquiète pas, un jour nous aussi on sera riches avec nos cryptos, comme tu-sais-qui sur son yacht.*

*Je tiens également à remercier **Elena** pour toute l'aide qu'elle m'a apportée en imagerie calcique biphotonique et en MEA et surtout pour tous les gâteaux du lendemain de weekend que tu nous rapportes. Ils ont grandement contribué à ma motivation ! Un grand merci à **Jérôme** qui m'a énormément aidé pour les analyses de Rayleigh-Moore et de manière générale dès que j'avais une question en physique et mathématique trop complexe pour moi. Merci aussi à tout ce que tu m'as donné quand on a fait le ménage dans ta salle.*

***Laure**, je te suis éternellement reconnaissant. Ton arrivée au labo a été un véritable soulagement pour moi. Tu m'as aidé pour tellement de manips fastidieuses, c'est long quand on doit faire des timepoints toutes les 4 h ! Au-delà des manips, on a eu beaucoup de discussions scientifiques et tu m'as apporté un regard objectif et permis de prendre du recul sur mon projet. Tu me demandais à chaque fois quelle est ma question initiale et ça m'a permis de me poser les bonnes questions et de bien recentrer mes rédactions.*

*Un grand merci à **Félix** qui commence sa thèse avec Armelle (6 mois de thèse, on peut encore dire que c'est le début, non ?). Tu m'as énormément aidé, surtout vers la fin, quand il me restait plein de manips et que je devais écrire. Avec ton arrivée et avec Laure, on a commencé à ressembler à une vraie petite équipe qui bosse sur le sommeil. Après avoir travaillé plusieurs années seul dans mon coin, ça a fait du*

bien. Je te donne tout le courage qu'il me reste (je ne vais plus en avoir besoin) pour ta thèse et j'espère être présent à ta soutenance pour voir ce qu'il y a de nouveau dans le VLPO !

Je remercie aussi tous les membres du labo que j'ai connu : **Charles-F.** (ton rire restera à jamais en ma mémoire), **Daria**, **David M.**, **Gilles**, **Alessya**, **Richard David H.**, **Flora V.**, **Anna** (#teamBretelles), **Danijela**, **Glenn**, **Noémie C.**, **Isabelle**, **Josien**, **Arthur**, **Anaïs** et **Julie** (merci pour les chocolats, les cafés et les cerveaux).

Je remercie également l'équipe de **Martine Cohen-Salmon**, pour m'avoir permis d'utiliser leur matériel de FISH et également **Anne-Cécile** pour son aide lors de mes débuts en transparasation de cerveau et pour la méthodologie d'analyse des résultats de FISH.

Le labo ne fonctionnerait pas sans eux, un grand merci à **Vincent** et **Claudie**. **Claudie**, un grand merci à toi, tu as toujours su trouver tout ce dont j'avais besoin pour travailler. On aura presque terminé ensemble, en tout cas ça sera compliqué le labo sans toi. Je remercie aussi grandement **Betty**, qui m'a beaucoup aidé à l'IRBA avec mes enregistrements de sommeil, notamment pendant l'habituation des souris.

Un grand merci à mes petits stagiaires qui m'ont bien aidé à faire avancer mes travaux : **Nolwenn**, **Fayçal** et **Amani**.

Je veux également remercier mes copains de M2 au Collège de France : **Adam**, la salle E2 était ton royaume où tu enregistras tes tranches de cerveaux humains. Merci pour les plats Libanais que tu partageais avec nous au 5^e lors de nos pauses déjeunées. **Deborah**, j'ai encore la petite chouette que tu nous avais offerte, elle m'a bien protégé ces 5 dernières années. Et enfin mon **Marc Oudart**, on a commencé et on va finir ensemble notre épopée au CdF. Pour moi on fera toujours partie de la même équipe. On s'est vraiment bien amusés au Club Med comme au Collège, même pendant cette période trouble de 2020 avec nos soirées clandestines. Au cours de ces 5 années passées au CdF, tu as toujours été là pour moi et je t'en suis reconnaissant. On va maintenant pouvoir porter notre amitié au-delà des murs du Collège de France.

Merci également à **Romain** qui a été de passage au Collège et avec qui j'ai eu de nombreuses discussions sur nos scripts d'analyse d'image respectifs. N'oublie pas notre projet !

Merci à **Tom**, pour les bons moments passés ensemble, on s'est rencontrés trop tard. Et merci à **Katia** et **Naomie** pour les bons moments conviviaux qu'on a tous passés ensemble. Vous êtes la relève, on compte sur vous pour redonner aux soirées du Collège leur grandeur d'antan ! Un grand merci à la team « Let's forget life in May » : **Barabara** et **Rachel** pour notre trajet en 4L super sympa ! **Ines**, **Katia**, **Marc** et **Tom**, les « embourbés », merci d'avoir sauvé la 4L de l'emprise de la

boue. **Héloïse**, **Lucie** et **Naomie**, ce petit weekend a été super, il m'a permis de me détendre et prendre du recul sur l'écriture de mon manuscrit.

Un immense merci à **Rodrigo**, toujours prompt à prendre de mes nouvelles et à nos discussions à la machine à café.

J'ai une pensée pour **Hervé Daniel**, un grand homme qui nous a transmis sa passion pour la neurobiologie, la pharmacologie de la synapse et une forme d'humilité indispensable à tout bon chercheur. J'aurais tant voulu vous remettre ce manuscrit et que vous soyez présent lors de ma soutenance. Puissiez-vous reposer en paix.

On en rencontre du monde en 5 ans. Je souhaite maintenant terminer par des remerciements à mes plus proches amis et à ma famille.

Un grand merci à mes meilleurs copains qui m'ont permis de me déconnecter, de m'amuser et parfois d'oublier au cours de ces 4 dernières années : **Sarah** et **Amine**, **Florine** et **Lucie**, **Audrey** et **Patchy**. On forme une super team !

A vous, mes meilleurs copains de master. **Adam** (tu as déjà été cité toi !), **Marie**, ma copine d'anglais de L3, les séjours que tu nous organises chez toi à st Robert ont été bénéfiques et curatifs. Vivement la prochaine session ! **Pablito**, on va se faire un grand BBQ pour fêter la fin de ma thèse ! **Laurine**, on a failli ne pas la commencer notre thèse. Je me souviens que tu avais eu ta réponse de financement à st Rob. En tout cas merci de m'avoir soutenu et pour toutes nos balades à moto qui nous aéraient l'esprit. Et enfin, **Yanis**, mon frerot. Depuis que je te connais, tu n'as cessé de m'apporter du positif. J'adore nos grandes discussions scientifiques, philosophiques, sur la société, notre avenir et notre conception de la vie et de ses sens. J'aime la philosophie avec laquelle tu abordes la vie et je m'en suis inspiré tout au long de ma thèse. **Laurine** et **Yanis**, attention j'arrive dans le club des PhD !

Enfin je tiens à remercier toute ma famille. Particulièrement mes **Parents**, **Wilfrid** et **Séverine** qui ont toujours été là pour moi depuis 28 ans et qui ont continué à l'être pendant ma thèse. Je vais maintenant pouvoir venir bricoler la maison avec vous à Montréal (France). Un grand merci à mes petits frères **Théophile** et **Ferdinand** et à ma petite sœur **Victorine**, vous êtes les meilleurs. On va faire péter le Dompé' !

Je remercie aussi toute la famille Salis, **Thomas** et **Barbara** de m'avoir accueilli il y a plus de 7 ans, et aussi à **Pauline** et **Dylan** de nous héberger chez eux à Nantes quand on vient en weekend.

Pour conclure, je ne remercierai jamais assez **Laura**, ma chérie pour m'avoir supporté pendant toutes ces années. Tu as toujours été là pour moi, pour m'écouter, me conseiller, me reconforter, me calmer ou me motiver quand j'en avais besoin. Tu as dû me voir passer par plein d'états, de la motivation à la démotivation, de

l'euphorie à la quasi-dépression, du blanc livide au rouge écarlate... Mais tu as toujours su trouver les mots qu'il fallait. Tu es le pilier de ma vie et m'es essentiel.

« *Pour chaque fin il y a toujours un nouveau départ.* »

— A. de Saint Exupéry



RÉSUMÉ

Bien que le sommeil soit un processus biologique essentiel à la vie, ses troubles touchent encore un tiers de la population occidentale et représentent un problème majeur de santé publique en favorisant l'apparition de nombreuses autres pathologies telles que le diabète, l'hypertension ou encore la dépression. Pourtant, les mécanismes de régulation du sommeil ne restent que partiellement caractérisés. Récemment, le rôle des astrocytes et du BDNF dans la régulation du sommeil lent ont été mis en évidence. Toutefois, leurs modes d'action restent largement méconnus et n'ont encore jamais été étudiés spécifiquement au niveau du noyau préoptique ventrolatéral (VLPO), une structure clef dans la régulation du sommeil lent.

Nous avons émis l'hypothèse que le BDNF puisse induire une plasticité morphologique des astrocytes du VLPO qui régulerait l'activité des réseaux neuronaux sous-jacents. En combinant des techniques d'hybridation d'ARNm, d'immunomarquages, de microscopie confocale et d'enregistrements du sommeil en cages piézoélectriques, chez des souris à P30-50, nous avons pu mettre en évidence une plasticité morphologique circadienne des astrocytes du VLPO. Nous avons montré que cette plasticité est dépendante de l'expression de la connexine 30, une protéine astrocytaire constitutive des jonctions communicantes, qui joue aussi un rôle important dans la régulation de la proximité des prolongements astrocytaires aux synapses. Le BDNF, suit également une expression circadienne qui pourrait moduler la morphologie des astrocytes. De plus, nos résultats nous ont permis de supposer que l'ARNm du BDNF est principalement synthétisé par les neurones promoteurs du sommeil lent du VLPO et qu'il subirait une maturation au sein des astrocytes. Enfin, j'ai pu montrer, *in vivo*, que l'injection de BDNF dans le VLPO favorise le sommeil.

L'ensemble de ces résultats suggère que le BDNF participe à la régulation du sommeil via une modulation de la morphologie des astrocytes du VLPO. Ce dernier est majoritairement exprimé en fin de période lumineuse et pourrait servir à l'induction du sommeil ou à sa consolidation lorsque la pression de sommeil est faible.

GLOSSAIRE

- 20-HETE** : acide 20-hydroxyéicosatétraénoïque
- aa** : acide aminé
- AD** : Adénosine
- AdK** : Adénosine Kinase
- AMPA** : α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique acid
- AQP4** : Aquaporine 4
- ATP** : Adénosine Triphosphate
- B/P** : solution de Blocage/Perméabilisation
- BDNF** : *Brain-Derived Neurotrophic Factor*
- BF** : prosencéphale basal (*Basal Forebrain*)
- BHE** : Barrière HématoEncéphalique
- CCK** : Cholécystokinine
- CT** : *Circadian Time*
- CRH** : hormone de libération de la corticotrophine
- cVLPO** : cœur du VLPO
- Cx** : connexine
- D/D** : *Dark/Dark*, cycle d'obscurité constante
- DAG** : Diacylglycérols
- DMH** : noyau hypothalamique dorsomédial
- DRN** : noyau du raphé dorsal
- EAAT** : *Excitatory Amino Acid Transporters*
- EEG** : Electroencéphalogramme
- EMG** : Electromyogramme
- ENT** : *Equilibrative Nucléoside Transporter*
- ERK** : *Extracellular signal-Regulated Kinase*
- eVLPO** : VLPO étendu (*extended VLPO*)
- FISH** : *Fluorescent In Situ Hybridization of mRNA*
- GAD** : Glutamate Décarboxylase
- GAT3** : transporteur du GABA de type 3
- GDNF** : *Glia-Derived Neurotrophic Factor*
- GFAP** : protéine acide fibrillaire gliale (*Glial Fibrillary Acidic Protein*)
- GlyT1** : transporteur de la glycine de type 1
- GS** : Glutamine Synthétase
- ICV** : IntraCérébroVentriculaire
- IL-1** : Interleukine-1
- IP 3** : Inositol trisphosphate
- JC** : Jonctions Communicantes
- KO** : *Knock Out*
- L/D** : *Light/Dark*, cycle d'alternance lumière/obscurité de 12 h/12 h
- L/L** : *Light/Light*, cycle de lumière constante
- LC** : *Locu Coeruleus*
- LCR** : Liquide CéphaloRachidien
- LTD** : dépression synaptique à long terme
- LTP** : potentialisation synaptique à long terme
- MAPK** : *Mitogen-Activated Protein Kinase*
- mBDNF** : isoforme mature du BDNF
- mGlu** : récepteur métabotrope au Glutamate
- MMP** : Métalloprotéase de la Matrice extracellulaire
- MnPO** : noyau Préoptique Médian
- NGF** : *Nerve Growth Factor*
- NMDA** : récepteur ionotrope au N-méthyl-D-aspartate
- NO** : monoxyde d'azote
- NREM** : *Non-Rapide Eye Movement*
- p75NTR** : récepteur aux neurotrophines p75
- PAG** : glutaminase

- PG** : Prostaglandines
PGD2 : Prostaglandine D2
PGE2 : Prostaglandine E2
PGO : Ponto-Geniculo-Occipital
PI3K : Phosphoinositide 3-kinase
PKC : Protéine kinase C
PLC γ : Phospholipase C gamma
proBDNF : isoforme proneurotro-
 phine du BDNF
PZ : Zone Parafaciale
RE : Réticulum Endoplasmique
REM : *Rapid Eye Movement*
RhoGDI1 : *Rho GDP Dissociation*
Inhibitor
ROCK : *Rho-associated protein ki-*
nase
ROI : région d'intérêt (*Region Of*
Interest)
RPa : Raphé Pallidus
SCN : Noyau Suprachiasmatique
SL : Sommeil Lent
SLP : Sommeil Lent Profond
SNARE : *Soluble N-ethylmaleimide-*
Sensitive Factor Attachment Proteins
Receptor
SNC : Système Nerveux Central
SNP : *Simple Nucleotide Polymor-*
phism
STED : *STimulated-Emission-Deple-*
tion
TCA : cycle des acides carboxyliques
TGF β : *Transforming Growth Fac-*
tor β
 thêta_A : Température Ambiante
TMN : Noyau Mubéromammillaire
TNAP : *Tissue-Nonspecific Alkaline*
Phosphatase
TNF : *Tumor Necrosis Factor*
TRAP : *Translating Ribosome Affi-*
nity Purification
TrkB : récepteur kinase B de la Tro-
 pomyosine
TrkB.FL : isoforme longue du ré-
 cepteur kinase B de la tropomyosine
TrkB.t1 : isoforme tronquée du ré-
 cepteur kinase B de la tropomyosine
TTIP : *Truncated TrkB Interacting*
Protein
TTX : tétrodotoxine
UPR : réponse aux protéines mal re-
 pliées (*Unfolded Protein Response*)
vGAT : transporteur vésiculaire du
GABA : acide γ -aminobutyrique
vGLUT : transporteur vésiculaire
 du glutamate
VIP : *Vasoactive Intestinal Peptide*
VLPO : noyau Préoptique Ventrola-
 téral
VNUT : transporteur vésiculaire des
 nucléotides
 θ_A : température ambiante

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	9
RÉSUMÉ	21
GLOSSAIRE	23
TABLE DES MATIÈRES	27
TABLE DES FIGURES	31
INTRODUCTION.....	35
1 LE SOMMEIL	37
1.1 Caractéristiques du sommeil	37
1.1.1 Caractéristiques comportementales et macroscopiques du sommeil.....	37
1.1.2 Rythmes cérébraux associés aux états de vigilance	39
1.2 Neuroanatomie et neurochimie du sommeil	41
1.2.1 Hypothalamus et sommeil lent	42
1.2.2 Le noyau préoptique ventrolatéral (VLPO)	42
1.2.3 Le noyau préoptique médian	49
1.2.4 La zone parafaciale.....	50
1.3 Régulation homéostatique et circadienne du sommeil.....	51
1.3.1 Contrôle circadien	52
1.3.2 Contrôle homéostatique.....	53
1.3.3 Les fonctions du sommeil	55
2 LES ASTROCYTES.....	59
2.1 Propriétés des astrocytes	59
2.1.1 Hétérogénéité et critères d'identifications.....	59
2.1.2 Morphologie et domaines astrocytaires.....	60
2.1.3 Propriétés membranaires, canaux ioniques, récepteurs et transporteurs	62
2.1.4 Signalisation astrocytaire	63
2.2 Fonctions des astrocytes	65
2.2.1 Homéostasie ionique et aqueuse extracellulaire	65
2.2.2 Homéostasie et synthèse des neurotransmetteurs	67
2.2.3 Astrocytes et transmission synaptique	67
2.2.4 Couplage neurovasculaire	71
2.2.5 Métabolisme énergétique cérébral.....	72
2.3 Fonctions des astrocytes liées au sommeil.....	74
2.3.1 Sécrétion de substances hypnogènes	74
2.3.2 Modulation des oscillations lentes et du sommeil	76
2.3.3 Activité des astrocytes pendant le sommeil.....	77
2.3.4 Changements transcriptionnels et structurels circadiens	79
2.4 Connexines astrocytaires.....	79
2.4.1 Présentation générale des connexines	80

2.4.2 Fonctions des connexines	81
2.4.3 Connexines astrocytaires et sommeil.....	84
3 BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR.....	89
3.1 La découverte du BDNF	89
3.2 Synthèse et maturation du BDNF	89
3.3 Les récepteurs du BDNF	92
3.3.1 TrkB et ses isoformes.....	93
3.3.2 P75NTR et sortiline.....	97
3.4 BDNF et sommeil.....	97
3.4.1 BDNF sanguin chez l'homme.....	98
3.4.2 BDNF et oscillations lentes.....	98
3.4.3 BDNF et morphologie cellulaire.....	99
3.4.4 BDNF et homéostasie du sommeil	99
3.4.5 Cas du polymorphisme Val66Met	100
4 OBJECTIFS DE THÈSE	102
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	107
RÉSULTATS.....	121
1 PLASTICITÉ MORPHOLOGIQUE DES ASTROCYTES DU VLPO AU COURS DU CYCLE L/D	123
1.1 Taille et complexité des astrocytes du VLPO au cours du cycle L/D	123
1.2 Plasticité morphologique des astrocytes du VLPO en absence de cycle L/D	127
1.3 Implication de la Cx30 dans la plasticité morphologique des astrocytes.....	129
1.4 Expression des connexines 30 et 43 au cours du cycle L/D	129
2 EFFETS DU BDNF SUR LA PLASTICITÉ MORPHOLOGIQUE DES ASTROCYTES DU VLPO	135
2.1 Variations morphologiques des astrocytes du VLPO induites par le BDNF	135
2.2 Implication de la Cx30 dans la plasticité morphologique des astrocytes induite par le BDNF	135
2.3 Influence du BDNF sur l'expression de la Cx30	137
3 EXPRESSION DU BDNF AU SEIN DU VLPO AU COURS DU CYCLE L/D.....	139
3.1 Etude des taux d'ARNm BDNF.....	139
3.2 Expression des formes proBDNF et mBDNF	139
3.3 Phosphorylation de TrkB	142
3.4 Variations d'expression du BDNF en cycle L/L et D/D	143
4 ORIGINE DU BDNF DANS LE VLPO : SYNTHÈSE ET MATURATION	145
4.1 Synthèse du BDNF par les neurones du VLPO.....	145
4.2 Stockage et maturation du BDNF produit par les neurones dans les astrocytes	149

5 EFFETS <i>IN VIVO</i> DU BDNF ET RÔLES DE LA Cx30 SUR LE SOMMEIL	151
5.1 Injection de BDNF dans le VLPO et quantité de sommeil	151
5.2 Sommeil des souris déficientes pour la Cx30 dans la POA.....	153
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	157
1 PLASTICITÉ MORPHOLOGIQUE DES ASTROCYTES DU VLPO AU COURS DU CYCLE CIRCADIEN.....	159
2 RÔLES DE LA Cx30 DANS LA PLASTICITÉ MORPHOLOGIQUE DES ASTROCYTES DU VLPO	162
3 BDNF ET PLASTICITÉ MORPHOLOGIQUE DES ASTROCYTES DU VLPO.....	164
4 ORIGINE CELLULAIRE DU BDNF : SYNTHÈSE, MATURATION ET STOCKAGE	167
5 EFFETS <i>IN VIVO</i> DU BDNF ET DE LA Cx30 SUR LE SOMMEIL	169
CONCLUSION.....	172
FIGURES SUPPLÉMENTAIRES.....	177
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	187
ANNEXES.....	229
1 STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CONNECTIONS BETWEEN THE MEDIAN AND THE VENTROLATERAL PREOPTIC NUCLEUS	231
2 NEUROPEPTIDE S PROMOTES WAKEFULNESS THROUGH THE INHIBITION OF SLEEP-PROMOTING VENTROLATERAL PREOPTIC NUCLEUS NEURONS	244
3 PROSTAGLANDIN D ₂ CONTROLS LOCAL BLOOD FLOW AND SLEEP-PROMOTING NEURONS IN THE VLPO VIA ASTROCYTE-DERIVED ADENOSINE.....	259
4 UPREGULATION OF ASTROGLIAL CONNEXIN 30 IMPAIRS HIPPOCAMPAL SYNAPTIC ACTIVITY AND RECOGNITION MEMORY	267

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Illustration d'enregistrements EEG typiques chez l'homme et chez le rat pendant différents états de conscience.	38
Figure 2 : Le Hypnogramme chez l'homme.....	38
Figure 3 : Hypnogramme de souris C57BL/6 sur 24 h.....	39
Figure 4 : Illustration de différentes oscillations cérébrales associées au sommeil.....	40
Figure 5 : <i>Scoring</i> du sommeil lent chez la souris et hypnogramme.....	41
Figure 6 : Localisation du VLPO.....	43
Figure 7 : Schéma illustrant le contrôle de la régulation du sommeil lent par le VLPO.....	44
Figure 8 : Anatomie cellulaire du VLPO.....	45
Figure 9 : Thermorégulation circadienne chez la souris.....	48
Figure 10 : Différents sous-types d'astrocytes.....	60
Figure 11 : Morphologie et domaines astrocytaires.....	62
Figure 12 : Contrôle de l'homéostasie du potassium extracellulaire par les astrocytes.....	66
Figure 13 : Cycle neuro-astrocytaire du glutamate et du GABA.....	68
Figure 14 : La synapse tri et multipartite.....	69
Figure 15 : Schéma représentant les constituants de l'unité gliovasculaire.....	72
Figure 16 : Hypothèse de la navette lactate astrocyte-neurone.....	74
Figure 17 : Disposition spatiale des connexines.....	80
Figure 18 : Influence de la taille du réseau astrocytaire dans la régulation de l'activité synaptique.....	83
Figure 19 : La connexine 30 contrôle la transmission synaptique excitatrice via des fonctions non canal.....	85
Figure 20 : Taux de connexines 30 et 43 dans le SCN au cours du cycle nyctéméral.....	86
Figure 21 : Représentation schématique de la synthèse et de la maturation du BDNF.....	90
Figure 22 : Isoformes du BDNF et interactions avec leurs récepteurs spécifiques.....	92
Figure 23 : Voies de signalisation intracellulaires BDNF-TrkB.....	94
Figure 24 : Modèle de séquestration du BDNF médié par le récepteur TrkB.t1 astrocytaire.....	96
Figure 25 : Exemple d'analyse de Sholl et des différents paramètres mesurés.....	112
Figure 26 : Implantation du guide canule ciblant le VLPO et contrôles histologiques d'implantation.....	114
Figure 27 : Exemple de signal piézoélectrique enregistré et de calcul de la décision statistique.....	116
Figure 28 : Les astrocytes du VLPO présentent une plasticité au cours du cycle L/D.....	125
Figure 29 : Morphologie des astrocytes en conditions L/L et D/D.....	128
Figure 30 : Cx30 et plasticité morphologique des astrocytes du VLPO.....	131
Figure 31 : Le BDNF induit une augmentation de la taille et une complexification des astrocytes du VLPO.....	136

Figure 32 : Expression cyclique du BDNF, de son ARNm et phosphorylation de TrkB au cours du cycle L/D	141
Figure 33 : Origine cellulaire et maturation du BDNF dans le VLPO	147
Figure 34 : Effets de l'injection de BDNF ou de la déficience Cx30 sur le sommeil	152
Figure 35 : Schéma récapitulatif du processus de régulation du sommeil médié par le BDNF, la Cx30 et la plasticité morphologique des astrocytes au sein du VLPO	173

Première partie

INTRODUCTION

1 Le sommeil

1.1 Caractéristiques du sommeil

L E SOMMEIL est un processus biologique essentiel à la vie. Il est ubiquitaire, aussi bien chez les mammifères que chez les oiseaux (Benington et Heller, 1995) ou encore les insectes comme la drosophile. Pour l'homme comme pour les rongeurs, une privation de sommeil a des effets sur la physiologie et peut être associée à certaines pathologies et à la mort (Roth, 2009). Le record de temps passé sans dormir a été attribué en 1964 à un étudiant californien pour une durée de 11 jours et 25 minutes (Coren, 1998).

Dans les sociétés modernes, les troubles du sommeil sont très répandus et favoriseraient l'apparition de nombreuses pathologies telles que la dépression (Sarsour et al., 2010), l'hypertension artérielle (Altman et al., 2012), le diabète ou encore la maladie d'Alzheimer (Brzecka et al., 2018). Ainsi, le caractère vital du sommeil et les troubles qui lui sont associés soulignent l'importance et la nécessité de la recherche sur le sommeil. Au cours des dernières décennies, de nombreux travaux de recherche ont permis d'établir de nouveaux concepts sur la régulation du cycle veille-sommeil et les fonctions du sommeil, qui seront détaillés dans ce chapitre.

1.1.1 Caractéristiques comportementales et macroscopiques du sommeil

Le sommeil est un état comportemental caractérisé par une conscience réduite associée à une atonie musculaire et une diminution de la réponse aux stimuli extérieurs. En laboratoire, le sommeil est défini à l'aide d'enregistrements polysomnographiques composés d'électroencéphalogrammes (EEG) et d'électromyogramme (EMG). L'EEG enregistre le champ électrique produit par les neurones — principalement corticaux et para-hippocampiques — et l'EMG, quant à lui, enregistre l'activité électrique des muscles oculomoteurs (électro-oculogramme) et du menton. En se basant sur ces enregistrements, le sommeil est généralement divisé en deux phases : le sommeil lent (SL) ou *Non-rapid Eye Movement sleep* (NREM) et le sommeil paradoxal ou *Rapid Eye Movement sleep* (REM). Le SL est caractérisé par une activité EEG de basse fréquence et de grande amplitude. Chez l'homme, il est subdivisé en 3 stades (N1 à N3) qui se succèdent et au cours desquels la fréquence de l'activité EEG diminue et l'amplitude augmente, jusqu'à être dominé par des oscillations lentes (0,5-4 Hz) au stade 3 (SL profond). Pendant le sommeil paradoxal, les EEG présentent une activité similaire à celle enregistrée pendant l'éveil. L'EEG présente des activités de haute fréquence et de faible amplitude associées à une atonie musculaire complète et des mouvements oculaires rapides (**Figure 1**). Finalement, la succession de ces deux types de sommeil forme, chez l'homme, un cycle d'environ 90 minutes qui se répète au cours de la période de repos. Au fil de ces répétitions, les épisodes de SL sont de moins en moins profonds et les épisodes de SP de plus en plus longs, jusqu'à atteindre l'éveil complet (**Figure 2**).

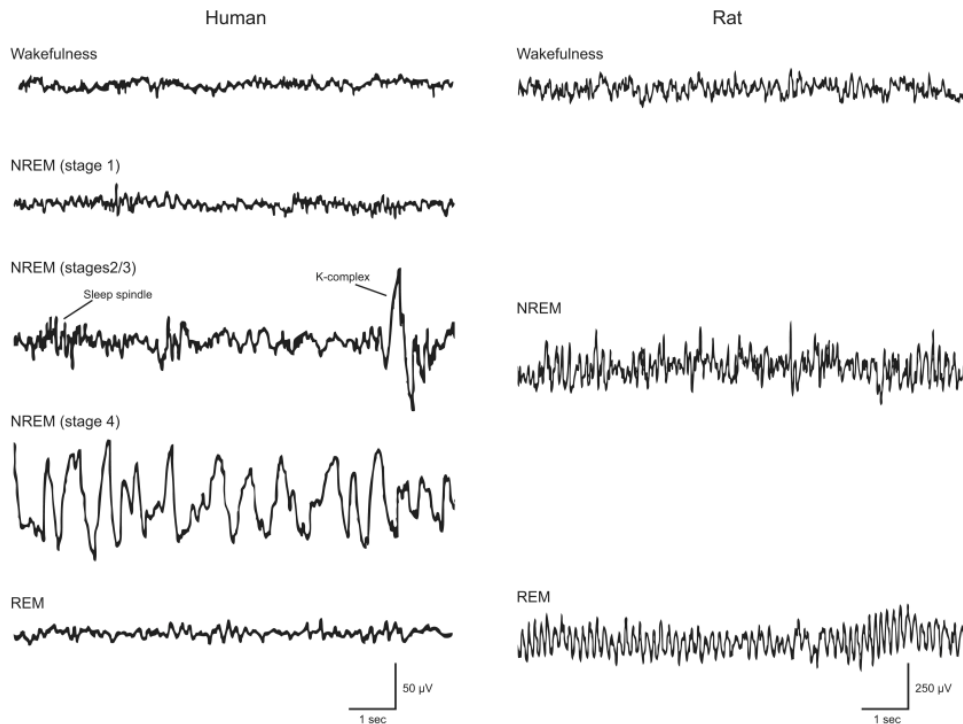


Figure 1 : Illustration d'enregistrements EEG typiques chez l'homme et chez le rat pendant différents états de conscience. Adapté de Brown et al. 2012.

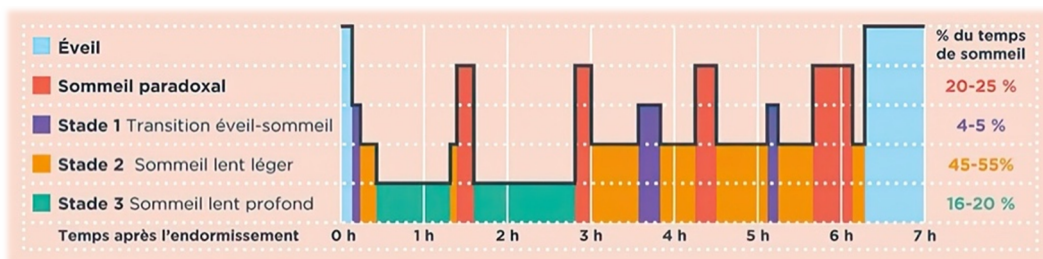


Figure 2 : Hypnogramme chez l'homme. Le sommeil commence généralement par du sommeil lent profond (stade 3) précédé par du sommeil lent léger (stade 2) et d'une transition éveil vers sommeil (stade 1). Au cours du repos, le sommeil lent profond est de moins en moins abondant et les épisodes de sommeil paradoxal sont de plus en plus longs, jusqu'au réveil. Adapté de [Inserm/Pinci, Alexandra](#).

Les états de vigilance des rongeurs, et plus particulièrement de la souris commune (*mus musculus*), sont, comme pour l'homme, au nombre de trois : l'éveil, le sommeil lent et le sommeil paradoxal. De même, lors du SL, une forte synchronisation corticale est observée, associée à une diminution de la fréquence EEG et une augmentation de son amplitude. Quant au sommeil paradoxal, son activité EEG est proche de

celle observée pendant l'éveil (mélange de plusieurs fréquences et amplitudes), les souris sont immobiles et présentent une atonie musculaire, exception faite de la respiration. Cependant, contrairement à certains mammifères, dont l'homme, la souris est un animal nocturne et présente un sommeil polyphasique (**Figure 3**). Pendant la période obscure, la souris est principalement éveillée et très active, mais des périodes de sommeil viennent entrecouper cette activité. C'est pendant la phase lumineuse que la fréquence et la durée des épisodes de sommeil augmentent. Le SL occuperait environ 90 % du sommeil. Le SP survient de manière répétée à intervalles réguliers et dure d'une dizaine de secondes à quelques minutes, mais ne surviendrait pas directement après l'éveil (Yamabe et al., 2019).

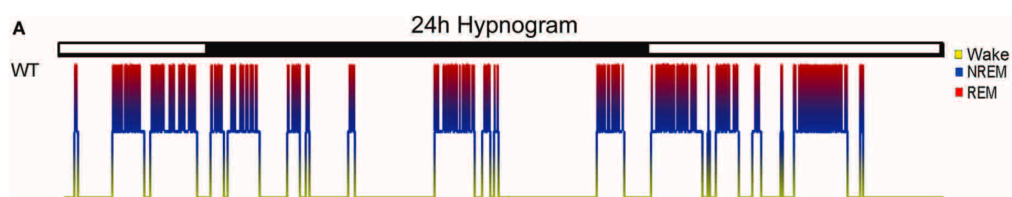


Figure 3 : Hypnogramme de souris C57BL/6 sur 24 h. Les souris sont des animaux nocturnes qui présentent un sommeil polyphasique. Elles sont très actives pendant la phase obscure, période qui est entrecoupée de périodes de sommeil (siestes). La phase lumineuse est dominée par le sommeil avec une alternance entre sommeil lent et sommeil paradoxal. Cette période inclut également de brefs épisodes d'éveil, qui restent néanmoins moins fréquents et plus courts que pendant la phase obscure. Adapté de Johnston et al. 2014.

1.1.2 Rythmes cérébraux associés aux états de vigilance

L'électroencéphalographie est une technique d'enregistrement de l'activité cérébrale dont l'invention est généralement attribuée à Richard Caton, un médecin britannique (Swartz, 1998). Chez l'homme, le dispositif est composé d'électrodes de surface disposées sur le cuir chevelu, tandis que chez l'animal, ces électrodes sont le plus souvent implantées dans le cortex. Les signaux électriques enregistrés et amplifiés correspondent à l'activité des réseaux neuronaux des régions présentes sous les électrodes (le plus souvent le cortex et l'hippocampe). Aujourd'hui, cinq types d'ondes cérébrales sont connus : alpha, bêta, delta, gamma et thêta, et sont différenciellement présent en fonction de l'état de vigilance considéré.

1.1.2.1 Rythmes associés à l'éveil

Pendant l'éveil, les ondes corticales ont des rythmes locaux rapides, de faible amplitude bêta (15-30 Hz) et gamma (30-120 Hz). Les ondes alpha (8-14 Hz) surviennent lors d'un état d'éveil relaxé et sont supprimées par l'ouverture des yeux et par les stimuli visuels (Palva et Palva, 2007). Les ondes thêta (4-8 Hz; **Figure 4**), quant à elles, apparaissent lors des états de somnolence (stade 1) qui correspondent à la transition entre l'éveil et le sommeil (endormissement).

1.1.2.2 Rythmes associés au sommeil lent

Chez l'homme, le stade 1 du SL est un état de transition de l'éveil vers le sommeil, aussi appelé endormissement. Les enregistrements EEG présentent alors des oscillations de faible amplitude et de fréquence variable (**Figure 4**), dominés par des ondes alpha et thêta (Buzsáki, 2006). Le stade 2 est caractérisé par l'apparition de *spindles* (7-15 Hz; **Figure 4**) et de complexes K (**Figure 1**). Enfin, le stade 3, aussi appelé sommeil lent profond, est dominé par des ondes lentes de basse fréquence et de grande amplitude (0,5-4 Hz). De plus, des rythmes rapides tels que les ondes bêta et gamma peuvent survenir pendant ce stade; les oscillations lentes (0,5-1 Hz) — découvertes par Steriade — regroupent ces rythmes rapides et lents (Steriade, 2006). L'intensité des oscillations lentes augmente avec le temps passé éveillé précédent l'épisode de sommeil lent et diminue avec la durée de sommeil (Achermann, 2003 ; Martinez-Gonzalez et al., 2008). Elles représentent donc un marqueur caractéristique du besoin de sommeil bien que les mécanismes sous-jacents restent méconnus.

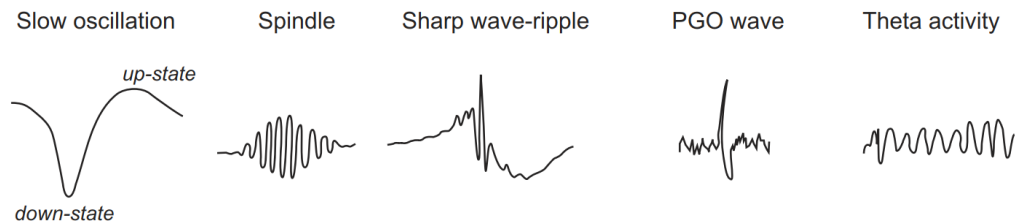


Figure 4 : Illustration de différentes oscillations cérébrales associées au sommeil. Les potentiels de champ électrique dominants pendant le sommeil lent sont les oscillations lentes néocorticales ($\approx 0,8$ Hz), les *spindles* thalamocorticaux (10-15 Hz) et les ondes aiguës hippocampiques. Chez les animaux, le sommeil paradoxal est caractérisé par des ondes ponto-géniculococcipitales (PGO) provenant du tronc cérébral pontin qui se propagent vers le noyau géniculé latéral et le cortex visuel. Ce type d'activité est également supporté par des rythmes thêta hippocampiques (4-8 Hz). Chez l'homme, les ondes PGO et l'activité thêta sont moins marquées. Adapté de Rasch et Born 2013.

Ces oscillations lentes du sommeil lent sont également bien décrites chez les rongeurs. Bien que la subdivision du SL en différents stades ne soit pas encore bien établie, de récentes études ont caractérisé des stades similaires à ceux observés chez l'homme. Ainsi, il serait possible de subdiviser le SL murin en 3 stades (N1 à N3) en se basant sur les *delta bursts* (**Figure 5**; Lacroix et al., 2018).

1.1.2.3 Rythmes associés au sommeil paradoxal

Pendant le sommeil paradoxal, l'activité EEG est forte et désynchronisée. Les ondes thêta qui sont caractéristiques du SP tonique – période de SP sans mouvements rapides des yeux – apparaissent (Buzsáki, 2006) tandis que les ondes ponto-géniculococcipitales (PGO) sont absentes.

occipitale (PGO; **Figure 4**) se manifestent de manière concomitante aux mouvements des yeux (SP phasique : période associée à des contractions musculaires ; Mignot, 2008).

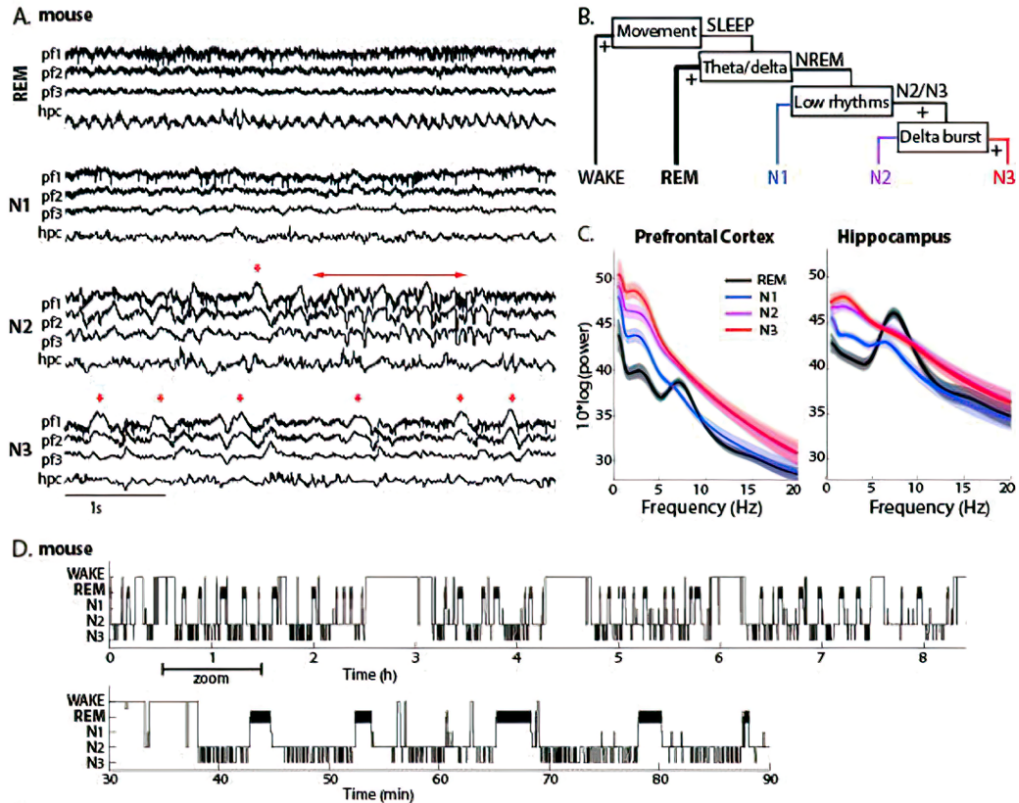


Figure 5 : Scoring du sommeil lent chez la souris et hypnogramme. **A.** Exemple d'enregistrement EEG du cortex préfrontal et de l'hippocampe pendant le REM et une même période de NREM (N1 à N3). Les astérisques et les flèches représentent respectivement les ondes delta et les *spindles*. **B.** Diagramme de la méthode de *scoring* permettant de distinguer les différents stades du NREM en se basant sur les oscillations lentes. **C.** Spectre de puissance moyenne sur l'ensemble des stades pour le cortex préfrontal et l'hippocampe. On constate une augmentation progressive de la bande delta (2-4 Hz) entre N1, N2 et N3. **D.** Exemple d'un hypnogramme murin sur l'ensemble de la période d'enregistrement et un zoom sur une période donnée. Adapté de Lacroix et al. 2018.

1.2 Neuroanatomie et neurochimie du sommeil

Au début du XXe siècle, le neurologue autrichien Baron Constantin von Economo a entrepris une série d'études clinicopathologiques sur des personnes rendues insomniaques suite à l'épidémie d'encéphalite léthargique. C'est lors des analyses post mortem de leur cerveau que des lésions inflammatoires de l'hypothalamus antérieur et

des ganglions de la base furent découvertes, expliquant la chorée souvent associée à l'insomnie. Sur la base de ces résultats, von Economo a émis l'hypothèse que la région hypothalamique antérieure constituait un centre du sommeil.

1.2.1 Hypothalamus et sommeil lent

Basé sur la découverte d'un centre du sommeil situé dans l'hypothalamus antérieur, von Economo a émis l'hypothèse que ce centre exercerait une action inhibitrice sur le cortex et le thalamus produisant ainsi l'état de sommeil. Moins d'une décennie plus tard, le physiologiste Walter Rudolf Hess déclara qu'il était possible de provoquer le sommeil chez le chat en stimulant certaines régions de l'hypothalamus et du mésencéphale (Hess, 1931). En 1946, les travaux du neurophysiologiste Nauta montrèrent que des lésions mécaniques à l'hypothalamus caudal de rat tendent à produire une somnolence légère à extrême, tandis que les lésions englobant l'hypothalamus latéral et rostral produisent un état d'insomnie. Il conclut que la partie rostrale (zones suprachiasmatiques et préoptiques) est le siège d'une structure nerveuse qui revêt une importance spécifique pour le sommeil et la nomme « centre du sommeil ». De même, la partie caudale comporterait des « centres de l'éveil ». Il suggère également que l'inhibition active du ou des centres de l'éveil par le centre du sommeil serait à l'origine de l'état de sommeil (Nauta, 1946). Enfin, un peu plus de deux décennies plus tard, en 1968, McGinty et Sterman rapportèrent que des lésions du cerveau antérieur basal, qui comprend la région préoptique, produisent des insomnies chez les chats, confirmant ainsi les résultats obtenus par Nauta (McGinty et Sterman, 1968).

1.2.2 Le noyau préoptique ventrolatéral (VLPO)

Dans le domaine des sciences du sommeil, un tournant s'est produit lorsque Saper et ses collaborateurs ont localisé précisément un centre du sommeil dans l'hypothalamus rostral chez le rat. Il s'agit d'un groupe de cellules actives pendant le sommeil jusqu'alors non identifié, qui se situe dans la zone préoptique ventrolatérale (Sherin et al., 1996).

1.2.2.1 La découverte du VLPO

Ce groupe de neurones actifs pendant le sommeil fût identifié par des marquages de la protéine c-Fos, un produit de l'expression de gènes précoces résultant de l'activation neuronale (Sherin et al., 1996). Ces neurones sont localisés latéralement au chiasma optique, lorsqu'en coupe frontale se dessine le croisement de la commissure antérieure. Cette région bilatérale est appelée noyau préoptique ventrolatérale (VLPO ; **Figure 6**). Contrairement à l'accumulation de c-Fos pendant le sommeil, aucune augmentation de l'expression de c-Fos n'est observée lors de l'accroissement du besoin de sommeil au cours d'une période d'éveil prolongée (Sherin et al., 1996). Cependant, plus récemment, des enregistrements unitaires de ces neurones ont montré qu'ils commençaient tout de même à s'activer pendant une privation de sommeil (Alam et al., 2014).

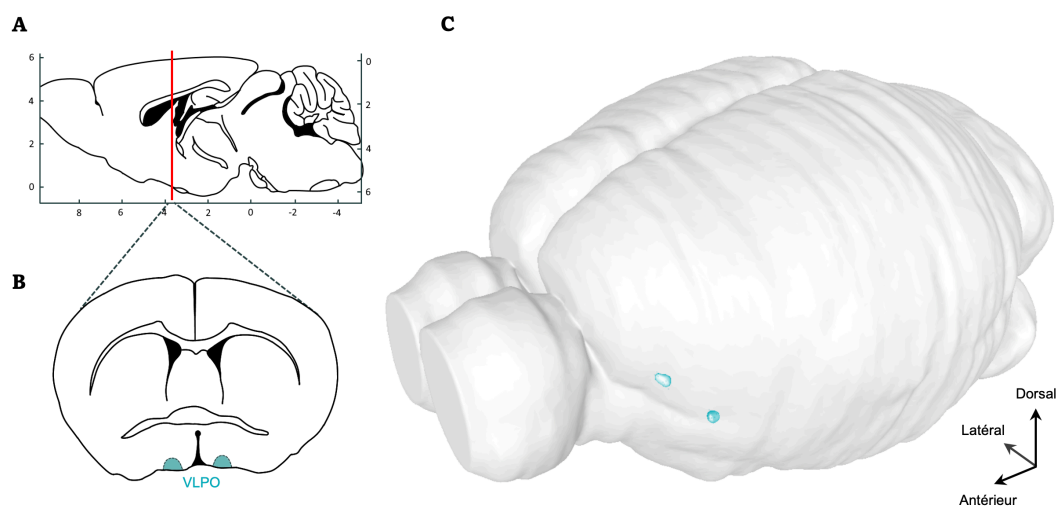


Figure 6 : Localisation du VLPO. **A.** Schéma représentant le plan de coupe frontale (en rouge) qui comprend le VLPO sur un cerveau de souris (Bregma 0,14 à -0,22 mm ; Franklin et Paxinos, 2007). **B.** Représentation de la localisation du VLPO sur la coupe frontale (structure bilatérale, en bleu, AP : +0,1 mm ; ML : \pm 0,7 mm ; DV : -4,5 mm) sur le plan de coupe frontale. **C.** Représentation tridimensionnelle du VLPO au sein du cerveau de souris.

Afin de démontrer la nécessité des neurones du VLPO à l'induction du sommeil, Lu et ses collaborateurs ont effectué des lésions cellulaires spécifiques dans le VLPO de rats. Les rongeurs ayant subi ces lésions bilatérales présentent une réduction de 40 à 50 % de la durée totale du sommeil et une fragmentation de leur sommeil (Lu et al., 2000). Ces lésions ont par la suite été reproduites par plusieurs équipes confirmant ainsi que les neurones du VLPO sont nécessaires au maintien du sommeil lent (Arrigoni et al., 2009 ; Eikermann et al., 2011 ; Vetrivelan et al., 2012 ; 2016). Cependant, les animaux présentant une ablation complète et bilatérale du VLPO continuent de dormir, ce qui suggère l'existence d'autres systèmes régulant le sommeil comme le noyau préoptique médian (MnPO, Gong et al., 2004) ou la zone parafaciale (PZ ; Anaclet et al., 2012 ; 2014 ; Alam et al., 2018) qui seront détaillés ci-après.

1.2.2.2 Afférences et efférences du VLPO

Les neurones promoteurs du sommeil du VLPO innervent abondamment le noyau tubéromammillaire (TMN), un groupe de cellules de l'hypothalamus postérieur impliqué dans l'éveil (**Figure 7** ; Sherin et al., 1996). Les neurones du VLPO qui projettent sur le TMN sont à la fois GABAergiques et galaninergiques (un neuropeptide inhibiteur), suggérant que le VLPO exercerait un puissant contrôle inhibiteur sur le TMN (Sherin et al., 1998). En effet, il a été montré que la plupart des

neurones du VLPO actifs pendant le sommeil expriment l'ARN messager (ARNm) de la galanine aussi bien chez les rongeurs (nocturnes comme diurnes) et chez le chat (Gaus et al., 2002).

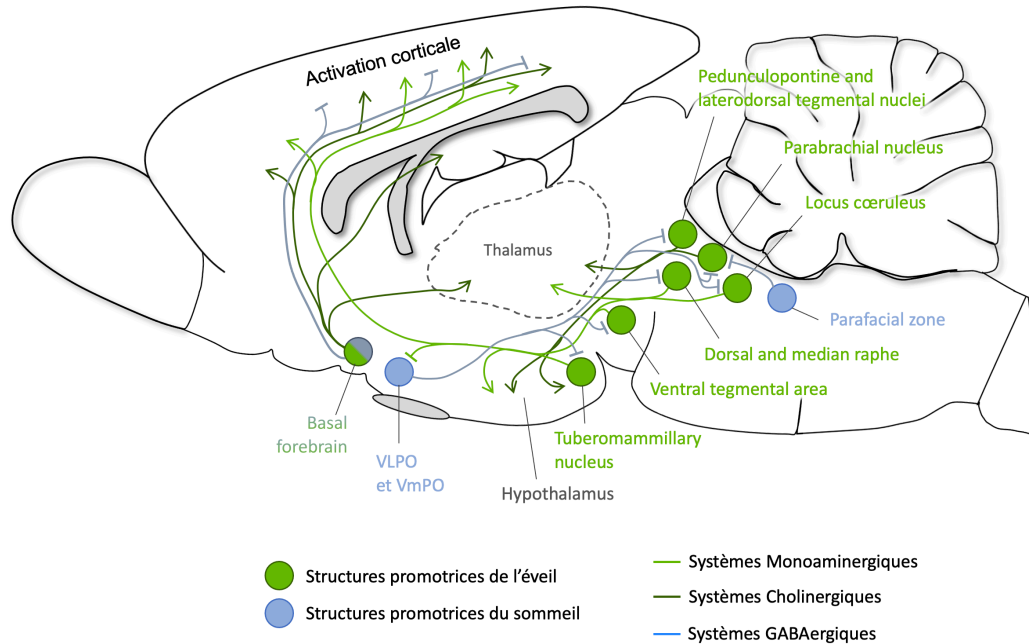


Figure 7 : Schéma illustrant les interactions réciproques entre les structures responsables de l'éveil et du sommeil lent. Pendant le SL les neurones du VLPO et de la zone parafaciale (*Parafacial Zone*, PZ ; bleu) sont actifs et inhibent les systèmes monoaminergiques et cholinergiques associés à l'éveil (vert) ainsi que le thalamus et le cortex. À l'inverse, pendant l'éveil, les neurones du VLPO sont inhibés par les systèmes associés à l'éveil, bloquant ainsi l'entrée en SL. Adapté de Scammell et al., 2017.

De plus, en 2018, il a été montré que les neurones galaninergiques du VLPO innervent également la plupart des régions du système d'éveil ascendant, notamment les neurones à orexine spécifiques de l'hypothalamus latéral, sérotoninergiques du raphé, noradrénergiques du locus cœruleus (LC), de la médulla ventrolatérale et les neurones glutamatergiques du noyau parabrachial (Kroeger et al., 2018). Réciproquement, la quasi-totalité de ces structures promotrices de l'éveil innerve les neurones du VLPO et exerce un contrôle inhibiteur (**Figure 7** ; Chou et al., 2002). Ainsi, comme le proposa le neurologue Clifford B. Saper, les neurones VLPO contenant du GABA et de la galanine contribueraient au processus de sommeil par le biais de l'extinction synaptique des centres d'éveil (Saper et al., 2001).

1.2.2.3 Diversité cellulaire et moléculaire du VLPO

Bien que le VLPO ait initialement été décrit comme un groupe de neurones actifs pendant le sommeil, de récentes études ont révélé qu'il présente une grande hétérogénéité cellulaire et contient plusieurs populations neuronales sur les plans neurochimique et fonctionnel, permettant de définir deux territoires : le VLPO étendu (*extended VLPO*) et le cœur du VLPO (**Figure 8**). Outre la galanine, d'autres peptides, y compris des peptides excitateurs, sont produits et exprimés de manière différente par les neurones du VLPO. Parmi ces peptides, on trouve la cholécystokinine (CCK), l'hormone de libération de la corticotrophine (CRH), la dynorphine A et la substance P (Gaus et al., 2002 ; Arrigoni et Fuller, 2022).

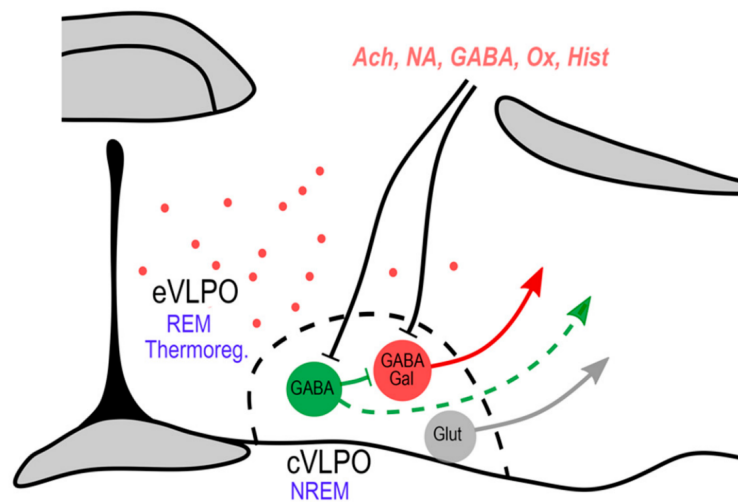


Figure 8 : Anatomie cellulaire du VLPO. Le cœur du VLPO (cVLPO) contient de nombreuses populations neuronales distinctes : (i) des neurones GABAergiques qui expriment la galanine (VLPO^{Gal}) qui sont promoteurs du sommeil lent, (ii) des neurones GABAergiques qui n'expriment pas la galanine (VLPO^{GABA}) qui pourraient diminuer l'activité des neurones VLPO^{Gal}, (iii) des neurones glutamatergiques (VLPO^{Glut}) qui pourraient promouvoir l'éveil. Il existe également un sous-ensemble de neurones galaninergiques éparpillés dans une région médiodorsale par rapport au cVLPO appelée le VLPO étendu (*extended VLPO*, eVLPO). Ces neurones sont impliqués dans les mécanismes de régulation du sommeil paradoxal et probablement dans la thermorégulation. Des afférences au cVLPO régulent l'activité des neurones promoteurs du sommeil lent VLPO^{Gal} directement et/ou indirectement via les neurones VLPO^{GABA} locaux. Ces neurones pourraient également avoir des projections en dehors du cVLPO. Adapté de Arrigoni et Fuller 2022.

Le VLPO GABAergique

L'abondante expression du transporteur vésiculaire du GABA (vGAT) dans le VLPO suggère que ce dernier contient un grand nombre de neurones libérant du GABA. Ces neurones sont répartis en au moins deux sous-groupes distincts ; le premier exprime la galanine, est actif pendant le sommeil et est inhibé par les afférences

inhibitrices provenant des structures de l'éveil (Chou et al., 2002 ; Gallopin et al., 2005 ; Alam et al., 2014 ; Sangare et al., 2016 ; Chauveau et al., 2020, **Annexe 2**). En revanche, le second groupe est, lui, dépourvu de galanine, est excité par les signaux d'éveil et pourrait inhiber les neurones promoteurs du SL et ainsi favoriser l'éveil (Liu et al., 2010 ; Liang et al., 2021). Ce dernier sous-groupe récemment découvert fait l'objet d'une attention prononcée ces dernières années.

Le VLPO galaninergique

La galanine est un neuropeptide inhibiteur qui, lors de sa libération, pourrait contribuer à l'inhibition des neurones promoteurs de l'éveil. Cette hypothèse est étayée par des résultats d'électrophysiologie montrant que les neurones du *locus caeruleus*, du TMN, du noyau du raphé dorsal et les neurones à orexine sont tous inhibés par la galanine. Or toutes ces régions sont innervées par le VLPO (Schönrock et al., 1991 ; Sherinet al., 1998 ; Xu et al., 1998 ; Goforth et al., 2014 ; Kroeger et al., 2018). Néanmoins, la proportion relative de la signalisation galaninergique par rapport à celle impliquant le GABA dans la promotion du sommeil reste incertaine.

A ce jour, la galanine est, pour de nombreuses espèces, le meilleur marqueur cellulaire connu pour identifier les neurones promoteurs du SL du VLPO (Chou et al., 2002). Chez l'homme, des études post mortem montrent une étroite corrélation entre le nombre de neurones immunoréactifs à la galanine et la quantité de sommeil chez des individus âgés, dans le noyau intermédiaire (homologue humain du VLPO ; Lim et al., 2014 ; Saper, 2021).

Au sein du VLPO, deux populations distinctes de neurones galaninergiques ont été identifiées. La première se trouve dans le cœur du VLPO (cVLPO) tandis que la seconde est en position dorsale et médiane par rapport au cVLPO, dans le VLPO étendu (*extended VLPO*, eVLPO ; **Figure 8** ; Gaus et al., 2002 ; Lu et al., 2002). Fonctionnellement, les neurones galaninergiques du cVLPO favoriseraient le sommeil lent tandis que ceux du eVLPO seraient fortement liés à la régulation du sommeil paradoxal (Lu et al., 2002). En effet, des enregistrements unitaires dans le eVLPO ont montré que de nombreux neurones sont actifs pendant les phases de sommeil paradoxal (Koyama et Hayaishi, 1994 ; Alam et al., 2014). De plus, des traçages des neurones galaninergiques du eVLPO ont montré que ces derniers innervent les noyaux pontins impliqués dans la régulation du sommeil paradoxal (Hsieh et al., 2011). Il n'existe cependant pas de marqueur connu permettant de distinguer les neurones galaninergiques du cVLPO de ceux du eVLPO, ce qui rend difficile l'étude des rôles respectifs de ces deux populations dans la régulation des états comportementaux.

Le VLPO glutamatergique

Le VLPO contient également des neurones qui libèrent du glutamate, comme l'indique l'expression du transporteur vésiculaire du glutamate 2 (Vglut2 ; Vanini et al., 2020). Il a été démontré que l'activation des neurones glutamatergiques supprime le SL, retarde la survenue du sommeil paradoxal et consolide l'état de veille pendant

environ une heure (Vanini et al., 2020). De plus, la stimulation optogénétique des neurones glutamatergiques dans la zone préoptique, comprenant le VLPO, induit des transitions rapides du NREM vers l'éveil (Chung et al., 2017). Ces résultats suggèrent que l'activation des neurones glutamatergiques du VLPO favoriserait l'éveil. Le circuit par lequel les neurones glutamatergiques du VLPO contribuent à l'éveil n'est pas encore caractérisé, bien que certaines hypothèses suggèrent que les neurones glutamatergiques pourraient favoriser l'éveil en activant des centres de l'éveil comme le TMN (Chung et al., 2017). Cette réponse d'éveil provoquée par l'activation des neurones glutamatergiques du VLPO est, chez la souris, de courte durée par rapport aux réponses évoquées par l'activation d'autres neurones favorisant l'éveil, comme ceux du noyau supramammillaire ou parabrachial médian. L'activation de ces neurones peut induire jusqu'à six heures d'éveil consécutif, même pendant une période de fort besoin de sommeil (Anaclet et al., 2015 ; Venner et al., 2016 ; Pedersen et al., 2017 ; Xu et al., 2021).

1.2.2.4 Autres processus physiologiques médiés par le VLPO

Outre son implication dans la régulation du sommeil, le VLPO participerait également à la régulation homéostatique de l'organisme, comme la thermorégulation ou encore le métabolisme énergétique.

VLPO et thermorégulation

De récents travaux ont suggéré que le VLPO pourrait contribuer au processus de thermorégulation. En effet, le VLPO contient des neurones thermosensibles ; leur excitabilité augmente en réponse à une élévation de la température locale (de plus de 3 °C ; Alam et al., 1995 ; Gong et al., 2000). Une hypothèse suggère que l'augmentation de la température lors d'un épisode de fièvre pourrait être à l'origine de la somnolence associée à cet état maladif (Saper et al., 2012).

En plus de leur rôle dans le maintien du sommeil lent, la chemoactivation sélective des neurones promoteurs du SL du VLPO produit une hypothermie prononcée (Kroeger et al., 2018), qui ressemble à la diminution rapide de la température corporelle observée au début du sommeil (**Figure 9** ; Alfoldi et al., 1990 ; Harding et al., 2019). Cette réduction de la température centrale qui se produit au début du sommeil est largement due à la vasodilatation de la peau et donc à la perte de chaleur (Harding et al., 2019). Ce processus est lié à l'inhibition des neurones thermorégulateurs dans le noyau hypothalamique dorsomédial (DMH) et du raphé pallidus (RPa ; Morrison, 2016).

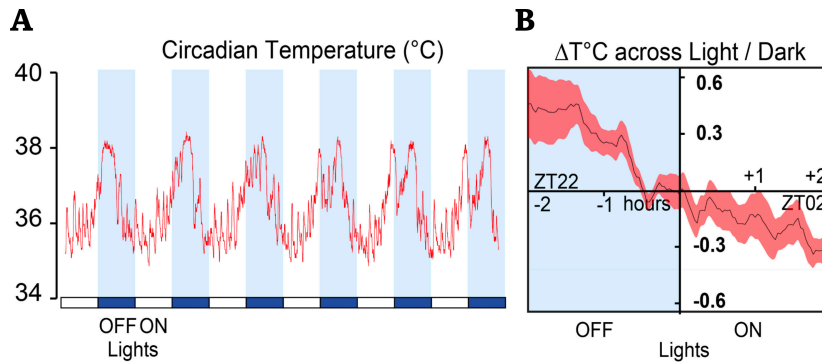


Figure 9 : Thermorégulation circadienne chez la souris. **A.** Exemple de cycle de température circadien sur 6 jours chez la souris C57Bl6/J. **B.** Transitions moyennes de température sur 16 jours consécutifs, pour un même individu, 2 h avant et après le changement de lumière. Adapté de Hardin et al. 2019.

Au sein du VLPO, le sommeil lent et l'hypothermie seraient contrôlées par deux populations de neurones galaninergiques distinctes, mais partiellement chevauchantes. Celles promotrices du SL étant principalement situées dans le cVLPO, tandis que celles induisant la perte de chaleur dans le eVLPO dorsal et médial. En effet, l'activation optogénétique des neurones galaninergiques du cVLPO favorise le sommeil, mais pas l'hypothermie (Kroeger et al., 2018), tandis que la stimulation optogénétique de neurones GABAergiques plus dorsaux, dans une zone correspondant au eVLPO, induit une hypothermie (Zhao et al., 2017). Ainsi, la coactivation de ces deux populations de neurones galaninergiques déclencherait donc à la fois le SL et l'hypothermie.

VLPO et métabolisme

L'association entre le sommeil et la satiété est établie de longue date. Le phénomène connu sous le nom de somnolence postprandiale a historiquement été lié à des changements des taux d'insuline postprandiaux ou à l'arrivée de signaux ascendants gastro-intestinaux vers le tronc cérébral. Cependant, des études récentes ont suggéré que les neurones du VLPO, actifs pendant le sommeil, seraient aussi capables de détecter directement les changements métaboliques et contribueraient au sommeil ou à la somnolence qui suit un repas riche en glucides. En effet, il a été montré que dans le VLPO, l'apport de glucose favorise le SL et augmente l'expression de cFos (Varin et al., 2015). Le mécanisme d'excitation des neurones promoteurs du SL du VLPO par le glucose serait le même que celui qui se produit dans les cellules bêta pancréatiques sensibles au glucose et dans les neurones POMC du noyau arqué (impliqué dans le contrôle de la prise alimentaire). Plus précisément, le glucose est d'abord transporté au niveau intracellulaire puis catabolisé par la glycolyse, entraînant une augmentation des taux d'ATP et induisant la fermeture des canaux K_{ATP} , qui aboutit à la dépolarisation de la membrane plasmique (Yoon et Diano, 2021). Les signaux de satiété pourraient donc favoriser le sommeil en activant les neurones

promoteurs du SL du VLPO, parallèlement à l'activation des centres de la faim et de l'hypoglycémie qui favorisent, quant à eux, l'éveil et la recherche de nourriture (Burdakov et al., 2006).

1.2.3 Le noyau préoptique médian

Le noyau préoptique médian (MnPO) est une structure de l'hypothalamus antérieur situé dans l'aire préoptique et qui joue des rôles importants dans la régulation homéostatique de l'organisme. En plus d'être impliquée dans la régulation des processus cardiovasculaires (tels que la régulation de la pression artérielle et de la composition du sang), la forte connectivité du MnPO avec d'autres régions de l'hypothalamus – comme le VLPO et le tronc cérébral – lui confère des rôles dans les comportements de veille-sommeil, mais aussi en lien avec la soif et la thermorégulation (Yoshida et al., 2009).

1.2.3.1 MnPO et régulation du sommeil

Tout comme le VLPO, le MnPO innerve abondamment les centres de l'éveil. De plus, il existe une forte interconnexion bidirectionnelle entre le MnPO et le VLPO qui activerait les réseaux neuronaux du VLPO par la levée de l'inhibition locale (Walter et al., 2019 ; **Annexe 1**). L'étude de l'activité des neurones du MnPO par des marquages c-Fos révèle que, contrairement au VLPO où les neurones sont majoritairement actifs pendant le sommeil, ceux du MnPO le sont principalement au début de la phase de sommeil (Gvilia et al., 2006 ; 2011). Ce qui suggère que le MnPO initierait le sommeil tandis que le VLPO serait plutôt impliqué dans son maintien.

Enfin, au sein du MnPO, les neurones GABAergiques seraient impliqués dans la régulation du sommeil lent. En effet, chez le chat, des micro-injections d'agoniste des récepteurs GABA dans le MnPO induisent une augmentation du temps passé en SL, sans pour autant modifier la durée du sommeil paradoxal (Benedetto et al., 2012).

1.2.3.2 MnPO et thermorégulation

Les mammifères ont un rythme circadien de température corporelle qui dépend essentiellement du noyau suprachiasmatique (SCN), siège de l'horloge interne principale. Les travaux de Guzman-Ruiz et ses collaborateurs chez le rat ont montré que la libération de vasopressine par le SCN fait diminuer la température corporelle juste avant le début de la phase lumineuse, tandis que l'*α-melanocyte stimulating hormone* induit le maintien d'une température corporelle élevée à la fin de la phase obscure. Ce contrôle de la température corporelle circadien par le SCN est en synergie avec d'autres structures comme le noyau arqué (ARC), qui fonctionne comme un senseur métabolique. Cette coordination entre les signalisations circadienne et métabolique au sein de l'hypothalamus est essentielle pour un contrôle adéquat de la température et implique de nombreuses afférences du SCN et de l'ARC vers le MnPO (Guzmán-Ruiz et al., 2015).

En plus de recevoir ces afférences, le MnPO inhibe les noyaux du raphé via une signalisation GABAergique, ce qui induit une diminution de la température corporelle. Ces projections du MnPO comportent des récepteurs aux prostaglandines (EP3) qui, lors de leur activation (notamment par la prostaglandine E_2), induisent une inhibition des neurones du MnPO et favorisent l'accroissement de la température corporelle lors d'un épisode de fièvre. Cependant, des lésions du MnPO seules n'induisent pas une hyperthermie. En revanche, si ces lésions sont combinées à des lésions d'autres noyaux hypothalamiques, notamment de l'aire préoptique dorsolatérale, une élévation de la température basale est alors observée. Il y aurait ainsi au moins deux voies inhibitrices responsables du maintien de la température corporelle et l'hyperthermie associée à un état de fièvre nécessiterait la levée de ces deux inhibitions (Yoshida et al., 2009).

1.2.3.3 MnPO et osmorégulation

La région antéroventrale du troisième ventricule où est situé le MnPO est également impliquée dans le maintien de l'homéostasie des liquides, des électrolytes et du système cardiovasculaire. Le MnPO, ainsi que d'autres noyaux hypothalamiques, répondent aux changements de la composition du sang. De plus, les mécanorécepteurs de l'aorte et d'autres vaisseaux envoient des signaux sensoriels à cette région, relayant des informations sur le volume sanguin et la pression artérielle. Les réponses aux changements de composition liquidienne médiées par le MnPO peuvent être endocriniennes, autonomes ou comportementales. Notamment, les réponses à un pic de sodium dans le sang comprennent la libération du peptide natriurétique auriculaire (PNA) et d'ocytocine. Le PNA est une hormone libérée par le cœur en réponse à une pression artérielle trop élevée ou à une forte salinité du sang et l'ocytocine est un neuropeptide sécrété par l'hypothalamus et la neurohypophyse. Associée à ces sécrétions, l'activation du MnPO entraîne la stimulation du noyau paraventriculaire, qui induit une augmentation de l'activité des voies nerveuses sympathiques rénales et une augmentation conjointe de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle moyenne (Lewellyn et al., 2012). Enfin, notons que des lésions préoptiques médianes entraînent généralement une composition du sang inappropriée, une consommation d'eau excessive et la libération du PNA (Pedrino et al., 2009).

1.2.4 La zone parafaciale

La plupart des recherches sur les circuits du sommeil NREM se sont concentrées sur l'aire préoptique et le prosencéphale basal, mais les premières études de transection ont suggéré que le tronc cérébral caudal contient également des neurones qui favorisent le sommeil NREM (Batini et al., 1958).

1.2.4.1 Localisation et fonctions

La zone parafaciale (PZ) est une structure du tronc cérébral, située dans le bulbe rachidien, qui est impliquée dans la régulation du SL et plus particulièrement dans son induction. Un groupe de neurones de la PZ a récemment été identifié comme étant actif pendant le sommeil lent. Ces neurones GABAergiques et glycinergiques

expriment la protéine c-Fos pendant le SL et des lésions spécifiques de ces cellules ou encore la perturbation de la transmission GABAergique/glycinergique dans cette région augmente l'éveil. De plus, l'activation chémogénétique de ces neurones induit rapidement l'apparition de périodes soutenues de SL associées à une importante puissance des ondes delta sur l'EEG, similaires à celles observées après une privation de sommeil. À l'inverse, l'inhibition chémogénétique de ces mêmes neurones diminue fortement le sommeil NREM, même pendant les périodes de fort besoin de sommeil, indiquant que ces neurones GABAergiques/glycinergiques de la PZ sont nécessaires au sommeil lent et pourrait le promouvoir en inhibant les régions promotrices de l'éveil (Anaclet et al., 2014).

1.2.4.2 Afférences et efférences de la PZ

La PZ reçoit principalement des afférences de l'hypothalamus, du mésencéphale et du pont et de la *medulla*. Le noyau sous-thalamique innerve également la PZ. Avec l'hypothalamus, ils ont de nombreuses fonctions, notamment dans les activités sensori-motrices, viscérales. Cependant, les fonctions du noyau sous-thalamique restent méconnues. Il serait impliqué dans la sélection des actions. Provenant du mésencéphale, la PZ reçoit des terminaisons nerveuses de la substance noire, de la *pars reticulata* et du mésencéphale profond, des structures fortement liées à l'action motrice et aux circuits de la récompense. Enfin, à partir de la protubérance dorsale et de la moelle épinière, la PZ reçoit des entrées des noyaux réticulaire et vestibulaire médian qui seraient impliqués dans l'expiration et la genèse du rythme respiratoire (Su et al., 2018).

Concernant les efférences, les neurones de la PZ projettent vers le noyau parabrachial médian (Anaclet et al., 2014), où siègent des neurones favorisant l'éveil. Trente-quatre noyaux partagent également de fortes projections réciproques avec les neurones GABAergiques de la PZ, notamment divers noyaux de la *stria terminalis*, de la zone hypothalamique latérale, de la substance noire, de la *zona incerta* et du noyau amygdaloïde central (Su et al., 2018). Ces fortes projections réciproques suggèrent un contrôle par rétroaction du sommeil lent.

1.3 Régulation homéostatique et circadienne du sommeil

Les mécanismes à l'origine des transitions entre les états comportementaux de veille et de sommeil restent partiellement incompris. Un modèle de circuit expliquant ses transitions d'état est le modèle du *flip-flop switch*, qui postule que des interactions inhibitrices réciproques interviennent entre les groupes de cellules favorisant le sommeil et ceux favorisant l'éveil (Saper et al., 2001 ; Saper et Fuller, 2017). Ce modèle est renforcé par le fait que ces groupes de cellules présentent, respectivement, des profils d'activité de sommeil et d'éveil. Plus précisément, les structures promotrices du sommeil, dont le VLPO, inhibent celles promotrices de l'éveil par la libération synaptique de GABA et de galanine. Réciproquement, les structures promotrices de l'éveil (le TMN, le *locus caeruleus* et le raphé dorsal) inhibent celles du sommeil en libérant de l'histamine, de la noradrénaline et de la sérotonine (respectivement ;

Figure 7 ; Scammell et al., 2017). Etant donné sa nature auto-renforçante – c'est-à-dire le fait que lorsque chaque côté est activé, il réduit sa propre rétroaction inhibitrice – ce commutateur à bascule est intrinsèquement stable dans l'un ou l'autre des deux états (sommeil ou éveil) tout en s'affranchissant des états intermédiaires. Par conséquent, la conception de cette bascule garantit la stabilité des états comportementaux, mais facilite également le passage relativement rapide d'un état comportemental à l'autre.

En 1982, le pharmacologue Alexander A. Borbély propose un modèle de régulation de l'éveil et du sommeil à deux composantes : un processus circadien (C) et un processus homéostatique (S ; Borbély, 1982).

1.3.1 Contrôle circadien

La première composante que nous présenterons est le processus C (contrôle circadien) qui détermine le moment de l'éveil et du sommeil. La majorité des organismes sont exposés à l'alternance jour/nuit imposée par la rotation de la Terre en vingt-quatre heures, qui s'accompagne d'oscillations de la température ambiante. Ce processus circadien dépend de l'horloge circadienne intrinsèque, un mécanisme biologique qui fournit un rythme autonome à l'état interne de l'organisme et qui est synchronisée avec les changements externes de l'environnement. Chez les mammifères, le siège de cette horloge interne se trouve dans le noyau suprachiasmatique (SCN), qui est à la fois nécessaire et suffisant pour orchestrer la temporalité des changements d'état de veille/sommeil, du métabolisme et de la physiologie de l'organisme, en lien avec les oscillations du cycle jour/nuit (Marcheva et al., 2013).

Les neurones du SCN forment un réseau intracellulaire couplé capable d'auto-entretenir des oscillations circadiennes d'activité neuronale et d'expression de gènes, même en absence de stimuli extérieurs (Welsh et al. 2010). La majorité des neurones du SCN sont GABAergiques et leurs efférences auraient des effets dépendants de l'état du réseau du SCN et de la région dans laquelle l'effet s'exerce. Ainsi, ils pourraient avoir un effet soit excitateur soit inhibiteur et promouvoir la synchronisation ou la désynchronisation neuronale (Wagner et al., 1997 ; Scammell et al., 2017). Nous ne détaillerons pas ici la boucle de rétrocontrôle transcription-traduction et post-transcriptionnelle qui permet de maintenir cet oscillateur (voir Hastings et al., 2018). Bien que cet oscillateur puisse fonctionner en totale autonomie, il intègre tout de même des stimuli extérieurs et des événements internes à l'organisme. Un des stimuli temporels externes (ou *Zeitgeber*) le plus puissant est la lumière. En effet, le SCN reçoit des signaux de la rétine via le tractus retino-hypothalamique. Ces signaux proviennent de cellules ganglionnaires rétiniennes photosensibles à mélanopsine nécessaires à cette synchronisation de l'horloge interne avec la lumière (Gooley et al., 2001 ; Berson et al., 2010).

Un autre synchronisateur temporel physiologique important est la mélatonine. Elle est sécrétée par l'épiphyse pendant la période obscure (période d'activité des

rongeurs) et sa libération est contrôlée par le SCN formant une boucle de rétrocontrôle supplémentaire de ce réseau. Elle est impliquée dans de nombreux processus physiologiques tels que la régulation de la température corporelle, l'immunité, la glycémie. En plus d'induire une somnolence, la mélatonine a un effet chronobiotique, c'est-à-dire qu'elle induit un déphasage de l'horloge interne, se traduisant par une avance ou un retard de phase en fonction du moment du cycle circadien. Ainsi la mélatonine agirait comme un signal temporel interne (Scheer et Czeisler, 2005). Enfin, les neurones du SCN projettent abondamment sur les autres noyaux hypothalamiques, notamment la zone subparaventriculaire (SPZ). Cette dernière serait un relais critique promouvant l'éveil pendant la période d'activité et le sommeil pendant la période de repos (Lu et al., 2001). De plus, des projections directes du SCN vers le VLPO et le MnPO existent et pourraient également jouer un rôle dans la régulation circadienne des états de vigilance (Saper et al., 2010).

1.3.2 Contrôle homéostatique

Le processus S (contrôle homéostatique) détermine la profondeur et la durée du sommeil en fonction de la pression de sommeil accumulée au cours de la période d'éveil précédente : plus la période d'éveil est longue, plus la pression de sommeil est importante et plus le sommeil sera long. Chez les mammifères, les oscillations lentes du SL enregistrables en EEG, et plus particulièrement la pente du signal, sont un marqueur de la pression de sommeil (Tobler et al., 1984 ; Lancel et al., 1991 ; Huber et al., 2000). Cette pression de sommeil est reflétée par des facteurs de sommeil endogènes qui s'accumulent lentement pendant l'éveil. Il s'agit de molécules dont l'administration dans l'organisme doit induire le sommeil et leur taux doit augmenter avec le temps passé éveillé (Brown et al., 2012). Les sections suivantes résumeront brièvement les connaissances actuelles des deux facteurs de sommeil les plus étudiés : l'adénosine et la prostaglandine D₂.

1.3.2.1 L'Adénosine

L'adénosine (AD) est un métabolite de la purine qui est, depuis longtemps, liée aux processus du sommeil (Porkka-Heiskanen et Kalinchuk, 2011). Elle s'accumule progressivement dans l'espace extracellulaire pendant l'éveil et pendant une privation de sommeil (Porkka-Heiskanen et al., 1997) . Cette accumulation peut conduire à l'induction du sommeil en inhibant les neurones promoteurs de l'éveil dans tout l'encéphale et/ou en désinhibant les neurones promoteurs du sommeil (Scharbarg et al., 2016). Par exemple, l'administration sous-arachnoïdienne d'agonistes de l'AD favorise le sommeil et induit l'expression de la protéine c-Fos dans les neurones du VLPO (Scammell et al. 2001). Ces effets semblent passer, au moins en partie, par l'intermédiaire des récepteurs A₁. En effet, ils désinhibent les neurones promoteurs du SL (galaninergiques) du VLPO en réduisant les *inputs* synaptiques GABAergiques sur les neurones du VLPO, favorisant, *in fine* le sommeil (Chamberlin et al., 2003).

Des études pharmacologiques chez le rat ont également montré que l'AD excitait un sous-ensemble de neurones promoteurs du sommeil du VLPO via le récepteur A_{2A}

(Gallopín et al., 2005). Enfin, chez la souris, le glucose induit une libération astrocytaire d'adénosine dans le VLPO. Cette dernière s'y accumule au cours du cycle veille-sommeil et est suffisante pour activer les neurones promoteurs du sommeil du VLPO et induire une vasodilatation locale. Ainsi, ce mécanisme pourrait constituer, lors de forts apports en glucose, une boucle d'autoactivation des neurones promoteurs du sommeil du VLPO (Scharbarg et al., 2016).

1.3.2.2 La prostaglandine D₂

Les prostaglandines (PG) sont un ensemble de composés lipidiques appartenant à la famille des eicosanoïdes. La prostaglandine D₂ (PGD₂) est la plus abondante des PG dans le SNC de rats et d'autres mammifères, y compris les humains. Elle est produite par les leptoméniges, le plexus choroïde et les oligodendrocytes et est impliquée dans l'homéostasie du sommeil. Les recherches initiales sur le rôle de la PGD₂ dans la régulation du sommeil ont été menées par Ueno et ses collaborateurs, qui ont montré que la perfusion de PGD₂ dans les ventricules latéraux ou dans l'espace sous-arachnoïdien, à la base du cerveau antérieur, pouvait induire le sommeil (Ueno et al., 1982). Des effets hypnogènes similaires de la perfusion intracérébroventriculaire (ICV) de PGD₂ ont ensuite été démontrés chez les primates (Onoe et al., 1988). Il est important de noter que les animaux soumis à un sommeil induit par la PGD₂ restent éveillables et que le spectre de puissance de l'EEG du sommeil lent est similaire à celui du sommeil naturel (Urade et Hayaishi, 2011).

Dans le liquide céphalorachidien (LCR), la concentration de PGD₂ est rythmée et présente une oscillation parallèle à celle du cycle veille-sommeil. De plus, pendant une privation de sommeil, donc lors d'une augmentation à la propension au sommeil, l'amplitude de cette oscillation augmente (Ram et al., 1997). DP₁, le principal récepteur de la PGD₂ est majoritairement exprimé dans les leptoméniges du cerveau antérieur basal, latéralement au chiasma optique. L'administration de PGD₂ dans cet espace chez le rat induit un sommeil lent soutenu, effet qui est absent chez les souris DP₁-KO (Mizoguchi et al., 2001), indiquant que cette induction du SL par la PGD₂ est médiée par les récepteurs DP₁. Cependant, chez ces souris DP₁-KO, la structure du sommeil et de l'éveil est identique à celle des souris WT, ce qui suggère que les récepteurs DP₁ ne seraient pas essentiels à la régulation basale du sommeil et de l'éveil, ou que l'absence de récepteurs chez ces souris est compensée, au cours du développement par exemple. En revanche, elles présentent un rebond de SL très atténué après une privation de sommeil, renforçant le rôle de la PGD₂ endogène dans l'homéostasie du SL (Urade et Hayaishi, 2011). De plus l'administration de PGD₂ dans l'espace sous-arachnoïdien augmente de façon marquée l'expression de c-Fos dans les neurones du VLPO (Scammell et al., 1998). Plus récemment, nous avons montré que les astrocytes du VLPO expriment le récepteur DP₁. L'application de PGD₂ dans le VLPO induit une libération massive d'adénosine par les astrocytes conduisant, via l'activation du récepteur A_{2A}, à une vasodilatation des vaisseaux et une activation des neurones promoteurs du sommeil lent du VLPO contribuant ainsi à la régulation homéostatique du sommeil (Scharbarg et al., 2023, **Annexe 3**).

1.3.3 Les fonctions du sommeil

Le sommeil est un comportement universel conservé chez de nombreuses espèces. S'il est un état d'inactivité, qui empêche l'animal de s'alimenter, de se reproduire et le rend vulnérable aux prédateurs, il devrait donc leur avoir conféré des avantages adaptatifs supérieurs aux inconvénients apparents. Parmi les nombreuses fonctions présumées du sommeil, plusieurs seront abordées dont la consolidation mnésique, la thermorégulation, le système immunitaire et la régénération cellulaire.

1.3.3.1 La consolidation mnésique

Un grand nombre d'études comportementales ont démontré que le sommeil favorise la consolidation de tous les principaux types de mémoire. En effet, à intervalle de veille de même durée, le sommeil post-apprentissage améliore les performances lors de nouveaux tests de tâches d'apprentissage (Marshall et Born, 2007 ; Robertson et al., 2004). Chez l'homme, le sommeil lent profond favorise la consolidation de la mémoire déclarative, dépendante de l'hippocampe, tandis que le sommeil paradoxal favorise la mémoire non déclarative, y compris la mémoire procédurale, perceptive et les aspects émotionnels de la mémoire (Plihal et Born, 1999 ; Smith, 2001 ; Wagner et al., 2001). Nous nous intéresserons brièvement aux mécanismes de la consolidation mnésique liés au sommeil lent profond.

Le sommeil lent profond est caractérisé par des oscillations neuronales spécifiques, dont il a été montré que nombre d'entre elles sont des mécanismes véhiculant l'effet bénéfique du sommeil sur la consolidation de la mémoire au niveau des systèmes et des réseaux, comme nous le verrons plus loin. Ces oscillations lentes représentent un mécanisme central qui sous-tend les effets du SLP. Chez l'animal, des stimulations sensorielles augmentent systématiquement l'activité à ondes lentes dans les zones corticales impliquées dans la perception de la stimulation au cours d'un épisode de SL ultérieur (Kattler et al., 1994 ; Yasuda et al., 2005). Chez l'homme, l'amplitude et la pente des oscillations lentes sont augmentées localement par les expériences d'apprentissage précédant le SLP et sont diminuées lorsque l'apprentissage est entravé par l'immobilisation du bras utilisé pour cette tâche (Huber et Born, 2014 ; Mölle et al., 2009). Ces études indiquent que le SLP est régulé de manière homéostatique par l'apprentissage et la mémorisation pendant la période d'éveil pré sommeil. Réciproquement, un rôle causal du sommeil lent profond peut être établi dans la consolidation de la mémoire. En effet, l'utilisation de stimuli acoustiques sur des sujets afin d'entraver l'activité à ondes lentes empêche l'amélioration de l'apprentissage visuomoteur et la discrimination visuelle de texture, normalement observée après un sommeil post-entraînement (Aeschbach et al., 2008 ; Landsness et al., 2009).

Deux activités EEG ont été décrites comme importantes pour ce processus de consolidation mnésique pendant le sommeil lent. Il s'agit des *spindles* thalamiques et des *sharp wave-ripples* qui sont temporellement couplés et pourraient favoriser le dialogue cortico-hippocampique, en contribuant au transfert des traces de mémoire de

l'hippocampe vers les réseaux néocorticaux de stockage à long terme. Nous ne rentrerons pas dans le détail de ces activités EEG, notons tout de même que deux hypothèses de consolidation mnésique sont proposées : celle du dialogue hippocampo-néocortical, présentée ci-dessus, et la théorie de l'homéostasie synaptique, ou recalibrage synaptique, proposée par Tononi et Cirelli (Tononi et Cirelli, 2014). Cette théorie suppose que l'apprentissage pendant la veille entraîne une augmentation généralisée de la force synaptique qui est normalisée par un processus général ayant lieu pendant le sommeil. Cette augmentation de la force synaptique finirait par réduire la sélectivité des réponses neuronales, saturer la capacité d'apprentissage et provoquer un stress cellulaire. En normalisant la force synaptique, le sommeil est alors nécessaire pour réduire son poids en éliminant les synapses faiblement potentialisées et favoriserait la consolidation de la mémoire.

1.3.3.2 Thermorégulation et métabolisme

Pendant le sommeil, le métabolisme de l'organisme est réduit en comparaison avec l'éveil. Chez les mammifères, les températures corporelle et cérébrale sont synchronisées avec le cycle circadien et sont étroitement liées aux cycles de sommeil (Harding et al., 2019 ; 2020). Par exemple, chez la souris, chaque transition de l'éveil au sommeil implique une perte de température corticale de 0,2 °C, mais augmente rapidement à chaque épisode d'éveil. Inversement, le sommeil paradoxal s'accompagne d'une élévation de 0,1 à 0,2 °C dans le SNC (Harding et al., 2020).

Les rôles que peuvent avoir ces variations circadiennes de température au cours du sommeil restent largement incompris. Ainsi, plusieurs hypothèses sont proposées, par exemple un impact sur les fonctions cellulaires, à un niveau moléculaire, qu'aurait le refroidissement de l'organisme au cours du SL. Cette hypothermie favorise l'induction de gènes comme les *Cold-Inducible RNA Binding Protein* (CIRBP), qui nécessitent des températures basses, rencontrées pendant le NREM, pour être induites. Le produit de ces gènes pourrait interagir avec les gènes d'horloge ou encore avoir un rôle neuroprotecteur (Peretti et al., 2015 ; Hoekstra et al., 2019).

A l'échelle de l'organisme, un autre rôle pourrait être lié à la conservation d'énergie. En effet, le sommeil lent pourrait permettre de diminuer la consommation d'énergie, par un ralentissement du métabolisme, et faciliterait ainsi la réallocation des ressources énergétiques (Harding et al., 2020). Par exemple, certaines fonctions du système immunitaire changent pendant le sommeil et pourraient être effectuées plus facilement grâce à ce ralentissement métabolique.

1.3.3.3 Régulation du système immunitaire

Historiquement, soignants et médecins ont suggéré que le sommeil aide à récupérer des états pathologiques. Après avoir découvert que les produits bactériens (par exemple les peptides muramyl) et les modulateurs endogènes de la réponse immunitaire (interleukine 1) améliorent le sommeil, il a été proposé que le sommeil serve aux défenses de l'organisme (Krueger et Obäl, 1993). De plus, il a été montré que le sommeil, ou le manque de sommeil affectent le système immunitaire (Imeri et Opp,

2009 ; Besedovsky et al., 2012). Par exemple, la perte de sommeil est associée à une réduction des titres d'anticorps (induits par l'immunisation antérieure) ainsi des changements dans la structure et la qualité du sommeil au cours d'épisodes infectieux (Lange et Born, 2011). Enfin, une étude chez le lapin a mis en évidence une association entre la durée des épisodes de sommeil et la rémission d'un épisode infectieux. Ainsi les animaux présentant des épisodes de sommeil plus longs présentent une réduction des taux de mortalité et des signes infectieux (Toth et al., 1993). Cette corrélation suggère que le sommeil contribue à la fonction corporelle de récupération après une maladie infectieuse.

1.3.3.4 Sommeil et régénération

Une des théories sur les fonctions du sommeil veut que celui-ci rétablisse les états physiologiques et neurologiques qui sont compromis pendant l'éveil (Hartmann, 1973). Des preuves de ce rôle réparateur du sommeil sont, depuis le début du siècle, de plus en plus nombreuses. Par exemple, des études chez le rongeur ont montré que l'éveil prolongé entraîne une augmentation de l'expression de gènes codant des protéines impliquées dans les réponses aux chocs thermiques et des chaperons moléculaires. Ce qui indique la présence d'un stress du réticulum endoplasmique et l'activation de la réponse aux protéines mal repliées (*Unfolded Protein Response*, UPR ; Terao et al., 2003 ; Naidoo et al., 2005). L'UPR vise donc à restaurer le fonctionnement normal du RE, en réduisant la traduction protéique d'une part et en augmentant l'expression de chaperons moléculaires pour aider au repliement des protéines et à la dégradation de celles mal repliées, d'autre part (Schröder et Kaufman, 2005). L'augmentation de l'expression des gènes liés au stress cellulaire reste toute de fois limitée pendant le sommeil naturel suite à une privation de sommeil (Terao et al., 2003). Ainsi l'éveil prolongé entraînerait un stress du RE qui peut être soulagé par le sommeil.

Contrairement à l'état de veille, l'expression de catégories de gènes très différentes est régulée à la hausse pendant le sommeil (Cirelli et al., 2004 ; Terao et al., 2006 ; Mackiewicz et al., 2007). Ces gènes sont notamment impliqués dans (i) les voies de biosynthèse de l'hème, du cholestérol et des lipides ; (ii) la synthèse des protéines, y compris l'activité de régulation de la traduction et la biogenèse des ribosomes ; (iii) le transport intracellulaire des macromolécules ; (iv) le maintien des *pools* de vésicules synaptiques ; (v) le fonctionnement des enzymes antioxydantes. Ces observations suggèrent que l'une des fonctions du sommeil serait de reconstituer les composants clés de la synthèse des macromolécules, tels que les protéines et les lipides utilisés et endommagés par la forte activité neuronale pendant la veille.

Enfin, pendant le sommeil, une augmentation du flux convectif du cerveau vers la circulation générale a été rapportée. Ce flux entraînerait les toxines et autres produits hors du cerveau afin de les éliminer. En effet, l'activité cellulaire accrue associée à l'éveil augmente la production de petites molécules (p. ex. H^+ , CO_2 , lactate, radicaux libres) à partir de macromolécules (comme le glycogène), augmentant ainsi la

pression osmotique et le volume cellulaire. Etant donné que le cerveau est un compartiment fermé et que l'eau est un fluide incompressible, l'activité cellulaire est donc associée à une modification importante du rapport entre le volume cellulaire et le volume de l'espace extracellulaire. De plus, des modifications locales du débit sanguin existent et entraînent des variations du volume du liquide extracellulaire. Très récemment, un système lymphatique cérébral (système glymphatique) a été décrit (Louveau et al., 2015), il pourrait constituer une voie d'élimination du liquide extracellulaire et des déchets qu'il contient. Cette dynamique des fluides cérébraux est associée à une variation du volume de l'espace interstitiel. En effet, l'équipe de M. Nedergaard a montré que le sommeil est associé à une augmentation de 60 % de l'espace interstitiel cortical, ce qui faciliterait les échanges avec le liquide céphalorachidien et donc la clairance des métabolites. Ce phénomène serait également impliqué dans l'élimination du peptide β -amyloïde (Xie et al., 2013). Ainsi le cycle veille/sommeil aurait un rôle important dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer. Cette découverte a fourni une preuve directe que le sommeil remplit une fonction réparatrice, en partie grâce à l'élimination accrue des déchets métaboliques qui s'accumulent dans le cerveau éveillé.

2 Les Astrocytes

En 1856, Rudolf Ludwig Karl Virchow est le premier à introduire le terme de glie (du grec ancien γλία, *glía* : « glu, colle ») qu'il décrit comme un tissu connectif dans lequel les éléments du système nerveux sont incrustés (Virchow, 1856). Ces cellules gliales sont retrouvées dans tous les organismes possédant un système nerveux central (SNC) et sont devenues, au cours de l'évolution, de plus en plus spécialisées. Elles se subdivisent en deux catégories : la microglie, d'origine endodermique et la macroglie, d'origine ectodermique, comprenant les astrocytes, les oligodendrocytes et les cellules NG2. Il est intéressant de constater que le ratio glie/neurones est positivement corrélé à la complexité du SNC suivant la phylogénie. Ainsi, dans *C. elegans* ce ratio est de 0,18 (Oikonomou et Shaham, 2011), tandis qu'il est de 0,4 dans le cortex du rat (Bass, 1971) et de 1 dans le cerveau humain (Azevedo et al., 2009). De plus, la comparaison de ce ratio entre les aires corticales des primates révèle une augmentation chez l'homme comparé à d'autres primates (Sherwood et al., 2006). Il serait également possible que l'augmentation du ratio soit concomitante de l'augmentation des besoins énergétiques relatifs à la taille du cerveau (Hawkins et Olszewski, 1957). Notons qu'on observe aussi au sein du cerveau humain des variations de ce ratio suivant les régions cérébrales.

Pendant longtemps, les cellules gliales ont été considérées comme un simple ciment structurel passif du cerveau. Du fait de leur non-excitabilité (elles n'émettent pas de potentiels d'action), leurs rôles dans la physiologie du cerveau sont longtemps restés largement sous-estimés. Un tournant est franchi lorsqu'une série de découvertes mirent en évidence l'expression de récepteurs au glutamate par les astrocytes (Backus et al., 1989 ; Gallo et al., 1989) ainsi que des canaux ioniques qui s'ouvrent en réponse au glutamate (Usowicz et al., 1989). Grâce à cet arsenal moléculaire, les astrocytes répondent au glutamate par des élévations de la concentration de calcium (Ca^{2+}) intracellulaire (Cornell-Bell et al., 1990) et libèrent à leur tour du glutamate qui stimule les neurones voisins (Parpura et al., 1994). Les astrocytes sont également étroitement associés aux neurones, plus particulièrement en s'associant aux synapses donnant naissance au concept de synapses tripartites (Voltera et al., 2003). Ces observations ont conduit à une explosion des recherches depuis deux décennies sur les cellules gliales et en particulier sur les astrocytes, reconnus maintenant comme des partenaires indispensables et actifs des neurones impliqués dans de nombreuses fonctions et pathologies cérébrales (voir Kettenmann et Ransom, 2013).

2.1 Propriétés des astrocytes

2.1.1 Hétérogénéité et critères d'identifications

Les astrocytes constituent une population cellulaire diverse et hétérogène composée de nombreux sous-types (**Figure 10**) qui diffèrent tous plus ou moins dans leur morphologie, leur physiologie, leur expression génétique et leurs fonctions.

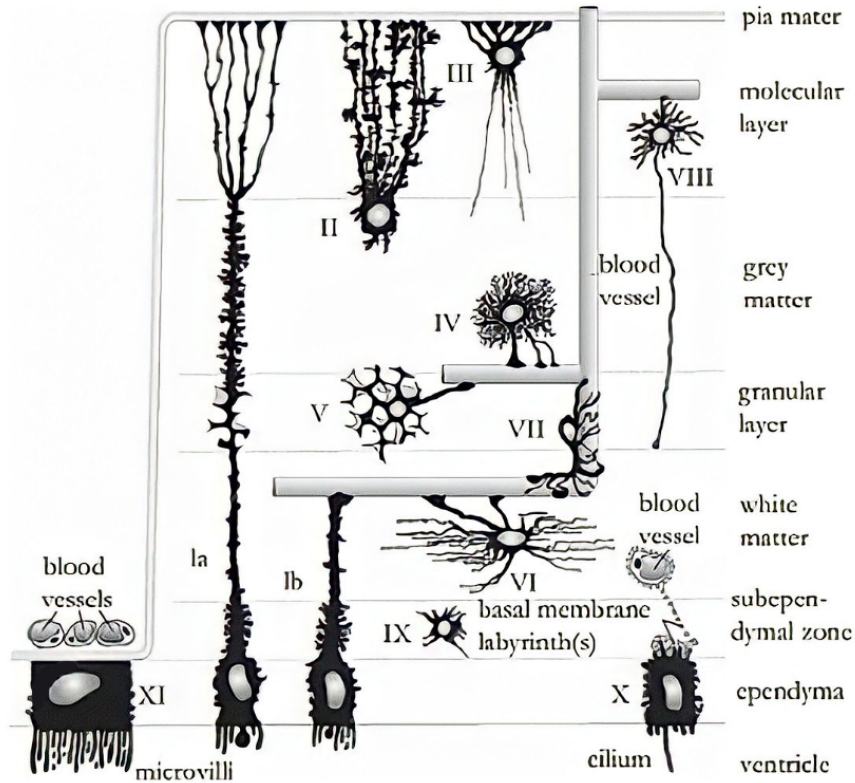


Figure 10 : Différents sous-types d'astrocytes : (Ia) tanocytes de la pie, (Ib) tanocytes vasculaires, (II) astrocyte radial (glie de Bergmann), (III) astrocyte marginal, (IV) astrocyte protoplasmique, (V) astrocyte velu, (VI) astrocyte fibreux, (VII) astrocyte périvasculaire, (VIII) astrocyte interlaminaire, (IX) astrocyte immature, (X) épendymocyte, (XI) cellules du plexus choroïde. Reproduit de Kettenmann et Ransom, 2013.

Néanmoins, de nombreuses cellules astrogliales se conforment à la plupart des critères suivants : (i) être électriquement non excitable ; (ii) avoir une membrane fortement hyperpolarisée (-75 à -90 mV) ; (iii) exprimer des transporteurs fonctionnels du glutamate et de l'acide γ -aminobutyrique (GABA) ; (iv) contenir des granules de glycogène ; (v) posséder des terminaisons périvasculaires et/ou des prolongements périssynaptiques ; (vi) exprimer abondamment des protéines des jonctions communicantes (Kimelberg, 2010).

2.1.2 Morphologie et domaines astrocytaires

Les études morphologiques des astrocytes ont longtemps reposé sur le marquage de la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP), un composant du cytosquelette des astrocytes. Cependant, le marquage de la GFAP ne représente qu'environ 15 % du volume astrocytaire (**Figure 11 A** ; Bushong et al., 2002). De nouvelles techniques

telles que l'injection d'un marqueur fluorescent (Ogata et Kosaka, 2002) ou encore l'utilisation de modèles murins génétiquement modifiés (Nolte et al., 2001) ont permis de mieux visualiser et caractériser la morphologie des astrocytes (**Figure 11 B**). Il a ainsi pu être mis en évidence qu'un astrocyte murin avait un volume moyen de 20·000 à 80·000 μm^3 , qu'il pouvait entourer 300 à 600 dendrites et contacter environ 100·000 synapses. Un astrocyte humain peut, quant à lui, contacter 2 millions de synapses (Bushong et al., 2002 ; Oberheim et al., 2006 ; Halassa et al., 2007).

Lors du développement postnatal, les astrocytes immatures étendent, pendant les premières semaines, de longs prolongements qui se superposent. Un élagage des prolongements a ensuite lieu, créant des domaines non chevauchants. Chez les rongeurs, ce processus de maturation prend 3 à 4 semaines (**Figure 11 C** ; Bushong et al., 2002 ; Ogata et Kosaka, 2002). L'organisation des domaines astrocytaires est dépendante de l'environnement. En effet, les prolongements astrocytaires interagissent avec les vaisseaux sanguins d'une part et avec les terminaisons pré et postsynaptiques d'autre part, donnant respectivement naissance aux concepts d'unité gliovasculaire et de synapse tripartite (Voltera et al., 2003). Les astrocytes murins peuvent être principalement divisés en deux catégories : les astrocytes protoplasmiques (**Figure 10 IV**) qui présentent de nombreuses et courtes ramifications et les astrocytes fibreux (**Figure 10 VI**), qui ont moins de ramifications, mais celles-ci sont longues et lisses. Les astrocytes protoplasmiques sont présents dans la matière grise du SNC et présentent un petit soma d'environ 10 μm de diamètre, 5 à 10 prolongements primaires de 50 μm puis de nombreux petits prolongements (Bushong et al., 2002). Même au sein de cette catégorie, leur morphologie peut varier. Suivant les régions cérébrales, la densité de ces astrocytes peut varier de 10·000 à 30·000 par mm^3 . Ils étendent des prolongements qui vont contacter les vaisseaux sanguins, les synapses et la surface de la pie (Reichenbach et al., 2010). Les astrocytes fibreux sont, quant à eux, présents dans la matière blanche et sont organisés linéairement entre les axones. Ils présentent des prolongements d'une centaine de micromètres qui suivent l'orientation des axones et ne forment pas de domaines restreints, mais ont des prolongements superposés qui contactent les vaisseaux sanguins, la pie et les terminaisons axonales (Lundgaard et al., 2014). Enfin, d'autres types d'astrocytes ont été décrits en fonction des régions cérébrales, telles que les pituicytes au sein de la neurohypophyse, les tancytes dans l'hypothalamus, les cellules de Muller dans la rétine ou encore les cellules de Bergmann au sein du cervelet (Verkhatsky et Nedergaard, 2018).

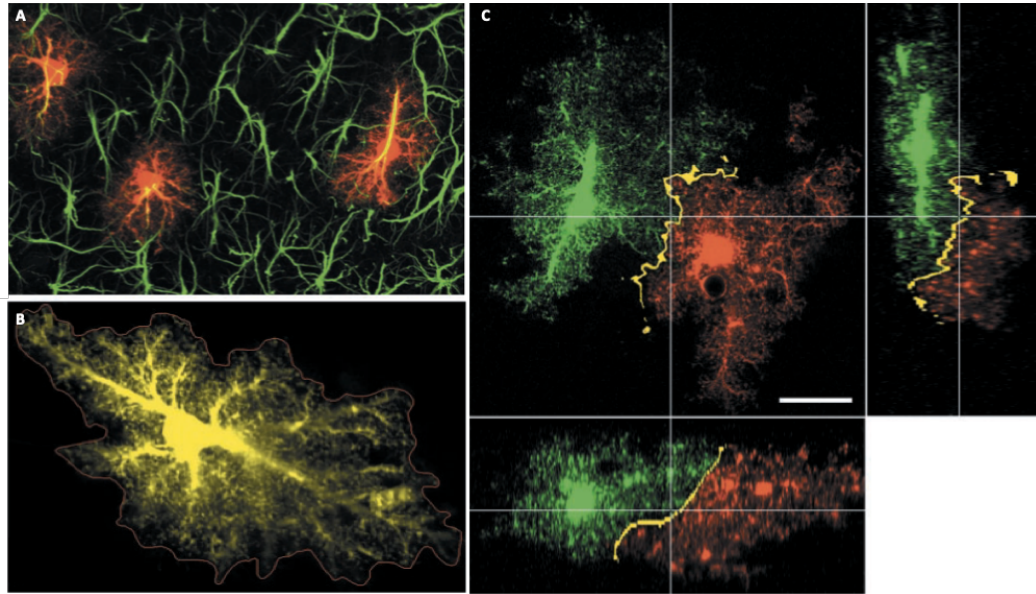


Figure 11 : Morphologie et domaines astrocytaires. **A.** L'injection d'un marqueur au sein des astrocytes (rouge) démontre la faible couverture du marquage GFAP (vert) par rapport à la taille totale des astrocytes. **B.** Morphologie d'un astrocyte protoplasmique du stratum radiatum de CA1. **C.** La région d'interaction entre deux astrocytes (jaune) indique que les domaines astrocytaires sont non chevauchants. Adapté de Bushong et al., 2002.

2.1.3 Propriétés membranaires, canaux ioniques, récepteurs et transporteurs

Les astrocytes n'émettent pas de potentiel d'action (Orkand et al., 1966), cependant, ils expriment des canaux ioniques, des récepteurs et des transporteurs qui leur permettent de détecter et d'intégrer les signaux neuronaux. Par exemple, les nombreux canaux ioniques qu'ils expriment leur permettent de conduire les courants au niveau de leur membrane plasmique, les rendant électriquement actifs. Une des principales caractéristiques des astrocytes est une conductance potassique (K^+) passive élevée à l'origine de l'hyperpolarisation de leur membrane (-80 mV). Malgré l'expression de nombreux canaux *voltage-dependents* de type sodique et calcique, leur densité reste trop faible pour concurrencer la conductance K^+ (Verkhratsky et Steinhäuser, 2000).

Les astrocytes expriment également différents types de récepteurs à diverses molécules telles que les neurotransmetteurs, les acides aminés, les neuropeptides, les métabolites, sécrétés par les cellules voisines. Le schéma d'expression de ces récepteurs dépend de l'environnement local de l'astrocyte (Verkhratsky et Nedergaard, 2018). Par exemple seuls les astrocytes exprimant des récepteurs glycinergiques sont présents dans la moëlle épinière où la glycine est le principal neurotransmetteur inhibiteur (Kirchhoff et al., 1996). De manière générale, de nombreux astrocytes expriment des récepteurs ionotropiques (AMPA, NMDA, $GABA_{A/B}$) et métabotropiques

(mGlu) leur permettant d'être sensibles à la transmission synaptique (Spampinato et al., 2018 ; Skowrońska et al., 2019 ; Ceprian et Fulton, 2019). Cependant la distribution et la combinaison des sous-unités de ces récepteurs varient en fonction des régions cérébrales.

Les astrocytes possèdent une grande variété de transporteurs qui sont impliqués dans la recapture, le recyclage et la libération de neurotransmetteurs au niveau pérисynaptique et extrasynaptique et qui attestent de leur rôle prépondérant dans la régulation de l'homéostasie extracellulaire. Ils expriment des transporteurs du glutamate EAAT1 (GLAST-1) et EAAT2 (GLT1) en fonction de la région considérée (Rauen et al., 1996 ; Vandenberg et Ryan, 2013) et des transporteurs GAT3 (Minelli et al., 1996) et GlyT1 (Zafra et al., 1995) leur permettant de recapter les neurotransmetteurs inhibiteurs qui sont particulièrement enrichis au niveau des prolongements pérисynaptiques (Vandenberg et Ryan, 2013). Enfin, les astrocytes expriment également des transporteurs actifs primaires potassiques, sodiques et calciques participant à la régulation de l'homéostasie de ces ions (Capuani et al., 2016) ainsi que des transporteurs à la D-sérine, à l'adénosine, au glucose et aux monomamines (King et al., 2006 ; Jha et Morrison, 2018).

2.1.4 Signalisation astrocytaire

2.1.4.1 Signalisation calcique

Les stimulations mécaniques et chimiques sur des cultures d'astrocytes primaires ont permis de mettre en évidence des changements de concentration intracellulaire de calcium ayant conduit à la découverte de la signalisation calcique astrocytaire (Enkvist et al., 1989 ; Kim et al., 1994). La signalisation et l'homéostasie calcique sont entretenues par des flux calciques coordonnés par des canaux ioniques, des pompes et des transporteurs qui permettent de réguler la concentration intracellulaire de calcium. Les récentes avancées dans le domaine de l'imagerie calcique ont permis de mettre en évidence une organisation spatiotemporelle du calcium très variable au sein de l'astrocyte. Ainsi, il a été montré que la concentration calcique basale est plus élevée dans les astrocytes que dans les neurones. De plus, au sein des astrocytes elle est plus importante dans les prolongements que dans le soma et dépend du stade de développement de l'astrocyte (Zheng et al., 2015).

L'activation des récepteurs astrocytaires induit une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium, cependant le mécanisme liant l'activité neuronale à la signalisation calcique astrocytaire reste sujet à débats. Initialement, il a été proposé que le glutamate libéré au niveau de la fente synaptique activerait les récepteurs mGluR5 astrocytaires et induirait une élévation de la concentration intracellulaire de calcium, créant des vagues calciques (Dani et al., 1992 ; Porter et McCarthy, 1996). Plus récemment, l'implication des récepteurs mGluR2 et mGluR3 a été proposée dans l'augmentation calcique localisée au niveau des prolongements astrocytaires (Haustein et al., 2014). L'étude précise de ces signaux intrinsèques par des techniques comme l'imagerie biphotonique ont permis de mettre en évidence des

fluctuations de la concentration calcique différentes en fonction de la localisation subcellulaire. Ainsi, les fluctuations somatiques sont moins fréquentes que celles au niveau des prolongements (Wang et al., 2006). Cette compartimentalisation permettrait une régulation fine et locale d'un groupe de synapses ou de vaisseaux sanguins.

De manière générale, les augmentations intracellulaires de calcium proviennent de la libération du stock de calcium du réticulum endoplasmique suite à l'activation de récepteurs membranaires couplés aux protéines G. Cette activation induit une cascade de signalisation impliquant la phospholipase C et le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. Il a été montré que l'étendue et l'intensité de la réponse calcique dépendraient de l'activité neuronale (Panatier et al., 2011). Cependant, bien que la signalisation calcique semble corrélée à l'activité neuronale, la temporalité des signaux calciques et électriques neuronaux est très différente. En effet, alors qu'un événement post-synaptique a une durée de quelques millisecondes, un événement calcique dure quelques secondes. De même, il existe un délai entre la réponse neuronale à un stimulus et l'apparition d'un événement calcique au niveau de l'astrocyte (Schummers et al., 2008). Ces différences temporelles posent la question de l'implication réelle de la signalisation calcique dans l'intégration et le traitement de l'information neuronale. Cependant, plusieurs études ont pu mettre en évidence des réponses calciques plus courtes indiquant que les astrocytes peuvent jouer un rôle dans la modulation de l'activité synaptique (Winship et al., 2007 ; Lind et al., 2013 ; Lind et al., 2018).

Enfin, il a été montré que ces signaux peuvent se propager en vagues calciques au sein du réseau astrocytaire suite à un stimulus, renforçant ainsi le poids et l'importance de la signalisation calcique astrocytaire (Cornell-Bell et al., 1990 ; Dani et al., 1992). Le mécanisme de propagation de ces vagues reste incertain, cependant il semblerait que les connexines et pannexines y jouent un rôle essentiel (Scemes et Giaume, 2006).

2.1.4.2 Sécrétion de gliotransmetteurs

Les astrocytes peuvent sécréter de nombreuses molécules dont des neurotransmetteurs et des neuromodulateurs tels que le glutamate, l'ATP, la D-sérine, le GABA, le *tumor necrosis factor- α* (TNF- α), des prostaglandines et d'autres peptides décrits sous le terme de « gliotransmetteurs » (Bezzi et Volterra, 2001). La gliotransmission est décrite comme un « transfert actif d'informations de la glie vers les neurones » (Savtchouk et Volterra, 2018). Cependant, les mécanismes impliqués dans la gliotransmission restent sujets à controverses.

De nombreuses études ont rapporté que la libération de gliotransmetteurs se fait via l'exocytose de vésicules (Bezzi et al., 2004 ; Jourdain et al., 2007 ; Martineau et al., 2013) et lysosomes (Jaiswal et al., 2007 ; Zhang et al., 2008) dépendante du calcium. En effet, les astrocytes possèdent toute la machinerie moléculaire nécessaire à l'exocytose dont les protéines du complexe SNARE (*proteins of the soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor* ; Montana et al., 2006 ;

Parpura et Verkhratsky, 2012), ainsi que les pompes vésiculaires et les transporteurs telle que la V-ATPase, responsable de l'acidification du compartiment intracellulaire nécessaire au fonctionnement des transporteurs vésiculaires de neurotransmetteurs comme les transporteurs vésiculaires du glutamate (VGLUT) 1-3 et des nucléotides (VNUT ; Sawada et al., 2008 ; Sreedharan et al., 2010). De plus, des études de l'ultrastructure des astrocytes ont révélé la présence de vésicules de 30 à 1·000 nm de diamètre (Parpura et Zorec, 2010) ainsi que la localisation de vésicules d'une trentaine de nanomètres de diamètre au voisinage direct des terminaisons synaptiques (Jourdain et al., 2007). D'autres modes d'exocytose astrogliale non dépendants du calcium ont été décrits, faisant intervenir l'inversion de polarité de transporteurs de neurotransmetteurs ou encore l'ouverture d'hémicanaux (connexines, pannexines). Cependant, les conditions physiologiques et/ou pathologiques dans lesquelles ces différents mécanismes se produisent restent méconnues.

2.2 Fonctions des astrocytes

2.2.1 Homéostasie ionique et aqueuse extracellulaire

L'homéostasie ionique est un élément essentiel au bon fonctionnement du système nerveux central. Les concentrations ioniques cérébrales sont dynamiques et soumises à des fluctuations qui sont essentielles au bon fonctionnement de l'ensemble des processus cérébraux tels que la mémorisation ou encore le sommeil. De par les nombreux canaux ioniques qu'ils expriment, les astrocytes jouent un rôle fondamental dans la régulation de cette homéostasie ionique.

2.2.1.1 Homéostasie potassique extracellulaire

L'activité neuronale s'accompagne d'un influx de Na^+ et de Cl^- et d'un efflux de K^+ induisant des variations de concentration extracellulaires de ces ions et du volume de l'espace extracellulaire (Syková et al., 2008). La concentration basale extracellulaire en ion potassium ($[\text{K}^+]_e$) étant basse (2,7 à 3,5 mM ; Somjen, 2002), l'augmentation extracellulaire de K^+ , consécutive à l'activité neuronale, est importante, mais est rapidement diminuée par les astrocytes voisins via deux mécanismes principaux et complémentaires : la capture locale de K^+ et son tamponnage spatial (Verkhratsky et Butt, 2013). La capture locale de K^+ est principalement médiée par les pompes Na^+/K^+ et les cotransporteurs $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ astrocytaires. Le tamponnage spatial a initialement été proposé par Orkand et Walz (Orkand et al., 1980 ; Walz et Hertz, 1982). Il est basé sur des canaux hautement perméables au K^+ ($\text{K}_{ir}4.1$) et les jonctions communicantes, qui connectent chaque astrocyte à ses voisins en formant vaste un réseau astrocytaire (Olsen et Sontheimer, 2008). La capture locale de K^+ crée donc un gradient électrochimique dans le réseau astrocytaire et le K^+ est alors dispersé le long de ce gradient, du site initial d'activité neuronale aux astrocytes distants. Enfin, les canaux $\text{K}_{ir}4.1$ permettent la libération du K^+ du réseau astroglial vers l'espace extracellulaire à distance du site de capture (**Figure 12**).

2.2.1.2 Homéostasie du volume de l'espace extracellulaire

Les astrocytes expriment l'aquaporine 4 (AQP4), un canal perméable à l'eau qui médie les échanges d'eau entre le sang et le parenchyme. Ces AQP4 sont colocalisées avec les canaux $K_{ir}4.1$ au niveau des pieds astrocytaires (Wolburg et al., 2011), qui forment des surfaces de contact et d'échange entre les vaisseaux sanguins et les astrocytes. L'AQP4 et $K_{ir}4.1$ sont fonctionnellement couplés dans les mouvements d'eau et de K^+ (Amiry-Moghaddam et Ottersen, 2003). Comme décrit précédemment, l'activité synaptique entraîne la libération de composés tels que le glutamate et le K^+ qui sont captés par les astrocytes via des transporteurs spécifiques. Or, il a été montré que l'activité synaptique induisait également un rétrécissement rapide de l'espace extracellulaire (Dietzel et al., 1980 ; Syková et al., 2008). Ce phénomène est dû à la libération des solutés lors de l'activité synaptique qui sont alors cotransportés avec l'eau, induisant un gonflement des prolongements astrocytaires et une diminution du volume de l'espace extracellulaire (Nagelhus et al., 2004 ; Haj-Yasein et al., 2012). Cette diminution du volume de l'espace extracellulaire augmente la concentration locale en neurotransmetteurs et a donc un impact significatif sur la neurotransmission.

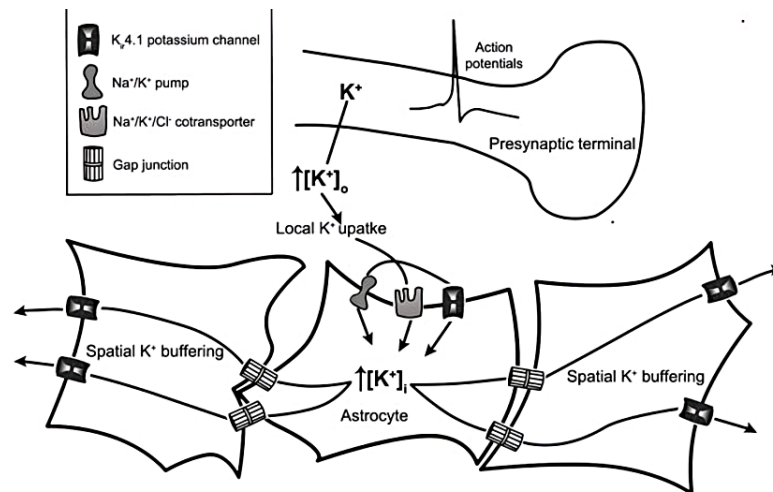


Figure 12 : Contrôle de l'homéostasie du potassium extracellulaire par les astrocytes.

La genèse de potentiels d'action dans les neurones entraîne une augmentation extracellulaire de potassium. Le K^+ extracellulaire est localement capté par chaque astrocyte via les pompes Na^+/K^+ et les cotransporteurs $Na^+/K^+/Cl^-$. Le K^+ intracellulaire diffuse alors au sein du réseau astrocytaire via les jonctions communicantes et est relargué dans l'espace extracellulaire à distance du site où il a été capté. Adapté de Verkhratsky et Butt, 2013.

2.2.2 Homéostasie et synthèse des neurotransmetteurs

Dans leur équipement moléculaire, les astrocytes possèdent des transporteurs et des enzymes de biosynthèse pour les principaux neurotransmetteurs, notamment le glutamate et le GABA, faisant d'eux des acteurs essentiels de l'homéostasie des neurotransmetteurs.

Le glutamate un est des principaux neurotransmetteurs du SNC. Il est libéré par le bouton présynaptique, induisant une importante augmentation de sa concentration dans la fente synaptique. Le glutamate étant neurotoxique lorsqu'il est en excès, doit être rapidement éliminé de la fente synaptique. Il est ainsi capté par les astrocytes via les transporteurs du glutamate où il est converti en glutamine par la glutamine synthétase et est renvoyé aux neurones. L'entrée de glutamate dans les astrocytes est associée à une entrée de Na^+ via les transporteurs des acides aminés excitateurs (EAAT) qui induit un efflux de glutamine et une coordination entre les deux flux (Uwechue et al., 2012 ; Todd et al., 2017). Au sein des neurones excitateurs, la glutamine est ensuite à nouveau convertie en glutamate par la glutaminase, libérant de l'ammoniac qui est renvoyé aux astrocytes pour y être détoxifié (**Figure 13** ; Bak et al., 2006). Les astrocytes peuvent également synthétiser *de novo* le glutamate à partir du glucose via l' α -cétoglutarate produit par l'enzyme pyruvate carboxylase (Yu et al., 1982 ; Schousboe et al., 2014).

Les astrocytes participent également à l'élimination du GABA par l'intermédiaire des transporteurs GAT-1 et GAT-3, ces derniers étant principalement exprimés par les astrocytes (Melone et al., 2014). Tout comme le glutamate, le GABA est capté par les astrocytes au niveau des synapses où il est métabolisé en succinate, puis en α -cétoglutarate et enfin, en glutamate, via les mêmes étapes que pour la synthèse de novo de glutamate. Le glutamate est alors envoyé à l'élément présynaptique inhibiteur où il est converti en GABA par la glutamate décarboxylase (Schousboe et Waagepetersen, 2007).

2.2.3 Astrocytes et transmission synaptique

Au sein du SNC, les synapses sont entourées par des prolongements astrocytaires terminaux qui sont enrichis en canaux ioniques et transporteurs (synapse tripartite). Ils expriment spécifiquement la glutamate synthétase, des ezrines et la radixine, qui interagissent avec l'actine et participent à la plasticité morphologique des astrocytes (Derouiche et Frotscher, 2001 ; Lavialle et al., 2011), contribuant ainsi à la plasticité synaptique (Heller et Rusakov, 2015). Cette organisation confère à l'astrocyte un rôle important dans la transmission synaptique et repose sur une communication bidirectionnelle rapide (Savtchouk et Volterra, 2018) entre les neurones et les astrocytes, via l'activation des nombreux récepteurs astrocytaires par les neurotransmetteurs. L'activation de ces récepteurs induit la genèse de signaux calciques qui aboutissent à la libération de substances neuroactives (**Figure 14 A** ; Araque et al., 1999). Plus récemment, le concept de synapse multipartite a été décrit et introduit

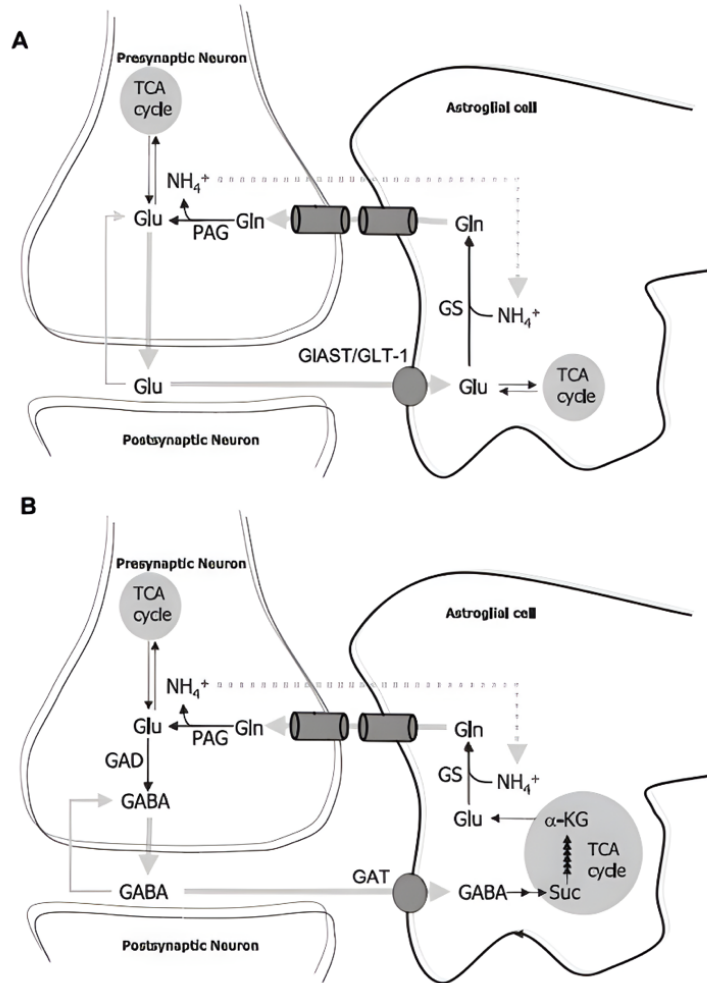


Figure 13 : Cycle neuro-astrocytaire du glutamate et du GABA. A. Le glutamate (Glu) est principalement recapté au niveau de la synapse glutamatergique par les astrocytes où il est converti en glutamine par la glutamine synthétase (GS). La glutamine (Gln) est ensuite envoyée à l'élément présynaptique via des transporteurs où elle est reconvertie en glutamate et ammoniac par la glutaminase (PAG). L'ammoniac est, quant à lui, renvoyé aux astrocytes pour y être détoxifié. Le glutamate peut également être produit de novo dans l'astrocyte comme dans l'élément présynaptique excitateur par le cycle des acides carboxyliques (TCA). **B.** Aux synapses GABAergiques, le GABA libéré par l'élément présynaptique inhibiteur est recapté par les astrocytes et par l'élément présynaptique. Au sein de l'astrocyte, le GABA est métabolisé en succinate, puis en α -ketoglutarate et enfin en glutamate. Le glutamate est alors envoyé à l'élément présynaptique inhibiteur où il est converti en GABA par la glutamate décarboxylase (GAD). Adapté de Bak et al., 2006.

les prolongements microgliaux et la matrice extracellulaire présente au niveau de la fente synaptique (**Figure 14 B** ; Verkhratsky et Nedergaard, 2014).

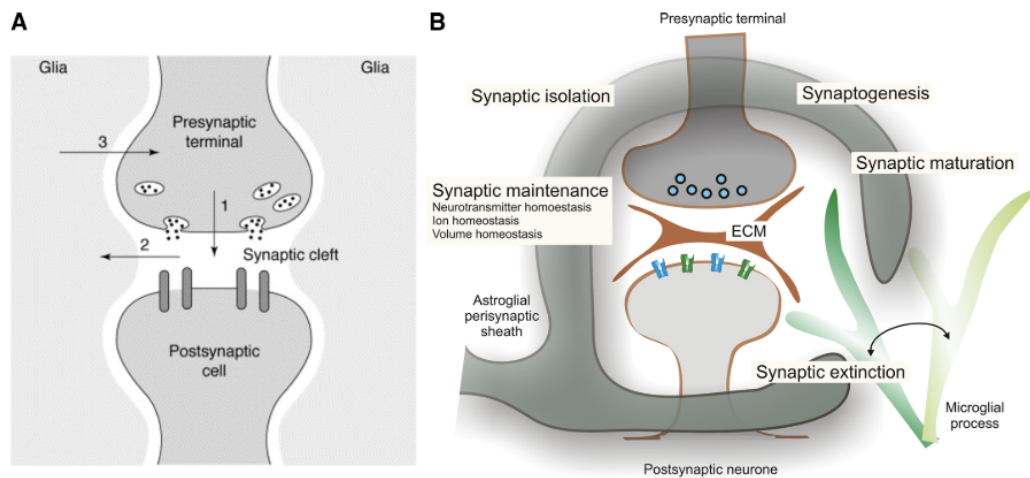


Figure 14 : La synapse tri et multipartite. A. La synapse tripartite comportant les éléments pré et postsynaptiques et les prolongements astrocytaires, tous les trois en étroit contact. **B.** La synapse multipartite inclut la contribution de la matrice extracellulaire et de la microglie. Adapté de Verkhratsky et Nedergaard, 2018.

2.2.3.1 Effets des gliotransmetteurs sur la transmission synaptique

Les astrocytes peuvent libérer différentes molécules telles que de l'ATP et des neurotransmetteurs, cependant cette libération par les astrocytes est plus lente et diffuse que la libération neuronale. De nombreux scientifiques se sont alors intéressés aux rôles de ces gliotransmetteurs et à leurs effets sur l'activité neuronale. Les études ont montré que les réponses neuronales à la libération de neurotransmetteurs sont très variées.

Le glutamate astrocytaire peut, par exemple, potentialiser la transmission excitatrice en activant les récepteurs NMDA présynaptiques (Kang et al. 1998 ; Santello et al., 2012). Dans certaines synapses de l'hippocampe, le glutamate astrocytaire potentialise la libération de neurotransmetteurs suite à l'activation des récepteurs métabotropiques au glutamate de façon indépendante de l'activation des récepteurs NMDA (Perea et Araque, 2007 ; Navarrete et al., 2012). Lorsque le glutamate est libéré pendant une activité neuronale importante, il tend à potentialiser la transmission synaptique inhibitrice en se liant aux récepteurs kainate présynaptique (Kang et al., 1998 ; Liu et al., 2004). De manière générale, au sein du SNC, la libération astrocytaire de glutamate induit des courants entrants au sein des neurones (Sarantis et al., 1988 ; Fellin et Carmignoto, 2004 ; Xu et al., 2007 ; Chen et al., 2012). De plus, bien que très controversée, la libération de glutamate par les astrocytes participerait à la régulation de la potentialisation et de la dépression synaptique à long terme (LTP et LTD ; Navarrete et Araque, 2010 ; Han et al., 2012 ; Min et al., 2012), ainsi qu'à la libération d'ATP (Pascual et al., 2005a ; Lee et al., 2013). En effet, certaines études montrent que l'inhibition de l'induction de la LTP par le blocage

du Ca^{2+} astrocytaire intracellulaire peut être annulée par l'application extracellulaire de D-serine ou de glycine (Henneberger et al., 2010), tandis que d'autres études mettent en évidence l'absence d'effet du blocage des flux calciques réticulaires des astrocytes sur la LTP (Agulhon et al., 2010). Une des hypothèses qui pourrait expliquer ces résultats à première vue contradictoires serait que les mécanismes d'induction de la LTP impliqueraient des sources de calcium différentes.

De l'ATP peut aussi être libérée par les astrocytes suite à l'activation des récepteurs GABA_B astrocytaires. En effet, l'activité répétitive des neurones excitateurs de l'hippocampe active les interneurons inhibiteurs qui libèrent du GABA qui agit alors sur les récepteurs GABA_B exprimés par les astrocytes. L'ATP libérée est dégradée en adénosine dans l'espace extracellulaire et cette dernière se fixe alors sur les récepteurs A_1 présynaptiques des synapses excitatrices voisines, inhibant la libération de neurotransmetteurs par ces synapses (Pascual et al., 2005 ; Serrano et al., 2006). Ou encore, dans le VLPO, l'adénosine peut être sécrétée par les astrocytes et induit une dépolarisation des neurones promoteurs du sommeil via l'activation du récepteur A_{2A} (Gallopín et al., 2005 ; Scharbarg et al., 2016).

Enfin, les astrocytes possèdent des compartiments intracellulaires et des vésicules de recyclages pouvant être impliqués dans la communication neurone-glie. En effet, le BDNF qui est sécrété de manière active par les neurones (Conner et al., 1997 ; Dieni et al., 2012) est rapidement internalisé par les astrocytes via une endocytose dépendante du récepteur au BDNF $p75^{\text{NTR}}$ (voir § 3.3.2, p. 97). Après son internalisation, ce dernier peut alors suivre un processus de recyclage et être sécrété ultérieurement par les astrocytes (Bergami et al., 2008). Un mécanisme similaire implique également un autre récepteur au BDNF, le récepteur kinase B de la tropomyosine (TrkB ; voir 3.3.1.2 , p. 95).

La libération de gliotransmetteurs par les astrocytes joue donc un rôle important dans la régulation de nombreux événements synaptiques allant de la transmission à la plasticité synaptique. Cependant, le manque de spécificité des méthodes utilisées pour stimuler ou supprimer la libération de gliotransmetteurs par les astrocytes a été soulevé (Hamilton et Attwell, 2010 ; Nedergaard et Verkhratsky, 2012). En effet, d'une part les méthodes visant à stimuler la libération de gliotransmetteurs peuvent induire la libération simultanée de neurotransmetteurs par les neurones voisins, d'autre part, les manipulations visant à supprimer la libération de gliotransmetteurs ne peuvent empêcher des effets secondaires sur d'autres voies de signalisation, par lesquelles les astrocytes peuvent également influencer l'activité neuronale.

2.2.3.2 Régulation de l'excitabilité neuronale

L'excitabilité neuronale dépend de l'activité des canaux ioniques Ca^{2+} , K^+ , Na^+ et Cl^- *voltage-dépendent* exprimés par les neurones. Cette excitabilité est définie par les changements auxquels sont soumis les neurones pendant le passage de l'état de repos à la décharge de potentiels d'action (Rutecki, 1992). Il est aujourd'hui bien établi que les astrocytes participent à la régulation de l'excitabilité neuronale. En effet,

comme présenté précédemment, lorsqu'un neurone émet un potentiel d'action, une importante quantité de potassium est libérée dans le milieu extracellulaire et est immédiatement recapturée par les astrocytes pour éviter l'hyperexcitabilité. Le K^+ est ensuite redistribué au sein du réseau astrocytaire avant d'être libéré par les canaux $K_{ir}4.1$ et les jonctions communicantes (Bellot-Saez et al., 2017), à distance du site d'émission du potentiel d'action (**Figure 12**). Ainsi, le blocage de ces canaux $K_{ir}4.1$ induit une augmentation du potassium extracellulaire, qui augmente l'excitabilité neuronale et favorise l'apparition de crises d'épilepsie (Steinhäuser et al., 2016). De même, chez les souris déficientes en protéines constituant les jonctions communicantes, une augmentation de la concentration extracellulaire en K^+ est observée et donc une forte excitabilité neuronale (Pannasch et al., 2011). Ce mode de régulation dépend de la couverture astrocytaire des synapses qui subit des variations contrôlées par les conditions physiologiques. Par exemple, dans l'hypothalamus, les prolongements astrocytaires se rétractent pendant la lactation ou la déshydratation, réduisant significativement la couverture astrogliale des neurones magnocellulaires (Theodosis et al., 2008). Cette plasticité des prolongements astrocytaires entraîne des modifications du volume de l'espace extracellulaire ainsi que des positions des transporteurs exprimés par les astrocytes par rapport à la fente synaptique, ce qui affecte le déversement ou la clairance des neurotransmetteurs et finalement la transmission synaptique.

2.2.4 Couplage neurovasculaire

En plus de contacter les synapses, les astrocytes réalisent de nombreux contacts avec les vaisseaux sanguins, allant même jusqu'à les envelopper complètement (Mathiisen et al., 2010). Un répertoire moléculaire spécifique à cette interface gliovasculaire est exprimé par les astrocytes, permettant ainsi l'homéostasie périvasculaire, la régulation de la contractilité vasculaire et le contrôle de l'intégrité de la barrière hématoencéphalique (BHE).

L'unité gliovasculaire est constituée d'une superposition de cellules endothéliales créant une barrière physique autour des vaisseaux, le tout étant entouré d'une lame basale constituée de matrice extracellulaire et recouverte par les prolongements astrocytaires périvasculaires. Les astrocytes sont des partenaires importants de la BHE. En effet, il a été montré que l'intégrité de la BHE dépend de la présence d'astrocytes (Janzer et Raff, 1987 ; Tao-Cheng et al., 1987). De plus, ils sécrètent de nombreux facteurs participant à l'élaboration de la BHE tels que le $TGF\beta$ (*transforming growth factor* β), ou encore le GDNF (*glia-derived neurotrophic factor*). Les astrocytes sont, de par leur liaison avec les cellules endothéliales, responsables de l'induction de la formation de jonctions serrées et modulent ainsi la perméabilité de la barrière (**Figure 15** ; Almutairi et al., 2016). Les astrocytes possèdent une polarisation de leur répertoire moléculaire. Ainsi, au niveau de leurs prolongements impliqués dans la formation de la BHE, ils expriment abondamment l'AQP4 et $K_{ir}4.1$. Donc, après la capture des ions K^+ à la synapse, leur redistribution dans le réseau astrocytaire permet leur libération au niveau périvasculaire (Kofuji et Newman, 2004).

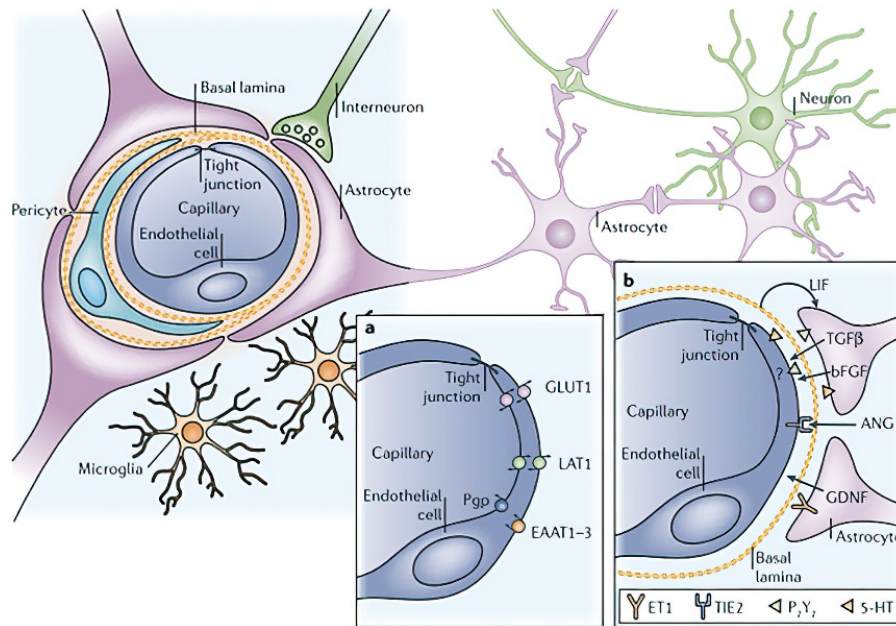


Figure 15 : Schéma représentant les constituants de l'unité gliovasculaire. La BHE est formée par les cellules endothéliales des capillaires sanguins, entourées de la lame basale et des extrémités périvasculaires des astrocytes. **a.** Caractéristiques des cellules endothéliales. Elles expriment un certain nombre de transporteurs et de récepteurs (EAAT1-3, transporteurs d'acides aminés excités ; GLUT1, transporteur 1 du glucose ; LAT1, transporteur L pour les grands acides aminés ; Pgp, glycoprotéine P). **b.** Exemple d'interaction bidirectionnelle astroglie-endothéliale nécessaire au maintien de la BHE (5-HT, 5-hydroxytryptamine [sérotonine] ; ANG1, angiopoïétine 1 ; bFGF, *basic fibroblast growth factor* ; ET1, endothéline 1 ; GDNF, *glial cell line-derived neurotrophic factor* ; LIF, *leukaemia inhibitory factor* ; P2Y2, Récepteur purinergique ; TGF- β , *transforming growth factor- β* ; TIE2, *endothelium-specific receptor tyrosine kinase*). D'après Abbott et al., 2006.

2.2.5 Métabolisme énergétique cérébral

Le SNC a d'importants besoins énergétiques. En effet, bien que le cerveau ne représente que 2 % de la masse du corps, il utilise 20 % du dioxygène total et 25 % du glucose (Weber et Barros, 2015). Le cerveau possède donc un dense réseau vasculaire afin de répondre à cette importante demande. La majeure partie de l'énergie consommée est consacrée à la transmission glutamatergique qui, à elle seule, représenterait environ 80 % de l'énergie dépensée dans la matière grise (Sibson et al., 1998 ; Hyder et al., 2006). Le SNC tire son énergie de l'oxydation du glucose, c'est pourquoi l'augmentation de l'activité neuronale est couplée à une augmentation du glucose utilisé (Bélangier et al., 2011). En plus du glucose, les cellules du cerveau utilisent plusieurs autres substrats énergétiques comme le lactate, le pyruvate ou encore la glutamine (Zielke et al., 2009). Les astrocytes ont un rôle central dans l'approvisionnement en glucose : leurs prolongements périvasculaires peuvent mesurer l'activité

neuronale tandis qu'au niveau des pieds périvasculaires, ils possèdent des transporteurs du glucose GLUT1 (Kacem et al., 1998) qui l'acheminent depuis la circulation sanguine (Bélanger et al., 2011), faisant des astrocytes le principal conduit des substrats énergétiques vers les neurones. L'activité neuronale élevant le taux de neurotransmetteurs libérés dans l'espace extracellulaire, ces derniers sont recaptés par les astrocytes augmentant ainsi la concentration intracellulaire de Na^+ . Cet influx de Na^+ induit l'activation des pompes Na^+/K^+ -ATPases qui accroissent la consommation d'ATP dans les astrocytes et donc la glycolyse et la capture du glucose depuis la circulation sanguine.

En outre, les astrocytes sont les seules cellules cérébrales capables de synthétiser le glycogène, qui est la plus grande réserve énergétique du cerveau (Magistretti et al., 1993 ; Brown, 2004). Le lactate également représente une source énergétique importante pour les neurones (Bouzier-Sore et al., 2006) et une part importante du glucose entrant dans la glycolyse est transformé en lactate au sein des astrocytes et est ensuite transmis aux neurones via des transporteurs astrocyte-neurone du lactate (**Figure 16**). Ce modèle ne s'applique pas à la transmission GABAergique. En effet des preuves expérimentales (Chatton et al., 2003) et une étude de modélisation (Ochipinti et al., 2010) ont montré que l'absorption du GABA par les astrocytes ne serait pas couplée à l'utilisation du glucose.

Les astrocytes participent également à la régulation du débit sanguin via le contrôle de la vasodilatation et de la vasoconstriction en réponse à l'activité neuronale, phénomène nommé couplage vasculaire. En effet, les astrocytes produisent de l'acide arachidonique en réponse à une stimulation glutamatergique, qui est ensuite converti par le cytochrome P450 en acide 20-hydroxyéicosatétraénoïque (20-HEHE), un puissant vasoconstricteur. De plus, la stimulation glutamatergique et l'augmentation de calcium astrocytaire peuvent induire une vasodilatation via la libération de prostaglandine E2 (PGE2) (MacVicar et Newman, 2015).

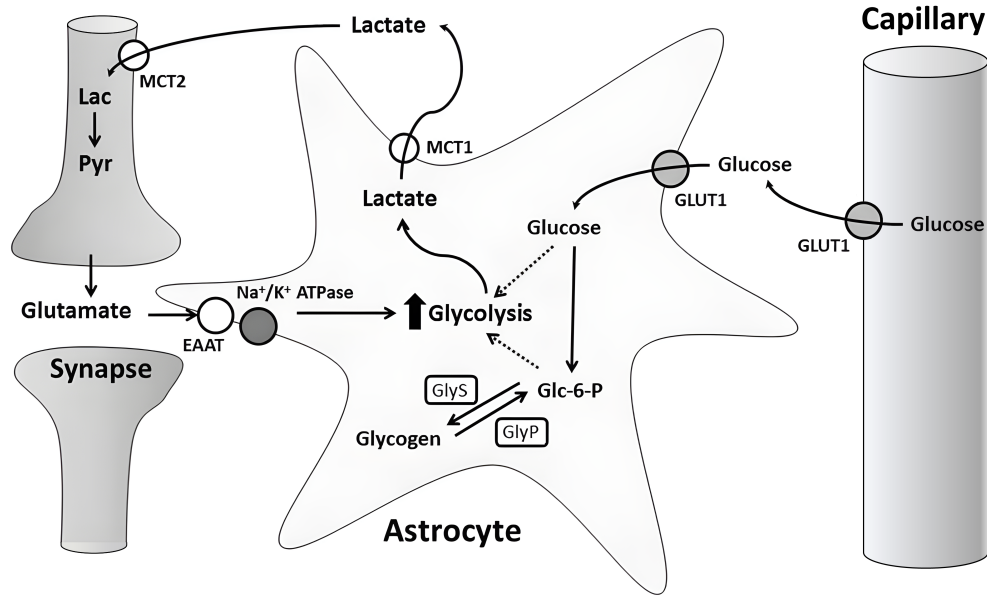


Figure 16 : Hypothèse de la navette lactate astrocyte-neurone. Le glucose est capté par les astrocytes via les transporteurs GLUT1 et converti en glucose-6-phosphate (Glc-6-P). Le Glc-6-P est converti en glycogène par la glycogène synthétase (GlyS) et stocké. En cas de forte demande énergétique, la glycogénolyse médiée par la glycogène phosphorylase (GlyP) convertie le glycogène en Glc-6-P qui est ensuite pris comme substrat par la glycolyse. L'activité synaptique induit l'augmentation locale de la concentration en glutamate dans le milieu extracellulaire qui est capté par les astrocytes via les transporteurs des acides aminés excitateurs (EAAT) induisant une augmentation de Na^+ dans l'astrocyte. Cette augmentation de Na^+ active les pompes Na^+/K^+ -ATPases qui consomment de l'ATP induisant la production de lactate via la glycolyse. Le lactate (Lac) est alors envoyé aux neurones via les transporteurs MCT1 et 2 puis converti en pyruvate (Pyr) dans les neurones qui sera utilisé par les neurones comme substrat énergétique. Adapté de Stobart et Anderson, 2013.

2.3 Fonctions des astrocytes liées au sommeil

Le rôle des astrocytes dans le sommeil a été suggéré il y a plusieurs décennies, mais les preuves directes de cette implication ne se sont accumulées qu'au cours de la dernière décennie.

2.3.1 Sécrétion de substances hypnogènes

Les astrocytes sécrètent *in vitro* de nombreuses molécules qui, lorsqu'elles sont introduites *in vivo*, augmentent la durée ou l'intensité du sommeil. Parmi ces molécules, on trouve des facteurs immunitaires et des cytokines (l'interleukine-1 [IL-1], le *tumor necrosis factor* α [TNF α], etc), des neurotrophines (par exemple le *Brain-Derived Neurotrophic Factor* [BDNF]), des prostaglandines (telle que la PGD2) ou encore des purines (l'adénosine). Ces substances sont libérées par les astrocytes en réponse à des signaux neuronaux tels que la libération de neurotransmetteurs ou de

purines via des récepteurs exprimés à la membrane plasmique astrocytaires (Tobler et al. 1984 ; Kofuji et Araque 2021).

2.3.1.1 ATP et adénosine

L'adénosine est considérée comme le principal médiateur de l'homéostasie du sommeil (Greene et al., 2017). En effet, elle possède des effets hypnotiques et son accumulation est positivement corrélée à l'accroissement de la pression de sommeil. Les astrocytes peuvent sécréter de l'ATP qui est ensuite hydrolysée dans l'espace extracellulaire (Pascual et al., 2005 ; Halassa et al., 2009). Cette sécrétion d'ATP serait active, car nécessitant la formation d'un complexe protéique *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment Proteins REceptor* (SNARE) entre les vésicules d'exocytose et la membrane plasmique de façon similaire à la transmission synaptique neuronale (Kofuji et Araque, 2021). Chez des souris mutantes exprimant un dominant négatif du complexe SNARE dans les astrocytes (dnSNARE), la privation de sommeil a des effets atténués sur la durée de sommeil et la durée des épisodes de sommeil lent et de sommeil paradoxal en comparaison avec des souris contrôles qui, elles, présentent une augmentation des durées de sommeil et d'épisode de sommeil lent profond. Cet effet semble médié par une diminution de l'activation des récepteurs A1 à l'adénosine, car l'ajout d'un antagoniste de ces récepteurs chez les souris contrôles conduit au même phénotype que les mutants dnSNARE après une privation de sommeil (Halassa et al., 2009). Plusieurs autres études ont montré que les variations du taux d'adénosine cérébrale induites par la privation de sommeil ou l'inflammation (qui augmente la quantité de sommeil) sont dépendantes de la gliotransmission (Schmitt et al. 2012 ; Nadjar et al. 2013).

Ce rôle de la gliotransmission dans les changements homéostatiques du sommeil a été renforcé par plusieurs études optogénétiques chez la souris. En effet, il a été montré que l'activation optogénétique des astrocytes, dans des régions impliquées dans la régulation du cycle veille-sommeil, induit une augmentation de la durée de sommeil pendant la période d'activité (Pelluru et al., 2016 ; Kim et al., 2020). De plus, ces activations optogénétiques des astrocytes induisent une augmentation des taux d'ATP dans le VLPO tandis que les taux des autres gliotransmetteurs restent inchangés. Or, pendant le sommeil physiologique, les taux d'ATP et d'adénosine du VLPO augmentent et l'inhibition pharmacologique de l'enzyme responsable de l'hydrolyse extracellulaire de l'ATP en adénosine réduit le temps de sommeil (Kim et al., 2020). Enfin, au sein du VLPO, l'augmentation du glucose induit la libération d'adénosine par les astrocytes qui s'accumule de manière dépendante au cycle circadien. L'adénosine induirait alors une vasodilatation des vaisseaux sanguins ainsi qu'une dépolarisation des neurones promoteurs du sommeil via l'activation des récepteurs à l'adénosine de type 2A (A_{2A}). Ce mécanisme impliquant les récepteurs A_{2A} pourrait également participer à l'homéostasie du sommeil (Scharbarg et al., 2016).

Dans les mécanismes précédemment décrits, l'ATP peut être libérée de plusieurs manières. Par exocytose, qui implique la formation de complexe SNARE permettant

aux vésicules d'exocytose de fusionner avec les membranes. Ou également via des mécanismes de sécrétion non vésiculaires, mettant en œuvre les hémicanaux et les récepteurs purinergiques. Les astrocytes peuvent, par exemple, augmenter la concentration d'adénosine extracellulaire par le biais d'une modification de son transport par les transporteurs de nucléosides (*Equilibrative Nucleoside Transporter*, ENT). Ce phénomène est médié par l'adénosine kinase (AdK) qui diminue la concentration astrocytaire d'adénosine modifiant son gradient et induisant son entrée passive du milieu extracellulaire vers le cytosol (Greene et al., 2017). Ceci conduit à une diminution de l'activation des récepteurs A₁ nécessaires à l'homéostasie du sommeil. En effet, la délétion conditionnelle d'AdK dans les astrocytes induit une augmentation des activités à ondes lentes pendant le sommeil lent profond en conditions basales ou après privation de sommeil. De plus, l'introduction d'adénosine en excès modifie également la durée des oscillations lentes du sommeil lent profond confirmant le rôle de l'AdK dans l'homéostasie du sommeil (Bjorness et al., 2016). La sécrétion d'ATP par les astrocytes implique également, dans le VLPO, les récepteurs P2X₇ et les hémicanaux (Choi et al., 2022).

2.3.1.2 Autres gliotransmetteurs

Outre l'ATP et l'adénosine, les astrocytes libèrent d'autres molécules dont le *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF), la D-sérine, les cytokines IL-1 β et TNF- α , la PGD₂ et le NO (Bezzi et Volterra, 2001), qui influencent également le sommeil. Cependant, on ne sait pas si toutes ces molécules sont libérées de façon physiologique par les astrocytes en lien avec l'homéostasie du sommeil.

Sur des tranches corticales, il a été montré que les astrocytes libèrent du BDNF suite à l'activité neuronale (Bergami et al., 2008) qui participe ensuite aux mécanismes de plasticité synaptique (Gómez-Palacio-Schjetnan et Escobar, 2013). La stimulation des vibrisses chez le rongeur éveillé, quant à elle, induit une augmentation de l'expression d'IL-1 β par les astrocytes (Hallett et al., 2010). De plus, il a été démontré que le TNF- α provenant d'astrocytes en culture et de tranche de cerveaux est impliqué dans la plasticité synaptique (Beattie et al. 2002 ; Becker et al. 2013). Or, comme le propose la théorie de l'homéostasie synaptique, une des fonctions du sommeil lent serait de réduire la force synaptique qui est augmentée pendant l'éveil. Ainsi, il est donc possible que ces molécules libérées par les astrocytes puissent réguler indirectement l'homéostasie du sommeil via une modulation de la force synaptique pendant l'éveil.

2.3.2 Modulation des oscillations lentes et du sommeil

Dans le cortex, les oscillations lentes notamment enregistrées pendant le sommeil lent profond résultent, soit d'oscillations lentes synchronisées, soit d'états hauts et bas synchronisés des neurones pyramidaux. Afin de déterminer l'implication des astrocytes dans la régulation de ces processus, deux expériences ont principalement été effectuées. Tout d'abord, des enregistrements *in vivo* en configuration cellule entière des neurones pyramidaux ont été effectués sur des souris mutantes dnSNARE. Ces

enregistrements ont montré une diminution de l'activité des récepteurs NMDA qui a pour conséquence, à l'échelle corticale, une réduction de la puissance des ondes lentes (Fellin et al., 2009). Ensuite, la seconde expérience montre que lorsque les astrocytes sont optogénétiquement activés *in vivo* et que l'activité associée des neurones est enregistrée, ces enregistrements révèlent une transition vers un schéma d'oscillations lentes (Poskanzer et Yuste, 2016). De plus, lorsque les astrocytes de certaines régions impliqués dans la régulation des états de vigilance sont optogénétiquement activés, le temps passé endormi pendant la période d'activité des animaux est accru (Pelluru et al., 2016).

Enfin, plus spécifiquement, l'implication des astrocytes du VLPO dans la régulation du sommeil a pu être mise en évidence. En effet, l'activation optogénétique d'astrocytes du VLPO induit l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire et, pendant la phase obscure, augmente significativement la durée du sommeil lent et du sommeil paradoxal associé à une diminution du temps de latence avant l'endormissement (Kim et al., 2020). Le mécanisme sous-jacent impliquerait la sécrétion active d'ATP par les astrocytes du VLPO. En effet, l'activation optogénétique des astrocytes induit la libération d'ATP via les hémicanaux et le récepteur P2X_7 . Une fois libérée dans l'espace extracellulaire, l'ATP est hydrolysée en adénosine par les TNAP (*Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase*) exprimées par les interneurons inhibiteurs du VLPO. Cette dernière induit, localement, l'inhibition de ces interneurons induisant une diminution de la libération de GABA au voisinage des neurones promoteurs du sommeil du VLPO et donc leur désinhibition (Choi et al., 2022).

Finalement, l'ensemble de ces résultats a permis de mettre en évidence un rôle supposé des astrocytes dans la modulation l'homéostasie du sommeil, notamment en régulant les oscillations lentes.

2.3.3 Activité des astrocytes pendant le sommeil

L'activité des astrocytes pendant le sommeil est, depuis plusieurs décennies, sujet à de nombreuses suppositions, car contrairement aux neurones, les astrocytes ne sont pas électriquement excitables, donc leur activité ne peut pas être mesurée avec les outils traditionnellement utilisés pour les neurones (notamment les enregistrements électrophysiologiques). Jusque récemment, l'étude de l'activité des astrocytes se basait sur des mesures *ex vivo* ou *in vitro* de changements morphologiques, d'expression génique ou encore protéique. Ce n'est que depuis quelques années que l'activité astrocytaire a pu être directement étudiée via le développement de techniques d'enregistrement des signaux calciques *in vivo* et *ex vivo* comme la microscopie biphotonique, permettant alors l'étude des activités astrocytaires au cours du cycle veille-sommeil.

2.3.3.1 Changements de l'activité calcique au cours du cycle veille/sommeil

Il est maintenant bien établi, au travers de travaux de plusieurs équipes indépendantes, que l'activité des astrocytes varie au cours du cycle veille-sommeil. En effet,

dans le cortex frontal (Ingiosi et al., 2020), le cortex somato-sensoriel (Bojarskaite et al., 2020), le cortex visuel primaire (Vaidyanathan et al., 2021), l'hippocampe et le cervelet (Tsunematsu et al., 2021), l'activité calcique intracellulaire astrocytaire est maximale pendant l'éveil. Ce qui n'est cependant pas le cas dans l'hypothalamus et le tronc cérébral (Tsunematsu et al., 2021). Des pics d'activité astrocytaire ont également été rapportés pendant la transition entre le sommeil paradoxal et l'éveil, cependant les mécanismes gouvernant ces modifications de l'activité astrocytaire restent méconnus, mais pourraient refléter des changements généraux dans les concentrations en neuromodulateurs en lien avec le cycle veille-sommeil.

Des analyses des signaux calciques astrocytaires au niveau cellulaire montrent que la fréquence et l'amplitude des événements calciques sont compartimentalisées dans la cellule : elle est plus fréquente dans les prolongements qu'au niveau du soma. De plus, des analyses de la complexité spatiotemporelle des événements calciques astrocytaires au sein de chaque cellule ont montré que la durée de chaque événement calcique est plus longue pendant l'éveil par rapport au sommeil, tandis que leur étendue spatiale est plus variable en fonction des différents états de vigilance. Les paramètres spatiotemporels de ces événements sont également dépendants de leur proximité au soma et de leur propagation dans la cellule (Bojarskaite et al., 2020 ; Ingiosi et al., 2020 ; Tsunematsu et al., 2021).

Enfin, il est intéressant de noter que les changements calciques observés au cours du cycle veille-sommeil dans les astrocytes ne semblent pas être une réponse passive à l'activité neuronale. En effet, il a été montré que l'activité synchronisée des astrocytes corticaux est maximale pendant l'éveil (Ingiosi et al., 2020) tandis que les neurones corticaux présentent, eux, un pic de synchronisation pendant les oscillations lentes du sommeil lent profond (Steriade, 2000 ; Vyazovskiy et al., 2009). De plus, les changements de fréquence des événements calciques astrocytaires peuvent précéder les changements de fréquences EEG (Bojarskaite et al., 2020 ; Vaidyanathan et al., 2021). Ainsi, les astrocytes ne sont pas toujours synchronisés avec l'activité neuronale et peuvent même anticiper ou conduire ces changements.

2.3.3.2 Calcium astrocytaire et homéostasie du sommeil

Précédemment, nous avons vu que les astrocytes peuvent être source d'adénosine, qui influence l'homéostasie du sommeil chez les mammifères (voir § 2.3.1.1, p. 75). Cependant, la question des mécanismes de régulation de ce processus en fonction du besoin de sommeil reste en suspens. L'hypothèse d'un rétrocontrôle neurones-astrocytes propose que les astrocytes détectent les signaux neuronaux libérés pendant l'éveil, les intègrent par le biais de changements de variations de calcium intracellulaire et, via une rétroaction négative, atténuent les signaux d'éveil, entraînant une augmentation des activités à ondes lentes du sommeil lent profond (Frank et al., 2013).

Or, l'imagerie calcique dans le cortex frontal de souris a permis de montrer que les concentrations de calcium astrocytaires sont plus élevées pendant la première moitié de la phase de sommeil (fort besoin en sommeil) et encore plus après une privation de sommeil. Elle diminue ensuite jusqu'à leur plus bas niveau à la fin de la période de repos ou après le sommeil de récupération post-privation. Notons que ces changements sont plus prononcés pendant le sommeil lent profond et corrélés aux maxima et minima des oscillations lentes. La privation de sommeil entraîne également des changements des transitoires calciques caractérisés par une diminution de la synchronicité des astrocytes corticaux et des changements dans la durée et la taille des événements calciques au sein de chaque astrocyte (Ingiosi et al., 2020).

2.3.4 Changements transcriptionnels et structurels circadiens

Au cours du cycle veille/sommeil de nombreux changements surviennent au sein du SNC et les astrocytes ne dérogent pas à la règle. En effet, il a récemment été montré que les astrocytes présentent des variations transcriptionnelles et structurelles au cours du cycle veille/sommeil. La technique de purification par affinité des ribosomes en cours de traduction (TRAP), qui permet de déterminer sélectivement les ARN en cours de traduction, a été appliquée aux astrocytes pendant différents états de vigilance. De manière générale, 1,4 % des transcrits de l'astrocyte dépend de l'état de vigilance (Bellesi et al., 2015). Parmi ces transcrits, beaucoup sont surexprimés pendant l'éveil (spontané comme forcé) et sont relatifs au cytosquelette et à l'extension des prolongements astrocytaires. Parmi ces transcrits figure le gène *GJB6* qui code les sous-unités de la connexine 30 (Cx30), une protéine impliquée dans la formation de jonctions communicantes et dans la plasticité morphologique des astrocytes (Pannasch et al., 2014).

De plus, les travaux de l'équipe de M. Hasting ont mis en évidence que les astrocytes du SCN possèdent leur propre boucle de rétroaction négative de transcription-traduction constituant une horloge moléculaire circadienne astrocytaire. De plus, cette horloge astrocytaire seule est suffisante pour orchestrer les oscillations circadiennes au sein du SCN ainsi que les comportements circadiens chez la souris (Brancazio et al., 2019)

Enfin, la microscopie électronique à balayage en bloc sérié a révélé que quelques heures de privation de sommeil sont suffisantes pour provoquer, au niveau cortical, l'extension des prolongements astrocytaires au plus près de la fente synaptique (Bellesi et al., 2015).

2.4 Connexines astrocytaires

Les astrocytes forment un vaste *continuum*. Ils sont connectés et échangent de petites molécules à travers des jonctions communicantes (JC), formées par des protéines appelées connexines (Cx ; Sofroniew et Vinters, 2010 ; Escartin et Rouach, 2013).

2.4.1 Présentation générale des connexines

Les connexines forment une large famille multigénique de protéines qui diffèrent par leur masse moléculaire (de 26 à 62 kDa) ; leur nom est donné en accord avec leur masse moléculaire. La structure topologique des Cx est commune et constituée de quatre domaines transmembranaires, de deux boucles extracellulaires et d'une boucle intracellulaire. Les domaines C et N terminaux sont localisés du côté du cytosol (Giaume et al., 2013). Les Cx s'assemblent de manière à former des hétéro- ou des homohexamères, qui forment alors un canal transmembranaire appelé connexon. Les connexons sont essentiels à l'intégration des cellules dans un réseau connecté et l'apposition de deux connexons, appartenant chacun à une cellule différente, forme une jonction communicante (JC ; Dermietzel et al., 1990 ; Sáez et al., 2003). Quand les connexons ne sont pas en regard avec un autre connexon, ils forment des hémicanaux (**Figure 17** ; Esseltine et Laird, 2016). Les JC peuvent être formées par des connexons identiques – formant alors des canaux homotypiques – ou par des connexons différents, formant des canaux hétérotypiques. Enfin, les JC peuvent connecter deux cellules de même type, on parle de jonction communicante homocellulaire, ou de type différent (JC hétérocellulaire).

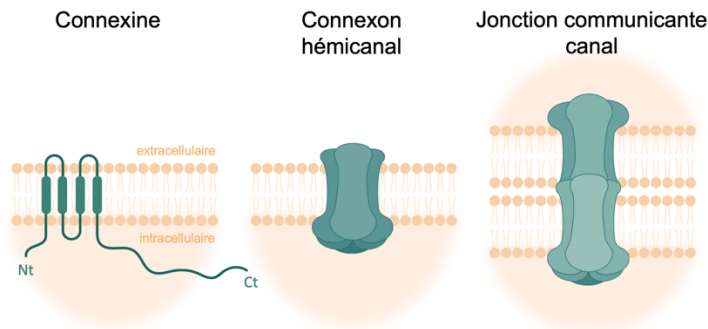


Figure 17 : Disposition spatiale des connexines. Schéma illustrant la structure topologique d'une connexine, l'hexamérisation formant un connexon et l'apposition de deux connexons de deux cellules adjacentes formant une jonction communicante.

Les connexines sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique et sont ensuite transportées dans l'appareil de Golgi où elles subissent des modifications post-traductionnelles (Lampe et Lau, 2004). Elles sont ensuite adressées à la membrane plasmique le long des filaments d'actine et de tubuline (Shaw et al., 2007). Le renouvellement des Cx à la membrane est rapide, elles n'ont, en effet, qu'une demi-vie de quelques heures (Falk et al., 2009). Leur dégradation implique leur internalisation dans des vésicules à double membrane appelées connexosomes (Kjenseth et al., 2010).

Le cerveau murin exprime abondamment onze connexines (Rouach et al., 2002 ; Nagy et al., 2004). Certaines Cx sont spécifiques à certains types cellulaires. Par exemple, les astrocytes expriment exclusivement les connexines 26, 30 et 43 (Giaume et al., 1991 ; Nagy et al., 2001) ; la Cx43 étant la plus abondante (Nagy et al., 2004). Bien que la Cx43 soit exprimée de manière ubiquitaire dans l'ensemble du SNC, l'expression de la Cx30 est variable selon les régions. Elle est plus abondante dans le thalamus, les méninges, l'hippocampe et le cortex tandis que l'expression de la Cx26 est restreinte aux astrocytes des aires subcorticales (Nagy et al., 2011). Au cours du développement, la Cx43 est exprimée dès les premiers stades embryonnaires, tandis que la Cx30 apparaît progressivement et son expression augmente pendant les trois premières semaines postnatales chez la souris (Kunzelmann et al., 1999).

Les connexons ont un large pore d'environ 10 Å, ce qui leur confère une large conductance. Ils sont perméables aux ions et aux molécules hydrophiles ayant une masse moléculaire inférieure à 1,5 kDa (Loewenstein, 1981 ; Tabernero et al., 2006 ; Decrock et al., 2015). Ainsi, les JC sont perméables au K^+ , Ca^{2+} , Na^+ , aux seconds messagers ainsi qu'aux petits acides aminés. Les hémicanaux, quant à eux, conduisent des molécules telles que l'ATP, le glutamate, le glutathion ou encore la PGE2 (Giaume et al., 2013). Les propriétés biophysiques des connexons sont dépendantes de nombreux facteurs tels que le pH, le calcium intracellulaire ou encore leur état de phosphorylation contrôlé par les protéines kinase A, C et G (Ek-Vitorin et al., 2006 ; Hervé et Derangeon, 2013). Leur perméabilité peut également être modulée par des voies de signalisation activées par l'ATP, le Ca^{2+} , le glutamate, le $TNF-\alpha$ ou l'IL-1 β (Rouach et al., 2002). Enfin, il est intéressant de noter que dans les cultures d'astrocytes déficients pour la Cx43, l'expression de la Cx30 est quasiment doublée, indiquant qu'il existerait un mécanisme de compensation entre ces deux connexines (Theis et al., 2003).

2.4.2 Fonctions des connexines

Au sein de cette section, nous nous intéresserons aux rôles des connexines astrocytaires dans différents processus cérébraux. Les différentes fonctions seront présentées en fonction de la structure adoptée par les Cx : jonction communicante, hémicanal et fonctions indépendantes de la formation de canal.

2.4.2.1 Jonctions communicantes

Initialement, ce sont des expériences de remplissage d'astrocytes avec un marqueur fluorescent qui ont permis de mettre en évidence la communication inter-astrocytes via les JC. La diffusion du marqueur à travers les astrocytes a révélé un réseau dont 80 % des cellules couplées sont des astrocytes (Binmöller et Müller, 1992 ; Schools et al., 2006). Toutefois, les astrocytes d'une même région ne sont pas tous couplés entre eux. Par exemple, dans l'hippocampe, l'injection d'un marqueur diffusant à travers les JC, a montré que certains astrocytes n'étaient pas couplés au réseau malgré une grande proximité avec ce dernier. L'étude de souris déficientes pour les

connexines 30 et 43 a permis de mettre en évidence un réseau très fortement réduit (**Figure 18 A** ; Pannasch et Rouach, 2013)

Comme nous l'avons déjà vu, les réseaux astrocytaires sont fortement impliqués dans le trafic de métabolites énergétiques des astrocytes aux neurones ; le lactate et le glucose diffusent à travers les JC (Rouach et al., 2008). Les JC sont également impliquées dans le maintien de l'homéostasie potassique et glutamatergique. En effet, comme décrit précédemment, lors du tamponnage du K^+ , ce dernier est redistribué au sein du réseau astrocytaire par les JC, mécanisme indispensable pour maintenir la transmission synaptique efficace et fonctionnelle. De plus, les souris doubles déficientes pour les connexines 30 et 43 présentent des défauts de régulation de l'augmentation locale du K^+ extracellulaire suite à l'activité synaptique (**Figure 18 B**). Ceci ayant pour conséquence une augmentation de la transmission synaptique hippocampique associée à un défaut de plasticité à long terme (**Figure 18 C**). Notons également que les astrocytes déconnectés du réseau astrocytaire présentent une augmentation du volume de leur cytoplasme (Pannasch et al., 2011).

La signalisation calcique au sein du réseau astrocytaire a un impact sur la libération présynaptique de glutamate et contribue à la régulation de la fréquence de décharge des neurones ainsi qu'à la synchronisation de l'activité neuronale et à la plasticité synaptique (Kang et al., 2005 ; Serrano et al., 2006 ; Poskanzer et Yuste, 2011 ; Poskanzer et Yuste, 2016). Les connexines participent à la régulation de la propagation de ces vagues calciques. En conditions physiologiques, le contrôle de la transmission synaptique est dépendant de la communication au niveau du réseau astrocytaire. Il a en effet été montré que cette communication astrocytaire limite l'excitabilité neuronale, contrôle la probabilité de libération des neurotransmetteurs, le nombre de synapses fonctionnelles, ainsi que la plasticité synaptique (Pannasch et al., 2011). Les réseaux astrocytaires participent également à la régulation des activités des réseaux neuronaux (Pannasch et al., 2012) et au recrutement neuronal pendant les activités épileptiques, donc pendant une période d'hypersynchronisation neuronale non physiologique (Chever et al., 2016). En effet, un défaut de couplage entre astrocytes induit également un défaut de génération des crises d'épilepsie (Wallraff et al., 2006), car la réduction de la taille du réseau astrocytaire empêche la communication nécessaire entre les neurones pour induire ce type d'activité pathologique (**Figure 18 D** ; Chever et al., 2016).

2.4.2.2 Fonctions canal

Les hémicanaux permettent aux astrocytes de sécréter de nombreuses molécules telles que des gliotransmetteurs et des neuromodulateurs. Ces hémicanaux ont été identifiés dans les astrocytes aussi bien *in vitro* que *in vivo* et les connexines 26, 30 et 43 peuvent toutes former des hémicanaux (Giaume et al., 2013). Du fait de la faible sélectivité, les hémicanaux ont initialement été décrits comme étant fermés à l'état de repos de la cellule, mais pouvant être activés par des signaux calciques

intracellulaires ou suite à l'exposition à des agents proinflammatoires (Orellana et al., 2009 ; Orellana et al., 2012).

Les hémicanaux sont perméables à de plus grandes molécules que celles pouvant passer par les JC et peuvent donc libérer des molécules telles que de l'ATP et du glutamate (Loewenstein, 1981 ; Giaume et al., 2013). Il a été montré que les hémicanaux formés de Cx43 peuvent libérer de l'ATP tandis que ceux formés par la Cx30 n'auraient pas de sélectivité apparente (Hansen et al., 2014). De par leur capacité à libérer de nombreuses molécules, les hémicanaux sont impliqués dans les processus de neuro- et de gliotransmission. Ainsi, l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire suite à l'activation des récepteurs mGluR5 et P2Y astrocytaires engendre l'ouverture des

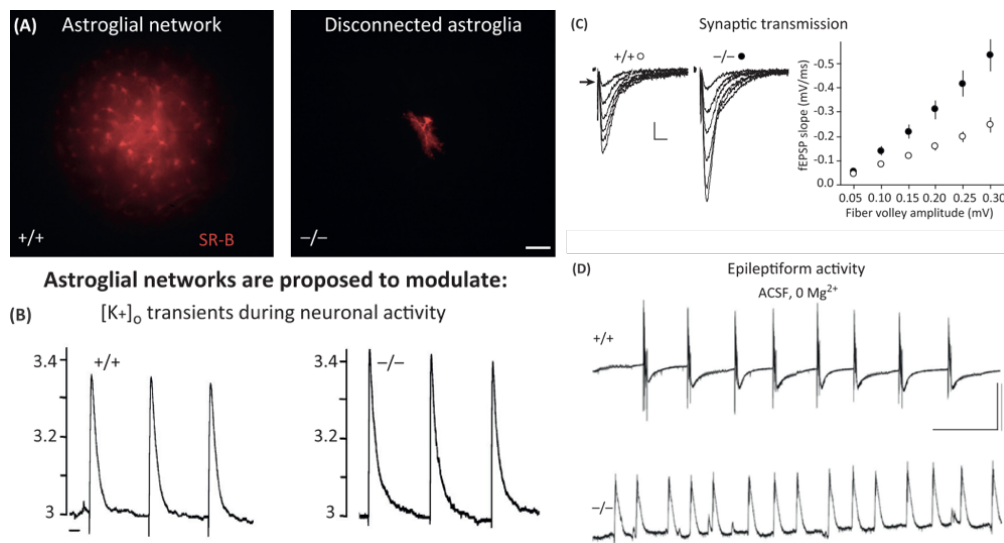


Figure 18 : Influence de la taille du réseau astrocytaire dans la régulation de l'activité synaptique. **A.** La taille du réseau astrocytaire est fortement diminuée pour des astrocytes déficients pour l'expression des Cx30 et 43. Barre d'échelle, 50 μm. **B.** Les niveaux potassiques extracellulaires sont augmentés chez la souris déficiente pour l'expression des Cx30 et 43. **C.** La transmission synaptique excitatrice est augmentée chez des souris déficientes pour l'expression des Cx30 et 43. **D.** Augmentation des activités de crises au niveau de l'hippocampe chez des souris déficientes pour l'expression des Cx30 et 43 (Pannasch et Rouach, 2013).

hémicanaux Cx43, leur permettant ainsi de libérer des molécules qui modulent la transmission synaptique. L'activation des hémicanaux Cx43 participe également à la régulation de la transmission synaptique glutamatergique via la libération d'ATP (Chever et al., 2014). Enfin, dans le cortex préfrontal, l'ouverture des hémicanaux Cx43 active les récepteurs NMDA via la libération de D-sérine (Meunier et al., 2017).

2.4.2.3 Fonctions non-canal

L'extrémité C-terminale des connexines comporte de nombreux motifs de liaison à d'autres protéines permettant des interactions protéiques (Hervé et al., 2007). Ces fonctions ont tout d'abord été caractérisées au cours du développement cérébral où il a été montré qu'elles participent à la régulation de la migration neuronale (Elias et al., 2007). Des études protéomiques et d'immunoprécipitation ont montré que les Cx ont de nombreux partenaires, dont des protéines du cytosquelette (Olk et al., 2010), suggérant qu'elles puissent intervenir dans l'organisation de la morphologie astrocytaire. Or il a été montré que la Cx30 régule la morphologie astrocytaire, d'une part en contrôlant la polarité des prolongements astrocytaires par la modulation la voie de signalisation laminine/ β 1-intégrine/Cdc42 (Ghézali et al., 2018) et d'autre part en modulant la longueur des prolongements. En effet, dans l'hippocampe, les astrocytes déficients pour la Cx30 possèdent plus de ramifications (**Figure 19 A**) ayant pour conséquence un ajustement de la transmission synaptique excitatrice. Les prolongements des astrocytes déficients pour la Cx30 s'infiltrèrent dans la fente synaptique et induisent alors une augmentation de la recapture du glutamate par les astrocytes (**Figure 19 B**). Cette dernière provoque alors une diminution de la transmission synaptique excitatrice (**Figure 19 C, D**) ;(Pannasch et al., 2014).

2.4.3 Connexines astrocytaires et sommeil

Peu de données de la littérature permettent d'émettre des liens entre connexines et sommeil. Nous détaillerons ici deux principaux liens qui concernent la modulation de l'activité des connexines par des psychotropes et anesthésiques et l'expression des ARNm et des protéines Cx en lien avec le sommeil et le cycle lumière/obscurité (L/D).

2.4.3.1 Modulation de l'activité des canaux connexines par des psychotropes et anesthésiques

Les anesthésiques produisent un état comportemental et cérébral similaire à celui observé pendant le sommeil lent profond physiologique (Franks et Zecharia, 2011) et sont depuis longtemps connus pour inhiber les jonctions communicantes, notamment dans les astrocytes (Mantz et al., 1993 ; Rozental et al., 2000 ; Siracusano et al., 2006). Ces études ont été initialement conduites sur des cultures primaires d'astrocytes, cependant, deux études plus récentes ont montré que différents anesthésiques (propofol, kétamine, dexmedetomidine et acide γ -hydroxybutyrique [GHB]) ont également des effets inhibiteurs sur les JC, *ex vivo*, sur des tranches aiguës de cerveau (Liu et al., 2013 ; Liu et al., 2016). Il est intéressant de noter qu'en plus d'inhiber les JC, ces composés inhibent également les hémicanaux astrocytaires et pourraient donc moduler la gliotransmission. Inversement, le modafinil, qui est un psychostimulant utilisé dans le traitement de la narcolepsie et de l'hypersomnie idiopathique, augmente l'expression de l'ARNm Cx30 et potentialise la communication via les JC (Liu et al., 2013). Dans tous les cas, ces effets sont réversibles après lavage de ces composés. Enfin, ces molécules n'agissent pas directement sur les Cx, les effets

observés sont induits via l'activation de différentes voies de signalisation. L'ensemble de ces résultats suggère que les connexines pourraient jouer un rôle dans la régulation des états comportementaux de veille et sommeil.

2.4.3.2 Variations circadiennes d'expression des connexines 30 et 43

Récemment, Bellesi et ses collaborateurs se sont intéressés aux variations moléculaires et ultrastructurales des astrocytes au cours (i) du cycle circadien, (ii) de l'état de vigilance et (iii) du besoin de sommeil. Des expériences de TRAP ont été conduites sur trois groupes de souris BAC-transgéniques, définis en fonction des signaux EEG enregistrés : le premier groupe étant des souris éveillées depuis plus d'une heure en

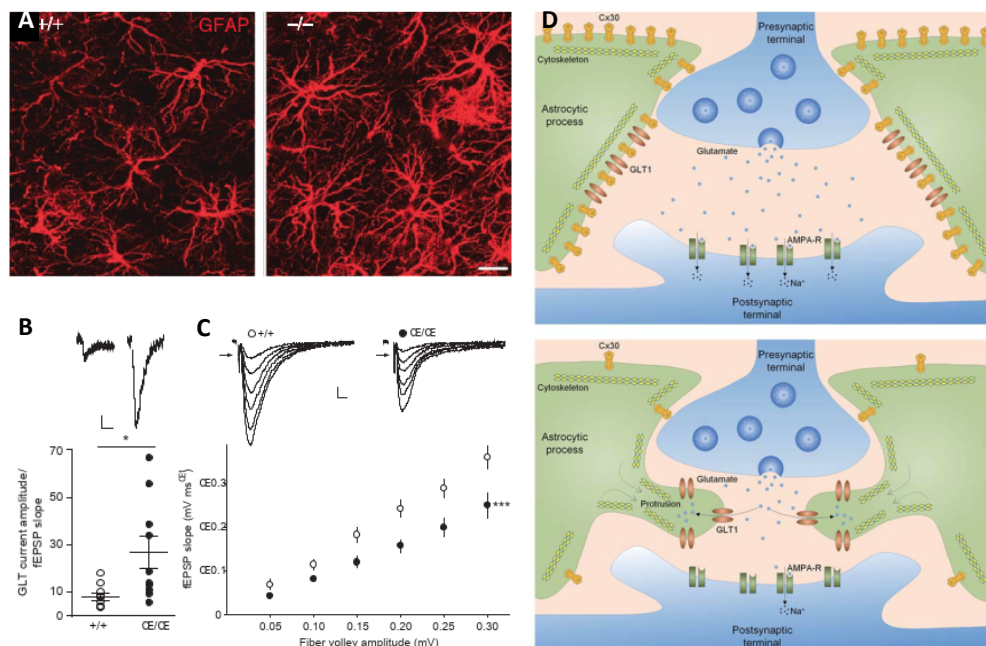


Figure 19 : La connexine 30 contrôle la transmission synaptique excitatrice via des fonctions non canal. **A.** Images de microscopie confocale et immunomarquage GFAP. Les astrocytes déficients pour l'expression de la Cx30 sont plus ramifiés. **B.** Les courants GLT1 sont augmentés dans les astrocytes déficients pour la Cx30. **C.** Les souris déficientes pour l'expression de la Cx30 présentent une diminution de la transmission synaptique. **D.** Schéma du phénomène de plasticité morphologique des astrocytes : en présence de Cx30, les prolongements périssynaptiques astrocytaires se tiennent à proximité de la fente synaptique. En absence de Cx30 ces prolongements s'infiltrent dans la fente synaptique induisant une augmentation de la recapture du glutamate par GLT1 (Pannasch et al., 2014 ; Clasadonte et Haydon, 2014).

phase obscure, le second endormi pendant plus de 45 minutes en phase lumineuse et le dernier, des souris ayant subi une privation de sommeil d'au moins 4 heures. En utilisant des micropuces TRAP, les auteurs ont mis en évidence une augmentation

de l'expression de gènes spécifiquement exprimés par les astrocytes dans les trois groupes expérimentaux. Parmi ces gènes, le gène *Gjb6* codant la connexine 30 est surexprimé dans le prosencéphale (cortex et striatum), dans les groupes de souris éveillées et ayant subi une privation de sommeil, par rapport aux souris endormies. Afin de vérifier si ces changements transcriptionnels se traduisent par des variations d'expression de la protéine Cx30 dans le cortex, les auteurs ont réalisé des western blots. Suite à une privation de sommeil, l'expression de la protéine Cx30 est significativement augmentée en comparaison avec l'état de sommeil (Bellesi et al., 2015).

Une seconde étude d'Ali et ses collaborateurs a mis en évidence une expression cyclique des ARNm Cx30 et Cx43 dans le noyau suprachiasmatique, le siège de l'horloge interne principale, avec un pic d'expression au début de la phase obscure. Ces fluctuations ne sont plus observées lorsque les souris sont placées en obscurité constante (cycle D/D), suggérant que l'expression rythmique des ARNm Cx30 et Cx43 serait médiée par l'exposition à la lumière. Des immunomarquages des protéines connexines 30 et 43 dans le SCN ont également mis en évidence une fluctuation de leur expression au cours du cycle nycthéral avec un pic pendant la phase lumineuse (**Figure 20**). Contrairement au cycle des ARNm, seul le rythme d'expression de la protéine Cx43 persiste en obscurité constante. En revanche, en conditions de lumière constante (cycle L/L), le taux d'expression de la Cx30 reste constitutivement élevé tandis que celui de la Cx43 reste constitutivement bas, suggérant différents mécanismes de régulation de l'expression des connexines 30 et 43 dans le SCN (Ali et al., 2019).

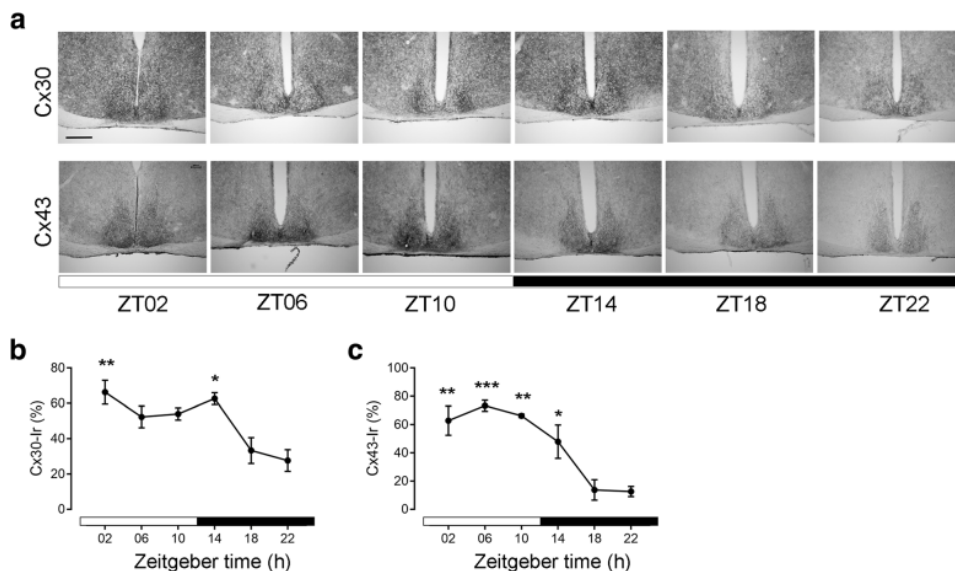


Figure 20 : Taux de connexines 30 et 43 dans le SCN au cours du cycle nycthéral.
a. Photomicrographies représentatives de l'immunomarquage des Cx30 et Cx43 dans le SCN de souris C57BL/6 maintenues en cycle jour/nuit (L/D) de 12:12 h (barre d'échelle : 300 μ m). **b, c.**

Quantifications respectives des taux de Cx30 et Cx43 à partir des immunomarquages. Les données sont exprimées en tant que moyenne \pm SEM sur n = 3 souris par ZT. Les différences significatives entre les différents points temporels ont été analysées par une ANOVA 1 facteur suivie du test posthoc de Tukey. Les niveaux de Cx30 (F = 7,41 ; P = 0,002) et de Cx43 (F = 13,17 ; P = 0,0002) sont significativement différents entre les différents points temporels dans des conditions de LD 12:12. *: P \leq 0,05 vs. ZT22 ; **: P \leq 0,01 ; ***: P \leq 0,001 vs. ZT22. Les barres blanches indiquent la phase de lumière, les barres noires indiquent la phase sombre (Ali et coll., 2019).

3 Brain-Derived Neurotrophic Factor

Le *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) est une neurotrophine qui est largement répandue et étudiée dans l'ensemble du système nerveux central des mammifères. Le BDNF a de nombreuses fonctions dans le SNC allant du contrôle du développement neuronal et glial, à la neuroprotection ou encore la modulation des interactions synaptiques à court et long terme, des processus tous indispensables à la cognition et à la mémorisation. Le BDNF est impliqué dans le contrôle de nombreux mécanismes ayant souvent des effets contradictoires. Ceux-ci pouvant s'expliquer par ses mécanismes de biosynthèse qui impliquent plusieurs isoformes intermédiaires biologiquement actives et qui se lient à différents récepteurs impliqués dans plusieurs voies de signalisation distinctes. Dans cette introduction, nous nous intéresserons exclusivement aux fonctions du BDNF au stade adulte et au sein du SNC.

3.1 La découverte du BDNF

Le BDNF est un membre de la famille des neurotrophines à laquelle appartiennent le *Nerve Growth Factor* (NGF) ou encore les neurotrophines 3 et 4 (Hofer et al., 1990 ; Maisonpierre et al., 1990 ; Rosenthal et al., 1991). Il a été isolé pour la première fois en 1989 par Yves-Alain Barde et Hans Thoenen à partir de cerveaux de cochon (Barde et al., 1982). Le gène humain codant le BDNF est localisé sur le chromosome 11p14.1. Il comporte 11 exons et ses différentes combinaisons d'épissage conduisent à la synthèse de plusieurs transcrits qui sont spécifiques à différents tissus (Pruunsild et al., 2007). La structure du BDNF est très conservée chez les vertébrés, avec 85,9 à 100 % d'identité de séquences, révélant ainsi l'importance physiologique de cette neurotrophine (Yeh et al., 2015).

Le BDNF est exprimé dans quasiment toutes les régions du SNC (Yan et al., 1997). De par ses mécanismes de biosynthèse et la diversité de ses récepteurs, le BDNF est impliqué dans un large champ de processus neurophysiologiques. Ses fonctions les plus citées incluent les processus développementaux (neurogénèse, synaptogenèse, gliogenèse, ...), la neuroprotection, le contrôle de la plasticité à court et à long terme prenant ainsi part à la régulation des mécanismes de cognition et de mémorisation (Gonzalez et al., 2016 ; Sasi et al., 2017).

3.2 Synthèse et maturation du BDNF

La synthèse et la maturation du BDNF sont deux processus multiétapes impliquant plusieurs précurseurs, qui sont eux-mêmes des isoformes actives du BDNF. Du fait de ses 11 promoteurs, qui précèdent chacun un exon, l'épissage alternatif conduit à la synthèse de plusieurs ARNm qui contiennent tous l'exon IX (codant la protéine BDNF ; Aid et al., 2007). Cette protéine est traduite dans le réticulum endoplasmique, site où elle acquiert sa structure tertiaire ; elle est alors nommée pré-pro BDNF (**Figure 21** ; Foltran et Diaz, 2016). Le pré-proBDNF est ensuite adressé à l'appareil de Golgi. La séquence signal de la pré-région y est alors clivée et libère la

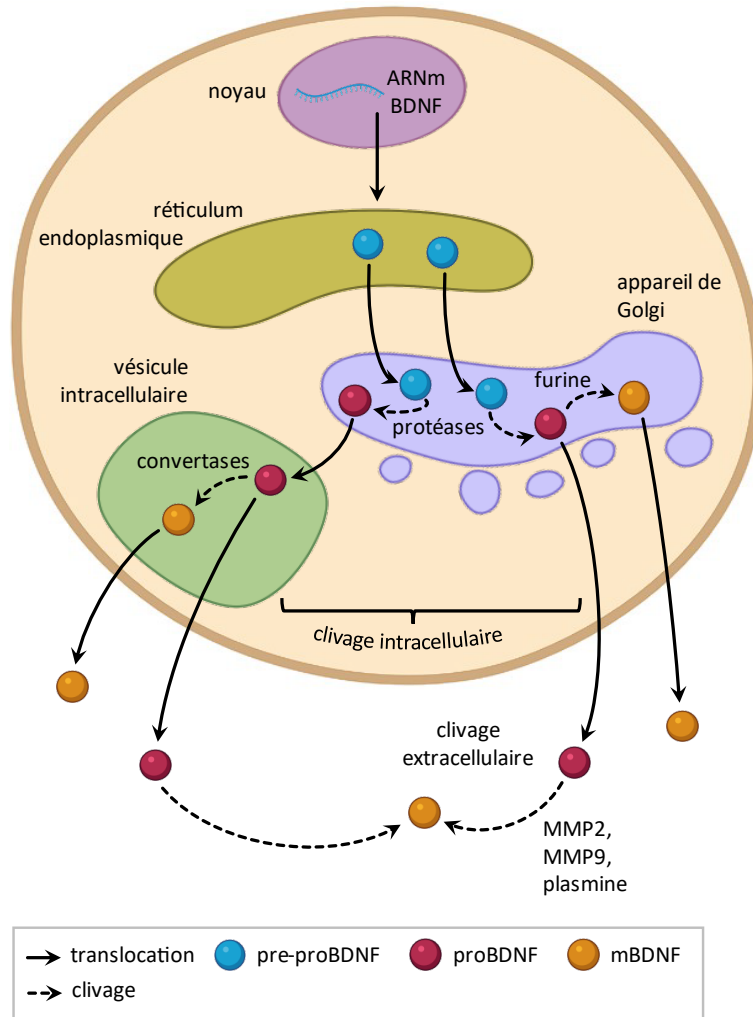


Figure 21 : Représentation schématique de la synthèse et de la maturation du BDNF. La synthèse et la maturation du BDNF est un processus séquentiel multiétapes qui a lieu en intra et en extracellulaire. Au sein de la cellule le précurseur du BDNF, appelé pré-proBDNF, est synthétisé dans le réticulum endoplasmique puis transporté dans l'appareil de Golgi. Au sein du Golgi, le pré-proBDNF est clivé, par des protéases intracellulaires, libérant ainsi la pré-région et la forme proneurotrophine du BDNF (proBDNF). Le proBDNF est ensuite clivé au sein de l'appareil de Golgi ou au sein de vésicules intracellulaires libérant le prodomaine. Ces processus de clivage impliquent des protéases intracellulaires, des furines et des convertases. Depuis ces vésicules ou depuis l'appareil de Golgi, le pro et le mBDNF peuvent être libérés dans l'espace extracellulaire via des mécanismes classiques d'exocytose. Le proBDNF ensuite libéré dans l'espace extracellulaire peut également être pris en charge et clivé en prodomaine et mBDNF par les métalloprotéases 2 et 9 (MMP2 et MMP9), des plasmine ou d'autres protéases de la matrice extracellulaire. En conséquence, plusieurs isoformes actives du BDNF, le pro et le mBDNF, ainsi que le prodomaine sont présents dans l'espace extracellulaire. Adapté de Kowiański et al., 2018.

forme proneurotrophine du BDNF (proBDNF). Le proBDNF est une protéine de 247 acides aminés (aa) répartis en deux régions : le domaine proneurotrophine (pro-domaine) N-terminal de 129 aa et le domaine mature C-terminal de 118 aa (Rosenthal et al., 1991 ; Mowla et al., 2001). Le proBDNF est généralement clivé par des furines dans le trans-Golgi ou par des convertases dans des vésicules intracellulaires (Lu et al., 2005). Ce clivage libère le prodomaine et la forme mature du BDNF (mBDNF) qui peuvent ensuite être sécrétés. Le proBDNF restant est libéré dans l'espace extracellulaire où il peut être clivé par des protéases de la matrice extracellulaire telles que les métalloprotéases 2 et 9 (MMP2 et MMP9) ou des plasmines (**Figure 21** ; Pang et al., 2004 ; Mizoguchi et al., 2011 ; Vafadari et al., 2016). Ce schéma de synthèse caractéristique des neurotrophines permet, d'une part, de contrôler la génération des isoformes via la régulation de l'activité enzymatique des protéases et, d'autre part, d'expliquer les rôles multiples du BDNF dans de nombreux processus physiologiques présentant des effets finaux souvent opposés.

Dans le SNC, le BDNF est exprimé par les neurones et par d'autres types cellulaires comme les cellules gliales (Brigadski et Leßmann, 2020). Sa sécrétion est soit constitutive, soit dépendante de l'activité cellulaire et sera alors spécifique au type de cellule considéré (Mowla et al., 2001). Par exemple, les neurones vont libérer du pro et du mBDNF suite à la dépolarisation de leur membrane plasmique (Yang et al., 2009 ; Dieni et al., 2012). Ces mécanismes de sécrétion ont un impact sur le ratio proBDNF/mBDNF, qui varie principalement au cours du développement et d'une région cérébrale à l'autre. Finalement, au stade adulte, la forme mature du BDNF prévaut sur la forme proneurotrophine (Yang et al., 2014).

En plus des deux isoformes susmentionnées, un polymorphisme du gène codant le BDNF existe et affecte le fonctionnement de la signalisation du BDNF (**Figure 22**). Il s'agit d'un polymorphisme nucléotidique simple (SNP, *Simple Nucleotide Polymorphism*) commun chez l'homme. Il consiste en une substitution de la valine (Val) 66 par une méthionine (Met) au sein du gène du BDNF, au niveau de la région codant le prodomaine (Egan et al., 2003). La présence de l'allèle Met a un impact, *in vitro*, sur la maturation, la distribution intracellulaire et la sécrétion du BDNF. Alors que la forme Val est majoritairement présente dans les vésicules de sécrétion des dendrites neuronales, la forme Met présente une distribution diffuse dans l'ensemble de la cellule. De plus, la sécrétion active du BDNF est significativement réduite, *in vitro*, lorsque des neurones en cultures sont transfectés avec le variant Met (Bachmann et al., 2012). Enfin, selon certaines données publiées récemment, ce variant Val66Met du prodomaine pourrait être un ligand à part entière et aurait une capacité de transduction de signal différente en regard des formes pro et mBDNF (pour une revue sur le sujet, voir Hempstead, 2015).

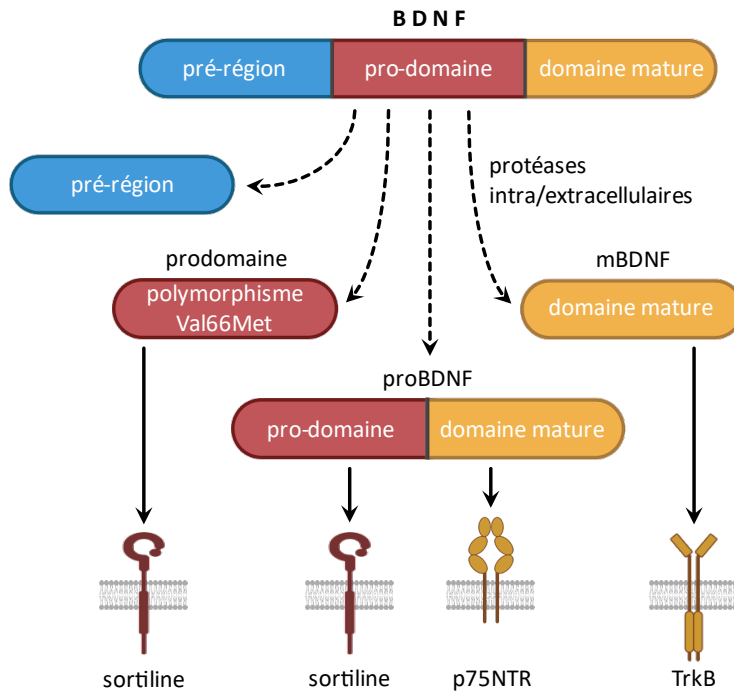


Figure 22 : Isoformes du BDNF et interactions avec leurs récepteurs spécifiques. Le clivage intracellulaire du pré-proBDNF (**Figure 21**) abouti à différentes isoformes actives du BDNF, le prodomaine, le proBDNF et le mBDNF. Chaque forme active présente des affinités pour différents récepteurs au BDNF. Le prodomaine se lie préférentiellement à la sortiline. Un polymorphisme, existant chez l'homme et la souris, retrouvé au niveau du prodomaine et qui consiste en une substitution d'une valine par une méthionine au codon 66, n'empêche pas la fixation du prodomaine à la sortiline. Le proBDNF est constitué de deux parties : le prodomaine et le domaine mature. Ces derniers interagissent spécifiquement avec deux récepteurs : la sortiline et p75NTR. La forme mature du BDNF ou mBDNF est uniquement constituée du domaine mature et se lie préférentiellement au récepteur kinase B de la tropomyosine (TrkB). Adapté de Kowiański et al., 2018.

3.3 Les récepteurs du BDNF

Plusieurs récepteurs au BDNF possédant, eux-mêmes, plusieurs isoformes existent et sont différemment exprimés dans le SNC, en fonction du type cellulaire considéré. Cette diversité moléculaire et d'expression entraîne l'activation de différentes voies de signalisation. De plus, chaque isoforme du BDNF se lie préférentiellement à un récepteur donné. Dans le cadre de cette thèse, nous nous intéresserons particulièrement à une cible du BDNF, le récepteur TrkB, qui a la plus grande affinité pour la forme mature du BDNF. Les différentes constructions possibles du récepteur TrkB,

ainsi que ses différentes isoformes seront introduites dans cette partie pour montrer la diversité qui peut exister autour des voies impliquant le BDNF.

3.3.1 TrkB et ses isoformes

Le récepteur tyrosine kinase B de la tropomyosine (TrkB) appartient à la famille des récepteurs tyrosine kinase aux tropomyosines (Ebendal, 1992 ; Reichardt, 2006). La forme mature du BDNF se lie préférentiellement à TrkB. L'épissage alternatif lors de la traduction du gène *NTRK2* aboutit à la formation des quatre principales isoformes du récepteur TrkB : la forme longue tyrosine kinase (TrkB.FL, *full-length* ou gp145), la forme tronquée C-terminal (TrkB.t1 ou gp95), la forme tronquée C-terminal Shc⁺ (TrkB.shc) et une dernière forme tronquée pourvue du domaine tyrosine kinase (TrkB.T.TK). Il existe également des isoformes tronquées au niveau du domaine N-terminal extracellulaire qui sont exprimées dans le cortex et le cervelet, cependant leurs fonctions restent à ce jour inconnues. Les isoformes TrkB.FL et TrkB.t1 sont les plus abondamment exprimées dans le SNC (Luberg et al., 2010). Lors de leur activation, les récepteurs TrkB se dimérisent. Ces dimères peuvent être composés d'homodimères TrkB.FL/TrkB.FL ou TrkB.t1/ TrkB.t1, mais également d'hétérodimères TrkB.FL/TrkB.t1 (Ohira et al., 2001).

3.3.1.1 Voies de signalisation de TrkB.FL

L'homodimère TrkB.FL est la forme prédominante exprimée par les neurones. Il est pourvu du domaine tyrosine kinase intracellulaire (Fenner, 2012). La fixation du BDNF induit donc une auto-transphosphorylation des deux monomères et entraîne un changement de conformation du dimère. Ce changement de conformation expose des sites intracellulaires de fixation de différentes protéines adaptatrices et effecteurs de voies de signalisation. Trois voies majeures de signalisation sont activées et aboutissent principalement à la survie et la différenciation cellulaire : phospholipase C gamma (PLC γ), phosphoinositide 3-kinase (PI3K), *Extracellular Signal-Regulated kinase/Mitogen-Activated Protein Kinase* (ERK/MAPK ; **Figure 23** ; Cheng et al., 2006). L'activation de la voie PLC γ par TrkB.FL induit la catalyse de la conversion des phosphatidylinositols en inositol trisphosphate (IP₃) et diacylglycérols (DAG). Le DAG peut activer la protéine kinase C (PKC) conduisant ainsi à la survie cellulaire et à la potentialisation de la plasticité synaptique. Quant à l'IP₃, il régule la libération de Ca²⁺ depuis le réticulum endoplasmique, modulant ainsi la plasticité synaptique et l'efficacité de la neurotransmission (**Figure 23** ; Minichiello, 2009 ; Numakawa et al., 2010).

L'activation de TrkB.FL induit également la formation d'un complexe Shc-GRB2 conduisant à l'activation de la PI3K *via* la stimulation de petites protéines G telles que Ras (Huang et coll., 2009). La voie PI3K-Akt stimule la survie neuronale tandis que la voie PI3K-GSK3 β stimule la croissance axonale. La croissance dendritique est également stimulée *via* différentes voies de signalisation impliquant la PI3K, comme par exemple la voie mTOR (**Figure 23** ; Takei et al., 2001). Le complexe SHC régule également l'activation de la voie ERK/MAPK qui, *via* différents effecteurs,

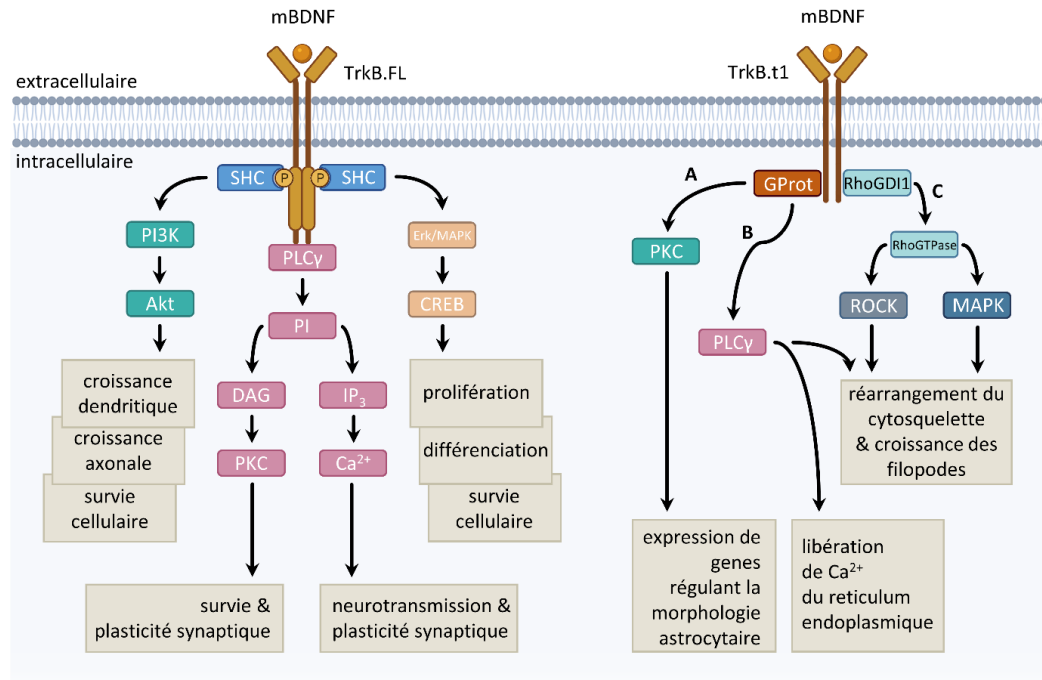


Figure 23 : Voies de signalisation intracellulaires BDNF-TrkB. Deux isoformes du récepteur tyrosine kinase TrkB sont majoritairement exprimées dans le SNC : la forme longue (TrkB.FL, Full Length) et la forme tronquée (TrkB.t1) qui est dépourvue du domaine kinase intracellulaire. La fixation du BDNF au récepteur TrkB.FL induit sa dimérisation et la transphosphorylation des tyrosines 490 de chaque monomère. Le récepteur active alors différentes voies de signalisation intracellulaires : phospholipase C gamma (PLC γ), phosphoinositide 3-kinase (PI3K), phosphoinositide 3-kinase, *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK), *Extracellular signal-Regulated Kinase* (ERK). L'activation de ces cascades de signalisations par le BDNF peut alors conduire à la survie, la différenciation et la prolifération cellulaire ainsi qu'à des mécanismes promouvant la plasticité synaptique, la croissance dendritique et axonale. Le BDNF via la forme tronquée du récepteur TrkB, active principalement trois voies de signalisation. (A) La première est la voie de protéine kinase C (PKC) qui conduit à l'expression de gènes induisant la différenciation en astrocyte. (B) La deuxième induit la libération de Ca²⁺ depuis le réticulum endoplasmique et des réarrangements du cytosquelette via la PLC γ . (C) Enfin, la voie RhoGDI1/RhoGTPase induit des réarrangements du cytosquelette ainsi que la croissance de filopodes. De nombreuses interconnexions existent entre ces différentes voies de signalisation, qui, par souci de simplification, n'ont pas été représentées ici. Adapté de Fenner (2012).

régule la survie et la différenciation neuronale et contrôle la synthèse protéique (Numakawa et al., 2010).

Enfin, notons que les voies de signalisation intracellulaires activées par les homodimères TrkB.FL sont en réalité beaucoup plus complexes. En effet, les différentes voies de signalisation évoquées ci-dessus sont toutes interconnectées. Ainsi, la

formation d'hétérodimères TrkB.FL/TrkB.t1 non fonctionnels et l'activation de p75NTR peuvent indirectement réguler ces voies de signalisation.

3.3.1.2 Voies de signalisation de TrkB.t1

La forme tronquée 1 du récepteur TrkB (TrkB.t1) est une isoforme pour laquelle le domaine tyrosine kinase C-terminal est tronqué. Elle est la forme majoritairement exprimée par les cellules gliales et notamment par les astrocytes (Fenner, 2012). Du fait de l'absence de ce domaine, la dimérisation consécutive à la fixation du BDNF ne peut entraîner la trans-autophosphorylation des sous-unités du dimère. Les voies de signalisation activées par TrkB.t1 diffèrent donc de celles activées par TrkB.FL, décrites ci-dessus. Ainsi, la fonction de TrkB.t1 la plus abondamment décrite est l'inhibition de l'activité kinase de TrkB.FL via un effet dominant négatif (Klein et al., 1991). De plus, nous avons déjà vu ci-dessus que le BDNF favorisait la survie neuronale via TrkB.FL. Or, il a été montré que les effets neuroprotecteurs du BDNF sont supprimés dans les cellules qui surexpriment la forme tronquée de TrkB (Saarelainen et al., 2000 ; Haapasalo et al., 2001).

Plusieurs études se sont intéressées à la distribution des isoformes TrkB.FL et TrkB.t1 et ont conduit à l'hypothèse que la forme t1 est trop abondante dans le SNC pour ne fonctionner que comme un dominant négatif de la forme FL (Ferrer et al., 1999 ; Ohira et Hayashi, 2003). En 2000, Kryl et ses collaborateurs ont identifié une protéine appelée TTIP (*Truncated TrkB Interacting Protein*) interagissant spécifiquement avec TrkB.t1, un résultat prometteur bien qu'à ce jour le rôle de cette protéine reste méconnu (Kryl et Barker, 2000). Il a cependant été montré qu'il existait une activité kinase dépendante de TrkB.t1. En effet, l'activation de TrkB.t1 par le BDNF induit l'activation de la PKC via des protéines G (Cheng et al., 2007) et conduirait, pendant le développement, les cellules neuronales à adopter un phénotype glial. Ceci pourrait également réguler les cascades de signalisation dans les cellules gliales matures, en modulant la signalisation calcique astrocytaire et en réarrangeant le cytosquelette (Rose et al., 2003 ; Ohira et al., 2005 ; 2007). De plus, TrkB.t1 se lie également à *Rho GDP Dissociation Inhibitor* (RhoGDI1) qui inhibe les Rho GTPases et affecte l'activité des voies de signalisation ROCK (*Rho-associated protein kinase*) et MAPK. La stimulation par le BDNF de ces voies de signalisation provoque des réarrangements du cytosquelette et des changements morphologiques des cellules gliales (**Figure 23** ; Ohira et al., 2005 ; 2007).

Un autre rôle de TrkB.t1, indépendant de TrkB.FL, serait la régulation du taux de BDNF extracellulaire. En effet, les cellules gliales et notamment les astrocytes expriment abondamment TrkB.t1 à leur membrane plasmique. Ainsi, lorsque le BDNF extracellulaire est abondant, il se fixe aux récepteurs TrkB.t1 astrocytaires. Le complexe BDNF-TrkB.t1 est alors internalisé dans des vésicules de transport où le BDNF est stocké. Il est alors, soit adressé aux lysosomes et dégradé, soit de nouveau libéré dans l'espace extracellulaire via l'exocytose (Alderson et al., 2000 ; Fenner, 2012).

Grâce à ce stock intracellulaire de BDNF, les cellules gliales peuvent donc rapidement induire une augmentation de la concentration de BDNF extracellulaire (**Figure 24**). Ainsi, une des fonctions de ce mécanisme pourrait être de diminuer localement le taux de BDNF lorsque celui-ci est élevé dans le milieu extracellulaire, puis d'en libérer quand la concentration extracellulaire diminue.

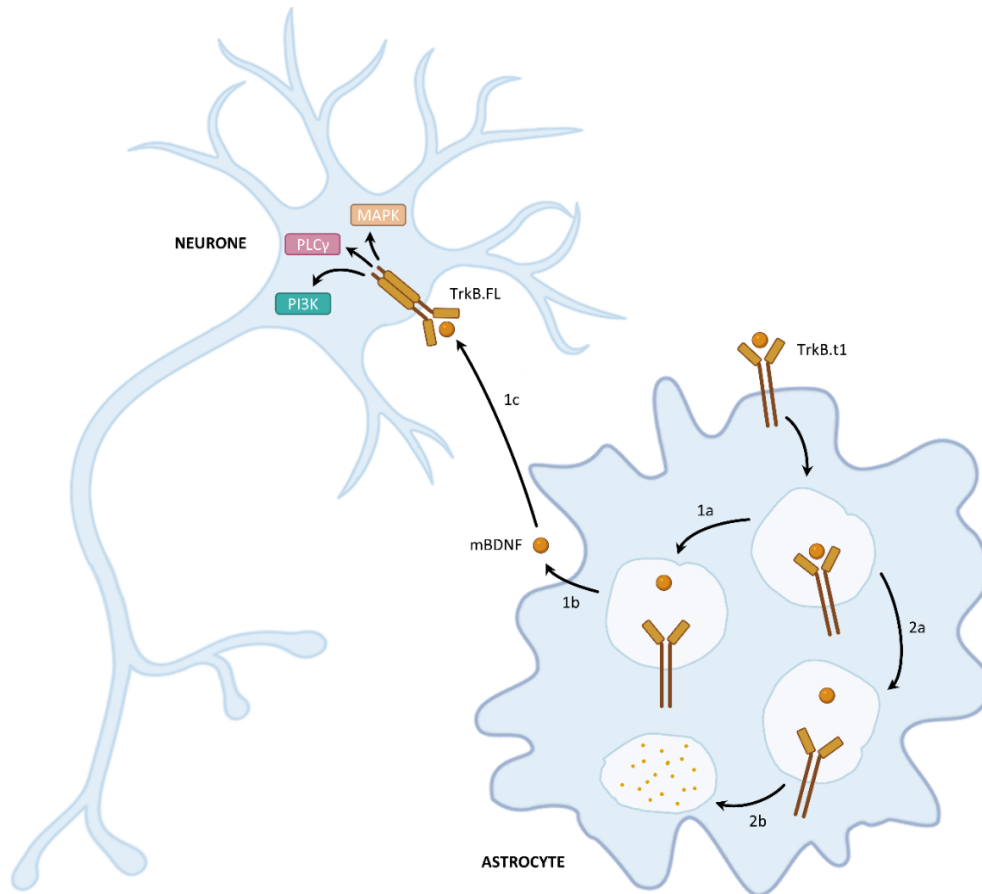


Figure 24 : Modèle de séquestration du BDNF médié par le récepteur TrkB.t1 astrocytaire. La fixation du BDNF à l'homodimère TrkB.t1 induit l'internalisation du complexe BDNF-TrkB.t1. Le complexe est ensuite adressé à des vésicules de transport (1a) ou à des endosomes tardifs (2a). Le BDNF présent dans les vésicules de transports (1a) peut ensuite être libéré dans le milieu extracellulaire par exocytose (1b). Le BDNF peut ensuite se fixer sur des récepteurs TrkB.FL portés par d'autres types cellulaires et ainsi activer les différentes cascades de signalisation (MAPK, PLC γ , PI3K). Le BDNF peut aussi être adressé aux endosomes tardifs (2a) puis aux lysosomes (2b) pour ensuite être dégradé. Par ces deux voies, la séquestration du pool de BDNF au sein des astrocytes permet de modifier sa disponibilité dans l'environnement extracellulaire. Adapté de Fenner (2012).

3.3.2 P75NTR et sortiline

Nous avons vu que la forme mature du BDNF se lie préférentiellement au récepteur TrkB. Le proBDNF, quant à lui, interagit préférentiellement avec le récepteur aux neurotrophines p75 (p75NTR), un des membres de la famille des récepteurs au TNF (**Figure 22**). Cette interaction implique le domaine mature (C-terminal ; Brigadski et Leßmann, 2020). L'activation de p75NTR recrute à la membrane plasmique un complexe de protéines adaptatrices qui induit différents mécanismes comme la plasticité synaptique, la croissance axonale et dendritique des neurones (Chao et Hempstead, 1995). Le proBDNF se lie également à des récepteurs de la famille des sortilines, mais cette fois-ci *via* le prodomaine. L'activation des récepteurs p75 et sortiline induit la formation d'un complexe proBDNF/p75NTR/sortiline (**Figure 22**). L'induction de ces cascades de signalisation par ce complexe conduit ensuite à l'activation de *c-Jun N-terminal kinase* (JNK), de *Ras homolog family member A* (RhoA) et du facteur nucléaire kappa B (NF- κ B). Ces voies de transduction médient l'apoptose, la régulation du développement du cône de croissance et de la motilité neuronale, des processus promouvant la survie ainsi que le maintien du nombre adéquat de cellules neuronales, notamment pendant le développement (Reichardt, 2006 ; Anastasia et al., 2013).

Enfin, une étude récente a mis en évidence un nouveau mode de maturation du BDNF via les astrocytes. En effet, il a été montré que les astrocytes corticaux internalisent le proBDNF par un mécanisme d'endocytose dépendant du récepteur p75NTR. Le proBDNF est ensuite clivé, libérant ainsi le prodomaine et la forme mature du BDNF. Ce processus d'internalisation-maturation du BDNF au sein des astrocytes contribuerait au renforcement synaptique et à la consolidation mnésique (Bergami et al., 2008 ; Vignoli et al., 2021).

3.4 BDNF et sommeil

Nous avons vu que la complexité de la structure du gène *BDNF* conduit à une biosynthèse et une maturation complexes, dépendantes du tissu et du type cellulaire, et aboutit à plusieurs isoformes actives (Kowiański et al., 2018). La diversité des récepteurs à ces isoformes et les fortes interconnexions qui existent entre les voies de signalisation qu'ils activent (Fenner, 2012) contribuent aux effets pléiotropes du BDNF au sein du SNC. Ce dernier serait impliqué dans les mécanismes de régulation de nombreux processus comportementaux et plusieurs liens ont été établis entre BDNF et différentes pathologies telles que la dépression (Brunoni et al., 2008), la schizophrénie (Xiu et al., 2009), les troubles obsessionnels compulsifs (Maina et al., 2010) ou encore les troubles du comportement alimentaire (Mercader et al., 2007 ; Kaplan et al., 2008).

Au cours du vingtième siècle, des liens entre les neurotrophines et le sommeil ont été établis (Drucker-Colín et al., 1975) et c'est en 1999 que Kushikata et ses collaborateurs ont établi le premier lien entre BDNF et sommeil. L'étude porte sur l'injection intraventriculaire de BDNF chez des rats et des lapins, suivi de 23 h

d'enregistrement de sommeil (EEG, température cérébrale et activité motrice). Ainsi, l'injection intraventriculaire de BDNF augmente la durée de sommeil lent chez le rat et les durées de SL et de sommeil paradoxal chez le lapin (Kushikata et al., 1999).

Après cette découverte, peu d'études se sont, à ce jour, intéressées aux rôles du BDNF dans l'homéostasie du sommeil. Nous détaillerons dans cette partie l'essentiel de la littérature qui nous a permis de concevoir une potentielle implication du BDNF dans la régulation du sommeil.

3.4.1 BDNF sanguin chez l'homme

Chez l'homme, quelques études se sont intéressées aux taux de BDNF dans le sérum sanguin chez des patients. Une première a visé à déterminer les taux sanguins de BDNF chez des personnes atteintes de narcolepsie. La narcolepsie est un trouble neurologique caractérisé par des épisodes de sommeil excessifs pendant la période d'activité, associés à une cataplexie, à une fragmentation du sommeil (en période de repos) et à des paralysies pendant le sommeil. Ce phénotype serait, entre autres, dû à une dégénérescence des neurones à hypocretine dans l'hypothalamus latéral. Chez ces patients, des dosages ELISA ont montré que les taux sanguins de BDNF sont plus élevés que chez les sujets sains. Cependant, les mécanismes impliqués restent, à ce jour, inconnus (Klein et al., 2013). De plus, une étude récente a mis en évidence des taux sanguins de BDNF plus faibles chez les patients atteints d'insomnies (moins de 6 h de sommeil par nuit ; Furihata et al., 2020) et il a récemment été montré que l'insomnie est associée à une diminution des taux de pro- et de mBDNF dans le sérum sanguin (Sánchez-García et al., 2023).

Une dernière étude a entrepris des dosages du BDNF par ELISA dans le sérum de patients ont mis en évidence l'existence d'un rythme d'expression diurne de ce dernier. Les taux plasmatiques de BDNF sont plus élevés le matin, au début de la période d'activité, que la nuit (Begliomini et al., 2008).

Ainsi, chez l'homme, plusieurs liens complémentaires entre la durée de sommeil et le taux de BDNF dans le sérum sanguin ont été mis en évidence chez des patients sains et en conditions pathologiques, suggérant que le BDNF pourrait être impliqué dans l'homéostasie du sommeil.

3.4.2 BDNF et oscillations lentes

Les oscillations lentes du sommeil lent correspondent à une activité corticale EEG ayant une fréquence comprise entre 0,5 et 4 Hz associée à de grandes amplitudes crête à crête (voir § 1.1.2.2, p. 40). Elles représentent un marqueur caractéristique de la pression de sommeil et de sa qualité. Comme évoqué précédemment, le BDNF est impliqué dans la potentialisation synaptique (voir § 3.3, p. 92 à 97). Ainsi, il a été montré que plus les rats explorent leur environnement pendant l'éveil, plus l'expression de gènes liés à la plasticité synaptique est induite, dont *Arc*, *Homer* et *BDNF*. De plus, pour des rats restés éveillés pendant une même durée, ceux qui ont

le plus exploré présentent une intensification de la puissance spectrale des oscillations lentes pendant le sommeil suivant, qui est positivement corrélée à l'expression corticale de BDNF (Huber et al., 2007).

En 2008, Faraguna et ses collaborateurs ont étudié les effets d'une injection de BDNF dans le cortex de rats sur leur sommeil. Pour cela, des rats éveillés et libres de leurs mouvements ont reçu une injection de BDNF dans un hémicortex pendant que l'autre recevait une injection saline contrôle. Ces injections ont été effectuées peu de temps après le commencement de la phase lumineuse et les rats ont ensuite été exposés à un nouvel objet pendant une heure. Pendant les deux premières heures de sommeil, consécutives au test d'exposition au nouvel objet, les oscillations lentes enregistrées sont significativement plus puissantes dans l'hémicortex injecté avec du BDNF par rapport au controlatéral contrôle. L'effet observé est spécifique du sommeil lent et montre que l'injection locale de BDNF peut dissocier spécifiquement, et de manière réversible, l'intensité du sommeil lent entre les deux hémisphères corticaux, sans affecter ni la structure, ni la durée du sommeil (Faraguna et al., 2008).

3.4.3 BDNF et morphologie cellulaire

Tout comme le BDNF module les oscillations lentes du sommeil lent (voir ci-dessus), nous avons vu que les astrocytes auraient également un rôle dans la modulation de ces mêmes oscillations du SL (voir § 2.3.2, p. 76). De plus, les astrocytes modulent, via des changements de leur morphologie, l'activité synaptique et donc, à plus grande échelle, l'activité de réseaux neuronaux (voir § 2.4.2.3, p. 84). Dans le noyau supra-chiasmatique, les neurones-VIP (*Vasoactive Intestinal Peptide*) sont impliqués dans le processus de synchronisation de l'horloge interne avec la lumière extérieure. Or, il a été montré que, dans le SCN, la couverture astrocytaire des neurones VIP varie au cours du cycle veille/sommeil. De plus, le blocage pharmacologique spécifique de la signalisation TrkB, en utilisant des souris $\text{TrkB}^{\text{F616A}}$, abolit ces variations observées au cours du cycle lumière/obscurité (Girardet et al., 2013). Ainsi, la signalisation BDNF/TrkB est impliquée dans la régulation de la plasticité morphologique des astrocytes du SCN et pourrait être impliquée dans la synchronisation de l'horloge avec la lumière et donc dans l'homéostasie du sommeil.

3.4.4 BDNF et homéostasie du sommeil

De nombreux indices présentés précédemment laissent supposer que le BDNF pourrait avoir un rôle dans l'homéostasie du sommeil. Une première étude a mis en évidence une diminution de la durée totale de sommeil pendant la phase obscure (période d'activité) et un retard d'endormissement lors de la période de repos, chez des souris déficientes pour le BDNF. Ce phénotype induit également une diminution de l'expression génique de la corticostatine, un neuropeptide sécrété par un sous-ensemble de cellules GABAergiques (présentes dans le cortex et l'hippocampe) qui s'accumule avec le besoin de sommeil et qui promeut les oscillations lentes. Cette diminution de sommeil pendant la période d'activité des animaux, qui pourrait

correspondre à une altération des comportements de « sieste », et le délai du début de la période de repos suggère que le BDNF serait impliqué dans la régulation de ces comportements (Martinowich et al., 2011).

En plus de ce rôle supposé du BDNF évoqué ci-dessus, le récepteur TrkB.t1, l'isoforme la plus abondante dans la glie, serait également impliqué dans la régulation du sommeil. En effet, des souris TrkB.t1-KO (*Knock Out*), connues pour présenter une grande anxiété, présentent une durée de sommeil paradoxal accrue, une diminution de la latence à laquelle surviennent les épisodes de SP, ainsi qu'une plus grande fragmentation du sommeil se traduisant par des épisodes de sommeil et d'éveil plus courts (Watson et al., 2014).

Enfin, l'abolition de la régulation du gène *BDNF* par inactivation du promoteur IV induit une diminution de l'amplitude des oscillations lentes pendant le sommeil lent, dont une importante diminution de la puissance spectrale des ondes thêta. En revanche, le temps passé en SL par heure augmente, ce qui pourrait traduire un mécanisme de compensation de la diminution de qualité du sommeil observée (Hill et al., 2016).

3.4.5 Cas du polymorphisme Val66Met

Pour terminer, une dernière étude s'est penchée sur le cas du polymorphisme Val66Met du gène *BDNF* précédemment décrit au § 3.2 (p. 85), qui est, chez l'homme, assez fréquent, avec par exemple une fréquence de plus de 20 % en France en 2010 (Petryshen et al., 2010). Les patients possédant cet allèle présenteraient des modifications de l'activité EEG enregistrée pendant le sommeil et l'éveil. Ainsi, pendant l'éveil, les patients Val/Met auraient une puissance spectrale des ondes alpha doublée par rapport aux patients Val/Val ; pendant le sommeil paradoxal, l'activité des ondes alpha, thêta et sigma est plus importante chez les patients Val/Met. Enfin, pendant le sommeil lent l'activité EEG est plus faible dans la gamme des ondes delta à thêta chez les patients porteurs de l'allèle Met. De plus, au cours du sommeil, la puissance des oscillations lentes du sommeil lent diminue avec la succession des cycles de SL, jusqu'au réveil. Cependant, chez les patients Met, la puissance des oscillations lentes persisterait plus longtemps au cours des cycles de SL (Bachmann et al., 2012).

Finalement, l'ensemble de ces données suggère que le BDNF serait impliqué dans la régulation de l'homéostasie du sommeil. Ses rôles dans ce processus restent, à ce jour, méconnus et en font un candidat à étudier.

4 Objectifs de thèse

Dans cette introduction, nous avons tout d'abord décrit les caractéristiques comportementales et macroscopiques du sommeil chez les mammifères. Nous avons décrit l'état de l'art concernant la neuroanatomie et la neurochimie du sommeil en nous focalisant particulièrement sur l'aire préoptique, une région de l'hypothalamus antérieur et plus particulièrement sur le noyau préoptique ventrolatéral. Ce dernier comporte des neurones galaninergiques promoteurs du sommeil, notamment impliqués dans le maintien du sommeil lent. Nous avons décrit l'équilibre entre les deux états comportementaux stables que sont l'éveil et le sommeil. Le passage de l'un à l'autre de ces états stables est rapide et implique des interactions inhibitrices réciproques entre les structures promotrices de l'éveil et celles promotrices du sommeil. Nous avons conclu cette première partie sur les fonctions, à ce jour, connues et supposées du sommeil, un processus biologique qui reste largement méconnu.

Dans une seconde partie, nous nous sommes intéressés à la contribution des astrocytes, cellules gliales abondantes dans le SNC, dans le cadre de l'homéostasie du sommeil. Nous avons vu que les astrocytes sont organisés en domaines non chevauchants et forment, via les jonctions communicantes, un continuum cytoplasmique. Ils communiquent notamment via des signaux calciques qui prennent la forme de vagues, qui se propagent au sein du réseau, et via la gliotransmission, un mécanisme de sécrétion de petites molécules et de peptides. De nombreux rôles sont prêtés aux astrocytes. Nous avons particulièrement détaillé leur implication dans la transmission synaptique, notamment au travers du concept de synapse tripartite. Ce dernier leur confère une place de choix, au plus près de la synapse, leur permettant de moduler et de réguler la transmission synaptique et l'excitabilité neuronale. Parmi les fonctions des astrocytes, nous avons décrit un certain nombre lié au sommeil, comme la sécrétion de gliotransmetteurs hypnogènes ou encore la modulation des oscillations lentes du sommeil lent. Enfin, nous nous sommes intéressés à la connexine 30, une protéine majoritairement exprimée par les astrocytes et constitutive des jonctions communicantes. Nous avons vu ses fonctions canal et aussi non canal, notamment son implication dans la modulation de l'invasion des prolongements astrocytaires dans la fente synaptique dans l'hippocampe, mécanisme impliqué dans la régulation de la transmission glutamatergique.

Enfin, nous avons conclu cette introduction avec le *Brain-Derived Neurotrophic Factor*, cette neurotrophine largement répandue dans le SNC des mammifères. Nous avons décrit sa synthèse et sa maturation multiétapes qui conduit à l'expression de plusieurs isoformes actives. Ces dernières ayant des affinités pour différents récepteurs, dont le plus abondant dans le SNC et le plus décrit est le récepteur kinase B à la tropomyosine (TrkB). Ce dernier possède également plusieurs isoformes pouvant s'homodimériser ou s'hétérodimériser et qui transduisent plusieurs voies de signalisation fortement interconnectées. Ainsi, pour toutes ces raisons, le BDNF présente des effets pléiotropes au sein du SNC et peut souvent conduire à des résultats opposés. Nous

avons terminé par décrire des études qui ont permis d'établir des liens entre BDNF et sommeil, un domaine encore peu étudié et largement méconnu.

Aux vues de la littérature, notre hypothèse est qu'au sein du VLPO, l'activité du réseau des neurones promoteurs du sommeil lent pourrait être régulée par le BDNF. Ce mécanisme hypothétique impliquerait la régulation de l'excitabilité neuronale au niveau synaptique par la plasticité morphologique circadienne des astrocytes du VLPO. Nous supposons que ces variations morphologiques des astrocytes du VLPO seraient médiées par le BDNF et prendraient part à la régulation de l'homéostasie du sommeil.

Les objectifs de ma thèse sont les suivants : (i) caractériser la plasticité morphologique des astrocytes du VLPO au cours du cycle L/D, (ii) étudier, *ex vivo*, les effets du BDNF sur cette plasticité morphologique et l'implication de la Cx30 dans ce processus, (iii) décrire l'expression du BDNF au cours du cycle L/D ainsi que (iv) son origine cellulaire, et enfin (v), *in vivo*, déterminer les effets du BDNF et de la Cx30 sur le sommeil.

Le matériel et les méthodes utilisées lors de ces travaux seront décrits dans le chapitre suivant dédié. Nous détaillerons ensuite, dans un troisième chapitre, les résultats obtenus au cours de ces 4 ans de thèse. Enfin, nous conclurons ce manuscrit avec une conclusion suivie d'une discussion des résultats obtenus.

Seconde Partie

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Animaux

Plusieurs lignées de souris ont été utilisées pour les différentes expérimentations. Pour les immunomarquages, analyses morphologiques, western blots, FISH et incubations avec du BDNF des mâles et des femelles ont été utilisés. Pour les injections *in vivo* de BDNF, seuls des mâles ont été utilisés. Des souris C57BL/6 ont été utilisées pour les expérimentations *in vivo* (âgées de 8 à 12 semaines, n = 16 ; Charles River) ainsi que pour les hybridations *in situ* d'ARN (FISH, n = 12 ; Charles River). Les souris Gal-GFP utilisées dans ce projet (Tg[Gal-EGFP]HX109Gsat/Mmucd, 016342-UCD, n = 18) proviennent du *Mutant Mouse Regional Resource Center (USA ; Gong et al., 2003)*. Les GFAP-GFP et GFAP-GFP-Cx30^{Δ/Δ} (déficientes pour la Cx30) issues du laboratoire ont été utilisées à P40-50 pour l'étude de la morphologie des astrocytes du VLPO. Dans cette lignée, la eGFP, placée sous le contrôle du promoteur de la *Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)*, est exprimée de manière stochastique dans environ 10 à 15 % des astrocytes, permettant de visualiser l'ensemble des prolongements astrocytaires et leur domaine. Enfin, pour étudier les effets de la délétion spécifique de la connexine 30 dans l'aire préoptique, des souris Nkx2.1^{cre}-Cx30^{fl/fl} ont été obtenues en croisant des mâles Nkx2.1^{cre} (Tg[Nkx2-1-cre]2Sand ; Xu et al., 2008) avec des femelles Cx30^{fl/fl} (Gjb6^{tm1Mcsa} ; Boulay et al., 2013). L'expression de la Cx30 est constitutivement abolie dans l'aire préoptique de ces souris.

Les souris ont été hébergées dans l'animalerie du Collège de France ou de l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA) dans des pièces à la température contrôlées (20-22 °C) sous un cycle de lumière-obscurité de 12 heures avec un accès *ad libitum* à la nourriture et l'eau. Le début de la phase lumineuse (période d'activité) était à 8:00 (Zeitgeber Time 0 ; ZT-0) tandis que le début de la phase obscure était à 20:00 (Zeitgeber Time 12 ; ZT-12). Certaines études ayant nécessité de perfuser des animaux à des moments précis du cycle d'alternance lumière/obscurité (L/D), des décyclages ont été effectués dans des pièces ou des armoires à décycliser dédiées. Les souris ont eu au minimum 1 journée d'habituation par heure de décyclage. Pour l'exposition à un cycle de lumière (L/L) ou d'obscurité (D/D) constante, les animaux ont été placés pendant 14 jours dans ces conditions. Dans les expérimentations nécessitant des chirurgies, les animaux sont arrivés au laboratoire 2 semaines avant l'intervention. Toutes les expérimentations impliquant des animaux ont été conduites conformément aux Directives du Conseil de la Communauté Européenne du 1^{er} janvier 2013 (2010/63/EU) et du comité d'éthique français (approbation éthique n° 26644-2019092221129408 v2 et 23917-2020020117038006 v5 autorisation délivrées par le Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche).

Préparation des coupes de VLPO

Coupes aiguës

Les souris ont été sacrifiées par décapitation. Les cerveaux ont été rapidement extraits – sans retirer les méninges – puis immergés 1 à 2 min dans du liquide céphalorachidien artificiel (aCSF, 4 °C) contenant (en mM : 130 NaCl ; 5 KCl ; 2,4 CaCl₂ ; 20 NaHCO₃ ; 1,25 KH₂PO₄ ; 1,3 MgSO₄ et 10 D-glucose (pH = 7,35). Des tranches coronales de 100 µm d'épaisseur contenant le VLPO ont été réalisées à l'aide d'un vibratome (VT2000S, Leica).

Coupes fixées

Les tissus à prélever ont tout d'abord été fixés par perfusion intracardiaque. Les souris ont été anesthésiées profondément (Pentobarbital, Euthasol® 150 mg·kg⁻¹). Dès que l'animal ne manifestait plus de réflexes aux stimulations plantaire et caudale, il a été perfusé à l'aide d'une pompe péristaltique dans le ventricule gauche avec du PBS 1X puis avec du paraformaldéhyde (PFA) à 2 ou 4 %, selon l'utilisation ultérieure des coupes, pendant au moins 2 min. Le cerveau a ensuite été prélevé et incubé la nuit en PFA (2 ou 4 %) à 4 °C. 48 h avant la coupe, les cerveaux ont été placés dans une solution de PBS 1X, sucrose 30 % à 4 °C. Des coupes de 80 µm ont ensuite été réalisées au microtome à congélation (HM450, Thermo Fisher Scientific) de manière à couvrir le VLPO, soit entre Bregma 0,26 mm et Bregma 0,10 mm. Les coupes flottantes ont ensuite été conservées dans du PBS 1X, azide de sodium 0,001 %.

Immunohistologie

Les coupes ont été rincées 2 fois 15 min avec du PBS 1X à température ambiante (θ_A) puis incubées 1 h (θ_A) avec la solution de blocage/perméabilisation (B/P ; PBS 1X, BSA 1 mg·ml⁻¹, NGS 0,2 %, Triton X-100 0,30 %) sous agitation. Les coupes ont été incubées la nuit avec les anticorps primaires (1:500 en solution B/P ; *chicken* anti-GFP AVES 1020, *mouse* anti-Cx30 Invitrogen 332500, *mouse* anti-mBDNF Abcam ab203573, *rabbit* anti-proBDNF Thermofisher PA5-77533, *rabbit* anti-phospho-TrkB (Tyr816) Sigma ABN 1381, *rabbit* anti-Cx43 Invitrogen 71-0700, *rabbit* anti-S100 Sigma-Aldrich 2644, *rabbit* anti-Iba1 WAKO-Sigma-Aldrich SAB5701363). Les anticorps primaires ont été rincés 2 fois 30 min avec la solution B/P à θ_A sous agitation puis les coupes ont été incubées avec les anticorps secondaires (1:1000 en solution B/P ; *goat* anti-*chicken* Alexa Fluor 488 Invitrogen A11039, *goat* anti-*mouse* Alexa Fluor 555 Life Technologies A21424, *goat* anti-*rabbit* Alexa Fluor 555 Life Technologies A21428, *goat* anti-*rabbit* Alexa Fluor 647 Life technologies A21235) 2 h à θ_A sous agitation et à l'abri de la lumière. Enfin, les coupes sont lavées 2 fois 30 min en PBS 1X (θ_A , agitation) puis montées entre lame et lamelle (Superfrost) avec du fluoromount-G (Invitrogen™ 00-4958-02). Les images ont été acquises au spinning disk W1 (Zeiss Axioobserver Z1 *with motorized XYZ stage* ; CSUW11 [Yokogawa] *spinning-disk scan head*). La mise au point a été réalisée

avec des objectifs 25X, 40X et 63X à immersion d'huile, de manière à couvrir le VLPO. Les fluorophores ont été excités avec des faisceaux LASER de longueurs d'onde 405, 491, 561 et 642 nm et l'acquisition des images a été effectuée grâce au logiciel MetaMorph (v.7.8, Molecular Devices). Des séries selon l'axe Z ont été acquises avec un pas de 200 nm afin de permettre des analyses tridimensionnelles. Si cela le nécessitait, les images ont été déconvoluées (Huygens Essential, Scientific Volume Imaging) avant d'être exploitées. Enfin, les images ont été analysées à l'aide d'Imaris (v.9.7.2, Bitplane, Oxford Instruments) et du logiciel Fiji (ImageJ, 1.52r et ultérieur) en utilisant des plugins que j'ai créés :

- github.com/gus-lw/zStack_Fluorescence_Quantification
- github.com/gus-lw/zStack_3D_Density

Analyses morphologiques

Les reconstructions tridimensionnelles des astrocytes à partir des coupes de VLPO de souris GFAP-GFP et GFAP-GFP-Cx30^{Δ/Δ} ont été réalisées avec le logiciel Imaris (v.9.7.5, Bitplane, Oxford Instruments). Plusieurs paramètres attrayants à la taille et la complexité des cellules ont été calculés à partir de ces reconstructions. Le *Convex Hull* correspond au volume maximal qu'occupe l'astrocyte dans l'espace (μm^3). Le paramètre *filament length* représente la longueur cumulée totale de tous les prolongements de l'astrocyte et le *filament branch level* est le plus grand nombre d'embranchements mesuré à partir du soma de l'astrocyte. A partir des reconstructions, des analyses de Sholl ont été effectuées. Cette analyse consiste en mesurer le nombre d'intersections des prolongements astrocytaires avec des sphères concentriques partant du soma et, ici, avec un pas de 5 μm entre chaque sphère (**Figure 25 A**). A partir du nombre d'intersections en fonction de la distance au soma (en μm ; **Figure 25 B**), l'aire sous la courbe a été calculée à l'aide du script Python suivant : github.com/gus-lw/AUC-Python. L'indice de complexité (*Complexity Index*, CI) est une grandeur que nous avons créé pour ces analyses. Il correspond au nombre d'intersections mesuré à deux distances au soma où des maxima du nombre d'intersection sont atteints pour la majorité de nos cellules, soit 15 et 20 μm , noté respectivement CI¹⁵ et CI²⁰ (**Figure 25 B**, CI¹⁵ et CI²⁰). La distance du maximum de complexité par rapport au soma (*distance of max complexity from soma*) correspond à la distance à laquelle est observé le nombre maximal d'intersections sur le Sholl d'un astrocyte (**Figure 25 B**, Int_{max}). Enfin, le *Shoenen Ramification Index* (SRI) correspond au ratio entre le nombre maximal d'intersections (sur le Sholl de l'astrocyte) et le nombre de prolongements primaires (ici le nombre d'intersections sur le Sholl à 5 μm du soma ; Garcia-Segura et Perez-Marquez, 2014).

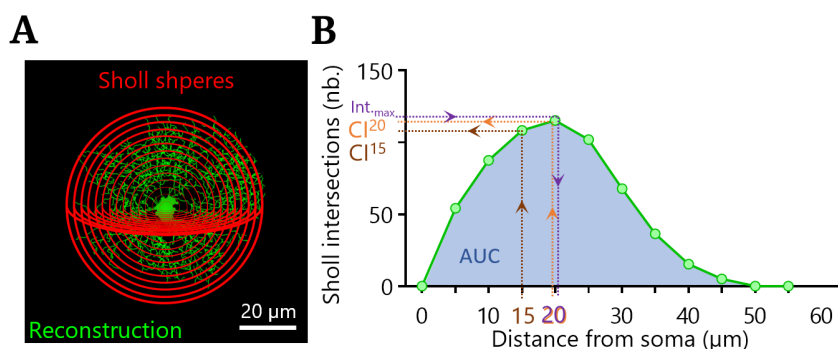


Figure 25 : Exemple d'analyse de Sholl et des différents paramètres mesurés. **A.** Astrocyte reconstruit avec Imaris en vert. Représentation en rouge des sphères concentriques utilisées pour l'analyse de Sholl ($dr = 5 \mu\text{m}$). **B.** Graphique illustrant un exemple de Sholl sur $n = 39$ astrocytes. Le nombre d'intersection est tracé en fonction de la distance au soma. L'aire sous la courbe est représentée en bleu (AUC). Les index de complexité à 15 (CI^{15}) et à 20 μm (CI^{20}) sont représentés en orange foncé et clair. Enfin, la distance du maximum de complexité, c-à-d. la distance au soma à laquelle se trouve le nombre maximal d'intersections, est représenté en violet.

Microscopie électronique à haute pression à froid

Des coupes de cerveaux de souris C57BL/6 de 70 μm d'épaisseur ont été réalisées à ZT-0 et ZT-12. Le VLPO a ensuite été disséqué sous loupe binoculaire et placé dans une capsule pour être immédiatement pressurisé à haute pression, à froid. Après cryosubstitution et vérifications, les échantillons ont été imagés (117 clichés à ZT-0 et 70 à ZT-12, grossissement de 20500) en microscopie électronique à l'Institut de Biologie de l'École Normale Supérieure (IBENS, coll. P. Rostaing ; Rostaing et al., 2004).

Les images de microscopie électronique ont été segmentées pour séparer le milieu intracellulaire du milieu extracellulaire par une méthode semi-automatique utilisant le logiciel de traitement d'image ilastik (*the ilastik developers*) et Fiji (ImageJ). Après identification des membranes plasmiques et du milieu extracellulaire sur au moins 20 images, l'ensemble des images ont pu être segmentées. À partir des images segmentées, la surface du milieu extracellulaire a été mesurée dans ImageJ et rapportée à la surface totale de la région d'intérêt (*Region of Interest*, ROI).

Western blots

Des coupes aiguës de cerveaux de souris Gal-GFP de 500 μm d'épaisseur ont été faites à ZT-0, 4, 8, 12, 16 et 20. À l'aide d'une loupe binoculaire à épifluorescence (SMZ 1550, Nikon), les VLPO ont été prélevés en se limitant à la fluorescence de la GFP. Les échantillons ont été immédiatement placés à $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ en attendant d'être utilisés. Les VLPO ont été lysés par sonication (10 s, $4 \text{ }^\circ\text{C}$) dans une solution de

SDS (2 %), orthovanadate (1 %), β G (1 %), inhibiteur de protéases (10 %). Les protéines ont été ensuite récupérées par centrifugation (5 min, 1400 RPM, 4 °C), les surnageants collectés et du Laemmli 5X a été ajouté (30 % du volume de surnageant). Les échantillons ont été mis à bouillir au bain-marie pendant 2 à 3 minutes. Environ 20 μ g d'extrait de protéines totales ont été déposés dans les puits de gels SDS-PAGE (8-12 % ; NuPAGE Novex Bis-Tris gel, Invitrogen), puis, après l'électrophorèse, ont été transférés sur une membrane de nitrocellulose (*Transfert kit*, Invitrogen) avant hybridation avec l'anticorps primaire anti-Cx30 (*rabbit*, Life Technologies, 712200). Les données ont été normalisées avec l'expression de la β -actine et quantifiées dans Fiji (ImageJ).

Incubation des coupes de VLPO avec du BDNF

Les coupes aiguës de VLPO ont été incubées 2 h dans une solution bullant (carbo-gène) comportant de l'aCSF, du sérum d'albumine bovin (BSA, 2 mg.ml⁻¹) et du BDNF (Preprotech, 450-02) à 20 ng.ml⁻¹. Les coupes contrôles ont été incubées dans une solution bullante d'aCSF et de BSA 2 mg.ml⁻¹. A l'issue de l'incubation, les coupes ont été fixées la nuit en PFA 2 %.

Hybridation in situ d'ARNm (FISH)

Le FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization of mRNA*) a été réalisé sur des coupes de tissu de souris congelées perfusées avec du PFA 4 % selon la procédure RNAscope (Advanced Cell Diagnostics, Newark, Ca, USA). Pour l'hybridation, les sondes suivantes ont été utilisées : Mm-Gal-C3 (400961-C3), Mm-Bdnf-C1 (424821), Mm-NTRK2-C2 (423611-C2), Mm-Slc32a1-C2 (319171-C2) et Mm-Slc32a1-C2 (319191-C2 ; RNAScope®, ACD-Biotechnie). Des immunomarquages post-FISH ont été effectués en se référant au protocole d'immunomarquages précédent (anticorps primaires 1:500, *rabbit* anti-S100 Sigma-Aldrich 2644, *rabbit* anti-Iba1 WAKO-Sigma-Aldrich SAB5701363, *rabbit* anti-GFAP Sigma-Aldrich G9269 ; anticorps secondaires 1:1000, *goat* anti-*rabbit* Alexa Fluor 647 Life technologies A21235). Les cellules marquées ont été imagées avec un spinning disk W1 (*Zeiss Axioobserver Z1 with motorized XYZ stage ; CSUW11 [Yokogawa] spinning-disk scan head*). La mise au point a été réalisée avec des objectifs 25X et 63X à immersion d'huile, de manière à couvrir le VLPO. Les fluorophores ont été excités avec des faisceaux LASER de longueurs d'onde 405, 491, 561 et 642 nm et l'acquisition des images a été effectuée grâce au logiciel MetaMorph (v.7.8, Molecular Devices). Des séries selon l'axe Z ont été prises avec un pas de 200 nm afin de permettre des analyses tridimensionnelles puis les images ont été déconvoluées (Huygens Essential, Scientific Volume Imaging) avant d'être et analysées avec le logiciel Fiji (ImageJ, 1.52r et ultérieur) en utilisant un plugin que j'ai créé (github.com/gus-lw/zStack_3D_Density).

Micro-injections in vivo de BDNF dans le VLPO

Pour étudier les effets de l'injection de BDNF dans le VLPO sur le sommeil, 32 souris C57Bl6 (de 10 semaines ; Charles River) ont été anesthésiées : induction sous isoflurane (4 %), injection intrapéritonéale de buprénorphine ($0,05 \text{ ml} \cdot 10 \text{ g}^{-1}$), de caprophène (Rimadyl® ; $0,05 \text{ ml} \cdot 10 \text{ g}^{-1}$). L'animal a été maintenu sous isoflurane 2 %, la zone d'incision a été rasée et de la lidocaïne injectée en sous cutanée ($0,04 \text{ ml} \cdot 20 \text{ g}^{-1}$) au niveau de la zone d'incision. Un double guide-canules (26 G ; Plastics One) a été implanté 1 mm avant le VLPO (AP : 0,1 mm ; ML : 0,7 mm ; DV : 4,5 mm ; Franklin et Paxinos 2008) et fixé au crâne à l'aide de Super-Bond® puis avec du ciment dentaire (Paladur).

Après 10 jours de récupération et 2 semaines d'habituation à la manipulation du guide canule, à la contention et à la procédure expérimentale dans son ensemble, 8 animaux ont reçu l'injection du véhicule (solution saline [NaCl $9 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$], *Bovine Serum Albumin* [BSA] $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, 500 nl par VLPO à $100 \text{ nl} \cdot \text{min}^{-1}$) à ZT-0 tandis que 8 autres l'ont reçu à ZT-12. Leur quantité de sommeil a ensuite été enregistrée pendant 24 h dans les cages piézoélectriques (voir paragraphe suivant). Une semaine plus tard, les 8 mêmes animaux ont reçu une injection de BDNF (saline, BSA $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, BDNF [Preprotech, 450-02] $20 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$, 500 nl par VLPO à $100 \text{ nl} \cdot \text{min}^{-1}$) à ZT-0 et les 8 autres à ZT-12. Leur quantité de sommeil a ensuite été enregistrée pendant 24 h, immédiatement après l'injection. Enfin, les animaux ont été sacrifiés et une étude histologique de l'implantation des guide-canules a été menée de manière à valider les animaux dont l'implantation cible correctement le VLPO ($n_{\text{ZT-0}} = 6$, $n_{\text{ZT-12}} = 5$; **Figure 26**).

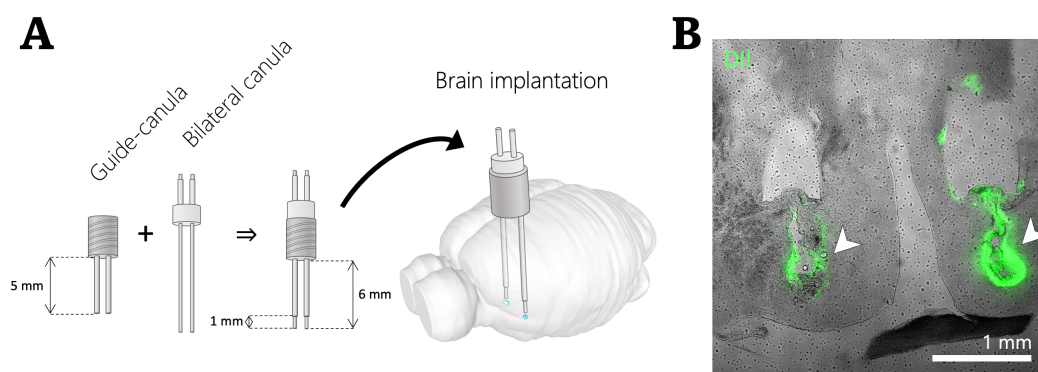


Figure 26 : Implantation du guide canule ciblant le VLPO et contrôles histologiques d'implantation. **A.** Illustration (de gauche à droite) du double guide-canules, de la double canule et du dispositif implanté ciblant les deux VLPO. Le guide-canules est plus court que la double canule de manière à éviter d'endommager le VLPO lors de l'implantation. La projection de 1 mm des canules permet de délivrer les composés injectés au plus près de chaque VLPO. **B.** Image confocale en lumière de champ et autofluorescence du Dil (ThermoFisher scientific, D3911), injecté en *post-mortem*. Les flèches pointent le site de projection des canules.

Enregistrement du sommeil en cages piézoélectriques

La quantité de sommeil ainsi que la durée et le nombre d'événements de sommeil et d'éveil des souris ont été enregistrés en utilisant un dispositif de cages piézoélectriques individuelles (*Sleep Monitoring System for Mice*, Signal Solutions) et le logiciel d'acquisition PiezoSleep (Signal Solutions ; Mang et al. 2014). Les souris sont placées individuellement dans une cage avec accès *ad libitum* à l'eau et à la nourriture pendant 24 heures. Brièvement, un film piézoélectrique est placé au fond de la cage et transduit les mouvements de l'animal en signal électrique. Lorsque l'animal est immobile, le système PiezoSleep extrait la fréquence respiratoire de l'animal et va calculer un ensemble de *features*. Ces derniers permettent de calculer une décision statistique qui prend des valeurs positives lorsque l'animal est endormi et négatives lorsqu'il est éveillé immobile ou éveillé en mouvement (**Figure 27 A**). Pour un enregistrement d'au moins 24 h, la distribution de la décision statistique associée à un animal est bimodale (deux comportements enregistrés : l'éveil et le sommeil) et le point d'inflexion de la courbe de distribution permet de déterminer le seuil séparant l'état d'éveil du sommeil (**Figure 27 B**). La durée de sommeil ainsi que la durée et le nombre d'événements de sommeil et d'éveil ont été calculés pour chaque animal à l'aide de la suite d'outils d'analyse SleepStats (Signal Solutions) et de scripts Python maison.

Analyses statistiques

Les données ont été analysées en utilisant les logiciels Excel (Office 2019, Microsoft corp.), GraphPad Prism 9 (v.9.5, GraphPad Software LLC) et Python (Python 3, PyCharm 2022.2.3 [Community Edition], JetBrains s.r.o.). Les valeurs aberrantes ont été identifiées en utilisant l'écart médian absolu (*Median Absolute Deviation*, MAD). Les valeurs n'appartenant pas à l'intervalle $[[Med - 3 \cdot MAD; Med + 3 \cdot MAD]]$ ont été exclues (Leys et al., 2013). Le programme que j'ai développé au cours de ma thèse pour calculer la MAD peut être téléchargé à l'adresse suivante : github.com/gus-lw/MAD-Calculator.

L'ensemble des résultats est présenté sous la forme de nuage de points – la nature des points est précisée dans les légendes – où la barre horizontale représente la moyenne et la variabilité des échantillons est représentée par l'écart standard à la moyenne (SEM). Les tests statistiques réalisés pour chaque jeu de données sont explicités dans la légende correspondante et les *P-values* sont définies comme suit : $0,05 \leq P^* < 0,01$; $0,01 \leq P^{**} < 0,001$; $0,001 \leq P^{***} < 0,0001$; $0,0001 \leq P^{****}$.

Le taux de variations entre deux mesures comparées a été calculé de la façon suivante : $T_v = \frac{V_2 - V_1}{V_1} \cdot 100$ avec V_1 et V_2 , les valeurs à comparer.

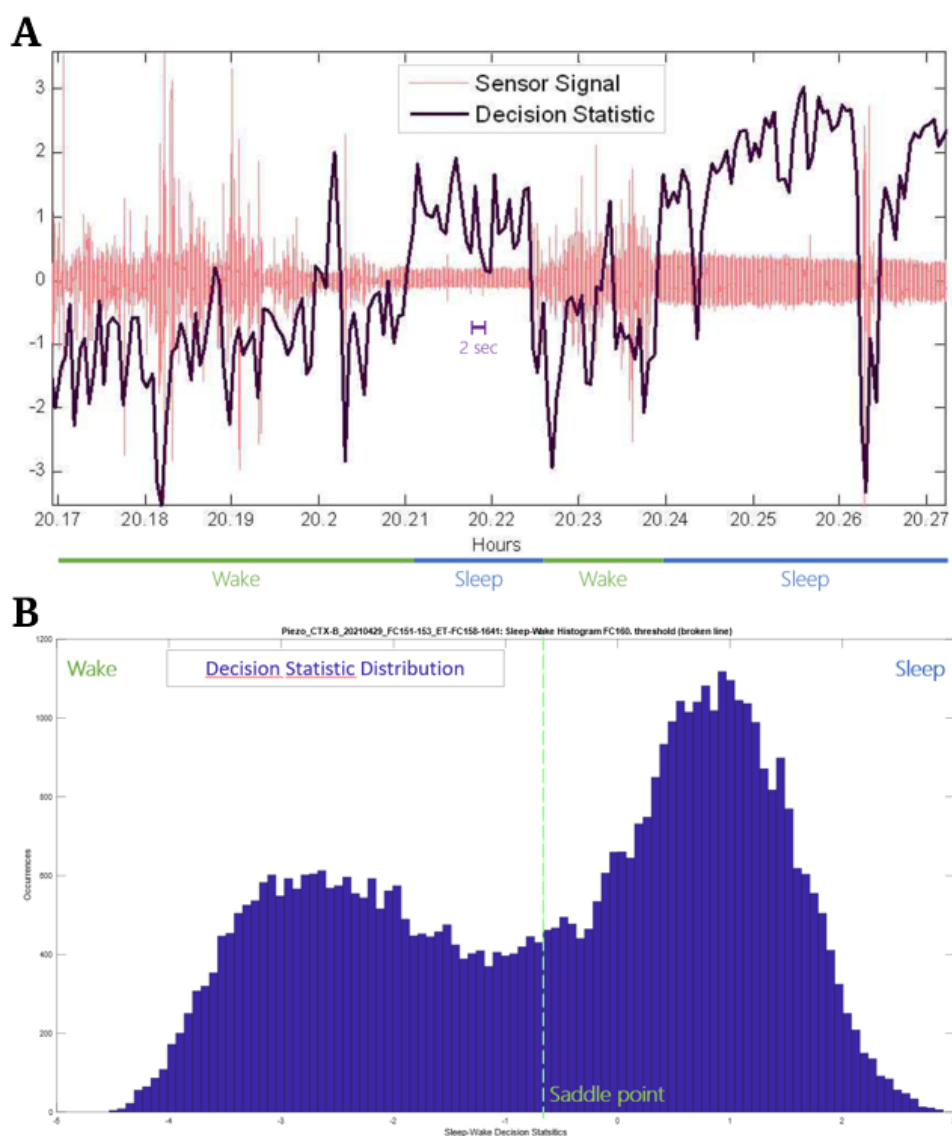


Figure 27 : Exemple de signal piézoélectrique enregistré et de calcul de la décision statistique. A. La décision statistique (courbe violette) est calculé à partir du signal piézo brut (courbe rouge). Elle prend des valeurs positives quand la souris est endormie et négatives lorsqu'elle est éveillée. **B.** Histogramme de la décision statistique d'un enregistrement de 24 h. La distribution est bimodale car le système piézo détecte deux états : l'éveil et le sommeil. Le seuil délimitant l'état d'éveil du sommeil (barre pointillée verte) est calculé à partir du point d'inflexion de la courbe de distribution de la décision statistique.

La périodicité des variations de nos mesures au cours du L/D a été évaluée en appliquant le test de Rayleigh-Moore à nos données (Moore, 1980). Brièvement, les

données mesurées toutes les 4 heures au cours du cycle L/D sont transformées en coordonnées polaires sur le cercle trigonométrique. L'angle correspond alors au ZT et la norme au rang des valeurs mesurées. Chaque vecteur étant ainsi défini, leur somme vectorielle est calculée. L'hypothèse nulle est que les N vecteurs indépendants ont une distribution circulaire uniforme. La P-value associée est calculée comme suit :

$$P = 2 \cdot e^{-6 \cdot R^{*2} N^2 \cdot (N+1)^{-1} \cdot (2N+1)^{-1}} \text{ avec } \begin{cases} R^* = R/N^{3/2} \\ R = \sqrt{X^2 + Y^2} \end{cases}, \text{ } X \text{ et } Y \text{ étant les coordonnées cartésiennes de la somme vectorielle des données transformées.}$$

Deux P-values ont été calculées à partir de cette formule. La première est liée à la première harmonique de la distribution et correspond à la périodicité du signal sur un intervalle de 24 h (notée P^{24}). La seconde est liée à la 2nde harmonique de la distribution et correspond à la périodicité du signal sur 12 h (notée P^{12}). Sur les figures, les *P-values* relatives aux analyses de R-Moore sont définies comme suit : $0,05 \leq P^\diamond < 0,01$; $0,01 \leq P^{\diamond\diamond} < 0,001$; $0,001 \leq P^{\diamond\diamond\diamond} < 0,0001$; $0,0001 \leq P^{\diamond\diamond\diamond\diamond}$. La valeur crête maximale de la sinusoïde, modélisant la variation périodique, est indiquée par une flèche (\blacktriangledown).

Dans le cas de deux jeux de données exprimant une périodicité au cours du cycle veille/sommeil, leur décalage temporel a été calculé en quantifiant le déphasage crête à crête des deux signaux. En d'autres termes, les données polaires de chaque jeu de données ont été sommées vectoriellement et le déphasage a été défini comme la différence de phase entre ces deux vecteurs résultants.

Troisième Partie

RÉSULTATS

Dans cette troisième partie, je présente l'essentiel de mes résultats, sur la plasticité morphologique des astrocytes et leurs rôles dans la régulation du sommeil. Mes travaux de thèse seront intégrés dans un manuscrit en cours d'élaboration qui sera prochainement soumis. Ainsi, dans l'optique de la rédaction de ce manuscrit, l'ensemble des figures est rédigé en anglais. Cependant, les légendes sont rédigées en français et certains éléments sont traduits.

J'ai par ailleurs également participé à 4 autres études, dont les publications sont disponibles en annexe.

Dans la première, intitulée *Structural and functional connections between the median and the ventrolateral preoptic nucleus* (Walter et al., 2019), j'ai effectué les immunomarquage, les reconstructions tridimensionnelles ainsi que les comptage de synapses et les mesures des longueurs des fibres du MnPO au VLPO en fonction de différents angles de coupes. La technique de coupe permettant de conserver le faisceau de fibres du MnPO qui afférente le VLPO n'a pas été utilisée dans mes travaux de thèse car nous n'avons pas étudié la connectivité fonctionnelle entre ces deux structures. Les coupes de VLPO ont donc été réalisées avec un angle de 90° et sont donc parfaitement coronales.

Dans la seconde étude, *Neuropeptide S promotes wakefulness through the inhibition of sleep-promoting ventrolateral preoptic nucleus neurons* (Chauveau et al., 2020), j'ai réalisé des marquage *in situ* des ARNm du récepteur au neuropeptide S (NPSR) ce qui nous a permis de montrer que ce dernier est, dans le VLPO, abondamment exprimé par les neurones galaninergiques GABAergiques.

Au sein de la troisième étude, *Prostaglandin D₂ controls local blood flow and sleep-promoting neurons in the VLPO via astrocyte-derived adenosine* (Scharbarg et al., 2023), j'ai immunomarcqué le récepteur à l'adénosine A_{2A} sur des coupes de VLPO issues de souris Gal-GFP (qui expriment la GFP sous le contrôle du promoteur de la galanine). Ainsi, nous avons montré que A_{2A}R est exprimé par les neurones galaninergiques promoteurs du sommeil du VLPO.

Enfin, au sein de la dernière étude, *Upregulation of astroglial connexin 30 impairs hippocampal synaptic activity and recognition memory* (Hardy et al., 2023), ma contribution a été de reconstruire en trois dimensions – à partir des cerveaux que j'ai préalablement transgénés – et de mesurer le volume de l'hippocampe ainsi que le volume contenant les cellules transfectées par le vecteur viral. Nous avons ainsi pu estimer le pourcentage du volume de l'hippocampe transfecté par le vecteur viral.

1 Plasticité morphologique des astrocytes du VLPO au cours du cycle L/D

Parmi les nombreuses fonctions des astrocytes, nous avons vu qu'ils sont impliqués dans la modulation de l'activité neuronale via différents mécanismes. L'un de ces processus implique, au sein de la synapse tripartite, le phénomène de plasticité morphologique des astrocytes qui régule la transmission synaptique par la présence des prolongements astrocytaires au voisinage de la fente synaptique (Theodosios et al., 2008 ; Pannasch et al., 2014). De plus, il a récemment été démontré au niveau cortical que pendant le sommeil, l'espace interstitiel augmentait, ce qui pourrait impacter la taille des cellules. Afin de déterminer si des changements morphologiques des astrocytes du VLPO pourraient participer à la régulation des activités synaptiques, j'ai tout d'abord vérifié s'il existait une modulation de la taille et de la complexité des astrocytes au cours du cycle d'alternance lumière/obscurité (L/D). Dans notre étude, la taille des astrocytes est décrite par le *convex Hull*, tandis que leur complexité est décrite par l'ensemble de paramètres suivants : le *filament length*, le *filament branch level*, et à partir des analyses de Sholl, l'*AUC*, les index de complexité (CI^{15} et CI^{20}), la distance au soma du maximum de complexité et le SRI. Pour cela, j'ai utilisé des souris GFAP-GFP qui expriment la eGFP sous le contrôle du promoteur de la GFAP. Ce modèle présente l'avantage d'exprimer la eGFP de manière stochastique dans 10 à 15 % des astrocytes, permettant une visualisation de l'ensemble du domaine astrocytaire et des contours des domaines.

1.1 Taille et complexité des astrocytes du VLPO au cours du cycle L/D

En étudiant la morphologie en 3D des astrocytes du VLPO toutes les 4 h au cours du cycle L/D (**Figure 28 A**), j'ai pu mettre en évidence que le volume qu'occupe les astrocytes augmente progressivement au cours de la période lumineuse, puis diminue au cours de la phase obscure. Il en est de même pour la longueur cumulée totale des prolongements astrocytaires (**Figure 28 B** ; *convex Hull*, ANOVA 1 facteur, $P < 0,0001$; *filament length*, test de Kruskal-Wallis, $P < 0,0001$), l'aire sous la courbe des analyses Sholl (**Figure supp. 1 A**) ainsi que l'index de complexité à 20 μm (CI^{20}) (**Figure 28 B** ; *Sholl AUC*, test de Kruskal-Wallis, $P < 0,0001$; *complexity index*²⁰, test de Kruskal-Wallis, $P < 0,0001$). De plus, j'ai pu mettre en évidence que le *convex Hull*, le *filament length*, et l'aire sous la courbe du Sholl présentent des variations périodiques sur 24 h associées à des maxima à ZT-8 (analyse de Rayleigh-Moore, *convex Hull* : $P^{24} = 0,0216$; *filament length* : $P^{24} = 0,0221$; *sholl AUC* : $P^{24} = 0,0030$; CI^{20} : $P^{24} = 0,0792$) et sont en phase. Ainsi, au cours du cycle d'alternance jour/nuit, les astrocytes du VLPO présentent des variations de taille et de complexité caractérisées par un maximum atteint en fin de période lumineuse et un minimum en fin de période obscure. La souris dormant principalement pendant la période lumineuse, ces résultats suggèrent que les astrocytes du VLPO « grandiraient » pendant la phase lumineuse,

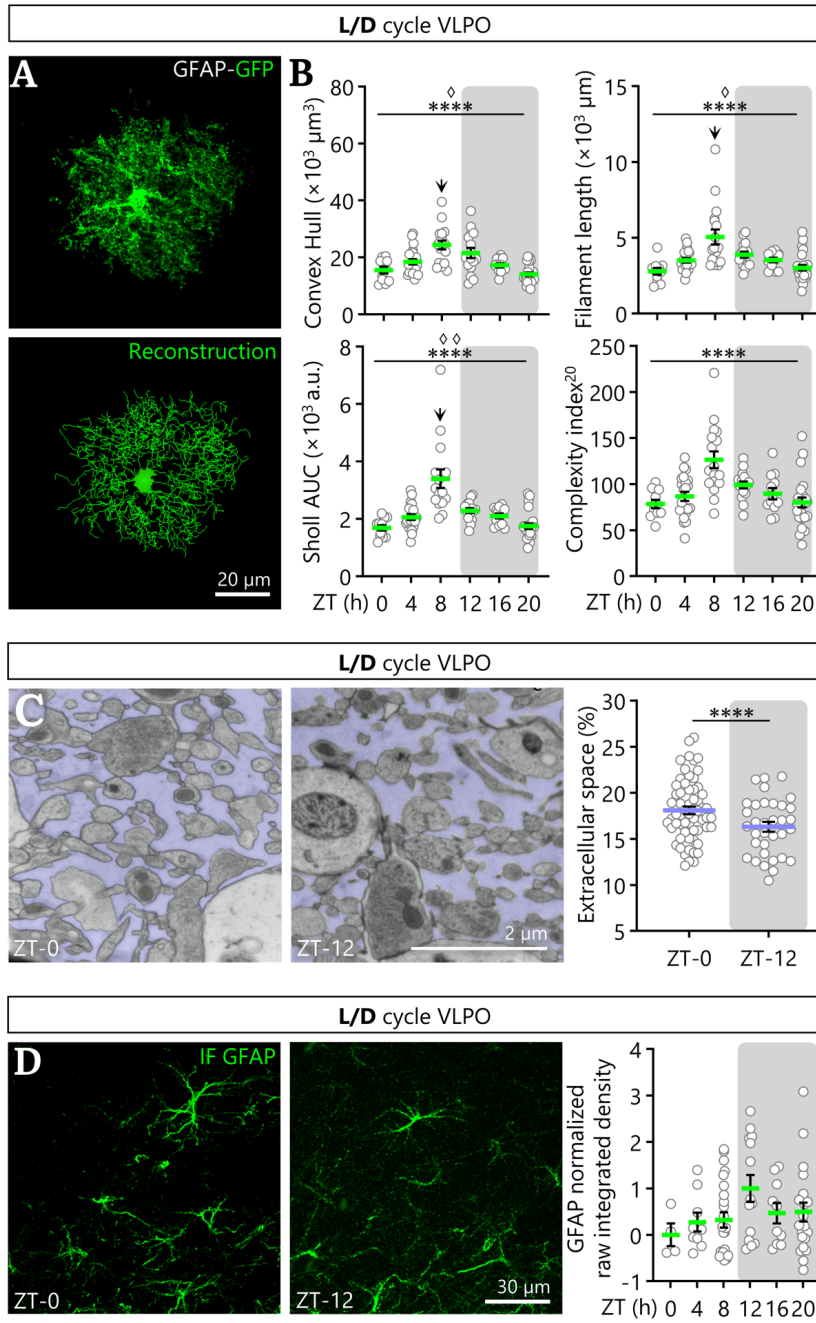


Figure 28 : Les astrocytes du VLPO présentent une plasticité au cours du cycle L/D.

A. Image en microscopie confocale d'un astrocyte du VLPO (haut) de souris GFAP-GFP en cycle de lumière normal (L/D) et sa reconstruction Imaris (bas). **B.** Mesures à partir des reconstructions du *convex Hull*, de la longueur cumulée totale des filaments (*filament length*), de l'aire sous la courbe de l'analyse de Sholl (*Sholl AUC*) et de l'index de complexité à 20 μm (*complexity index*²⁰), $n_{ZT-0} = 11$, $n_{ZT-4} = 22$, $n_{ZT-8} = 16$, $n_{ZT-12} = 16$, $n_{ZT-16} = 12$ et $n_{ZT-20} = 24$ astrocytes. Sur les graphiques, la période d'obscurité est symbolisée par le rectangle. Chaque cercle blanc représente la valeur mesurée pour un astrocyte et la barre verte la moyenne \pm SEM (N = 3 animaux / ZT).

C. Images de microscopie électronique à haute pression à froid représentant un champ du VLPO de souris C57BL/6 à ZT-0 et ZT-12. L'espace extracellulaire représenté en violet a été mesuré pour 62 ROI à ZT-0 et 34 ROI à ZT-12 (cercles blancs). Chaque mesure correspond au pourcentage de surface occupé par l'espace extracellulaire par rapport à la surface totale de la ROI du VLPO considérée et la barre violette la moyenne \pm SEM.

D. Images confocales d'immunomarquage GFAP dans le VLPO de souris Gal-GFP à ZT-0 et ZT-12. Quantification de la *raw intergrated density* du signal GFAP rapportée à la surface de la ROI du VLPO dans laquelle la mesure a été faite, normalisée par rapport à ZT-0 ($n_{ZT-0} = 4$, $n_{ZT-4} = 9$, $n_{ZT-8} = 24$, $n_{ZT-12} = 15$, $n_{ZT-16} = 10$ et $n_{ZT-20} = 21$ ROI). Chaque cercle blanc représente la *raw int. den.* mesurée dans une ROI du VLPO (N = 3 animaux / ZT) et la barre verte la moyenne \pm SEM. ANOVA 1 facteur avec test de Holm-Šidák, test de Kruskal-Wallis avec test de Dunn, analyse de Rayleigh-Moore. Les flèches horizontales représentent les valeurs de crête maximales atteintes par chaque sinusoïde modélisant les variations périodiques observées (càd. la phase du signal).

c'est-à-dire pendant le sommeil, puis rétréciraient pendant la période obscure, soit pendant l'éveil supposé.

Au cours du sommeil, il a été montré que l'espace interstitiel cortical augmentait de 60 % et serait impliqué dans la clairance des déchets métaboliques et cellulaires (Xie et al., 2013). De plus, comme les astrocytes du VLPO occupent un volume plus important en fin de période de repos, nous nous sommes intéressés aux variations de surface de l'espace extracellulaire du VLPO au cours du cycle circadien. Pour cela, des échantillons de VLPO ont été collectés et imagés en microscopie électronique à haute pression à froid (collaboration P. Rostaing, IBENS) à ZT-0 et ZT-12. J'ai quantifié la surface de l'espace extracellulaire a été quantifié par segmentation en utilisant le logiciel ilastik. Ainsi, j'ai pu mettre en évidence, qu'au début de la phase obscure, l'espace extracellulaire est diminué de 10 % par rapport au début de la phase lumineuse (**Figure 28 C**, ZT-0 : $18,10 \pm 0,42$ %, ZT-12 : $16,31 \pm 0,53$ % ; t-test non apparié, $P = 0,0108$). L'augmentation de taille des astrocytes est donc accompagnée d'une réduction de l'espace interstitiel entre la fin de la phase lumineuse et le début de la période d'obscurité. Cette augmentation de l'espace extracellulaire dans le VLPO, bien que moins importante, a lieu pendant la période de sommeil présumée des animaux, comme celle observée dans le cortex (Xie et al., 2013).

La taille de l'espace interstitiel du VLPO présentant des variations similaires à celle du cortex, nous nous sommes demandés si une plasticité des astrocytes est aussi observable dans le cortex (cortex moteur primaire M1), une région qui, contrairement au VLPO, est principalement active pendant l'éveil. Comme précédemment, les astrocytes ont été reconstruits sur Imaris à partir d'images confocales du cortex de souris GFAP-GFP (**Figure supp. 1 E**). Aucune variations significatives de taille ni de complexité des astrocytes n'ont été trouvées. De même, aucun des paramètres morphologiques ne présente de variations périodiques au cours du cycle L/D. Finalement, la plasticité morphologique des astrocytes du VLPO observée au cours du cycle veille/sommeil n'est pas retrouvée dans une région dont la période d'activité est temporellement opposée. Elle serait donc spécifique au VLPO et pourrait donc contribuer à la régulation de l'activité de cette structure et par conséquent, à la régulation du sommeil.

Enfin, ayant constaté une plasticité morphologique des astrocytes du VLPO au cours du cycle L/D, nous avons tenu à vérifier les taux d'expression de la GFAP dans le VLPO en L/D. En effet, la GFAP est un filament intermédiaire spécifique de certaines cellules gliales et est un constituant majeur du cytosquelette de la plupart des astrocytes. De plus, il a été montré que dans le SCN, les taux de GFAP présentent des variations circadiennes (LaviaIlle et Servière, 1993 ; Santos et al., 2005) Ainsi, après un immunomarquage de la GFAP sur des tranches de cerveaux de souris Gal-GFP (**Figure 28 D**), j'ai quantifié la *raw integrated density* du signal GFAP dans des ROI de VLPO. Au cours du cycle L/D, j'ai pu mettre en évidence que les taux de GFAP dans le VLPO ne varient pas significativement. Cependant une tendance

à l'augmentation est observable en début de période obscure et pourrait être associée à l'augmentation de taille et à la complexification des astrocytes du VLPO.

1.2 Plasticité morphologique des astrocytes du VLPO en absence de cycle L/D

La régulation du sommeil implique deux composantes : des processus homéostatiques et des processus circadiens. Afin de déterminer la part de chacun de ces deux processus dans régulation de la plasticité morphologique des astrocytes du VLPO, nous avons tout d'abord étudié les effets de l'exposition à un cycle de lumière constante (L/L) ou d'obscurité constante (D/D), permettant d'observer le cycle circadien des animaux. Après 14 jours d'exposition constante, les animaux ont été perfusés aux heures qui correspondaient à ZT-0, 4, 8, 12, 16 et 20 lorsqu'elles étaient placées en cycle L/D, que nous appellerons ZT subjectif (L/L) ou aux temps circadien (CT, *Circadian Time*, pour les D/D).

Sur la **Figure 29 A**, nous constatons qu'en conditions L/L, les variations de volume des astrocytes présentent une tendance à l'augmentation au cours de la phase lumineuse subjective (*convex Hull*, ANOVA 1 facteur, $P = 0,0610$). De même, les paramètres de complexités (**Figure 29 A**) extraits des analyses de Sholl (**Figure supp. 1 C**) ne présentent pas de variations significatives ni de périodicité au cours du cycle. De plus, en moyenne, les astrocytes en condition L/L ont un volume significativement plus élevé qu'en L/D (**Figure 29 C**, *Convex Hull L/D* : $18,47 \pm 0,58 \cdot 10^3 \mu\text{m}^3$, *L/L* : $43,12 \pm 1,60 \cdot 10^3 \mu\text{m}^3$, test de Kruskal-Wallis/Dunn, $P < 0,0001$).

Après une exposition en condition d'obscurité constante, nous observons toujours des variations significatives et périodiques du volume des astrocytes du VLPO, mais qui présentent un schéma de variations différent de celui observé en conditions L/D, caractérisé par un volume maximum atteint à ZT-4 au lieu de ZT-8 et une diminution significative entre ZT-4 et ZT-8 associés à un déphasage de -4 h (**Figure 29 B** *convex Hull* ; test de Kruskal-Wallis, Dunn, $P = 0,0103$; analyses de R-Moore, $P^{24} = 0,0049$). Contrairement au volume, la longueur cumulée totale des prolongements astrocytaires et les autres paramètres de complexité liés au Sholl (**Figure supp. 1 D**) ne présentent pas de variations significatives au cours du cycle circadien (**Figure 29 B**, *filament length* : $P = 0,0906$, *Sholl AUC* : $P = 0,0843$, *CT²⁰* : $P = 0,2333$, test de Kruskal-Wallis). Enfin, nous constatons qu'en conditions D/D, les astrocytes du VLPO sont globalement moins complexes qu'en condition L/D bien que leurs volumes moyens soient similaires (**Figure 29 C** ; *Convex Hull L/D* : $18,47 \pm 0,58 \cdot 10^3 \mu\text{m}^3$, *D/D* : $28,81 \pm 1,70 \cdot 10^3 \mu\text{m}^3$; *Sholl AUC L/D* : $2,21 \pm 0,08$ u.a., *D/D* : $1,32 \pm 0,08$ u.a. ; test de Kruskal-Wallis/Dunn, respectivement $P = 0,0329$ et $P < 0,0001$).

Les variations de volume des astrocytes du VLPO persistent donc en condition D/D et présentent une avance de phase, suggérant qu'elles pourraient être médiées par

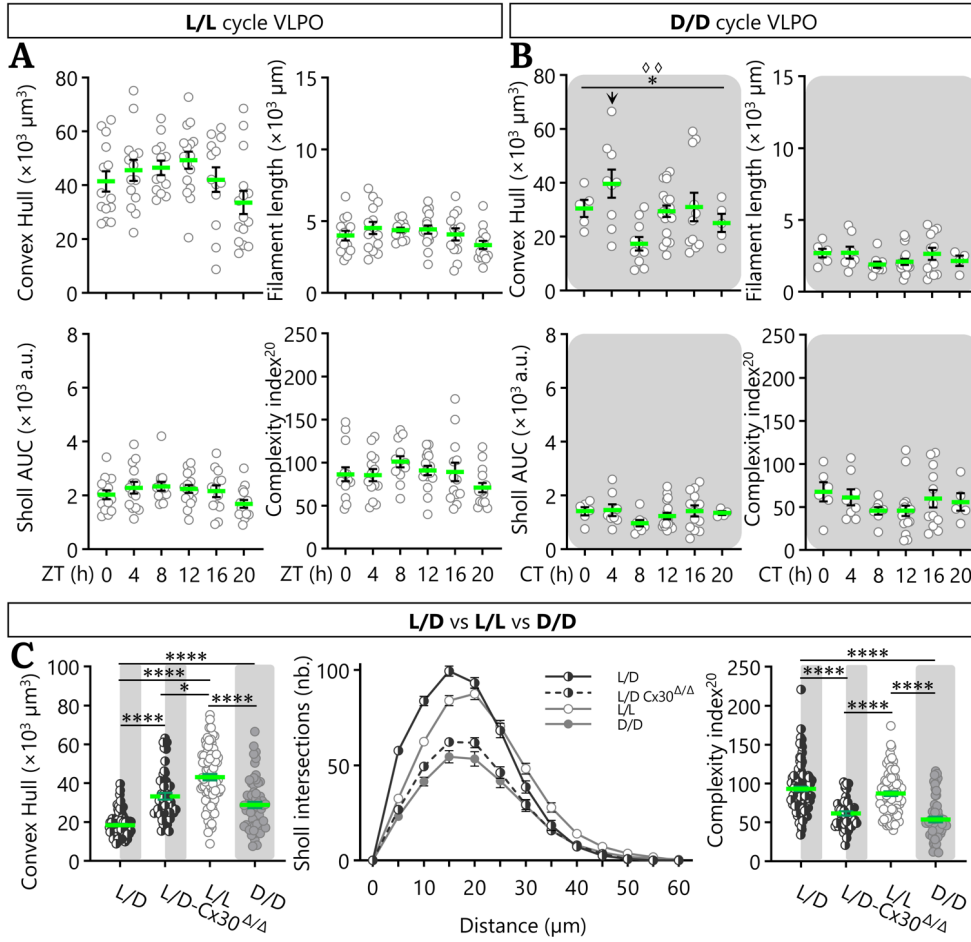


Figure 29 : Morphologie des astrocytes en conditions L/L et D/D. A-B. Mesures des paramètres de taille et de complexité des astrocytes du VLPO sur des reconstructions Imaris d'astrocytes de souris GFAP-GFP ayant été exposées pendant 14 jours à un cycle de lumière constante (L/L (A) : $n_{ZT-0} = n_{ZT-4} = n_{ZT-8} = 14$, $n_{ZT-12} = 16$, $n_{ZT-16} = 13$ et $n_{ZT-20} = 15$ astrocytes, ZT subjectifs) ou d'obscurité constante (D/D (B) : $n_{CT-0} = 5$, $n_{CT-4} = 9$, $n_{CT-8} = 11$, $n_{CT-12} = 19$, $n_{CT-16} = 11$ et $n_{CT-20} = 5$ astrocytes, CT : *Circadian Time*). C. Comparaison des moyennes sur l'ensemble des ZT/CT du *convex Hull*, de l'analyse de Sholl et de l'index de complexité à 20 μm (*complexity index*²⁰), pour les conditions L/D (n = 102), L/D-GFAP-Cx30^{Δ/Δ} (L/D Cx30^{Δ/Δ}, n = 52), L/L et D/D. Pour les conditions L/L (n = 85) et D/D (n = 60). L'ensemble des résultats est présenté sous la forme moyenne \pm SEM. Chaque cercle blanc représente la valeur mesurée pour un astrocyte, sur N = 3 animaux par ZT/CT. ANOVA 1 facteur avec test de Holm-Šidák, test de Kruskal-Wallis avec test de Dunn, analyse de Rayleigh-Moore. La flèche horizontale représente la valeur de crête maximale atteinte par la sinusoïde modélisant les variations périodiques observées (càd. la phase du signal).

l'horloge circadienne interne. Cependant, les variations de complexité des astrocytes observées en L/D n'apparaissent plus suggérant que la synchronisation avec la lumière pourrait être impliquée dans ce mécanisme. Afin d'étudier l'implication de processus homéostatiques dans cette régulation, des expériences de privations de sommeil et de privations suivies d'un rebond de sommeil sont encore en cours au laboratoire.

1.3 Implication de la Cx30 dans la plasticité morphologique des astrocytes

Récemment il a été démontré dans l'équipe que la régulation de l'expression de la Cx30, dans l'hippocampe, modulait la proximité des prolongements astrocytaires à la synapse (Ghézali et al., 2018). Nous nous sommes intéressés aux rôles que pourrait avoir la Cx30 dans ce phénomène. Pour cela, de même que précédemment, j'ai perfusé des souris GFAP-GFP déficientes pour la Cx30 (GFAP-GFP-Cx30 Δ/Δ), toutes les 4 heures de ZT-0 à ZT-20. Les mêmes paramètres morphologiques ont été calculés à partir des reconstructions Imaris. Sans Cx30, ni le volume des astrocytes du VLPO, ni la longueur cumulée totale de leurs prolongements ne varie de manière significative au cours du cycle L/D. De même, aucun des paramètres étudiés ne vari plus au cours du cycle L/D (**Figure 30 A**, *convex Hull* : P = 0,2515, *filament length* : P = 0,2972, *AUC* : P = 0,4208, *complexity index*²⁰ : P = 0,6071, test de Kruskal-Wallis). La présence de la Cx30 serait donc nécessaire à cette plasticité morphologique des astrocytes du VLPO.

1.4 Expression des connexines 30 et 43 au cours du cycle L/D

Nous avons vu en introduction que les astrocytes de l'hippocampe de souris déficientes pour la Cx30 (Cx30 Δ/Δ) présentent des prolongements plus grands (Pannasch et al., 2014). Dans le VLPO, les astrocytes de souris déficientes pour la Cx30 présentent un volume moyen (sur l'ensemble des ZT) 1,8 fois plus grand que les souris contrôles GFAP-GFP (**Figure 29 C** ; *convex Hull* L/D : $18,47 \pm 0,60 \cdot 10^3 \mu\text{m}^3$ et L/D Cx30 Δ/Δ : $33,31 \pm 1,72 \cdot 10^3 \mu\text{m}^3$; Kruskal-Wallis/Dunn test, P < 0,0001). Cependant nous observons une diminution de 52 % de l'aire sous la courbe des analyses de Sholl des astrocytes Cx30 Δ/Δ (**Figure 29 C** ; L/D : $2,21 \pm 0,08$ u.a. et L/D Cx30 Δ/Δ : $1,45 \pm 0,06$ u.a. ; Kruskal-Wallis Dunn test, P < 0,0001). L'absence de Cx30 diminue donc la complexité de l'arborisation astrocytaire, qui étend alors ses prolongements, augmentant la taille des domaines astrocytaires.

Afin de déterminer si l'expression de la Cx30 était modifiée lors des cycles circadiens, j'ai quantifié les variations de densité de Cx30 dans le VLPO. Pour cela, j'ai mis au point une macro ImageJ ([zStack 3D Density](#)) permettant de mesurer le volume de signal Cx30 dans le VLPO à partir d'images de microscopie confocale où la Cx30 est immunomarquée (**Figure 30 B**). La quantification de la densité de Cx30 dans le

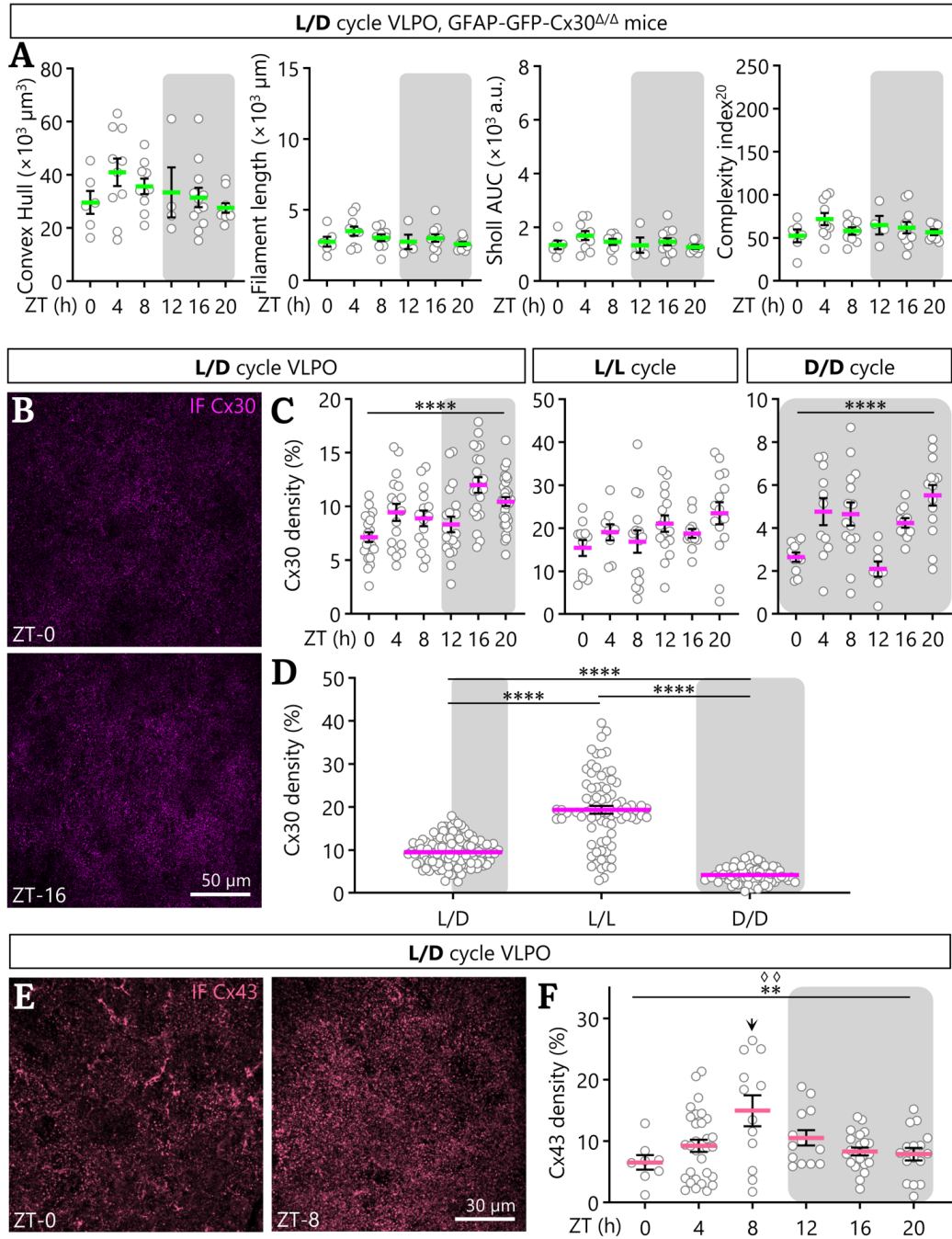


Figure 30 : Cx30 et plasticité morphologique des astrocytes du VLPO. **A.** Mesures des paramètres morphologiques de taille et de complexité d'astrocytes de souris GFAP-GFP-Cx30^{Δ/Δ} sur des reconstructions Imaris. Chaque cercle blanc représente la valeur du paramètre morphologique d'un astrocyte ($n_{ZT-0} = 6$, $n_{ZT-4} = n_{ZT-8} = 10$, $n_{ZT-12} = 4$, $n_{ZT-16} = 12$ et $n_{ZT-20} = 10$ astrocytes ; $N = 3$ animaux/ZT). **B.** Images de microscopie confocale du marquage de la Cx30 dans le VLPO par immunofluorescence à ZT-0 et ZT-16. **C.** Quantification de la densité de Cx30 dans le VLPO, de ZT-0 à ZT-20, chez des souris Gal-GFP et GFAP-GFP en conditions L/D ($n_{ZT-0} = 22$, $n_{ZT-4} = 18$, $n_{ZT-8} = 15$, $n_{ZT-12} = 20$, $n_{ZT-16} = 21$ et $n_{ZT-20} = 32$ ROI), L/L ($n_{ZT-0} = 11$, $n_{ZT-4} = 9$, $n_{ZT-8} = 15$, $n_{ZT-12} = 16$, $n_{ZT-16} = 13$ et $n_{ZT-20} = 15$ ROI) et D/D ($n_{ZT-0} = n_{ZT-4} = n_{ZT-16} = 11$, $n_{ZT-8} = 15$, $n_{ZT-12} = 8$ et $n_{ZT-20} = 14$ ROI), de gauche à droite. Pour les conditions L/L et D/D, les ZT indiqués correspondent aux ZT. Chaque cercle blanc représente la densité de Cx30 dans une ROI du VLPO sur $N = 3$ animaux par ZT (2 mâles et 1 femelle). **D.** Densité de Cx30 moyenne (sur l'ensemble des 6 ZT) dans le VLPO en conditions L/D ($n = 128$), L/L ($n = 79$) et D/D ($n = 70$). Chaque point représente la densité de Cx30 dans une ROI du VLPO sur $n = 18$ animaux par condition. **E.** Images confocales représentant le marquage de la Cx43 dans le VLPO par immunofluorescence à ZT-0 et ZT-8. **F.** Quantification de la densité de Cx43 dans le VLPO, de ZT-0 à ZT-20, chez des souris Gal-GFP. Chaque cercle blanc représente la densité de Cx43 dans une ROI du VLPO sur $n = 3$ animaux par ZT (2 mâles et 1 femelle ; $n_{ZT-0} = 8$, $n_{ZT-4} = 31$, $n_{ZT-8} = 12$, $n_{ZT-12} = 13$, $n_{ZT-16} = 22$ et $n_{ZT-20} = 16$ astrocytes). L'ensemble des résultats est présenté sous la forme moyenne \pm SEM. ANOVA 1 facteur avec test de Holm-Šidák, test de Kruskal-Wallis, analyse de Rayleigh-Moore. Les flèches horizontales représentent les valeurs de crête maximales atteintes par chaque sinusoïde modélisant les variations périodiques observées (càd. la phase du signal).

VLPO au cours du cycle L/D met en évidence des variations des taux de Cx30. L'expression de la Cx30 augmente au cours de la phase lumineuse et au début de la phase obscure, pour atteindre un maximum à ZT-16, moment du cycle où le volume des astrocytes décroît (**Figure 30 C**, graphe L/D à droite ; ANOVA 1 facteur, $P < 0,0001$). Nous avons également étudié l'expression totale de la Cx30 dans le VLPO en western blots. Cependant, nous n'avons pas trouvé de variations significatives au cours du cycle L/D (**Figure supp. 3 D, E**). Le VLPO étant une petite région difficile à disséquer, nous envisageons de prélever plus de VLPO par ZT pour essayer de s'affranchir des imprécisions de la dissection. Ces résultats montrent donc une corrélation entre les variations d'expression de la Cx30 et la plasticité morphologique des astrocytes. Ces variations de Cx30 pourraient donc bien sous-tendre la plasticité morphologique des astrocytes du VLPO observé au cours du cycle L/D.

Afin de d'étudier l'implication des processus circadiens dans les variations d'expression de la Cx30 dans le VLPO, les taux de Cx30 ont été mesurés en conditions L/L et D/D. En L/L, les taux de Cx30 ne varient pas plus non plus (**Figure 30 C**, L/L ; ANOVA 1 facteur, $P = 0,1120$). Cependant, la densité moyenne de Cx30 (sur l'ensemble des ZT) est significativement plus élevée qu'en conditions L/D (**Figure 30 D**, L/D : $9,49 \pm 0,28$ % ; L/L : $19,34 \pm 0,91$ % ; ANOVA 1 facteur/Tukey, $P < 0,0001$). En condition de lumière constante, il se pourrait donc que l'augmentation de l'expression de la Cx30, induisent une augmentation saturante du volume des astrocytes qui masquerait leur plasticité morphologique. En revanche, en conditions D/D, les taux de Cx30 fluctuent au cours du cycle circadien. Cependant, le cycle de variations observé diffère de celui en L/D notamment à cause d'une forte dépression significative entre CT-8 et CT-12 et une accumulation en fin de période obscure subjective (**Figure 30 C**, D/D ; ANOVA 1 facteur, $P < 0,0001$). De plus, les taux de Cx30 sont plus 2 fois plus faibles en D/D qu'en L/L (**Figure 30 D**, ANOVA 1 facteur/Tukey, $P < 0,0001$). Ainsi, les variations de Cx30 au cours du cycle L/D semblent, au moins en partie, médiées par des processus circadiens. Cependant, la lumière a un effet sur les taux moyens de Cx30 sur l'ensemble du cycle L/D.

Enfin, la Cx43 est, après la Cx30, la seconde connexine la plus exprimée par les astrocytes. Cependant aucune étude ne suggère qu'elle puisse être impliquée dans l'homéostasie du sommeil, il a été montré, dans le noyau suprachiasmatique, que l'expression des Cx30 et Cx43 variait au cours du cycle circadien. Bien que la Cx43 ne soit pas connue pour être impliquée dans la plasticité morphologique des astrocytes, j'ai étudié son expression au sein du VLPO au cours du cycle veille/sommeil. Comme pour la Cx30, à partir d'immunomarquage de la Cx43 (**Figure 30 E**, sa densité dans le VLPO a été calculée. Dans le VLPO, son expression varie au cours du cycle et présente une périodicité sur 12 heures (**Figure 30 F**, ANOVA 1 facteur, $P < 0,0001$; analyse de R-Moore, $P^{12} = 0,0017$). De plus, son expression augmente pendant la période lumineuse jusqu'à atteindre son paroxysme à ZT-8, comme les paramètres morphologiques mesurés sur les astrocytes du VLPO. Ces résultats laissent supposer que l'expression de la Cx43 dans le VLPO serait corrélée aux variations

1 Plasticité morphologique des astrocytes du VLPO au cours du cycle L/D 133

de plasticité morphologique des astrocytes. Cependant, nous n'avons pas constaté de phénomènes compensatoires lorsque les taux de Cx30 diminuent au cours du cycle L/D.

Ainsi, les astrocytes du VLPO présentent une plasticité morphologique au cours du cycle L/D qui reposerait sur des variations d'expression de la connexine 30. Ces variations sont associées à des fluctuations de la taille de l'espace extracellulaire. Enfin, en absence de synchronisation avec la lumière de l'horloge interne, ce phénomène de plasticité persiste et pourrait contribuer à la modulation de l'activité du VLPO.

2 Effets du BDNF sur la plasticité morphologique des astrocytes du VLPO

Le BDNF est une neurotrophine pléiotrope. Parmi ses nombreuses fonctions au sein du système nerveux central, nous avons vu que les cascades de signalisation qu'il déclenche ont des effets sur le cytosquelette et la morphologie cellulaire. De plus, dans le SCN, le BDNF est impliqué, via son récepteur TrkB, dans la régulation de la plasticité morphologique des astrocytes (Girardet et al., 2013). Ainsi, au sein du VLPO, le BDNF pourrait-il être à l'origine des variations de morphologie observées au cours du cycle veille/sommeil ?

Pour répondre à cette question, nous avons incubé des coupes aiguës de VLPO de souris GFAP-GFP pendant 2 h avec du BDNF ou avec la solution saline contrôle. À partir des images de microscopie confocale et les astrocytes ont été reconstruits en 3 dimensions à l'aide du logiciel Imaris à partir d'images de microscopie confocale déconvoluées (**Figure 31 A, B**). Enfin, comme précédemment, les mêmes descripteurs de taille et de complexité ont été calculés à partir de ces reconstructions.

2.1 Variations morphologiques des astrocytes du VLPO induites par le BDNF

L'incubation des coupes aiguës de VLPO avec du BDNF induit une augmentation significative de 75 % du volume des astrocytes (**Figure 31 D**, *convex Hull*, saline : $1,54 \pm 0,16 \cdot 10^3 \mu\text{m}^3$, BDNF : $2,89 \pm 0,21 \cdot 10^3 \mu\text{m}^3$; t-test non apparié, $P < 0,0001$) et de 46 % de la longueur cumulée totale des prolongements astrocytaires (**Figure 31 D**, *filament length*, saline : $3,26 \pm 0,31 \cdot 10^3 \mu\text{m}$, BDNF : $5,32 \pm 0,41 \cdot 10^3 \mu\text{m}$; test de Mann-Whitney, $P = 0,0010$). Le BDNF a également des effets sur la complexité des astrocytes du VLPO. En effet, les analyses de Sholl et le *filament branch level* (**Figure supp. 2 A**, saline : $7,71 \pm 0,13$, BDNF : $8,47 \pm 0,23$, t-test non apparié, $P = 0,0107$) montrent une complexité des prolongements plus importante suite à l'incubation avec du BDNF, par rapport au contrôle, qui se traduit par une aire sous la courbe significativement plus élevée (**Figure 31 C**, *Sholl AUC*, 68 %, saline : $1,81 \pm 0,18 \cdot 10^3 \text{ u.a.}$, BDNF : $3,05 \pm 0,21 \cdot 10^3 \text{ u.a.}$; test de Mann-Whitney, $P = 0,0003$). Enfin, l'index de complexité à 20 μm présente une tendance à l'augmentation (*complexity index*²⁰, saline : $92,29 \pm 12,59$, BDNF : $115,9 \pm 9,40$; t-test non apparié, $P = 0,0754$). Le BDNF a donc, *ex vivo*, un effet à la fois sur la taille et sur la complexité des astrocytes du VLPO.

2.2 Implication de la Cx30 dans la plasticité morphologique des astrocytes induite par le BDNF

La Cx30 est impliquée dans la morphologie des astrocytes et nous avons vu que, dans le VLPO, les souris déficientes pour la Cx30 présentent des astrocytes plus grands, moins complexes et dépourvus de plasticité morphologique au cours du cycle L/D.

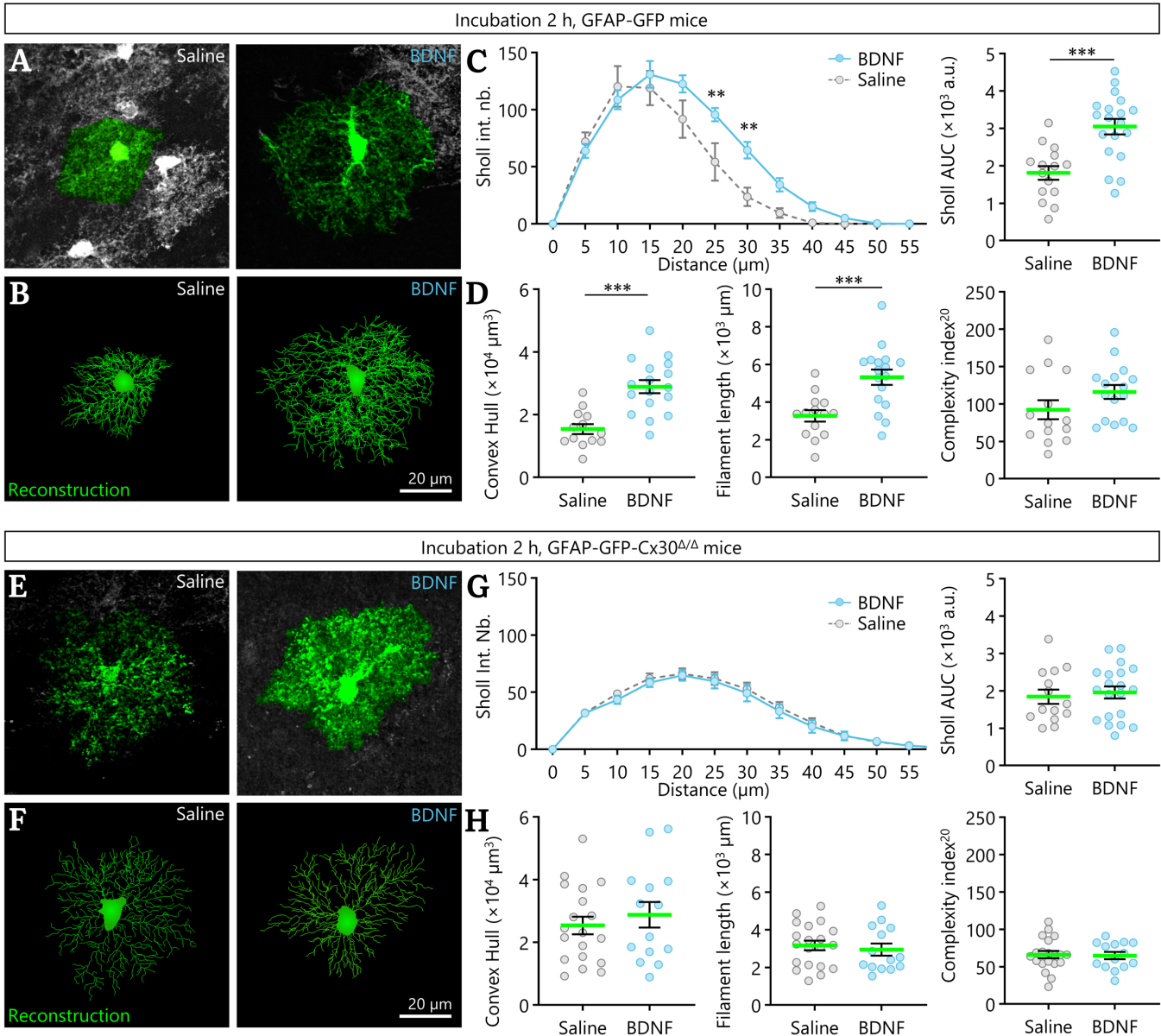


Figure 31 : Le BDNF induit une augmentation de la taille et une complexification des astrocytes du VLPO. **A.** Images de microscopie confocale d'astrocytes sur des coupes aiguës de VLPO de souris GFAP-GFP, après 2 h d'incubation avec la solution saline contrôle (à gauche) et du BDNF (à droite). **B.** Reconstructions 3D Imaris à partir des images de microscopie confocale en A. **C.** Analyses de Sholl et quantification de l'aire sous la courbe (*Sholl AUC*) suite à l'incubation des coupes GFAP-GFP avec du BDNF (bleu) ou avec la solution saline (gris). **D.** Quantification du volume des astrocytes (*convex Hull*), de la longueur cumulée totale de leurs prolongements (*filament length*) et de l'index de complexité à 20 μm (*complexity index*²⁰) après incubation avec du BDNF (bleu ; n = 19 astrocytes) ou la solution saline (gris ; n = 16 astrocytes). **E-F.** Images de microscopie confocale d'astrocytes sur des coupes aiguës de VLPO de souris GFAP-GFP-Cx30^{Δ/Δ} et leur reconstruction Imaris, après 2 h d'incubation avec la solution saline contrôle (à gauche) et du BDNF (à droite). **G.** Analyses de Sholl et quantification de l'aire sous la courbe (*Sholl AUC*) suite à l'incubation des coupes GFAP-GFP-Cx30^{Δ/Δ} avec du BDNF (bleu) ou avec la solution saline (gris). **H.** Quantification du volume des astrocytes (*convex Hull*), de la longueur cumulée totale de leurs prolongements (*filament length*) et de l'index de complexité à 20 μm (*complexity index*²⁰) après incubation avec du BDNF (bleu ; n = 14 astrocytes) ou la solution saline (gris ; n = 19 astrocytes). L'ensemble des résultats est présenté sous la forme moyenne \pm SEM. Chaque cercle blanc représente la valeur mesurée pour un astrocyte, sur N = 3 animaux par condition. ANOVA 2 facteurs avec test de Šidák, t-test non apparié, test Mann-Whitney.

Etant donné qu'*ex vivo*, le BDNF induit une plasticité morphologique des astrocytes du VLPO, nous nous sommes demandés si ce phénomène est dépendant de la Cx30. Pour cela, j'ai incubé des coupes aiguës de VLPO de souris GFAP-GFP-Cx30 Δ/Δ pendant 2 h avec la solution saline contrôle ou du BDNF. De même que précédemment, les astrocytes ont été reconstruits sur Imaris à partir des images de microscopie confocale (**Figure 31 E, G**).

A partir de ces reconstructions, les mêmes descripteurs morphologiques ont été calculés. Nous constatons qu'en présence de BDNF, les astrocytes déficients pour la Cx30 ne présentent pas de variations de volume ni de longueur cumulée totale de leurs prolongements par rapport à la condition contrôle (**Figure 31 H**, *convex Hull*, saline : $2,54 \pm 0,28 \cdot 10^3 \mu\text{m}^3$, BDNF : $2,88 \pm 0,41 \cdot 10^3 \mu\text{m}^3$; test de Mann-Whitney, $P = 0,6275$; *filament length* : saline : $3,17 \pm 0,26 \cdot 10^3 \mu\text{m}$, BDNF : $2,95 \pm 0,32 \cdot 10^3 \mu\text{m}$; test de Mann-Whitney, $P = 0,6410$). De même, les analyses de Sholl ne révèlent pas de différences de complexité entre les incubations avec du BDNF ou avec la solution saline (**Figure 31 F, H**, *Sholl AUC*, saline : $1,84 \pm 0,19 \cdot 10^3$ u.a., BDNF : $1,96 \pm 0,16 \cdot 10^3$ u.a. ; test de Mann-Whitney, $P = 0,7957$; *complexity index*²⁰ : saline : $66,20 \pm 4,80$, BDNF : $64,79 \pm 4,83$; t-test non-apparié, $P = 0,8414$). Enfin, en moyenne, les astrocytes déficients pour la Cx30 semblent plus grands et moins complexes que les astrocytes pourvus de Cx30, comme observé précédemment au cours du cycle L/D. Ainsi, en contexte de déficience pour la Cx30, l'incubation des coupes aiguës de VLPO avec du BDNF ne module plus la morphologie des astrocytes et suggère que la plasticité morphologique des astrocytes du VLPO induite par le BDNF serait dépendante de la Cx30.

2.3 Influence du BDNF sur l'expression de la Cx30

La plasticité morphologique des astrocytes du VLPO semble dépendante de l'expression de la Cx30 et nous avons pu voir qu'au cours du cycle L/D les taux de Cx30 varient dans le VLPO. De ce fait, nous nous sommes demandé si le BDNF pouvait induire des variations d'expression de la Cx30.

Pour répondre à cette interrogation, j'ai effectué un immunomarquage de la Cx30 sur les coupes aiguës de VLPO incubées avec la solution saline contrôle et avec le BDNF (**Figure supp. 2 C**). J'ai quantifié la densité de Cx30 dans le VLPO mais n'ai pas trouvé de différences significatives des taux de Cx30 entre les deux conditions (**Figure supp. 2 D**, saline : $17,44 \pm 2,32$ %, BDNF : $18,86 \pm 1,56$ % ; t-test non apparié, $P = 0,6022$).

Finalement, le BDNF module la morphologie des astrocytes du VLPO, ce qui se traduit par une augmentation de leur taille associée à une complexification de la cellule. Cette plasticité induite par le BDNF semble dépendante de la Cx30.

3 Expression du BDNF au sein du VLPO au cours du cycle L/D

Peu d'études se sont intéressées aux variations d'expression du BDNF au cours du cycle veille/sommeil. Cependant, chez le rat, il a été montré que les taux de d'ARNm du BDNF dans l'hippocampe varient au cours du cycle circadien et sont plus élevés au milieu de la phase lumineuse (Schaaf et al., 2000). De plus, chez l'homme, plusieurs études se sont penchées sur les taux de BDNF dans le sérum sanguin. Il a ainsi pu être établi que les taux de BDNF sanguin présentent des variations circadiennes (Begliuomini et al., 2008).

Les astrocytes du VLPO présentent une plasticité morphologique et nous avons vu qu'*ex vivo* le BDNF est suffisant pour induire cette plasticité. *Ex vivo*, cette plasticité pourrait donc être due à des fluctuations circadiennes des taux de BDNF dans le VLPO. Nous nous sommes donc intéressés aux variations d'expression du BDNF au cours du cycle L/D. Nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'expression de l'ARN messenger du BDNF.

3.1 Etude des taux d'ARNm BDNF

A partir de coupes de cerveau de souris C57BL/6 fixées, nous avons réalisé une hybridation *in situ* pour détecter l'ARNm du BDNF. A partir des images de microscopie confocale du VLPO (**Figure 32 A**), j'ai quantifié la densité de l'ARNm *BDNF* dans le VLPO au cours du cycle L/D. Ainsi, j'ai pu mettre en évidence que sa densité augmente significativement au cours de la phase lumineuse et atteint un maximum en fin de période obscure, avant de brutalement chuter en début de phase lumineuse (**Figure 32 B**, test de Kruskal-Wallis, $P < 0,0001$, test de comparaison multiple de Dunn). L'analyse de Rayleigh-Moor révèle une périodicité sur 12 heures ($P^{12} = 0,0181$). Ainsi, au cours du cycle L/D, l'expression de l'ARNm du BDNF est cyclique et ce dernier s'accumule jusqu'en fin de période obscure, là où les souris commencent à dormir.

3.2 Expression des formes proBDNF et mBDNF

Après avoir trouvé des variations d'expression l'ARNm du BDNF, nous nous sommes intéressés à la protéine BDNF. A partir de dissections de VLPO de souris Gal-GFP, un ELISA a mis en évidence des variations des taux de BDNF au sein du VLPO au cours du cycle L/D caractérisées par une accumulation pendant la phase obscure (**Figure 32 C**, test de Kruskal-Wallis, $P = 0,0013$).

La transcription du gène codant le BDNF abouti à l'expression de deux principales isoformes actives : le proBDNF et le mBDNF. Pour l'étude de l'expression de ces deux isoformes du BDNF, j'ai utilisé deux anticorps, l'un reconnaissant spécifiquement la forme proneurotrophine, et l'autre la forme mature. Les images de microscopie confocale de ces immunomarquages du proBDNF et mBDNF sont présentées

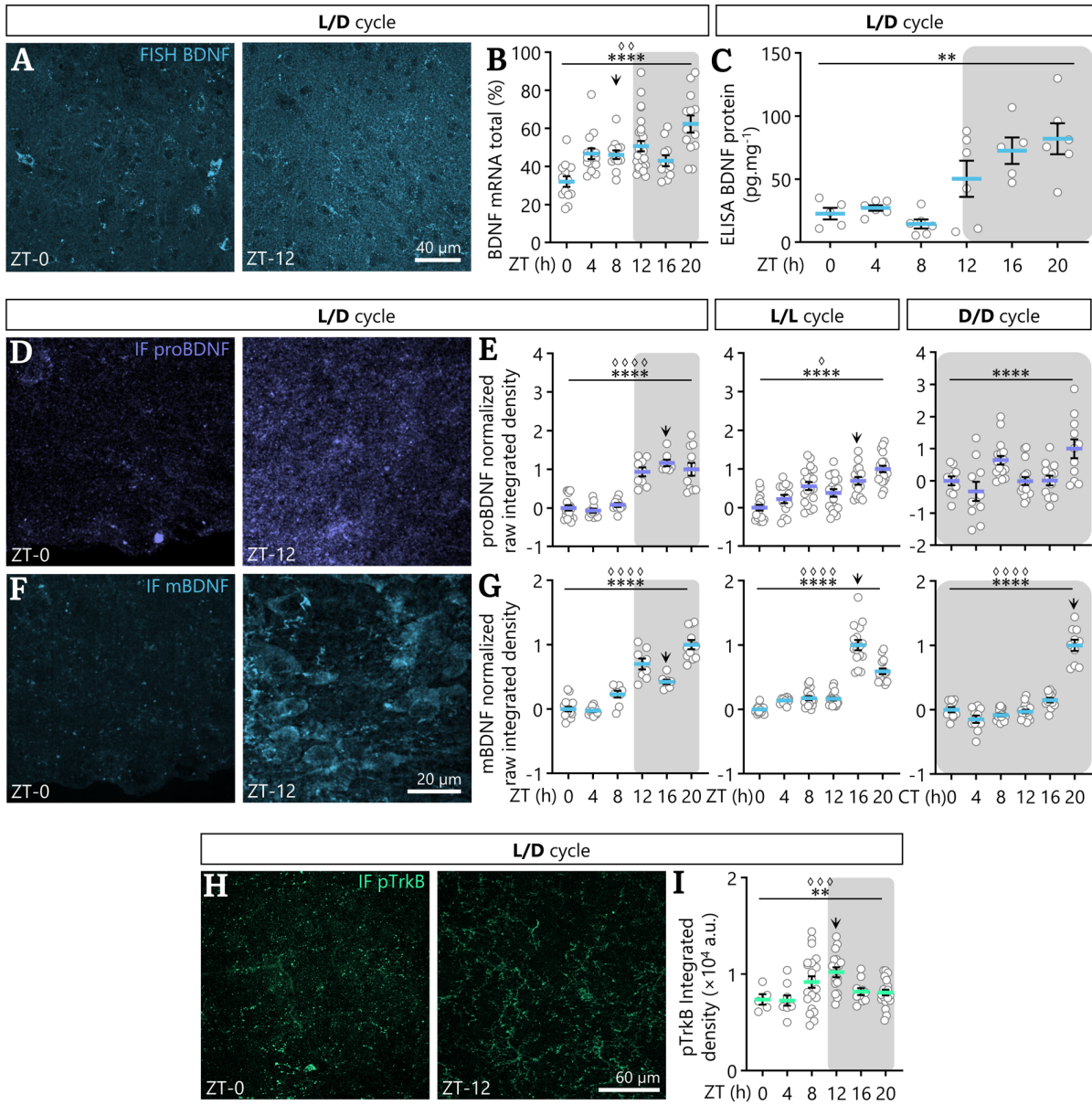


Figure 32 : Expression cyclique du BDNF, de son ARNm et phosphorylation de TrkB au cours du cycle L/D. **A.** Images de microscopie confocale de FISH à ZT-0 et ZT-12 sur des souris C57BL/6. Le signal correspond à l'ARNm du BDNF. **B.** Quantification de la densité totale de signal FISH BDNF dans le VLPO au cours du cycle L/D. Chaque cercle blanc représente la densité mesurée dans une ROI du VLPO ($n_{ZT-0} = 13$, $n_{ZT-4} = 15$, $n_{ZT-8} = 12$, $n_{ZT-12} = 27$, $n_{ZT-16} = 11$ et $n_{ZT-20} = 13$ ROI), $N = 3$ animaux. **C.** Quantification de la masse de protéines BDNF dans des échantillons de VLPO de souris Gal-GFP par ELISA. Chaque point représente la concentration de BDNF du VLPO d'un animal ($N_{ZT-0} = N_{ZT-16} = 5$, $N_{ZT-4} = N_{ZT-8} = N_{ZT-12} = N_{ZT-20} = 6$). **D, F.** Images de microscopie confocale d'un immunomarquage proBDNF à ZT-0 et ZT-2 (D) et d'un immunomarquage mBDNF à ZT-0 et ZT-12 (F) sur des coupes de cerveau de souris Gal-GFP. **E.** Quantification de la *raw integrated density* de proBDNF rapportée à la surface de la ROI du VLPO dans laquelle la mesure a été faite, normalisée par rapport au ZT-0, en conditions (de gauche à droite) L/D ($n_{ZT-0} = 17$, $n_{ZT-4} = 12$, $n_{ZT-8} = n_{ZT-12} = 9$, $n_{ZT-16} = 8$, $n_{ZT-20} = 11$ ROI), L/L ($n_{ZT-0} = n_{ZT-8} = n_{ZT-12} = 19$, $n_{ZT-4} = 13$, $n_{ZT-16} = 16$, $n_{ZT-20} = 20$ ROI) et D/D ($n_{ZT-0} = n_{ZT-4} = 10$, $n_{ZT-8} = n_{ZT-12} = 17$, $n_{ZT-16} = 13$, $n_{ZT-20} = 11$ ROI). **G.** Quantification de la *raw integrated density* de mBDNF rapportée à la surface de la ROI du VLPO dans laquelle la mesure a été faite, normalisée par rapport au ZT-0, en conditions (de gauche à droite) L/D ($n_{ZT-0} = 17$, $n_{ZT-4} = 12$, $n_{ZT-8} = 9$, $n_{ZT-12} = n_{ZT-16} = 8$, $n_{ZT-20} = 11$ ROI), L/L ($n_{ZT-0} = 20$, $n_{ZT-4} = 12$, $n_{ZT-8} = 18$, $n_{ZT-12} = 19$, $n_{ZT-16} = n_{ZT-20} = 16$ ROI) et D/D ($n_{ZT-0} = 11$, $n_{ZT-4} = n_{ZT-20} = 10$, $n_{ZT-8} = n_{ZT-12} = 18$, $n_{ZT-16} = 12$ ROI). Chaque point représente la *raw integrated density* normalisée d'une ROI de VLPO, $N = 3$ animaux. Pour les conditions L/L et D/D, les ZT indiqués correspondent aux ZT effectifs des souris lorsqu'elles étaient placées en cycle L/D 12 h/12 h. **H.** Images de microscopie confocale d'un immunomarquage de la forme phosphorylée de TrkB (pTrkB) à ZT-0 et ZT-12 sur des coupes de cerveau de souris Gal-GFP. **I.** Quantification de la *raw integrated density* de pTrkB rapportée à la surface de la ROI du VLPO dans laquelle la mesure a été faite. Chaque point représente la *raw integrated density* normalisée d'une ROI de VLPO ($n_{ZT-0} = 5$, $n_{ZT-4} = 9$, $n_{ZT-8} = 22$, $n_{ZT-12} = 16$, $n_{ZT-16} = 10$, $n_{ZT-20} = 21$ ROI), $N = 3$ animaux. ANOVA 1 facteur, test de Kruskal-Wallis et analyse de Rayleigh-Moore. Les flèches horizontales représentent les valeurs de crête maximales atteintes par chaque sinusoïde modélisant les variations périodiques observées (càd. la phase du signal).

en **Figure 32 D** et **F** (respectivement). A partir de ces images confocales, j'ai quantifié la *raw integrated density* du signal proBDNF. L'expression du proBDNF varie significativement au cours du cycle L/D, qui est caractérisée par une accumulation au cours de la période obscure (**Figure 32 E**, L/D, ANOVA 1 facteur, $P < 0,0001$). De plus, les variations de proBDNF présentent une périodicité sur 24 heures (analyse de R-Moore, $P^{24} < 0,0001$). De même, l'expression du mBDNF varie de manière périodique au cours du cycle L/D et ce dernier s'accumule pendant la période d'obscurité (**Figure 32 E**, L/D, ANOVA 1 facteur, $P < 0,0001$; analyse de R-Moore, $P^{24} < 0,0001$). Les taux de proBDNF et de mBDNF varient donc de manière périodique au cours du cycle L/D et s'accumulent pendant la période d'obscurité. Pour le mBDNF, cette accumulation commence à ZT-8, moment du cycle où les astrocytes du VLPO sont plus grands et plus complexes, suggérant que cette plasticité pourrait être induite par le BDNF.

3.3 Phosphorylation de TrkB

TrkB est le récepteur du BDNF qui a la plus forte affinité pour la forme mature du BDNF et est abondamment exprimé par les astrocytes (Fenner, 2012). Nous nous sommes alors demandé, dans un premier temps, si TrkB est exprimé dans le VLPO et par quels types cellulaires. Pour cela, j'ai utilisé l'hybridation *in situ* d'ARN pour détecter l'expression de *NTRK2*, le gène codant TrkB, dans le VLPO de souris C57BL/6 (**Figure supp. 3 A**). J'ai quantifié la densité du signal *NTRK2* au niveau du soma d'astrocytes, en utilisant un immunomarquage GFAP, ainsi qu'au niveau des soma de neurones galaninergiques, promoteurs du sommeil lent, en utilisant le marquage FISH galanine. Bien que l'ARNm *NTRK2* soit exprimé par ces deux types cellulaires du VLPO, il est plus exprimé par les astrocytes que par les neurones galaninergiques (**Figure supp. 3 B**, *astrocytes* : $18,62 \pm 0,90$ %, *Gal neuron* : $11,61 \pm 0,58$ % ; t-test non apparié, $P < 0,0001$). J'ai également regardé l'expression de *NTRK2* à ZT-0 et ZT-12 et trouvé une augmentation significative à ZT-12, au début de la phase obscure (**Figure supp. 3 B**, ZT-0 : $5,16 \pm 0,29$ %, ZT-12 : $8,78 \pm 0,95$ % ; t-test non apparié, $P < 0,0001$). L'ARNm *NTRK2* est exprimé dans le VLPO par les astrocytes et les neurones promoteurs du sommeil, suggérant que TrkB est bien exprimé par ces cellules. De plus, son expression varie entre deux moments opposés du cycle L/D.

L'ARNm *NTRK2* étant bien exprimé dans le VLPO, notamment par les astrocytes et les taux de mBDNF variant au cours du cycle L/D, nous avons ensuite étudié la phosphorylation du récepteur TrkB dans le VLPO. En effet, le BDNF induit la formation d'un complexe dimérique de récepteur TrkB qui s'activent par auto-transphosphorylation. A cette fin, j'ai effectué un immunomarquage de la forme phosphorylée du récepteur TrkB (pTrkB ; **Figure 32 H**). A partir des images de microscopie confocale, j'ai quantifié la *raw integrated density* du signal pTrkB total dans le VLPO. Nous constatons que les taux de pTrkB fluctuent de manière périodique au cours du cycle L/D (**Figure 32 I**, test de Kruskal-Wallis, $P = 0,0047$; analyse de R-Moore, $P^{12} = 0,0082$). De plus, l'accumulation de pTrkB se fait en fin

de période lumineuse et au début de la phase obscure et varie donc de manière similaire aux descripteurs morphologiques des astrocytes présentés en **Figure 28 B** (**Figure 32 H**, test de Kruskal-Wallis, $P = 0,0047$, test de comparaison multiple de Dunn). La forme phosphorylée de TrkB s'accumule à partir de ZT-8, moment du cycle où les taux de mBDNF commencent à augmenter. De plus, le schéma de phosphorylation de pTrkB au cours du cycle L/D mime les variations de morphologie des astrocytes du VLPO observées au cours du cycle L/D, ce qui suggère fortement que le BDNF pourrait, via l'activation de TrkB, être impliqué dans la plasticité morphologique des astrocytes du VLPO. Il semblerait donc, le BDNF puisse agir préférentiellement en fin de période de repos, comme pour permettre une consolidation du sommeil via une boucle d'autorégulation positive.

3.4 Variations d'expression du BDNF en cycle L/L et D/D

Comme pour la plasticité morphologique des astrocytes du VLPO (§ 1.1, p. 123), nous nous sommes demandé quels processus (homéostatiques ou circadiens) soutiennent ces variations d'expression du BDNF observées dans le VLPO. J'ai donc étudié l'expression des formes proneurotrophine et mature du BDNF dans le VLPO sur des souris placées en cycle de lumière constante (L/L) ou d'obscurité constante (D/D). En conditions L/L, les taux de proBDNF varient toujours de manière périodique dans le VLPO. Cependant, d'après l'analyse de Rayleigh-Moore, la périodicité se produit sur 12 heures avec un retard d'au plus 4 heures par rapport à son expression en L/D (**Figure 32 E**, L/L ; ANOVA 1 facteur, $P < 0,0001$, analyse de R-Moore, $P^{12} = 0,0400$). En conditions d'obscurité constante, l'expression du proBDNF présente toujours des variations significatives au cours du cycle subjectif qui, cependant, ne sont pas périodiques et diffèrent de celles observées en L/L (**Figure 32 E**, D/D ; ANOVA 1 facteur, $P < 0,0001$, analyse de R-Moore, P^{12} et $P^{24} > 0,2000$).

Concernant les variations de mBDNF en condition L/L, nous constatons qu'elles présentent une double périodicité (sur 12 h et sur 24 h) et que le mBDNF s'accumule pendant la période d'obscurité subjective (**Figure 32 G**, L/L ; ANOVA 1 facteur, $P < 0,0001$, analyse de R-Moore, $P^{12} = 0,0002$, $P^{24} = 0,0291$). En condition D/D, les taux de mBDNF varient périodiquement sur 24 h et augmentent également pendant la phase obscure subjective (**Figure 32 G**, D/D ; ANOVA 1 facteur, $P < 0,0001$, analyse de R-Moore, $P^{24} = 0,0002$). Le pic d'accumulation de mBDNF est décalé de + 4 h par rapport à celui observé en conditions L/D.

Ainsi, au cours du cycle L/D, l'ARNm du BDNF et les formes proneurotrophine et mature du BDNF varient de manière périodique au sein du VLPO et s'accumulent à partir de la fin de la période lumineuse, au moment où les souris sont supposées commencer à dormir, mais également pendant la période d'obscurité. De manière concomitante, la phosphorylation du récepteur TrkB augmente dans le VLPO et cette activation de TrkB pourrait résulter de l'accumulation de BDNF. Enfin, les variations de BDNF dans le VLPO sont toujours présentes en absence de cycle L/D

et, bien que son schéma d'expression ne soit pas tout à fait le même qu'en condition L/D, une accumulation de BDNF est constatée pendant la période obscure subjective. Ce qui suggère que l'expression cyclique du BDNF dans le VLPO pourrait être sous-tendue par des processus circadiens, bien que la synchronisation avec la lumière semble importante pour que ces variations conservent leur phase. Les privations de sommeil en cours au laboratoire pourront nous apporter plus de précisions sur ce point, notamment sur l'implication de processus homéostatiques dans ces variations de BDNF.

4 Origine du BDNF dans le VLPO: synthèse et maturation

La synthèse et la maturation du BDNF sont des processus multi-étape complexes faisant intervenir plusieurs isoformes biologiquement actives (Kowiański et al., 2018). Au sein du SNC, le BDNF est synthétisé par différents types cellulaires et sa sécrétion peut être constitutive comme active et dépendra du type cellulaire considéré (Mowla et al., 2001 ; Brigadski et Leßmann, 2020). Au sein du VLPO, l'expression du BDNF varie au cours du cycle L/D et nous avons constaté que son ARNm présente un schéma d'expression similaire à la protéine (**Figure 32 A-G**), suggérant que le BDNF du VLPO pourrait en grande partie être synthétisé localement. De plus, les astrocytes seraient impliqués dans le processus de maturation du BDNF, en internalisant le proBDNF, en le clivant en mBDNF puis en le sécrétant (Bergami et al., 2008 ; Vignoli et al., 2016).

Nous avons déjà vu précédemment que les cellules du VLPO synthétisent du BDNF (§ 3.1, p.139). Nous avons alors entrepris d'identifier le ou les types cellulaires qui synthétisent le BDNF dans le VLPO.

4.1 Synthèse du BDNF par les neurones du VLPO

Nous avons réalisé une série de FISH visant comarquer l'ARNm du BDNF et divers marqueurs cellulaires : S100 pour les astrocytes, iba1 pour les microglies, la l'ARNm de la galanine (*GAL*) pour les neurones promoteurs du sommeil, l'ARNm *vGAT* pour les neurones inhibiteurs et l'ARNm *vGLUT* pour les excitateurs (**Figure 33 A**). Tout d'abord, j'ai déterminé les types cellulaires qui expriment l'ARNm du *BDNF*. Pour cela, j'ai compté, parmi les cellules *BDNF*⁺, le nombre de cellules double positives pour le FISH *BDNF* et les cinq marqueurs cellulaires (S100, iba1, *GAL*, *vGAT*, *vGLUT*). Ainsi, parmi l'ensemble des cellules exprimant l'ARNm *BDNF*, moins de 5 % des cellules S100⁺ et iba1⁺ l'expriment. Ce sont les neurones galaninergiques (*GAL*⁺), inhibiteurs (*vGAT*⁺) et excitateurs (*vGLUT*⁺) qui expriment l'ARNm *BDNF* (**Figure 33 B**, S100 : 5,340 ± 1,53 %, iba1 : 3,76 ± 1,60 %, *GAL* : 39,08 ± 2,41 %, *vGAT* : 50,40 ± 2,81 %, *vGLUT* : 46,84 ± 2,03 % ; test de Kruskal-Wallis, P < 0,0001).

Dans le VLPO, plusieurs populations neuronales co-existent et expriment différents neurotransmetteurs et neuropeptides (Arrigoni et Fuller, 2022). Au sein du groupes de cellules qui expriment l'ARNm *BDNF*, nous nous sommes intéressés à la proportion de cellules à la fois GABAergiques/galaninergiques et Glutamatergiques/galaninergiques en comptant, parmi les cellules galaninergiques (*GAL*⁺), la proportion de cellules *vGAT*⁺ ou *vGLUT*⁺ dans le VLPO. Plus de 50 % des cellules galaninergiques expriment le transporteur vésiculaire du GABA et notons tout de même que 14 % des neurones galaninergiques expriment le transporteur vésiculaire du glutamate (**Figure 33 C**, *GAL*⁺*vGAT*⁺ : 55,61 ± 2,73 %, *GAL*⁺*vGlut*⁺ : 17,08 ± 1,42 % ; t-test non apparié, P < 0,0001). Ainsi, dans le VLPO, la majorité des neurones gala-

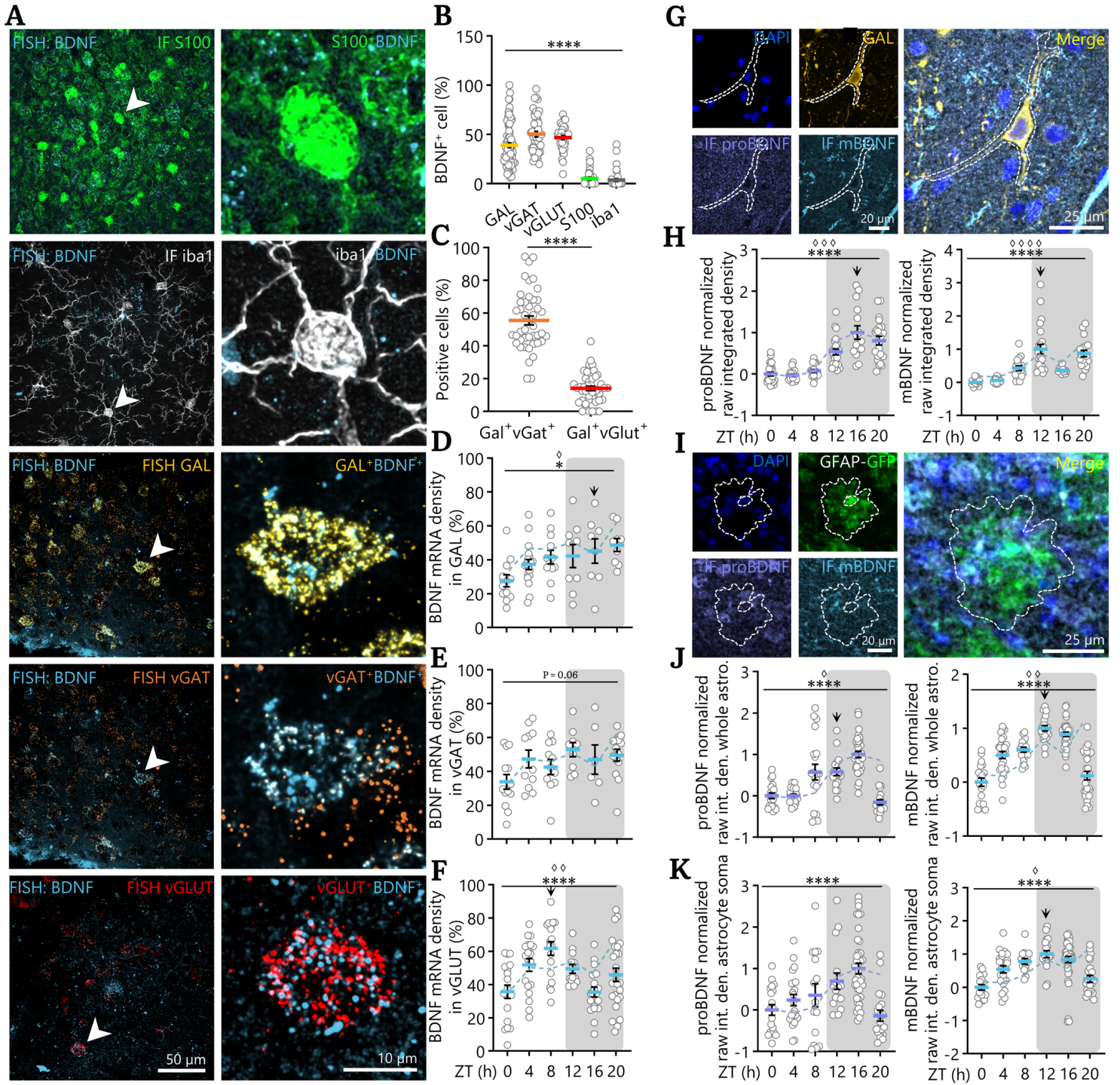


Figure 33 : Origine cellulaire et maturation du BDNF dans le VLPO. **A.** Images de microscopie confocale de VLPO de souris C57BL/6 ($N = 2$) avec un double marquage FISH BDNF et, de haut en bas, immunofluorescence (IF) S100, IF iba1, FISH galanine (*GAL*), FISH *vGAT* et FISH *vGLUT*. Les têtes de flèche blanches pointent le soma de cellules comarquées et agrandies sur l'image de droite. **B.** Comptage des types cellulaires du VLPO exprimant l'ARNm BDNF. Chaque point du nuage de point représente le rapport entre le nombre de cellules comarquées par le nombre de cellules BDNF⁺ $\times 100$ comptées dans des ROI de VLPO à différents moments du cycle L/D sur des souris C57BL/6 (test de Kruskal-Wallis). **C.** Dénombrement des cellules galaninergiques *vGAT* et galaninergique *vGLUT* du VLPO, déterminée à partir de l'expression des ARNm *GAL*, *vGAT* et *vGLUT* (t-test non apparié). **D-F.** Quantification de la densité d'ARNm dans les somas de cellules *GAL*⁺, *vGAT*⁺ et *vGLUT*⁺. Chaque point représente la densité d'ARNm BDNF mesurée dans une ROI du VLPO (ANOVA. 1 facteur, test de Kruskal-Wallis et analyse de Rayleigh-Moore). **G.** Images confocales de VLPO de souris Gal-GFP ($N = 3$) et immunomarquages du proBDNF et mBDNF. **H.** Quantification de la *raw integrated density* du proBDNF et mBDNF dans les neurones galaninergiques (surface pointillée sur les images confocale en E) rapportée à la surface de la ROI et normalisée par rapport à ZT-0. **I.** Images confocales de VLPO de souris GFAP-GFP ($N = 3$) et immunomarquages proBDNF et mBDNF. **J.** Quantification de la *raw integrated density* du proBDNF et mBDNF dans les astrocytes du VLPO (surface pointillée sur les images confocale en G) rapportée à la surface de la ROI et normalisée par rapport à ZT-0. **K.** Idem que précédemment (J) sauf que la mesure est faite dans le soma de l'astrocyte. Pour F-H, chaque point représente la *raw int. den.* normalisée pour une cellule/un soma du VLPO (ANOVA 1 facteur, test de Kruskal-Wallis et analyse de R-Moore). Pour l'ensemble, les résultats sont présentés sous la forme moyenne \pm SEM. Les courbes en pointillés représentent les variations globales, dans l'ensemble du VLPO, de l'ARNm *BDNF*, du *proBDNF* ou du *mBDNF* en fonction des graphes considérés. Les flèches horizontales représentent les valeurs de crête maximales atteintes par chaque sinusoïde modélisant les variations périodiques observées (càd. la phase du signal).

ninergiques sont GABAergiques, cependant il n'est pas à exclure que certains soient à la fois GABAergiques et glutamatergiques.

Les neurones galaninergiques, GABAergiques et glutamatergiques du VLPO synthétisent donc l'ARNm *BDNF* et pourraient être à l'origine des variations d'expression du BDNF observées dans le VLPO au cours du cycle L/D. Afin de déterminer, parmi ces trois types cellulaires, celui ou ceux impliqués dans ce schéma d'expression du BDNF, j'ai quantifié la densité du signal FISH *BDNF* dans les somas des cellules *GAL*⁺, *vGAT*⁺ et *vGLUT*⁺ du VLPO. Tout d'abord, au sein des somas des neurones galaninergiques (*GAL*⁺), l'expression de l'ARNm *BDNF* varie au cours du cycle L/D de manière périodique et augmente de ZT-0 à ZT-20 (**Figure 33 D**, ANOVA 1 facteur, $P = 0,0319$, analyse de R-Moore, $P^{24} = 0,0254$). Dans les somas des neurones GABAergiques (*vGAT*⁺), l'ARNm *BDNF* tend à s'accumuler de ZT-0 à ZT-12 (**Figure 33 E**, test de Kruskal-Wallis, $P = 0,0657$). Enfin, au sein des somas glutamatergiques (*vGLUT*⁺), l'ARNm *BDNF* s'accumule en fin de période lumineuse puis son tau diminue au cours de la période d'obscurité (**Figure 33 F**, ANOVA 1 facteur, $P = 0,0319$, analyse de R-Moore, $P^{24} = 0,0086$). Dans ces trois cas, les fluctuations d'ARNm *BDNF* observées suivent les fluctuations globales mesurées dans l'ensemble du VLPO au cours du cycle L/D (**Figure 33 D-F**, courbes pointillés bleus) suggérant que ces trois types cellulaires contribuent à cet effet.

Pour vérifier que l'ARNm du BDNF, exprimé de manière cyclique dans les neurones galaninergiques du VLPO, est bien traduit, j'ai immunomarcqué les formes proneurotrophine et mature de la protéine BDNF sur des coupes de VLPO de souris Gal-GFP. L'expression de la GFP sous le contrôle du promoteur de la galanine permet de visualiser les neurones galaninergiques et de mesurer les taux de proBDNF et mBDNF au sein de ces cellules (**Figure 33 G**). J'ai quantifié la *raw integrated density* du proBDNF au sein des neurones galaninergiques et trouvé une accumulation périodique pendant la phase obscure (**Figure 33 H**, ANOVA 1 facteur, $P < 0,0001$, analyse de R-Moore, $P^{24} = 0,0002$) qui reflète parfaitement les variations globales de proBDNF dans le VLPO (**Figure 33 H**, courbe en pointillés violets). De plus, le déphasage entre les oscillations d'ARNm *BDNF* et de proBDNF dans les neurones galaninergiques est d'environ 2 heures ce qui suggère qu'une partie du proBDNF du VLPO est produite par les neurones galaninergiques. Enfin, pour vérifier si le proBDNF pouvait être mûré dans les neurones Gal, j'ai également immunomarcqué le mBDNF sur des coupes de VLPO de souris Gal-GFP et mesuré la *raw int. den.* dans le soma (**Figure supp. 4 A, C**) et dans l'ensemble de la cellule (**Figure 33 H**). Dans ces deux cas, on constate une accumulation périodique de la fin de la période lumineuse au début de la période obscure, suivi d'une dépression à ZT-16 qui est suivie d'un rebond avant le passage de la période obscure à lumineuse (**Figure supp. 4 C**, test de Kruskal-Wallis, $P = 0,0002$, analyse de R-Moore, $P = 0,0086$; **Figure 33 H**, test de Kruskal-Wallis, $P < 0,0001$, analyse de R-Moore, $P^{24} < 0,0001$ et $P^{12} = 0,0369$). Ce schéma de variations est similaire à

celui observé pour le mBDNF global dans le VLPO (**Figure 33 H**, courbe en pointillés bleus).

Finalement, au sein du VLPO, le BDNF serait majoritairement produit par les neurones glutamatergiques, galaninergiques et GABAergiques. Ces derniers sont à l'origine des variations des taux d'ARNm BDNF observées au cours du cycle L/D.

4.2 Stockage et maturation du BDNF produit par les neurones dans les astrocytes

Les astrocytes du VLPO ne semblent pas produire de BDNF (**Figure 33 B**). Cependant, nous avons vu que ces derniers peuvent internaliser le proBDNF et le maturer en mBDNF et peuvent également réguler les taux de mBDNF extracellulaire en le captant (Bergami et al., 2008 ; Vignoli et al., 2016). Pour vérifier si les astrocytes du VLPO sont susceptibles d'internaliser le BDNF pour le maturer ou le relarguer ultérieurement, j'ai marqué le proBDNF et le mBDNF par immunofluorescence sur des coupes de VLPO de souris GFAP-GFP. J'ai ensuite mesuré la *raw int.den.* des signaux proBDNF et mBDNF dans les somas astrocytaires et dans l'ensemble des astrocytes du VLPO (**Figure 33 G**). Nous pouvons constater, au sein des astrocytes du VLPO, la présence de proBDNF et de mBDNF dont les taux oscillent au cours du cycle L/D. Au sein des somas, le proBDNF et le mBDNF s'accumulent à partir de ZT-4 jusqu'au milieu de la période obscure (**Figure 33 I**, *proBDNF* : test de Kruskal-Wallis, $P < 0,0001$; *mBDNF* : ANOVA 1 facteur, $P < 0,0001$, analyse de R-Moore, $P^{24} = 0,0100$). De même, dans l'ensemble des astrocytes, les variations observées sont similaires pour le mBDNF, tandis que le proBDNF commence à s'accumuler plus tardivement, à ZT-8 (**Figure 33 H**, *proBDNF* : test de Kruskal-Wallis, $P < 0,0001$, analyse de R-Moore, $P^{24} = 0,0347$; *mBDNF* : ANOVA 1 facteur, $P < 0,0001$, analyse de R-Moore, $P^{24} = 0,0003$). En comparaison avec la courbe d'expression globale du mBDNF dans le VLPO (**Figure 33 H** et **I**, courbe en pointillés bleus), l'expression du mBDNF dans les astrocytes semble plus importante ce qui pourrait suggérer que ces derniers potentiellement stocker du mBDNF. Enfin, nous avons également constaté une accumulation de mBDNF dans le soma des microglies, bien que le schéma de variations diffère de celui observé dans les neurones galaninergiques et dans les astrocytes (**Figure supp. 4 B** et **D**, test de Kruskal-Wallis, $P = 0,0002$, analyses de R-Moore, $P^{12} = 0,0007$).

5 Effets *in vivo* du BDNF et rôles de la Cx30 sur le sommeil

Depuis le début du siècle, des études suggèrent que le BDNF pourrait être impliqué dans la régulation du sommeil. En effet, alors que des injections de BDNF induisent une augmentation de la durée du sommeil et des oscillations corticales lentes (similaires à celles observées en SL ; (Kushikata et al., 1999 ; Faraguna et al., 2008), des souris KO pour le gène codant le BDNF présentent des altérations de leur sommeil. Ces animaux ont un retard à l'endormissement pendant la période de repos ainsi qu'une durée du sommeil réduite pendant la phase obscure qui pourrait correspondre à une altération des comportements de « sieste » observés normalement pendant la période d'activité (Martinowich et al., 2011). Enfin, des KO murins du récepteur TrkB.t1 voient la durée de leur SP augmentée et la latence à laquelle les épisodes de SP surviennent est réduite.

Dans notre hypothèse, le BDNF serait impliqué dans la régulation de l'activité du VLPO, et donc du sommeil, via la modulation de la morphologie des astrocytes. Afin de déterminer l'implication du BDNF dans la régulation du sommeil, nous avons réalisé des micro-injections de BDNF dans le VLPO de souris et enregistré leur durée de sommeil avec un dispositif non-invasif de cages piézoélectriques (**Figure 34 A**). Pour prendre en compte un éventuel effet du moment d'injection du BDNF, les injections ont été faites à deux moments opposés du cycle, à savoir le début de la période lumineuse (ZT-0) et le début de la période d'obscurité (ZT-12).

5.1 Injection de BDNF dans le VLPO et quantité de sommeil

L'injection de BDNF dans le VLPO à ZT-0, le début de la période lumineuse, induit une augmentation significative du temps passé endormi à ZT-12 et ZT-20, soit respectivement 12 h et 20 h après l'injection (**Figure 34 B**, ANOVA 2 facteurs/Šídák, $P_{ZT-12} = 0,0037$ et $P_{ZT-20} = 0,0036$). Cet effet du BDNF se produit pendant la période d'obscurité, qui correspond à la période d'activité des souris (**Figure 34 C**, *night* : test de Wilcoxon, $P = 0,0313$; *ZT-20* : test de Wilcoxon, $P = 0,0313$) et semblerait dû à une augmentation du nombre d'événements de sommeils (**Figure supp. 5 A**, *sleep bouts count* : test de Wilcoxon, $P = 0,1875$) associée à une diminution de la durée et du nombre des événements d'éveil (**Figure supp. 5 A**, *wake bouts duration* : test de Wilcoxon, $P = 0,1563$; *wake bouts count* : test de Wilcoxon, $P = 0,1563$).

De façon similaire, l'injection du BDNF à ZT-12 a un effet sur la durée de sommeil qui se manifeste plus de 12 h après l'injection (**Figure 34 D**, ANOVA 2 facteurs, $P_{ZT-8} = 0,0490$) qui se traduit par une augmentation du temps passé endormi à ZT-8. Cette augmentation est observée pendant la période lumineuse avant la transition avec la période d'obscurité (**Figure 34 E**, tests de Wilcoxon, $P_{\text{day}} = 0,0625$, $P_{ZT-8} = 0,0625$).

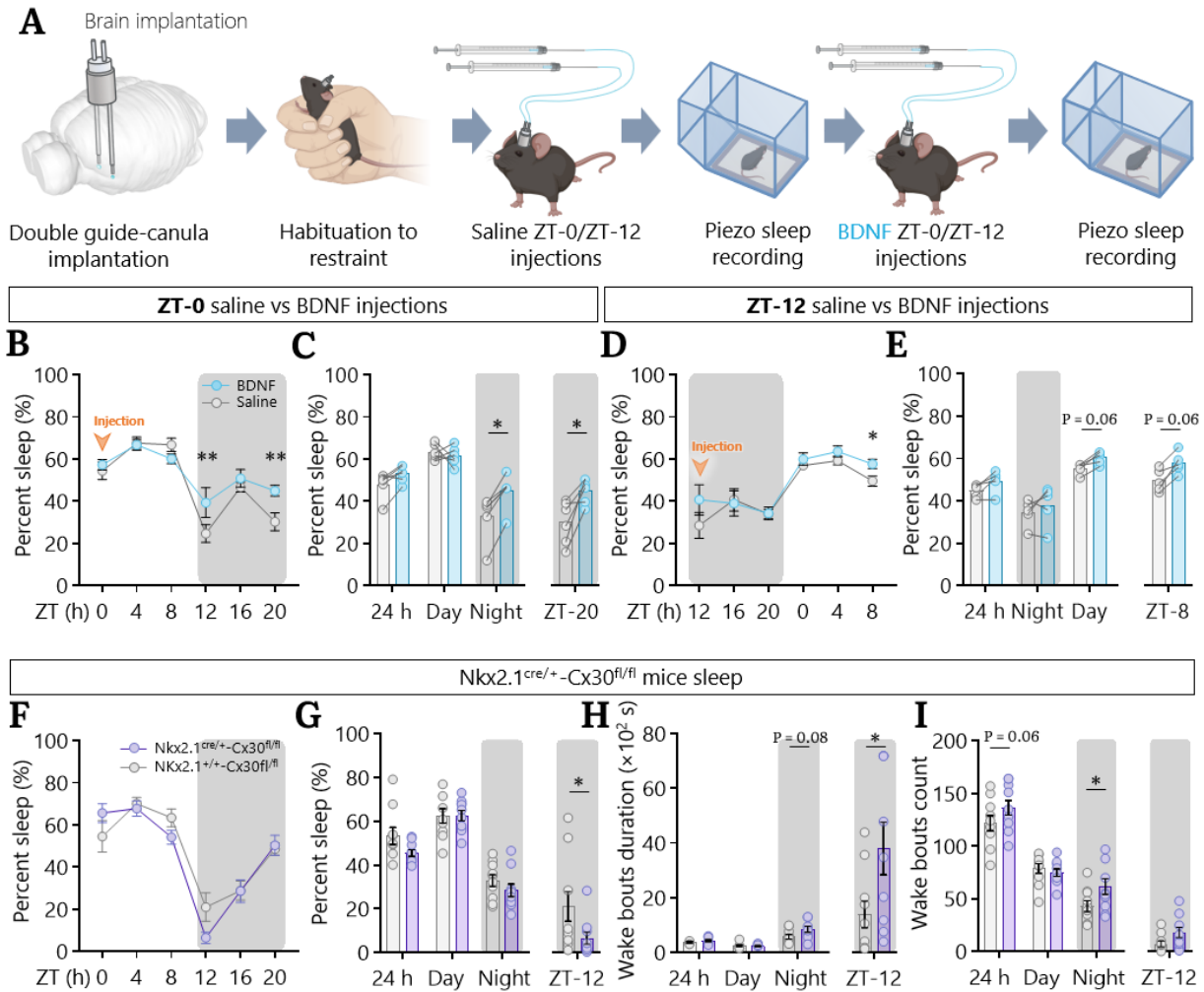


Figure 34 : Effets de l'injection de BDNF ou de la déficience Cx30 sur le sommeil. **A.** Schéma du protocole expérimental. Un double guide canule est implanté en ciblant les deux VLPO. Après récupération post-chirurgie (10 j) et habituation à la manipulation et à l'ensemble de l'expérience (2 sem.), les animaux ont reçu une injection saline à ZT-0 ou ZT-12 puis leur sommeil a été enregistré 24 h en cages piézoélectriques. Une semaine plus tard, les mêmes animaux ont reçu l'injection de BDNF et leur sommeil a été enregistré pendant 24 h. **B.** Pourcentages de temps passé endormi sur des périodes de 4 h suivant l'injection de solution saline ou BDNF (flèche orange) à ZT-0. **C.** Pourcentages moyens de temps de sommeil sur les périodes de 24 h, lumineuse (12 h), obscure (12 h) et à ZT-20 (4 h) après injection à ZT-0. Chaque point représente un animal (N = 6) ; les lignes grises relient les points en conditions saline et BDNF d'un même animal. **D.** Pourcentage moyen de temps passé endormi sur des périodes de 4 h suivant l'injection de solution saline ou BDNF (flèche orange) à ZT-12. **E.** Pourcentage de temps de sommeil sur les périodes de 24 h, lumineuse (12 h), obscure (12 h) et à ZT-8 (4 h) après injection à ZT-12. Chaque point représente un animal (N = 5) ; les lignes grises relient les points en conditions saline et BDNF d'un même animal. **F.** Pourcentage moyen de temps passé endormi sur des périodes de 4 h des souris *littermate* Nkx2.1^{cre/+}-Cx30^{fl/fl} et Nkx2.1^{+/+}-Cx30^{fl/fl} enregistrées en cages piézoélectriques (24 h). **G.** Pourcentage de temps de sommeil sur des périodes de 24 h, lumineuse (12 h), obscure (12 h) et à ZT-12. **H.** Durée moyenne des événements d'éveil sur les 24 d'enregistrement, pendant les périodes lumineuse (12 h) et obscure (12 h) et à ZT-12. **I.** Nombre d'événements d'éveil moyen sur les 24 d'enregistrement, pendant les périodes lumineuse (12 h) et obscure (12 h) et à ZT-12. Chaque point représente un animal (N = 10 Nkx2.1^{+/+}-Cx30^{fl/fl} et N' = 10 Nkx2.1^{cre/+}-Cx30^{fl/fl}). Les résultats sont présentés sous la forme moyenne ± SEM ; ANOVA 2 facteurs avec test de comparaison multiple de Šidák, test de Wilcoxon, t-test non apparié et test de Mann-Whitney.

Ainsi, l'injection de BDNF dans le VLPO induit une augmentation du temps passé endormi. En injectant au début de la période de repos (ZT-0) l'effet est observé 12 h après, au moment de la transition entre période de repos et période d'activité. De plus, un second effet est observé à l'interface entre phase obscure et lumineuse, qui correspond la fin de la période d'activité. L'injection à ZT-12 induit également un effet en fin de la période de repos suivant l'injection.

5.2 Sommeil des souris déficientes pour la Cx30 dans la POA

Le BDNF induit, au sein du VLPO, une plasticité morphologique des astrocytes dépendante de la Cx30. Or nous supposons que les effets du BDNF sur le sommeil seraient médiés par cette plasticité morphologique des astrocytes. Nous avons vu que les souris déficientes pour la Cx30 ne présentent plus de changements morphologiques des astrocytes du VLPO. Nous nous sommes donc demandé si une déficience de la Cx30 dans l'aire préoptique pouvait altérer le sommeil.

Nous avons utilisé des souris $Nkx2.1^{cre/+}-Cx30^{fl/fl}$ qui n'expriment pas la Cx30 dans la POA (incluant donc le VLPO). Comme nous pouvons le constater sur la **Figure supp. 5 D**, seuls quelques rares astrocytes expriment encore la Cx30. Le sommeil de ces souris a été enregistré en cage piézoélectriques et comparé au sommeil de $Nkx2.1^{+/+}-Cx30^{fl/fl}$ des mêmes portées et qui expriment normalement la Cx30 dans la POA (**Figure supp. 5 D**). En fin de période de repos, les souris $Nkx2.1^{cre/+}-Cx30^{fl/fl}$ dorment moins que les contrôles (**Figure 34 F et G**, ZT-12 : t-test non apparié, $P = 0,0047$). Cette diminution du sommeil semble s'expliquer par une augmentation du nombre et de la durée des événements d'éveil (**Figure 34 H et I**, *wake bouts duration* : test de Mann-Whitney, $P_{night} = 0,0892$, $P_{ZT-12} = 0,0789$; *wake bouts count* : t-test non apparié, $P_{24h} = 0,0646$, $P_{night} = 0,0209$, $P_{ZT-12} = 0,1722$). La non-expression de la Cx30 dans la POA et donc dans le VLPO semble donc diminuer la durée du sommeil à la transition entre la phase lumineuse et obscure, au moment où l'on observe l'activation du récepteur TrkB et l'augmentation de la taille et de la complexité des astrocytes.

Finalement, l'injection de BDNF au sein du VLPO modifie la durée du sommeil des souris et semble avoir un effet sur son maintien, notamment en fin de période de repos. De plus, au sein de la POA, l'absence de Cx30 semble induire un réveil précoce des animaux en fin de période de repos et début de période d'activité, ce qui paraît cohérent avec notre modèle de régulation du sommeil passant par le BDNF et la modulation de la plasticité morphologique des astrocytes impliquant la Cx30.

Quatrième Partie

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Mes travaux de thèse ont visé à déterminer si une modulation des prolongements astrocytaires du VLPO au cours du cycle circadien pourrait intervenir dans la régulation du sommeil, via la libération locale de BDNF et l'expression de la Cx30. Au cours de cette discussion, nous mettrons en regard les résultats produits au cours de ma thèse avec les données de la littérature. Nous détaillerons les apports de ces travaux dans la compréhension des mécanismes de régulation du sommeil, notamment au sein du centre du sommeil qu'est le VLPO. Enfin, nous détaillerons les interprétations des résultats et évoquerons les perspectives qui en découlent.

1 Plasticité morphologique des astrocytes du VLPO au cours du cycle circadien

Dans notre première partie, nous avons montré, pour la première fois, que les astrocytes du VLPO présentent, chez la souris, une plasticité morphologique au cours du cycle L/D. Cette plasticité est caractérisée par une augmentation progressive du volume et de la complexité des astrocytes pendant la phase lumineuse, qui correspond à la période de repos de ces animaux. Puis, au cours de la phase obscure (période de plus grande activité), le volume et la complexité des astrocytes diminuent progressivement jusqu'à revenir aux valeurs observées en début de phase lumineuse. Les analyses de Rayleigh-Moore nous ont permis de mettre en évidence une périodicité de cette plasticité morphologique sur les 24 h du cycle L/D, avec un maximum de complexité et de taille atteint à ZT-8. Afin de déterminer si cette plasticité morphologique des astrocytes implique une réactivité astrocytaire, nous avons étudié les changements d'expression de la GFAP, un filament intermédiaire glial (Lawal et al., 2022), au cours du cycle circadien. Chez la souris et le hamster, les taux de GFAP du SCN varieraient au cours du cycle L/D ainsi qu'en cycle D/D (Lavialle et Servière, 1993 ; Santos et al., 2005). Ainsi, j'ai pu montrer que son expression ne varie pas significativement au cours du cycle L/D, suggérant que cette plasticité n'implique pas de variations d'expression de la GFAP et n'est pas due à de la réactivité astrocytaire. La plasticité morphologique astrocytaire étant un mécanisme impliqué dans la modulation de l'excitabilité neuronale et de la transmission synaptique (Theodosis et al., 2008 ; Pannasch et al., 2014), les prolongements astrocytaires pourraient, en fin de période de repos, envahir les fentes synaptiques au niveau des neurones promoteurs du sommeil (galaninergiques) du VLPO et moduler leur inhibition par les interneurons locaux et par les afférences des centres promoteurs de l'éveil. Ce processus permettrait une augmentation de leur excitabilité et de consolider le sommeil. Ce phénomène pourrait alors être à l'origine du maintien du sommeil pendant ainsi qu'en fin de période de repos, lorsque la pression de sommeil, exercée notamment par l'adénosine, est faible.

Au cours du sommeil, il a été montré, chez la souris, que la taille de l'espace extracellulaire cortical augmente. Ces variations du volume de l'espace interstitiel seraient impliquées dans la clairance des métabolites et autres déchets de l'activité cellulaire (Xie et al., 2013). De plus, ces variations ont un impact sur les concentrations locales en ions et neurotransmetteurs dans l'espace extracellulaire, ce qui a une répercussion

sur la neurotransmission et l'excitabilité neuronale (Haj-Yasein et al., 2012). La taille des astrocytes du VLPO augmentant pendant la phase lumineuse, nous avons mesuré les variations de surface de l'espace extracellulaire du VLPO entre deux moments opposés du cycle L/D, à savoir le début de la phase lumineuse (ZT-0) et le début de la phase obscure (ZT-12). Au début de cette dernière (ZT-12), j'ai pu mettre en évidence que l'espace extracellulaire du VLPO est plus restreint. Or, à ce moment du cycle, le volume des astrocytes est plus grand qu'au début de la phase lumineuse. Inversement, au début de la phase lumineuse, quand les astrocytes sont plus petits, l'espace interstitiel est plus grand. Ces résultats suggèrent que le volume de l'espace interstitiel du VLPO diminue pendant la période de repos, puis réaugmenterait au cours de la période d'activité. Ces variations de taille de l'espace extracellulaire observées entre ZT-0 et ZT-12 pourraient être en partie dues aux variations de volume des astrocytes du VLPO. Ainsi, les variations de l'espace extracellulaire au cours du cycle circadien seraient temporellement opposées à celles observées dans le cortex. Cette opposition de phase pourrait être due au fait que le VLPO est une structure très active principalement pendant les épisodes de sommeil, contrairement au cortex, et son activité s'opposerait alors à la clairance des métabolites et autres déchets cellulaires. Inversement, pendant les périodes d'éveil (pendant la phase obscure), le VLPO étant moins actif, l'augmentation du volume de l'espace interstitiel pourrait permettre le drainage des déchets. Enfin, étant donné que le cortex présente des variations de taille de l'espace interstitiel, nous nous sommes demandé si les astrocytes cortex présentaient également une plasticité morphologique circadienne. Le cortex étant une région fortement active pendant l'éveil, contrairement au VLPO, qui est principalement actif pendant le sommeil, j'ai pu montrer que les astrocytes du cortex moteur (M1) ne semblent pas présenter de plasticité morphologique significative au cours du cycle L/D, bien qu'une tendance semble exister. Ce phénomène pourrait être spécifique du VLPO et, peut-être à plus grande échelle, de certaines régions promotrices du sommeil.

La régulation du sommeil étant sous-tendue par des processus circadiens et homéostatiques, nous avons cherché à déterminer quel(s) processus est/sont impliqué(s) dans la plasticité morphologique des astrocytes du VLPO. Pour cela nous avons commencé par étudier l'implication de la composante circadienne sur la morphologie des astrocytes de souris placées en conditions de jour constant (L/L) ou de nuit constante (D/D). En L/L nous avons constaté qu'en moyenne, les astrocytes du VLPO ont un volume significativement plus important qu'en cycle L/D. De plus, au cours du cycle subjectif, les astrocytes du VLPO ne présentent plus de variations significatives ni de taille ni de complexité. Cependant, comme le volume moyen atteint par les astrocytes en L/L est bien supérieur au volume maximum observé en L/D, il est possible que cette absence de variations reflète un phénomène de saturation. De plus, la lumière étant un puissant stimulus synchronisateur de l'horloge interne, l'exposition constante à la lumière pourrait avoir perturbé le rythme circadien endogène. En effet, il a été montré dans la littérature que l'exposition à de la lumière constante est connue pour désynchroniser les cellules d'horloge du SCN

(Ohta et al., 2005) altérant la rythmicité de certains comportements. Par exemple, lorsque des souris sont placées en L/L, leur activité locomotrice circadienne est altérée et présente soit (i) une forte arythmie, soit (ii) reste périodique, mais avec un allongement des périodes d'activité ou enfin (iii) est répartie en deux événements par 24 h (Possidente et Birnbaum, 1979). Cependant, lorsque des animaux sont placés en D/D, après une exposition L/L, la rythmicité de l'activité locomotrice revient et l'exposition à un cycle L/D suffit à resynchroniser l'horloge (Chen et al., 2008). Ainsi, mes résultats montrent qu'après une exposition à un cycle d'obscurité constante, le volume des astrocytes du VLPO présente des variations périodiques avec un maximum atteint au milieu de la période lumineuse subjective, ce qui correspond à une avance de phase de 4 h par rapport au cycle L/D. Donc, en D/D, la périodicité de la plasticité morphologique des astrocytes est maintenue avec un décalage de phase. Or, lorsque les souris sont placées en conditions d'obscurité constante, le rythme réel de l'horloge interne peut être observé. Chez la souris, le cycle de l'horloge interne est légèrement inférieur à 24 h, donc en condition D/D, l'horloge interne a tendance à être en avance de phase (Richardson et al., 1985 ; Eckel-Mahan et Sassone-Corsi, 2015). Ceci pourrait expliquer l'avance de phase observée pour les variations de volume des astrocytes du VLPO en D/D. Enfin, concernant la complexité des astrocytes, nous n'avons pas observé de variations significatives en conditions L/L et D/D, bien que dans le cas de l'index de complexité²⁰, il y ait une tendance à des variations au cours du cycle. La synchronisation de l'horloge interne avec la lumière pourrait donc être impliquée dans ce mécanisme de complexification des astrocytes observé en cycle L/D. Au vu de ces résultats, il semblerait que l'horloge circadienne interne ait une implication dans la plasticité morphologique des astrocytes du VLPO, notamment parce qu'en D/D, les variations de volume des astrocytes sont périodiques et présentent une avance de phase. Pour corrélérer cette plasticité morphologique des astrocytes en cycle L/L et D/D avec le sommeil des souris, des enregistrements de la quantité de sommeil en cage piézoélectrique sont en cours.

Ainsi, au sein du VLPO les variations de volume des astrocytes observées en L/D semblent soutenues par des processus circadiens. Cependant, comme aucune variation de complexité morphologique n'est observée en conditions L/L et D/D, ce phénomène observé en L/D pourrait également impliquer des composantes homéostatiques. Pour étudier cette hypothèse, des expériences des privations de sommeil de 4 h, suivies ou non de 2 h de rebond de sommeil, sont en cours au laboratoire. Il serait également intéressant d'étudier les effets de la suppression du rythme circadien intrinsèque sur la plasticité morphologique des astrocytes du VLPO. Pour cela nous pourrions effectuer des lésions du SCN ou bien utiliser des agents pharmacologiques dans le but des perturber l'expression des gènes d'horloge.

Finalement, nous supposons que la plasticité morphologique des astrocytes du VLPO pourrait contribuer à la régulation de son activité via l'insertion des prolongements astrocytaires distaux dans les fentes synaptiques. Pour vérifier cette hypothèse, nous

sommes en train de mesurer la distance des prolongements astrocytaires aux synapses excitatrices et inhibitrices du VLPO au cours du cycle L/D. Pour cela, nous utilisons une procédure mise au point au laboratoire reposant sur la microscopie STED. Brièvement, des marqueurs pré- et postsynaptiques sont immunodétectés et imagés en microscopie à super résolution STED (*STimulated-Emission-Depletion*) ainsi que les prolongements astrocytaires. Ensuite, la distance de ces prolongements avec les *clusters* formés par un groupe pré et un groupe postsynaptique est mesurée au cours du cycle L/D au sein du VLPO. L'emploi de la microscopie STED nous permet de passer la limite de diffraction d'Airy et d'obtenir une résolution de l'ordre de la dizaine de nanomètres. A l'issue de cette expérimentation, nous pourrions voir si la proximité des prolongements astrocytaires aux synapses varie et si ces variations au cours du cycle L/D sont corrélées à la plasticité morphologique des astrocytes du VLPO.

2 Rôles de la Cx30 dans la plasticité morphologique des astrocytes du VLPO

Les astrocytes expriment abondamment certaines connexines dont la Cx30 et la Cx43 (Giaume et al., 1991 ; Rash et al., 2001). Elles remplissent de nombreuses fonctions liées à leur activité en tant que jonctions communicantes, hémicanaux ou d'autres fonctions indépendantes de leur activité canal. Ces fonctions vont de la propagation des vagues calciques astrocytaires, en passant par la sécrétion de gliotransmetteurs, à la modulation de la plasticité morphologique des astrocytes (Giaume et al., 2013). En effet, il a été montré au laboratoire que, dans l'hippocampe, la modulation de l'expression de la Cx30 est impliquée dans la plasticité morphologique des astrocytes ainsi que la proximité des prolongements astrocytaires à la synapse (Pannasch et al., 2014 ; Ghézali et al., 2018). Ayant observé une plasticité morphologique des astrocytes du VLPO au cours du cycle L/D, nous avons supposé que, comme dans l'hippocampe, elle pourrait impliquer des variations d'expression de la Cx30. Nous avons donc étudié l'impact de l'absence de Cx30 sur la plasticité morphologique des astrocytes du VLPO, chez des souris GFAP-GFP-Cx30^{Δ/Δ}. En absence de Cx30, nous n'observons ni de variations de taille ni de complexité des astrocytes au cours du cycle circadien, ce qui suggère que la Cx30 serait nécessaire à cette plasticité. Ces résultats sont retrouvés lors d'incubation de coupes aiguës de VLPO avec du BDNF. De plus, en contexte Cx30^{Δ/Δ} en cycle L/D, les astrocytes ont un volume moyen très grand et sont moins complexes que ceux des souris Cx30^{+/+}. Ces résultats suggèrent que, comme observé dans l'hippocampe, la Cx30 serait impliquée dans la régulation de la morphologie astrocytaire et que son absence conduit à un volume astrocytaire constitutivement plus important que lorsque qu'elle est exprimée, et qui est associé à une diminution de la complexité astrocytaire. Etant donné que la diminution d'expression de la Cx30 est associée, dans l'hippocampe, à une infiltration des prolongements astrocytaires dans les fentes synaptiques (Pannasch et al., 2014), nous avons également quantifié les variations d'expression de la Cx30 dans le VLPO au cours du cycle L/D. Ainsi, j'ai pu mettre en évidence, qu'au sein du VLPO la densité de Cx30 augmente en milieu de phase lumineuse, au moment où la taille et la complexité

2 Rôles de la Cx30 dans la plasticité morphologique des astrocytes du VLPO163

des astrocytes augmentent, puis décroît, jusqu'au milieu de la phase obscure (ZT-16) où elle réaugmente alors brutalement. A ce moment (ZT-16), les astrocytes présentent une taille et une complexité proche du minimum observé au cours du cycle L/D. Ce pic de densité de Cx30, observé à ZT-16 est similaire à celui observé à ZT-18 dans le SCN dans l'étude de Ali et coll. (2019). Dans cette étude, un second pic est observé à ZT-2, similaire à celui que nous avons observé à ZT-4 dans le VLPO. La forte accumulation de Cx30 mesurée à ZT-16 pourrait être impliquée dans la diminution rapide de la taille et de la complexité des astrocytes observée au même moment. Les variations d'expression de Cx30 du VLPO que j'ai quantifié ne semblent cependant pas présenter de périodicité au cours du cycle L/D de 24 h. Nous avons également quantifié l'expression de la Cx30 dans le VLPO par western blots. Cependant, son expression ne semble pas présenter de variations significatives au cours du cycle L/D. Ceci pourrait être dus au faible volume du VLPO chez la souris qui rend difficile la dissection sous loupe binoculaire et conduit à de très faibles concentrations des extraits protéiques lors des western blots. De plus, il est important de souligner que les mesures de densité de Cx30 et les western blots effectuées prennent en compte aussi bien les Cx30 membranaires que celles internalisées. Il serait intéressant d'étudier plus spécifiquement les variations d'expression de la Cx30 à la membrane. De plus, de manière générale, les connexines ont un taux de renouvellement très élevé avec une demi-vie allant de 1 à 5 h (Falk et al., 2009). Peut-être que notre fenêtre de mesure de 4 h n'est pas suffisamment précise pour observer de courtes variations de Cx30 qui pourraient survenir au cours du cycle L/D. Comme dans l'hippocampe la plasticité morphologique des astrocytes implique les fonctions non-canal de la Cx30, nous avons voulu étudier la morphologie des astrocytes du VLPO au cours du cycle L/D sur des souris Cx30T5M (Schütz et al., 2010) qui présente une altération des fonctions canal Cx30. Cependant, notre système de marquage des astrocytes par immunofluorescence ne permettait pas une reconstruction tridimensionnelle correcte et comparable des astrocytes avec les conditions L/D sur les souris GFAP-GFP et GFAP-GFP-Cx30^{Δ/Δ}.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'implication de l'horloge circadienne dans ces variations d'expression de la Cx30. En condition L/L, la densité moyenne de Cx30 dans le VLPO est plus importante qu'en L/D, mais ne semble pas présenter de variations au cours du cycle subjectif. En revanche, en D/D, les variations de Cx30 sont observées au cours du cycle circadien et, comme en L/D, la Cx30 s'accumule en milieu de période lumineuse subjective. Il est intéressant de noter que la densité moyenne en D/D est très inférieure à celle en L/L et inférieure à celle observée en L/D. Ainsi, les variations de Cx30 semblent soutenues par le rythme circadien. Cependant, la lumière semble avoir un effet sur la quantité de Cx30 dans le VLPO, ce qui pourrait expliquer l'énorme augmentation du volume des astrocytes observée en L/L et pourrait masquer la plasticité morphologique en conditions L/L. Il serait, ici aussi, pertinent d'étudier, en plus des privations de sommeil, les effets de la suppression du rythme circadien de l'horloge interne sur les taux de Cx30 au cours du cycle L/D.

Enfin, la Cx43 étant la connexine la plus abondamment exprimée dans le SNC et étant fortement impliquée dans le couplage astrocytaire via les jonctions communicantes (Wördsörfer et al., 2008), nous nous sommes intéressés à son expression dans le VLPO au cours du cycle L/D. Sa densité présente un schéma de variations périodique avec un pic atteint en fin de période lumineuse, à ZT-8, qui est similaire aux pics de la taille et de la complexité des astrocytes au cycle L/D. Bien que la Cx43 ne soit pas connue pour moduler la morphologie des astrocytes, les hémicanaux Cx43 astrocytaires peuvent, entre autres, libérer de l'ATP dans l'espace extracellulaire qui, une fois dégradé en adénosine, augmente l'excitabilité des neurones promoteurs du sommeil du VLPO et augmente la durée de sommeil pendant la période d'activité (Halassa et al., 2009 ; Hansen et al., 2014 ; Scharbarg et al., 2016 ; Kim et al., 2020). La Cx43 pourrait donc également être impliquée dans la régulation du sommeil au sein du VLPO et jouer un rôle dans le maintien du sommeil pendant la période d'activité. Il serait donc intéressant, dans nos perspectives, d'étudier cette hypothèse.

3 BDNF et plasticité morphologique des astrocytes du VLPO

Le BDNF une neurotrophine abondamment exprimée dans le SNC adulte (Yan et al., 1997). Comme la plupart des neurotrophines, il a de nombreux rôles soutenus par plusieurs isoformes et de nombreux récepteurs. Nous avons vu que la synthèse du BDNF conduit à plusieurs isoformes intermédiaires biologiquement actives notamment le proBDNF qui peut être clivé en mBDNF. Cette forme mature du BDNF a une forte affinité pour le récepteur tyrosine kinase TrkB. J'ai montré que, dans le VLPO, l'ARNm de TrkB, *NTRK2*, est exprimé par les neurones promoteurs du sommeil et les astrocytes. Cependant ces derniers l'expriment plus abondamment. Dans la littérature, il est démontré que le BDNF, via TrkB, a des effets sur le réarrangement du cytosquelette des cellules gliales (dont les astrocytes) et donc sur leur morphologie (Ohira et al., 2005 ; 2007). De plus, au sein du SCN, la signalisation BDNF/TrkB serait impliquée dans la régulation de la morphologie des astrocytes, processus qui pourrait prendre part à la synchronisation de l'horloge interne (Girardet et al., 2013). Plusieurs études, déjà décrites en introduction, ont également permis de supposer que le BDNF serait impliqué dans l'homéostasie du sommeil. Au regard de ces informations, nous avons donc supposé que le BDNF pourrait être impliqué dans la plasticité morphologique des astrocytes du VLPO. Nous avons ainsi montré que l'incubation de coupes aiguës de VLPO avec du BDNF induit une augmentation du volume et de la complexité des astrocytes, par rapport à l'incubation avec la solution saline contrôle. Etant donné qu'au cours du cycle L/D, les variations morphologiques des astrocytes seraient dépendantes de l'expression de la Cx30, nous avons étudié, *in vitro*, l'induction de cette plasticité par le BDNF sur des coupes de VLPO de souris déficientes pour la Cx30. Dans ce contexte Cx30^{Δ/Δ}, le BDNF n'induit plus de variation ni de taille, ni de complexité des astrocytes du VLPO. De plus, comme précédemment, les astrocytes semblent constitutivement plus grands qu'en

contexte Cx30^{+/+}. Nous avons également quantifié la densité de Cx30 dans le VLPO suite à ces incubations de coupes Cx30^{+/+} et n'avons pas trouvé de différences significatives entre l'incubation avec le BDNF ou avec la solution saline. Cependant, comme précédemment, la densité de Cx30 est mesurée dans l'ensemble du VLPO et nous ne visualisons pas les Cx30 effectivement recrutées à la membrane. Ainsi des variations de la quantité de Cx30 présentes à la membrane plasmique et donc fonctionnelles, pourraient exister et médier cette plasticité induite par le BDNF.

Afin de déterminer si la plasticité morphologique des astrocytes du VLPO pourrait être due à des fluctuations locales des taux de BDNF, j'ai quantifié les taux d'ARNm du BDNF dans le VLPO en FISH. J'ai pu montrer une accumulation pendant la période lumineuse, période où les souris sont supposées dormir. L'expression des protéines proBDNF et mBDNF augmente, quant à elle, un peu plus tardivement, pendant la phase obscure. Dans le cas du mBDNF, ce dernier commence à s'accumuler dès la fin de la phase lumineuse. Le moment du cycle L/D où l'expression du proBDNF et du mBDNF est maximale présente un retard de phase d'environ 8 h par rapport maximum d'expression l'ARNm BDNF. Les astrocytes pourraient être à l'origine de ce délai en internalisant puis stockant ou dégradant les protéines BDNF. L'accumulation progressive des deux formes de BDNF pendant la période d'éveil supposée des animaux suggère que le BDNF s'accumulerait avec le temps passé éveillé et pourrait constituer une pression de sommeil. Ainsi, les expérimentations en cours au laboratoire nous permettront de déterminer les effets d'une privation de sommeil sur l'accumulation du BDNF dans le VLPO. De plus, l'augmentation du mBDNF à la fin de la période lumineuse coïncide avec l'augmentation de volume et de complexité des astrocytes du VLPO. Cependant, le fait que l'accumulation de BDNF continue pendant la phase obscure alors que la taille et la complexité des astrocytes diminuent pourrait s'expliquer par les astrocytes qui internaliseraient le BDNF à ce moment du cycle, le rendant moins disponible pour activer les voies de signalisation du BDNF. En effet, il a été montré que les astrocytes, via le récepteur TrkB, sont impliqués dans la régulation du taux de BDNF extracellulaire (Alderson et al., 2000 ; Fenner, 2012) et nous nous intéresserons à cette hypothèse plus loin dans cette discussion. Ce phénomène pourrait aussi s'expliquer par une désensibilisation des récepteurs TrkB suite à leur suractivation par le BDNF (Sommerfeld et al., 2000).

La forme mature du BDNF ayant une forte affinité pour le récepteur tyrosine kinase TrkB et ce dernier étant exprimé abondamment par les astrocytes du VLPO, nous avons quantifié les variations d'expression de cette forme phosphorylée et donc activée du récepteur TrkB. Nous avons montré que l'ARNm *NTRK2*, le gène codant TrkB, est exprimé par les neurones promoteurs du sommeil et par les astrocytes du VLPO. Ces derniers l'expriment plus ; ce qui suggère que le récepteur TrkB est exprimé, au sein du VLPO, par ces deux types cellulaires. La détection de pTrkB augmente à partir de la fin de la période lumineuse et se poursuit jusqu'au début de la phase obscure. La périodicité de cette variation de pTrkB présente une avance de

phase de 4 h par rapport au pic d'expression du mBDNF dans le VLPO. Le fait que les taux de mBDNF et de pTrkB soient élevés en fin de phase lumineuse et en début de phase obscure suggère qu'ils consolideraient le sommeil en fin de période de repos, lorsque la pression de sommeil (exercée notamment par l'adénosine) est faible. Il serait intéressant d'étudier la modulation de la phosphorylation de TrkB au niveau des astrocytes et des neurones promoteurs du sommeil du VLPO au cours du cycle circadien. En effet, le BDNF a aussi des effets directs sur ces neurones via l'activation de TrkB afin d'étudier la contribution respective des récepteurs TrkB neuronaux et astrocytaire, notamment à ZT-8, moment du cycle où nous supposons que les BDNF aurait des effets sur le maintien du sommeil.

Pour terminer avec les variations de BDNF au cours du cycle L/D, nous avons étudié son expression en conditions L/L et D/D. En L/L, le proBDNF s'accumule en fin de phase lumineuse et pendant la phase obscure subjective de manière progressive, sans montrer la transition brutale observée lors du passage de la phase lumineuse à obscure en cycle L/D. Concernant le mBDNF, des variations périodiques sont également observées en L/L avec une accumulation rapide à partir du milieu de la phase obscure subjective. Pour ces deux formes du BDNF, la phase du cycle de variations reste la même que celle observée en L/D. En condition D/D, les variations de proBDNF persistent, mais ne sont plus périodiques et présentent deux maxima, l'un en fin de période lumineuse subjective et l'autre en fin de période d'obscurité subjective. Pour le mBDNF, il s'accumule rapidement en fin de période obscure et présente une périodicité avec une avance de phase de 4 h par rapport au cycle L/D. En condition D/D, le volume des astrocytes atteint une valeur maximale 8 h après le pic de mBDNF. L'augmentation brutale de BDNF dans le VLPO en fin de phase obscure subjective entraînerait peut-être une désensibilisation de la voie de signalisation BDNF/TrkB qui pourrait expliquer ce délai. Finalement, en absence de cycle L/D, les variations de BDNF persistent bien que le schéma de variations semble altéré en comparaison avec celui en L/D. De plus, l'expression du mBDNF conserve une périodicité en L/L et D/D suggérant que son expression est probablement contrôlée par le rythme circadien intrinsèque de l'organisme. Afin de déterminer l'implication de processus homéostatiques dans cette expression périodique du BDNF dans le VLPO, nous effectuons, au laboratoire, des privations/rebond de sommeil. Enfin, il serait maintenant important de corrélérer ces variations observées avec l'hypnogramme des souris pour avoir des informations précises sur l'état de veille ou de sommeil des animaux.

Etant donné que nous supposons que le BDNF régule l'activité du VLPO via la plasticité morphologique des astrocytes, nous nous intéressons de près à l'activité neuronale du VLPO. Nous avons déjà enregistré les effets du BDNF sur des coupes aiguës de VLPO sur l'ensemble du réseau par MEA (*MultiElectrode Array*). Cependant, l'activité spontanée des neurones du VLPO est trop faible, même en élevant la température et la concentration extracellulaire de potassium, pour pouvoir enregistrer une activité de réseau exploitable. Nous caractérisons également, au niveau

cellulaire, les effets du BDNF sur l'activité des neurones galaninergiques promoteurs du sommeil du VLPO, *ex vivo*, en *patch-clamp*.

4 Origine cellulaire du BDNF : synthèse, maturation et stockage

Nous avons mis en évidence des variations d'expression de l'ARNm et de la protéine BDNF au cours du cycle L/D, ce qui laisse supposer que la traduction du BDNF, localement dans le VLPO, pourrait être à l'origine des variations de protéine observées. J'ai tout d'abord montré que l'ARNm du BDNF est majoritairement exprimé par les neurones (galaninergiques [GAL^+], excitateurs [$vGLUT^+$] et inhibiteurs [$vGAT^+$]). Les astrocytes ($S100^+$) et la microglie ($iba1^+$) n'expriment quasiment pas l'ARNm du BDNF (moins de 5 % des cellules). Au sein des trois types cellulaires GAL^+ , $vGLUT^+$ et $vGAT^+$, l'expression de l'ARNm BDNF varie au cours du cycle L/D, notamment dans les neurones GAL^+ et $vGLUT^+$ où les variations sont périodiques. Dans l'ensemble le schéma de variations mime celui observé dans le VLPO bien que les neurones $vGLUT^+$ semblent exprimer une quantité d'ARNm BDNF supérieure à celle des neurones GAL^+ . De plus, bien qu'historiquement les neurones galaninergiques soient décrits comme GABAergiques (Sherin et al., 1998), nous avons mis en évidence l'existence de neurones exprimant à la fois les ARNm de la galanine et du transporteur vésiculaire au glutamate, suggérant que ces neurones du VLPO sont galaninergique et glutamatergiques. Cependant, ils représentent moins de 20 % des neurones GAL^+ contre 60 % pour les $vGAT^+$. D'après les résultats précédents, nous supposons également l'existence de neurones galaninergiques à la fois GABAergiques et glutamatergiques. Ainsi, dans le VLPO, les variations globales de BDNF observées au cours du cycle L/D seraient principalement médiées par les neurones glutamatergiques, puis par les neurones galaninergiques et enfin, il semblerait également que les neurones GABAergiques y contribuent.

La sécrétion du BDNF au sein du SNC peut être constitutive ou active (Mowla et al., 2001) et, de manière générale, les neurones le sécrètent à la suite d'une excitation (Yang et al., 2009 ; Dieni et al., 2012). Or, au sein du VLPO les neurones galaninergiques expriment l'ARNm du BDNF et sont donc aptes à traduire la protéine. Nous nous sommes donc intéressés à l'expression du pro- et du mBDNF dans les neurones galaninergiques au cours du cycle L/D. Au sein des neurones galaninergiques, le proBDNF s'accumule de façon périodique pendant la période d'obscurité (période d'activité supposée) avec un retard de phase inférieur à 4 h. Ce qui suggère que cette augmentation de proBDNF pourrait être le reflet de la traduction des ARNm BDNF qui s'accumulent légèrement avant. Les variations de mBDNF dans les neurones galaninergiques sont également périodiques suggérant que le proBDNF pourrait être maturé en mBDNF au sein des neurones galaninergiques du VLPO. De plus, les variations au sein de ces cellules miment les variations observées dans l'ensemble du VLPO au cours du cycle L/D. Nous avons également observé des variations d'expression du mBDNF dans les microglies. Ces dernières ne semblent

cependant pas produire de BDNF car, comme nous l'avons vu, moins de 5 % des cellules exprimant l'ARNm du BDNF sont des microglies. Cependant, plusieurs études montrent que les microglies peuvent internaliser et sécréter du BDNF (Kettenmann et al., 2011). Elles pourraient donc être impliquées, avec les astrocytes, dans ce processus de capture du BDNF extracellulaire et pourraient le sécréter dans le VLPO. Donc les variations de BDNF du VLPO pourraient être en grande partie soutenues par les neurones galaninergiques et glutamatergiques. Nous prévoyons d'étudier l'existence de neurones galaninergiques à la fois glutamatergiques et GABAergiques dans le VLPO. Enfin, comme les neurones galaninergiques du VLPO présentent plusieurs sous populations, nous envisageons d'étudier les variations d'expression de l'ARNm *BDNF* au sein de ces différents neurones galaninergiques.

Au sein du VLPO, les astrocytes ne semblent pas produire de BDNF car moins d'une cellule sur 20 exprime l'ARNm du BDNF. Cependant, les astrocytes peuvent réguler la concentration extracellulaire de BDNF en l'internalisant via le récepteur TrkB (Alderson et al., 2000 ; Fenner, 2012). De plus, il a été montré que les astrocytes corticaux internalisent le proBDNF via le récepteur p75NTR, ce dernier peut ensuite être maturé en mBDNF au sein des astrocytes, formant un *pool* de mBDNF pouvant être ensuite sécrété. Nous avons constaté que les taux de proBDNF et de mBDNF dans les astrocytes du VLPO fluctuent de manière périodique au cours du cycle L/D. Le proBDNF s'accumule en fin de phase lumineuse jusqu'au milieu de la phase d'obscurité tandis que le mBDNF s'accumule dès le milieu de la phase lumineuse jusqu'au milieu de la phase obscure. La périodicité de ces variations présente une avance de phase de 4 h par rapport à celles observées dans l'ensemble du VLPO et dans les neurones galaninergiques, suggérant que les astrocytes pourraient internaliser le BDNF dès le milieu de la phase lumineuse, et donc de la période de repos supposée, ce qui aurait pour conséquence de retarder l'accumulation de BDNF dans le VLPO d'au moins 4 h. Il est possible que ce tamponnage hypothétique du BDNF par les astrocytes, d'une part, limite l'accumulation trop rapide de BDNF dans le VLPO en phase lumineuse, et d'autre part, contribue à éliminer, pendant la phase obscure, le BDNF accumulé dans le VLPO. Nous avons également constaté que les microglies présentent, dans leur soma des fluctuations des taux de mBDNF, suggérant qu'elles pourraient également, comme les astrocytes, prendre part à cette régulation de la concentration de BDNF extracellulaire dans le VLPO au cours du cycle L/D.

Ainsi, d'après nos résultats, au sein du VLPO, le BDNF serait principalement synthétisé par les neurones glutamatergiques et les neurones galaninergiques. De plus, certains neurones galaninergiques du VLPO seraient également glutamatergiques et pourraient contribuer à ce processus de biosynthèse. En plus de synthétiser le proBDNF, les neurones galaninergiques le matureraient en mBDNF et seraient donc aptes à sécréter les deux formes de BDNF. Enfin, les astrocytes du VLPO seraient impliqués dans le schéma périodique d'expression du BDNF en internalisant le BDNF à différents moments du cycle L/D, ce qui pourrait permettre de réguler la concentration de BDNF dans l'espace extracellulaire et, en fin de période d'activité, de

l'éliminer. La question des processus impliqués dans ces variations d'expression de l'ARNm du BDNF se pose et nécessiterait d'étudier les variations de son expression en conditions L/L, D/D et suite à des privations/rebonds de sommeil.

5 Effets in vivo du BDNF et de la Cx30 sur le sommeil

Plusieurs études suggèrent que le BDNF serait impliqué dans la régulation du sommeil. Par exemple, l'injection intracortical de BDNF induit une augmentation de la durée du sommeil et potentialise les oscillations lentes associées au SL (Kushikata et al., 1999 ; Faraguna et al., 2008). Dans cette partie, nous avons étudié les effets de l'injection de BDNF dans le VLPO (à ZT-0 et ZT-12) sur la quantité de sommeil des souris. L'injection de BDNF à ZT-0, pendant la période de repos des souris, augmente la quantité de sommeil pendant la période d'activité des animaux consécutive à l'injection. Lorsque le BDNF est injecté à ZT-12, c'est-à-dire au début de la période d'activité et au moment où les taux de BDNF sont maximaux dans le VLPO, une augmentation de la durée du sommeil est observée en fin de la période de repos suivant l'injection. Il semble également qu'il y ait une tendance à l'augmentation de la durée de sommeil lors de l'injection au début de la période d'activité (ZT-12). La variabilité observée à ce moment du cycle pourrait être due à au stress induit par l'injection. Cet effet retardé du BDNF sur le sommeil nous laisse penser que ce dernier aurait un rôle dans la consolidation du sommeil à la fin de la période de repos et soutiendrait les épisodes de sommeil pendant la période d'éveil. En effet, comme nous avons vu, il serait synthétisé par les neurones promoteurs du sommeil, puis mûré et sécrété par les astrocytes du VLPO. Ces cellules gliales pourraient ensuite réguler localement l'activité neuronale en libérant du BDNF au niveau des synapses via leurs prolongements astrocytaires pérисynaptiques (PAP), conduisant ainsi à la consolidation du sommeil observée à ZT-8 et ZT-12. En effet, dans leur étude, Martinowich et ses collaborateurs ont montré que les souris déficientes pour le BDNF présentaient un retard à l'endormissement pendant la période de repos, mais également une durée de sommeil réduite pendant la période d'éveil (Martinowich et al., 2011). Enfin, l'injection de BDNF induisant une forte augmentation locale de la concentration en BDNF, les astrocytes du VLPO pourraient internaliser ce BDNF, le stocker et le relarguer en fin de période de repos, expliquant ainsi l'effet retardé de l'injection. L'ensemble de ces enregistrements de sommeil a été effectué à l'aide d'un dispositif piézoélectrique permettant de discriminer l'état d'éveil (mobile ou immobile) et de sommeil. Il serait intéressant de compléter ces résultats par des enregistrements polysomnographiques suite à l'injection de BDNF à ZT-0, afin de déterminer les effets respectifs du BDNF sur le sommeil NREM et REM, ainsi que sur la puissance des ondes delta. Cet effet du BDNF dans la consolidation du sommeil pourrait également intervenir chez l'homme. En effet, plusieurs études ont montré que les taux plasmatiques de BDNF sont plus faibles chez les patients insomniaques (Furihata et al., 2020 ; Sánchez-García et al., 2023). De plus, la modulation des taux de BDNF chez des variants génétiques ou par modifications

épigénétiques a également été associée à des nuits fragmentées par de longs éveils chez les personnes âgées (Ancelin et al., 2023).

L'effet du BDNF sur le sommeil est maximum au moment où la morphologie des astrocytes est la plus grande et complexe. C'est-à-dire à la fin de la période de repos et au début de la période d'activité. D'après notre hypothèse, cette plasticité induite par le BDNF serait à l'origine d'une consolidation de l'activité du VLPO et donc impliquée dans la régulation du sommeil. Or, lorsque nous avons décrit cette plasticité, nous avons constaté qu'elle dépendait de l'expression de la Cx30 par les astrocytes, ce qui nous a amené à supposer que la déficience en Cx30 pourrait avoir un impact sur le sommeil des souris. Nous avons donc enregistré la durée du sommeil de souris KO Cx30 dans la POA ($Nkx2.1^{cre/+}-Cx30^{fl/fl}$) et de souris *littermate* $Nkx2.1^{+/+}-Cx30^{fl/fl}$ contrôles. Sur 24 h, ces souris présentent une diminution de la durée du sommeil en fin de période de repos et au début de la période d'activité. Il semble que ce soient la durée et la fréquence des événements d'éveil qui sont augmentées, suggérant que ces souris pourraient présenter, à ce moment du cycle (ZT-8 et ZT-12), une diminution de l'inhibition des centres de l'éveil par les structures promotrices du sommeil qui pourrait être due à une diminution de l'activité des neurones promoteurs du sommeil du VLPO. Ces résultats renforcent l'hypothèse de la participation de la Cx30 à la régulation du sommeil via la modulation de la plasticité morphologique des astrocytes du VLPO. L'ensemble de ce processus permettrait une consolidation du sommeil en fin de période de repos, au moment où la pression de sommeil est au plus bas.

CONCLUSION

Finally, my thesis work suggests that the morphological plasticity of astrocytes induced by BDNF might regulate the neuronal activity of the VLPO. Thus, at ZT-0, at the beginning of the rest period, the galaninergic neurons promoting sleep become active and produce BDNF mRNA which accumulates during the rest period (**Figure 34**). After translation, proBDNF is partially cleaved into mBDNF, and both forms are secreted. From the middle of the rest period, VLPO astrocytes internalize pro- and mBDNF. Then, at the end of the light phase, BDNF release by PAPs massively activates TrkB receptors and might directly activate sleep-promoting neurons and also act as a trophic factor by retrocontrol positive and increase the size and complexity of astrocytes, via Cx30. Closer to synapses, PAPs could (i) decrease the inhibition of sleep-promoting neurons by local interneurons and/or inhibitory afferents of the wake centers, by increasing GABA reuptake, and/or (ii) potentiate excitatory afferents, by releasing BDNF or by reducing glutamate spill-over. Thus, astrocyte plasticity would induce sleep episodes at the end of the rest period and during the active period, when sleep pressure is low.

Even though some links still need to be consolidated, my work has allowed us to characterize a new regulatory pathway of VLPO activity by BDNF and Cx30, involving astrocyte morphological plasticity and modulation of neuroglial interactions. This new regulatory pathway of sleep might represent a new therapeutic target for the treatment of sleep-related pathologies, such as insomnia, which affect about one-third of the Western population and for which there is currently no effective long-term treatment.

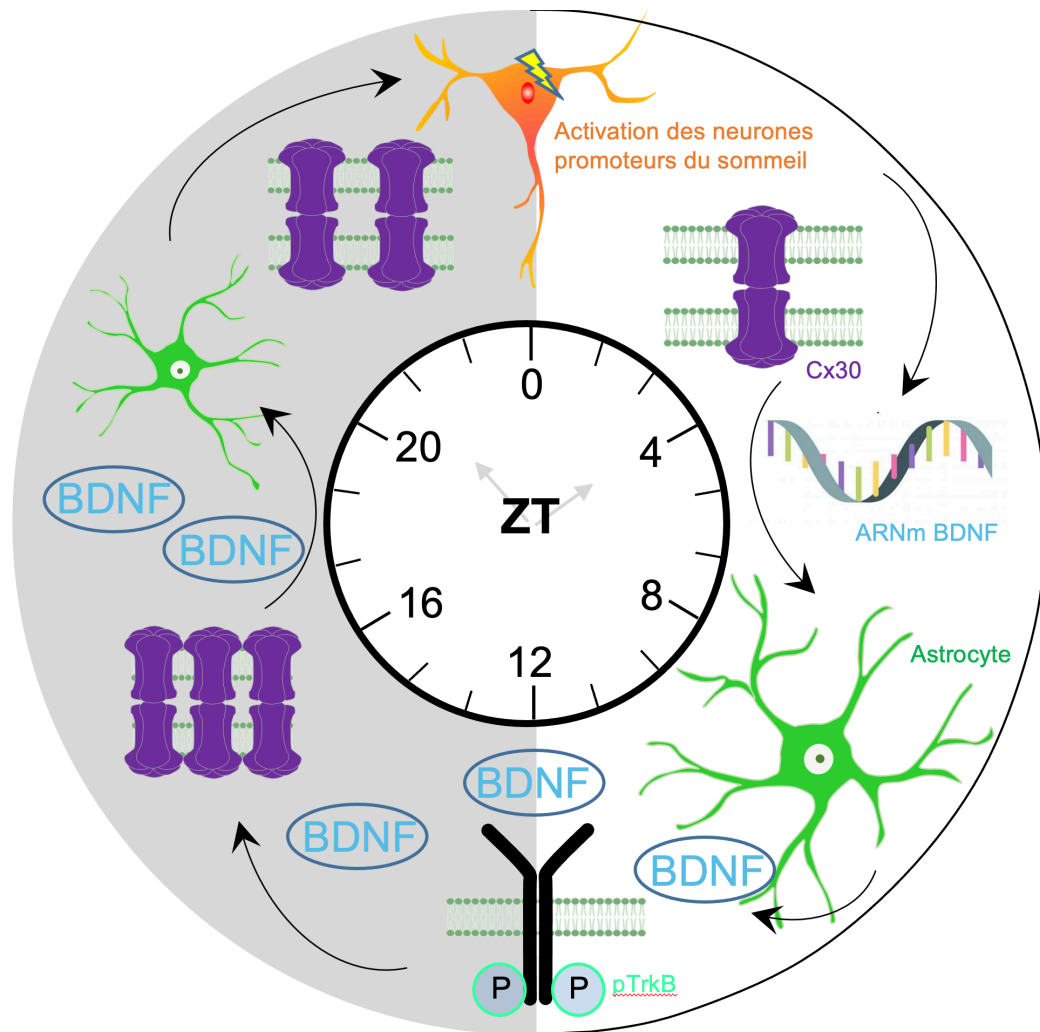
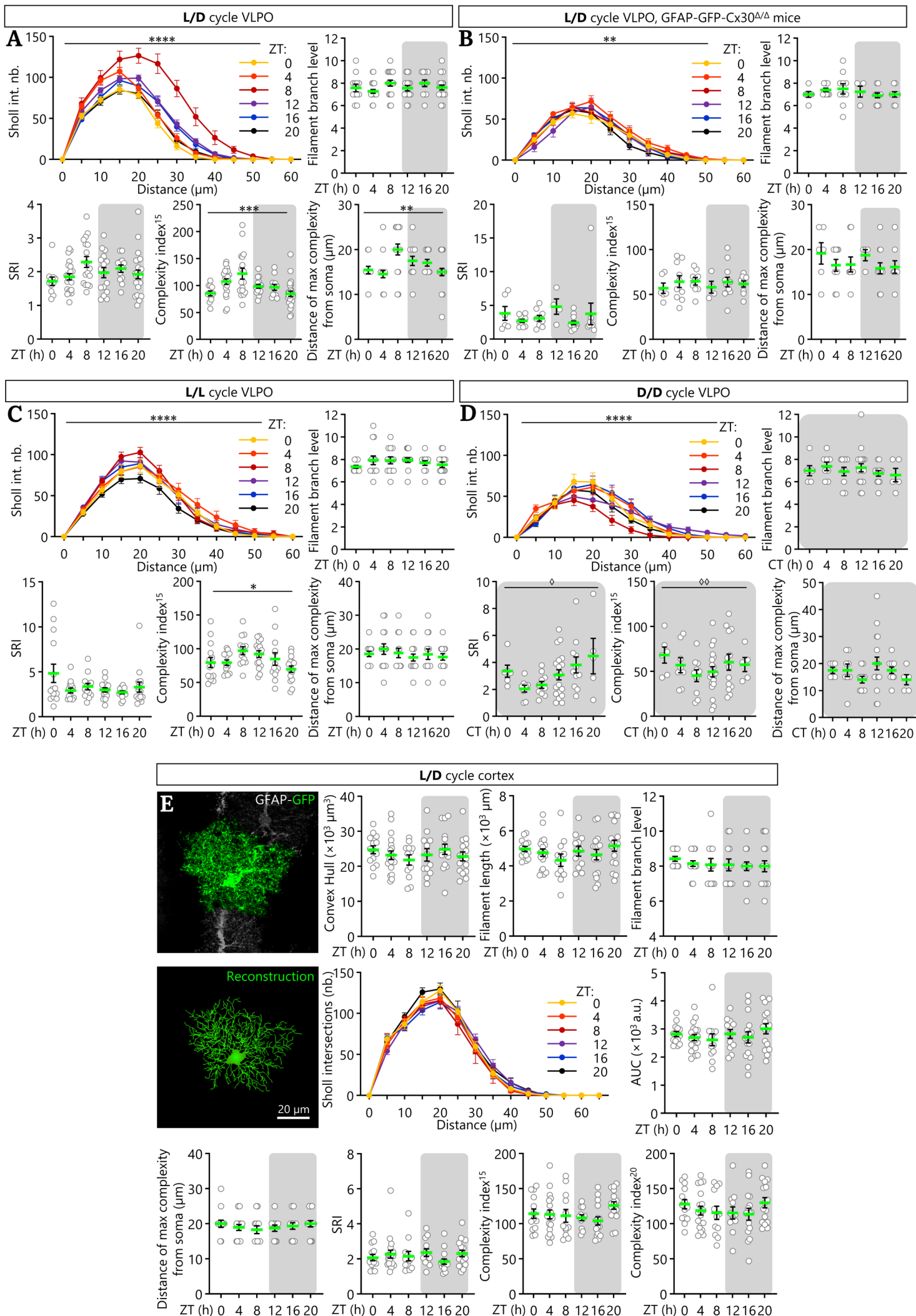


Figure 35 : Schéma récapitulatif du processus de régulation du sommeil médié par le BDNF, la Cx30 et la plasticité morphologique des astrocytes au sein du VLPO. L'activation des neurones promoteurs du sommeil du VLPO à ZT-0, en début de période de repos, induirait l'expression de l'ARNm du BDNF. Son accumulation au cours de la période de repos conduit à sa traduction et à l'expression des formes pro- et mBDNF. L'accumulation de mBDNF induirait l'activation massive du récepteur TrkB en fin de période de repos, à ZT-12, induisant une augmentation de la taille et de la complexité des astrocytes du VLPO. L'accumulation de pro- et de mBDNF continue au cours de la période d'activité augmenterait l'expression de la Cx30 dans le VLPO qui induirait à son tour une diminution de la taille et de la complexité des astrocytes, rétablissant le contrôle inhibiteur exercé par les interneurons locaux et les afférences des centres de l'éveil sur les neurones promoteurs du sommeil du VLPO.

FIGURES SUPPLÉMENTAIRES

Figure supp. 1 : Variations morphologiques des astrocytes du VLPO et du cortex moteur au cours du cycle veille/sommeil. **A.** Paramètres morphologiques mesurés sur les reconstructions Imaris d'astrocytes du VLPO de souris GFAP-GFP en condition L/D. Sur la première ligne, de gauche à droite, les résultats de l'analyse de Sholl sont présentés sous la forme d'une courbe, moyenne sur l'ensemble des astrocytes d'un même ZT, du nombre d'intersections en fonction de la distance au soma. Le *filament branch level* correspond au plus grand nombre d'embranchement de l'astrocyte à partir du prolongement primaire. Sur la seconde ligne, sont présentés le SRI (*Schoenen Ramification Index*), l'index de complexité à 15 μm (*complexity index*¹⁵) et la distance par rapport au soma du maximum d'intersections de l'astrocyte sur l'analyse de Sholl. **B-D.** Les blocs B à D présentent les mêmes paramètres que le bloc A pour les souris GFAP-GFP-Cx30 Δ/Δ (**B**) et les souris GFAP-GFP exposées à un cycle de lumière constante (L/L, **C**) ou d'obscurité constante (D/D, **D**). **E.** Image confocale d'un astrocyte du cortex moteur (M1) de souris GFAP-GFP et sa reconstruction Imaris. Les mêmes paramètres de morphologies issus de la reconstruction sont présentés. L'ensemble des résultats est présenté sous la forme moyenne \pm SEM. Pour les nuages de points, chaque point représente la valeur mesurée pour un astrocyte, sur N = 3 animaux par ZT. ANOVA 1 facteur avec test de Holm-Šidák, test de Kruskal-Wallis avec test de Dunn, analyse de Rayleigh-Moore. Les flèches horizontales représentent les valeurs de crête maximales atteintes par chaque sinusoïde modélisant les variations périodiques observées (càd. la phase du signal).



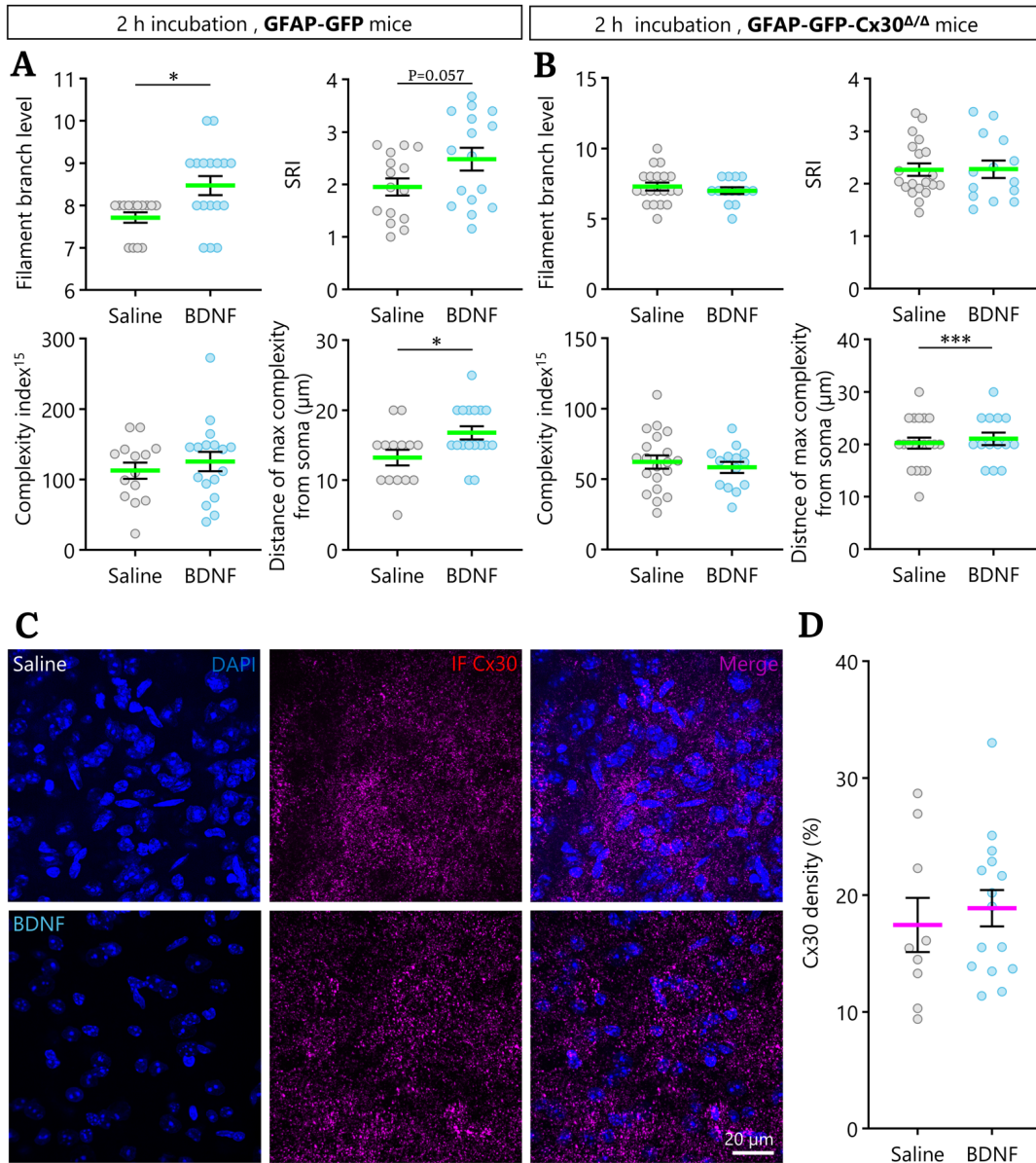


Figure supp. 2 : Effets du BDNF sur la morphologie des astrocytes et les taux de Cx30 du VLPO. A. Descripteurs morphologiques mesurés sur les reconstructions Imaris GFAP-GFP après 2 h d'incubation avec la solution saline contrôle (gris) ou du BDNF (bleu) : *filament branch level*, SRI, *complexity index*¹⁵, *distance of max complexity from soma*. **B.** Descripteurs morphologiques mesurés sur les reconstructions Imaris GFAP-GFP-Cx30 Δ/Δ après 2 h d'incubation avec la solution saline contrôle (gris) ou du BDNF (bleu) : *filament branch level*, SRI, *complexity index*¹⁵, *distance of max complexity from soma*. Les résultats en A et B sont présentés sous la forme moyenne \pm SEM. Pour les nuages de points, chaque point représente la valeur mesurée pour un astrocyte, sur N = 3 animaux par condition. T-test non apparié, test de Mann-Whitney. **C.** Images de microscopie confocale de VLPO de souris GFAP-GFP incubés 2 h avec la solution saline contrôle ou du BDNF où la Cx30 est immunomarquée. **D.** Quantification de la densité de Cx30 à partir des images confocales en C après 2 h d'incubation avec la solution saline (gris) ou du BDNF (bleu). Les résultats en D sont présentés sous la forme moyenne \pm SEM. Pour les nuages de points, chaque point représente la valeur mesurée dans une ROI du VLPO sur N = 3 animaux par condition. T-test non apparié.

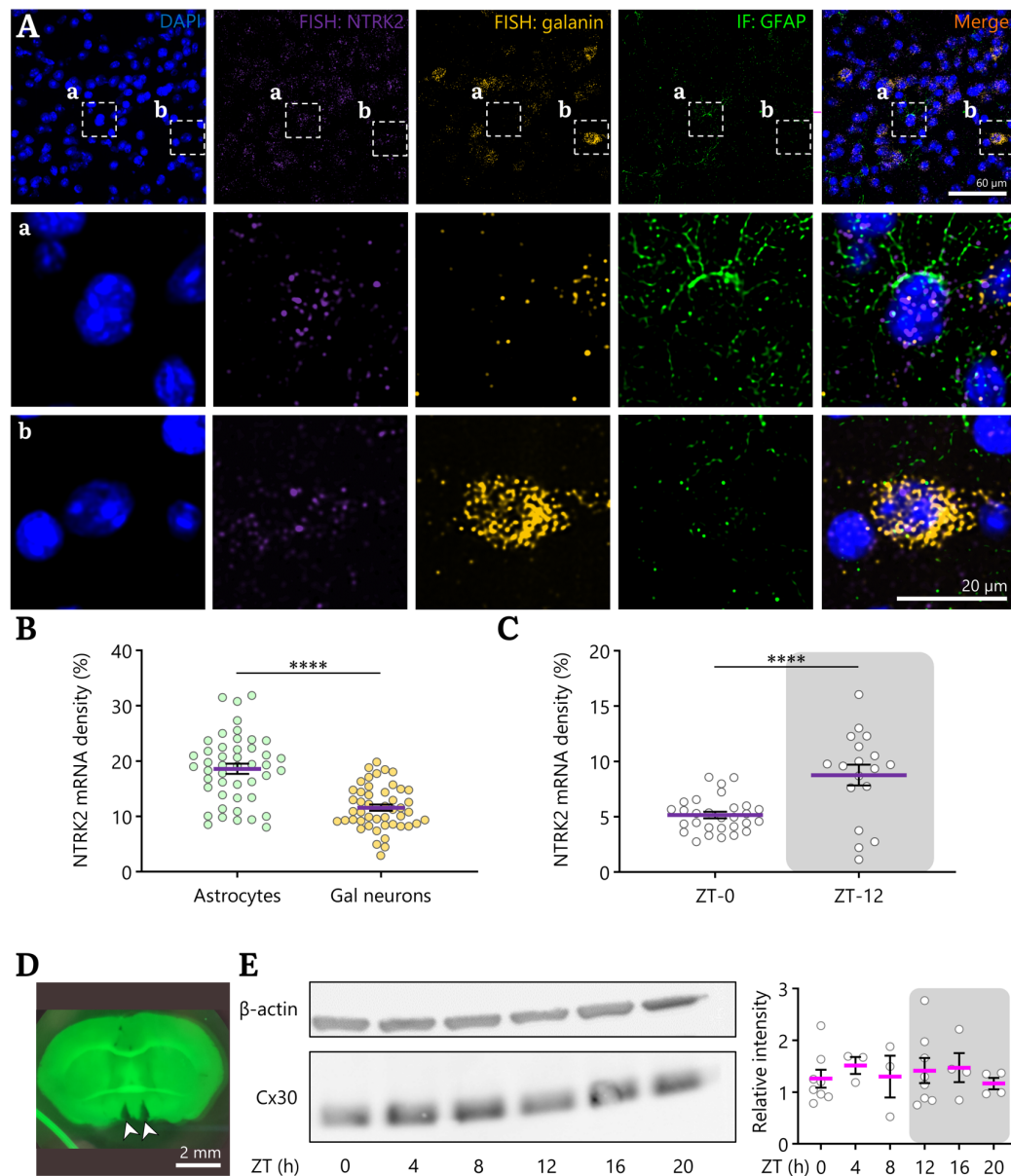


Figure sup. 3 : Expression de l'ARNm NTRK2 et taux de Cx30 dans le VLPO.

A. Images de microscopie confocale de FISH NTRK2 et galanine dans le VLPO, sur des coupes de cerveaux de souris C57BL/6. De gauche à droite : DAPI, FISH NTRK2, FISH galanine, IF GFAP et merge des 4 canaux. Deux régions d'intérêts sont indiquées en a et b. **a.** ROI centrée sur un astrocyte. **b.** ROI centrée sur un neurone promoteur du sommeil (galaninergique). **B.** Quantification de la densité de signal FISH *NTRK2* dans le soma des cellules GFAP⁺ (astrocytes) et galanin⁺ (Gal neurons). **C.** Quantification de la densité du signal FISH *NTRK2* dans des ROI du VLPO à ZT-0 et ZT-12. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne \pm SEM, N = 3 animaux. Chaque point des nuages de points représente la densité NTRK2 mesurée, respectivement, dans une cellule ou dans une ROI du VLPO. T-test non apparié. **D.** Image prise à la loupe binoculaire d'une dissection de VLPO sur des coupes aiguës de cerveaux Gal-GFP, les flèches indiquent l'emplacement des VLPO prélevés. **E.** Photographie d'un gel de western blot anti-Cx30 et β -actine sur les échantillons de VLPO prélevés de ZT-0 à ZT-20. Le graphe en nuage de points quantifie l'intensité relative des bandes obtenues. Chaque point représente l'intensité relative d'un échantillon de VLPO d'un animal (N = 3 à 8 animaux). Test de Kruskal-Wallis.

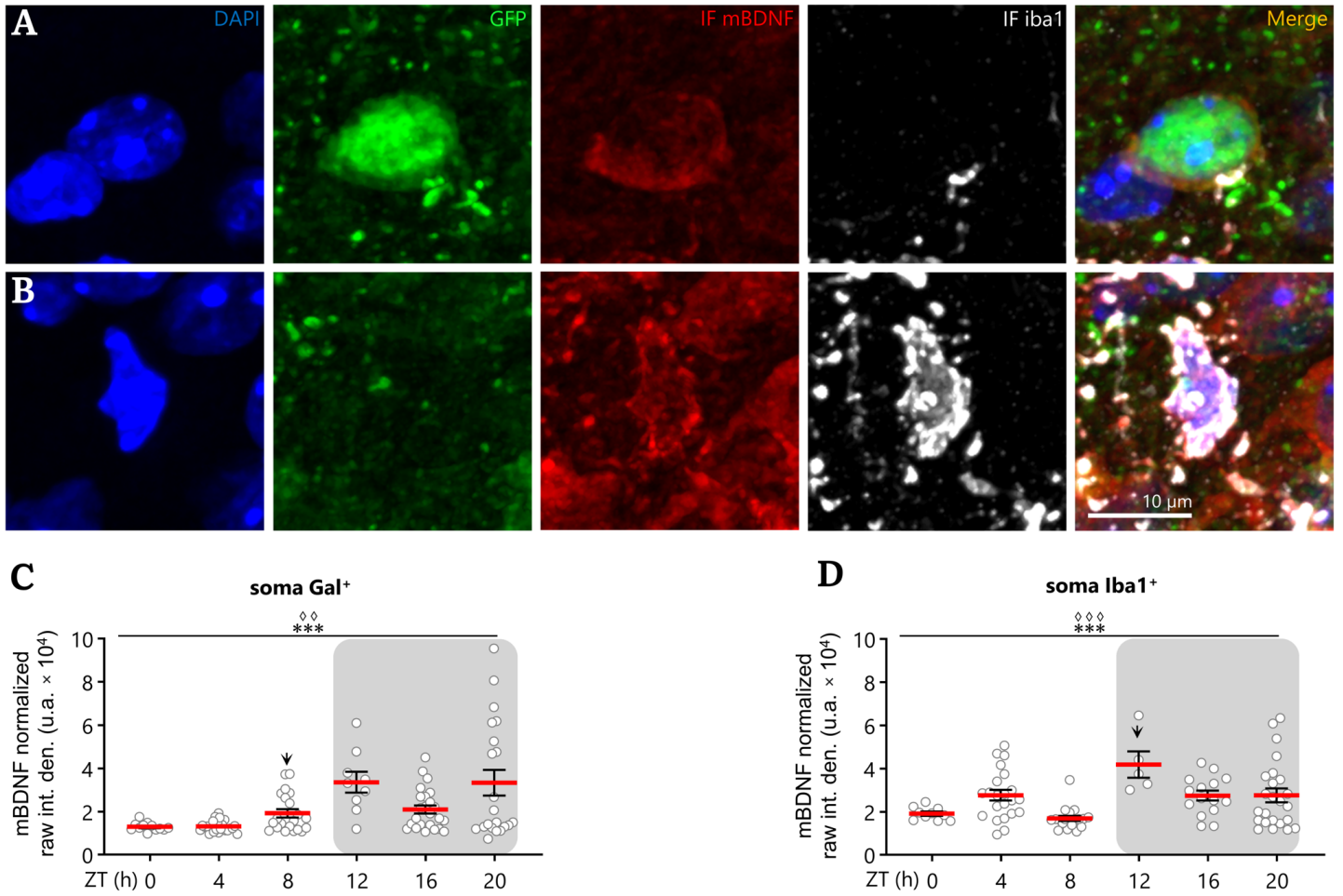


Figure supp. 4 : Expression du mBDNF dans les corps cellulaires des neurones galaninergiques et des microglies. **A, B.** Images de microscopie confocale de VLPO de souris Gal-GFP et immunomarquage mBDNF et iba1 centrée sur le soma d'un neurone galaninergique (A) et le corps cellulaire d'une microglie (B). **C, D.** Quantifications de la *raw integrated density* dans le soma des neurones galaninergiques (C) ou dans le corps cellulaire des microglies (D) rapportée à la surface du soma dans laquelle la mesure a été faite et normalisée par rapport à ZT-0. Chaque point représente la quantification dans un corps cellulaire (tests de Kruskal-Wallis, analyses de Raleigh-Moore). Les résultats sont présentés sous la forme moyenne \pm SEM.

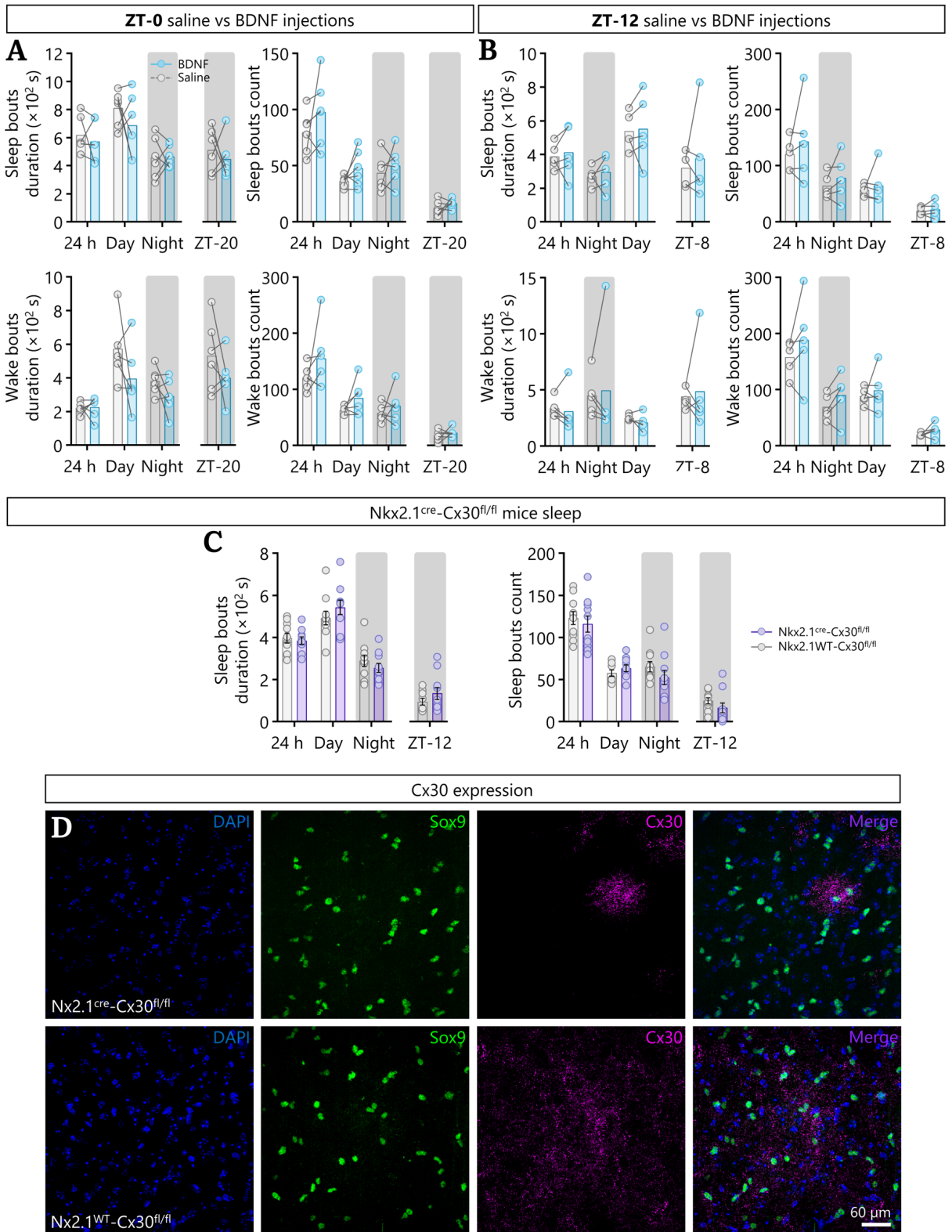


Figure supp. 5 : Effets de l'injection de BDNF et de la délétion de la Cx30 dans la POA sur le sommeil **A.** Durée et nombre moyen d'événement de sommeil (haut) et d'éveil (bas) sur les périodes de 24 h, lumineuse (12 h), obscure (12 h) et à ZT-20 (4 h) après injection à ZT-0 de solution saline ou de BDNF. Chaque point représente un animal (N = 6) ; les lignes grises relient les points en conditions saline et BDNF d'un même animal. **B.** Durée et nombre moyen d'événement de sommeil (haut) et d'éveil (bas) sur les périodes de 24 h, lumineuse (12 h), obscure (12 h) et à ZT-20 (4 h) après injection à ZT-12 de solution saline ou de BDNF. Chaque point représente un animal (N = 5) ; les lignes grises relient les points en conditions saline et BDNF d'un même animal. **C.** Durée et nombre moyen d'événements de sommeil sur les périodes de 24 h, lumineuse (12 h), obscure (12 h) et à ZT-20 (4 h). Chaque point représente un animal (N = 10 Nkx2.1^{+/+}-Cx30^{fl/fl} et N' = 10 Nkx2.1^{cre/+}-Cx30^{fl/fl}). Les résultats sont présentés sous la forme moyenne \pm SEM ; test de Wilcoxon, t-test non apparié et test de Mann-Whitney. **D.** Images de microscopie confocale de VLPO de souris Nkx2.1^{+/+}-Cx30^{fl/fl} et Nkx2.1^{cre/+}-Cx30^{fl/fl} présentant un double immunomarquage Sox9 (astrocytes) et Cx30.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbott N. J., Rönnbäck L., Hansson E. « Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier ». *Nat Rev Neurosci* [En ligne]. 1 janvier 2006. Vol. 7, n°1, p. 41-53. Disponible sur : <https://doi.org/10.1038/nrn1824> >
- Achermann P. « Mathematical models of sleep regulation ». *Front Biosci* [En ligne]. 2003. Vol. 8, n°6, p. s683-693. Disponible sur : <https://doi.org/10.2741/1064>
- Aeschbach D., Cutler A. J., Ronda J. M. « A Role for Non-Rapid-Eye-Movement Sleep Homeostasis in Perceptual Learning ». *J. Neurosci.* [En ligne]. 12 mars 2008. Vol. 28, n°11, p. 2766-2772. Disponible sur : <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5548-07.2008>
- Agulhon C., Fiacco T. A., McCarthy K. D. « Hippocampal short- and long-term plasticity are not modulated by astrocyte Ca²⁺ signaling ». *Science* [En ligne]. mars 2010. Vol. 327, n°5970, p. 1250-1254. Disponible sur : <https://doi.org/10.1126/science.1184821>
- Aid T., Kazantseva A., Piirsoo M., Palm K., Timmusk T. « Mouse and ratBDNF gene structure and expression revisited ». *J. Neurosci. Res.* [En ligne]. 15 février 2007. Vol. 85, n°3, p. 525-535. Disponible sur : <https://doi.org/10.1002/jnr.21139>
- Alam M. A., Kostin A., Siegel J., McGinty D., Szymusiak R., Alam M. N. « Characteristics of sleep-active neurons in the medullary parafacial zone in rats ». *Sleep* [En ligne]. 1 octobre 2018. Vol. 41, n°10, p. zsy130. Disponible sur : <https://doi.org/10.1093/sleep/zsy130>
- Alam M. A., Kumar S., McGinty D., Alam M. N., Szymusiak R. « Neuronal activity in the preoptic hypothalamus during sleep deprivation and recovery sleep ». *Journal of Neurophysiology* [En ligne]. 2014. Vol. 111, n°2, p. 287-299. Disponible sur : <https://doi.org/10.1152/jn.00504.2013>
- Alam M. N., McGinty D., Szymusiak R. « Neuronal discharge of preoptic/anterior hypothalamic thermosensitive neurons: relation to NREM sleep ». *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* [En ligne]. 1 novembre 1995. Vol. 269, n°5, p. R1240-R1249. Disponible sur : <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1995.269.5.R1240>
- Alderson R. F., Curtis R., Alterman A. L., Lindsay R. M., DiStefano P. S. « Truncated TrkB mediates the endocytosis and release of BDNF and neurotrophin-4/5 by rat astrocytes and Schwann cells in vitro ». *Brain Research* [En ligne]. 2000. Vol. 871, n°2, p. 210-222. Disponible sur : [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02428-8](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02428-8)
- Alföldi P., Rubicsek G., Cserni G., Obál F. « Brain and core temperatures and peripheral vasomotion during sleep and wakefulness at various ambient temperatures in the rat ». *Pflügers Arch.* [En ligne]. novembre 1990. Vol. 417, n°3, p. 336-341. Disponible sur : <https://doi.org/10.1007/BF00371001>
- Ali A. A. H., Stahr A., Ingenwerth M., Theis M., Steinhäuser C., Von Gall C. « Connexin30 and Connexin43 show a time-of-day dependent expression in the mouse suprachiasmatic nucleus and modulate rhythmic locomotor activity in the context of chronodisruption ». *Cell Communication and Signaling* [En ligne]. 11 décembre 2019. Vol. 17, n°1, p. 61. Disponible sur : <https://doi.org/10.1186/s12964-019-0370-2>

Almutairi M. M. A., Gong C., Xu Y. G., Chang Y., Shi H. *Factors controlling permeability of the blood-brain barrier* [En ligne]. *Cellular and Molecular Life Sciences*. janvier 2016. Vol. 73, n°1, p. 57-77. Disponible sur : <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2050-8>

Altman N. G., Izci-Balserak B., Schopfer E., Jackson N., Rattanaumpawan P., Gehrman P. R., Patel N. P., Grandner M. A. « Sleep duration versus sleep insufficiency as predictors of cardiometabolic health outcomes ». *Sleep Medicine* [En ligne]. 2012. Vol. 13, n°10, p. 1261-1270. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2012.08.005>

Amiry-Moghaddam M., Ottersen O. P. « The molecular basis of water transport in the brain ». *Nat Rev Neurosci* [En ligne]. décembre 2003. Vol. 4, n°12, p. 991-1001. Disponible sur : <https://doi.org/10.1038/nrn1252>

Anaclet C., Ferrari L., Arrigoni E., Bass C. E., Saper C. B., Lu J., Fuller P. M. « The GABAergic parafacial zone is a medullary slow wave sleep-promoting center ». *Nature Neuroscience* [En ligne]. septembre 2014. Vol. 17, n°9, p. 1217-1224. Disponible sur : <https://doi.org/10.1038/nn.3789>

Anaclet C., Lin J.-S., Vetrivelan R., Krenzer M., Vong L., Fuller P. M., Lu J. « Identification and Characterization of a Sleep-Active Cell Group in the Rostral Medullary Brainstem ». *J. Neurosci.* [En ligne]. 12 décembre 2012. Vol. 32, n°50, p. 17970-17976. Disponible sur : <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0620-12.2012>

Anaclet C., Pedersen N. P., Ferrari L. L., Venner A., Bass C. E., Arrigoni E., Fuller P. M. « Basal forebrain control of wakefulness and cortical rhythms ». *Nat Commun* [En ligne]. 3 novembre 2015. Vol. 6, n°1, p. 8744. Disponible sur : <https://doi.org/10.1038/ncomms9744>

Anastasia A., Deinhardt K., Chao M. V., Will N. E., Irmady K., Lee F. S., Hempstead B. L., Bracken C. « Val66Met polymorphism of BDNF alters prodomain structure to induce neuronal growth cone retraction ». *Nature Communications* [En ligne]. décembre 2013. Vol. 4, n°1. Disponible sur : <https://doi.org/10.1038/ncomms3490> (consulté le 29 décembre 2018)

Ancelin M., Jaussent I., Ritchie K., Besset A., Ryan J., Dauvilliers Y. « Brain-derived neurotrophic factor (*BDNF*) variants and promoter I methylation are associated with prolonged nocturnal awakenings in older adults ». *Journal of Sleep Research* [En ligne]. 3 février 2023. Disponible sur : <https://doi.org/10.1111/jsr.13838> (consulté le 14 mai 2023)

Araque A., Parpura V., Sanzgiri R., Haydon P. « Tripartite synapses : glia, the unacknowledged partner ». *Trends in Neurosciences*. 1999. Vol. 22, n°5, p. 208-215.

Arrigoni E., Fuller P. M. « The Sleep-Promoting Ventrolateral Preoptic Nucleus: What Have We Learned over the Past 25 Years? ». *International Journal of Molecular Sciences* [En ligne]. 2022. Vol. 23, n°6. Disponible sur : <https://doi.org/10.3390/ijms23062905>

Arrigoni E., Lu J., Vetrivelan R., Saper C. B. « Long-term synaptic plasticity is impaired in rats with lesions of the ventrolateral preoptic nucleus ». *European Journal of Neuroscience* [En ligne]. décembre 2009. Vol. 30, n°11, p. 2112-2120. Disponible sur : <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.07001.x>

Azevedo F. A. C., Carvalho L. R. B., Grinberg L. T., Farfel J. M., Ferretti R. E. L., Leite R. E. P., Filho W. J., Lent R., Herculano-Houzel S. « Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain ». *Journal*

of *Comparative Neurology* [En ligne]. avril 2009. Vol. 513, n°5, p. 532-541. Disponible sur : <https://doi.org/10.1002/cne.21974>

Bachmann V., Klein C., Bodenmann S., Schäfer N., Berger W., Brugger P., Landolt H.-P. « The BDNF Val66Met Polymorphism Modulates Sleep Intensity: EEG Frequency- and State-Specificity ». *Sleep* [En ligne]. 2012. Disponible sur : <https://doi.org/10.5665/sleep.1690>

Backus K. H., Kettenmann H., Schachner M. « Pharmacological characterization of the glutamate receptor in cultured astrocytes ». *J. Neurosci. Res.* [En ligne]. mars 1989. Vol. 22, n°3, p. 274-282. Disponible sur : <https://doi.org/10.1002/jnr.490220307>

Bak L. K., Schousboe A., Waagepetersen H. S. « The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer ». *J Neurochem* [En ligne]. août 2006. Vol. 98, n°3, p. 641-653. Disponible sur : <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03913.x>

Barde Y.-A., Edgar D., Thoenen H. « Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain ». 1982. p. 5.

Bass N. H. « Quantitative cytoarchitectonic distribution of neurons, glia, and DNA in rat cerebral cortex ». *The Journal of comparative neurology* [En ligne]. 1971. Vol. 143, n°4, p. 481-90. Disponible sur : <https://doi.org/10.1002/cne.901430405>

Batini C., Moruzzi G., Palestini M., Rossi G. F., Zanchetti A. « Institute of Psychiatric Research, Indianapolis, Indiana ». *Science* [En ligne]. 1958. Vol. 128, p. 30-32. Disponible sur : <https://doi.org/10.1126/science.128.3314.30-a>

Beattie E. C., Stellwagen D., Morishita W., Bresnahan J. C., Ha B. K., Zastrow M. V., Beattie M. S., Malenka R. C. « Control of Synaptic Strength by Glial TNF α ». 2002. Vol. 295,.

Becker D., Zahn N., Deller T., Vlachos A. « Tumor necrosis factor alpha maintains denervation-induced homeostatic synaptic plasticity of mouse dentate granule cells ». *Front. Cell. Neurosci.* [En ligne]. 2013. Vol. 7,. Disponible sur : <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00257> (consulté le 16 mars 2023)

Begliuomini S., Lenzi E., Ninni F., Casarosa E., Merlini S., Pluchino N., Valentino V., Luisi S., Luisi M., Genazzani A. R. « Plasma brain-derived neurotrophic factor daily variations in men: correlation with cortisol circadian rhythm ». *Journal of Endocrinology* [En ligne]. 1 mai 2008. Vol. 197, n°2, p. 429-435. Disponible sur : <https://doi.org/10.1677/JOE-07-0376>

Bélangier M., Allaman I., Magistretti P. J. « Differential effects of pro- and anti-inflammatory cytokines alone or in combinations on the metabolic profile of astrocytes: Cytokines alter the metabolic profile of astrocytes ». *Journal of Neurochemistry* [En ligne]. février 2011. Vol. 116, n°4, p. 564-576. Disponible sur : <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.07135.x>

Bellesi M., De Vivo L., Tononi G., Cirelli C. « Effects of sleep and wake on astrocytes: clues from molecular and ultrastructural studies ». *BMC Biology* [En ligne]. 25 décembre 2015. Vol. 13, n°1, p. 66. Disponible sur : <https://doi.org/10.1186/s12915-015-0176-7>

Bellot-Saez A., Kékesi O., Morley J. W., Buskila Y. *Astrocytic modulation of neuronal excitability through K⁺ spatial buffering* [En ligne]. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. juin 2017. Vol. 77, p. 87-97. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.03.002>

- Benedetto L., Chase M. H., Torterolo P. « GABAergic processes within the median preoptic nucleus promote NREM sleep ». *Behavioural Brain Research* [En ligne]. juin 2012. Vol. 232, n°1, p. 60-65. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.03.033>
- Benington J. H., Heller H. C. « Restoration of brain energy metabolism as the function of sleep ». *Progress in Neurobiology* [En ligne]. 1995. Vol. 45, p. 347-360. Disponible sur : [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(94\)00057-0](https://doi.org/10.1016/0301-0082(94)00057-0)
- Bergami M., Santi S., Formaggio E., Cagnoli C., Verderio C., Blum R., Berninger B., Matteoli M., Canossa M. « Uptake and recycling of pro-BDNF for transmitter-induced secretion by cortical astrocytes ». *Journal of Cell Biology* [En ligne]. 20 octobre 2008. Vol. 183, n°2, p. 213-221. Disponible sur : <https://doi.org/10.1083/jcb.200806137>
- Berson D. M., Castrucci A. M., Provencio I. « Morphology and mosaics of melanopsin-expressing retinal ganglion cell types in mice ». *J. Comp. Neurol.* [En ligne]. 2010. p. NA-NA. Disponible sur : <https://doi.org/10.1002/cne.22381>
- Besedovsky L., Lange T., Born J. « Sleep and immune function ». *Pflugers Arch - Eur J Physiol* [En ligne]. janvier 2012. Vol. 463, n°1, p. 121-137. Disponible sur : <https://doi.org/10.1007/s00424-011-1044-0>
- Bezzi P., Gundersen V., Galbete J. L., Seifert G., Steinhäuser C., Pilati E., Volterra A. « Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate ». *Nat Neurosci* [En ligne]. juin 2004. Vol. 7, n°6, p. 613-620. Disponible sur : <https://doi.org/10.1038/nm1246>
- Bezzi P., Volterra A. « A neuron–glia signalling network in the active brain ». *Current Opinion in Neurobiology* [En ligne]. juin 2001. Vol. 11, n°3, p. 387-394. Disponible sur : [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(00\)00223-3](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(00)00223-3)
- Binmöller F. -J, Müller C. M. « Postnatal development of dye-coupling among astrocytes in rat visual cortex ». *Glia* [En ligne]. 1992. Vol. 6, n°2, p. 127-137. Disponible sur : <https://doi.org/10.1002/glia.440060207>
- Bjorness T. E., Dale N., Mettlach G., Sonneborn A., Sahin B., Fienberg A. A., Yanagisawa M., Bibb J. A., Greene R. W. « An Adenosine-Mediated Glial-Neuronal Circuit for Homeostatic Sleep ». *J. Neurosci.* [En ligne]. 30 mars 2016. Vol. 36, n°13, p. 3709-3721. Disponible sur : <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3906-15.2016>
- Bojarskaite L., Bjørnstad D. M., Pettersen K. H., Cunen C., Hermansen G. H., Åbjørsbråten K. S., Chambers A. R., Sprengel R., Vervaeke K., Tang W., Enger R., Nagelhus E. A. « Astrocytic Ca²⁺ signaling is reduced during sleep and is involved in the regulation of slow wave sleep ». *Nat Commun* [En ligne]. 6 juillet 2020. Vol. 11, n°1, p. 3240. Disponible sur : <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17062-2>
- Borbély A. A. « A two process model of sleep regulation ». *Human Neurobiology*. 1982. Vol. 1, n°3, p. 195-204.
- Boulay A.-C., Del Castillo F. J., Giraudet F., Hamard G., Giaume C., Petit C., Avan P., Cohen-Salmon M. « Hearing Is Normal without Connexin30 ». *Journal of Neuroscience* [En ligne]. 2013. Vol. 33, n°2, p. 430-434. Disponible sur : <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4240-12.2013>

Bouzier-Sore A. K., Voisin P., Bouchaud V., Bezancon E., Franconi J. M., Pellerin L. « Competition between glucose and lactate as oxidative energy substrates in both neurons and astrocytes: A comparative NMR study ». *European Journal of Neuroscience* [En ligne]. septembre 2006. Vol. 24, n°6, p. 1687-1694. Disponible sur : <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05056.x>

Brancaccio M., Edwards M. D., Patton A. P., Smyllie N. J., Chesham J. E., Maywood E. S., Hastings M. H. « Cell-autonomous clock of astrocytes drives circadian behavior in mammals ». *Science* [En ligne]. 11 janvier 2019. Vol. 363, n°6423, p. 187-192. Disponible sur : <https://doi.org/10.1126/science.aat4104>

Brigadski T., Leßmann V. « The physiology of regulated BDNF release ». *Cell Tissue Res* [En ligne]. octobre 2020. Vol. 382, n°1, p. 15-45. Disponible sur : <https://doi.org/10.1007/s00441-020-03253-2>

Brown A. M. « Brain glycogen re-awakened ». *J Neurochem* [En ligne]. mai 2004. Vol. 89, n°3, p. 537-552. Disponible sur : <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02421.x>

Brown R. E., Basheer R., McKenna J. T., Strecker R. E., McCarley R. W. « Control of Sleep and Wakefulness ». *Physiological Reviews* [En ligne]. juillet 2012. Vol. 92, n°3, p. 1087-1187. Disponible sur : <https://doi.org/10.1152/physrev.00032.2011>

Brunoni A. R., Lopes M., Fregni F. « A systematic review and meta-analysis of clinical studies on major depression and BDNF levels: implications for the role of neuroplasticity in depression ». *International Journal of Neuropsychopharmacology* [En ligne]. décembre 2008. Vol. 11, n°8, p. 1169-1180. Disponible sur : <https://doi.org/10.1017/S1461145708009309>

Brzecka A., Leszek J., Ashraf G. M., Ejma M., Ávila-Rodriguez M. F., Yarla N. S., Tarasov V. V., Chubarev V. N., Samsonova A. N., Barreto G. E., Aliev G. « Sleep disorders associated with Alzheimer's disease: A perspective ». *Frontiers in Neuroscience* [En ligne]. 2018. Vol. 12, n°MAY, p. 1-10. Disponible sur : <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00330>

Burdakov D., Jensen L. T., Alexopoulos H., Williams R. H., Fearon I. M., O'Kelly I., Gerasimenko O., Fugger L., Verkhratsky A. « Tandem-Pore K⁺ Channels Mediate Inhibition of Orexin Neurons by Glucose ». *Neuron* [En ligne]. juin 2006. Vol. 50, n°5, p. 711-722. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.04.032>

Bushong E. A., Martone M. E., Jones Y. Z., Ellisman M. H. « Protoplasmic Astrocytes in CA1 Stratum Radiatum Occupy Separate Anatomical Domains ». *The Journal of Neuroscience* [En ligne]. 1 janvier 2002. Vol. 22, n°1, p. 183-192. Disponible sur : <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-01-00183.2002>

Buzsáki G. *Rhythms of the Brain* [En ligne]. Oxford University Press.[s.l.] : Oxford University Press, 2006. Disponible sur : <https://academic.oup.com/book/11166ISBN : 978-0-19-530106-9>.

Capuani C., Melone M., Tottene A., Bragina L., Crivellaro G., Santello M., Casari G., Conti F., Pietrobon D. « Defective glutamate and K⁺ clearance by cortical astrocytes in familial hemiplegic migraine type 2 ». *EMBO Mol Med* [En ligne]. août 2016. Vol. 8, n°8, p. 967-986. Disponible sur : <https://doi.org/10.15252/emmm.201505944>

- Ceprian M., Fulton D. « Glial Cell AMPA Receptors in Nervous System Health, Injury and Disease ». *IJMS* [En ligne]. 17 mai 2019. Vol. 20, n°10, p. 2450. Disponible sur : <https://doi.org/10.3390/ijms20102450>
- Chamberlin N. L., Arrigoni E., Chou T. C., Scammell T. E., Greene R. W., Saper C. B. « Effects of adenosine on gabaergic synaptic inputs to identified ventrolateral preoptic neurons ». *Neuroscience* [En ligne]. juillet 2003. Vol. 119, n°4, p. 913-918. Disponible sur : [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(03\)00246-X](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(03)00246-X)
- Chao M., Hempstead B. « p75 and Trkr a two-receptor ». *TINS*. 1995. Vol. 18, n°7, p. 321-326.
- Chatton J.-Y., Pellerin L., Magistretti P. J. « GABA uptake into astrocytes is not associated with significant metabolic cost: Implications for brain imaging of inhibitory transmission ». *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* [En ligne]. 14 octobre 2003. Vol. 100, n°21, p. 12456-12461. Disponible sur : <https://doi.org/10.1073/pnas.2132096100>
- Chauveau F., Claverie D., Lardant E., Varin C., Hardy E., Walter A., Canini F., Rouach N., Rancillac A. « Neuropeptide S promotes wakefulness through the inhibition of sleep-promoting ventrolateral preoptic nucleus neurons ». *Sleep* [En ligne]. 13 janvier 2020. Vol. 43, n°1, p. zsz189. Disponible sur : <https://doi.org/10.1093/sleep/zsz189>
- Chen N., Sugihara H., Sharma J., Perea G., Petravicz J., Le C., Sur M. « Nucleus basalis-enabled stimulus-specific plasticity in the visual cortex is mediated by astrocytes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [En ligne]. octobre 2012. Vol. 109, n°41,. Disponible sur : <https://doi.org/10.1073/pnas.1206557109>
- Chen R., Seo D., Bell E., Von Gall C., Lee C. « Strong Resetting of the Mammalian Clock by Constant Light Followed by Constant Darkness ». *J. Neurosci.* [En ligne]. 12 novembre 2008. Vol. 28, n°46, p. 11839-11847. Disponible sur : <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2191-08.2008>
- Cheng A., Coksaygan T., Tang H., Khatri R., Balice-Gordon R. J., Rao M. S., Mattson M. P. « Truncated tyrosine kinase B brain-derived neurotrophic factor receptor directs cortical neural stem cells to a glial cell fate by a novel signaling mechanism ». *J Neurochem* [En ligne]. 2007. Vol. 0, n°0, p. 070209222715068-??? Disponible sur : <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04337.x>
- Chever O., Dossi E., Pannasch U., Derangeon M., Rouach N. « Astroglial networks promote neuronal coordination ». *Science Signalling* [En ligne]. 2016. Vol. 9, n°410, p. 1-9. Disponible sur : <https://doi.org/10.1126/scisignal.aad3066>
- Chever O., Lee C.-Y., Rouach N. « Astroglial connexin43 hemichannels tune basal excitatory synaptic transmission. » *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* [En ligne]. 20 août 2014. Vol. 34, n°34, p. 11228-32. Disponible sur : <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0015-14.2014>
- Choi I., Kim J., Jeong J., Lee M., Suk K., Jang I. « Astrocyte-derived adenosine excites sleep-promoting neurons in the ventrolateral preoptic nucleus: Astrocyte-neuron interactions in the regulation of sleep ». *Glia* [En ligne]. octobre 2022. Vol. 70, n°10, p. 1864-1885. Disponible sur : <https://doi.org/10.1002/glia.24225>

Chou T. C., Bjorkum A. A., Gaus S. E., Lu J., Scammell T. E., Saper C. B. « Afferents to the ventrolateral preoptic nucleus. » *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2002. Vol. 22, n°3, p. 977-990.

Chung S., Weber F., Zhong P., Tan C. L., Nguyen T. N., Beier K. T., Hörmann N., Chang W. C., Zhang Z., Do J. P., Yao S., Krashes M. J., Tasic B., Cetin A., Zeng H., Knight Z. A., Luo L., Dan Y. « Identification of preoptic sleep neurons using retrograde labelling and gene profiling ». *Nature* [En ligne]. 2017. Vol. 545, n°7655, p. 477-481. Disponible sur : <https://doi.org/10.1038/nature22350>

Cirelli C., Gutierrez C. M., Tononi G. « Extensive and Divergent Effects of Sleep and Wakefulness on Brain Gene Expression ». *Neuron* [En ligne]. janvier 2004. Vol. 41, n°1, p. 35-43. Disponible sur : [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00814-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00814-6)

Clasadonte J., Haydon P. G. « Connexin 30 controls the extension of astrocytic processes into the synaptic cleft through an unconventional non-channel function ». *Neuroscience Bulletin* [En ligne]. 2014. Vol. 30, n°6, p. 1045-1048. Disponible sur : <https://doi.org/10.1007/s12264-014-1476-6>

Conner J. M., Lauterborn J. C., Yan Q., Gall C. M., Varon S. « Distribution of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Protein and mRNA in the Normal Adult Rat CNS: Evidence for Anterograde Axonal Transport ». *The Journal of Neuroscience* [En ligne]. 1 avril 1997. Vol. 17, n°7, p. 2295-2313. Disponible sur : <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-07-02295.1997>

Coren S. « Sleep Deprivation, Psychosis and Mental Efficiency ». *Psychiatric Times* [En ligne]. 1 mars 1998. Vol. 15, n°3,. Disponible sur : <https://web.archive.org/web/20190420034912/https://www.psychiatrictimes.com/sleep-disorders/sleep-deprivation-psychosis-and-mental-efficiency>

Cornell-Bell A. H., Finkbeiner S. M., Cooper M. S., Smith S. J. « Glutamate Induces Calcium Waves in Cultured Astrocytes: Long-Range Glial Signaling ». *Science* [En ligne]. 26 janvier 1990. Vol. 247, n°4941, p. 470-473. Disponible sur : <https://doi.org/10.1126/science.1967852>

Dani J. W., Chernjavsky A., Smith S. J. « Neuronal activity triggers calcium waves in hippocampal astrocyte networks ». *Neuron* [En ligne]. mars 1992. Vol. 8, n°3, p. 429-440. Disponible sur : [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(92\)90271-E](https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90271-E)

Decrock E., De Bock M., Wang N., Bultynck G., Giaume C., Naus C. C., Green C. R., Leybaert L. *Connexin and pannexin signaling pathways, an architectural blueprint for CNS physiology and pathology?* [En ligne]. *Cellular and Molecular Life Sciences*. août 2015. Vol. 72, n°15, p. 2823-2851. Disponible sur : <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1962-7>

Dermietzel R., Hwang T. K., Spray D. S. *The gap junction family: structure, function and chemistry* [En ligne]. *Anatomy and Embryology*. décembre 1990. Vol. 182, n°6, p. 517-528. Disponible sur : <https://doi.org/10.1007/BF00186458>

Derouiche A., Frotscher M. « Peripheral astrocyte processes: Monitoring by selective immunostaining for the actin-binding ERM proteins ». *GLIA* [En ligne]. 2001. Vol. 36, n°3, p. 330-341. Disponible sur : <https://doi.org/10.1002/glia.1120>

Dieni S., Matsumoto T., Dekkers M., Rauskolb S., Ionescu M. S., Deogracias R., Gundelfinger E. D., Kojima M., Nestel S., Frotscher M., Barde Y.-A. « BDNF and its pro-peptide are

stored in presynaptic dense core vesicles in brain neurons ». *The Journal of Cell Biology* [En ligne]. 19 mars 2012. Vol. 196, n°6, p. 775-788. Disponible sur : <https://doi.org/10.1083/jcb.201201038>

Dietzel I., Heinemann U., Hofmeier G., Lux H. D. « Transient changes in the size of the extracellular space in the sensorimotor cortex of cats in relation to stimulus-induced changes in potassium concentration ». *Exp Brain Res* [En ligne]. novembre 1980. Vol. 40, n°4,. Disponible sur : <https://doi.org/10.1007/BF00236151> (consulté le 20 mars 2023)

Drucker-Colín R. R., Spanis C. W., Hunyadi J., Sassin J. F., McGaugh J. L. « Growth Hormone Effects on Sleep and Wakefulness in the Rat ». *Neuroendocrinology* [En ligne]. 1975. Vol. 18, n°1, p. 1-8. Disponible sur : <https://doi.org/10.1159/000122377>

Ebendal T. « Function and evolution in the NGF family and its receptors ». *Journal of Neuroscience Research* [En ligne]. août 1992. Vol. 32, n°4, p. 461-470. Disponible sur : <https://doi.org/10.1002/jnr.490320402>

Eckel-Mahan K., Sassone-Corsi P. « Phenotyping Circadian Rhythms in Mice ». *Current Protocols in Mouse Biology* [En ligne]. septembre 2015. Vol. 5, n°3, p. 271-281. Disponible sur : <https://doi.org/10.1002/9780470942390.mo140229>

Egan M. F., Kojima M., Callicott J. H., Goldberg T. E., Kolachana B. S., Bertolino A., Zaitsev E., Gold B., Goldman D., Dean M., Lu B., Weinberger D. R. « The BDNF val66met Polymorphism Affects Activity-Dependent Secretion of BDNF and Human Memory and Hippocampal Function ». *Cell* [En ligne]. janvier 2003. Vol. 112, n°2, p. 257-269. Disponible sur : [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00035-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00035-7)

Eikermann M., Vetrivelan R., Grosse-Sundrup M., Henry M. E., Hoffmann U., Yokota S., Saper C. B., Chamberlin N. L. « The ventrolateral preoptic nucleus is not required for isoflurane general anesthesia ». *Brain Research* [En ligne]. décembre 2011. Vol. 1426, p. 30-37. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.10.018>

Ek-Vitorin J. F., King T. J., Heyman N. S., Lampe P. D., Burt J. M. « Selectivity of connexin 43 channels is regulated through protein kinase C-dependent phosphorylation ». *Circulation Research* [En ligne]. juin 2006. Vol. 98, n°12, p. 1498-1505. Disponible sur : <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000227572.45891.2c>

Elias L. A. B., Wang D. D., Kriegstein A. R. « Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex ». *Nature* [En ligne]. août 2007. Vol. 448, n°7156, p. 901-907. Disponible sur : <https://doi.org/10.1038/nature06063>

Enkvist M. O. K., Holopainen I., Åkerman K. E. O. « Glutamate receptor-linked changes in membrane potential and intracellular Ca²⁺ in primary rat astrocytes: INTRACELLULAR Ca²⁺ IN ASTROCYTES ». *Glia* [En ligne]. 1989. Vol. 2, n°6, p. 397-402. Disponible sur : <https://doi.org/10.1002/glia.440020602>

Escartin C., Rouach N. *Astroglial networking contributes to neurometabolic coupling* [En ligne]. *Frontiers in Neuroenergetics*. 2013. Vol. 5, n°APR,. Disponible sur : <https://doi.org/10.3389/fnene.2013.00004>

Esseltine J. L., Laird D. W. *Next-Generation Connexin and Pannexin Cell Biology* [En ligne]. *Trends in Cell Biology*. décembre 2016. Vol. 26, n°12, p. 944-955. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.06.003>

Falk M. M., Baker S. M., Gumpert A. M., Segretain D., Buckheit R. W. « Gap Junction Turnover Is Achieved by the Internalization of Small Endocytic Double-Membrane Vesicles ». *MBoC* [En ligne]. 15 juillet 2009. Vol. 20, n°14, p. 3342-3352. Disponible sur : <https://doi.org/10.1091/mbc.e09-04-0288>

Faraguna U., Vyazovskiy V. V., Nelson A. B., Tononi G., Cirelli C. « A Causal Role for Brain-Derived Neurotrophic Factor in the Homeostatic Regulation of Sleep ». *Journal of Neuroscience* [En ligne]. 9 avril 2008. Vol. 28, n°15, p. 4088-4095. Disponible sur : <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5510-07.2008>

Fellin T., Carmignoto G. *Neurone-to-astrocyte signalling in the brain represents a distinct multifunctional unit* [En ligne]. *Journal of Physiology*. août 2004. Vol. 559, n°1, p. 3-15. Disponible sur : <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.063214>

Fellin T., Halassa M. M., Terunuma M., Succol F., Takano H., Frank M., Moss S. J., Haydon P. G. « Endogenous nonneuronal modulators of synaptic transmission control cortical slow oscillations in vivo. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [En ligne]. 2009. Vol. 106, n°35, p. 15037-15042. Disponible sur : <https://doi.org/10.1073/pnas.0906419106>

Fenner B. M. « Truncated TrkB: Beyond a dominant negative receptor ». *Cytokine & Growth Factor Reviews* [En ligne]. février 2012. Vol. 23, n°1-2, p. 15-24. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2012.01.002>

Ferrer I., Marín C., Rey M. J., Ribalta T., Goutan E., Blanco R., Tolosa E., Martí E. « BDNF and Full-length and Truncated TrkB Expression in Alzheimer Disease. Implications in Therapeutic Strategies ». *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* [En ligne]. juillet 1999. Vol. 58, n°7, p. 729-739. Disponible sur : <https://doi.org/10.1097/00005072-199907000-00007>

Foltran R. B., Diaz S. L. « BDNF isoforms: a round trip ticket between neurogenesis and serotonin? ». *J. Neurochem.* [En ligne]. juillet 2016. Vol. 138, n°2, p. 204-221. Disponible sur : <https://doi.org/10.1111/jnc.13658>

Frank M. G., Shaw P., Tafti M., Thorpy M. « Astroglial regulation of sleep in The Genetic Basis of Sleep & Sleep Disorders ». *Cambridge University Press* [En ligne]. 2013. p. 84-90. Disponible sur : <https://doi.org/10.1017/CBO9781139649469>

Franklin K. B. J., Paxinos G. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. 3. ed. Amsterdam : Elsevier, AP, 2007. 162 p.ISBN : 978-0-12-369460-7.

Franklin K. B. J., Paxinos G. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. 3. ed. Amsterdam : Elsevier, AP, 2008. 162 p.ISBN : 978-0-12-369460-7.

Franks N. P., Zecharia A. Y. « Sleep and general anesthesia ». *Can J Anesth/J Can Anesth* [En ligne]. février 2011. Vol. 58, n°2, p. 139-148. Disponible sur : <https://doi.org/10.1007/s12630-010-9420-3>

Furihata R., Saitoh K., Otsuki R., Murata S., Suzuki M., Jike M., Kaneita Y., Ohida T., Uchiyama M. « Association between reduced serum BDNF levels and insomnia with short sleep duration among female hospital nurses ». *Sleep Medicine* [En ligne]. 2020. Vol. 68, p. 167-172. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2019.12.011>

- Gallo V., Giovannini C., Suergiu R., Levi G. « Expression of Excitatory Amino Acid Receptors by Cerebellar Cells of the Type-2 Astrocyte Cell Lineage ». *J Neurochem* [En ligne]. janvier 1989. Vol. 52, n°1, p. 1-9. Disponible sur : <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1989.tb10890.x>
- Gallopín T., Fort P., Eggermann E., Cauli B., Luppi P. H., Rossier J., Audinat E., Mühlethaler M., Serafin M. « Identification of sleep-promoting neurons in vitro ». *Nature* [En ligne]. 2000. Vol. 404, n°6781, p. 992-995. Disponible sur : <https://doi.org/10.1038/35010109>
- Gallopín T., Luppi P.-H., Cauli B., Urade Y., Rossier J., Hayaishi O., Lambolez B., Fort P. « The endogenous somnogen adenosine excites a subset of sleep-promoting neurons via A2A receptors in the ventrolateral preoptic nucleus ». *Neuroscience* [En ligne]. 2005. Vol. 134, n°4, p. 1377-1390. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.05.045>
- Garcia-Segura L. M., Perez-Marquez J. « A new mathematical function to evaluate neuronal morphology using the Sholl analysis ». *Journal of Neuroscience Methods* [En ligne]. avril 2014. Vol. 226, p. 103-109. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2014.01.016>
- Gaus S. E., Strecker R. E., Tate B. A., Parker R. A., Saper C. B. « Ventrolateral preoptic nucleus contains sleep-active, galaninergic neurons in multiple mammalian species ». *Neuroscience* [En ligne]. novembre 2002. Vol. 115, n°1, p. 285-294. Disponible sur : [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(02\)00308-1](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00308-1)
- Ghézali G., Calvo C.-F., Pillet L.-E., Llense F., Ezan P., Pannasch U., Bemelmans A.-P., Manneville S. E., Rouach N. « Connexin 30 controls astroglial polarization during postnatal brain development ». *Development* [En ligne]. 2018. Vol. 145, n°4, p. dev155275. Disponible sur : <https://doi.org/10.1242/dev.155275>
- Giaume C., Leybaert L., C. Naus C., C. Sáez J. « Connexin and pannexin hemichannels in brain glial cells: properties, pharmacology, and roles ». *Front. Pharmacol.* [En ligne]. 2013. Vol. 4, Disponible sur : <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00088> (consulté le 4 mai 2023)
- Giaume C., Marin P., Cordier J., Glowinski J., Premont J. « Adrenergic regulation of intercellular communications between cultured striatal astrocytes from the mouse. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* [En ligne]. 1991. Vol. 88, n°13, p. 5577-5581. Disponible sur : <https://doi.org/10.1073/pnas.88.13.5577>
- Girardet C., Lebrun B., Cabirol-Pol M. J., Tardivel C., François-Bellan A. M., Becquet D., Bosler O. « Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling regulates daily astroglial plasticity in the suprachiasmatic nucleus: Electron-microscopic evidence in mouse ». *Glia* [En ligne]. 2013. Vol. 61, n°7, p. 1172-1177. Disponible sur : <https://doi.org/10.1002/glia.22509>
- Goforth P. B., Leininger G. M., Patterson C. M., Satin L. S., Myers M. G. « Leptin Acts via Lateral Hypothalamic Area Neurotensin Neurons to Inhibit Orexin Neurons by Multiple GABA-Independent Mechanisms ». *J. Neurosci.* [En ligne]. 20 août 2014. Vol. 34, n°34, p. 11405-11415. Disponible sur : <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5167-13.2014>
- Gómez-Palacio-Schjetnan A., Escobar M. L. « Neurotrophins and Synaptic Plasticity ». In : Belzung C, Wigmore P (éd.). *Neurogenesis and Neural Plasticity* [En ligne]. Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 2013. p. 117-136. Disponible sur : https://doi.org/10.1007/7854_2012_231 (consulté le 16 mars 2023) ISBN : 978-3-642-36231-6.

- Gong H., McGinty D., Guzman-Marin R., Chew K.-T., Stewart D., Szymusiak R. « Activation of *c-fos* in GABAergic neurones in the preoptic area during sleep and in response to sleep deprivation: Preoptic GABAergic neurones and sleep ». *The Journal of Physiology* [En ligne]. mai 2004. Vol. 556, n°3, p. 935-946. Disponible sur : <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.056622>
- Gong H., Szymusiak R., King J., Steininger T., McGinty D. « Sleep-related c-Fos protein expression in the preoptic hypothalamus: effects of ambient warming ». *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* [En ligne]. 1 décembre 2000. Vol. 279, n°6, p. R2079-R2088. Disponible sur : <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2000.279.6.R2079>
- Gong S., Zheng C., Doughty M. L., Losos K., Didkovsky N., Schambra U. B., Nowak N. J., Joyner A., Leblanc G., Hatten M. E., Heintz N. « A gene expression atlas of the central nervous system based on bacterial artificial chromosomes ». *Nature* [En ligne]. octobre 2003. Vol. 425, n°6961, p. 917-925. Disponible sur : <https://doi.org/10.1038/nature02033>
- Gonzalez A., Moya-Alvarado G., Gonzalez-Billaut C., Bronfman F. C. « Cellular and molecular mechanisms regulating neuronal growth by brain-derived neurotrophic factor: Neuronal Growth by Brain-Derived Neurotrophic Factor ». *Cytoskeleton* [En ligne]. octobre 2016. Vol. 73, n°10, p. 612-628. Disponible sur : <https://doi.org/10.1002/cm.21312>
- Gooley J. J., Lu J., Chou T. C., Scammell T. E., Saper C. B. « Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract ». *Nat Neurosci* [En ligne]. décembre 2001. Vol. 4, n°12, p. 1165-1165. Disponible sur : <https://doi.org/10.1038/nn768>
- Greene R. W., Bjorness T. E., Suzuki A. « The adenosine-mediated, neuronal-glia, homeostatic sleep response ». *Current Opinion in Neurobiology* [En ligne]. juin 2017. Vol. 44, n°5, p. 236-242. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.05.015>
- Guzmán-Ruiz M. A., Ramirez-Corona A., Guerrero-Vargas N. N., Sabath E., Ramirez-Plascencia O. D., Fuentes-Romero R., León-Mercado L. A., Sigales M. B., Escobar C., Buijs R. M. « Role of the suprachiasmatic and arcuate nuclei in diurnal temperature regulation in the rat ». *Journal of Neuroscience* [En ligne]. 2015. Vol. 35, n°46, p. 15419-15429. Disponible sur : <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1449-15.2015>
- Gvilia I., Suntsova N., Angara B., McGinty D., Szymusiak R. « Maturation of sleep homeostasis in developing rats: a role for preoptic area neurons ». *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* [En ligne]. avril 2011. Vol. 300, n°4, p. R885-R894. Disponible sur : <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00727.2010>
- Gvilia I., Xu F., McGinty D., Szymusiak R. « Homeostatic Regulation of Sleep: A Role for Preoptic Area Neurons ». *J. Neurosci.* [En ligne]. 13 septembre 2006. Vol. 26, n°37, p. 9426-9433. Disponible sur : <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2012-06.2006>
- Haapasalo A., Koponen E., Hoppe E., Wong G., Castrén E. « Truncated *trkB.T1* Is Dominant Negative Inhibitor of *trkB.TK+*-Mediated Cell Survival ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* [En ligne]. février 2001. Vol. 280, n°5, p. 1352-1358. Disponible sur : <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4296>
- Haj-Yasein N. N., Jensen V., Østby I., Omholt S. W., Voipio J., Kaila K., Ottersen O. P., Hvalby Ø., Nagelhus E. A. « Aquaporin-4 regulates extracellular space volume dynamics during high-frequency synaptic stimulation: A gene deletion study in mouse hippocampus ».

- Glia* [En ligne]. mai 2012. Vol. 60, n°6, p. 867-874. Disponible sur : <https://doi.org/10.1002/glia.22319>
- Halassa M. M., Fellin T., Takano H., Dong J.-H., Haydon P. G. « Synaptic Islands Defined by the Territory of a Single Astrocyte ». *Journal of Neuroscience* [En ligne]. 2007. Vol. 27, n°24, p. 6473-6477. Disponible sur : <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1419-07.2007>
- Halassa M. M., Florian C., Fellin T., Munoz J. R., Lee S.-Y. Y., Abel T., Haydon P. G., Frank M. G. « Astrocytic modulation of sleep homeostasis and cognitive consequences of sleep loss. » *Neuron* [En ligne]. 29 janvier 2009. Vol. 61, n°2, p. 213-9. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.11.024>
- Hallett H., Churchill L., Taishi P., De A., Krueger J. M. « Whisker stimulation increases expression of nerve growth factor- and interleukin-1 β -immunoreactivity in the rat somatosensory cortex ». *Brain Research* [En ligne]. mai 2010. Vol. 1333, n°48-56, p. 48-56. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.03.048>
- Hamilton N. B., Attwell D. « Do astrocytes really exocytose neurotransmitters? ». *Nat Rev Neurosci* [En ligne]. avril 2010. Vol. 11, n°4, p. 227-238. Disponible sur : <https://doi.org/10.1038/nrn2803>
- Han J., Kesner P., Metna-Laurent M., Duan T., Xu L., Georges F., Koehl M., Abrous D. N., Mendizabal-Zubiaga J., Grandes P., Liu Q., Bai G., Wang W., Xiong L., Ren W., Marsicano G., Zhang X. « Acute cannabinoids impair working memory through astroglial CB 1 receptor modulation of hippocampal LTD ». *Cell* [En ligne]. mars 2012. Vol. 148, n°5, p. 1039-1050. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.037>
- Hansen D. B., Braunstein T. H., Nielsen M. S., MacAulay N. « Distinct permeation profiles of the connexin 30 and 43 hemichannels ». *FEBS Letters* [En ligne]. 17 avril 2014. Vol. 588, n°8, p. 1446-1457. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.01.036>
- Harding E. C., Franks N. P., Wisden W. « The Temperature Dependence of Sleep ». *Front. Neurosci.* [En ligne]. 24 avril 2019. Vol. 13, p. 336. Disponible sur : <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00336>
- Harding E. C., Franks N. P., Wisden W. « Sleep and thermoregulation ». *Current Opinion in Physiology* [En ligne]. juin 2020. Vol. 15, p. 7-13. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2019.11.008>
- Hardy E., Moulard J., Walter A., Ezan P., Bemelmans A.-P., Mouthon F., Charvériat M., Rouach N., Rancillac A. « Upregulation of astroglial connexin 30 impairs hippocampal synaptic activity and recognition memory ». *PLoS Biol* [En ligne]. 11 avril 2023. Vol. 21, n°4, p. e3002075. Disponible sur : <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002075>
- Hartmann E. L. « The Functions of Sleep ». *American Behavioral Scientist* [En ligne]. novembre 1973. Vol. 17, n°2, p. 248-248. Disponible sur : <https://doi.org/10.1177/000276427301700207>
- Hastings M. H., Maywood E. S., Brancaccio M. « Generation of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus ». *Nat Rev Neurosci* [En ligne]. août 2018. Vol. 19, n°8, p. 453-469. Disponible sur : <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0026-z>
- Haustein M. D., Kracun S., Lu X.-H., Shih T., Jackson-Weaver O., Tong X., Xu J., Yang X. W., O'Dell T. J., Marvin J. S., Ellisman M. H., Bushong E. A., Looger L. L., Khakh B. S.

« Conditions and Constraints for Astrocyte Calcium Signaling in the Hippocampal Mossy Fiber Pathway ». *Neuron* [En ligne]. avril 2014. Vol. 82, n°2, p. 413-429. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.02.041>

Hawkins A., Olszewski J. « Glia/nerve cell index for cortex of the whale ». *Science (New York, N.Y.)*. 1957. Vol. 126, n°3263, p. 76-77.

Heller J. P., Rusakov D. A. « Morphological plasticity of astroglia: Understanding synaptic microenvironment ». *Glia* [En ligne]. 2015. Vol. 63, n°12, p. 2133-2151. Disponible sur : <https://doi.org/10.1002/glia.22821>

Hempstead B. L. « BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR: THREE LIGANDS, MANY ACTIONS ». *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2015. Vol. 126, p. 9-19.

Henneberger C., Papouin T., Oliet S. H. R., Rusakov D. A. « Long-term potentiation depends on release of d-serine from astrocytes ». *Nature* [En ligne]. janvier 2010. Vol. 463, n°7278, p. 232-236. Disponible sur : <https://doi.org/10.1038/nature08673>

Hervé J. C., Bourmeyster N., Sarrouilhe D., Duffy H. S. *Gap junctional complexes: From partners to functions* [En ligne]. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. mai 2007. Vol. 94, n°1-2, p. 29-65. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2007.03.010>

Hervé J. C., Derangeon M. *Gap-junction-mediated cell-to-cell communication* [En ligne]. *Cell and Tissue Research*. avril 2013. Vol. 352, n°1, p. 21-31. Disponible sur : <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1485-6>

Hess R. W. « Le sommeil ». *Société de biologie*. 1931.

Hill J. L., Hardy N. F., Jimenez D. V., Maynard K. R., Kardian A S., Pollock C. J., Schloesser R. J., Martinowich K. « Loss of promoter IV-driven BDNF expression impacts oscillatory activity during sleep, sensory information processing and fear regulation. » *Translational psychiatry* [En ligne]. 2016. Vol. 6, n°8, p. e873-e873. Disponible sur : <https://doi.org/10.1038/tp.2016.153>

Hoekstra M. M., Emmenegger Y., Hubbard J., Franken P. « Cold-inducible RNA-binding protein (CIRBP) adjusts clock-gene expression and REM-sleep recovery following sleep deprivation ». *eLife* [En ligne]. 5 février 2019. Vol. 8, p. e43400. Disponible sur : <https://doi.org/10.7554/eLife.43400>

Hofer M., Pagliusi S. R., Hohn A., Leibrock J., Barde Y.-A. « Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain ». 1990. p. 6.

Hsieh K.-C., Gvilia I., Kumar S., Uschakov A., McGinty D., Alam M. N., Szymusiak R. « c-Fos expression in neurons projecting from the preoptic and lateral hypothalamic areas to the ventrolateral periaqueductal gray in relation to sleep states ». *Neuroscience* [En ligne]. août 2011. Vol. 188, p. 55-67. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.05.016>

Huber R., Born J. « Sleep, synaptic connectivity, and hippocampal memory during early development ». *Trends in Cognitive Sciences* [En ligne]. mars 2014. Vol. 18, n°3, p. 141-152. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.tics.2013.12.005>

Huber R., Deboer T., Tobler I. « Topography of EEG Dynamics After Sleep Deprivation in Mice ». *Journal of Neurophysiology* [En ligne]. 1 octobre 2000. Vol. 84, n°4, p. 1888-1893. Disponible sur : <https://doi.org/10.1152/jn.2000.84.4.1888>

- Huber R., Tononi G., Cirelli C. « Exploratory Behavior, Cortical BDNF Expression, and Sleep Homeostasis ». *Sleep* [En ligne]. février 2007. Vol. 30, n°2, p. 129-139. Disponible sur : <https://doi.org/10.1093/sleep/30.2.129>
- Hyder F., Patel A. B., Gjedde A., Rothman D. L., Behar K. L., Shulman R. G. « Neuronal–Glial Glucose Oxidation and Glutamatergic–GABAergic Function ». *J Cereb Blood Flow Metab* [En ligne]. juillet 2006. Vol. 26, n°7, p. 865-877. Disponible sur : <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600263>
- Imeri L., Opp M. R. « How (and why) the immune system makes us sleep ». *Nat Rev Neurosci* [En ligne]. mars 2009. Vol. 10, n°3, p. 199-210. Disponible sur : <https://doi.org/10.1038/nrn2576>
- Ingiosi A. M., Hayworth C. R., Harvey D. O., Singletary K. G., Rempe M. J., Wisor J. P., Frank M. G. « A Role for Astroglial Calcium in Mammalian Sleep and Sleep Regulation ». *Current Biology* [En ligne]. novembre 2020. Vol. 30, n°22, p. 4373-4383.e7. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.08.052>
- Jaiswal J. K., Fix M., Takano T., Nedergaard M., Simon S. M. « Resolving vesicle fusion from lysis to monitor calcium-triggered lysosomal exocytosis in astrocytes ». *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* [En ligne]. 28 août 2007. Vol. 104, n°35, p. 14151-14156. Disponible sur : <https://doi.org/10.1073/pnas.0704935104>
- Janzer R. C., Raff M. C. « Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells ». *Nature* [En ligne]. 1987. Vol. 325, n°6101, p. 253-257. Disponible sur : <https://doi.org/10.1038/325253a0>
- Jha M. K., Morrison B. M. « Glia-neuron energy metabolism in health and diseases: New insights into the role of nervous system metabolic transporters ». *Experimental Neurology* [En ligne]. novembre 2018. Vol. 309, p. 23-31. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2018.07.009>
- Johnston M. V., Ammanuel S., O'Driscoll C., Wozniak A., Naidu S., Kadam S. D. « Twenty-four hour quantitative-EEG and in-vivo glutamate biosensor detects activity and circadian rhythm dependent biomarkers of pathogenesis in Mecp2 null mice ». *Front. Syst. Neurosci.* [En ligne]. 27 juin 2014. Vol. 8,. Disponible sur : <https://doi.org/10.3389/fnsys.2014.00118> (consulté le 27 mars 2023)
- Jourdain P., Bergersen L. H., Bhaukaurally K., Bezzi P., Santello M., Domercq M., Matute C., Tonello F., Gundersen V., Volterra A. « Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. » *Nature neuroscience* [En ligne]. 2007. Vol. 10, n°3, p. 331-339. Disponible sur : <https://doi.org/10.1038/nn1849>
- Kacem K., Lacombe P., Seylaz J., Bonvento G. « Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: a confocal microscopy study ». *Glia*. 1998. n°23(1), p. 1-10.
- Kang J., Jiang L., Goldman S. a., Nedergaard M. « Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. » *Nat. Neurosci.* [En ligne]. 1998. Vol. 1, n°8, p. 683-92. Disponible sur : <https://doi.org/10.1038/3684>
- Kang N., Xu J., Xu Q., Nedergaard M., Kang J. « Astrocytic glutamate release-induced transient depolarization and epileptiform discharges in hippocampal CA1 pyramidal

neurons ». *Journal of Neurophysiology* [En ligne]. 2005. Vol. 94, n°6, p. 4121-4130. Disponible sur : <https://doi.org/10.1152/jn.00448.2005>

Kaplan A. S., Levitan R. D., Yilmaz Z., Davis C., Tharmalingam S., Kennedy J. L. « A DRD4/BDNF gene-gene interaction associated with maximum BMI in women with bulimia nervosa ». *Int. J. Eat. Disord.* [En ligne]. janvier 2008. Vol. 41, n°1, p. 22-28. Disponible sur : <https://doi.org/10.1002/eat.20474>

Kattler H., Dijk D.-J., Borbély A. A. « Effect of unilateral somatosensory stimulation prior to sleep on the sleep EEG in humans ». *Journal of Sleep Research* [En ligne]. septembre 1994. Vol. 3, n°3, p. 159-164. Disponible sur : <https://doi.org/10.1111/j.1365-2869.1994.tb00123.x>

Kettenmann H., Hanisch U.-K., Noda M., Verkhratsky A. « Physiology of Microglia ». *Physiological Reviews* [En ligne]. avril 2011. Vol. 91, n°2, p. 461-553. Disponible sur : <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2010>

Kettenmann H., Ransom B. R. *Neuroglia* [En ligne]. III.[s.l.] : Helmut Kettenmann and Bruce R. Ransom, 2013. 864 p. Disponible sur : <https://global.oup.com/academic/product/neuroglia-9780199794591?cc=fr&lang=en&#ISBN : 978-0-19-979459-1>.

Kim J. H., Choi I. S., Jeong J. Y., Jang I. S., Lee M. G., Suk K. « Astrocytes in the ventrolateral preoptic area promote sleep ». *Journal of Neuroscience* [En ligne]. 2020. Vol. 40, n°47, p. 8994-9011. Disponible sur : <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1486-20.2020>

Kim W. T., Rioult M. G., Cornell-Bell A. H. « Glutamate-induced calcium signaling in astrocytes ». *Glia* [En ligne]. juin 1994. Vol. 11, n°2, p. 173-184. Disponible sur : <https://doi.org/10.1002/glia.440110211>

Kimelberg H. K. « Functions of Mature Mammalian Astrocytes: A Current View ». *Neuroscientist* [En ligne]. février 2010. Vol. 16, n°1, p. 79-106. Disponible sur : <https://doi.org/10.1177/1073858409342593>

King A. E., Ackley M. A., Cass C. E., Young J. D., Baldwin S. A. « Nucleoside transporters: from scavengers to novel therapeutic targets ». *Trends in Pharmacological Sciences* [En ligne]. août 2006. Vol. 27, n°8, p. 416-425. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.tips.2006.06.004>

Kirchhoff F., Mülhardt C., Pastor A., Becker C.-M., Kettenmann H. « Expression of Glycine Receptor Subunits in Glial Cells of the Rat Spinal Cord ». *Journal of Neurochemistry* [En ligne]. 1996. Vol. 66, n°4, p. 1383-1390. Disponible sur : <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1996.66041383.x>

Kjenseth A., Fykerud T., Rivedal E., Leithe E. *Regulation of gap junction intercellular communication by the ubiquitin system* [En ligne]. *Cellular Signalling*. septembre 2010. Vol. 22, n°9, p. 1267-1273. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.03.005>

Klein A. B., Jennum P., Knudsen S., Gammeltoft S., Mikkelsen J. D. « Increased serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in patients with narcolepsy ». *Neuroscience Letters* [En ligne]. juin 2013. Vol. 544, p. 31-35. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.03.031>

Klein R., Nanduri V., Jing S., Lamballe F., Tapley P., Bryant S., Cordon-Cardo C., Jones K. R., Reichardt L. F., Barbacid M. « The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-

derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 ». *Cell* [En ligne]. juillet 1991. Vol. 66, n°2, p. 395-403. Disponible sur : [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90628-C](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90628-C)

Kofuji P., Araque A. « G-Protein-Coupled Receptors in Astrocyte–Neuron Communication ». *Neuroscience* [En ligne]. février 2021. Vol. 456, p. 71-84. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.03.025>

Kofuji P., Newman E. A. « Potassium buffering in the central nervous system ». *Neuroscience* [En ligne]. 2004. Vol. 129, n°4, p. 1043-1054. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.06.008>

Kowiański P., Lietzau G., Czuba E., Waśkow M., Steliga A., Moryś J. « BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity ». *Cellular and Molecular Neurobiology* [En ligne]. 2018. Vol. 38, n°3, p. 579-593. Disponible sur : <https://doi.org/10.1007/s10571-017-0510-4>

Koyama Y., Hayaishi O. « Firing of neurons in the preoptic/anterior hypothalamic areas in rat: its possible involvement in slow wave sleep and paradoxical sleep ». *Neuroscience Research* [En ligne]. février 1994. Vol. 19, n°1, p. 31-38. Disponible sur : [https://doi.org/10.1016/0168-0102\(94\)90005-1](https://doi.org/10.1016/0168-0102(94)90005-1)

Kroeger D., Absi G., Gagliardi C., Bandaru S. S., Madara J. C., Ferrari L. L., Arrigoni E., Münzberg H., Scammell T. E., Saper C. B., Vetrivelan R. « Galanin neurons in the ventrolateral preoptic area promote sleep and heat loss in mice ». *Nature Communications* [En ligne]. 2018. Vol. 9, n°1,. Disponible sur : <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06590-7>

Krueger J. M., Obäl F. « A neuronal group theory of sleep function ». *Journal of Sleep Research* [En ligne]. juin 1993. Vol. 2, n°2, p. 63-69. Disponible sur : <https://doi.org/10.1111/j.1365-2869.1993.tb00064.x>

Kryl D., Barker P. A. « TTIP Is a Novel Protein That Interacts with the Truncated T1 TrkB Neurotrophin Receptor ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* [En ligne]. décembre 2000. Vol. 279, n°3, p. 925-930. Disponible sur : <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.4058>

Kunzelmann P., Schröder W., Traub O., Steinhäuser C., Dermietzel R., Willecke K. « Late onset and increasing expression of the gap junction protein connexin30 in adult murine brain and long-term cultured astrocytes ». *GLIA* [En ligne]. janvier 1999. Vol. 25, n°2, p. 111-119. Disponible sur : [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(19990115\)25:2<111::AID-GLIA2>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1136(19990115)25:2<111::AID-GLIA2>3.0.CO;2-I)

Kushikata T., Fang J., Krueger J. M. « Brain-derived neurotrophic factor enhances spontaneous sleep in rats and rabbits ». *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* [En ligne]. mai 1999. Vol. 276, n°5, p. R1334-R1338. Disponible sur : <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1999.276.5.R1334>

Lacroix M. M., De Lavilléon G., Lefort J., El Kanbi K., Bagur S., Laventure S., Dauvilliers Y., Peyron C., Benchenane K. *Improved sleep scoring in mice reveals human-like stages* [En ligne]. [s.l.] : Neuroscience, 2018. Disponible sur : <https://doi.org/10.1101/489005> (consulté le 27 mars 2023)

- Lampe P. D., Lau A. F. *The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication* [En ligne]. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. juillet 2004. Vol. 36, n°7, p. 1171-1186. Disponible sur : [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(03\)00264-4](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(03)00264-4)
- Lancel M., Van Riezen H., Glatt A. « Effects of circadian phase and duration of sleep deprivation on sleep and EEG power spectra in the cat ». *Brain Research* [En ligne]. mai 1991. Vol. 548, n°1-2, p. 206-214. Disponible sur : [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)91123-I](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)91123-I)
- Landsness E. C., Crupi D., Hulse B. K., Peterson M. J., Huber R., Ansari H., Coen M., Cirelli C., Benca R. M., Ghilardi M. F., Tononi G. « Sleep-Dependent Improvement in Visuomotor Learning: A Causal Role for Slow Waves ». *Sleep* [En ligne]. octobre 2009. Vol. 32, n°10, p. 1273-1284. Disponible sur : <https://doi.org/10.1093/sleep/32.10.1273>
- Lange T., Born J. « The immune recovery function of sleep – Tracked by neutrophil counts☆ ». *Brain, Behavior, and Immunity* [En ligne]. janvier 2011. Vol. 25, n°1, p. 14-15. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.08.008>
- Lavialle M., Servièrre J. « Circadian fluctuations in GFAP distribution in the Syrian hamster suprachiasmatic nucleus ». *NeuroReport* [En ligne]. septembre 1993. Vol. 4, n°11, p. 1243-1246. Disponible sur : <https://doi.org/10.1097/00001756-199309000-00008>
- Lavialle M., Aumann G., Anlauf E., Pröls F., Arpin M., Derouiche A. « Structural plasticity of perisynaptic astrocyte processes involves ezrin and metabotropic glutamate receptors ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [En ligne]. août 2011. Vol. 108, n°31, p. 12915-12919. Disponible sur : <https://doi.org/10.1073/pnas.1100957108>
- Lawal O., Ulloa Severino F. P., Eroglu C. « The role of astrocyte structural plasticity in regulating neural circuit function and behavior ». *Glia* [En ligne]. août 2022. Vol. 70, n°8, p. 1467-1483. Disponible sur : <https://doi.org/10.1002/glia.24191>
- Lee H. U., Yamazaki Y., Tanaka K. F., Furuya K., Sokabe M., Hida H., Takao K., Miyakawa T., Fujii S., Ikenaka K. « Increased astrocytic ATP release results in enhanced excitability of the hippocampus ». *GLIA* [En ligne]. février 2013. Vol. 61, n°2, p. 210-224. Disponible sur : <https://doi.org/10.1002/glia.22427>
- Leys C., Ley C., Klein O., Bernard P., Licata L. « Detecting outliers: Do not use standard deviation around the mean, use absolute deviation around the median ». *Journal of Experimental Social Psychology* [En ligne]. 2013. Vol. 49, n°4, p. 764-766. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.jesp.2013.03.013>
- Liang Y., Shi W., Xiang A., Hu D., Wang L., Zhang L. « The NAergic locus coeruleus-ventrolateral preoptic area neural circuit mediates rapid arousal from sleep ». *Current Biology* [En ligne]. septembre 2021. Vol. 31, n°17, p. 3729-3742.e5. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.06.031>
- Lim A. S. P., Ellison B. A., Wang J. L., Yu L., Schneider J. A., Buchman A. S., Bennett D. A., Saper C. B. « Sleep is related to neuron numbers in the ventrolateral preoptic/intermediate nucleus in older adults with and without Alzheimer's disease ». *Brain* [En ligne]. octobre 2014. Vol. 137, n°10, p. 2847-2861. Disponible sur : <https://doi.org/10.1093/brain/awu222>
- Lind B. L., Brazhe A. R., Jessen S. B., Tan F. C. C., Lauritzen M. J. « Rapid stimulus-evoked astrocyte Ca²⁺ elevations and hemodynamic responses in mouse somatosensory cortex

- in vivo ». *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* [En ligne]. 26 novembre 2013. Vol. 110, n°48,. Disponible sur : <https://doi.org/10.1073/pnas.1310065110> (consulté le 20 mars 2023)
- Lind B. L., Jessen S. B., Lønstrup M., Joséphine C., Bonvento G., Lauritzen M. « Fast Ca²⁺ responses in astrocyte end-feet and neurovascular coupling in mice ». *Glia* [En ligne]. février 2018. Vol. 66, n°2, p. 348-358. Disponible sur : <https://doi.org/10.1002/glia.23246>
- Liu Q. S., Xu Q., Arcuino G., Kang J., Nedergaard M. « Astrocyte-mediated activation of neuronal kainate receptors ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [En ligne]. mars 2004. Vol. 101, n°9, p. 3172-3177. Disponible sur : <https://doi.org/10.1073/pnas.0306731101>
- Liu X., Gangoso E., Yi C., Jeanson T., Kandelman S., Mantz J., Giaume C. « General anesthetics have differential inhibitory effects on gap junction channels and hemichannels in astrocytes and neurons: Anesthetics and Connexin-Based Channels ». *Glia* [En ligne]. avril 2016. Vol. 64, n°4, p. 524-536. Disponible sur : <https://doi.org/10.1002/glia.22946>
- Liu X., Petit J.-M., Ezan P., Gyger J., Magistretti P., Giaume C. « The psychostimulant modafinil enhances gap junctional communication in cortical astrocytes ». *Neuropharmacology* [En ligne]. décembre 2013. Vol. 75, p. 533-538. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.04.019>
- Liu Y.-W., Li J., Ye J.-H. « Histamine regulates activities of neurons in the ventrolateral preoptic nucleus: Histamine regulates hypothalamic neurons ». *The Journal of Physiology* [En ligne]. 1 novembre 2010. Vol. 588, n°21, p. 4103-4116. Disponible sur : <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.193904>
- Llewellyn T., Zheng H., Liu X., Xu B., Patel K. P. « Median preoptic nucleus and subfornical organ drive renal sympathetic nerve activity via a glutamatergic mechanism within the paraventricular nucleus ». *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* [En ligne]. 15 février 2012. Vol. 302, n°4, p. R424-R432. Disponible sur : <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00403.2011>
- Loewenstein W. R. « Junctional intercellular communication: the cell-to-cell membrane channel ». *Physiology (Bethesda, Md.)*. 1981. Vol. 61, p. 829-913.
- Louveau A., Smirnov I., Keyes T. J., Eccles J. D., Rouhani S. J., Peske J. D., Derecki N. C., Castle D., Mandell J. W., Lee K. S., Harris T. H., Kipnis J. « Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels ». *Nature* [En ligne]. 16 juillet 2015. Vol. 523, n°7560, p. 337-341. Disponible sur : <https://doi.org/10.1038/nature14432>
- Lu J., Bjorkum A. A., Xu M., Gaus S. E., Shiromani P. J., Saper C. B. « Selective Activation of the Extended Ventrolateral Preoptic Nucleus during Rapid Eye Movement Sleep ». *J. Neurosci.* [En ligne]. 1 juin 2002. Vol. 22, n°11, p. 4568-4576. Disponible sur : <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-11-04568.2002>
- Lu J., Greco M. A., Shiromani P., Saper C. B. « Effect of lesions of the ventrolateral preoptic nucleus on NREM and REM sleep. » *The Journal of Neuroscience* [En ligne]. 2000. Vol. 20, n°10, p. 3830-3842. Disponible sur : <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-11-04568.2002> [pii] ET - 2000/05/11
- Lu J., Wu Y., Sousa N., Almeida O. F. X. « SMAD pathway mediation of BDNF and TGFβ2 regulation of proliferation and differentiation of hippocampal granule neurons ». *Development*

[En ligne]. 15 juillet 2005. Vol. 132, n°14, p. 3231-3242. Disponible sur : <https://doi.org/10.1242/dev.01893>

Lu J., Zhang Y.-H., Chou T. C., Gaus S. E., Elmquist J. K., Shiromani P., Saper C. B. « Contrasting Effects of Ibotenate Lesions of the Paraventricular Nucleus and Subparaventricular Zone on Sleep–Wake Cycle and Temperature Regulation ». *J. Neurosci.* [En ligne]. 1 juillet 2001. Vol. 21, n°13, p. 4864-4874. Disponible sur : <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-13-04864.2001>

Luberg K., Wong J., Weickert C. S., Timmusk T. « Human TrkB gene: novel alternative transcripts, protein isoforms and expression pattern in the prefrontal cerebral cortex during postnatal development ». *Journal of Neurochemistry* [En ligne]. mai 2010. Vol. 113, n°4, p. 952-964. Disponible sur : <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06662.x>

Lundgaard I., Osório M. J., Kress B. T., Sanggaard S., Nedergaard M. *White matter astrocytes in health and disease* [En ligne]. *Neuroscience*. septembre 2014. Vol. 276, p. 161-173. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.10.050>

Mackiewicz M., Shockley K. R., Romer M. A., Galante R. J., Zimmerman J. E., Naidoo N., Baldwin D. A., Jensen S. T., Churchill G. A., Pack A. I. « Macromolecule biosynthesis: a key function of sleep ». *Physiological Genomics* [En ligne]. novembre 2007. Vol. 31, n°3, p. 441-457. Disponible sur : <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00275.2006>

MacVicar B. A., Newman E. A. « Astrocyte Regulation of Blood Flow in the Brain ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [En ligne]. mai 2015. Vol. 7, n°5, p. a020388. Disponible sur : <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020388>

Magistretti P. J., Sorg O., Yu N., Martin J. L., Pellerin L. « Neurotransmitters regulate energy metabolism in astrocytes: implications for the metabolic trafficking between neural cells ». *Dev Neurosci*. 1993. Vol. 15, n°3-5, p. 306-312.

Maina G., Rosso G., Zanardini R., Bogetto F., Gennarelli M., Bocchio-Chiavetto L. « Serum levels of brain-derived neurotrophic factor in drug-naïve obsessive–compulsive patients: A case–control study ». *Journal of Affective Disorders* [En ligne]. avril 2010. Vol. 122, n°1-2, p. 174-178. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.jad.2009.07.009>

Maisonpierre P., Belluscio L., Squinto S., Ip N., Furth M., Lindsay R., Yancopoulos G. « Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF ». *Science* [En ligne]. 23 mars 1990. Vol. 247, n°4949, p. 1446-1451. Disponible sur : <https://doi.org/10.1126/science.2321006>

Mang G. M., Nicod J., Emmenegger Y., Donohue K. D., O'Hara B. F., Franken P. « Evaluation of a piezoelectric system as an alternative to electroencephalogram/electromyogram recordings in mouse sleep studies ». *Sleep* [En ligne]. 2014. Vol. 37, n°8, p. 1383-1392. Disponible sur : <https://doi.org/10.5665/sleep.3936>

Mantz J., Cordier J., Giaume C. « Effects of General Anesthetics on Intercellular Communications Mediated by Gap Junctions between Astrocytes in Primary Culture ». *Anesthesiology* [En ligne]. 1 mai 1993. Vol. 78, n°5, p. 892-901. Disponible sur : <https://doi.org/10.1097/00000542-199305000-00014>

Marcheva B., Ramsey K. M., Peek C. B., Affinati A., Maury E., Bass J. « Circadian Clocks and Metabolism ». In : Kramer A, Mrosovsky M (éd.). *Circadian Clocks* [En ligne]. Berlin,

Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 2013. p. 127-155. Disponible sur : https://doi.org/10.1007/978-3-642-25950-0_6 (consulté le 30 mars 2023) ISBN : 978-3-642-25949-4.

Marshall L., Born J. « The contribution of sleep to hippocampus-dependent memory consolidation ». *Trends in Cognitive Sciences* [En ligne]. octobre 2007. Vol. 11, n°10, p. 442-450. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.tics.2007.09.001>

Martineau M., Shi T., Puyal J., Knolhoff A. M., Dulong J., Gasnier B., Klingauf J., Sweedler J. V., Jahn R., Mothet J.-P. « Storage and Uptake of d-Serine into Astrocytic Synaptic-Like Vesicles Specify Gliotransmission ». *J. Neurosci.* [En ligne]. 20 février 2013. Vol. 33, n°8, p. 3413-3423. Disponible sur : <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3497-12.2013>

Martinez-Gonzalez D., Lesku J. A., Rattenborg N. C. « Increased EEG spectral power density during sleep following short-term sleep deprivation in pigeons (*Columba livia*): evidence for avian sleep homeostasis ». *J Sleep Res* [En ligne]. juin 2008. Vol. 17, n°2, p. 140-153. Disponible sur : <https://doi.org/10.1111/j.1365-2869.2008.00636.x>

Martinowich K., Schloesser R. J., Jimenez D. V., Weinberger D. R., Lu B. « Activity-dependent brain-derived neurotrophic factor expression regulates cortistatin-interneurons and sleep behavior ». *Mol Brain* [En ligne]. décembre 2011. Vol. 4, n°1, p. 11. Disponible sur : <https://doi.org/10.1186/1756-6606-4-11>

Mathiisen T. M., Lehre K. P., Danbolt N. C., Ottersen O. P. « The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: An electron microscopic 3D reconstruction ». *GLIA* [En ligne]. juillet 2010. Vol. 58, n°9, p. 1094-1103. Disponible sur : <https://doi.org/10.1002/glia.20990>

McGinty D. J., Serman M. B. « Sleep Suppression after Basal Forebrain Lesions in the Cat ». *Science* [En ligne]. 14 juin 1968. Vol. 160, n°3833, p. 1253-1255. Disponible sur : <https://doi.org/10.1126/science.160.3833.1253>

Melone M., Ciappelloni S., Conti F. « Plasma membrane transporters GAT-1 and GAT-3 contribute to heterogeneity of GABAergic synapses in neocortex ». *Front. Neuroanat.* [En ligne]. 25 juillet 2014. Vol. 8,. Disponible sur : <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00072> (consulté le 20 mars 2023)

Mercader J. M., Fernández-Aranda F., Gratacòs M., Ribasés M., Badía A., Villarejo C., Solano R., González J. R., Vallejo J., Estivill X. « Blood Levels of Brain-Derived Neurotrophic Factor Correlate with Several Psychopathological Symptoms in Anorexia Nervosa Patients ». *Neuropsychobiology* [En ligne]. 2007. Vol. 56, n°4, p. 185-190. Disponible sur : <https://doi.org/10.1159/000120623>

Meunier C., Wang N., Yi C., Dallerac G., Ezan P., Koulakoff A., Leybaert L., Giaume C. « Contribution of astroglial Cx43 hemichannels to the modulation of glutamatergic currents by D-serine in the mouse prefrontal cortex ». *The Journal of Neuroscience* [En ligne]. 2017. p. 2204-16. Disponible sur : <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2204-16.2017>

Mignot E. « Why We Sleep: The Temporal Organization of Recovery ». *PLoS Biol* [En ligne]. 29 avril 2008. Vol. 6, n°4, p. e106. Disponible sur : <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060106>

- Min R., Santello M., Nevian T. « The computational power of astrocyte mediated synaptic plasticity ». *Frontiers in Computational Neuroscience* [En ligne]. 2012. Vol. 6, n°November, p. 1-15. Disponible sur : <https://doi.org/10.3389/fncom.2012.00093>
- Minelli A., DeBiasi S., Brecha N. C., Vitellaro Zuccarello L., Conti F. « GAT-3, a High-Affinity GABA Plasma Membrane Transporter, Is Localized to Astrocytic Processes, and It Is Not Confined to the Vicinity of GABAergic Synapses in the Cerebral Cortex ». *J. Neurosci.* [En ligne]. 1 octobre 1996. Vol. 16, n°19, p. 6255-6264. Disponible sur : <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-19-06255.1996>
- Minichiello L. « TrkB signalling pathways in LTP and learning ». *Nat Rev Neurosci* [En ligne]. décembre 2009. Vol. 10, n°12, p. 850-860. Disponible sur : <https://doi.org/10.1038/nrn2738>
- Mizoguchi A., Eguchi N., Kimura K., Kiyohara Y., Qu W.-M., Huang Z.-L., Mochizuki T., Lazarus M., Kobayashi T., Kaneko T., Narumiya S., Urade Y., Hayaishi O. « Dominant localization of prostaglandin D receptors on arachnoid trabecular cells in mouse basal forebrain and their involvement in the regulation of non-rapid eye movement sleep ». *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* [En ligne]. 25 septembre 2001. Vol. 98, n°20, p. 11674-11679. Disponible sur : <https://doi.org/10.1073/pnas.201398898>
- Mizoguchi H., Nakade J., Tachibana M., Ibi D., Someya E., Koike H., Kamei H., Nabeshima T., Itohara S., Takuma K., Sawada M., Sato J., Yamada K. « Matrix Metalloproteinase-9 Contributes to Kindled Seizure Development in Pentylentetrazole-Treated Mice by Converting Pro-BDNF to Mature BDNF in the Hippocampus ». *Journal of Neuroscience* [En ligne]. 7 septembre 2011. Vol. 31, n°36, p. 12963-12971. Disponible sur : <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3118-11.2011>
- Mölle M., Eschenko O., Gais S., Sara S. J., Born J. « The influence of learning on sleep slow oscillations and associated spindles and ripples in humans and rats ». *European Journal of Neuroscience* [En ligne]. mars 2009. Vol. 29, n°5, p. 1071-1081. Disponible sur : <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06654.x>
- Montana V., Malarkey E. B., Verderio C., Matteoli M., Parpura V. « Vesicular transmitter release from astrocytes ». *Glia* [En ligne]. 15 novembre 2006. Vol. 54, n°7, p. 700-715. Disponible sur : <https://doi.org/10.1002/glia.20367>
- Morrison S. F. « Central neural control of thermoregulation and brown adipose tissue ». *Autonomic Neuroscience* [En ligne]. avril 2016. Vol. 196, p. 14-24. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2016.02.010>
- Mowla S. J., Farhadi H. F., Pareek S., Atwal J. K., Morris S. J., Seidah N. G., Murphy R. A. « Biosynthesis and Post-translational Processing of the Precursor to Brain-derived Neurotrophic Factor ». *Journal of Biological Chemistry* [En ligne]. 20 avril 2001. Vol. 276, n°16, p. 12660-12666. Disponible sur : <https://doi.org/10.1074/jbc.M008104200>
- Nadjar A., Blutstein T., Aubert A., Laye S., Haydon P. G. « Astrocyte-derived adenosine modulates increased sleep pressure during inflammatory response: Astrocytes Mediate Somnogenic Effects of LPS ». *Glia* [En ligne]. mai 2013. Vol. 61, n°5, p. 724-731. Disponible sur : <https://doi.org/10.1002/glia.22465>
- Nagelhus E. A., Mathiesen T. M., Ottersen O. P. « Aquaporin-4 in the central nervous system: Cellular and subcellular distribution and coexpression with KIR4.1 ». *Neuroscience* [En

ligne]. janvier 2004. Vol. 129, n°4, p. 905-913. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.08.053>

Nagy J. I., Dudek F. E., Rash J. E. « Update on connexins and gap junctions in neurons and glia in the mammalian nervous system ». *Brain Research Reviews* [En ligne]. 2004. Vol. 47, n°1-3, p. 191-215. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.05.005>

Nagy J. I., Li X., Rempel J., Stelmack G., Patel D., Staines W. A., Yasumura T., Rash J. E. « Connexin26 in adult rodent central nervous system: Demonstration at astrocytic gap junctions and colocalization with connexin30 and connexin43 ». *Journal of Comparative Neurology* [En ligne]. décembre 2001. Vol. 441, n°4, p. 302-323. Disponible sur : <https://doi.org/10.1002/cne.1414>

Nagy J. I., Lynn B. D., Tress O., Willecke K., Rash J. E. « Connexin26 expression in brain parenchymal cells demonstrated by targeted connexin ablation in transgenic mice: Cx26 in subcortical astrocytes ». *European Journal of Neuroscience* [En ligne]. juillet 2011. Vol. 34, n°2, p. 263-271. Disponible sur : <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07741.x>

Naidoo N., Giang W., Galante R. J., Pack A. I. « Sleep deprivation induces the unfolded protein response in mouse cerebral cortex: UPR induction following sleep deprivation ». *Journal of Neurochemistry* [En ligne]. 4 février 2005. Vol. 92, n°5, p. 1150-1157. Disponible sur : <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02952.x>

Nauta W. J. H. « Hypothalamic regulation of sleep in rats; an experimental study ». *J. Neurophysiol.* 1946. Vol. 9, p. 285-316.

Navarrete M., Araque A. « Endocannabinoids potentiate synaptic transmission through stimulation of astrocytes ». *Neuron* [En ligne]. octobre 2010. Vol. 68, n°1, p. 113-126. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.08.043>

Navarrete M., Perea G., De Sevilla D. F., Gómez-Gonzalo M., Núñez A., Martín E. D., Araque A. « Astrocytes mediate in vivo cholinergic-induced synaptic plasticity ». *PLoS Biology* [En ligne]. février 2012. Vol. 10, n°2,. Disponible sur : <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001259>

Nedergaard M., Verkhratsky A. « Artifact versus reality-How astrocytes contribute to synaptic events ». *Glia* [En ligne]. juillet 2012. Vol. 60, n°7, p. 1013-1023. Disponible sur : <https://doi.org/10.1002/glia.22288>

Nolte C., Matyash M., Pivneva T., Schipke C. G., Ohlemeyer C., Hanisch U. K., Kirchhoff F., Kettenmann H. « GFAP promoter-controlled EGFP-expressing transgenic mice: A tool to visualize astrocytes and astrogliosis in living brain tissue ». *GLIA* [En ligne]. 2001. Vol. 33, n°1, p. 72-86. Disponible sur : [https://doi.org/10.1002/1098-1136\(20010101\)33:1<72::AID-GLIA1007>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/1098-1136(20010101)33:1<72::AID-GLIA1007>3.0.CO;2-A)

Numakawa T., Suzuki S., Kumamaru E., Adachi N., Richards M., Kunugi H. « BDNF function and intracellular signaling in neurons ». *Histology and Histopathology* [En ligne]. 2010. n°25, p. 237-258. Disponible sur : <https://doi.org/10.14670/HH-25.237>

Oberheim N. A., Wang X., Goldman S., Nedergaard M. « Astrocytic complexity distinguishes the human brain ». *Trends in Neurosciences* [En ligne]. 2006. Vol. 29, n°10, p. 547-553. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.tins.2006.08.004>

Occhipinti R., Somersalo E., Calvetti D. « Energetics of Inhibition: Insights with a Computational Model of the Human GABAergic Neuron–Astrocyte Cellular Complex ». *J Cereb Blood Flow Metab* [En ligne]. novembre 2010. Vol. 30, n°11, p. 1834-1846. Disponible sur : <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2010.107>

Ogata K., Kosaka T. « Structural and quantitative analysis of astrocytes in the mouse hippocampus ». *Neuroscience* [En ligne]. août 2002. Vol. 113, n°1, p. 221-233. Disponible sur : [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(02\)00041-6](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00041-6)

Ohira K., Funatsu N., Homma K. J., Sahara Y., Hayashi M., Kaneko T., Nakamura S. « Truncated TrkB-T1 regulates the morphology of neocortical layer I astrocytes in adult rat brain slices: T1 controls astrocytic morphology in acute slices ». *European Journal of Neuroscience* [En ligne]. janvier 2007. Vol. 25, n°2, p. 406-416. Disponible sur : <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05282.x>

Ohira K., Hayashi M. « Expression of TrkB subtypes in the adult monkey cerebellar cortex ». *Journal of Chemical Neuroanatomy* [En ligne]. mars 2003. Vol. 25, n°3, p. 175-183. Disponible sur : [https://doi.org/10.1016/S0891-0618\(02\)00096-0](https://doi.org/10.1016/S0891-0618(02)00096-0)

Ohira K., Kumanogoh H., Sahara Y., Homma K. J., Hirai H., Nakamura S., Hayashi M. « A Truncated Tropo-Myosine-Related Kinase B Receptor, T1, Regulates Glial Cell Morphology via Rho GDP Dissociation Inhibitor 1 ». *J. Neurosci.* [En ligne]. 9 février 2005. Vol. 25, n°6, p. 1343-1353. Disponible sur : <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4436-04.2005>

Ohira K., Shimizu K., Hayashi M. « TrkB dimerization during development of the prefrontal cortex of the macaque ». *J. Neurosci. Res.* [En ligne]. 1 septembre 2001. Vol. 65, n°5, p. 463-469. Disponible sur : <https://doi.org/10.1002/jnr.1175>

Ohta H., Yamazaki S., McMahon D. G. « Constant light desynchronizes mammalian clock neurons ». *Nat Neurosci* [En ligne]. mars 2005. Vol. 8, n°3, p. 267-269. Disponible sur : <https://doi.org/10.1038/nn1395>

Oikonomou G., Shaham S. « The glia of caenorhabditis elegans ». *GLIA* [En ligne]. septembre 2011. Vol. 59, n°9, p. 1253-1263. Disponible sur : <https://doi.org/10.1002/glia.21084>

Olk S., Turchinovich A., Grzendowski M., Stühler K., Meyer H. E., Zoidl G., Dermietzel R. « Proteomic analysis of astroglial connexin43 silencing uncovers a cytoskeletal platform involved in process formation and migration ». *GLIA* [En ligne]. mars 2010. Vol. 58, n°4, p. 494-505. Disponible sur : <https://doi.org/10.1002/glia.20942>

Olsen M. L., Sontheimer H. « Functional implications for Kir4.1 channels in glial biology: from K⁺ buffering to cell differentiation ». *Journal of Neurochemistry* [En ligne]. novembre 2008. Vol. 107, n°3, p. 589-601. Disponible sur : <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05615.x>

Onoe H., Ueno R., Fujita I., Nishino H., Oomura Y., Hayaishi O. « Prostaglandin D₂, a cerebral sleep-inducing substance in monkeys. » *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* [En ligne]. juin 1988. Vol. 85, n°11, p. 4082-4086. Disponible sur : <https://doi.org/10.1073/pnas.85.11.4082>

Orellana J. A., Sáez P. J., Cortés-campos C., Elizondo R. J., Shoji K. F., Contreras-Duarte S., Figueroa V., Velarde V., Jiang J. X., Nualart F., Sáez J. C., García M. A. « Glucose increases intracellular free Ca²⁺ in tanycytes via ATP released through connexin 43

hemichannels ». *GLIA* [En ligne]. janvier 2012. Vol. 60, n°1, p. 53-68. Disponible sur : <https://doi.org/10.1002/glia.21246>

Orellana J. A., Sáez P. J., Shoji K. F., Schalper K. A., Palacios-Prado N., Velarde V., Giaume C., Bennett M. V. L., Sáez J. C. *Modulation of brain hemichannels and gap junction channels by pro-inflammatory agents and their possible role in neurodegeneration* [En ligne]. *Antioxidants and Redox Signaling*. février 2009. Vol. 11, n°2, p. 369-399. Disponible sur : <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2130>

Orkand R. K., Cohen M. W., Tang C.-M. « Electrogenic pumps in axons and neuroglia and extracellular potassium homeostasis ». *Brain Research* [En ligne]. juillet 1980. Vol. 194, n°1, p. 283-286. Disponible sur : [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(80\)91345-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(80)91345-1)

Orkand R. K., Nicholls J. G., Kuffler S. W. « Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia. » *Journal of Neurophysiology* [En ligne]. juillet 1966. Vol. 29, n°4, p. 788-806. Disponible sur : <https://doi.org/10.1152/jn.1966.29.4.788>

Palva S., Palva J. M. « New vistas for α -frequency band oscillations ». *Trends in Neurosciences* [En ligne]. avril 2007. Vol. 30, n°4, p. 150-158. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.02.001>

Panatier A., Vallée J., Haber M., Murai K. K., Lacaille J.-C., Robitaille R. « Astrocytes Are Endogenous Regulators of Basal Transmission at Central Synapses ». *Cell* [En ligne]. septembre 2011. Vol. 146, n°5, p. 785-798. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.022>

Pang P. T., Teng H. K., Zaitsev E., Woo N. T., Sakata K., Zhen S., Teng K. K., Yung W.-H., Hempstead B. L., Lu B. « Cleavage of proBDNF by tPA/Plasmin Is Essential for Long-Term Hippocampal Plasticity ». *Science* [En ligne]. 15 octobre 2004. Vol. 306, n°5695, p. 487-491. Disponible sur : <https://doi.org/10.1126/science.1100135>

Pannasch U., Derangeon M., Chever O., Rouach N. « Astroglial gap junctions shape neuronal network activity ». *Communicative & Integrative Biology* [En ligne]. 2012. Vol. 5, n°3, p. 248-254. Disponible sur : <https://doi.org/10.4161/cam.20753>

Pannasch U., Freche D., Dallérac G., Ghézali G., Escartin C., Ezan P., Cohen-Salmon M., Benchenane K., Abudara V., Dufour A., Lübke J. H. R., Déglon N., Knott G., Holcman D., Rouach N. « Connexin 30 sets synaptic strength by controlling astroglial synapse invasion. » *Nature neuroscience* [En ligne]. 2014. Vol. 17, n°4, p. 549-58. Disponible sur : <https://doi.org/10.1038/nn.3662>

Pannasch U., Rouach N. *Emerging role for astroglial networks in information processing: From synapse to behavior* [En ligne]. *Trends in Neurosciences*. 2013a. Vol. 36, n°7, p. 405-417. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.04.004>

Pannasch U., Rouach N. « Emerging role for astroglial networks in information processing: From synapse to behavior ». *Trends in Neurosciences* [En ligne]. 2013b. Vol. 36, n°7, p. 405-417. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.04.004>

Pannasch U., Vargová L., Reingruber J., Ezan P., Holcman D., Giaume C., Syková E., Rouach N. « Astroglial networks scale synaptic activity and plasticity. » *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America [En ligne]. 2011a. Vol. 108, n°20, p. 8467-8472. Disponible sur : <https://doi.org/10.1073/pnas.1016650108>

Pannasch U., Vargova L., Reingruber J., Ezan P., Holcman D., Giaume C., Sykova E., Rouach N. « Astroglial networks scale synaptic activity and plasticity ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* [En ligne]. 2011b. Vol. 108, n°20, p. 8467-8472. Disponible sur : <https://doi.org/10.1073/pnas.1016650108>

Parpura V., Basarsky T. A., Liu F., Jeftinija K., Jeftinija S., Haydon P. G. « Glutamate-mediated astrocyte–neuron signalling ». *Nature* [En ligne]. juin 1994. Vol. 369, n°6483, p. 744-747. Disponible sur : <https://doi.org/10.1038/369744a0>

Parpura V., Verkhratsky A. « Homeostatic function of astrocytes: Ca²⁺ and Na⁺ signaling ». *Translational Neuroscience* [En ligne]. 1 janvier 2012. Vol. 3, n°4,. Disponible sur : <https://doi.org/10.2478/s13380-012-0040-y> (consulté le 20 mars 2023)

Parpura V., Zorec R. « Gliotransmission: Exocytotic release from astrocytes ». *Brain Research Reviews* [En ligne]. mai 2010. Vol. 63, n°1-2, p. 83-92. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2009.11.008>

Pascual O., Casper K. B., Kubera C., Zhang J., Revilla-Sanchez R., Sul J.-Y., Takano H., Moss S. J., McCarthy K., Haydon P. G. « Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. » *Science (New York, N.Y.)* [En ligne]. 7 octobre 2005a. Vol. 310, n°5745, p. 113-6. Disponible sur : <https://doi.org/10.1126/science.1116916>

Pascual O., Casper K. B., Kubera C., Zhang J., Revilla-Sanchez R., Sul J.-Y., Takano H., Moss S. J., McCarthy K., Haydon P. G. « Astrocytic Purinergic Signaling Coordinates Synaptic Networks ». *Science* [En ligne]. 7 octobre 2005b. Vol. 310, n°5745, p. 113-116. Disponible sur : <https://doi.org/10.1126/science.1116916>

Pedersen N. P., Ferrari L., Venner A., Wang J. L., Abbott S. B. G., Vujovic N., Arrigoni E., Saper C. B., Fuller P. M. « Supramammillary glutamate neurons are a key node of the arousal system ». *Nat Commun* [En ligne]. 10 novembre 2017. Vol. 8, n°1, p. 1405. Disponible sur : <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01004-6>

Pedrinio G. R., Monaco L. R., Cravo S. L. « Renal vasodilation induced by hypernatraemia: Role of α -adrenoceptors in the median preoptic nucleus ». *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* [En ligne]. décembre 2009. Vol. 36, n°12, p. e83-e89. Disponible sur : <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2009.05280.x>

Pelluru D., Konadhode R. R., Bhat N. R., Shiromani P. J. « Optogenetic stimulation of astrocytes in the posterior hypothalamus increases sleep at night in C57 BL /6J mice ». *Eur J Neurosci* [En ligne]. mai 2016. Vol. 43, n°10, p. 1298-1306. Disponible sur : <https://doi.org/10.1111/ejn.13074>

Perea G., Araque A. « Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses ». *Science* [En ligne]. août 2007. Vol. 317, n°5841, p. 1083-1086. Disponible sur : <https://doi.org/10.1126/science.1144640>

Peretti D., Bastide A., Radford H., Verity N., Molloy C., Martin M. G., Moreno J. A., Steinert J. R., Smith T., Dinsdale D., Willis A. E., Mallucci G. R. « RBM3 mediates structural plasticity and protective effects of cooling in neurodegeneration ». *Nature* [En ligne]. 12 février 2015. Vol. 518, n°7538, p. 236-239. Disponible sur : <https://doi.org/10.1038/nature14142>

- Petryshen T. L., Sabeti P. C., Aldinger K. A., Fry B., Fan J. B., Schaffner S. F., Waggoner S. G., Tahl A. R., Sklar P. « Population genetic study of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene ». *Mol Psychiatry* [En ligne]. août 2010. Vol. 15, n°8, p. 810-815. Disponible sur : <https://doi.org/10.1038/mp.2009.24>
- Plihal W., Born J. « Effects of early and late nocturnal sleep on priming and spatial memory ». *Psychophysiology* [En ligne]. septembre 1999. Vol. 36, n°5, p. 571-582. Disponible sur : <https://doi.org/10.1111/1469-8986.3650571>
- Porkka-Heiskanen T., Kalinchuk A. V. « Adenosine, energy metabolism and sleep homeostasis ». *Sleep Medicine Reviews* [En ligne]. avril 2011. Vol. 15, n°2, p. 123-135. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.smr.2010.06.005>
- Porkka-Heiskanen T., Strecker R. E., Thakkar M., Bjørkum A. A., Greene R. W., McCarley R. W. « Adenosine: A Mediator of the Sleep-Inducing Effects of Prolonged Wakefulness ». *Science* [En ligne]. 23 mai 1997. Vol. 276, n°5316, p. 1265-1268. Disponible sur : <https://doi.org/10.1126/science.276.5316.1265>
- Porter J. T., McCarthy K. D. « Hippocampal Astrocytes *In Situ* Respond to Glutamate Released from Synaptic Terminals ». *J. Neurosci.* [En ligne]. 15 août 1996. Vol. 16, n°16, p. 5073-5081. Disponible sur : <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-16-05073.1996>
- Poskanzer K. E., Yuste R. « Astrocytes regulate cortical state switching in vivo. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [En ligne]. 2016a. Vol. 2016, p. 1-10. Disponible sur : <https://doi.org/10.1073/pnas.1520759113>
- Poskanzer K. E., Yuste R. *Astrocytic regulation of cortical UP states* [En ligne]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011. Vol. 108, n°45, p. 18453-18458. Disponible sur : <https://doi.org/10.1073/pnas.1112378108>
- Poskanzer K. E., Yuste R. « Astrocytes regulate cortical state switching in vivo. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [En ligne]. 2016b. Vol. 2016, p. 1-10. Disponible sur : <https://doi.org/10.1073/pnas.1520759113>
- Possidente B., Birnbaum S. « Circadian rhythms for food and water consumption in the mouse, *Mus musculus* ». *Physiology & Behavior* [En ligne]. avril 1979. Vol. 22, n°4, p. 657-660. Disponible sur : [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(79\)90226-9](https://doi.org/10.1016/0031-9384(79)90226-9)
- Pruunsild P., Kazantseva A., Aid T., Palm K., Timmusk T. « Dissecting the human BDNF locus: Bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters ». *Genomics* [En ligne]. septembre 2007. Vol. 90, n°3, p. 397-406. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2007.05.004>
- Ram A., Pandey H. P., Matsumura H., Kasahara-Orita K., Nakajima T., Takahata R., Satoh S., Terao A., Hayaishi O. « CSF levels of prostaglandins, especially the level of prostaglandin D2, are correlated with increasing propensity towards sleep in rats ». *Brain Research* [En ligne]. mars 1997. Vol. 751, n°1, p. 81-89. Disponible sur : [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(96\)01401-1](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(96)01401-1)
- Rasch B., Born J. « About Sleep's Role in Memory ». *Physiological Reviews* [En ligne]. avril 2013. Vol. 93, n°2, p. 681-766. Disponible sur : <https://doi.org/10.1152/physrev.00032.2012>

- Rash J. E., Yasumura T., Dudek F. E., Nagy J. I. « Cell-Specific Expression of Connexins and Evidence of Restricted Gap Junctional Coupling between Glial Cells and between Neurons ». *J. Neurosci.* [En ligne]. 15 mars 2001. Vol. 21, n°6, p. 1983-2000. Disponible sur : <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-06-01983.2001>
- Rauen T., Rothstein J. D., Wässle H. « Differential expression of three glutamate transporter subtypes in the rat retina ». *Cell and Tissue Research* [En ligne]. 28 novembre 1996. Vol. 286, n°3, p. 325-336. Disponible sur : <https://doi.org/10.1007/s004410050702>
- Reichardt L. F. « Neurotrophin-regulated signalling pathways ». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* [En ligne]. 29 septembre 2006. Vol. 361, n°1473, p. 1545-1564. Disponible sur : <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1894>
- Reichenbach A., Derouiche A., Kirchhoff F. *Morphology and dynamics of perisynaptic glia* [En ligne]. *Brain Research Reviews*. mai 2010. Vol. 63, n°1-2, p. 11-25. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2010.02.003>
- Richardson G. S., Moore-Ede M. C., Czeisler C. A., Dement W. C. « Circadian rhythms of sleep and wakefulness in mice: analysis using long-term automated recording of sleep ». *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* [En ligne]. 1 mars 1985. Vol. 248, n°3, p. R320-R330. Disponible sur : <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1985.248.3.R320>
- Robertson E. M., Pascual-Leone A., Press D. Z. « Awareness Modifies the Skill-Learning Benefits of Sleep ». *Current Biology* [En ligne]. février 2004. Vol. 14, n°3, p. 208-212. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.01.027>
- Rose C. R., Blum R., Pichler B., Lepier A., Kafitz K. W., Konnerth A. « Truncated TrkB-T1 mediates neurotrophin-evoked calcium signalling in glia cells ». 2003. Vol. 426,.
- Rosenthal A., Goeddel D. V., Nguyen T., Martin E., Burton L. E., Shih A., Laramée G. R., Wurm F., Mason A., Nikolics K., Winslow J. W. « Primary Structure and Biological Activity of Human Brain-Derived Neurotrophic Factor ». *Endocrinology* [En ligne]. septembre 1991. Vol. 129, n°3, p. 1289-1294. Disponible sur : <https://doi.org/10.1210/endo-129-3-1289>
- Rostaing P., Weimer R. M., Jorgensen E. M., Triller A., Bessereau J.-L. « Preservation of Immunoreactivity and Fine Structure of Adult *C. elegans* Tissues Using High-pressure Freezing ». *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* [En ligne]. 2004. Vol. 52, n°1, p. 1-12. Disponible sur : <https://doi.org/10.1177/002215540405200101>
- Roth T. « Slow Wave Sleep: Does it Matter? ». *Acta Neurobiologiae Experimentalis*. 2009. Vol. 68, n°2 Suppl, p. S4-S5.
- Rouach N., Avignone E., Mème W., Koulakoff A., Venance L., Blomstrand F., Giaume C. *Gap junctions and connexin expression in the normal and pathological central nervous system* [En ligne]. *Biology of the Cell*. novembre 2002. Vol. 94, n°7-8, p. 457-475. Disponible sur : [https://doi.org/10.1016/S0248-4900\(02\)00016-3](https://doi.org/10.1016/S0248-4900(02)00016-3)
- Rouach N., Koulakoff A., Abudara V., Willecke K., Giaume C. « Astroglial Metabolic Networks Sustain Hippocampal Synaptic Transmission ». *Science*. 2008. Vol. 322, n°December, p. 1551-1555.
- Rozental R., Srinivas M., Spray D. C. « How to Close a Gap Junction Channel: Efficacies and Potencies of Uncoupling Agents ». In : *Connexin Methods and Protocols* [En ligne]. New

Jersey : Humana Press, 2000. p. 447-476. Disponible sur : <https://doi.org/10.1385/1-59259-043-8:447> (consulté le 22 mars 2023) ISBN : 978-1-59259-043-8.

Rutecki P. « Neuronal excitability: voltage-dependent currents and synaptic transmission ». *J Clin Neurophysiol.* 1992. n°9, p. 195-211.

Saarelainen T., Lukkarinen J. A., Koponen S., Gröhn O. H. J., Jolkkonen J., Koponen E., Haapasalo A., Alhonen L., Wong G., Koistinaho J., Kauppinen R. A., Castrén E. « Transgenic Mice Overexpressing Truncated trkB Neurotrophin Receptors in Neurons Show Increased Susceptibility to Cortical Injury after Focal Cerebral Ischemia ». *Molecular and Cellular Neuroscience* [En ligne]. août 2000. Vol. 16, n°2, p. 87-96. Disponible sur : <https://doi.org/10.1006/mcne.2000.0863>

Sáez J. C., Berthoud V. M., Brañes M. C., Martínez A. D., Beyer E. C. *Plasma membrane channels formed by connexins: Their regulation and functions* [En ligne]. *Physiological Reviews.* 2003. Vol. 83, n°4, p. 1359-1400. Disponible sur : <https://doi.org/10.1152/physrev.00007.2003>

Sánchez-García S., Moreno-Tamayo K., Ramírez-Aldana R., García-Peña C., Medina-Campos R. H., García Dela Torre P., Rivero-Segura N. A. « Insomnia Impairs Both the Pro-BDNF and the BDNF Levels Similarly to Older Adults with Cognitive Decline: An Exploratory Study ». *IJMS* [En ligne]. 17 avril 2023. Vol. 24, n°8, p. 7387. Disponible sur : <https://doi.org/10.3390/ijms24087387>

Sangare A., Dubourget R., Geoffroy H., Gallopin T., Rancillac A. « Serotonin differentially modulates excitatory and inhibitory synaptic inputs to putative sleep-promoting neurons of the ventrolateral preoptic nucleus ». *Neuropharmacology* [En ligne]. 2016. Vol. 109, p. 29-40. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.05.015>

Santello M., Cali C., Bezzi P. « Gliotransmission and the tripartite synapse ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* [En ligne]. 2012. Vol. 970, p. 307-331. Disponible sur : https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0932-8_14

Santos J., Araújo J., Cunha M., Costa S., Barbosa A., Mesquita J., Costa M. « Circadian variation in GFAP immunoreactivity in the mouse suprachiasmatic nucleus ». *Biological Rhythm Research* [En ligne]. février 2005. Vol. 36, n°1-2, p. 141-150. Disponible sur : <https://doi.org/10.1080/09291010400028906>

Saper C. B. « The intermediate nucleus in humans: Cytoarchitecture, chemoarchitecture, and relation to sleep, sex, and Alzheimer disease ». In : *Handbook of Clinical Neurology* [En ligne]. [s.l.] : Elsevier, 2021. p. 461-469. Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128199756000303?via%3Dihub> ISBN : 10.1016/B978-0-12-819975-6.00030-3.

Saper C. B., Chou T. C., Scammell T. E. « The sleep switch: hypothalamic control of sleep and wakefulness. » *Trends in neurosciences.* décembre 2001. Vol. 24, n°12, p. 726-31.

Saper C. B., Fuller P. M. « Wake-sleep circuitry: an overview ». *Current Opinion in Neurobiology* [En ligne]. juin 2017. Vol. 44, p. 186-192. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.03.021>

- Saper C. B., Fuller P. M., Pedersen N. P., Lu J., Scammell T. E. « Sleep State Switching ». *Neuron* [En ligne]. 2010. Vol. 68, n°6, p. 1023-1042. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.032>. Sleep
- Saper C. B., Romanovsky A. A., Scammell T. E. « Neural circuitry engaged by prostaglandins during the sickness syndrome ». *Nat Neurosci* [En ligne]. août 2012. Vol. 15, n°8, p. 1088-1095. Disponible sur : <https://doi.org/10.1038/nn.3159>
- Sarantis M., Everett K., Attwell D. « A presynaptic action of glutamate at the cone output synapse ». *Nature* [En ligne]. 1988. Vol. 332, n°6163, p. 451-453. Disponible sur : <https://doi.org/10.1038/332451a0>
- Sarsour K., Morin C. M., Foley K., Kalsekar A., Walsh J. K. « Association of insomnia severity and comorbid medical and psychiatric disorders in a health plan-based sample: Insomnia severity and comorbidities ». *Sleep Medicine* [En ligne]. 2010. Vol. 11, n°1, p. 69-74. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2009.02.008>
- Sasi M., Vignoli B., Canossa M., Blum R. « Neurobiology of local and intercellular BDNF signaling ». *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* [En ligne]. juin 2017. Vol. 469, n°5-6, p. 593-610. Disponible sur : <https://doi.org/10.1007/s00424-017-1964-4>
- Savtchouk I., Volterra A. « Gliotransmission: Beyond black-and-white ». *Journal of Neuroscience* [En ligne]. 2018. Vol. 38, n°1, p. 14-25. Disponible sur : <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0017-17.2017>
- Sawada K., Echigo N., Juge N., Miyaji T., Otsuka M., Omote H., Yamamoto A., Moriyama Y. « Identification of a vesicular nucleotide transporter ». *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* [En ligne]. 15 avril 2008. Vol. 105, n°15, p. 5683-5686. Disponible sur : <https://doi.org/10.1073/pnas.0800141105>
- Scammell T. E., Arrigoni E., Lipton J. O. « Neural Circuitry of Wakefulness and Sleep ». *Neuron* [En ligne]. février 2017. Vol. 93, n°4, p. 747-765. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.01.014>
- Scammell T. E., Gerashchenko D. Y., Mochizuki T., McCarthy M. T., Estabrooke I. V., Sears C. A., Saper C. B., Urade Y., Hayaishi O. « An adenosine A2a agonist increases sleep and induces Fos in ventrolateral preoptic neurons ». *Neuroscience* [En ligne]. novembre 2001. Vol. 107, n°4, p. 653-663. Disponible sur : [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(01\)00383-9](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(01)00383-9)
- Scammell T., Gerashchenko D., Urade Y., Onoe H., Saper C., Hayaishi O. « Activation of ventrolateral preoptic neurons by the somnogen prostaglandin D₂ ». *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* [En ligne]. 23 juin 1998. Vol. 95, n°13, p. 7754-7759. Disponible sur : <https://doi.org/10.1073/pnas.95.13.7754>
- Scemes E., Giaume C. « Astrocyte calcium waves: What they are and what they do ». *Glia* [En ligne]. 15 novembre 2006. Vol. 54, n°7, p. 716-725. Disponible sur : <https://doi.org/10.1002/glia.20374>
- Schaaf M. J. M., Durland R., De Kloet E. R., Vreugdenhil E. « Circadian variation in BDNF mRNA expression in the rat hippocampus ». *Molecular Brain Research* [En ligne]. février 2000. Vol. 75, n°2, p. 342-344. Disponible sur : [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(99\)00314-9](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(99)00314-9)

- Scharbarg E., Daenens M., Lemaître F., Geoffroy H., Guille-Collignon M., Gallopin T., Rancillac A. « Astrocyte-derived adenosine is central to the hypnogenic effect of glucose ». *Scientific Reports* [En ligne]. 2016. Vol. 6, p. 0-14. Disponible sur : <https://doi.org/10.1038/srep19107>
- Scharbarg E., Walter A., Lecoin L., Gallopin T., Lemaître F., Guille-Collignon M., Rouach N., Rancillac A. « Prostaglandin D₂ Controls Local Blood Flow and Sleep-Promoting Neurons in the VLPO via Astrocyte-Derived Adenosine ». *ACS Chem. Neurosci.* [En ligne]. 15 mars 2023. Vol. 14, n°6, p. 1063-1070. Disponible sur : <https://doi.org/10.1021/acchemneuro.2c00660>
- Scheer F. A. J. L., Czeisler C. A. « Melatonin as a chronobiotic ». *Sleep Medicine Reviews* [En ligne]. février 2005. Vol. 9, n°1, p. 5-9. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.smr.2004.05.002>
- Schmitt L. I., Sims R. E., Dale N., Haydon P. G. « Wakefulness Affects Synaptic and Network Activity by Increasing Extracellular Astrocyte-Derived Adenosine ». *J. Neurosci.* [En ligne]. 28 mars 2012. Vol. 32, n°13, p. 4417-4425. Disponible sur : <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5689-11.2012>
- Schönrock B., Büsselberg D., Haas H. L. « Properties of tuberomammillary histamine neurons and their response to galanin ». *Agents and Actions* [En ligne]. mai 1991. Vol. 33, n°1-2, p. 135-137. Disponible sur : <https://doi.org/10.1007/BF01993148>
- Schools G. P., Zhou M., Kimelberg H. K. « Development of gap junctions in hippocampal astrocytes: Evidence that whole cell electrophysiological phenotype is an intrinsic property of the individual cell ». *Journal of Neurophysiology* [En ligne]. 2006. Vol. 96, n°3, p. 1383-1392. Disponible sur : <https://doi.org/10.1152/jn.00449.2006>
- Schousboe A., Scafidi S., Bak L. K., Waagepetersen H. S., McKenna M. C. « Glutamate Metabolism in the Brain Focusing on Astrocytes ». In : Parpura V, Schousboe A, Verkhratsky A (éd.). *Glutamate and ATP at the Interface of Metabolism and Signaling in the Brain* [En ligne]. Cham : Springer International Publishing, 2014. p. 13-30. Disponible sur : https://doi.org/10.1007/978-3-319-08894-5_2 (consulté le 20 mars 2023) ISBN : 978-3-319-08893-8.
- Schousboe A., Waagepetersen H. S. « GABA: Homeostatic and pharmacological aspects ». In : *Progress in Brain Research* [En ligne]. [s.l.] : Elsevier, 2007. p. 9-19. Disponible sur : [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(06\)60002-2](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(06)60002-2) (consulté le 20 mars 2023) ISBN : 978-0-444-52184-2.
- Schröder M., Kaufman R. J. « THE MAMMALIAN UNFOLDED PROTEIN RESPONSE ». *Annu. Rev. Biochem.* [En ligne]. 1 juin 2005. Vol. 74, n°1, p. 739-789. Disponible sur : <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.074134>
- Schummers J., Yu H., Sur M. « Tuned Responses of Astrocytes and Their Influence on Hemodynamic Signals in the Visual Cortex ». *Science* [En ligne]. 20 juin 2008. Vol. 320, n°5883, p. 1638-1643. Disponible sur : <https://doi.org/10.1126/science.1156120>
- Schütz M., Scimemi P., Majumder P., De Sisti R. D., Crispino G., Rodriguez L., Bortolozzi M., Santarelli R., Seydel A., Sonntag S., Ingham N., Steel K. P., Willecke K., Mammano F. « The human deafness-associated connexin 30 T5M mutation causes mild hearing loss and reduces biochemical coupling among cochlear non-sensory cells in knock-in mice ». *Human*

Molecular Genetics [En ligne]. 15 décembre 2010. Vol. 19, n°24, p. 4759-4773. Disponible sur : <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq402>

Serrano A., Haddjeri N., Lacaille J.-C., Robitaille R. « GABAergic Network Activation of Glial Cells Underlies Hippocampal Heterosynaptic Depression ». *J. Neurosci.* [En ligne]. 17 mai 2006a. Vol. 26, n°20, p. 5370-5382. Disponible sur : <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5255-05.2006>

Serrano A., Haddjeri N., Lacaille J.-C., Robitaille R. « GABAergic network activation of glial cells underlies hippocampal heterosynaptic depression. » *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* [En ligne]. 17 mai 2006b. Vol. 26, n°20, p. 5370-82. Disponible sur : <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5255-05.2006>

Shaw R. M., Fay A. J., Puthenveedu M. A., Von Zastrow M., Jan Y. N., Jan L. Y. « Microtubule Plus-End-Tracking Proteins Target Gap Junctions Directly from the Cell Interior to Adherens Junctions ». *Cell* [En ligne]. février 2007. Vol. 128, n°3, p. 547-560. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.12.037>

Sherin J. E., Elmquist J. K., Torrealba F., Saper C. B. « Innervation of histaminergic tuberomammillary neurons by GABAergic and galaninergic neurons in the ventrolateral preoptic nucleus of the rat ». *J Neurosci.* 1998. Vol. 18, n°12, p. 4705-4721.

Sherin J. E., Shiromani P. J., McCarley R. W., Saper C. B. « Activation of ventrolateral preoptic neurons during sleep. » *Science (New York, N.Y.)*. 12 janvier 1996. Vol. 271, n°5246, p. 216-9.

Sherwood C. C., Stimpson C. D., Raghanti M. A., Wildman D. E., Uddin M., Grossman L. I., Goodman M., Redmond J. C., Bonar C. J., Erwin J. M., Hof P. R. « Evolution of increased glia-neuron ratios in the human frontal cortex ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [En ligne]. septembre 2006. Vol. 103, n°37, p. 13606-13611. Disponible sur : <https://doi.org/10.1073/pnas.0605843103>

Sibson N. R., Shen J., Mason G. F., Rothman D. L., Behar K. L., Shulman R. G. « Functional Energy Metabolism: In vivo ¹³C-NMR Spectroscopy Evidence for Coupling of Cerebral Glucose Consumption and Glutamate Neuronal Activity ». *Dev Neurosci* [En ligne]. 1998. Vol. 20, n°4-5, p. 321-330. Disponible sur : <https://doi.org/10.1159/000017327>

Siracusano L., Girasole V., Alvaro S., Chiavarino N. D. M. « Myocardial preconditioning and cardioprotection by volatile anaesthetics »: *Journal of Cardiovascular Medicine* [En ligne]. février 2006. Vol. 7, n°2, p. 86-95. Disponible sur : <https://doi.org/10.2459/01.JCM.0000199792.32479.ce>

Skowrońska K., Obara-Michlewska M., Zielińska M., Albrecht J. « NMDA Receptors in Astrocytes: In Search for Roles in Neurotransmission and Astrocytic Homeostasis ». *IJMS* [En ligne]. 14 janvier 2019. Vol. 20, n°2, p. 309. Disponible sur : <https://doi.org/10.3390/ijms20020309>

Smith C. « Sleep states and memory processes in humans: procedural versus declarative memory systems ». *Sleep Medicine Reviews* [En ligne]. décembre 2001. Vol. 5, n°6, p. 491-506. Disponible sur : <https://doi.org/10.1053/smr.2001.0164>

- Sofroniew M. V., Vinters H. V. *Astrocytes: Biology and pathology* [En ligne]. *Acta Neuropathologica*. janvier 2010. Vol. 119, n°1, p. 7-35. Disponible sur : <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>
- Somjen G. G. « Ion Regulation in the Brain: Implications for Pathophysiology ». *Neuroscientist* [En ligne]. juin 2002. Vol. 8, n°3, p. 254-267. Disponible sur : <https://doi.org/10.1177/1073858402008003011>
- Sommerfeld M. T., Schweigreiter R., Barde Y.-A., Hoppe E. « Down-regulation of the Neurotrophin Receptor TrkB following Ligand Binding ». *Journal of Biological Chemistry* [En ligne]. mars 2000. Vol. 275, n°12, p. 8982-8990. Disponible sur : <https://doi.org/10.1074/jbc.275.12.8982>
- Spampinato S. F., Copani A., Nicoletti F., Sortino M. A., Caraci F. « Metabotropic Glutamate Receptors in Glial Cells: A New Potential Target for Neuroprotection? ». *Front. Mol. Neurosci.* [En ligne]. 13 novembre 2018. Vol. 11, p. 414. Disponible sur : <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00414>
- Sreedharan S., Shaik J. H., Olszewski P. K., Levine A. S., Schiöth H. B., Fredriksson R. « Glutamate, aspartate and nucleotide transporters in the SLC17 family form four main phylogenetic clusters: evolution and tissue expression ». *BMC Genomics* [En ligne]. décembre 2010. Vol. 11, n°1, p. 17. Disponible sur : <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-17>
- Steinhäuser C., Grunnet M., Carmignoto G. « Crucial role of astrocytes in temporal lobe epilepsy ». *Neuroscience* [En ligne]. mai 2016. Vol. 323, p. 157-169. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.12.047>
- Steriade M. « Grouping of brain rhythms in corticothalamic systems ». *Neuroscience* [En ligne]. 2006. Vol. 137, n°4, p. 1087-1106. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.10.029>
- Steriade M. « Corticothalamic resonance, states of vigilance and mentation ». *Neuroscience* [En ligne]. novembre 2000. Vol. 101, n°2, p. 243-276. Disponible sur : [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(00\)00353-5](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(00)00353-5)
- Stobart J. L., Anderson C. M. « Multifunctional role of astrocytes as gatekeepers of neuronal energy supply ». *Front. Cell. Neurosci.* [En ligne]. 2013. Vol. 7,. Disponible sur : <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00038> (consulté le 21 mars 2023)
- Su Y. T., Gu M. Y., Chu X., Feng X., Yu Y. Q. « Whole-Brain Mapping of Direct Inputs to and Axonal Projections from GABAergic Neurons in the Parafacial Zone ». *Neuroscience Bulletin* [En ligne]. 2018. Vol. 34, n°3, p. 485-496. Disponible sur : <https://doi.org/10.1007/s12264-018-0216-8>
- Swartz B. E. « The advantages of digital over analog recording techniques ». *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* [En ligne]. février 1998. Vol. 106, n°2, p. 113-117. Disponible sur : [https://doi.org/10.1016/S0013-4694\(97\)00113-2](https://doi.org/10.1016/S0013-4694(97)00113-2)
- Syková E., Nicholson C., Sykova, Eva; Nicholson C. « Diffusion in brain extracellular space. » *Physiological reviews* [En ligne]. 2008. Vol. 88, n°4, p. 1277-1340. Disponible sur : <https://doi.org/10.1152/physrev.00027.2007>.Diffusion

Taberner A., Medina J. M., Giaume C. « Glucose metabolism and proliferation in glia: role of astrocytic gap junctions. » *Journal of neurochemistry* [En ligne]. novembre 2006. Vol. 99, n°4, p. 1049-61. Disponible sur : <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04088.x>

Takei N., Kawamura M., Hara K., Yonezawa K., Nawa H. « Brain-derived Neurotrophic Factor Enhances Neuronal Translation by Activating Multiple Initiation Processes ». *Journal of Biological Chemistry* [En ligne]. novembre 2001. Vol. 276, n°46, p. 42818-42825. Disponible sur : <https://doi.org/10.1074/jbc.M103237200>

Tao-Cheng J. H., Nagy Z., Brightman M. W. « Tight junctions of brain endothelium in vitro are enhanced by astroglia. » *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* [En ligne]. 1987. Vol. 7, n°10, p. 3293-3299. Disponible sur : <https://doi.org/10.1523/jneurosci.07-10-03293.1987>

Terao A., Steininger T. L., Hyder K., Apte-Deshpande A., Ding J., Rishipathak D., Davis R. W., Heller H. C., Kilduff T. S. « Differential increase in the expression of heat shock protein family members during sleep deprivation and during sleep ». *Neuroscience* [En ligne]. janvier 2003. Vol. 116, n°1, p. 187-200. Disponible sur : [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(02\)00695-4](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00695-4)

Terao A., Wisor J. P., Peyron C., Apte-Deshpande A., Wurts S. W., Edgar D. M., Kilduff T. S. « Gene expression in the rat brain during sleep deprivation and recovery sleep: an Affymetrix GeneChip® study ». *Neuroscience* [En ligne]. janvier 2006. Vol. 137, n°2, p. 593-605. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.08.059>

Theis M., Jauch R., Zhuo L., Speidel D., Wallraff A., Döring B., Frisch C., Söhl G., Teubner B., Euwens C., Huston J., Steinhäuser C., Messing A., Heinemann U., Willecke K. « Accelerated Hippocampal Spreading Depression and Enhanced Locomotory Activity in Mice with Astrocyte-Directed Inactivation of Connexin43 ». *J. Neurosci.* [En ligne]. 1 février 2003. Vol. 23, n°3, p. 766-776. Disponible sur : <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-03-00766.2003>

Theodosis D. T., Poulain D. A., Oliet S. H. R. « Activity-Dependent Structural and Functional Plasticity of Astrocyte-Neuron Interactions ». *Physiological Reviews* [En ligne]. 1 juillet 2008. Vol. 88, n°3, p. 983-1008. Disponible sur : <https://doi.org/10.1152/physrev.00036.2007>

Tobler I., Borbely A. A., Schwyzer M., Fontana A. « Interleukin-i derived from astrocytes enhances slow wave activity in sleep eeg of the rat ». *European Journal of Pharmacology* [En ligne]. 1984. Vol. 1984, n°104, p. 191-192. Disponible sur : [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(84\)90391-1](https://doi.org/10.1016/0014-2999(84)90391-1)

Todd A. C., Marx M. C., Hulme S. R., Bröer S., Billups B. « SNAT3-mediated glutamine transport in perisynaptic astrocytes in situ is regulated by intracellular sodium ». *GLIA* [En ligne]. juin 2017. Vol. 65, n°6, p. 900-916. Disponible sur : <https://doi.org/10.1002/glia.23133>

Tononi G., Cirelli C. « Sleep and the Price of Plasticity: From Synaptic and Cellular Homeostasis to Memory Consolidation and Integration ». *Neuron* [En ligne]. janvier 2014. Vol. 81, n°1, p. 12-34. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.12.025>

Toth L. A., Tolley E. A., Krueger J. M. « Sleep as a Prognostic Indicator During Infectious Disease in Rabbits ». *Experimental Biology and Medicine* [En ligne]. 1 juin 1993. Vol. 203, n°2, p. 179-192. Disponible sur : <https://doi.org/10.3181/00379727-203-43590>

- Tsunematsu T., Sakata S., Sanagi T., Tanaka K. F., Matsui K. « Region-Specific and State-Dependent Astrocyte Ca²⁺ Dynamics during the Sleep-Wake Cycle in Mice ». *Journal of Neuroscience* [En ligne]. 2021. Vol. 41, n°25, p. 5440-5462. Disponible sur : <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2912-20.2021>
- Ueno R., Ishikawa Y., Nakayama T., Hayaishi O. « Prostaglandin D₂ induces sleep when microinjected into the preoptic area of conscious rats ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* [En ligne]. novembre 1982. Vol. 109, n°2, p. 576-582. Disponible sur : [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(82\)91760-0](https://doi.org/10.1016/0006-291X(82)91760-0)
- Urade Y., Hayaishi O. « Prostaglandin D₂ and sleep/wake regulation ». *Sleep Medicine Reviews* [En ligne]. décembre 2011. Vol. 15, n°6, p. 411-418. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.smr.2011.08.003>
- Usowicz M. M., Gallo V., Cull-Candy S. G. « Multiple conductance channels in type-2 cerebellar astrocytes activated by excitatory amino acids ». *Nature* [En ligne]. juin 1989. Vol. 339, n°6223, p. 380-383. Disponible sur : <https://doi.org/10.1038/339380a0>
- Uwechue N. M., Marx M. C., Chevy Q., Billups B. « Activation of glutamate transport evokes rapid glutamine release from perisynaptic astrocytes ». *Journal of Physiology* [En ligne]. mai 2012. Vol. 590, n°10, p. 2317-2331. Disponible sur : <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.226605>
- Vafadari B., Salamian A., Kaczmarek L. « MMP-9 in translation: from molecule to brain physiology, pathology, and therapy ». *Journal of Neurochemistry* [En ligne]. octobre 2016. Vol. 139, p. 91-114. Disponible sur : <https://doi.org/10.1111/jnc.13415>
- Vaidyanathan T. V., Collard M., Yokoyama S., Reitman M. E., Poskanzer K. E. « Cortical astrocytes independently regulate sleep depth and duration via separate gpcr pathways ». *eLife* [En ligne]. 2021. Vol. 10, p. 1-32. Disponible sur : <https://doi.org/10.7554/eLife.63329>
- Vandenberg R. J., Ryan R. M. « Mechanisms of Glutamate Transport ». *Physiological Reviews* [En ligne]. octobre 2013. Vol. 93, n°4, p. 1621-1657. Disponible sur : <https://doi.org/10.1152/physrev.00007.2013>
- Vanini G., Bassana M., Mast M., Mondino A., Cerda I., Phyle M., Chen V., Colmenero A. V., Hambrecht-Wiedbusch V. S., Mashour G. A. « Activation of Preoptic GABAergic or Glutamatergic Neurons Modulates Sleep-Wake Architecture, but Not Anesthetic State Transitions ». *Current Biology* [En ligne]. mars 2020. Vol. 30, n°5, p. 779-787.e4. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.12.063>
- Varin C., Rancillac A., Geoffroy H., Arthaud S., Fort P., Gallopin T. « Glucose Induces Slow-Wave Sleep by Exciting the Sleep-Promoting Neurons in the Ventrolateral Preoptic Nucleus: A New Link between Sleep and Metabolism ». *Journal of Neuroscience* [En ligne]. 2015. Vol. 35, n°27, p. 9900-9911. Disponible sur : <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0609-15.2015>
- Venner A., Anacleit C., Broadhurst R. Y., Saper C. B., Fuller P. M. « A Novel Population of Wake-Promoting GABAergic Neurons in the Ventral Lateral Hypothalamus ». *Current Biology* [En ligne]. août 2016. Vol. 26, n°16, p. 2137-2143. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.05.078>

Verkhartsy A., Butt A. *Glial Physiology and Pathophysiology*. [s.l.] : John Wiley & Sons, Ltd, 2013. ISBN : 978-1-118-40206-1.

Verkhartsy A., Nedergaard M. « Physiology of Astroglia ». *Physiol Rev*. 2018. Vol. 98,.

Verkhartsy A., Nedergaard M. « Astroglial cradle in the life of the synapse ». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* [En ligne]. octobre 2014. Vol. 369, n°1654,. Disponible sur : <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0595>

Verkhartsy A., Steinhäuser C. « Ion channels in glial cells ». *Brain Research Reviews* [En ligne]. avril 2000. Vol. 32, n°2-3, p. 380-412. Disponible sur : [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(99\)00093-4](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(99)00093-4)

Vetrivelan R., Fuller P. M., Yokota S., Lu J., Saper C. B. « Metabolic Effects of Chronic Sleep Restriction in Rats ». *Sleep* [En ligne]. novembre 2012. Vol. 35, n°11, p. 1511-1520. Disponible sur : <https://doi.org/10.5665/sleep.2200>

Vetrivelan R., Kong D., Ferrari L. L., Arrigoni E., Madara J. C., Bandaru S. S., Lowell B. B., Lu J., Saper C. B. « Melanin-concentrating hormone neurons specifically promote rapid eye movement sleep in mice ». *Neuroscience* [En ligne]. novembre 2016. Vol. 336, p. 102-113. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.08.046>

Vignoli B., Battistini G., Melani R., Blum R., Santi S., Berardi N., Canossa M. « Peri-Synaptic Glia Recycles Brain-Derived Neurotrophic Factor for LTP Stabilization and Memory Retention ». *Neuron* [En ligne]. novembre 2016. Vol. 92, n°4, p. 873-887. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.09.031>

Vignoli B., Sansevero G., Sasi M., Rimondini R., Blum R., Bonaldo V., Biasini E., Santi S., Berardi N., Lu B., Canossa M. « Astrocytic microdomains from mouse cortex gain molecular control over long-term information storage and memory retention ». *Commun Biol* [En ligne]. 5 octobre 2021. Vol. 4, n°1, p. 1152. Disponible sur : <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02678-x>

Virchow R. *Gesammelte Abhandlungen zur Wissenschaftlichen Medicin* [En ligne]. Frankfurt A. M. : Meidinger Sohn&Comp. Frankfurt : Frankfurt A. M. : Meidinger Sohn & Comp., 1856. Disponible sur : <https://wellcomecollection.org/works/m3tp5x6w>

Voltera A., Magistretti P. J., Haydon P. G. « The tripartite synapse Glia in Synaptic Transmission: Book Reviews ». *European Journal of Neurology* [En ligne]. mars 2003. Vol. 10, n°2, p. 196-197. Disponible sur : <https://doi.org/10.1046/j.1468-1331.2003.05568.x>

Vyazovskiy V. V., Olcese U., Lazimy Y. M., Faraguna U., Esser S. K., Williams J. C., Cirelli C., Tononi G. « Cortical Firing and Sleep Homeostasis ». *Neuron* [En ligne]. septembre 2009. Vol. 63, n°6, p. 865-878. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.08.024>

Wagner S., Castel M., Gainer H., Yarom Y. « GABA in the mammalian suprachiasmatic nucleus and its role in diurnal rhythmicity ». *Nature* [En ligne]. juin 1997. Vol. 387, n°6633, p. 598-603. Disponible sur : <https://doi.org/10.1038/42468>

Wagner U., Gais S., Born J. « Emotional Memory Formation Is Enhanced across Sleep Intervals with High Amounts of Rapid Eye Movement Sleep ». *Learn. Mem.* [En ligne]. 1 mars 2001. Vol. 8, n°2, p. 112-119. Disponible sur : <https://doi.org/10.1101/lm.36801>

- Wallraff A., Köhling R., Heinemann U., Theis M., Willecke K., Steinhäuser C. « The impact of astrocytic gap junctional coupling on potassium buffering in the hippocampus ». *Journal of Neuroscience* [En ligne]. 2006. Vol. 26, n°20, p. 5438-5447. Disponible sur : <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0037-06.2006>
- Walter A., Van der Spek L., Hardy E., Bemelmans A. P., Rouach N., Rancillac A. « Structural and functional connections between the median and the ventrolateral preoptic nucleus ». *Brain Structure and Function* [En ligne]. 2019. Vol. 224, n°9, p. 3045-3057. Disponible sur : <https://doi.org/10.1007/s00429-019-01935-4>
- Walz W., Hertz L. « Ouabain-Sensitive and Ouabain-Resistant Net Uptake of Potassium into Astrocytes and Neurons in Primary Cultures ». *J Neurochem* [En ligne]. juillet 1982. Vol. 39, n°1, p. 70-77. Disponible sur : <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1982.tb04702.x>
- Wang X., Lou N., Xu Q., Tian G. F., Peng W. G., Han X., Kang J., Takano T., Nedergaard M. « Astrocytic Ca²⁺ signaling evoked by sensory stimulation in vivo ». *Nature Neuroscience* [En ligne]. juin 2006. Vol. 9, n°6, p. 816-823. Disponible sur : <https://doi.org/10.1038/nn1703>
- Watson A. J., Henson K., Dorsey S. G., Frank M. G. « The truncated TrkB receptor influences mammalian sleep ». *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* [En ligne]. 2014. Vol. 308, n°3, p. R199-R207. Disponible sur : <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00422.2014>
- Weber B., Barros L. F. « The astrocyte: Powerhouse and recycling center ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [En ligne]. décembre 2015. Vol. 7, n°12,. Disponible sur : <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020396>
- Welsh D. K., Takahashi J. S., Kay S. A. « Suprachiasmatic Nucleus: Cell Autonomy and Network Properties ». *Annu. Rev. Physiol.* [En ligne]. 17 mars 2010. Vol. 72, n°1, p. 551-577. Disponible sur : <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135919>
- Winship I. R., Plaa N., Murphy T. H. « Rapid Astrocyte Calcium Signals Correlate with Neuronal Activity and Onset of the Hemodynamic Response In Vivo ». *Journal of Neuroscience* [En ligne]. 6 juin 2007. Vol. 27, n°23, p. 6268-6272. Disponible sur : <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4801-06.2007>
- Wolburg H., Wolburg-Buchholz K., Fallier-Becker P., Noell S., Mack A. F. « Structure and Functions of Aquaporin-4-Based Orthogonal Arrays of Particles ». In : *International Review of Cell and Molecular Biology* [En ligne]. [s.l.] : Elsevier, 2011. p. 1-41. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386043-9.00001-3> (consulté le 20 mars 2023) ISBN : 978-0-12-386043-9.
- Wördsörfer P., Maxeiner S., Markopoulos C., Kirfel G., Wulf V., Auth T., Urschel S., Von Maltzahn J., Willecke K. « Connexin Expression and Functional Analysis of Gap Junctional Communication in Mouse Embryonic Stem Cells ». *Stem Cells* [En ligne]. 1 février 2008. Vol. 26, n°2, p. 431-439. Disponible sur : <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0482>
- Xie L., Kang H., Xu Q., Chen M. J., Liao Y., Thiyagarajan M., O'Donnell J., Christensen D. J., Nicholson C., Iliff J. J., Takano T., Deane R., Nedergaard M. « Sleep Drives Metabolite Clearance from the Adult Brain ». *Science* [En ligne]. 18 octobre 2013. Vol. 342, n°6156, p. 373-377. Disponible sur : <https://doi.org/10.1126/science.1241224>

Xiu M. H., Hui L., Dang Y. F., De Hou T., Zhang C. X., Zheng Y. L., Chen D. C., Kosten T. R., Zhang X. Y. « Decreased serum BDNF levels in chronic institutionalized schizophrenia on long-term treatment with typical and atypical antipsychotics ». *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* [En ligne]. novembre 2009. Vol. 33, n°8, p. 1508-1512. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2009.08.011>

Xu J., Peng H., Kang N., Zhao Z., Lin J. H. C., Stanton P. K., Kang J. « Glutamate-induced exocytosis of glutamate from astrocytes ». *Journal of Biological Chemistry* [En ligne]. août 2007. Vol. 282, n°33, p. 24185-24197. Disponible sur : <https://doi.org/10.1074/jbc.M700452200>

Xu Q., Tam M., Anderson S. A. « Fate mapping Nkx2.1-lineage cells in the mouse telencephalon ». *J. Comp. Neurol.* [En ligne]. 1 janvier 2008. Vol. 506, n°1, p. 16-29. Disponible sur : <https://doi.org/10.1002/cne.21529>

Xu Q., Wang D.-R., Dong H., Chen L., Lu J., Lazarus M., Cherasse Y., Chen G.-H., Qu W.-M., Huang Z.-L. « Medial Parabrachial Nucleus Is Essential in Controlling Wakefulness in Rats ». *Front. Neurosci.* [En ligne]. 25 mars 2021. Vol. 15, p. 645877. Disponible sur : <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.645877>

Xu Z.-Q. D., Zhang X., Pieribone V. A., Grillner S., Hökfelt T. « Galanin–5-hydroxytryptamine interactions: electrophysiological, immunohistochemical and in situ hybridization studies on rat dorsal raphe neurons with a note on galanin R1 and R2 receptors ». *Neuroscience* [En ligne]. juin 1998. Vol. 87, n°1, p. 79-94. Disponible sur : [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(98\)00151-1](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(98)00151-1)

Yamabe M., Horie K., Shiokawa H., Funato H., Yanagisawa M., Kitagawa H. « MC-SleepNet: Large-scale Sleep Stage Scoring in Mice by Deep Neural Networks ». *Sci Rep* [En ligne]. 31 octobre 2019. Vol. 9, n°1, p. 15793. Disponible sur : <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51269-8>

Yan Q., Rosenfeld R. D., Matheson C. R., Hawkins N., Lopez O. T., Bennett L., Welcher A. A. « Expression of brain-derived neurotrophic factor protein in the adult rat central nervous system ». *Neuroscience* [En ligne]. mars 1997. Vol. 78, n°2, p. 431-448. Disponible sur : [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(96\)00613-6](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(96)00613-6)

Yang H., Wang H., Jaenisch R. « Generating genetically modified mice using CRISPR/Cas-mediated genome engineering ». *Nature Protocols* [En ligne]. 2014. Vol. 9, n°8, p. 1956-1968. Disponible sur : <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.134>

Yang J., Siao C.-J., Nagappan G., Marinic T., Jing D., McGrath K., Chen Z.-Y., Mark W., Tessarollo L., Lee F. S., Lu B., Hempstead B. L. « Neuronal release of proBDNF ». *Nature Neuroscience* [En ligne]. février 2009. Vol. 12, n°2, p. 113-115. Disponible sur : <https://doi.org/10.1038/nn.2244>

Yasuda T., Yasuda K., Brown R. A., Krueger J. M. « State-dependent effects of light-dark cycle on somatosensory and visual cortex EEG in rats ». *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* [En ligne]. octobre 2005. Vol. 289, n°4, p. R1083-R1089. Disponible sur : <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00112.2005>

Yeh F.-C., Kao C.-F., Kuo P.-H. « Explore the Features of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Mood Disorders ». *PLOS ONE* [En ligne]. 19 juin 2015. Vol. 10, n°6, p. 1-11. Disponible sur : <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128605> (consulté le 28 décembre 2018)

- Yoon N. A., Diano S. « Hypothalamic glucose-sensing mechanisms ». *Diabetologia* [En ligne]. mai 2021. Vol. 64, n°5, p. 985-993. Disponible sur : <https://doi.org/10.1007/s00125-021-05395-6>
- Yoshida K., Li X., Cano G., Lazarus M., Saper C. B. « Parallel Preoptic Pathways for Thermoregulation ». *J. Neurosci.* [En ligne]. 23 septembre 2009. Vol. 29, n°38, p. 11954-11964. Disponible sur : <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2643-09.2009>
- Yu A. C., Schousboec A., Hertz L. « Metabolic Fate of ¹⁴C-Labeled Glutamate in Astrocytes in Primary Cultures ». *J Neurochem* [En ligne]. octobre 1982. Vol. 39, n°4, p. 954-960. Disponible sur : <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1982.tb11482.x>
- Zafra F., Aragon C., Olivares L., Danbolt N., Gimenez C., Storm-Mathisen J. « Glycine transporters are differentially expressed among CNS cells ». *J. Neurosci.* [En ligne]. 1 mai 1995. Vol. 15, n°5, p. 3952-3969. Disponible sur : <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-05-03952.1995>
- Zhang H., Fan X., Bagshaw R., Mahuran D. J., Callahan J. W. « Purification and Proteomic Analysis of Lysosomal Integral Membrane Proteins ». *Organelle Proteomics* [En ligne]. 2008. Vol. 432, p. 229-241. Disponible sur : https://doi.org/10.1007/978-1-59745-028-7_16
- Zhao Z.-D., Yang W. Z., Gao C., Fu X., Zhang W., Zhou Q., Chen W., Ni X., Lin J.-K., Yang J., Xu X.-H., Shen W. L. « A hypothalamic circuit that controls body temperature ». *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* [En ligne]. 21 février 2017. Vol. 114, n°8, p. 2042-2047. Disponible sur : <https://doi.org/10.1073/pnas.1616255114>
- Zheng K., Bard L., Reynolds J. P., King C., Jensen T. P., Gourine A. V., Rusakov D. A. « Time-Resolved Imaging Reveals Heterogeneous Landscapes of Nanomolar Ca²⁺ in Neurons and Astroglia ». *Neuron* [En ligne]. octobre 2015. Vol. 88, n°2, p. 277-288. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.09.043>
- Zielke H. R., Zielke C. L., Baab P. J. « Direct measurement of oxidative metabolism in the living brain by microdialysis: A review ». In : *Journal of Neurochemistry* [En ligne]. [s.l.] : J Neurochem, 2009. p. 24-29. Disponible sur : <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.05941.x>

ANNEXES



Structural and functional connections between the median and the ventrolateral preoptic nucleus

Augustin Walter¹ · Lorijn van der Spek¹ · Eléonore Hardy¹ · Alexis Pierre Bemelmans² · Nathalie Rouach¹ · Armelle Rancillac¹

Received: 1 October 2018 / Accepted: 5 August 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

The median preoptic nucleus (MnPO) and the ventrolateral preoptic nucleus (VLPO) are two brain structures that contain neurons essential for promoting non-rapid eye movement (NREM) sleep. However, their connections are still largely unknown. Here, we describe for the first time a slice preparation with an oblique coronal slicing angle at 70° from the horizontal in which their connectivity is preserved. Using the *in vivo* iDISCO method following viral infection of the MnPO or *ex vivo* biocytin crystal deposition in the MnPO of mouse brain slices, we revealed a strong axonal pathway from the MnPO to the VLPO. Then, to further explore the functionality of these projections, acute 70° slices were placed on multi-electrode arrays (MEAs) and electrical stimulations were performed near the MnPO. Recordings of the signals propagation throughout the slices revealed a preferential pathway from the MnPO to the VLPO. Finally, we performed an input–output curve of field responses evoked by stimulation of the MnPO and recorded in the VLPO. We found that field responses were inhibited by GABA_A receptor antagonist, suggesting that afferent inputs from the MnPO activate VLPO neuronal networks by disinhibition.

Keywords Sleep-promoting neuron · Field recordings · VLPO · MnPO · NREM sleep · MEA

Introduction

Compared to the large number of brain structures involved in arousal, the ventrolateral preoptic nucleus (VLPO) is considered as one of the main brain regions that turns off wake-promoting neurons during non-rapid eye movement

sleep (NREM) (Economo 1930; Sherin et al. 1996; Sakai and Crochet 2001; Saper et al. 2010). Sleep neurons in the VLPO are GABAergic and galaninergic. The immunodetection of galanin forms a cluster in the VLPO allowing its localization.

Recently, another brain region composed of GABAergic neurons located in the medullary parafacial zone (PZ) was shown to be required for normal NREM sleep (Anaclet et al. 2014). Lesional experiments suggested that the VLPO could regulate NREMS sleep duration, while PZ could be involved in the regulation of the number of NREM episodes.

The median pre-optic nucleus (MnPO) is another region involved in sleep regulation. Located along the midline and dorsal compared to the VLPO, this region also contains GABAergic sleep-active neurons that are c-Fos positive following a NREM sleep hypersomnia (Gong et al. 2004). In the VLPO as in the MnPO, the number of c-Fos neurons is proportional to NREM sleep duration prior to the sacrifice of the mouse.

In good agreement with this distribution of immunoreactive neurons for c-Fos, unitary recordings in the preoptic area revealed in the VLPO the existence of neurons

Augustin Walter and Lorijn van der Spek contributed equally.

✉ Armelle Rancillac
armelle.rancillac@college-de-france.fr

¹ Neuroglial Interactions in Cerebral Physiopathology, Center for Interdisciplinary Research in Biology, Centre National de la Recherche Scientifique UMR 7241, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1050, Collège de France, Labex Memolife, PSL-University, 11 place Marcelin Berthelot, 75005 Paris, France

² Commissariat à l’Energie Atomique et aux Energies Alternatives, Département de la Recherche Fondamentale, Institut de biologie François Jacob, Molecular Imaging Research Center and Centre National de la Recherche Scientifique UMR9199, Université Paris-Sud, Neurodegenerative Diseases Laboratory, Fontenay-aux-Roses, France

discharging more frequently during the NREM sleep than during wakefulness (Szymusiak et al. 1998; Takahashi et al. 2009). In contrast to VLPO neurons that display an increase in discharge over an individual NREM period, MnPO sleep-active neurons discharge more frequently at the start of the NREM period (Alam et al. 2014). Therefore, the general hypothesis is that MnPO neurons play a more important role in NREM onset, whereas VLPO neurons are important for maintaining sleep.

Indeed, retrograde transport experiments identified a set of GABAergic neurons in the VLPO, containing the peptide galanin, which innervate all of the major components of the ascending arousal systems (Sherin et al. 1998; Saper et al. 2005).

Retrograde labeling experiments previously revealed that MnPO neurons strongly project towards the VLPO (Chou et al. 2002; Thompson and Swanson 2003; Uschakov et al. 2006, 2007). This pathway is believed to be crucial for NREM regulation, as MnPO neurons are considered to be involved in sleep pressure, whereas VLPO neurons regulate NREM onset and maintenance (Szymusiak et al. 1998; Takahashi et al. 2009; Gvilia et al. 2006), which may allow MnPO neurons to drive VLPO activity. However, the functionality of this pathway needs to be explored.

Here, we used the *in vivo* iDISCO method to reconstruct the pathway between the MnPO and the VLPO and biocytin crystal deposition into the MnPO of coronal or 70° slices to validate the preparation. We show functional connectivity between the MnPO and the VLPO with MEA and field recordings.

Materials and methods

Animals

Male C57BL/6J mice (Janvier, France) and FVB Gal-GFP mice (Mutant Mouse Regional Resource Center (MMRRC), USA), 30 days old, were used. The Gal-GFP mouse strain STOCK Tg (Gal-EGFP) HX109Gsat/Mmucd (identification number 016342-UCD) was obtained from the MMRRC, a NIH-funded strain repository, and was donated by N. Heintz (Gong et al. 2003) to the MMRRC via the NINDS-funded GENSAT BAC transgenic project. All animals were bred and housed in a temperature-controlled (20–22 °C) room under a 12/12 light/dark cycle (7 a.m./7 p.m.) with *ad libitum* access to food and water. Animals used for *ex vivo* studies were placed in light-tight ventilated cabinets and sacrificed at ZT-0. All animal procedures were conducted in strict compliance with our institutional protocols and were approved by the European Community Council Directive of 1 January 2013 (2010/63/EU) and the local ethics committee (C2EA-59, ‘Paris Centre et Sud’) and local guidelines for

the ethical treatment of animal care (Center for Interdisciplinary Research in Biology in College de France, France). The number of animals used in our study was kept to the necessary minimum.

AAV production and injection

One GFP cassette was placed under the control of a hSynapsin-specific promoter in an AAV shuttle plasmid containing the inverted terminal repeats (ITR) of AAV2. Pseudotype serotype 9 AAV particles were produced by transient cotransfection of HEK-293T cells. Viral titers were determined by quantitative PCR amplification of the ITR on DNase-resistant particles and expressed as vector genomes per mL (vg/mL).

One-month-old C57Bl6 mice were anesthetized with a mixture of ketamine (95 mg/kg; Merial) and xylazine (10 mg/kg; Bayer) in 0.9% NaCl and placed on a stereotaxic frame under body temperature monitoring. AAVs were diluted in PBS at a concentration of AAV-hSynapsin-GFP 1.02×10^{13} vg/mL, and 0.5 μ l of virus was stereotaxically injected unilaterally into the MnPO at a rate of 0.2 μ l/min, using a 29-gauge blunt-tip needle linked to a 2- μ l Hamilton syringe (Phymep). The stereotaxic coordinates to Bregma were anteroposterior: –0.3 mm; lateral: 0 mm; and dorsoventral: 4.5 mm. At the end of the injection, the needle was left in place for 5 min before being slowly removed. The skin was sutured, and mice recovery was checked for the next 24 h. After 10 days, the mice were sacrificed, and the brains were extracted after 4% paraformaldehyde (PFA)/PBS intracardiac perfusion.

iDISCO and computer-aided reconstruction of the MnPO–VLPO pathway

To reconstruct the MnPO–VLPO pathway, the iDISCO method was performed in mice injected with the AAV-hSYN-EGFP in the MnPO (Renier et al. 2014). Briefly, the axonal track was imaged performed using lightsheet microscopy (Ultra Microscope II; Lavis-BioTec). Reconstruction of the staining was done using Fiji (Simple Neurite Tracer) to create a three-dimensional model of this pathway. From this model, we used Fiji software to design the optimal slice preparation that could contain a functional track from the MnPO to the VLPO.

Preparation of acute hypothalamic slices

Acute slices (250 or 400 μ m) were prepared as previously described (Scharbarg et al. 2016). Animals were killed by decapitation at the beginning of the light phase. Brains were quickly extracted without removing the meninges and submerged in ice-cold oxygenated (95% O₂–5% CO₂) artificial

cerebrospinal fluid (aCSF) containing (in mM): 130 NaCl; 5 KCl; 2.4 CaCl₂; 20 NaHCO₃; 1.25 KH₂PO₄; 1.3 MgSO₄ and 10 D-glucose; 15 sucrose (pH = 7.35). Coronal brain slices containing the VLPO were cut with a vibratome (VT2000S; Leica), whereas slices cut with an angle were glued to a wedge with a 60° angle from the horizontal. The VLPO being at the bottom surface of the brain, we glued it on its dorsal face to an angled wedge. As the mouse cortex does not have a flat surface, the brains have been slightly inclined towards their anterior extremity. This orientation increases the cutting angle by about 10%. Thus, to make 70° cuts, we used an angled wedge of 60°.

Then, slices were transferred to a constantly oxygenated (95% O₂–5% CO₂) holding chamber containing aCSF. Subsequently, individual slices were placed in a submerged recording chamber maintained at 32 °C and perfused with oxygenated aCSF, and placed under an upright microscope (Zeiss) equipped with a CCD camera (Hamamatsu) for observation.

Biocytin staining, immunohistology and confocal microscopy

To validate the optimal slicing angle that preserved the connection between the MnPO and the VLPO, we performed free-floating 250 µm slices on Gal-GFP mice. Brains were sliced using a 70° angle, or a coronal section. Slices containing the VLPO were selected and kept at room temperature in a constantly oxygenated (95% O₂–5% CO₂) holding chamber containing aCSF. Small biocytin crystal depositions were performed under a binocular microscope into the MnPO and then, slices were returned into their holding chamber during 1 h. Slices were then fixed by immersion in 4% PFA (overnight; 4 °C in 0.1 M phosphate buffer) and rinsed in PBS. For immunofluorescent detection of biocytin crystals, sections were incubated with a Strepta-555-conjugated (1:200, Invitrogen) in PBS/Gelatine/Triton 1% during 2 h at room temperature. Sections were rinsed in PBS, mounted in Fluoromount G (Thermo Scientific). Confocal images were acquired with a spinning W1 confocal microscope (Zeiss). Each image is a z stack max intensity projection of five serial images (10 µm step). The length of labeled axonal fibers detected in the VLPO was measured in both hemispheres of three brains cut at a 70° angle and three others cut coronally. Quantification was assessed on 210.94 × 210.94 µm ROI in both conditions. A length of at least 10 µm was considered an axonal segment.

To determine the density of glutamatergic and GABAergic synapses performed by MnPO fibers into the VLPO, we performed stereotaxic injections of biocytin (0.2%; 0.5 µL) into the MnPO (AP: –0.3 mm; ML: 0 mm; DV: 4.5 mm) of three Gal-GFP mice of P30, anesthetized with ketamine kyllaxine (100 mg/kg and 10 mg/kg, respectively). 3 days

later, these mice were perfused using a 2% PFA solution and brains were postfixed in a 2% PFA solution overnight. Brains were cut using a 70° angle and slices (200 µm thick). Slices were rinsed in a PBS solution. For immunodetection of GFP, biocytin, glutamatergic and GABAergic synapses, sections were sequentially incubated with the following: (1) guinea pig anti-VGLUT2 (1:500, Synaptic Systems), rabbit anti-Homer1 (1:500, Synaptic Systems) and rabbit anti-VGAT (Millipore), mouse anti-gephyrin (Synaptic Systems) in PBS 1X containing gelatin (2 g/L) and Triton X-100 (0.25%) overnight at 4 °C; (2) Strepta-555-conjugated (1:200, Invitrogen), goat anti-Guinea pig Alexa Fluor 633 (1:1000, Molecular Probes), goat anti-rabbit Alexa Fluor 405 (1:1000, Life Technologies), donkey anti-rabbit Alexa Fluor 647 (1:1000, Life Technologies), goat anti-mouse Alexa Fluor 405 (1:1000, Life Technologies) for 2 h at room temperature. Two 30 min PBS/gelatin/triton (0.25%) washes were performed between each incubation step. Finally, sections were rinsed in PBS 1X and mounted in Fluoromount G (Thermo Scientific). Confocal images were acquired with a Spinning W1 confocal microscope (Zeiss). Each image is a z stack max intensity projection of five serial images (10 µm step). Analyses were made with ImageJ plugin SynapseCounter (by Andrey Rozenberg and Egor Dzyubenko). Pre- and postsynaptic proteins clusters were automatically determined by the plugin and only elements corresponding to 33–100% overlap between pre- and postsynaptic clusters were considered as synapses.

Field recordings

400-µm-thick slices were maintained immersed and continuously perfused at 1–2 mL/min with oxygenated kynurenic acid-free aCSF. Local field potential (LFP) recordings were performed with 0.5–1 MΩ glass pipettes filled with extracellular solution. Evoked responses were induced by single stimulation of afferences with incremental intensities (10 µA steps starting from 0). Field potential recordings were acquired with a Axopatch-1D amplifier (Molecular Devices), digitized at 10 kHz, filtered at 2 kHz and analyzed with pCLAMP software (Molecular Devices).

Multielectrode array (MEA) recordings

For MEA recordings, VLPO slices of 400 µm were transferred on planar MEA petri dishes (120 electrodes at 100 µm interelectrode distance; Multichannel Systems). Slices were maintained in place using a small platinum anchor and were continuously perfused (2 mL/min) with aCSF. Pictures of hypothalamic slices on MEAs were used to identify the location of the electrodes in the different brain regions and to select the electrodes of interest near the MnPO. Data were sampled at 10 kHz and evoked

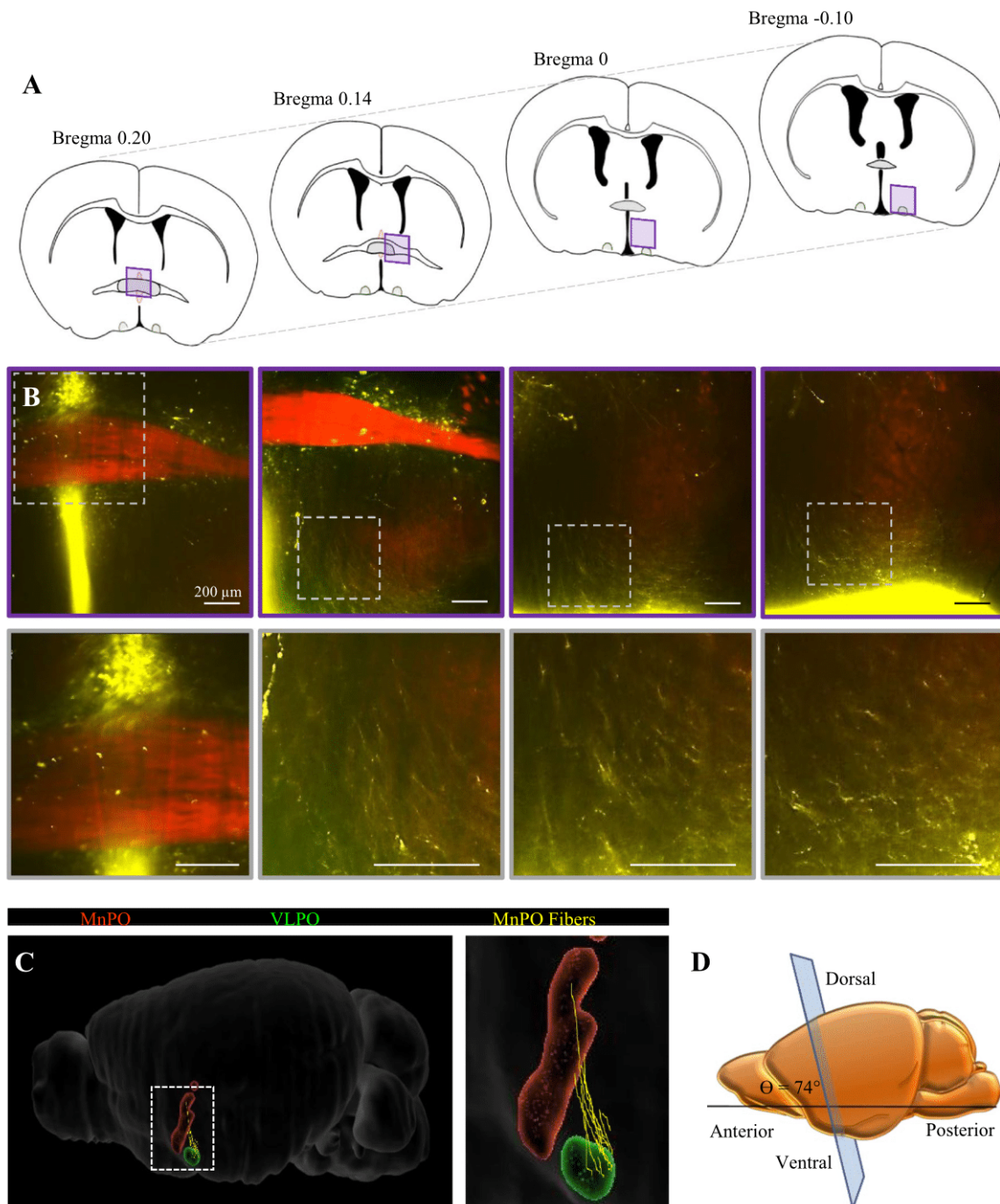


Fig. 1 Reconstruction of the MnPO–VLPO pathway. **a** Schematic transversal surface views where MnPO fibers were imaged and reconstructed after AAV-hSYN-EGFP injection into the VLPO. **b** Confocal images of the ROI shown in A (top traces) and at higher magnification (bottom traces). Scale bars: 200 μm . **c** Reconstructions of the

MnPO (red), the VLPO (green) and the MnPO fibers (yellow) using Fiji software (Simple Neurite Tracer plugin) and the Blue Brain Atlas (EPFL's Blue Brain Project). **d** Schematic representation of a lateral view of the slicing angle (90°)

network activity was recorded at 34°C by a MEA2100-60 system (bandwidth, 1–3000 Hz; gain, 2 \times ; Multichannel Systems) through the MC_Rack 4.4.1 software (Multichannel Systems). Responses were evoked by single stimulation of

afferences (15 μA step). Stimulation artifacts were truncated in the illustration for clarity. Raw data were analyzed with MC_Rack (Multi Channel Systems) and Clampfit software (Molecular Devices).

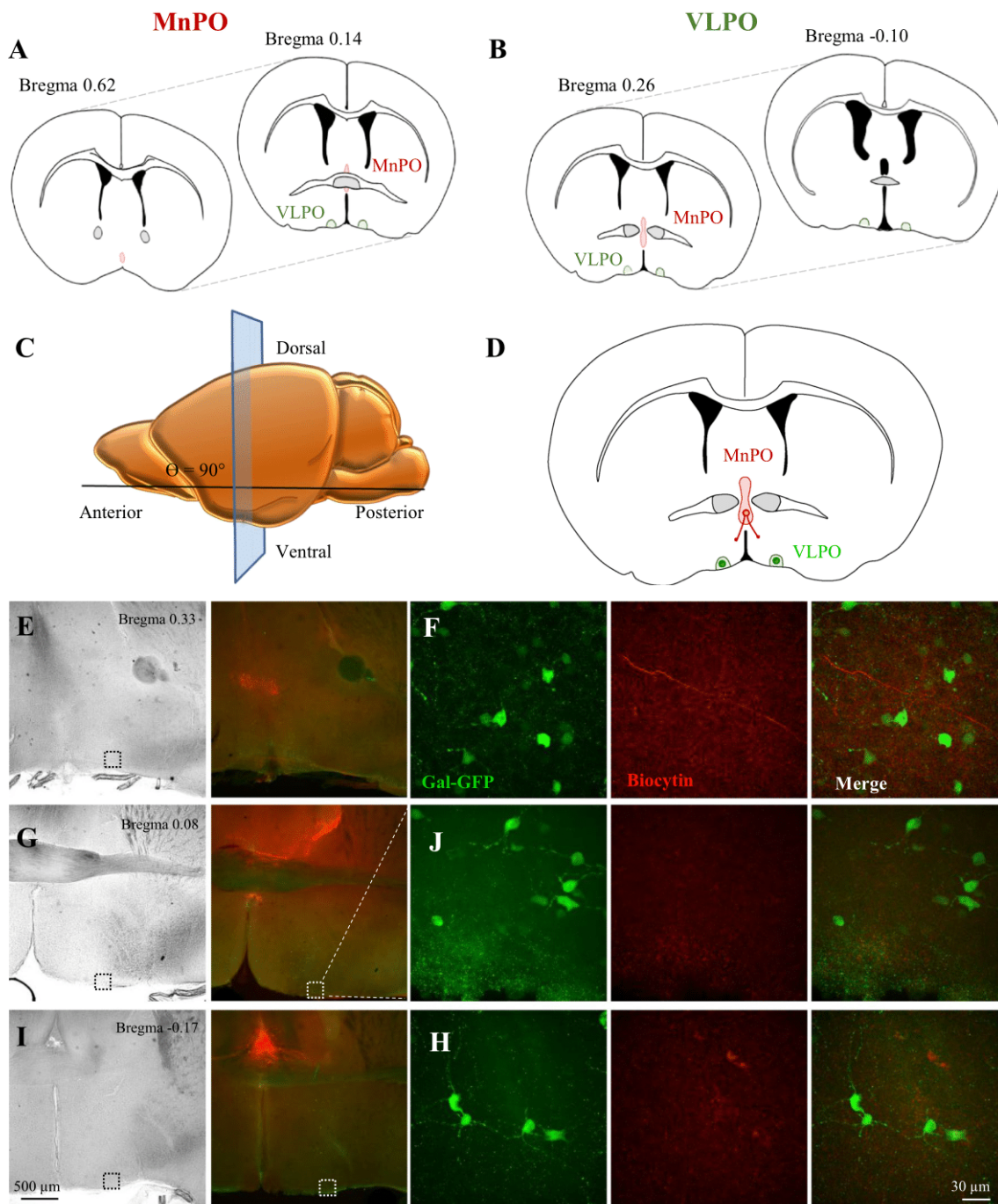


Fig. 2 Biocytin labeling of axonal projections from the MnPO to the VLPO in coronal slices. **a** Schematic representation of coronal slices (Bregma 0.62 and Bregma 0.14 mm) illustrating the extremity of the MnPO location (in red, from Franklin and Paxinos 2007). Note the VLPO shown in green. **b** Schematic representation of coronal slices (Bregma 0.26 and Bregma -0.10 mm) illustrating the extremity of the VLPO location (in green, from Franklin and Paxinos 2007). Note the MnPO shown in red. **c** Schematic representation of a lateral view of the slicing angle (90°). **d** Schematic representation of the corre-

sponding slice and of the axonal projections from the MnPO (in red) to the VLPO (in green) that were cut. **e**, **g**, and **i** Confocal bright field and fluorescent images of three slices, cut at Bregma 0.33 (**e**), 0.08 (**g**) and -0.17 mm (**i**) containing Gal-GFP VLPO neurons (green) and biocytin labeling (red). (**f**, **j**, **h**) Higher magnifications of the regions indicated by a white dotted square in **e**, **g** and **i**. Note that biocytin-labeled fibers were observed in the most rostral coronal brain section only

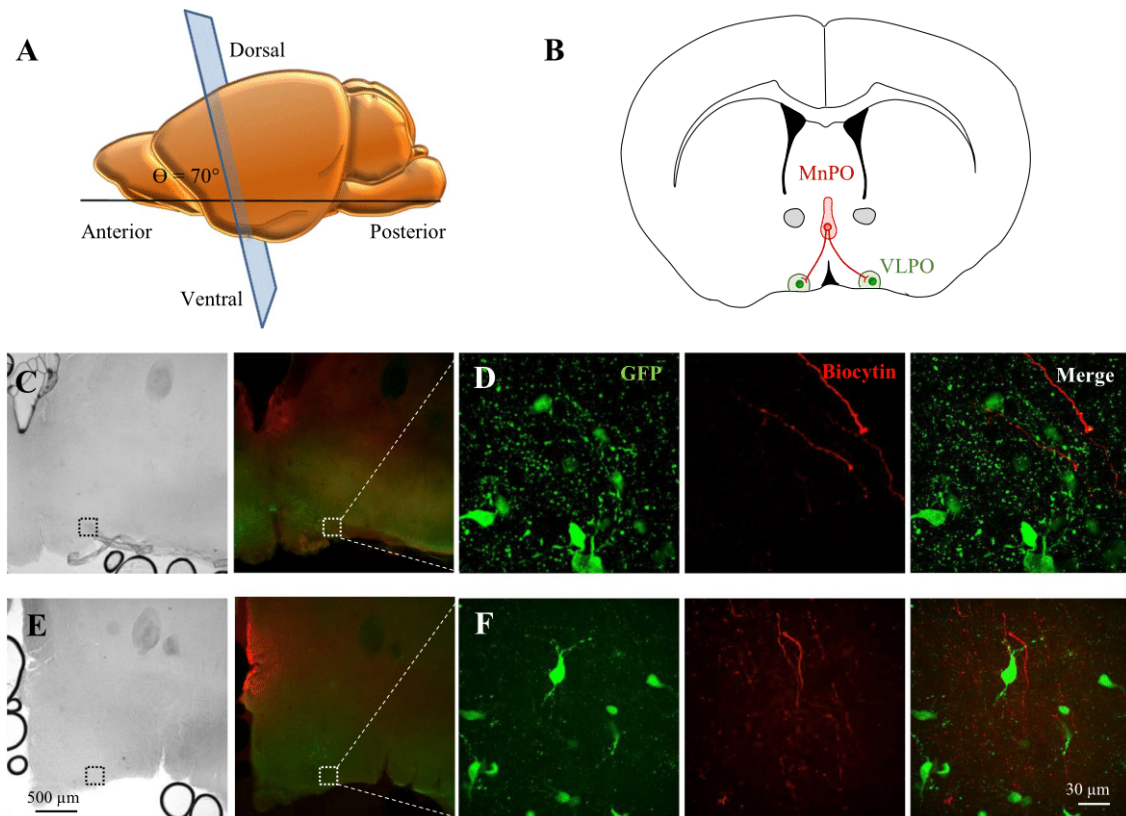


Fig. 3 Biocytin labeling of axonal projections from the MnPO to the VLPO on brain sections cut with a 70° angle. **a** Schematic representation of a lateral view of the slicing angle (70°). **b** Schematic representation of the corresponding slice and of the axonal projections from the MnPO (in red) to the VLPO (in green) that were preserved. **c, e**

Confocal bright field and fluorescent images of the two slices containing Gal-GFP VLPO neurons (green) and biocytin labeling (red). **d, f** Higher magnifications of the regions indicated by a white dotted square in **c** and **e**. Note that biocytin-labeled fibers were observed in all brain sections containing the VLPO

Statistics

All data are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM). Statistical analysis was performed using Statistica software (Statsoft) and GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc).

Results

Computer-aided design reconstruction of the MnPO–VLPO pathway

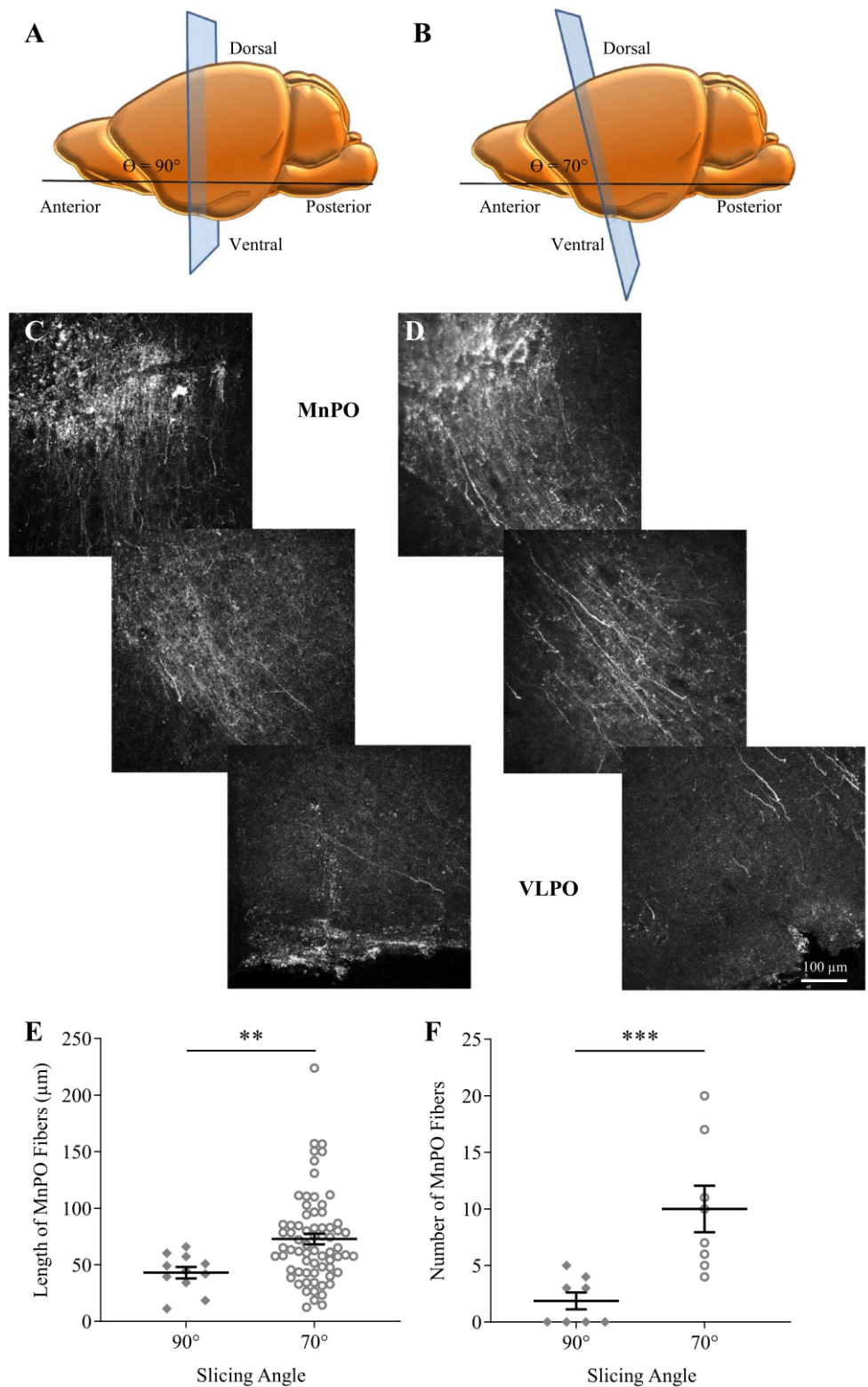
Here, we first performed a reconstruction of the pathway from the MnPO to the VLPO. We injected an AAV-hSYN-EGFP into the MnPO to label MnPO neurons projecting toward the VLPO. Then, we used the iDISCO method to perform a whole-mount immunolabeling of the GFP and

to image a large cleared brain region containing the MnPO and the VLPO, without invasive protocols such as brain slicing (Fig. 1a, b). Using Simple Neurite Tracer (Fiji), we then generated serial section reconstructions of the labeled fibers (Fig. 1c). The digitalized pathway was processed by Fiji software, which allowed us to rotate the reconstruction in three-dimensional space. Thus, we determined that the optimal slicing angle was 74.1° from the horizontal and estimated the optimal slice thickness that included an intact axonal pathway from the MnPO to the VLPO to be $250 \mu\text{m}$ (Fig. 1c, d).

Anatomical connectivity between MnPO and VLPO

To further investigate the structural and functional connectivity between the MnPO and the VLPO, we next generated and compared two different slice preparations containing the MnPO and the VLPO. In adult mice, the

Fig. 4 Biocytin labeling of the MnPO–VLPO pathway on a coronal and a 70° slice. **a, b** Schematic representation of a lateral view of the coronal slicing angle at 90°, (**a**) and 70° (**b**). **c, d** Confocal images of non-overlapping regions of interest illustrating the biocytin-labeled pathway from the MnPO (top panel) to the VLPO (bottom panel) on slices cut either at 90° (**c**) or at 70° (**d**). **e** Individual plots and means of the length of labeled axonal fibers detected in the VLPO in slices performed at 90° and at 70°. **f** Mean number of labeled axonal fibers detected per VLPO slices in each condition



MnPO is located between 0.62 and -0.14 mm along the midline (Fig. 2a) and dorsally compared to the VLPO that is located between Bregma 0.26 and -0.10 mm (Franklin and Paxinos 2007, The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates; Fig. 2b). Thus, we performed coronal slices

(cutting the brain at 90°) at Bregma 0.20, including both extremities of these nuclei and angular slices (cutting the brain at 70°) as determined by the iDISCO method and that should preserve the axonal track integrity.

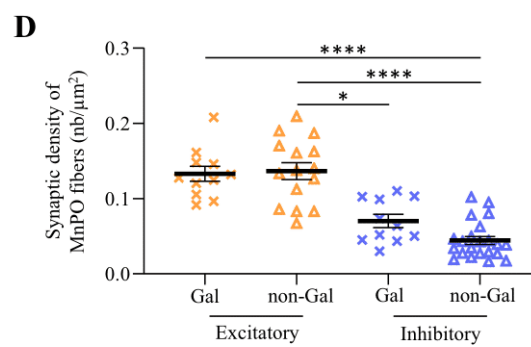
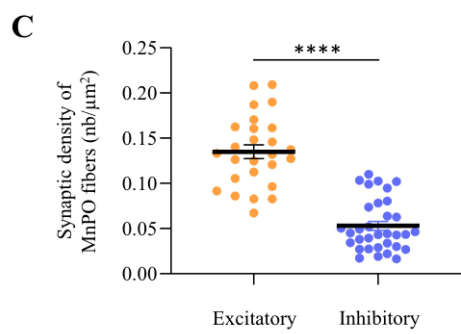
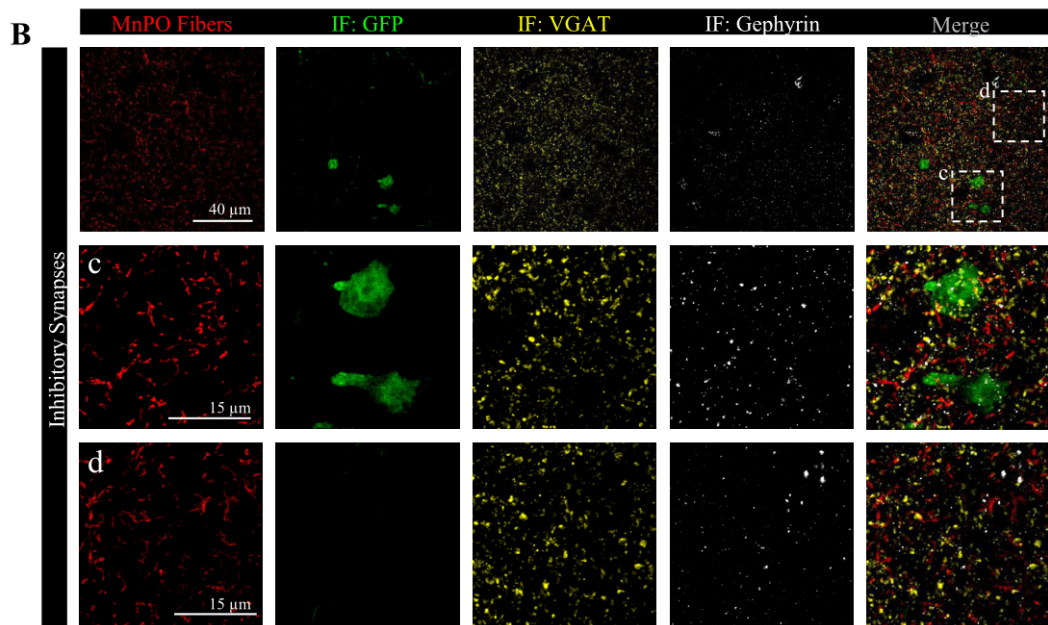
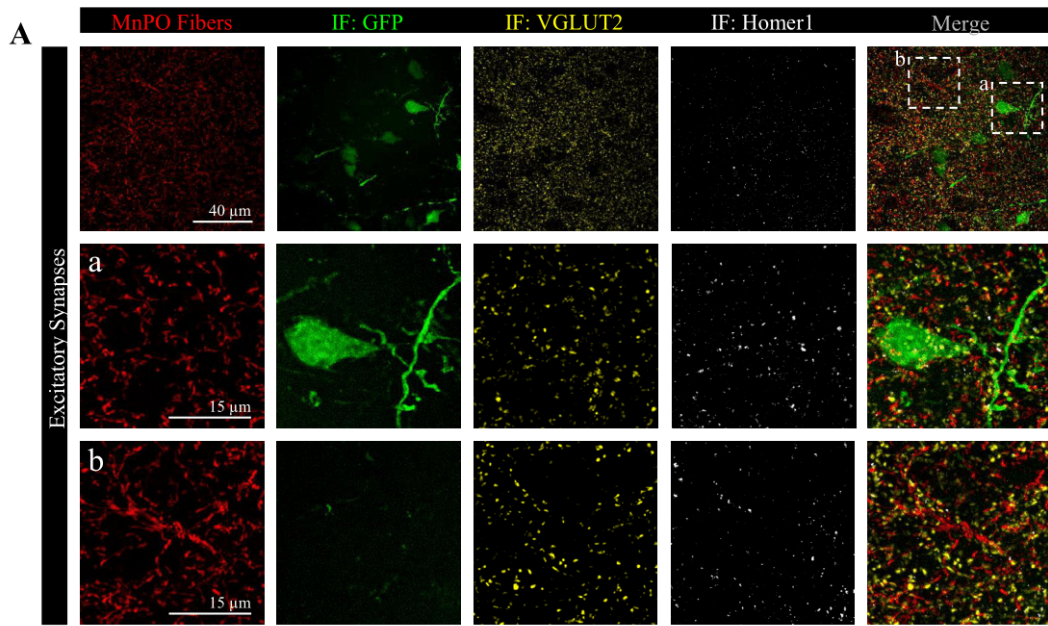


Fig. 5 Immunohistological determination of the inhibitory and excitatory synaptic densities on MnPO fibers in the VLPO. **a** Representative confocal images of excitatory synapses in the VLPO. MnPO fibers are visualized by their biocytin staining (red). Gal-GFP neurons increased staining was performed using GFP detection (green), presynaptic elements were immunostained for VGLUT2 (yellow) and the postsynaptic elements for Homer1 (white). **b** Same as in A, but for inhibitory synapses in the VLPO. Presynaptic elements were immunostained for VGat (yellow) and the postsynaptic elements for gephyrin (white). **c** Plots of excitatory and inhibitory synapse quantifications performed by MnPO fibers in the VLPO. **** $P < 0.0001$, Mann–Whitney test. **d** Plots of excitatory and inhibitory synapse quantifications performed by MnPO fibers on non-Gal-GFP and Gal-GFP neurons in the VLPO. * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$, Kruskal–Wallis test

To test the connectivity between the MnPO and the VLPO, we used the Gal-GFP mice that express GFP under the promoter of galanin and enables visualization of the VLPO (Gaus et al. 2002). Sleep-promoting neurons of the VLPO are indeed galaninergic. The visualization of fluorescence in galaninergic neurons thus allows an easy and robust determination of VLPO localization. First, we performed acute coronal brain slices of 250 μm thickness for both orientation (90° and 70°) using P30 Gal-GFP mice and next, we placed a biocytin crystal onto the MnPO of these slices that contained both the MnPO and the VLPO. This aim of these experiments was to label the fibers after the slicing to be sure that the staining observed in the VLPO resulted only from afferent fibers contained in the thickness of the slice without any other trajectory. Thus, we placed a biocytin crystal onto the MnPO of these slices during 1 h, to allow an anterograde transport of biocytin and the labeling of the pathway (Fig. 2).

We then examined the slices containing Gal-GFP neurons to determine whether biocytin-labeled fibers from the MnPO could be observed in the VLPO. We found only few biocytin-labeled fibers and only in the slice containing the rostral part of the VLPO, at Bregma 0.25 mm (Fig. 2e–g).

We then tested whether a brain slice cut using the optimal angle of 70° preserved the connection between the MnPO and the VLPO. We performed another series of biocytin crystal depositions into the MnPO of these slices for 1 h. Slices were then fixed and visualized using confocal microscopy. As shown in Fig. 3, all the slices containing Gal-GFP VLPO neurons also had biocytin-labeled fibers in the VLPO (Fig. 3c, d).

Comparisons of the MnPO fibers preservation in both preparations using either a slicing angle at 90° (coronal slices) or at 70° were performed on biocytin-labeled fibers after the slicing. We observed that the MnPO fiber track was denser on 70° angle brain sections than on coronal slices, suggesting a preserved integrity of the track (Fig. 4). Accordingly, we established that in the VLPO, the mean labeled length of MnPO fibers significantly

increased by 56.5% in brain slices performed at a 70° angle (from 44.1 ± 5.1 to 72.8 ± 4.7 μm ; $P < 0.01$, Mann–Whitney test; Fig. 4e). In particular, the number of axonal fibers significantly increased by 69.1% in brain slices performed at a 70° angle (from 1.9 ± 0.7 to 10.1 ± 2.1 ; $P < 0.001$, Mann–Whitney test; Fig. 4f). Thus, we found that 70° brain slices preserved the integrity of MnPO fibers arriving in the VLPO. This slicing angle allowed the preservation of more numerous and longer MnPO fibers.

Excitatory and inhibitory synapses are both observed in the VLPO on biocytin-labeled fibers from the MnPO

To investigate the putative nature of this afferent pathway to the VLPO, we performed in vivo biocytin injection into the MnPO of Gal-GFP mice. After biocytin diffusion, brains were sliced using the 70° angle. Biocytin labeling was revealed and immunodetection of excitatory synapses was performed on half of the slices, using the combination of a VGLUT2 antibody to visualize presynaptic elements and a homer antibody, to visualize postsynaptic elements. In parallel, on the other slices, immunodetection of GABAergic synapses was assessed using the combination of the VGAT antibody to visualize their presynaptic elements and the gephyrin antibody, to visualize their postsynaptic elements. In the VLPO, we next determined the density of excitatory and inhibitory synapses observed on biocytin-labeled fibers from the MnPO (Fig. 5). We found that on average, axons from the MnPO formed 154.9% more excitatory synapses than inhibitory (0.13 ± 0.01 vs. 0.05 ± 0.01 , $P < 0.001$, Mann–Whitney; Fig. 5a–c). To go further into the anatomical characterization of this innervation, we quantified the synaptic densities of MnPO fibers performed on non-Gal-GFP neurons and on Gal-GFP neurons. Although not statistically significant, we also observed a higher proportion of excitatory synapses on Gal-GFP neurons (0.13 ± 0.01 vs. 0.07 ± 0.01 synapses/ μm^2 , respectively, $P = 0.061$, Kruskal–Wallis test; Fig. 5d).

Propagation of the electrical signal along the axonal track from the MnPO to the VLPO

We next tested whether the pathway from the MnPO to the VLPO was functional. To do so, we prepared 400- μm -thick slices from P30 wild-type mice, using an angle of 70° to preserve the entire track integrity. The slice of interest, containing both the MnPO and the VLPO was then placed on a multielectrode array (MEA) containing 100 electrodes, each spaced by 100 μm (Fig. 6b). As the MEA area could not cover the entire axonal track from the MnPO to the VLPO, we placed the grid on the VLPO and performed stimulation with an electrode that

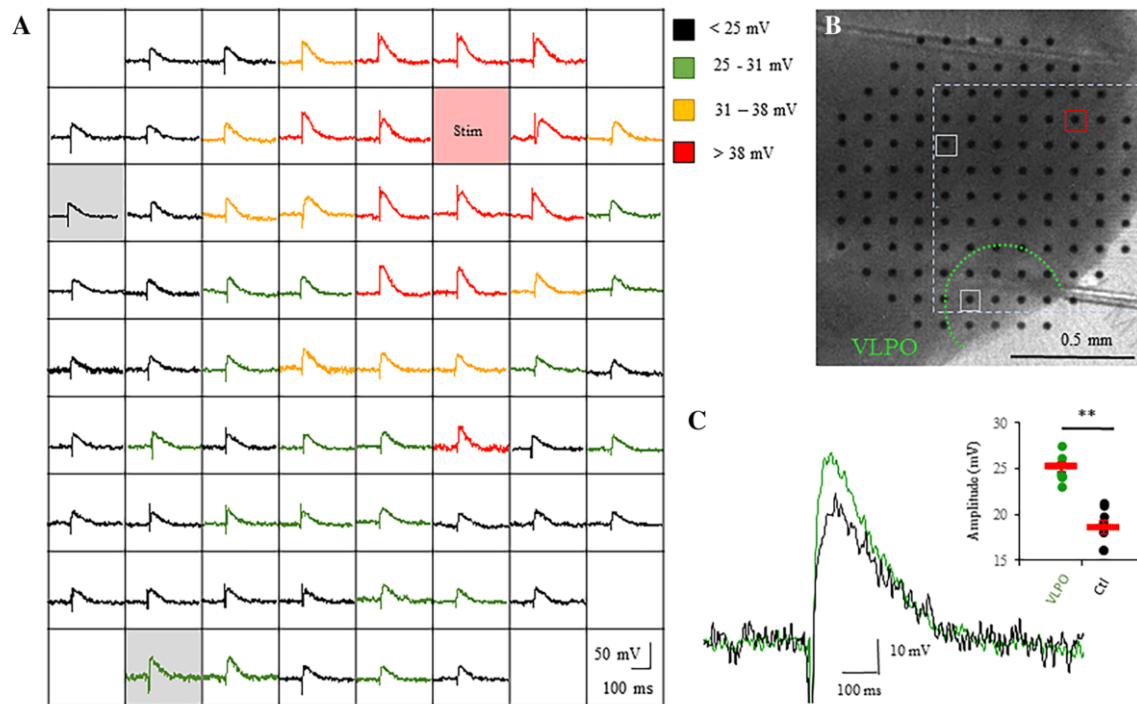


Fig. 6 Propagation of electrical signals along the axonal pathway from the MnPO to the VLPO. **a** Illustration of a typical extracellular recording with MEA in a MnPO–VLPO slice cut with a 70° angle. The stimulating electrode is highlighted by a red square. Amplitudes of the responses are color coded. Note that the response propagates throughout the slice from the stimulating electrode to the VLPO. **b** Picture of the brain slice (left hemisphere) upon the MEA grid (120 × 120 arrays; 100 μm interelectrode distance), indicating locations of the VLPO (green dash line), of the stimulating electrode

(red circle), of a control trace outside the MnPO–VLPO pathway (top left gray circle) and of a response into the VLPO (bottom left circle). Both recorded regions indicated by a gray circle are highlighted in gray in **a**. **c** Superimposed averaged responses recorded in the VLPO ($n=8$, in green) and in a control area ($n=8$, in black) with the electrodes highlighted in gray in **a** or indicated by a gray circle in **b**. Insert: dot plots of individual responses amplitude recorded in the VLPO ($n=8$, in green) or in the control region ($n=8$, in black). Mean values \pm SEM are represented by the red bar, $P < 0.001$ Wilcoxon test

was located the nearest possible to the MnPO (Fig. 6b). We then performed a single stimulation and recorded the signal propagation. The amplitudes of the responses were then measured and color coded as represented in Fig. 6a. We established that signal propagation occurs prominently along the MnPO–VLPO track. We indeed compared the response amplitudes evoked in the VLPO and in another brain region as a control (indicated by gray squares), outside the track and closer to the stimulating electrode that favors passive signal propagation. As illustrated in Fig. 6c, mean response recorded in the VLPO from 8 slices was higher by 35% compared to the control region (25.23 ± 0.7 vs. 18.61 ± 0.7 , $P < 0.001$, Wilcoxon test).

Functionality of the MnPO–VLPO pathway

To further investigate whether an electrical stimulation into the MnPO could propagate until the VLPO and activate local networks, we recorded the field potential in the VLPO evoked by the stimulation of the MnPO, on 70°

MnPO–VLPO slices of 400 μm thickness (Fig. 7a). We assessed the input–output curves of field postsynaptic potential (fPSP) responses. Fibers from the MnPO were stimulated by positioning the stimulating electrode near the MnPO and the recording electrode was positioned in the VLPO as represented in the Fig. 7a. Extracellular field potentials revealed excitability variations along the stimulation intensity (Fig. 7b, e) that is proportional to the fiber volley amplitude (Fig. 7c). As shown in the Fig. 7d, f, field responses were significantly reduced by 54.7% when GABA_A receptors were inhibited (picrotoxin 100 μM; $n=7$, $P=0.0156$, Wilcoxon test), and were further reduced, although not significantly, by 35.4% when blocking NMDA receptors (CPP, 100 μM) and AMPA receptors (NBQX 100 μM; $F=0.58$, Friedman test; Fig. 7f). However, the field potential response in the presence of these blockers of inhibitory and excitatory synaptic transmission was significantly different from the control ($F=0.0026$, Friedman test). Finally, we demonstrated that these field responses indeed resulted from neuronal activity, because they were inhibited when action

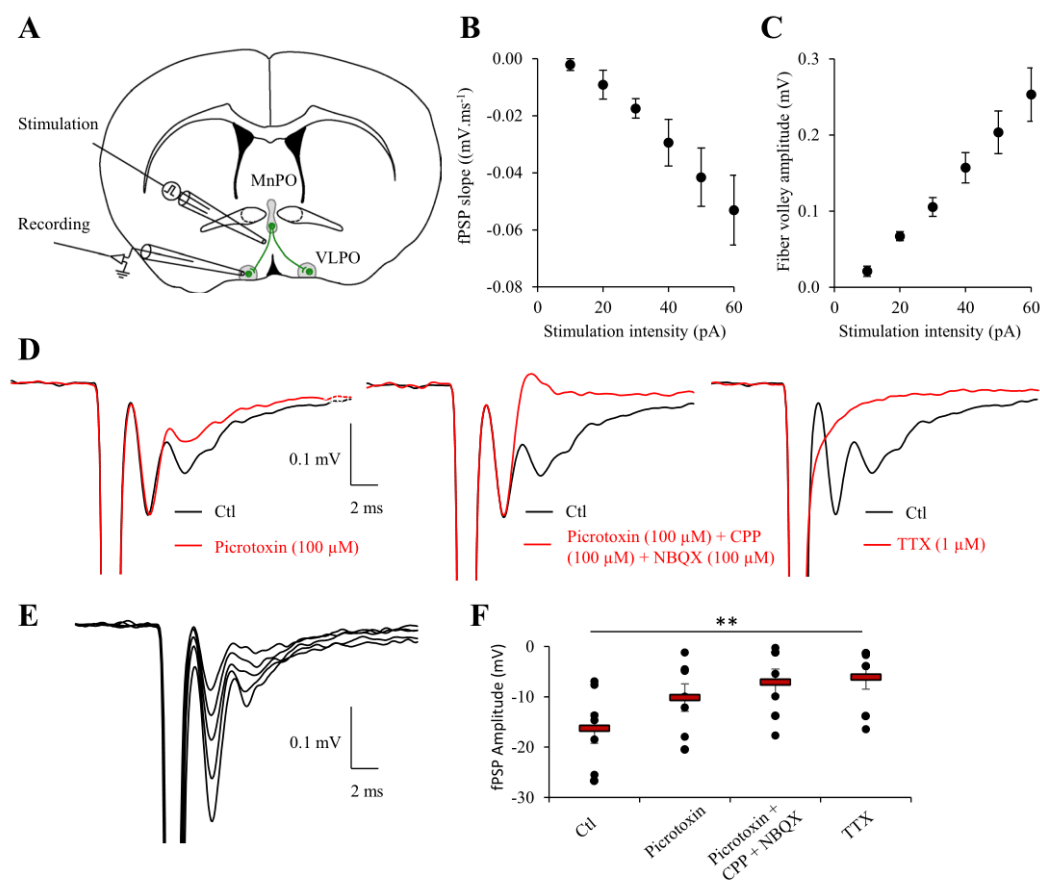


Fig. 7 Fiber volley propagates from the MnPO to the VLPO. **a** Schematic drawing of an acute MnPO–VLPO slice. MnPO axonal projections toward the VLPO are represented in green and were stimulated as indicated by a glass electrode. Field recordings were performed in the VLPO by a recording electrode. **b** Input/output curve of the field PSP slope compared to the stimulation intensity. Individual plots represent the mean \pm SEM ($n=8$ slices). **c** Input/output curve of the fiber volley amplitude compared to the stimulation intensity. Individual plots represent the mean \pm SEM ($n=8$ slices). **d** Superimposed response evoked at 50 pA in control condition (black trace, all panel)

or in the presence of picrotoxin (red trace, left panel), in the presence of picrotoxin plus CPP and NBQX (middle panel) or in the presence of TTX (red trace, right panel). **e** Superimposed example of volley responses recorded at different stimulation intensities (10, 30, 40, 60 and 70 pA; top panel). **f** Dot plots of individual recordings (black circles) of fPSP amplitude evoked by a stimulation intensity of 50 pA, in control condition (Ctl), or consecutively under picrotoxin (100 μ M), under picrotoxin plus CPP (100 μ M) and NBQX (100 μ M), and under TTX (1 μ M; $n=7$, $P=0.0012$, Friedman test)

potential discharge was inhibited using TTX (1 μ M; $n=7$; $F=0.0056$, Friedman test; Fig. 7f).

Discussion

We here describe for the first time a MnPO–VLPO slice preparation in which the integrity of the axonal track is preserved. By combining viral infection, biocytin labeling, MEA and field recordings, we here established for the first time that an oblique coronal slice of 70° preserves the anatomical and functional connectivity between the MnPO and the VLPO.

In this study, we used two different techniques to develop a preparation with intact connectivity between the MnPO

and the VLPO. First, we performed in vivo viral infection of MnPO neurons to label efferent axons and used iDISCO method to immunolabel and image the axonal track. After the reconstruction of the MnPO–VLPO pathway, we determined the best angle and thickness for slicing using an algorithm. Then, in a second set of experiments, we used crystal depositions on acute slices to investigate whether and how the axonal track from the MnPO to the VLPO was preserved. The aim of this experiment was to ensure that the observed labeled axons were exclusively present in the thickness of the slice, without alternative trajectory. Crystal depositions were therefore performed in vitro on acute and thin slices of 250 μ m to ensure the specificity of the trajectory.

Using both techniques, we demonstrate that 70° slice preparation preserved the MnPO–VLPO pathway on all slices containing the VLPO. Using Gal-GFP mice, we

located the VLPO by the fluorescence of Gal-GFP neurons that forms a cluster into the VLPO and allows its precise localization. In contrast, we observed in coronal slices that only the rostral part of the VLPO is targeted by biocytin-labeled fibers from the MnPO. Moreover, we established that the MnPO fiber track was denser on 70° angular brain sections than on coronal slices. Far more fibers reached the VLPO in these 70° slice preparations compared to what was observed in coronal sections. Altogether, these experiments show that the oblique slice of 70° can preserve the connectivity between the MnPO and the VLPO. Neurons from the MnPO also target other brain regions, i.e., the dorsal and median raphe, the locus cœruleus, the tuberomammillary nucleus (TMN), the basal forebrain (BF) and the orexin neurons (Sherin et al. 1998; Uschakov et al. 2007). However, these other pathways were not visible in our slice preparation, as they follow a different trajectory.

Functional studies, using MEA or field recording, were subsequently carried out on 400- μ m-thick slices to favor the integrity of the pathway, as it is classically used for these experiments (MacLean et al. 2006; Pannasch et al. 2014; Chever et al. 2016). Using MEA experiments, we established that evoked responses generated near the MnPO preferentially propagate towards the VLPO, following the track previously highlighted by biocytin labeling.

The functionality of the MnPO–VLPO pathway was then assessed by field potential recordings.

Although we cannot exclude the possibility that other passing fibers originating from other brain regions could have been recruited by our stimulation, we demonstrated that this electrical stimulation of the axonal track from the MnPO induced a field response in the VLPO. Interestingly, we found that this field response was strongly reduced by GABA_A receptor antagonist, whereas in the presence of glutamatergic receptor antagonists in addition to GABA_A receptors antagonist, a non-significant reduction of 34% was observed, suggesting that GABAergic neurons are mainly involved in field responses. These results are consistent with previous reports indicating that MnPO neurons (Gong et al. 2004), as well as sleep-promoting neurons from the VLPO (Sherin et al. 1996, 1998) and local interneurons contain GABA (Williams et al. 2014). However, neurons in the MnPO also contain glutamatergic neurons. GABAergic and glutamatergic neurons of the MnPO were reported to play opposite functions (Abbott et al. 2016). Therefore, we investigated the distribution and repartition of excitatory and inhibitory synapses performed by MnPO fibers into the VLPO. We found that afferent MnPO fibers preferentially make inhibitory synaptic contacts on Gal-GFP neurons compared to non-Gal-GFP. However, we observed a higher density of glutamatergic synapses made by MnPO compared to inhibitory synapses, globally and in Gal-GFP neurons vs.

non-Gal-GFP neurons, suggesting a complex regulation of neuronal activity within the VLPO.

As extracellular field potentials reflect the collective membrane depolarization, we hypothesize that the GABAergic input from the MnPO could disinhibit local neurons to generate a field response. Indeed, responses recorded in the VLPO are small, compared to recordings in the hippocampus, where the majority of the neuronal network is constituted by excitatory neurons (Ross et al. 2000). Thus, GABAergic afferent inputs from the MnPO could disinhibit VLPO network to turn off arousal-promoting brain regions (Saper et al. 2010; Scammell et al. 2017). Alternatively, glutamatergic inputs from the MnPO could also indirectly or directly stimulate sleep-promoting neurons to favor NREM sleep. A better characterization of the neuronal circuitry within the VLPO would greatly benefit the understanding of sleep regulation.

Single-unit recordings and c-Fos expression revealed that the MnPO and the VLPO contain NREM sleep-active neurons (Sherin et al. 1996; Szymusiak et al. 1998; Suntsova et al. 2002; Takahashi et al. 2009; Alam et al. 2014). Although it has been suggested that MnPO neurons might be implicated in sleep pressure, whereas VLPO neurons would rather be involved in sleep onset and maintenance, these nuclei contain different neuronal subtypes with distinct physiological roles, i.e., regulation of vigilance states, osmolarity or body temperature (McKinley et al. 2015; Abbott and Saper 2017; Zhang et al. 2017; Kroeger et al. 2018). Indeed, galaninergic neurons from the VLPO were already shown to project toward brain regions that regulate both sleep–wake behavior and body temperature. Moreover, their chemogenetic activation and their low-frequency stimulation using optogenetic tools were recently shown to promote both sleep and heat loss (Kroeger et al. 2018). Neuronal circuitries within the preoptic area are complex and regulate numerous fundamental functions associated with sleep regulation. However, the underlying circuit mechanism remains poorly understood.

Therefore, the slice preparation preserving the connection between the MnPO and the VLPO that we have here characterized for the first time could be used in future studies to explore the physiological role of MnPO inputs on VLPO local interneurons and sleep-promoting neurons. It would be interesting to determine which type of neurons receive direct inputs from the MnPO, and whether specific spatiotemporal patterns of activity in the MnPO pathway can generate neuronal responses in the VLPO.

Acknowledgements This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), Collège de France and the Marie Skłodowska-Curie Research and Innovation Programme EU-GliaPhD (722053) (N.R.). We thank all the members of the animal house facility and imaging platform from Collège de France,

including Philippe Mailly in particular. We gratefully acknowledge Yves Dupraz for the design of the brain cutting angles and IT people including Aurélien Agneray, in particular, for excellent and prompt technical assistance.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors have no conflicts of interest to declare.

Ethical approval All animal procedures were carried out according to the guidelines of European Community Council Directives of January first 2013 (2010/63/EU) and followed our local guidelines for the ethical treatment of animal care [Center for Interdisciplinary Research in Biology in College de France (France)]. The number of animals in our study was kept to the necessary minimum.

References

- Abbott SBG, Saper CB (2017) Median preoptic glutamatergic neurons promote thermoregulatory heat loss and water consumption in mice. *J Physiol* 595:6569–6583. <https://doi.org/10.1113/JP274667>
- Abbott SBG, Machado NLS, Geerling JC, Saper CB (2016) Reciprocal control of drinking behavior by median preoptic neurons in mice. *J Neurosci* 36:8228–8237. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1244-16.2016>
- Alam MA, Kumar S, McGinty D et al (2014) Neuronal activity in the preoptic hypothalamus during sleep deprivation and recovery sleep. *J Neurophysiol* 111:287–299. <https://doi.org/10.1152/jn.00504.2013>
- Anaclet C, Ferrari L, Arrigoni E et al (2014) The GABAergic parafacial zone is a medullary slow wave sleep-promoting center. *Nat Neurosci* 17:1217–1224. <https://doi.org/10.1038/nn.3789>
- Chever O, Dossi E, Pannasch U et al (2016) Astroglial networks promote neuronal coordination. *Sci Signal* 9:1–9. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aad3066>
- Chou TC, Bjorkum AA, Gaus SE et al (2002) Afferents to the ventrolateral preoptic nucleus. *J Neurosci* 22:977–990
- Economou CV (1930) Sleep as a problem of localization. *J Nerv Ment Dis* 71:249–259. <https://doi.org/10.1097/00005053-193003000-00001>
- Franklin KBJ, Paxinos G (2007) The mouse brain in stereotaxic coordinates, 3rd edn. Academic Press, San Diego
- Gaus SE, Strecker RE, Tate BA et al (2002) Ventrolateral preoptic nucleus contains sleep-active, galaninergic neurons in multiple mammalian species. *Neuroscience* 115:285–294
- Gong S, Zheng C, Doughty ML et al (2003) A gene expression atlas of the central nervous system based on bacterial artificial chromosomes. *Nature* 425:917–925. <https://doi.org/10.1038/nature02033>
- Gong H, McGinty D, Guzman-Marin R et al (2004) Activation of c-Fos in GABAergic neurons in the preoptic area during sleep and in response to sleep deprivation. *J Physiol* 556:935–946
- Gvilia I, Xu F, McGinty D, Szymusiak R (2006) Homeostatic regulation of sleep: a role for preoptic area neurons. *J Neurosci* 26:9426–9433. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2012-06.2006>
- Kroeger D, Absi G, Gagliardi C et al (2018) Galanin neurons in the ventrolateral preoptic area promote sleep and heat loss in mice. *Nat Commun*. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06590-7>
- MacLean JN, Fenstermaker V, Watson BO, Yuste R (2006) A visual thalamocortical slice. *Nat Methods* 3:129–134. <https://doi.org/10.1038/nmeth849>
- McKinley MJ, Yao ST, Uschakov A et al (2015) The median preoptic nucleus: front and centre for the regulation of body fluid, sodium, temperature, sleep and cardiovascular homeostasis. *Acta Physiol (Oxf)* 214:8–32. <https://doi.org/10.1111/apha.12487>
- Pannasch U, Freche D, Dallérac G et al (2014) Connexin 30 sets synaptic strength by controlling astroglial synapse invasion. *Nat Neurosci* 17:549–558. <https://doi.org/10.1038/nn.3662>
- Renier N, Wu Z, Simon DJ et al (2014) IDISCO: a simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. *Cell* 159:896–910. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.010>
- Ross FM, Cassidy J, Wilson M, Davies SN (2000) Developmental regulation of hippocampal excitatory synaptic transmission by metabotropic glutamate receptors. *Br J Pharmacol* 131:453–464. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703610>
- Sakai K, Crochet S (2001) Differentiation of presumed serotonergic dorsal raphe neurons in relation to behavior and wake–sleep states. *Neuroscience* 104:1141–1155
- Saper CB, Scammell TE, Lu J (2005) Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature* 437:1257–1263
- Saper CB, Fuller PM, Pedersen NP et al (2010) Sleep state switching. *Neuron* 68:1023–1042
- Scammell TE, Arrigoni E, Lipton JO (2017) Neural circuitry of wakefulness and sleep. *Neuron* 93:747–765. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.01.014>
- Scharbarg E, Daenens M, Lemaître F et al (2016) Astrocyte-derived adenosine is central to the hypnogenic effect of glucose. *Sci Rep* 6:19107
- Sherin JE, Shiromani PJ, McCarley RW, Saper CB (1996) Activation of ventrolateral preoptic neurons during sleep. *Science* 271:216–219
- Sherin JE, Elmquist JK, Torrealba F, Saper CB (1998) Innervation of histaminergic tuberomammillary neurons by GABAergic and galaninergic neurons in the ventrolateral preoptic nucleus of the rat. *J Neurosci* 18:4705–4721
- Suntsova N, Szymusiak R, Alam MN et al (2002) Sleep-waking discharge patterns of median preoptic nucleus neurons in rats. *J Physiol* 543:665–677. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.023085>
- Szymusiak R, Alam N, Steininger TL, McGinty D (1998) Sleep-waking discharge patterns of ventrolateral preoptic/anterior hypothalamic neurons in rats. *Brain Res* 803:178–188
- Takahashi K, Lin J-S, Sakai K (2009) Characterization and mapping of sleep-waking specific neurons in the basal forebrain and preoptic hypothalamus in mice. *Neuroscience* 161:269–292. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.02.075>
- Thompson RH, Swanson LW (2003) Structural characterization of a hypothalamic visceromotor pattern generator network. *Brain Res Brain Res Rev* 41:153–202
- Uschakov A, Gong H, McGinty D, Szymusiak R (2006) Sleep-active neurons in the preoptic area project to the hypothalamic paraventricular nucleus and perifornical lateral hypothalamus. *Eur J Neurosci* 23:3284–3296
- Uschakov A, Gong H, McGinty D, Szymusiak R (2007) Efferent projections from the median preoptic nucleus to sleep- and arousal-regulatory nuclei in the rat brain. *Neuroscience* 150:104–120
- Williams RH, Chee MJS, Kroeger D et al (2014) Optogenetic-mediated release of histamine reveals distal and autoregulatory mechanisms for controlling arousal. *J Neurosci* 34:6023–6029. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4838-13.2014>
- Zhang W, Zhou Q, Chen W et al (2017) A hypothalamic circuit that controls body temperature. *Proc Natl Acad Sci* 114:E1755. <https://doi.org/10.1073/pnas.1701881114>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



ORIGINAL ARTICLE

Neuropeptide S promotes wakefulness through the inhibition of sleep-promoting ventrolateral preoptic nucleus neurons

Frédéric Chauveau¹, Damien Claverie¹, Emma Lardant¹, Christophe Varin^{2,3}, Eléonore Hardy⁴, Augustin Walter^{4,●}, Frédéric Canini^{1,5,†}, Nathalie Rouach^{4,†,●} and Armelle Rancillac^{2,4,*,●}

¹IRBA (Armed Biomedical Research Institute), Brétigny-sur-Orge, France, ²Brain Plasticity Unit, CNRS, UMR 8249, ESPCI-ParisTech, PSL Research University, Paris 75005, France, ³Laboratory of Neurophysiology, ULB Neuroscience Institute, Université Libre de Bruxelles (ULB), Brussels, Belgium, ⁴Neuroglial Interactions in Cerebral Physiopathology, CIRB, Collège de France, CNRS UMR 7241/Inserm U1050, Labex Memolife, PSL Research University, Paris 75005, France and ⁵Ecole du Val de Grâce, 1 Place, Laveran 75005, Paris

[†]Contributed equally to this work.

*Corresponding author. Armelle Rancillac, Neuroglial Interactions in Cerebral Physiopathology, Center for Interdisciplinary Research in Biology – CIRB, CNRS UMR 7241/Inserm U1050, Collège de France, 11, place Marcelin Berthelot, 75005 Paris, France. Email: armelle.rancillac@college-de-france.fr

Abstract

Study Objectives: The regulation of sleep-wake cycles is crucial for the brain's health and cognitive skills. Among the various substances known to control behavioral states, intraventricular injection of neuropeptide S (NPS) has already been shown to promote wakefulness. However, the NPS signaling pathway remains elusive. In this study, we characterized the effects of NPS in the ventrolateral preoptic nucleus (VLPO) of the hypothalamus, one of the major brain structures regulating non-rapid eye movement (NREM) sleep.

Methods: We combined polysomnographic recordings, vascular reactivity, and patch-clamp recordings in mice VLPO to determine the NPS mode of action.

Results: We demonstrated that a local infusion of NPS bilaterally into the anterior hypothalamus (which includes the VLPO) significantly increases awakening and specifically decreases NREM sleep. Furthermore, we established that NPS application on acute brain slices induces strong and reversible tetrodotoxin (TTX)-sensitive constriction of blood vessels in the VLPO. This effect strongly suggests that the local neuronal network is downregulated in the presence of NPS. At the cellular level, we revealed by electrophysiological recordings and *in situ* hybridization that NPSR mRNAs are only expressed by non-Gal local GABAergic neurons, which are depolarized by the application of NPS. Simultaneously, we showed that NPS hyperpolarizes sleep-promoting neurons, which is associated with an increased frequency in their spontaneous IPSC inputs.

Conclusion: Altogether, our data reveal that NPS controls local neuronal activity in the VLPO. Following the depolarization of local GABAergic neurons, NPS indirectly provokes feed-forward inhibition onto sleep-promoting neurons, which translates into a decrease in NREM sleep to favor arousal.

Statement of Significance

Using a multidisciplinary approach, we have identified for the first time specific effects of NPS on the ventrolateral preoptic nucleus (VLPO), one of the main structures regulating NREM sleep. Polysomnographic recordings revealed that NPS injection into the VLPO decreases the time spent in NREM sleep, by reducing the duration of NREM sleep episodes. We further demonstrated that NPS receptor mRNAs are highly expressed by GAD⁺/Gal⁻ neurons. Using electrophysiological recordings, we revealed that NPS application in the VLPO induces a feed-forward inhibition on sleep-promoting neurons to indirectly produce their hyperpolarization. Since NPS release is associated with intense stress exposure and can lead to insomnia and post-traumatic stress disorders, the results of this study may provide new therapeutic targets in the treatment of insomnia as well as anxiety symptoms that are observed following stress exposure.

Key words: feed-forward inhibition; GABAergic neurons; NPS; NREM sleep; patch-clamp; polysomnography; neurovascular coupling; VLPO

Submitted: 5 December, 2018; Revised: 26 June, 2019

© Sleep Research Society 2019. Published by Oxford University Press on behalf of the Sleep Research Society. All rights reserved. For permissions, please e-mail journals.permissions@oup.com.

Introduction

Neuropeptide S (NPS) is a 20-amino acid peptide, named after its conserved N-terminus serine residue [1]. NPS is one of the least abundant neuropeptides in the brain and is expressed in only a few brainstem areas [2]. Nevertheless, its G protein-coupled receptor NPSR is widely distributed throughout the brain, suggesting its involvement in numerous functions. Among other roles, the NPS-NPSR system regulates memory processes [3–5], anxiety and stress responses [6–10], and arousal and sleep-wake cycles [6].

Sleep is a universal and essential biological process of animal life. However, the mechanisms that regulate vigilance states still remain poorly understood, and up to about one-third of the population in the Western world suffers from sleep disturbance [11, 12]. Despite the quite recent identification of NPS involvement in regulating vigilance states, only a few studies have focused so far on its specific effects and mechanisms of action. One study has shown that the intracerebroventricular (i.c.v.) injection of NPS induces arousal and reduces all stages of sleep [6]. Following this seminal work, further behavioral and immunological studies highlighted a role for NPS in arousal promotion and non-rapid eye movement (NREM) sleep regulation. Subsequently, the i.c.v. injection of NPS was shown to increase wakefulness and to enhance c-Fos expression, a widely used marker of neuronal activation, in posterior hypothalamic histaminergic and orexinergic neurons [13]. Conversely, the injection of an NPSR antagonist decreases the time spent in wakefulness and specifically increases the time spent in NREM sleep, without affecting rapid eye movement (REM) sleep [14]. Furthermore, studies of humans focusing on nucleotide polymorphisms in the NPSR gene have revealed a significant effect on sleep patterns [15]. Both NPS-IR nerve fibers and NPSR have already been observed in the ventrolateral preoptic nucleus (VLPO) [16], one of the main brain structures that triggers NREM sleep [17–19], suggesting that NPS release in the VLPO could also directly influence NREM sleep. However, the fine mechanism by which NPS specifically modulates NREM sleep remains unclear.

To determine the role of NPS within the VLPO, we used an integrated quadripartite approach combining polysomnographic recordings in freely moving mice, vascular reactivity measurements, patch-clamp recordings and the detection of individual fluorophores. First, we characterized *in vivo* the effects of NPS on NREM sleep through its bilateral infusion directly into the anterior hypothalamus, including the VLPO. Next, we highlighted the cellular mechanisms underlying NPS effects by applying NPS on VLPO brain slices and recording its vascular effect, as a readout of local network activity. We then used patch-clamp recording on different subsets of VLPO neurons to determine the precise mode of action of NPS on the cellular elements controlling NREM sleep. Lastly, we determined the subcellular localization of NPSR by combining fluorescent *in situ* hybridization (FISH) and immunolabeling.

Methods

Animals

Male C57B6J mice were used for *in vivo* experiments ($n = 5$ mice, 8 to 12 weeks old; Charles River), as well as for recordings of vascular reactivity ($n = 8$ mice, P30; Charles River), and *in situ* FISH

hybridization ($n = 6$ mice, P30; Charles River). Male Gal-GFP mice ($n = 29$ mice, P30) were used for patch-clamp recordings. The Gal-GFP mouse strain used for this research project (STOCK Tg(Gal-EGFP)HX109Gsat/Mmucd, identification number 016342-UCD) was obtained from the Mutant Mouse Regional Resource Center (United States), a NIH-funded strain repository and was donated to the MMRRRC by the NINDS-funded GENSAT BAC transgenic project. Dr. N. Heintz, the donating investigator of this Gal-GFP mouse strain, was the first to publish it [20].

Mice settled in the laboratory at least 1 week before experiments to acclimate to their new environment and were housed in a temperature-controlled (20–22°C) and light-tight ventilated cabinets, under a 12-hour light-dark cycle with *ad libitum* access to food and water. The beginning of the day (lights-on, rest phase) was at 09:00 am (Zeitgeber time 0; ZT-0). The beginning of the night (lights-off, active phase) was at 09:00 pm (ZT-12). Animals involved in *in vivo* studies arrived in the laboratory at least 2 weeks before surgery and their sleep recording sessions started at ZT-0. Animals used for *ex vivo* studies were placed in light-tight ventilated cabinets and sacrificed at ZT-0. All animal procedures were conducted in strict compliance with our institutional protocols and were approved by the European Community Council Directive of January 1, 2013 (2010/63/EU) and the local ethics committee (C2EA-59, “Paris Centre et Sud”) and local guidelines for the ethical treatment of animal care (Center for Interdisciplinary Research in Biology in College de France, France). The number of animals used in our study was kept to the necessary minimum.

In vivo NPS microinjections into the VLPO and sleep monitoring

C57BL/6J mice were prepared for simultaneous NPS injections into the VLPO and polysomnography as previously described [21]. Briefly, mice were implanted with one bilateral guide cannula (26G; Plastics One) placed 1 mm above the targeted bilateral VLPO (AP: 0.1 mm; ML: 0.7 mm; DV: 4.5 mm [22] for injections and three stainless-steel screws (00-96X1/16, Plastics One) placed over cerebellar cortex, frontal and parietal cortices for EEG recordings. Two silver-wire electrodes were inserted into neck muscles to record EMG activity (787000, AM Systems). Mice had 10 days to recover from surgery. After 3 days of habituation and acclimation to handling, mice were bilaterally injected with either 0.5 μ L of 0.9% saline solution (vehicle) or freshly unfrozen 10 μ M NPS solution (in 0.5 μ L vehicle) using an internal cannula (33G; Plastics One) connected to a 1 μ L-Hamilton syringe placed on an injection pump (KD Scientific; 310 plus model). All animals underwent two bilateral injections spaced by 2 days in a randomized order (vehicle or NPS at an infusion flow rate of 0.5 μ L/minute). Thus, each animal served as its own control. Injections were performed at ZT-0 under isoflurane brief anesthesia (induction 5%, maintenance 1.5%). Polysomnographic recordings began after complete recovery of sedation (5–10 seconds), for 3 hours after the infusion in the freely moving mice.

Acquired EEG and EMG signals were amplified (Model 3500, AM System), digitalized and collected via a CED interface with Spike2 software (Cambridge Electronic Design) at a sampling frequency of 520.8 Hz. Three vigilance states, wake, NREM sleep, and REM sleep, were scored and quantified offline in 5-second epochs. A minimum of two consecutive epochs were used to score sleep episodes. Waking was detected by a desynchronized

low-amplitude EEG accompanied by a sustained EMG activity with phasic bursts. NREM sleep was distinguished by high-voltage slow waves and the disappearance of phasic muscle activity. REM sleep was signaled by a muscle atonia with decreased EEG amplitude relative to NREM sleep and a regular pronounced theta rhythm. Standard parameters of vigilance states (duration, percentage, number, and duration of episodes) were then calculated. Relative EEG spectral power and frequency peaks were calculated during wake, NREM, and REM stages on artifact-free 5-second EEG epochs. According to three reference methods, epochs were considered as an artifact when at least one value of the signal was missing, or when the absolute variation of the signal slope was greater than $2 \mu\text{V}/\text{ms}$, or when the absolute value of the signal exceeded 7 SDs of the mean. The EEG power spectral analysis was performed on MATLAB software (Custom script, Mathworks) in each non-artifacted epoch using a Fast Fourier Transform algorithm with Welch estimation (1-second Hamming window and 50% overlap). The following bands were considered: delta, 1–4 Hz; low theta, 4.0–6.5 Hz; high theta, 6.5–9.5 Hz; α , 9.5–12 Hz; β_1 , 13–18 Hz; β_2 , 18–25 Hz; slow gamma, 25–50 Hz; fast gamma, 50–80 Hz. In each epoch and for each band, the absolute power was calculated from the EEG spectrum as the area under the spectrum curve and the relative power as the ratio of the absolute power under the total power spectrum. When present, the frequency of the maximal peak power of each band was automatically identified using the integrated function of MATLAB.

Preparation of acute VLPO slices

Animals were decapitated at ZT-0. Brains were quickly extracted without removing the meninges, and coronal slices (300 μm thick) were cut as previously described [23, 24]. Individual slices were then placed in a submerged recording chamber maintained at 32°C and perfused with oxygenated artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing (in mM): 130 NaCl; 5 KCl; 2.4 CaCl_2 ; 20 NaHCO_3 ; 1.25 KH_2PO_4 ; 1.3 MgSO_4 ; 10 d-glucose and 15 sucrose; (pH = 7.35) and placed under an upright microscope (Zeiss) equipped with a CCD camera (Hamamatsu) for blood vessel recordings or a coolSNAP HQ₂ (Photometrics) for patch-clamp recordings.

Vascular reactivity

300- μm thick slices were placed under the objective of the microscope, maintained at 32°C and perfused at 1–2 mL/minute with oxygenated aCSF. Blood vessels located in the VLPO placed within the focal plane and exhibiting a well-defined luminal diameter (10–20 μm) were selected for vascular reactivity study. Images of blood vessels were acquired every 30 seconds with the Media Cybernetics software. The possible drift of images during the recording time was corrected either on-line for the z-drift or offline for the x and y axes using Image Pro Plus 7.0. Manual replacement of images to minimize the differences between two consecutive frames was performed using a subtraction tool from Image Pro Plus. In order to determine the location of most movements, luminal diameters were quantified at different locations along the blood vessel using custom written routines running within IgorPro (Wavemetrics). Control baselines were recorded for 5 minutes at the start of the acquisition, with temperature

maintained at $32 \pm 1^\circ\text{C}$. Vessels with unstable baselines (variability higher than 5%) were discarded from the analysis.

Vasomotor responses were subsequently expressed as percentages of the respective mean baseline diameter. NPS was applied during 2 minutes and its effect was measured for 1 minute, either 7.5 minutes after the application onset for vasoconstrictions or after 14 minutes for vasodilations. The effects of pharmacological blocking were then analyzed by performing statistical comparisons between the mean value of the control baseline and the peak effects.

Drugs

NPS receptor agonist (10 μM ; PolyPeptide and GeneCust), S-20-Q antagonist (10 μM ; PolyPeptide), tetrodotoxin (TTX; 1 μM ; Latoxan), and picrotoxin (100 μM ; Sigma) were used in this study.

Whole-cell current-clamp recordings

300- μm thick slices were maintained immersed and continuously perfused at 1–2 mL/minute with oxygenated kynurenic acid-free aCSF. Electrophysiological experiments were performed with a MultiClamp700B (Axon Instruments) amplifier connected to an acquisition board (Digidata 1440; Axon Instruments) attached to a computer running the pCLAMP software (Axon Instruments). Membrane potentials, firing frequencies and input resistances were measured over 2-minute periods for baseline (just prior to NPS application), during 50 seconds for the NPS effect (starting 2 minutes after the onset of the drug application), and during 2 minutes for the recovery (between 8–10 minutes after the drug application onset).

Recordings of VLPO neurons were performed in the whole-cell current-clamp configuration with patch-clamp pipettes (3–6 M Ω) filled with an internal solution containing (in mM): 144 K-gluconate; 3 MgCl_2 ; 0.2 EGTA; 10 HEPES (pH 7.2, 285–295 mOsm). For some recordings, biocytin (5%) was added to the internal solution. Current-clamp recordings were made without series resistance compensation and at resting membrane potential, without adjustment of the membrane potential, excepted for the recordings of NPS effects in the presence of picrotoxin, where ~ 5 –10 pA was injected. A short hyperpolarizing current step at the beginning of each sweep was applied to monitor changes in input resistance throughout the recordings. This protocol sometimes triggered low-threshold spikes (LTS). The liquid junction potential of the patch pipette and the perfused extracellular solution was 11 mV and was not applied to the data. Data were rejected if the input resistance changed by more than 25% during the recording of the control period.

Whole-cell voltage-clamp recordings

300- μm thick slices obtained from Gal-GFP mice were maintained immersed as previously described for current-clamp recordings. Spontaneous currents were recorded from fluorescent neurons in voltage-clamp mode at a holding potential of -50 mV, which was less negative than the reversal potential for sIPSCs. Indeed, the pipette solution contained a low concentration of Cl^- (1 mM), resulting in an E_{Cl} of -111 mV. Therefore, inward currents were considered as sEPSCs and outward currents as sIPSCs [24]. Data were filtered at 2 kHz, digitized at 10 kHz

and acquired on-line using the pCLAMP 10 (Clampex) software (Axon Instruments). The recorded currents were subsequently analyzed using the Clampfit program (version 10.2.0.12; Axon Instruments). The threshold for sIPSC and sEPSC detection was set at 7 pA and the automatic detection was verified post hoc by visual inspection. Frequencies and amplitudes were measured over at least a 3-minute period for baseline (just prior to NPS application), 4 minutes for the NPS effect (starting 1 minute after the onset of the drug application) and at least 3 minutes for the recovery (at least 10 minutes after the drug application onset). Only cells displaying a sIPSC frequency > 0.1 Hz were kept for analysis.

Immunofluorescence and confocal microscopy

Free-floating 300- μ m slices containing biocytin-filled neurons were fixed by immersion in 4% paraformaldehyde (overnight; 4°C in 0.1 M phosphate buffer). Slices were then rinsed in PBS. Slices were then sequentially incubated in PB containing 1% H₂O₂ in order to quench endogenous peroxidases. For immunofluorescent detection of collagen IV and biocytin-filled neurons, sections were sequentially incubated with the following: (1) goat anti-collagen IV (1:400, Millipore) in PBS containing 0.5% Triton X-100 (PBST) overnight at 4°C; (2) an Alexa Fluor 558-conjugated rabbit anti-goat IgG (1:300, Invitrogen) overnight at 4°C; and (3) Alexa Fluor 488 streptavidin (1:800, Invitrogen) for 2 hours at room temperature. Three 20-minute PBST washes were performed between each incubation step. Sections were rinsed in PB, mounted in Vectashield (Vector) and were observed with a fluorescent microscope (Zeiss). Confocal images were acquired with a Nikon A1R confocal microscope. Z-stacks were imported into NIH ImageJ for analysis.

High-resolution FISH by RNAscope

To visualize in which VLPO cell types the NPSR mRNAs are expressed, colchicine (40 mg in 10 mL saline, 1.5 μ L) was injected into the third ventricle (AP: 0.4 mm, ML: 1 mm, DV: 2 mm) of three mice under ketamine-xylazine anesthesia (100 mg/kg and 10 mg/kg respectively, i.p.) and in situ hybridization experiments were performed. The mice were perfused 48 hours later with PBS, and brains were sliced coronally on a cryostat (20 μ m).

FISH was performed on frozen brain sections immobilized on a glass slide coated with Cell Tak (Corning, Corning, NY), following the RNAscope procedures (Advanced Cell Diagnostics, Inc., Newark, CA). Hybridization of a probe against the *Bacillus subtilisdihydrodipicolinate reductase* (dapB) gene was used as negative control. Three brains were processed, and one slice/brain from the middle of the VLPO was imaged for each hemisphere. The names of the probes used are provided in the [Supplementary Information](#) section.

Statistics

All data are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM) and represented as bar graphs or as plots of individual values with the mean value \pm SEM. The statistical significance of the data was assessed using the nonparametric Wilcoxon and Friedman ANOVA tests (Statistica software, Statsoft) according to the relevant conditions. The significance of intracerebral

injections of NPS into the VLPO upon vigilance states was determined using a Wilcoxon test. We used this test as each mouse received both NPS and a vehicle solution, randomly one after the other. This nonparametric test was therefore the most appropriate for these matched samples. A Z-test was also used to compare proportions (SigmaStat software). Mann Whitney U-test was used to determine the significance for unpaired and nonparametric values. The Kolmogorov–Smirnov test (K–S test) is a nonparametric test that was used to compare probability distribution of two samples. Significance was set at $p < 0.05$ and expressed as follows: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. In all cases, n refers to the number of examined neurons.

Results

Bilateral injection of NPS into the VLPO induces wakefulness and decreases NREM sleep

The i.c.v. injection of NPS or its antagonist was previously shown to modulate both arousal and NREM sleep. To determine whether the effects of NPS upon NREM sleep regulation result from an effect in the VLPO or from an indirect effect via neuronal regulation of wake-promoting structures, we performed bilateral injections of NPS into the anterior hypothalamus (including the VLPO), which is one of the main brain region regulating NREM sleep (Figure 1, A and B). These injections were performed at the beginning of the light phase (rest phase, at Zeitgeber time 0; ZT-0), when sleep pressure is high. Each animal randomly received NPS or a vehicle on day 1 and the other solution 2 days later, so that each animal served as its own control. Behavioral effects of NPS were then analyzed for three hours following the injection and were compared to those induced by the vehicle solution (Figure 1D). We found that the NPS effect was brief and mainly altered behavioral states during the first hour only, as assessed by a Friedman ANOVA to investigate the effect of time (Supplementary Table S1). Next, we compared the NPS effect vs. vehicle injection for this first hour and observed that NPS significantly modified the total amount of time spent in both NREM sleep and the wake state, although it had no significant effect on REM sleep (Figure 1E). More precisely, NPS injection decreased the time spent in NREM sleep by 78% ($n = 5$, $p < 0.05$, Wilcoxon test; Figure 1E). Out of the five recorded mice, two did not sleep at all during this time frame. This result suggests that, in the VLPO, NPS essentially interferes with sleep stability. Moreover, NPS increased the latency to the first NREM sleep episode (from 26.2 ± 6.3 to 80.3 ± 12.1 minutes; $p < 0.01$, Wilcoxon test; Figure 1C), suggesting that NPS could also impede NREM sleep onset.

We found that the strong decrease in the time spent in NREM sleep observed during the first hour post-NPS injection essentially resulted from NREM sleep episodes that were reduced by 62% ($n = 5$; Wilcoxon test, $p < 0.05$; Figure 1E). Interestingly, NREM sleep episode durations were consecutively significantly increased ($n = 5$; Friedman ANOVA, $\chi^2 = 7.6$, $p < 0.02$, Supplementary Table S1), suggesting that the NREM sleep stages were more consolidated for the second and third hours post-NPS injection, probably as a result of the previous sleep alterations. In contrast, no significant effect was observed regarding the number of NREM sleep episodes for the first hour after NPS injection ($n = 5$; Wilcoxon test, $p > 0.05$; Figure 1E) or for the two subsequent hours post-NPS injection (Friedman ANOVA, $\chi^2 = 3.26$, $p > 0.05$, Supplementary Table S1). Concomitantly, we observed for the

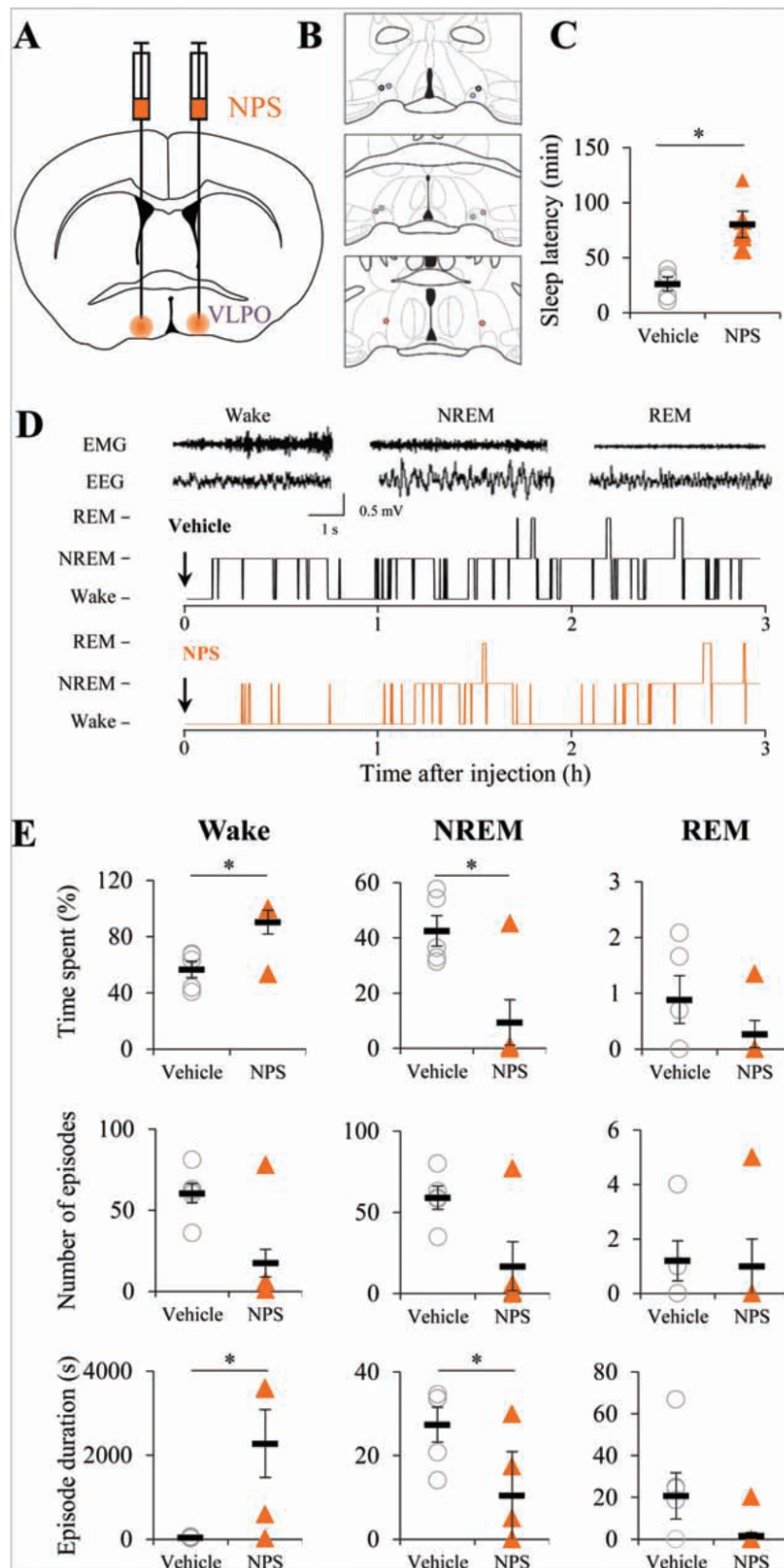


Figure 1. In vivo bilateral NPS infusion in the VLPO promotes wakefulness and decreases NREM sleep. (A) Schematic representation of the injection procedure. (B) Camera lucida drawings of coronal sections showing all injection sites. Black open circles indicate injection sites throughout the rostrocaudal extent of the VLPO, from Bregma 0.14 to -0.22 mm according to the Franklin and Paxinos atlas (2007). (C) Histograms showing the first NREM episode latency ($n = 5$ for both groups). Wilcoxon test: * $p < 0.05$. (D) Typical frontal EEG and EMG raw signals (top panel) and state scoring (5-second epochs) following NPS or vehicle injection in the same mice (bottom panel). (E) Plots of time spent (top panels), the number of episodes (middle panels), and the mean duration of episodes (bottom panels) in response to intra-VLPO injection of NPS (10 μ M NPS solution, 0.5 μ L per site, $n = 5$) or vehicle solution (0.5 μ L, $n = 5$). Data represent the mean value of the first hour after injection.

first hour a 63% increase in the time spent in the wake state after NPS injection ($n = 5$, Wilcoxon test, $p < 0.05$, [Figure 1E](#)).

Spectral analyses of the parietal and frontal derivation for the three behavioral states (wake, NREM, and REM sleep) were performed for the 3 hours following NPS and vehicle injections. Although several mice did not sleep at all during the first hour post-injection of NPS, we observed that during this period, NPS decreased the delta and low theta powers measured at the parietal electrode during NREM sleep (by 54% and 48% respectively, Wilcoxon test, $p = 0.10$; [Supplementary Table S1](#)). The delta and low theta powers measured at the frontal electrode also decreased during the wake period for the first hour after NPS injection (by 34% and 39%, respectively, Wilcoxon test, $p < 0.05$).

These results indicate that local and bilateral administration of NPS into the anterior hypothalamus, including the VLPO, had a short-lasting sleep-suppressing effect, mainly by reducing the mean NREM sleep episode duration.

NPS constricts the blood vessels of the VLPO

Hemodynamic changes are tightly adjusted spatiotemporally to the local neuronal activity of the principal output neurons [25–28]. This neurovascular coupling is regulated by a complex mechanism involving different vasoactive agents released by several cell types [26, 27, 29, 30]. Hemodynamic responses provide an indirect measure of neuronal activity, which can be used to image the activation of brain regions based on their blood oxygenation level-dependent (BOLD) fMRI signal. In the VLPO, sleep-promoting neurons are in tight contact with blood vessels ([Figure 2A](#)) and participate in blood flow regulation [30]. Therefore, we used vascular responses as a readout of the local activation of the VLPO neuronal network.

The global effect of NPS on the VLPO neuronal network was determined by applying NPS on brain slices. A 2-minute bath application of NPS induced a strong and reversible vasoconstriction ($15.9 \pm 0.9\%$; $n = 4$; $p = 0.001$; Wilcoxon test; [Figure 2, B and D](#)). This vasoconstriction is likely an indirect result of downregulation of the local neuronal activity, since blood vessels do not express NPSR [1]. The contribution of neurons to the vasoconstrictive effect of NPS was confirmed in slices preincubated with TTX ($1 \mu\text{M}$), a voltage-gated sodium channel blocker. TTX pretreatment significantly inhibited and even reversed the NPS vasoconstrictive effect. The induced vasodilation developed slowly and peaked at $106.5 \pm 2.3\%$ ($n = 4$; $p < 0.05$; Wilcoxon test; [Figure 2, B–D](#)). Typically, vasodilation is measured on precontracted blood vessels to promote their responsiveness due to the lack of blood pressure in brain slices [26]. Here, the NPS vasodilatory effect under TTX was strong enough to be observed without any vasoconstrictive pretreatment.

Distinct neuronal classes have been characterized in the VLPO according to their morphology, their electrophysiological properties, and their pharmacological responses to neurotransmitters involved in sleep-wake regulation [23, 31]. Two main classes of neurons with a role in sleep-wake regulation have been described: (1) neurons inhibited by noradrenaline (NA), referred to as NA (-) neurons and considered to be putative sleep-promoting neurons; and (2) neurons excited by NA (i.e. NA (+) neurons), which supposedly correspond to local neurons [21, 31–35]. These local GABAergic neurons have already been proposed to regulate the firing of sleep-promoting neurons [36, 37].

Our results suggest that local GABAergic neurons could be directly depolarized by NPS application, mediating the vasodilation observed in the presence of TTX. In contrast, in the absence of TTX, the inhibition of sleep-promoting neurons should induce a strong vasoconstriction that counterbalances the previous vasodilator effect. However, these results do not exclude the fact that other cell types known to regulate cerebral blood flow (such as astrocytes) could also be involved in regulating VLPO neuronal networks. To further decipher the mode of action of NPS on VLPO neuronal subtypes, we next performed *ex vivo* patch-clamp recordings of neurons in acute brain slices.

NPS hyperpolarizes galaninergic sleep-promoting neurons and depolarizes non-galaninergic neurons in the VLPO

Transgenic mice expressing GFP under the transcriptional control of the galanin gene (Gal-GFP mice) were used to identify putative sleep-promoting neurons in the VLPO, based on the expression of a green fluorescent reporter ([Supplementary Figure S1](#)). Indeed, galanin is the only known reliable molecular marker of sleep-promoting cells in the VLPO [38–41]; recently, one elegant study using optogenetic tools also reported that galaninergic neurons in the VLPO promote sleep [42]. In VLPO slices of Gal-GFP mice, Gal-GFP neurons are located in a dense core forming a fluorescent cluster of neurons ([Supplementary Figure S1](#)). We established that Gal-GFP VLPO neurons are all inhibited by NA application ($50 \mu\text{M}$ for 20 seconds; $n = 14/14$; [Supplementary Figure S1](#)) and display a potent low-threshold calcium spike, confirming their identification as VLPO sleep-active neurons.

To test the effects of NPS on VLPO neurons, we first investigated whether bath application of NPS could modulate the membrane potential of Gal-GFP neurons using current-clamp recordings. Our results demonstrate that the application of NPS ($10 \mu\text{M}$ for 2 minutes) hyperpolarizes the membrane potential of VLPO neurons by $3.3 \pm 0.7 \text{ mV}$ (from -49.5 ± 1.8 to $-52.8 \pm 1.7 \text{ mV}$, $n = 8$, $p < 0.01$, Wilcoxon test; [Figure 3, A, C, and E](#)). Accordingly, spontaneous neuronal firing also significantly decreased by 53% (from 1.1 ± 0.3 to $0.5 \pm 0.3 \text{ Hz}$, $n = 8$, $p < 0.01$, Wilcoxon test; [Figure 3D](#)). Additionally, their input resistance was reduced by 7% (from 697 ± 72.1 to $648.3 \pm 66.3 \text{ M}\Omega$; $n = 8$, $p < 0.01$, Wilcoxon test; [Figure 3F](#)) in response to NPS. All of these effects were reversible.

Since NPSR is a G protein-coupled receptor that couples to either Gq or Gs, the direct effect of linking NPS to its receptor should be a neuronal depolarization, as previously reported in the amygdala [9, 43]. We thus probed whether NPS can inhibit Gal-GFP neurons through the excitation of local GABAergic neurons that have been proposed to control the neuronal activity of sleep-promoting neurons [35, 36]. To test this hypothesis, we recorded the electrophysiological responses of non-Gal-GFP neurons in response to NPS application ($10 \mu\text{M}$ for 2 minutes) within the VLPO. This pharmaceutical NPS application depolarized the membrane potential of non-Gal-GFP neurons by $2.4 \pm 0.8 \text{ mV}$ (from -55.6 ± 2.4 to $-53.2 \pm 2.6 \text{ mV}$, $n = 7$; $p < 0.05$, Wilcoxon test, [Figure 3, B, C, and E](#)). Unlike Gal-GFP neurons, non-Gal-GFP neurons rarely fired any spontaneous action potentials at their resting membrane potential (4/7 compared to 8/8). In addition, the neurons in our dataset were 6 mV more hyperpolarized than the Gal-GFP neurons. This indicates that

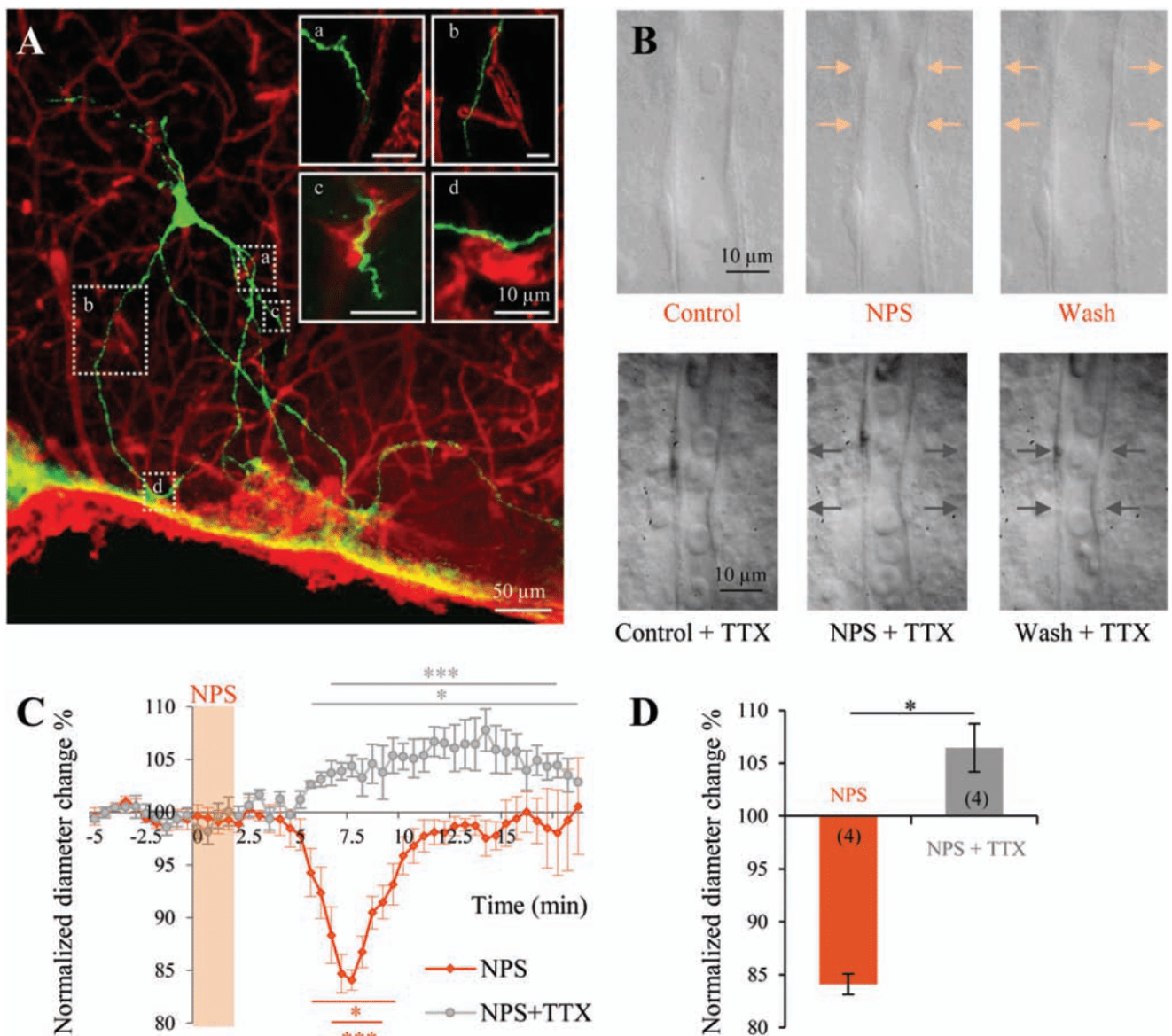


Figure 2. NPS mediates vasoconstriction in the VLPO. (A) Confocal image of a sleep-promoting neuron loaded with biocytin (green), located in the vicinity of blood vessels (immunodetected for collagen IV; red), that was inhibited in response to noradrenalin application. Inserts at the top right are a higher magnification of the region of interest indicated by the white dashed square. (B) Infrared images of a typical vasoconstriction induced by NPS (upper panels), or of a vasodilation induced by NPS application in the presence of TTX (1 μ M, bottom panels). The time points are before (control, left panels), at the peak effect (NPS; 2 minutes; 10 μ M, middle panels), and during the recovery (wash, right panels). The arrows indicate regions of high vascular reactivity. (C) Mean vascular constrictions induced by NPS (2 minutes; 10 μ M; $n = 4$; in orange) and the mean vascular dilation in the presence of TTX (1 μ M) induced by NPS (2 minutes; 10 μ M; $n = 4$; in gray; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, Wilcoxon tests). (D) Histogram comparing maximal diameter changes induced by NPS either without or under TTX (* $p < 0.05$; Mann-Whitney U-test). Sample sizes are indicated in parentheses.

despite our observation that NPS application increases the neuronal firing of non-Gal-GFP neurons (from 0.0 ± 0.0 to 0.5 ± 0.2 Hz, $n = 7$, $p = 0.063$, Wilcoxon test, Figure 3, B and D), this effect was not statistically significant, probably due to the lack of discharge in three out of seven neurons. Nevertheless, a significant 19% decrease in the input resistance was measured while recording the NPS response in Gal-GFP neurons (from 512.4 ± 74 to 412.8 ± 543.5 M Ω ; $n = 7$, $p < 0.01$, Wilcoxon test; Figure 3F). Furthermore, the normalized effect of NPS on Gal-GFP neurons was significantly different as compared to the effect on non-Gal-GFP neurons (93.8 ± 1.4 vs. 104.2 ± 1.7 %; $p < 0.001$, Mann-Whitney U-test; Figure 3F). Consequently, NPS may act directly on non-Gal-GFP rather than on Gal-GFP neurons.

NPS indirectly hyperpolarizes Gal-GFP neurons and directly depolarizes non-Gal-GFP neurons

To investigate whether the NPS effect occurs at the pre- or post-synaptic site, we performed bath applications of NPS in the presence of 1 μ M TTX, an inhibitor of voltage-sensitive sodium channels, to block indirect neuronal pathways (Figure 4, A, B, and D). In the presence of TTX, we found that NPS application was incapable of changing the membrane potential of Gal-GFP neurons (from -55.1 ± 1.3 to -55.2 ± 1.3 mV; $p = 0.625$, Wilcoxon test; Figure 4, A and C) as well as their input resistance (from 604.6 ± 109.7 to 575.5 ± 105.3 M Ω ; $p = 0.188$, Wilcoxon test, Figure 4D). This effect of NPS on membrane potential is significantly different from the

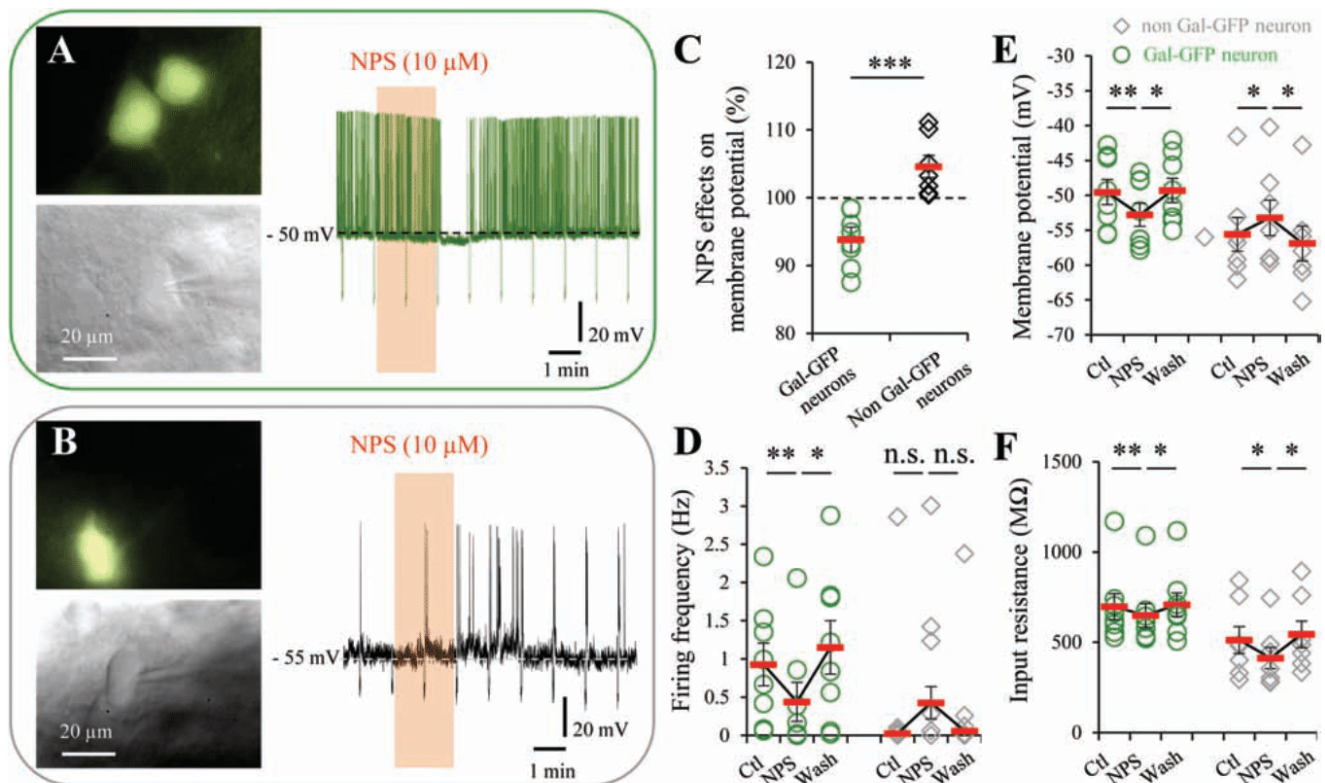


Figure 3. Patch-clamp recordings of neuronal responses to NPS application in the VLPO. (A) Epifluorescence (top left) and infrared (bottom left) images of a Gal-GFP neuron. A sample recording of an individual Gal-GFP neuron in current-clamp mode, at a mean membrane potential of -50 mV (as indicated by the dashed line) is shown. The orange box indicates the duration of NPS application (2 minutes; $10 \mu\text{M}$). Hyperpolarizing currents were injected to monitor the input resistance. NPS induced the hyperpolarization of the fluorescent neuron shown in the left panel. (B) Epifluorescence (top) and infrared (bottom) images of a non-Gal-GFP neuron. Same conditions as in (A), but on nonfluorescent neurons and at a mean membrane potential of -55 mV (as indicated by the dashed line). NPS induced the depolarization of the nonfluorescent neuron shown in (B). (C) Summary of NPS effects on the membrane potential of Gal-GFP (green circles, $n = 8$) and non-Gal-GFP neurons (black diamonds, $n = 7$). Empty symbols represent values of individual cells, and solid red bars denote the average values. $***p < 0.001$; Mann-Whitney U-test. (D–F) Plots of individual membrane variation (D), firing frequency (E), and input resistance (F) of Gal-GFP (green circles, $n = 8$) and non-Gal-GFP neurons (gray diamonds, $n = 7$) in response to NPS application. Solid red bars denote average values. $*p < 0.05$, $**p < 0.001$; Wilcoxon test.

one observed in the absence of TTX ($99.7 \pm 0.8\%$ vs. $93.8 \pm 1.4\%$; $p < 0.01$, Mann-Whitney U-test, Figure 4F), suggesting an indirect effect of NPS on sleep-promoting neurons.

In contrast, we observed a direct effect of NPS on non-Gal-GFP neurons when the depolarizing effect of bath-applied NPS was maintained in the presence of TTX (Figure 4, B and D). On average, there was a significant membrane potential depolarization of 2.1 ± 0.2 mV (from -56.1 ± 3.8 to -54.7 ± 2.9 ; $p < 0.05$, Mann-Whitney U-test; Figure 4, B and C), which was not significantly different from the NPS effect without TTX ($103.8 \pm 0.7\%$ vs. $104.6 \pm 1.7\%$; $p > 0.536$, Mann-Whitney U-test, Figure 4F). The input resistance during recordings of non-Gal-GFP neurons remained sensitive to NPS application under TTX (from 497.1 ± 94.3 to 443.5 ± 103.2 M Ω , $p < 0.05$, Wilcoxon test, Figure 4D).

The specificity of the NPS effect was then tested in the presence of S-20-Q ($10 \mu\text{M}$), a selective NPSR antagonist. This treatment significantly blocked the expected hyperpolarizing effect of NPS on Gal-GFP neurons (Figure 4, E–G). No significant membrane variation was induced by NPS application in the presence of S-20-Q (from -54.87 ± 1.81 to -53.31 ± 2.61 mV; $n = 6$; $p > 0.62$; Wilcoxon test; Figure 4E). This result was significantly different from the NPS effect without S-20-Q ($99.6 \pm 0.7\%$ vs. $93.8 \pm 0.8\%$; $p < 0.01$, Mann-Whitney U-test, Figure 4F). In addition, there was no effect of NPS in the presence of S-20-Q, regarding the firing frequency and input resistance (from 0.7 ± 0.3 to 0.5 ± 0.2

Hz; $p = 0.625$; and from 667.1 ± 114.2 to 662.8 ± 188.7 M Ω ; $p = 1$, Wilcoxon test; Figure 4, E and G). This set of experiments confirms the involvement of the NPS-NPSR signaling pathway in the hyperpolarizing effect of NPS on Gal-GFP neurons. These results indicate that under physiological conditions, NPS release could first depolarize local non-galaninergic GABAergic neurons, and then mediate a feed-forward inhibition onto sleep-promoting neurons.

NPS specifically increases the frequency of sIPSC input onto Gal-GFP neurons

To test whether the activation of presynaptic NPSR on GABAergic neurons could modulate spontaneous inhibitory (sIPSCs) or excitatory (sEPSCs) inputs onto Gal-GFP neurons, we recorded the spontaneous currents of Gal-GFP neurons in response to NPS application ($10 \mu\text{M}$, 4 minutes). The corresponding cumulative probability plots for the peak amplitude and interevent intervals of both sIPSCs and sEPSCs revealed that NPS application ($10 \mu\text{M}$, 4–6 minutes) induced a significant left shift in the cumulative probability distribution of the interevent interval of sIPSCs (K-S test; $p < 0.01$; Figure 5, A–E). Moreover, the mean change of IPSC frequency was significantly increased by $38.4 \pm 9.4\%$ in the presence of NPS (Wilcoxon test, $p < 0.01$; Figure 5C; Supplementary Figure S3). Spontaneous EPSCs were only observed in five out of

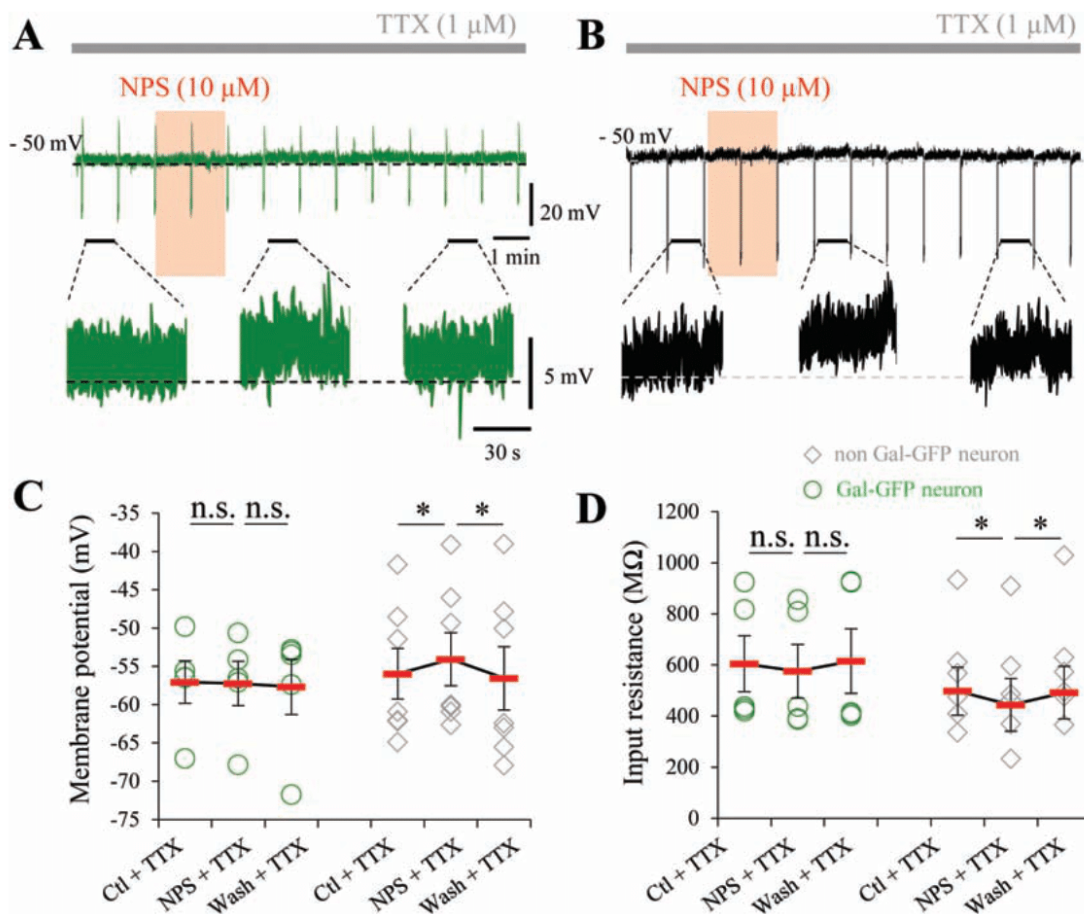


Figure 4. Pharmacological determination of the indirect inhibitory effect of NPS on Gal-GFP neurons. (A) Recording of an individual Gal-GFP neuron in current-clamp mode at a mean membrane potential of -50 mV (as indicated by the dashed line). The recording was performed in the presence of TTX (indicated by the gray bar). The orange box indicates the duration of NPS application (2 minute, 10 μ M). Hyperpolarizing currents were injected to monitor the input resistance. Zooms of the recording are represented in the bottom panel. (B) Same conditions as in (A), but on non-Gal-GFP neurons. (C–D) Plots of individual membrane variation (C) and input resistance (D) of Gal-GFP (green circles, $n = 5$) and in non-Gal-GFP neurons (gray diamond; $n = 7$) presence of TTX and in response to NPS application. Solid red bars denote average values. * $p < 0.05$, Wilcoxon test. (E) Same conditions as in (A), but in the presence of the NPSR antagonist S-20-Q (10 μ M; orange bar). The hyperpolarizing effect of NPS was occluded by S-20-Q. (F) Summary of NPS effects on the membrane potential of Gal-GFP (in green; $n = 8$ for Gal-GFP neurons, $n = 5$ for Gal-GFP neurons + TTX, and $n = 6$ for GFP neurons + S-20-Q) and non-Gal-GFP neurons (in black; $n = 7$ in each condition). Empty symbols represent the values of individual cells, and solid red bars denote average values. ** $p < 0.01$; Mann-Whitney U-test. Note: # indicates the condition where NPS had a significant effect (Wilcoxon test, # $p < 0.05$). (G) Plots of individual membrane variation (left panel), firing frequency (middle panel), and input resistance (right panel) of Gal-GFP (green circles) in the presence of S-20-Q and in response to NPS application. Solid red bars denote average values. * $p < 0.05$, Wilcoxon test.

six recorded Gal-GFP neurons. We did not observed any significant and reversible effect of NPS on sEPSCs (Figure 5, A, D, and E; Supplementary Figure S3). Individual raw data of NPS effect on sIPSCs and sEPSC variations in frequency and amplitude are represented in Supplementary Figure S3. These results support our hypothesis that the effects of NPS on Gal-GFP neurons could be mediated by the excitation of local non-Gal-GFP, which increases their sIPSC inputs onto sleep-promoting neurons.

NPS hyperpolarizing effect on Gal-GFP neurons is blocked in the presence of a GABA_A receptor antagonist

To determine whether the increase in IPSC frequency induced by NPS could be responsible for the effects seen in VLPO Gal-GFP neurons, the NPS effect was then tested in the presence of picrotoxin (100 μ M), a selective GABA_A receptor antagonist. We demonstrated that this treatment blocked the hyperpolarizing effect of NPS on Gal-GFP neurons (Figure 5, E and F). No significant membrane variation was induced by NPS application in the presence of

picrotoxin (-56.2 ± 0.9 to -56.7 ± 1.1 mV; $n = 6$; $p > 0.699$; Wilcoxon test; Figure 5, E and F). This result was significantly different from the NPS effect obtained in the absence of picrotoxin ($99.2 \pm 0.8\%$ vs. $93.8 \pm 1.7\%$; $p < 0.01$, Mann-Whitney U-test, Figure 5F). In addition, in the presence of picrotoxin, there was no effect of NPS on the firing frequency and input resistance of sleep-promoting neurons (2.4 ± 0.5 to 2.3 ± 0.6 Hz; $p = 0.699$; and 858.2 ± 69.8 to 855.1 ± 70.6 M Ω ; $p = 0.818$, Wilcoxon test; Figure 5G). This experiment supports our hypothesis that NPS may act indirectly on Gal-GFP neurons by regulating afferent GABA release.

Cellular sublocalization of NPSR mRNA

We performed triple FISH experiments on NPSR, GAD and Gal mRNAs within the core of the VLPO to identify the cellular sublocalization of NPSR mRNA expression. Out of 31 NPSR⁺ cells, only one cell was found co-expressing GAD and Gal (GAD⁺/Gal⁺ neuron); and 84% (26/31) only co-expressed GAD mRNAs (GAD⁺/Gal⁻ neurons; Figure 6A and Supplementary Figure S2).

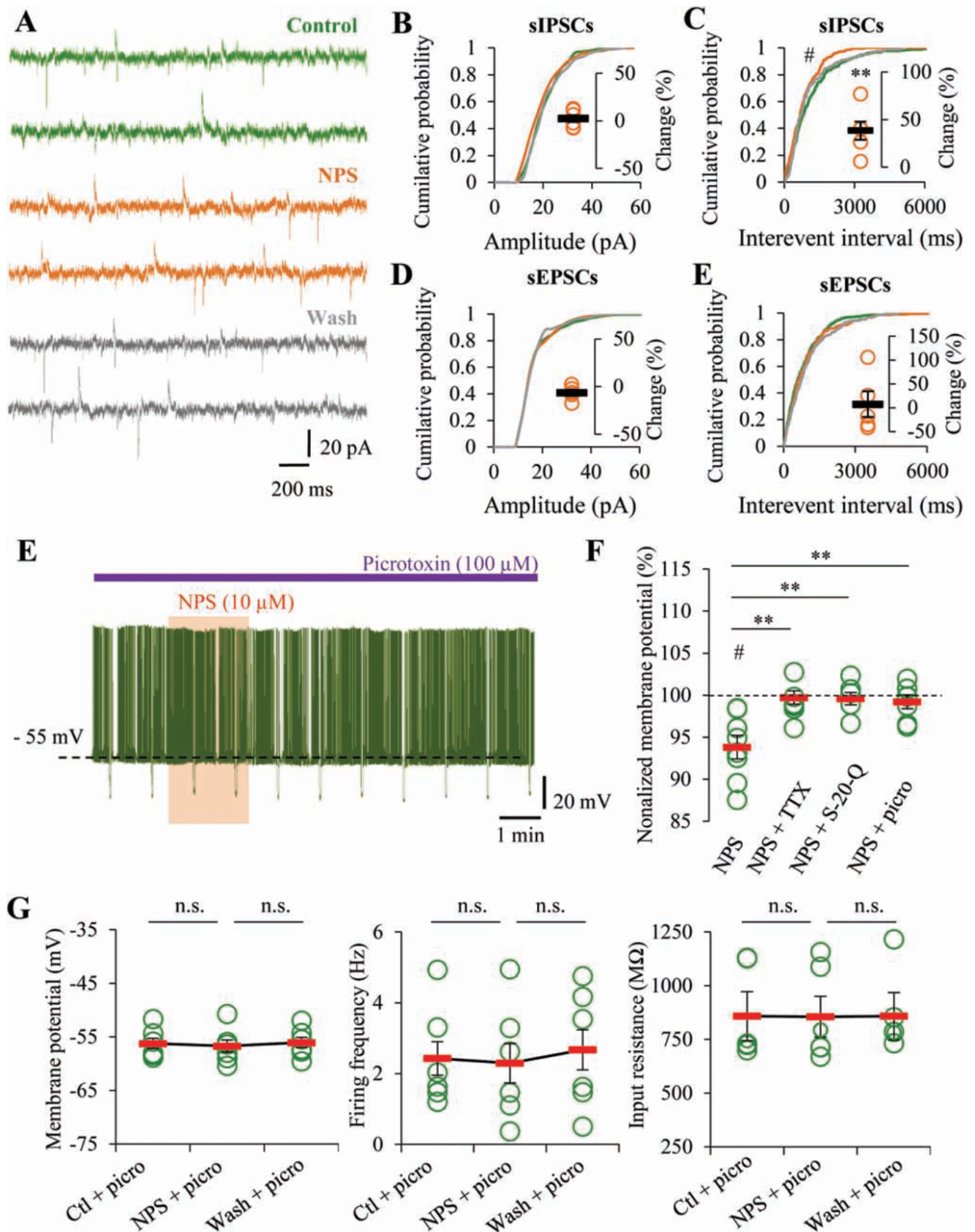


Figure 5. NPS increases the frequency of inhibitory synaptic inputs to Gal-GFP neurons. (A) Representative currents from one cell showing the effect of NPS (10 μ M, 4–6 minutes) on sIPSC and sEPSC. The holding potential was set at -55 mV. (B–E) Cumulative probability plots of sIPSC amplitude (B) and interevent interval (D) upon addition of NPS from the cell illustrated in A. Individual plots and averaged amplitude (C) and frequency (E) from all the cells ($n = 5$). (F–I) Same as in B–E but for sEPSC ($n = 4$). Wilcoxon test, * $p \leq 0.05$; K–S test, # $p \leq 0.05$.

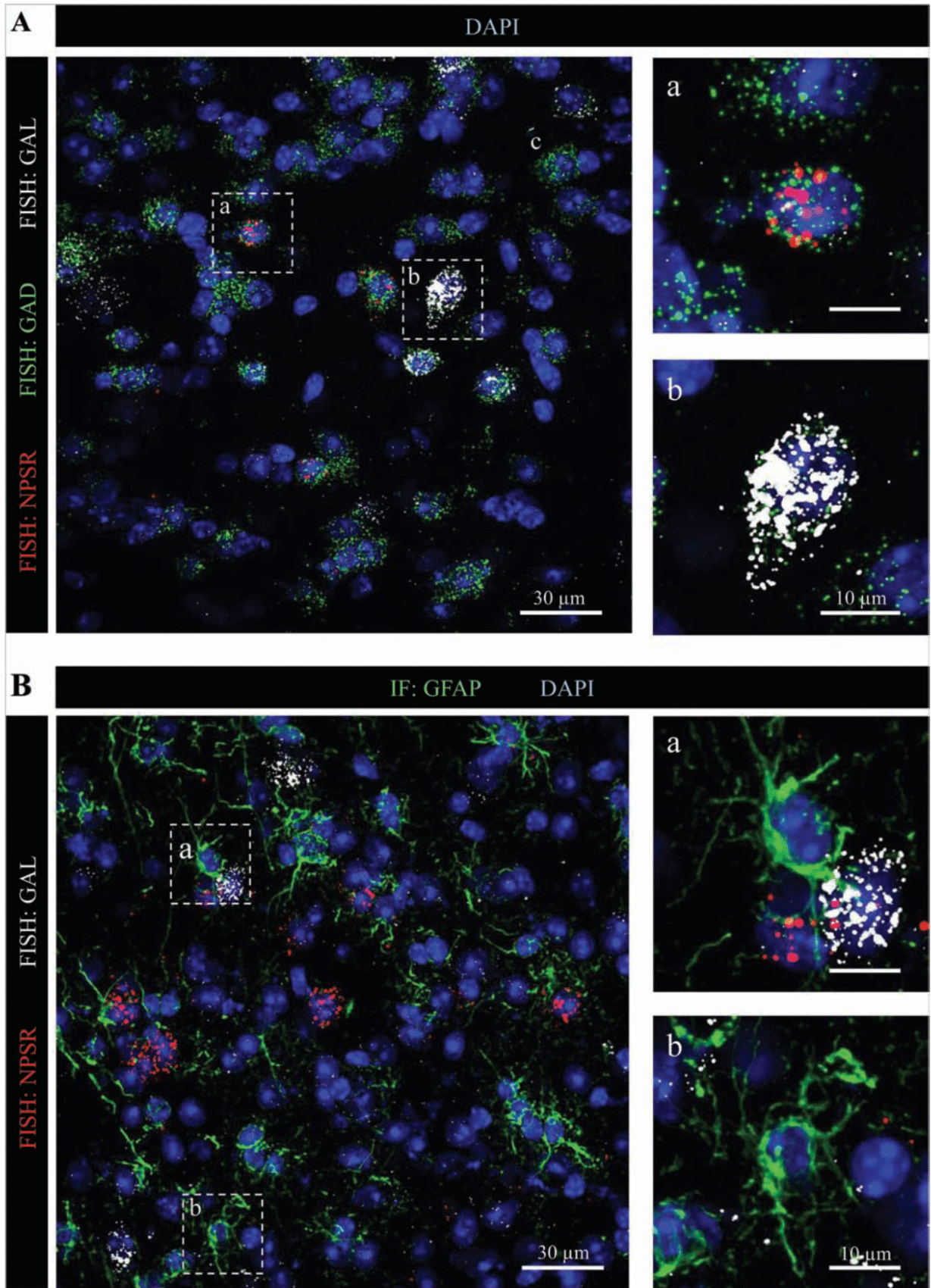


Figure 6. NPSR mRNAs are highly expressed by GAD⁺/Gal⁺ neurons. (A) Representative confocal images of GAD (green), Gal (white), and NPSR (red) transcripts detected by FISH in VLPO slices. Nuclei were stained with Hoechst stain (blue). (B) Representative confocal images of Gal (white) and NPSR (red) transcripts detected by FISH. Astrocytes were immunostained for GFAP (green), and nuclei were stained with Hoechst stain (blue) in VLPO slices.

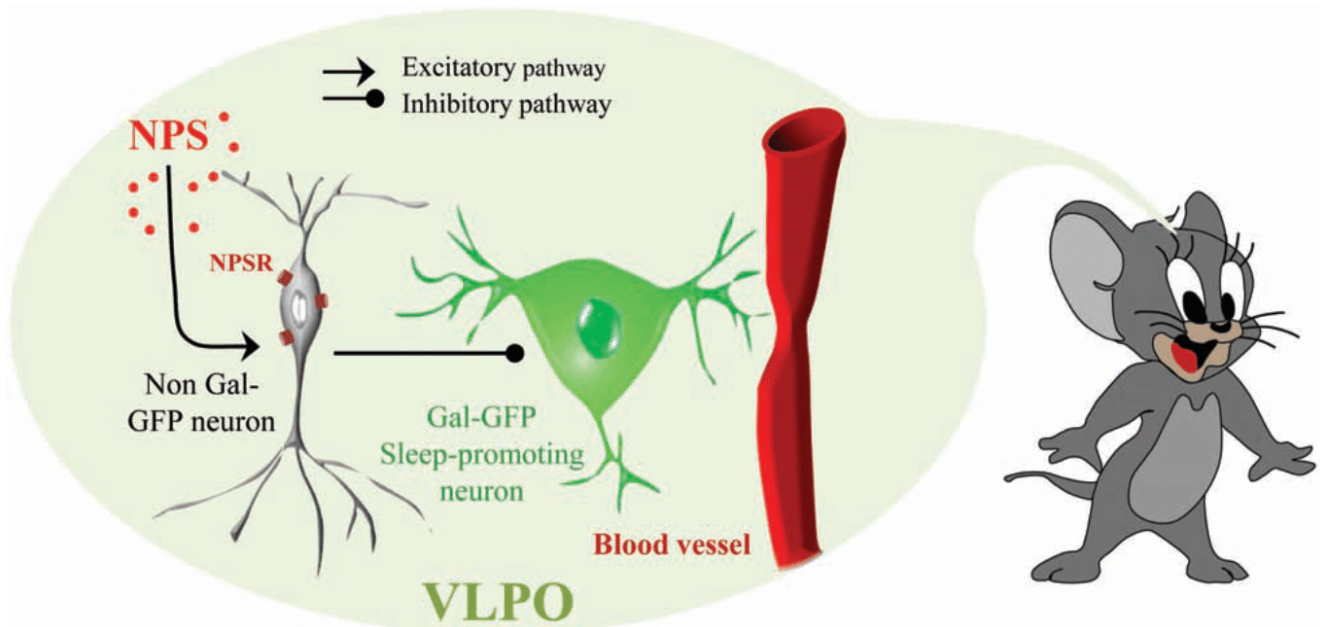


Figure 7. Putative model for how NPS contributes to the maintenance of wakefulness in the VLPO. NPS excites local non-galaninergic neurons, thus decreasing the activity of galaninergic sleep-promoting neurons. The downregulation of sleep-active neurons (i.e. the output neurons of the VLPO) then induces vasoconstriction, which reflects a downregulation of the local neuronal network, possibly promoting wakefulness.

Although NPS infusion did not fully prevent NREM sleep induction and maintenance, two out of five mice showed a total absence of NREM sleep episodes after NPS injection. The observed residual NREM sleep could result from natural activation of other brain structures that are also known to regulate NREM sleep onset. Indeed, the median preoptic nucleus (MnPO) also contains sleep-active neurons that display similar anatomical, physiological, and neurochemical properties as the VLPO neurons [46–48]. Furthermore, the medullary parafacial zone (PZ) also contains GABAergic/glycinergic neurons that are required for natural NREM sleep [49–51]. It has been suggested that VLPO and PZ neurons differentially target features of NREM sleep. The lesioning of either of these structures results in a nearly 50% decrease in NREM sleep. Moreover, VLPO lesions are accompanied by enhanced NREM sleep fragmentation [17], whereas PZ lesions decrease the number of episodes [49]. Here, we observed a strong effect of VLPO activity on the regulation of NREM sleep episode duration. In combination with the decrease in NREM sleep, there was a decrease in delta and low theta power during NREM sleep, which might reflect a lighter sleep state [52]. Regarding the wake state, we found that NPS had no significant effect on beta and gamma power. However, NPS did decrease delta and low theta, suggesting that this treatment favors a cortical arousal state, as previously observed following i.c.v. injection [13, 53]. Altogether, the present data suggest that NPS injection into the VLPO might induce NREM sleep delayed onset and disruption of NREM sleep episodes, leading to a sleep instability that favors arousal.

The NPS mode of action that leads to an enhanced wake state and a decrease in NREM sleep remains incompletely described. However, it is known that when i.c.v. is administered, NPS enhances c-Fos expression in orexinergic and histaminergic neurons of the hypothalamus [13]. These results suggest that the wake-promoting effect of NPS is mediated by the activation of orexinergic and histaminergic neurons. This effect could either be direct, as NPSRs have already been observed in these structures [2, 54], or it could be indirect and reinforced by the

new NPS regulatory pathway that we describe in this study. Indeed, we now demonstrate that NPS inhibits the sleep-promoting neurons of the VLPO, a structure that sends inhibitory projections to both orexinergic and histaminergic neurons [41, 55]. NPS could thus act in a cooperative fashion to enhance the excitability of some wake-active systems and inhibit sleep-promoting VLPO neurons. Finally, as NREM sleep regulation is also mediated by PZ neurons, it would be interesting to examine whether simultaneous injections of NPS into the VLPO and the PZ could fully prevent NREM sleep induction and maintenance.

The NPS-NPSR signaling pathway within the VLPO

The cell-specific NPS effects in the VLPO that we described in this study are similar to those that were previously described in the amygdala [9]. Indeed, previous research has identified that NPS controls neuronal activity in the basolateral amygdala via direct action on the endopiriform nucleus, modulating the GABAergic feed-forward inhibition in the basolateral amygdala [43]. Here, we demonstrated in the VLPO that NPS directly excites potent local GABAergic interneurons, thus suggesting that it also indirectly inhibits sleep-promoting neurons. We have indeed shown that NPS decreases the input resistance of non-Gal-GFP neurons by 19%, accompanied by membrane depolarization and increased neuronal firing. Accordingly, we demonstrated that NPS increases the frequency of sIPSCs on sleep-promoting neurons without changing their amplitude, suggesting a pre-synaptic action for NPS. NPS was also observed to significantly decrease the input resistance of Gal-GFP neurons by 6%, associated with membrane hyperpolarization and decreased neuronal firing. Our finding that the Gal-GFP neuronal firing frequency is higher than in non-Gal-GFP neurons is in good agreement with one of our previous studies, where we determined in cell-attached recordings that NA (-) cells spontaneously discharge at a higher firing rate than NA (+) cells (4.7 ± 0.7 Hz vs. 2.8 ± 0.3 Hz, respectively) [23]. A similar indirect regulation of VLPO

sleep-promoting neuronal activity has been reported for histamine, which depolarizes the membrane potential of the same potent interneurons and ultimately results in the indirect hyperpolarization of sleep-promoting cells [36].

Finally, our FISH results reveal that NPSR mRNAs are preferentially located on local GAD⁺/Gal⁺ neurons, which are depolarized by NPS application. This finding is in line with the previous observation that NPSR activation enhances neuronal excitability [6]. Indeed, NPSR mediates predominantly excitatory signals [56] and is believed to be selectively coupled (with a high affinity) to Gs and Gq protein-couple receptors, increasing intracellular Ca²⁺ and cAMP levels [6, 57]. Therefore, the depolarization of local GABAergic neurons by NPS could increase the frequency of IPSCs on sleep-promoting neurons, leading to their inhibition. Alternatively, since other GABAergic terminals are also present in the VLPO, it might be possible that their stimulation by presynaptic NPSR activation could lead to an increase in IPSC frequency inputs on sleep-promoting neurons, leading to their hyperpolarization. We also demonstrated that in the presence of a GABA_A receptor antagonist, the NPS effects on sleep-promoting neurons were prevented, supporting the hypothesis of a presynaptic action of NPS, that in turn leads to an increased frequency of IPSCs on sleep-promoting neurons, and thereby to their inhibition.

NPS has been well-conserved throughout evolution, suggesting a central role in important physiological functions. For instance, NPS has been shown to be involved in high-stress social interactions. Specifically, NPS release in the amygdala after exposure to an uncontrollable stress results in a submissive behavior [58], which is associated with an anxiolytic effect [59] and the modulation of fear memory [10]. Here, we demonstrated that NPS also regulates the vigilance level.

Hemodynamic responses to NPS within the VLPO also reinforce our hypothesis of a direct action of NPS on local GABAergic neurons and the indirect modulation of the principal cells of the VLPO which are the sleep-promoting neurons. Indeed, it is well accepted that predominant neuronal depolarization corresponds to a local increase in blood flow and oxygenation (i.e. vasodilation), whereas predominant hyperpolarization is associated with a decrease in blood flow and oxygenation (i.e. vasoconstriction) [60, 61]. We have shown that NPS application in the VLPO directly depolarizes local GABAergic neurons to induce a local vasodilation, as revealed in the presence of TTX. However, the subsequent indirect inhibition of sleep-promoting neurons then induces a strong vasoconstriction, reversing the vasodilatory effect induced by the depolarization of NPSR-expressing cells.

Conclusions

The present study identifies a novel direct effect of NPS in the VLPO that decreases the time spent in NREM sleep. This effect reduced episode duration in association with an increase in the time spent in the wake state, mediated by an indirect feed-forward inhibition onto sleep-promoting neurons of the VLPO.

NPS release is associated with an intense stress exposure that leads to insomnia and post-traumatic stress disorders. Therefore, a better determination of the NPR-NPSR signaling pathway could provide new means for identifying the neurobiological processes underlying sleep physiology, which is a prerequisite for developing pharmacological treatments and behavioral strategies to treat sleep dysfunctions.

Supplementary material

Supplementary material is available at SLEEP online.

Funding

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the French Institute of Health and Medical Research (Inserm), and the Collège de France. The research work of F.C. was funded by the Direction Générale de l'armement (General Directorate for Armament) (grant number: 12CA703).

Acknowledgments

We thank all members of the animal house facility from Orsay and the Collège de France. We gratefully acknowledge the IT staff, and Aurélien Agneray in particular from the Collège de France, for their excellent and prompt technical assistance. We thank Dr. M. Cohen-Salmon and Marc Oudart for their help and FISH expertise. The authors thank Brandon Loveall from Improvement for English proofreading of the manuscript. *Conflict of interest statement.* None declared.

References

- Xu Y-L, et al. Distribution of neuropeptide S Receptor mRNA and neurochemical characteristics of Neuropeptide S-Expressing neurons in the rat brain. *J Comp Neurol.* 2007;**504**(3):287–297.
- Liu X, et al. Molecular fingerprint of neuropeptide S-producing neurons in the mouse brain. *J Comp Neurol.* 2011;**519**(10):1847–1866.
- Okamura N, et al. Neuropeptide S enhances memory during the consolidation phase and interacts with noradrenergic systems in the brain. *Neuropsychopharmacology.* 2011;**36**(4):744–752.
- Han RW, et al. Neuropeptide S facilitates spatial memory and mitigates spatial memory impairment induced by N-methyl-D-aspartate receptor antagonist in mice. *Neurosci Lett.* 2009;**455**(1):74–77.
- Thomasson J, et al. Neuropeptide S overcomes short term memory deficit induced by sleep restriction by increasing prefrontal cortex activity. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2017;**27**(12):1308–1318.
- Xu YL, et al. Neuropeptide S: a neuropeptide promoting arousal and anxiolytic-like effects. *Neuron.* 2004;**43**(4):487–497.
- Leonard SK, et al. Pharmacology of neuropeptide S in mice: therapeutic relevance to anxiety disorders. *Psychopharmacology (Berl).* 2008;**197**(4):601–611.
- Vitale G, et al. Anxiolytic-like effect of neuropeptide S in the rat defensive burying. *Peptides.* 2008;**29**(12):2286–2291.
- Jüngling K, et al. Neuropeptide S-mediated control of fear expression and extinction: role of intercalated GABAergic neurons in the amygdala. *Neuron.* 2008;**59**(2):298–310.
- Chauveau F, et al. Prevention of stress-impaired fear extinction through neuropeptide s action in the lateral amygdala. *Neuropsychopharmacology.* 2012;**37**(7):1588–1599.
- Chan-Chee C, et al. [Epidemiology of insomnia in France]. *Rev Epidemiol Sante Publique.* 2011;**59**(6):409–422.

12. Ford ES, et al. Trends in insomnia and excessive daytime sleepiness among U.S. adults from 2002 to 2012. *Sleep Med.* 2015;**16**(3):372–378.
13. Zhao P, et al. Neuropeptide S promotes wakefulness through activation of the posterior hypothalamic histaminergic and orexinergic neurons. *Neuroscience.* 2012;**207**:218–226.
14. Oishi M, et al. Endogenous neuropeptide S tone influences sleep-wake rhythm in rats. *Neurosci Lett.* 2014;**581**:94–97.
15. Spada J, et al. Genetic association of objective sleep phenotypes with a functional polymorphism in the neuropeptide S receptor gene. *PLoS One.* 2014;**9**(6):e98789.
16. Adori C, et al. Exploring the role of neuropeptide S in the regulation of arousal: a functional anatomical study. *Brain Struct Funct.* 2016;**221**(7):3521–3546.
17. Lu J, et al. Effect of lesions of the ventrolateral preoptic nucleus on NREM and REM sleep. *J Neurosci.* 2000;**20**(10):3830–3842.
18. Sherin JE, et al. Activation of ventrolateral preoptic neurons during sleep. *Science.* 1996;**271**(5246):216–219.
19. Szymusiak R, et al. Sleep-waking discharge patterns of ventrolateral preoptic/anterior hypothalamic neurons in rats. *Brain Res.* 1998;**803**(1-2):178–188.
20. Gong S, et al. A gene expression atlas of the central nervous system based on bacterial artificial chromosomes. *Nature.* 2003;**425**(6961):917–925.
21. Varin C, et al. Glucose induces slow-wave sleep by exciting the sleep-promoting neurons in the ventrolateral preoptic nucleus: a new link between sleep and metabolism. *J Neurosci.* 2015;**35**(27):9900–9911.
22. Franklin KBJ, Paxinos G. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, 3rd edn. San Diego: Academic Press; 2007.
23. Dubourget R, et al. Multiparametric characterization of neuronal subpopulations in the ventrolateral preoptic nucleus. *Brain Struct Funct.* 2017;**222**(3):1–15.
24. Sangare A, et al. Serotonin differentially modulates excitatory and inhibitory synaptic inputs to putative sleep-promoting neurons of the ventrolateral preoptic nucleus. *Neuropharmacology.* 2016;**109**:29–40.
25. Logothetis NK, et al. Neurophysiological investigation of the basis of the fMRI signal. *Nature.* 2001;**412**(6843):150–157.
26. Cauli B, et al. Cortical GABA interneurons in neurovascular coupling: relays for subcortical vasoactive pathways. *J Neurosci.* 2004;**24**(41):8940–8949.
27. Rancillac A, et al. Glutamatergic control of microvascular tone by distinct GABA neurons in the cerebellum. *J Neurosci.* 2006;**26**(26):6997–7006.
28. Macé E, et al. Functional ultrasound imaging of the brain. *Nat Methods.* 2011;**8**(8):662–664.
29. Iadecola C. The Neurovascular unit coming of age: a journey through neurovascular coupling in health and disease. *Neuron.* 2017;**96**(1):17–42.
30. Scharbarg E, et al. Astrocyte-derived adenosine is central to the hypnogenic effect of glucose. *Sci Rep.* 2016;**6**:19107.
31. Gallopin T, et al. Identification of sleep-promoting neurons in vitro. *Nature.* 2000;**404**(6781):992–995.
32. Liu YW, et al. Propofol stimulates noradrenalin-inhibited neurons in the ventrolateral preoptic nucleus by reducing GABAergic inhibition. *Anesth Analg.* 2013;**117**(2):358–363.
33. Moore JT, et al. Direct activation of sleep-promoting VLPO neurons by volatile anesthetics contributes to anesthetic hypnosis. *Curr Biol.* 2012;**22**(21):2008–2016.
34. McCarren HS, et al. α 2-Adrenergic stimulation of the ventrolateral preoptic nucleus destabilizes the anesthetic state. *J Neurosci.* 2014;**34**(49):16385–16396.
35. Matsuo S, et al. alpha 2-Adrenoceptor-mediated pre-synaptic modulation of GABAergic transmission in mechanically dissociated rat ventrolateral preoptic neurons. *J Neurophysiol.* 2003;**89**(3):1640–1648.
36. Liu YW, et al. Histamine regulates activities of neurons in the ventrolateral preoptic nucleus. *J Physiol.* 2010;**588**(Pt 21):4103–4116.
37. Williams RH, et al. Optogenetic-mediated release of histamine reveals distal and autoregulatory mechanisms for controlling arousal. *J Neurosci.* 2014;**34**(17):6023–6029.
38. Gallopin T, et al. The endogenous somnogen adenosine excites a subset of sleep-promoting neurons via A2A receptors in the ventrolateral preoptic nucleus. *Neuroscience.* 2005;**134**(4):1377–1390.
39. Gaus SE, et al. Ventrolateral preoptic nucleus contains sleep-active, galaninergic neurons in multiple mammalian species. *Neuroscience.* 2002;**115**(1):285–294.
40. Lu J, et al. Selective activation of the extended ventrolateral preoptic nucleus during rapid eye movement sleep. *J Neurosci.* 2002;**22**(11):4568–4576.
41. Sherin JE, et al. Innervation of histaminergic tuberomammillary neurons by GABAergic and galaninergic neurons in the ventrolateral preoptic nucleus of the rat. *J Neurosci.* 1998;**18**(12):4705–4721.
42. Kroeger D, et al. Galanin neurons in the ventrolateral preoptic area promote sleep and heat loss in mice. *Nat Commun.* 2018;**9**(1):4129.
43. Meis S, et al. Identification of a neuropeptide S responsive circuitry shaping amygdala activity via the endopiriform nucleus. *PLoS One.* 2008;**3**(7):e2695.
44. Rizzi A, et al. Neuropeptide S is a stimulatory anxiolytic agent: a behavioural study in mice. *Br J Pharmacol.* 2009;**154**(2):471–479.
45. Kushikata T, et al. The effects of neuropeptide S on general anesthesia in rats. *Anesth Analg.* 2011;**112**(4):845–849.
46. Gong H, et al. Activation of c-fos in GABAergic neurones in the preoptic area during sleep and in response to sleep deprivation. *J Physiol.* 2004;**556**(Pt 3):935–946.
47. Gong H, et al. Sleep-related c-Fos protein expression in the preoptic hypothalamus: effects of ambient warming. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000;**279**(6):R2079–R2088.
48. Uschakov A, et al. Sleep-active neurons in the preoptic area project to the hypothalamic paraventricular nucleus and perifornical lateral hypothalamus. *Eur J Neurosci.* 2006;**23**(12):3284–3296.
49. Anacleit C, et al. The GABAergic parafacial zone is a medullary slow wave sleep-promoting center. *Nat Neurosci.* 2014;**17**(9):1217–1224.
50. Anacleit C, et al. Identification and characterization of a sleep-active cell group in the rostral medullary brainstem. *J Neurosci.* 2012;**32**(50):17970–17976.
51. Batini C, et al. Persistent patterns of wakefulness in the pretrigeminal midpontine preparation. *Science.* 1958;**128**(3314):30–32.
52. Steriade M. Synchronized activities of coupled oscillators in the cerebral cortex and thalamus at different levels of vigilance. *Cereb Cortex.* 1997;**7**(6):583–604.

53. Ahnaou A, et al. Neuropeptide-S evoked arousal with electroencephalogram slow-wave compensatory drive in rats. *Neuropsychobiology*. 2012;**65**(4):195–205.
54. Sutcliffe JG, et al. The hypocretins: setting the arousal threshold. *Nat Rev Neurosci*. 2002;**3**(5):339–349.
55. Saito YC, et al. GABAergic neurons in the preoptic area send direct inhibitory projections to orexin neurons. *Front Neural Circuits*. 2013;**7**:192.
56. Reinscheid RK, et al. Neuropeptide S and its receptor: a newly deorphanized G protein-coupled receptor system. *Neuroscientist*. 2005;**11**(6):532–538.
57. Erdmann F, et al. Neuronal expression of the human neuropeptide S receptor NPSR1 identifies NPS-induced calcium signaling pathways. *PLoS One*. 2015;**10**(2):e0117319.
58. Ebner K, et al. Increased in vivo release of neuropeptide S in the amygdala of freely moving rats after local depolarisation and emotional stress. *Amino Acids*. 2011;**41**(4):991–996.
59. Wegener G, et al. Neuropeptide S alters anxiety, but not depression-like behaviour in flinders sensitive line rats: a genetic animal model of depression. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2012;**15**(3):375–387.
60. Wade AR, et al. Early suppressive mechanisms and the negative blood oxygenation level-dependent response in human visual cortex. *J Neurosci*. 2010;**30**(14):5008–5019.
61. Devor A, et al. Suppressed neuronal activity and concurrent arteriolar vasoconstriction may explain negative blood oxygenation level-dependent signal. *J Neurosci*. 2007;**27**(16):4452–4459.

Prostaglandin D₂ Controls Local Blood Flow and Sleep-Promoting Neurons in the VLPO via Astrocyte-Derived Adenosine

Published as part of the ACS Chemical Neuroscience special issue "Monitoring Molecules in Neuroscience 2023".

Emeric Scharbarg, Augustin Walter, Laure Lecoin, Thierry Gallopin, Frédéric Lemaître, Manon Guille-Collignon, Nathalie Rouach, and Armelle Rancillac*

Cite This: <https://doi.org/10.1021/acscemneuro.2c00660>

Read Online

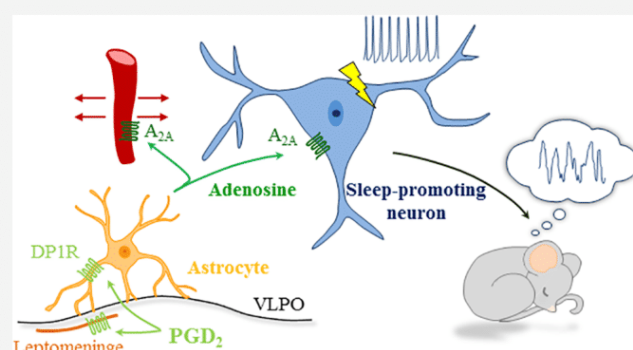
ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

ABSTRACT: Prostaglandin D₂ (PGD₂) is one of the most potent endogenous sleep-promoting molecules. However, the cellular and molecular mechanisms of the PGD₂-induced activation of sleep-promoting neurons in the ventrolateral preoptic nucleus (VLPO), the major nonrapid eye movement (NREM)-sleep center, still remains unclear. We here show that PGD₂ receptors (DP₁) are not only expressed in the leptomeninges but also in astrocytes from the VLPO. We further demonstrate, by performing real-time measurements of extracellular adenosine using purine enzymatic biosensors in the VLPO, that PGD₂ application causes a 40% increase in adenosine level, via an astroglial release. Measurements of vasodilatory responses and electrophysiological recordings finally reveal that, in response to PGD₂ application, adenosine release induces an A_{2A}R-mediated dilatation of blood vessels and activation of VLPO sleep-promoting neurons. Altogether, our results unravel the PGD₂ signaling pathway in the VLPO, controlling local blood flow and sleep-promoting neurons, via astrocyte-derived adenosine.

KEYWORDS: Purine enzymatic biosensors, PGD₂ receptors (DP₁R), Neurovascular coupling, Sleep-promoting neurons, NREM sleep, Neuroglial interactions, A_{2A} receptors (A_{2A}R)



INTRODUCTION

Prostaglandin D₂ (PGD₂) is the most potent endogenous sleep-promoting molecule.^{1–4} Its concentration in cerebrospinal fluid exhibits a circadian variation synchronized with the sleep–wake cycle.⁵ Immunofluorescence labeling and *in situ* hybridization have shown that PGD₂ receptors (DP₁R) are almost exclusively expressed in some arachnoid trabecular cells of the basal forebrain.^{6,7} Activation of DP₁R by PGD₂ infusion via the microdialysis probe was further shown to induce adenosine release in a dose-dependent manner in the subarachnoid space of the basal forebrain and to promote sleep via the adenosine A_{2A} receptor (A_{2A}R) activation. Pretreatment with a specific adenosine A_{2A}R antagonist indeed reduces the amount of PGD₂-induced sleep.⁷ *In vivo* administration of PGD₂ by microdialysis probes was tested in various rat brain regions and identified the ventral surface of the rostral basal forebrain as the most effective area in promoting nonrapid eye movement (NREM) sleep,^{1,4} which was reduced by an adenosine A_{2A} antagonist.⁸ However, combining PGD₂ infusion with c-Fos immunolabeling revealed c-Fos-immunoreactivity in the ventrolateral preoptic nucleus

(VLPO), the major NREM sleep center,⁹ whereas the basal forebrain remained unlabeled.³

Therefore, although several key aspects regarding PGD₂-induced sleep have been elucidated, our understanding of its physiological mechanisms is still incomplete. The VLPO being a very small brain structure, deeply localized, and not anatomically well-defined complicates its investigation. This study thus here aims to decipher how, locally in the VLPO, PGD₂ leads to the activation of sleep-promoting neurons.

RESULTS AND DISCUSSION

With NREM sleep induction by PGD₂ infusion being completely dependent on the activation of its DP₁ receptor,² we first investigated the expression of this receptor in the

Received: October 27, 2022

Accepted: February 21, 2023

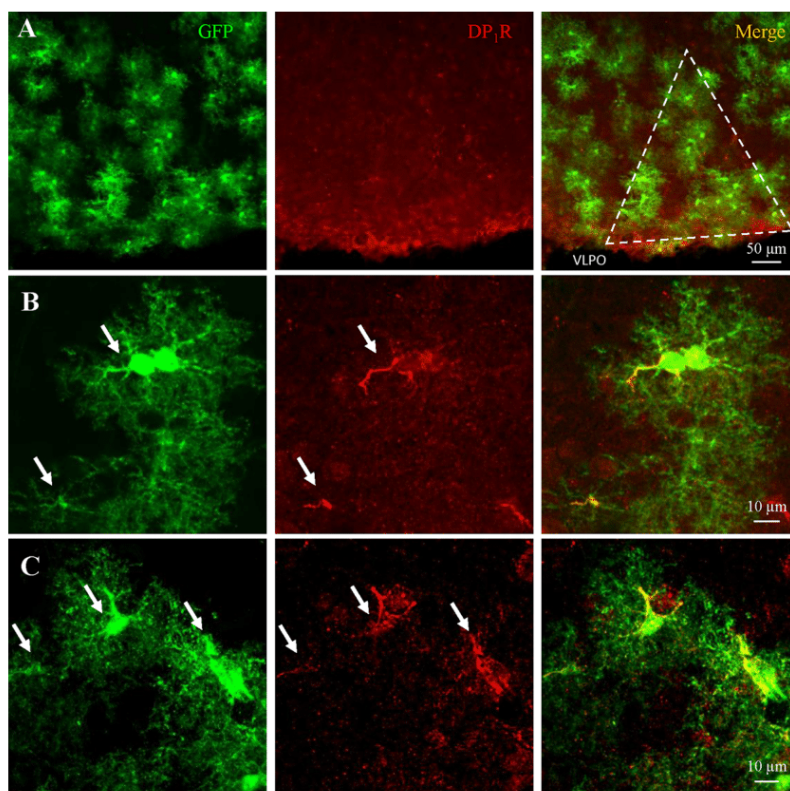


Figure 1. Astrocytes in the VLPO express DP₁R. (A) Confocal images showing immunostaining of DP₁R (in red) in the leptomeninges and the VLPO, as highlighted by a white dashed triangle. (B and C) Confocal images reveal that astrocytes from GFAP-GFP mice (in green) are also expressing DP₁R (in red). White arrows indicate regions of strong colabeling.

VLPO (Figure 1). Confirming previous reports from the literature, we also observed strong immunostaining on the leptomeninges at the border of the VLPO. However, we also find an immunolabeling into the VLPO (Figure 1A). We used GFAP-GFP-expressing mice to further reveal whether astrocytes could indeed express the DP₁ receptor. This transgenic mouse line has the interesting property of having only some astrocytes expressing GFP, not all of them, allowing better identification of individual cells. For the first time, we revealed that almost all GFP-GFAP-labeled VLPO astrocytes are expressing DP₁R, with a dense expression on the somata and primary processes (Figure 1B,C).

Next, to assess whether an increased level of PGD₂ is also associated with adenosine released in the VLPO, we performed real-time measurements of extracellular adenosine using purine enzymatic biosensors on brain slices^{10–13} (Figure 2). Measurements with adenosine (ADO) probes represent total purinergic responses and were referred to as ADO' (Figure 2B). In the VLPO, we measured a basal ADO' level of $2.24 \pm 0.22 \mu\text{M}$, which significantly increased to $3.13 \pm 0.35 \mu\text{M}$ under PGD₂. ADO's level decreased to $2.23 \pm 0.44 \mu\text{M}$ after the wash (Figure 2C,D). These experiments were then reproduced using INO biosensors to evaluate the proportion of inosine and its metabolites in the ADO' recording. We measured a variation from 1.13 ± 0.042 to $1.53 \pm 0.13 \mu\text{M}$ in response to PGD₂, indicating that approximately ~50% of the ADO' signal was specific to adenosine.

To further investigate whether adenosine is released by astrocytes in response to PGD₂, we performed real-time ADO measurements in pretreated slices and continuously perfused them with the glial toxin fluoroacetate (FAC; 5 mM). As

shown in Figure 2D, FAC treatment completely abolished the adenosinergic tone below the detection limit of the probe, as well as the ADO response to PGD₂ application ($0.1 \pm 0.1 \mu\text{M}$; Figure 2D). This result points to the role of glial cells as essential effectors of the PGD₂-dependent increase in extracellular ADO levels.

Adenosine is a potent vasodilator acting on vascular adenosine A_{2A} receptors (A_{2A}R).^{14,15} We thus investigated the putative release of adenosine in response to PGD₂ application by recording blood vessel diameter changes in the VLPO (Figure 3). We found that PGD₂ reversibly dilated intraparenchymal arterioles within the VLPO, by $12.17 \pm 3.93\%$ ($n = 7$; $P \leq 0.001$; Wilcoxon test, Figure 3). This response was blocked in the presence of a selective A_{2A}R antagonist (ZM241385; $10 \mu\text{M}$, $n = 5$; $P = 0.125$, Wilcoxon test, Figure 3B,C) and was also significantly impaired compared to control conditions ($P < 0.01$; Mann–Whitney *U* test, Figure 3C), indicating that PGD₂ induces adenosine-mediated signaling.

Several reports have suggested that increased adenosine levels can modulate the activity of adenosine A_{2A}R-expressing neurons in the VLPO.^{2,11,16–18} To further investigate whether PGD₂ can induce neuronal depolarization within the VLPO, we performed patch-clamp recordings of sleep-promoting neurons in response to the bath application of PGD₂ (Figure 4A,B). To identify sleep-promoting neurons in the VLPO, we used a transgenic mouse selectively expressing the green fluorescent protein (GFP) in galanin-expressing neurons (Gal-GFP mice). Galanin is indeed a reliable chemical marker of sleep-promoting neurons in the VLPO and allows clear

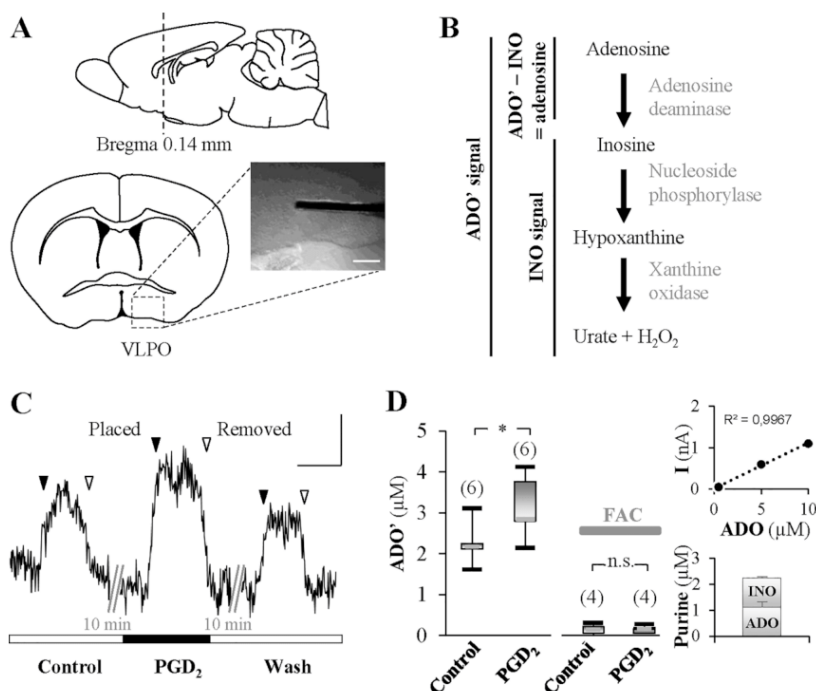


Figure 2. *In situ* measurements of astrocytic-derived adenosine in response to PGD_2 application in the VLPO. (A) Sagittal schematic representation of the mouse brain (top) and a VLPO slice at Bregma 0.14 mm (bottom). Photomicrograph of an ADO biosensor within the VLPO. Scale bar: 180 μm . (B) Enzymatic cascades used to measure adenosine and inosine. Adenosine biosensor measurements give a total purinergic concentration of adenosine and its metabolites called ADO'. The signal of INO is thereafter subtracted to obtain the ADO signal. (C) Representative recording of real-time ADO' signals within the VLPO. ADO biosensors were lowered into the VLPO area ("Placed"; black arrowheads) and raised ("Removed" white arrowheads) successively in control, 1 μM of PGD_2 , and after a 10 min wash back again into the tissue to prevent the probe desensitization. Scale bar: 1 min, 0.05 nA. (D) Left: box plots of the ADO' measurements under the control conditions, under PGD_2 (1 μM) and in the presence of fluoroacetate (FAC; 5 mM), a glial toxin. The median is plotted as the central gray bar of the box; the upper and lower quartiles are the edges of the box, and the whiskers show the extremes of the distribution. Sample sizes are indicated in parentheses. Right: example of a calibration curve from the adenosine biosensor showing a linear response from 1 to 10 μM adenosine (top), with ratios of ADO ($n = 6$) and INO ($n = 3$) detected in the VLPO under the control conditions (bottom). * $P < 0.05$, Wilcoxon matched-pairs signed rank test.

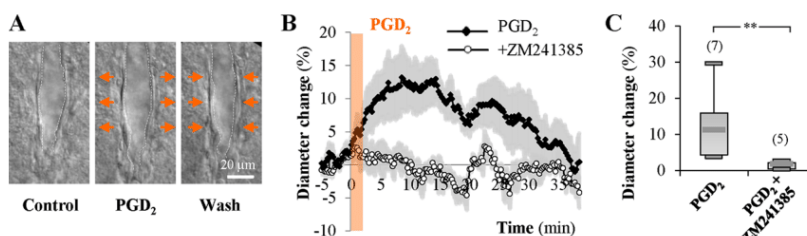


Figure 3. PGD_2 induces A_{2A} -mediated vasodilation in the VLPO. (A) Photograph of a vascular response induced by bath application of PGD_2 (1 μM ; 2 min). The dotted white lines highlight the inner diameter of the blood vessel. (B) Mean \pm SEM vascular responses induced by 2 min application of PGD_2 alone (black diamond; $n = 7$) or in the presence of ZM241385, an A_{2A} receptor antagonist (open circle; $n = 5$). (C) Box plots of the vascular response measured at 9–10 min after PGD_2 application onset. The median is plotted as the central gray bar of the box; the upper and lower quartiles are the edges of the box, and the whiskers show the extremes of the distribution. Sample sizes are indicated in parentheses. ** $P < 0.01$; Mann–Whitney U test.

identification of these neurons in an acute slice preparation.^{19–21}

Patch-clamp recordings of Gal-GFP neurons showed that PGD_2 application induces a significant membrane depolarization of 5.79 ± 0.98 mV ($n = 6$; $P < 0.05$, Wilcoxon test; Figure 4A,B). Additionally, their input resistance was reduced by 8.77% (from 977.68 ± 66.89 to 891.95 ± 54.85 M Ω) in response to PGD_2 application. The depolarizing effect of PGD_2 persisted in the presence of TTX and was not statistically reduced compared to the one induced in the absence of TTX (3.04 ± 0.92 mV, $n = 5$; $P = 0.515$, ANOVA and Kruskal–Wallis multicomparisons test; Figure 4B). Moreover, PGD_2

application in the presence of TTX still reduces neuronal input resistances by 8.86% (from 1183.19 ± 168.05 to 1078.39 ± 148.51 M Ω) indicating a direct effect of PGD_2 on sleep-promoting neurons. However, in the presence of an adenosine A_{2A} antagonist, ZM241385, the depolarization induced by PGD_2 was blocked (-0.08 ± 0.85 mV; $n = 4$; $P < 0.01$, ANOVA and Kruskal–Wallis multicomparisons test; Figure 4B) and the reduction of the input resistance was significantly less reduced, by 4.37% (from 9886.78 ± 92.32 to 943.67 ± 88.50 M Ω ; ANOVA and Kruskal–Wallis multicomparisons test; Figure 4B). These data further show that in the VLPO,

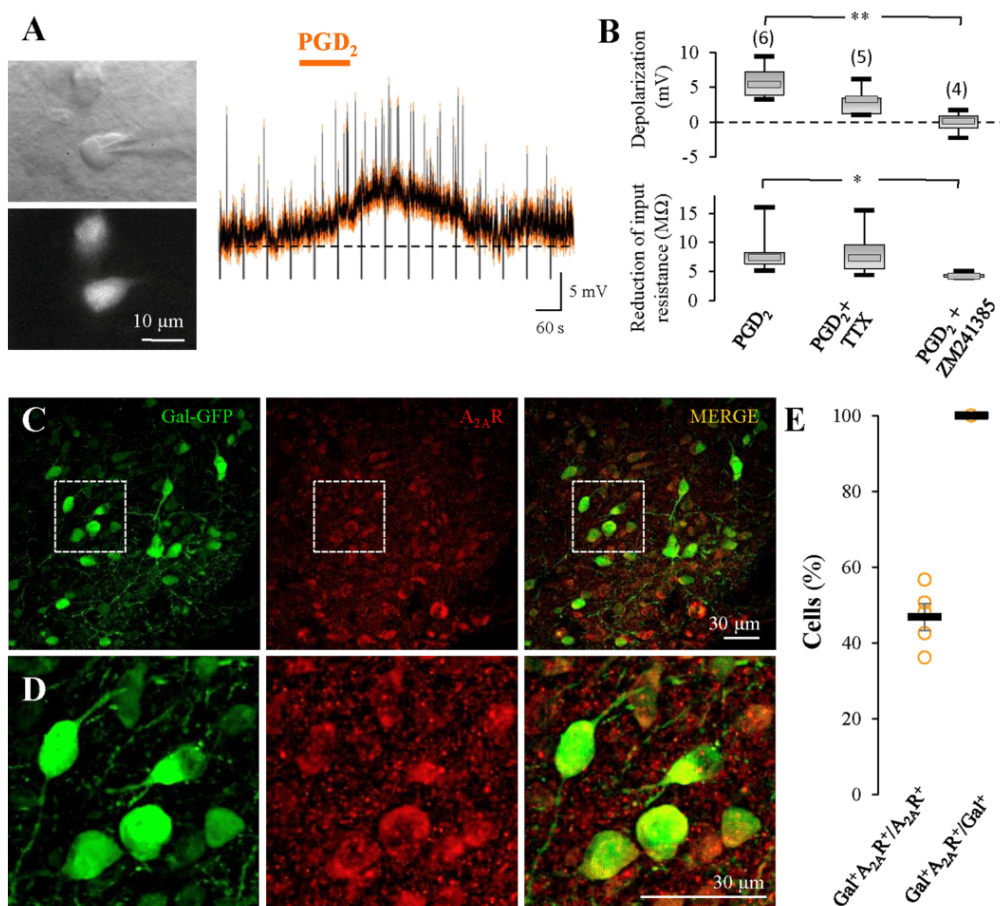


Figure 4. PGD₂ depolarizes Gal-GFP neurons via A_{2A}R activation. (A) Left: epifluorescence and infrared images of the recorded Gal-GFP neuron. Right: mean (black) \pm SEM (orange) electrophysiological response in current-clamp of a Gal-GFP neuron to PGD₂ application (1 μ M; 2 min, $n = 6$). The black dashed bar indicates the membrane potential of -58 mV. (B) Box plots of the depolarizations induced by PGD₂ (top) and of the reduction of the input resistance (bottom). The median is plotted as the central gray bar of the box; the upper and lower quartiles are the edges of the box, and the whiskers show the extremes of the distribution. Sample sizes are indicated in parentheses. (C) Confocal images showing the expression of A_{2A}R (red) in Gal-GFP neurons (green) and their merge (orange). (D) Confocal zooms of ROIs are indicated by dashed white squares in C. (E) Plots of means of labeled cells per animal (orange circles, $n = 5$) and the global mean (black bar). ** $P < 0.01$, ANOVA and Kruskal–Wallis multi-comparisons test.

PGD₂ induces adenosine release, which could then activate A_{2A}R on sleep-promoting neurons.

The presence of A_{2A}R on sleep-promoting neurons was previously suggested either pharmacologically by electrophysiological recordings^{11,17} or molecularly using A_{2A}R receptor-deficient mice²² or using sleep–wake behavior analyses associated with c-Fos-IR quantification in the VLPO.¹⁸ To firmly demonstrate that these receptors are indeed expressed by sleep-promoting neurons, we performed the immunostaining of A_{2A}R and found that nearly all Gal-GFP neurons expressed this receptor, and $\sim 50\%$ of A_{2A}R expressing cells were Gal-GFP ($n = 5$, Figure 4C,D). This result indicates that sleep-promoting neurons of the VLPO also express A_{2A}R. Taken together, the results of this study clearly define the cellular and molecular signaling pathway of PGD₂ in VLPO.

Here, we demonstrate and quantify for the first-time adenosine release in response to PGD₂ application into the VLPO. In addition, we established that astrocytes are crucial elements involved in increased levels of adenosine. These cells express DP₁R to sense PGD₂ accumulation during wakefulness, and their alteration using FAC abolishes adenosine release. Finally, we show that in response to PGD₂ application, adenosine release simultaneously induces A_{2A}R-mediated

vasodilation and depolarization of sleep-promoting neurons. Altogether, our results provide new evidence regarding PGD₂ regulation of neuronal activity in the VLPO.

Using amperometric biosensors on mouse VLPO slices, we directly demonstrated that extracellular adenosine is increased in response to PGD₂ application. Previous microdialysis analysis already reported extracellular adenosine release in response to PGD₂ infusion, but only in the subarachnoid space of the basal forebrain.⁷ Indeed, the small size of the VLPO does not facilitate its study. However, PGD₂ is a fat-soluble molecule. This paracrine signaling agent can diffuse into the brain tissue. The accumulation of PGD₂ during the day will then activate astrocytes via DP₁R and induce adenosine release. It has indeed already been shown that a PGD₂-induced increase in extracellular adenosine is absent in mice lacking the DP₁R, indicating that activation of these receptors is required for this increase of adenosine.⁷

In this study, we found that approximately 50% of the ADO' signal was specific to adenosine, which is similar to previous studies. However, the basal adenosine levels we measured in this study seem higher than those recorded in the basal forebrain,¹³ which probably results from different experimental protocols. Quantification of extracellular adenosine levels in

the presence of FAC, a molecule known to block cell metabolism, further revealed an astrocytic source of adenosine. As FAC is preferentially taken up by astrocytes relative to neurons,²³ the abolition of adenosinergic tone in the VLPO by FAC suggests an astrocyte-derived adenosine release in response to PGD₂ application. However, we cannot exclude that the release of a paracrine mediator by the leptomeninges may also participate in astrocyte activation.

Here, we did not investigate how extracellular adenosine levels were increased. Many pathways can indeed regulate extracellular adenosine levels, including adenosine exocytosis,²⁴ concentrative nucleoside transporters (CNTs), or transporters such as equilibrative nucleoside transporters (ENTs).²⁵ Alternatively, ATP can also be released by astrocytes, via P₂X₇ receptors or hemichannels and converted into adenosine following a degradative enzymatic activity from ectonucleotidases. This latest mechanism was recently proposed in the VLPO following the photostimulation of astrocytic channelrhodopsin-2.²⁶ Future work would be required to elucidate the molecular pathways underlying extracellular adenosine release in the VLPO in response to PGD₂.

In the VLPO, adenosine then acts on both A₁ and A_{2A}R. In particular, A₁R is widely expressed, by local GABAergic interneurons, whose activation is proposed to indirectly promote sleep via disinhibition of sleep-promoting neurons.^{17,26–28} Regarding A_{2A}R, their expression on blood vessels is well established.¹⁵ However, their expression by sleep-promoting neurons was only indirectly suggested by c-Fos protein immunoreactivity, pharmacological blockade or activation, electrophysiological recordings, as well as by the use of KO mice.^{11,17,18,29,30} Here, we demonstrate for the first time by immunolabeling that A_{2A}R is indeed expressed by sleep-promoting neurons in the VLPO. Moreover, our study also highlights a key role for PGD₂ in the neurovascular coupling (NVC), linking via A_{2A}R activation, vasodilation, and increased neuronal activity of sleep-promoting neurons. The tight link between blood flow regulation and neuronal activity is essential for normal brain function. This result strengthens the role of prostaglandins in the NVC. Prostaglandin E₂ was indeed also reported to be in the cortex, a key vasoactive messenger of NVC responses to sensory stimulation.³¹

A_{2A}R immunolabeling here reveals that all sleep-promoting neurons express this receptor in mice. This result contrasts with previous reports in rats, where the depolarizing effect of A_{2A}R was only observed in a subset of sleep-promoting neurons.¹⁷ However, this is consistent with our previous study in mice, showing that adenosine as well as an A_{2A} agonist were able to depolarize all recorded sleep-promoting neurons.¹¹ The expression of A_{2A}R on sleep-promoting neurons was further confirmed in mice, by the depolarizing effect of PGD₂ on sleep-promoting neurons, which is prevented in the presence of the A_{2A}R antagonist. However, we cannot exclude the possibility that sleep-promoting neurons could also express A₁R. Indeed, adenosine release is well-known to decrease the inhibitory tonus exerted by local A₁R-expressing interneurons on sleep-promoting neurons, thereby favoring their depolarization.²⁷ But simultaneously, direct activation of A₁R on sleep-promoting neurons would counterbalance the indirect disinhibition by the interneurons. As in the presence of ZM241385, PGD₂ does not affect sleep-promoting neurons; this supposes that A₁R is also expressed, as observed in rats.¹⁷ Consequently, in the presence of TTX, which blocks the disinhibition of sleep-promoting neurons by interneurons,

sleep-promoting neurons are still directly inhibited by A₁R activation, while they are depolarized by A_{2A}R. Thus, the global response to PGD₂ tends to decrease compared to the control condition.

In summary, we have here demonstrated that astrocytes express DP₁R in the VLPO and regulate adenosine levels in response to PGD₂ application. Then, adenosine increases the blood flow and depolarizes sleep-promoting neurons, via A_{2A}R. Activation of the VLPO would then lead to the inhibition of the wake-promoting structures, resulting in sleep.

METHODS AND MATERIALS

Animals. Male-only C57BL/6 mice (Charles River, France), P40–60 days old, were used to analyze the vascular effect of PGD₂ and perform ADO measurements. FVB Gal-GFP mice (Mutant Mouse Regional Resource Center (MMRRC), USA), P40–60 days old, were used for patch-clamp recordings. FVB Gal-GFP³² and GFAP-GFP³³ mice, P40–60 days old, male-only, were used for immunostainings.

The Gal-GFP mouse strain used for this research project, STOCK Tg(Gal-EGFP)HX109Gsat/Mmucd, identification number 016342-UCD, was obtained from the MMRRC, an NIH-funded strain repository, and was donated to the MMRRC by the NINDS funded GENSAT BAC transgenic project. All animals were housed in a temperature-controlled (20–22 °C) room under a 12-h light–dark cycle with lights on at 08:00 a.m. All animals had *ad libitum* access to food and water. All animal procedures were conducted in strict compliance with our institutional protocols and were approved by the European Community Council Directive of 22 September 2010 (010/63/UE) and the local ethics committee (Comité d'éthique en matière d'expérimentation animale number S9, C2EA-S9, "Paris Centre et Sud"). Accordingly, the number of animals in our study was kept to the necessary minimum.

Immunohistochemistry and Confocal Microscopy. Mice were deeply anesthetized with Euthasol Vet (Pentobarbital, DECHRA) and perfused intracardially with paraformaldehyde (PFA 2%), between Zeitgeber Time (ZT) –1 and 3, so between 1 and 3 h after the light was switched on in the animal house. The brains were carefully dissected and postfixed overnight with PFA 2% at 4 °C. The next day, PFA was removed, and the brains were cryoprotected overnight in PBS containing 30% sucrose. The brains were then cut into 40 μm sections with a freezing microtome (HM 450, Thermo Fisher Scientific). Slices were stored in PBS at 4 °C until use. For immunohistochemistry, slices were washed 3 × 15 min in PBS 1× at room temperature (RT), and antigen retrieval was performed by incubating slices in 50 mM sodium citrate (147 mg trisodiumcitrate dihydrate in 10 mL water, pH 8.5–9.0) preheated at 80 °C for 30 min. Slices were washed 3 × 15 min at RT with PBS 1× and incubated 24 h at RT with primary antibodies (A_{2A}R: AAR-002, polyclonal rabbit, Alamone Laboratories at 1:500; GFP: Abcam, Chicken, ab13970 at 1:500; DP₁R: ADI-905–800–100, polyclonal rabbit, Enzo at 1:500; GFP: AVES lab, Chicken at 1:1000 in PBS 1×/Triton × 100 0.5%/0.02% NaN₃) and then four nights at 4 °C. The antiadenosine A_{2A} receptor is a highly specific antibody directed against the (C)RQLKQMESQLPGER epitope of the mouse protein, corresponding to amino acid residues 201–2015 of the third intracellular loop of mouse adenosine A_{2A} receptor. For PGD₂ receptor (DP₁) polyclonal antibody, the immunogen sequence used was NESYRCQTSTWV, corresponding to the N-terminus of DP₁, amino acids 2–23.³⁴

Slices were rinsed 3 × 15 min in PBS 1× at RT and incubated with secondary antibodies (A_{2A}R: A21429, goat-Alexa Fluor 555, Life Technologies at 1:1000; GFP: A11032, goat-Alexa Fluor 488, Invitrogen, 1:1000; DP₁: goat antichick 488 at 1:500; goat antirabbit 647 at 1:500 in PBS 1×/Triton X100 0.5%/0.02% NaN₃) for 48 h at 4 °C. Slices were then washed 3 × 15 min with PBS 1× at RT, incubated with DAPI (1:1000) for 20 min at RT, and washed again for 10 min at RT before mounting with Fluoromount-G (00-4958-02, Invitrogen). For each immunostaining, a minimum of four

fields per animal were acquired at the 25 \times and 63 \times objective (spinning disk W1, Zeiss Axioobserver Z1 with motorized XYZ stage; CSUW11 (Yokogawa) spinning-disk scan head). GFP⁺, A_{2A}⁺, and DP1⁺ cells were counted manually in at least one region of interest (ROI) per slice per animal and at least in three mice. Then, a Z-stack 30- μ m-thick with a 2- μ m step was made on each field. Acquisition parameters were strictly conserved throughout different animals. Fluorescence cells were then counted on a maximal-intensity Z-projection image. The presented data correspond to the average of all ROIs' fluorescence intensities per condition. Image analyses were made using Fiji and ImageJ software (National Institute of Health, United States).

Hypothalamic Slices. Mice were rapidly decapitated between Zeitgeber Time (ZT)-1 and -3, and brains were quickly removed and placed into cold (\sim 4 °C) artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing (in mM): 130 NaCl; 5 KCl; 2.4 CaCl₂; 20 NaHCO₃; 1.25 KH₂PO₄; 1.3 MgSO₄; 5 D-glucose; and 15 sucrose (pH = 7.35). Brains were constantly oxygenated with 95% O₂-5% CO₂. During slicing, 1 mM kynurenate was added to the aCSF. Coronal brain slices (300- μ m-thick) containing the VLPO were cut with a vibratome (VT1200S; Leica) and transferred to a constantly oxygenated (95% O₂-5% CO₂) holding chamber containing aCSF. Next, individual slices were placed in a submerged recording chamber maintained at 32 °C and perfused (1.5 mL/min) with oxygenated kynurenate-free aCSF. Blood vessels were visualized using infrared videomicroscopy, with Dodt gradient contrast optics (Luigs and Neumann) mounted on an upright microscope (Zeiss) equipped with a CDD camera (Hamamatsu).

Purine Biosensor Recording. Purine biosensors (Sarissa Biomedical, Coventry, United Kingdom) were used to detect extracellular levels of either adenosine (ADO) or inosine (INO). Each biosensor included a platinum wire 50 μ m in diameter and 0.5 mm in length, coated with a permselective layer and an enzymatic matrix surrounding the platinum electrode.^{10,35} For the ADO biosensors, the enzymatic layer contained nucleoside phosphorylase, xanthine oxidase, and adenosine deaminase, whereas the INO biosensors lacked adenosine deaminase and were sensitive to adenosine. Amperometric measurements started when hydrogen peroxide oxidized the platinum wire to create an electrical signal proportional to the purine concentration. Measurements with adenosine biosensors gave a total purinergic concentration of adenosine and its metabolites referred to as ADO. In contrast, INO sensors were used to measure the response to inosine and its metabolites in a separate set of experiments, due to the small size of the VLPO. We thus obtained a specific ADO signal by subtracting the signal of INO sensors from ADO sensors; approximately 51% of the signal from the ADO/INO biosensor was specific to adenosine under our conditions. Before use, all biosensors were rehydrated in a buffer containing (in mM) 100 NaCl, 50 Tris, 20 glycerol, 1 MgCl₂, and 1 CaCl₂. All biosensor sets were calibrated at the beginning and end of each experiment with 10 μ M adenosine or inosine. The ADO and INO recordings were performed after a 30 min stabilization period. The sensors were inserted sequentially during a 3 min period in the VLPO in aCSF: without PGD₂ (control condition), followed by PGD₂ (1 μ M), and again after a 10 min wash without PGD₂. The biosensors were placed in contact with the surface of the slice by micromanipulators, which was visually confirmed as a slight deformation on its surface, indicating that the electrode was properly embedded. During the experiment, microelectrode biosensors were polarized at +500 mV versus Ag/AgCl. Purine concentrations were assessed by subtracting the electrical signal of the sensor when inserted into the VLPO from the mean of the electrical signals measured 30 s before and after the insertion. The biosensor signals were acquired with an amperometric detector (AMU 110; Radiometer Analytical, Villeurbanne, France) using an acquisition board (Digidata 1322A; Molecular Devices) attached to a computer running the pCLAMP 9.2 software package (Molecular Devices). Analyses were performed using Clampfit (Molecular Devices), SigmaPlot (Systat), and Python software programs.

Vascular Reactivity. Blood vessels in the VLPO within the focal plane that exhibited a well-defined luminal diameter (10–20 μ m) were selected for vascular reactivity. Images of blood vessels were acquired every 15 s with the Media Cybernetics software. The eventual drift of the images during the recording time was corrected either online for the z-drift or offline for the x and y axes using Image Pro Plus 7.0. Manual replacement of images to minimize the differences between two consecutive frames was performed using a subtraction tool from Image Pro Plus. To determine the location with the most movement, luminal diameters were quantified at different locations along the blood vessel using custom-written routines running within IgorPro (Wavemetrics). Control baselines were determined for 5 min at the start of the recording, with the temperature maintained at 32 \pm 1 °C. Unresponsive blood vessels or vessels with unstable baselines were discarded from the analysis. Vessels were considered unstable when their diameter moved more than 5% during the control baseline test. Only one vessel per slice was recorded.

Vasomotor responses were expressed as percentages of the mean baseline diameter, 5 min before the switch with the solution containing PGD₂. Pharmacological effects were then analyzed by performing statistical comparisons between the 1 min period before PGD₂ application and the mean blood vessel diameter change at 9–10 min after PGD₂ application onset.

Electrophysiological Recordings. Electrophysiological experiments were performed at 32 \pm 1 °C using a MultiClamp700B (Axon Instruments) amplifier connected to an acquisition board (Digidata 1440; Axon Instruments), filtered at 5 kHz, digitized at 50 kHz, and recorded on a computer running pCLAMP9.2 software (Axon Instruments). Data were analyzed offline using the Clampfit software (Molecular Devices).

Patch-Clamp Recordings in Whole-Cell Configuration. Current clamp recordings were made at resting membrane potential and without series resistance compensation. Patch-clamp pipettes (3–6 M Ω) were pulled from a borosilicate glass tube (1.5 mm o.d., 0.86 mm i.d.; Harvard Apparatus, France) on a horizontal puller (Model P-100; Sutter Instrument, Novato, USA) and were filled with the following (in mM): 144 K-gluconate; 1 MgCl₂; 0.5 EGTA; 10 HEPES at pH 7.2; 285–295 mOsm. A short hyperpolarizing current step was applied at the beginning of each sweep, every 60 s, to monitor changes in input resistance throughout the recordings. This protocol frequently triggered low-threshold spikes (LTS). The liquid junction potential of the patch pipet and the perfused extracellular solution was 11 mV and was not accounted for in the data. The pipet was slowly brought to the selected neuron to be recorded in whole-cell configuration using infrared videomicroscopy guidance. Data were rejected if the access resistance changed by more than 25% during the recording of the control period, and data reduction was performed to reduce data handling. Membrane potentials were measured between 4 and 6 min after the onset of the drug application and over a 2 min period for baseline before PGD₂ application. Input resistances were measured by the application of short steps of hyperpolarization each minute.

Drugs. The selective A_{2A} receptor antagonist ZM 241385 (4-(2-[7-amino-2-{2-furyl}{1,2,4}triazolo{2,3-a}{1,3,5}triazin-5-yl-amino]-ethyl)phenol; 100 μ M; Merck) was used to investigate the molecular pathway of the PGD₂-induced neuronal depolarization. To block neuronal transmission, PGD₂ was applied in the presence of tetrodotoxin (TTX; 1 μ M; Latoxan) as well as 10 min after TTX application onset. Glial metabolism was inhibited using fluoroacetate (FAC; 5 mM and 50 min of preincubation; Sigma) and PGD₂ (5Z,9 α ,13E,15S)-9,15-dihydroxy-11-oxoprostano-5,13-dien-1-oic-acid (1 μ M, Sigma).

Statistical Analyses. Data are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) and represented as a box plot, where the median is plotted as the central bar of the box; the upper and lower quartiles are the edges of the box, and the whiskers show the extremes of the distribution. The statistical significance of the data was assessed using either parametric tests (paired *t*-test and Student's *t*-test) or nonparametric tests (Wilcoxon test and Mann–Whitney *U* test),

depending on whether the values from the considered data set followed a normal distribution or not.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Armelle Rancillac – Brain Plasticity Unit, CNRS, ESPCI-ParisTech, Labex Memolife, Université PSL, 75005 Paris, France; Neuroglial Interactions in Cerebral Physiology and Pathologies, Center for Interdisciplinary Research in Biology, Collège de France, CNRS, Inserm, Labex Memolife, Université PSL, 75005 Paris, France; orcid.org/0000-0003-1085-5929; Email: armelle.rancillac@college-de-france.fr

Authors

Emeric Scharbarg – Brain Plasticity Unit, CNRS, ESPCI-ParisTech, Labex Memolife, Université PSL, 75005 Paris, France

Augustin Walter – Neuroglial Interactions in Cerebral Physiology and Pathologies, Center for Interdisciplinary Research in Biology, Collège de France, CNRS, Inserm, Labex Memolife, Université PSL, 75005 Paris, France

Laure Lecoin – Neuroglial Interactions in Cerebral Physiology and Pathologies, Center for Interdisciplinary Research in Biology, Collège de France, CNRS, Inserm, Labex Memolife, Université PSL, 75005 Paris, France

Thierry Gallopin – Brain Plasticity Unit, CNRS, ESPCI-ParisTech, Labex Memolife, Université PSL, 75005 Paris, France

Frédéric Lemaître – PASTEUR, Département de Chimie, Ecole Normale Supérieure, PSL University PSL, Sorbonne Université, CNRS, 75005 Paris, France

Manon Guille-Collignon – PASTEUR, Département de Chimie, Ecole Normale Supérieure, PSL University PSL, Sorbonne Université, CNRS, 75005 Paris, France

Nathalie Rouach – Neuroglial Interactions in Cerebral Physiology and Pathologies, Center for Interdisciplinary Research in Biology, Collège de France, CNRS, Inserm, Labex Memolife, Université PSL, 75005 Paris, France; orcid.org/0000-0002-5574-888X

Complete contact information is available at:

<https://pubs.acs.org/10.1021/acchemneuro.2c00660>

Author Contributions

E.S. performed the amperometric recordings. F.L. and M.G.-C. provided the equipment and expertise for the amperometric recordings. A.R. performed vascular reactivity and electrophysiological recordings. L.L. and A.W. performed the immunostainings. A.R. created all the figures. A.R. supervised and coordinated research activities. A.R. wrote the manuscript. All authors reviewed, provided constructive comments, and approved the final version of the manuscript. N.R. and T.G. acquired funding. All authors have agreed on the final version of the manuscript.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the French Institute of Health and Medical Research (Inserm), ESPCI ParisTech, Bettencourt Schueller Foundation, and the Collège de France.

We thank all members of the animal house facility from the Collège de France.

REFERENCES

- (1) Ueno, R.; Ishikawa, Y.; Nakayama, T.; Hayaishi, O. Prostaglandin D2 Induces Sleep When Microinjected into the Preoptic Area of Conscious Rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1982**, *109* (2), 576–582.
- (2) Urade, Y.; Hayaishi, O. Prostaglandin D2 and Sleep/Wake Regulation. *Sleep Med. Rev.* **2011**, *15* (6), 411–418.
- (3) Scammell, T.; Gerashchenko, D.; Urade, Y.; Onoe, H.; Saper, C.; Hayaishi, O. Activation of Ventrolateral Preoptic Neurons by the Somnogen Prostaglandin D2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95* (13), 7754–7759.
- (4) Matsumura, H.; Nakajima, T.; Osaka, T.; Satoh, S.; Kawase, K.; Kubo, E.; Kantha, S. S.; Kasahara, K.; Hayaishi, O. Prostaglandin D2-Sensitive, Sleep-Promoting Zone Defined in the Ventral Surface of the Rostral Basal Forebrain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91* (25), 11998–12002.
- (5) Pandey, H. P.; Ram, A.; Matsumura, H.; Hayaishi, O. Concentration of Prostaglandin D2 in Cerebrospinal Fluid Exhibits a Circadian Alteration in Conscious Rats. *Biochem Mol. Biol. Int.* **1995**, *37* (3), 431–437.
- (6) Oida, H.; Hirata, M.; Sugimoto, Y.; Ushikubi, F.; Ohishi, H.; Mizuno, N.; Ichikawa, A.; Narumiya, S. Expression of Messenger RNA for the Prostaglandin D Receptor in the Leptomeninges of the Mouse Brain. *FEBS Lett.* **1997**, *417* (1), 53–56.
- (7) Mizoguchi, A.; Eguchi, N.; Kimura, K.; Kiyohara, Y.; Qu, W. M.; Huang, Z. L.; Mochizuki, T.; Lazarus, M.; Kobayashi, T.; Kaneko, T.; Narumiya, S.; Urade, Y.; Hayaishi, O. Dominant Localization of Prostaglandin D Receptors on Arachnoid Trabecular Cells in Mouse Basal Forebrain and Their Involvement in the Regulation of Non-Rapid Eye Movement Sleep. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98* (20), 11674–11679.
- (8) Satoh, S.; Matsumura, H.; Suzuki, F.; Hayaishi, O. Promotion of Sleep Mediated by the A2a-Adenosine Receptor and Possible Involvement of This Receptor in the Sleep Induced by Prostaglandin D2 in Rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93* (12), 5980–5984.
- (9) Von Economo, C. Sleep As a Problem of Localization. *J. Nerv. Ment. Dis.* **1930**, *71* (3), 249–259.
- (10) Llaudet, E.; Botting, N. P.; Crayston, J. A.; Dale, N. A Three-Enzyme Microelectrode Sensor for Detecting Purine Release from Central Nervous System. *Biosens. Bioelectron.* **2003**, *18* (1), 43–52.
- (11) Scharbarg, E.; Daenens, M.; Lemaître, F.; Geoffroy, H.; Guille-Collignon, M.; Gallopin, T.; Rancillac, A. Astrocyte-Derived Adenosine Is Central to the Hypnogenic Effect of Glucose. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 19107.
- (12) Sims, R. E.; Dale, N. Activity-Dependent Adenosine Release May Be Linked to Activation of Na⁺-K⁺ ATPase: An In Vitro Rat Study. *PLoS One* **2014**, *9* (1), e87481.
- (13) Sims, R. E.; Wu, H. H. T.; Dale, N. Sleep-Wake Sensitive Mechanisms of Adenosine Release in the Basal Forebrain of Rodents: An In Vitro Study. *PLoS One* **2013**, *8* (1), No. e53814.
- (14) Ngai, A. C.; Coyne, E. F.; Meno, J. R.; West, G. A.; Winn, H. R. Receptor Subtypes Mediating Adenosine-Induced Dilation of Cerebral Arterioles. *Am. J. Physiol Heart Circ Physiol* **2001**, *280* (5), H2329–35.
- (15) Ralevic, V.; Dunn, W. R. Purinergic Transmission in Blood Vessels. *Auton Neurosci* **2015**, *191*, 48–66.
- (16) Huang, Z.-L.; Urade, Y.; Hayaishi, O. Prostaglandins and Adenosine in the Regulation of Sleep and Wakefulness. *Curr. Opin Pharmacol* **2007**, *7* (1), 33–38.
- (17) Gallopin, T.; Luppi, P. H.; Cauli, B.; Urade, Y.; Rossier, J.; Hayaishi, O.; Lambollez, B.; Fort, P. The Endogenous Somnogen Adenosine Excites a Subset of Sleep-Promoting Neurons via A2A Receptors in the Ventrolateral Preoptic Nucleus. *Neuroscience* **2005**, *134*, 1377–1390.
- (18) Kumar, S.; Rai, S.; Hsieh, K.-C.; McGinty, D.; Alam, M. N.; Szymusiak, R. Adenosine A2A Receptors Regulate the Activity of

Sleep Regulatory GABAergic Neurons in the Preoptic Hypothalamus. *Am. J. Physiol.* **2013**, *305* (1), R31–R41.

(19) Gaus, S. E.; Strecker, R. E.; Tate, B. A.; Parker, R. A.; Saper, C. B. Ventrolateral Preoptic Nucleus Contains Sleep-Active, Galaninergic Neurons in Multiple Mammalian Species. *Neuroscience* **2002**, *115* (1), 285–294.

(20) Chauveau, F.; Claverie, D.; Lardant, E.; Varin, C.; Hardy, E.; Walter, A.; Canini, F.; Rouach, N.; Rancillac, A. Neuropeptide S Promotes Wakefulness through the Inhibition of Sleep-Promoting Ventrolateral Preoptic Nucleus Neurons. *Sleep* **2020**, *43* (1), DOI: 10.1093/sleep/zsz189.

(21) Kroeger, D.; Absi, G.; Gagliardi, C.; Bandaru, S. S.; Madara, J. C.; Ferrari, L. L.; Arrigoni, E.; Münzberg, H.; Scammell, T. E.; Saper, C. B.; Vetrivelan, R. Galanin Neurons in the Ventrolateral Preoptic Area Promote Sleep and Heat Loss in Mice. *Nat. Commun.* **2018**, *9* (1), DOI: 10.1038/s41467-018-06590-7.

(22) Urade, Y.; Eguchi, N.; Qu, W.-M.; Sakata, M.; Huang, Z.-L.; Chen, J.-F.; Schwarzschild, M. A.; Fink, J. S.; Hayaishi, O. Sleep Regulation in Adenosine A2A Receptor-Deficient Mice. *Neurology* **2003**, *61* (11), S94–S96.

(23) Keyser, D. O.; Pellmar, T. C. Synaptic Transmission in the Hippocampus: Critical Role for Glial Cells. *Glia* **1994**, *10* (4), 237–243.

(24) Pascual, O.; Casper, K. B.; Kubera, C.; Zhang, J.; Revilla-Sanchez, R.; Sul, J.-Y.; Takano, H.; Moss, S. J.; McCarthy, K.; Haydon, P. G. Astrocytic Purinergic Signaling Coordinates Synaptic Networks. *Science* **2005**, *310* (5745), 113–116.

(25) Paes-De-Carvalho, R. Adenosine as a Signaling Molecule in the Retina: Biochemical and Developmental Aspects. *An Acad. Bras Cienc* **2002**, *74* (3), 437–451.

(26) Choi, I. S.; Kim, J. H.; Jeong, J. Y.; Lee, M. G.; Suk, K.; Jang, I. S. Astrocyte-Derived Adenosine Excites Sleep-Promoting Neurons in the Ventrolateral Preoptic Nucleus: Astrocyte-Neuron Interactions in the Regulation of Sleep. *Glia* **2022**, *70*, 1864.

(27) Morairty, S.; Rainnie, D.; McCarley, R.; Greene, R. Disinhibition of Ventrolateral Preoptic Area Sleep-Active Neurons by Adenosine: A New Mechanism for Sleep Promotion. *Neuroscience* **2004**, *123*, 451–457.

(28) Chamberlin, N. L.; Arrigoni, E.; Chou, T. C.; Scammell, T. E.; Greene, R. W.; Saper, C. B. Effects of Adenosine on GABAergic Synaptic Inputs to Identified Ventrolateral Preoptic Neurons. *Neuroscience* **2003**, *119*, 913–918.

(29) Scammell, T. E.; Gerashchenko, D. Y.; Mochizuki, T.; McCarthy, M. T.; Estabrooke, I. V.; Sears, C. a.; Saper, C. B.; Urade, Y.; Hayaishi, O. An Adenosine A2a Agonist Increases Sleep and Induces Fos in Ventrolateral Preoptic Neurons. *Neuroscience* **2001**, *107* (4), 653–663.

(30) Huang, Z.-L.; Qu, W.-M.; Eguchi, N.; Chen, J.-F.; Schwarzschild, M. A.; Fredholm, B. B.; Urade, Y.; Hayaishi, O. Adenosine A2A, but Not A1, Receptors Mediate the Arousal Effect of Caffeine. *Nat. Neurosci* **2005**, *8* (7), 858–859.

(31) Lacroix, A.; Toussay, X.; Anenberg, E.; Lecrux, C.; Ferreiros, N.; Karagiannis, A.; Plaisier, F.; Chausson, P.; Jarlier, F.; Burgess, S. A.; Hillman, E. M. C.; Tegeder, I.; Murphy, T. H.; Hamel, E.; Cauli, B. COX-2-Derived Prostaglandin E2 Produced by Pyramidal Neurons Contributes to Neurovascular Coupling in the Rodent Cerebral Cortex. *J. Neurosci.* **2015**, *35* (34), 11791–11810.

(32) Gong, S.; Zheng, C.; Doughty, M. L.; Losos, K.; Didkovsky, N.; Schambra, U. B.; Nowak, N. J.; Joyner, A.; Leblanc, G.; Hatten, M. E.; Heintz, N. A Gene Expression Atlas of the Central Nervous System Based on Bacterial Artificial Chromosomes. *Nature* **2003**, *425* (6961), 917–925.

(33) Nolte, C.; Matyash, M.; Pivneva, T.; Schipke, C. G.; Ohlemeyer, C.; Hanisch, U.-K.; Kirchhoff, F.; Kettenmann, H. GFAP Promoter-Controlled EGFP-Expressing Transgenic Mice: A Tool to Visualize Astrocytes and Astroglialosis in Living Brain Tissue. *Glia* **2001**, *33* (1), 72–86.


(34) Frenguelli, B. G.; Llaudet, E.; Dale, N. High-Resolution Real-Time Recording with Microelectrode Biosensors Reveals Novel

Aspects of Adenosine Release during Hypoxia in Rat Hippocampal Slices. *J. Neurochem* **2003**, *86* (6), 1506–1515.

(35) Dale, N.; Pearson, T.; Frenguelli, B. G. Direct Measurement of Adenosine Release during Hypoxia in the CA1 Region of the Rat Hippocampal Slice. *J. Physiol* **2000**, *526*, 143–155.

RESEARCH ARTICLE

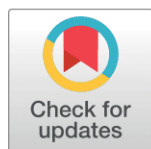
Upregulation of astroglial connexin 30 impairs hippocampal synaptic activity and recognition memory

Eléonore Hardy^{1,2,3}, Julien Moulard^{1,3}, Augustin Walter^{1,3}, Pascal Ezan¹, Alexis-Pierre Bemelmans⁴, Franck Mouthon², Mathieu Charvériat², Nathalie Rouach¹, Armelle Rancillac¹ *

1 Neuroglial Interactions in Cerebral Physiology and Pathologies, Center for Interdisciplinary Research in Biology, College de France, CNRS, Inserm, Labex Memolife, Université PSL, Paris, France, **2** Theranexus, Lyon, France, **3** Doctoral School N° 158, Sorbonne Université, Paris, France, **4** Neurodegenerative Diseases Laboratory, Molecular Imaging Research Center, Paris-Saclay University, CEA, CNRS, Fontenay-aux-Roses, France

 These authors contributed equally to this work.

* armelle.rancillac@college-de-france.fr



OPEN ACCESS

Citation: Hardy E, Moulard J, Walter A, Ezan P, Bemelmans A-P, Mouthon F, et al. (2023) Upregulation of astroglial connexin 30 impairs hippocampal synaptic activity and recognition memory. *PLoS Biol* 21(4): e3002075. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002075>

Academic Editor: Cagla Eroglu, Duke University Medical Center, UNITED STATES

Received: February 16, 2022

Accepted: March 10, 2023

Published: April 11, 2023

Copyright: © 2023 Hardy et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its [Supporting Information](#) files.

Funding: This work was supported by an industrial convention for training through research (CIFRE) provided by the Association Nationale de la Recherche Technologie (ANRT) for E.H. and grants from the European Research Council (Consolidator grant #683154), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the French Institute of Health and Medical Research (Inserm), Bettencourt

Abstract

Astrocytes crucially contribute to synaptic physiology and information processing. One of their key characteristics is to express high levels of connexins (Cxs), the gap junction-forming protein. Among them, Cx30 displays specific properties since it is postnatally expressed and dynamically upregulated by neuronal activity and modulates cognitive processes by shaping synaptic and network activities, as recently shown in knockout mice. However, it remains unknown whether local and selective upregulation of Cx30 in postnatal astrocytes within a physiological range modulates neuronal activities in the hippocampus. We here show in mice that, whereas Cx30 upregulation increases the connectivity of astroglial networks, it decreases spontaneous and evoked synaptic transmission. This effect results from a reduced neuronal excitability and translates into an alteration in the induction of synaptic plasticity and an *in vivo* impairment in learning processes. Altogether, these results suggest that astroglial networks have a physiologically optimized size to appropriately regulate neuronal functions.

Introduction

Astrocytes are key elements regulating synaptic physiology and, thereby, brain information processing. These glial cells shape neuronal excitability, synaptic transmission, and plasticity [1–4]. Remarkably, astrocytes exhibit the highest expression level of connexins (Cxs), the gap junction channel-forming proteins. When aligned between adjacent cells, these proteins connect their cytoplasm, enabling direct intercellular communication by diffusion and redistribution of small molecules [4–7], with a molecular weight up to 1.5 kDa [8]. This Cx-mediated astroglial network regulates the efficiency of extracellular potassium (K⁺) and glutamate clearance at synapses [2], as well as long-distance trafficking of energy metabolites to fuel active synapses [2,9]. However, Cxs do not only form gap junction channels with other astrocytes. They can also

Schuller Foundation and the Collège de France to N.R. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: I have read the journal's policy and the authors of this manuscript have the following competing interests: This work was supported by the Theranexus Company. E.H., F.M. and M.C. are employees of Theranexus. The other authors (J.M., A.W., P.E., A.P. B., N.R. and A.R.) declare no potential conflict of interest.

Abbreviations: AAV, adeno-associated vector; aCSF, artificial cerebrospinal fluid; ADP, afterdepolarization; AHP, afterhyperpolarization; AP, action potential; CPP, 3-(RS)-(2-carboxypiperazin-4-yl)-propyl-1-phosphonic acid; Cx, connexin; DBE, dibenzyl ether; DCM, dichloromethane; fEPSP, field excitatory postsynaptic potential; ITI, intertrial time interval; ITR, inverted terminal repeat; LTP, long-term potentiation; mEPSC, miniature excitatory postsynaptic current; mGluR, metabotropic glutamate receptor; NMDA, N-methyl-D-aspartate; NOR, novel object recognition; PFA, paraformaldehyde; PPF, paired pulse facilitation; PTP, posttetanic potentiation; ROI, region of interest; TTX, tetrodotoxin; ZT, Zeitgeber time; γ -DGG, γ -D-glutamylglycine.

mediate direct exchange with the extracellular space when forming hemichannels [10,11]. In addition, recent studies have reported channel-independent functions of astroglial Cxs, involving, for instance, intracellular signaling, protein interactions, or cell adhesion [12–15].

Two major Cxs are expressed in astrocytes in the mouse brain: Cx43, a key player in brain development and physiology [4,16], and Cx30, expressed after the second postnatal week [17] in an activity-dependent manner, being endogenously upregulated by spontaneous neuronal activity in hippocampal slices (approximately 50%) [18] or by visual experience *in vivo* in the visual cortex (approximately 70%) [13]. Furthermore, Cx30 is thought to be involved in basic cognitive and behavioral processes, as its expression is upregulated *in vivo* in mice raised in an enriched environment [19] and is key for the reactivity of mice to novel environments [20] and contextual memory [21].

Yet, whether increased expression in a physiological range of astroglial Cx30 favors or limits neuronal activity and cognitive capabilities remains unknown. By combining *in vivo* viral injections of Cx30 selectively in astrocytes with electrophysiological recordings and behavioral testing, we here investigated whether and how local and specific upregulation of Cx30 expression in hippocampal astrocytes from the CA1 region impacts astroglial network connectivity, synaptic transmission, plasticity, and memory. We here demonstrate that mice with increased levels of Cx30 in astrocytes display enhanced size of their gap junction-mediated network but reduced spontaneous and evoked hippocampal synaptic transmission at CA1 Schaffer collateral synapses. We further show that increased level of Cx30 reduces intrinsic neuronal excitability and that this translates into an impairment in synaptic plasticity and learning processes.

Results

Local and specific upregulation of Cx30 expression in hippocampal CA1 astrocytes by viral transduction

Effects of increased Cx30 expression in astrocytes were investigated following unilateral injection of adeno-associated vectors (AAVs) into the right hippocampus. AAV-GFAP-Cx30 (Cx30-increased condition) or AAV-GFAP-GFP (control condition) constructs were expressed under the GFAP promoter to specifically transduce GFAP-expressing astrocytes (Fig 1A). To assess the efficiency of astrocyte transduction, we quantified the proportion of cells coexpressing GFP and S100 β , a largely expressed astroglial marker, using immunostaining. We found that approximately 99% of GFP⁺ cells were S100 β ⁺ (Fig 1B and 1C). Reciprocally, we observed that approximately 96% of S100 β ⁺ cells were GFP⁺, indicating that the designed AAV selectively targeted astrocytes, and, virtually, all these cells were transduced. Histological controls performed 2 weeks after AAV injection confirmed that all injection sites were confined to the CA1 dorsal hippocampus. To evaluate the extent of the viral transduction, 3D reconstructions of transparent mouse brains were performed and revealed that approximately 30% of the hippocampus expressed the viral construct, specifically localized in its dorsal part (Fig 1D). Quantification of increased Cx30 expression by viral transduction was next performed by Cx30 immunolabeling (Fig 1E). Analysis of brain sections after AAV-GFAP-Cx30 transduction was performed and normalized to quantification following AAV-GFAP-GFP transduction. This revealed a 50% increase in Cx30 expression (Fig 1F), indicating an upregulation within a physiological range. The physiological amplitude of the variations in Cx30 levels was indeed previously determined in acute hippocampal slices, and a 50% decrease was found after blocking spontaneous action potential firing, whereas a 40% increase occurred after disinhibition, as assessed by western blotting and immunohistochemistry [18]. In addition, mice exposed to an enriched environment show enhanced Cx30 expression [19]. Thus, an increased level of Cx30 after AAV-GFAP-Cx30 transduction corresponds to a variation within a physiological range.

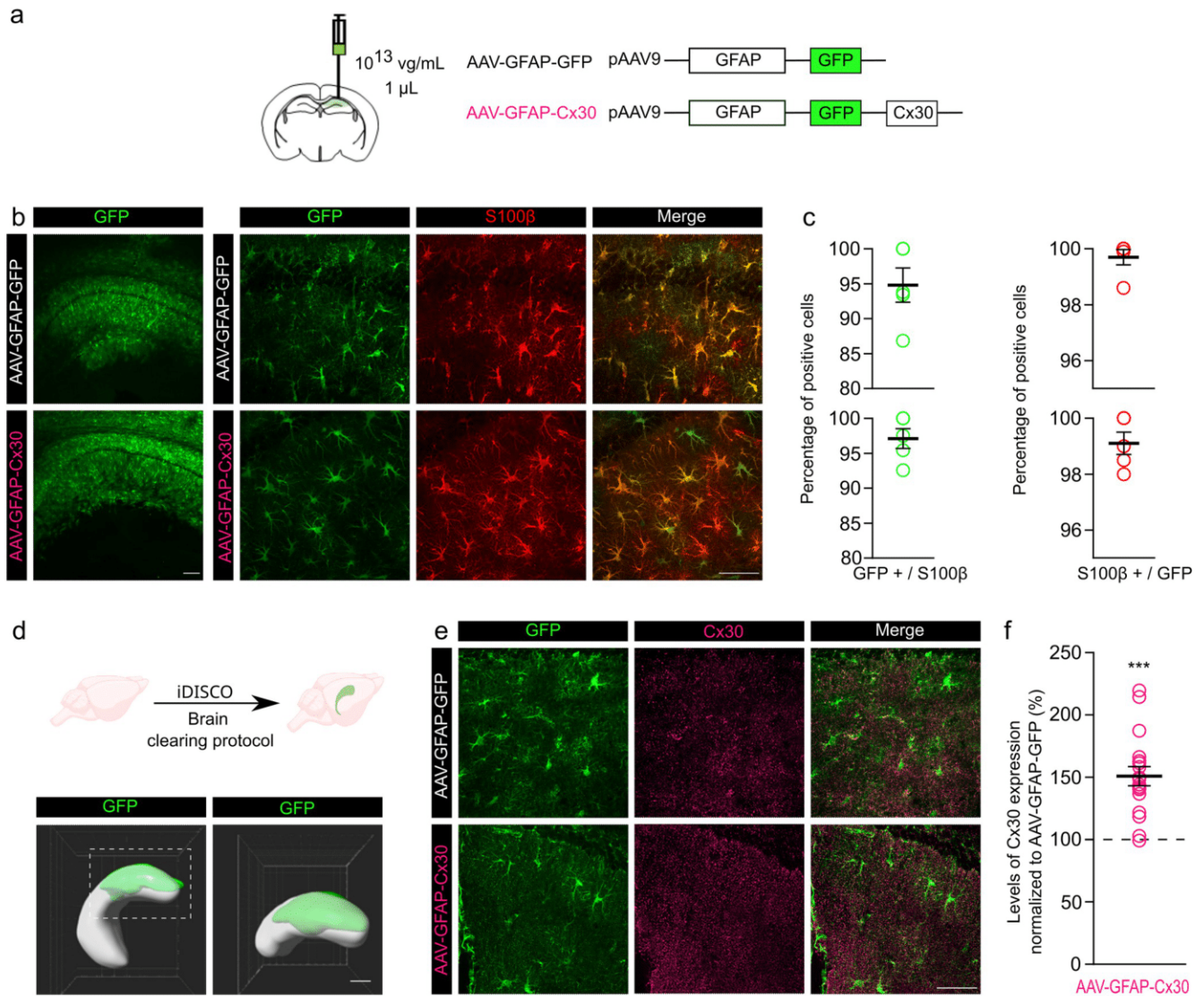


Fig 1. Increased expression of Cx30 in astrocytes from the dorsal hippocampus using in vivo local injection of AAV. (a) Schematic of the experimental procedure and of the viral vector constructs. (b) Confocal images of the CA1 region after injection of AAV-GFAP-GFP or AAV-GFAP-Cx30 and immunolabeling of GFP (green) at low magnification (left panel), scale bar: 20 μm or high magnification (right panels), scale bar: 50 μm. Note that the immunolabeling of S100β (red) strongly overlaps GFP expression. (c) Quantification of GFP+/S100β ($n = 5$ ROI) and S100β+/GFP ($n = 5$ ROI) positive cells after injection of AAV-GFAP-GFP (top) or AAV-GFAP-Cx30 transduction (bottom). (d) Reconstructed volume in the hippocampus of the viral transduction (green) after brain clearing protocol iDISCO (left) and at higher magnification of its dorsal part (right). Scale bar: 500 μm. (e) Confocal images of the CA1 region after injection of AAV-GFAP-GFP or AAV-GFAP-Cx30, and immunolabeling of GFP (green) and Cx30 (purple), scale bar: 50 μm (left panels). (f) Quantification of Cx30 expression after AAV-GFAP-Cx30 transduction normalized to AAV-GFAP-GFP ($n = 30$ ROI). Individual numerical values are indicated in S1 Data. *** $p < 0.001$, Welch t test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002075.g001>

Cx30 regulates astrocytic currents and the size of the astroglial network

To study the impact of increased Cx30 expression on the functional properties of astrocytes, we recorded their electrophysiological properties (Fig 2A). We first characterized the membrane properties and found that Cx30 upregulation in astrocytes did not affect their membrane potential but decreased their membrane resistance (approximately 65%) (Fig 2B) and whole-cell passive currents (linear current–voltage relationship; Fig 2C). As astroglial Cx30 is one of

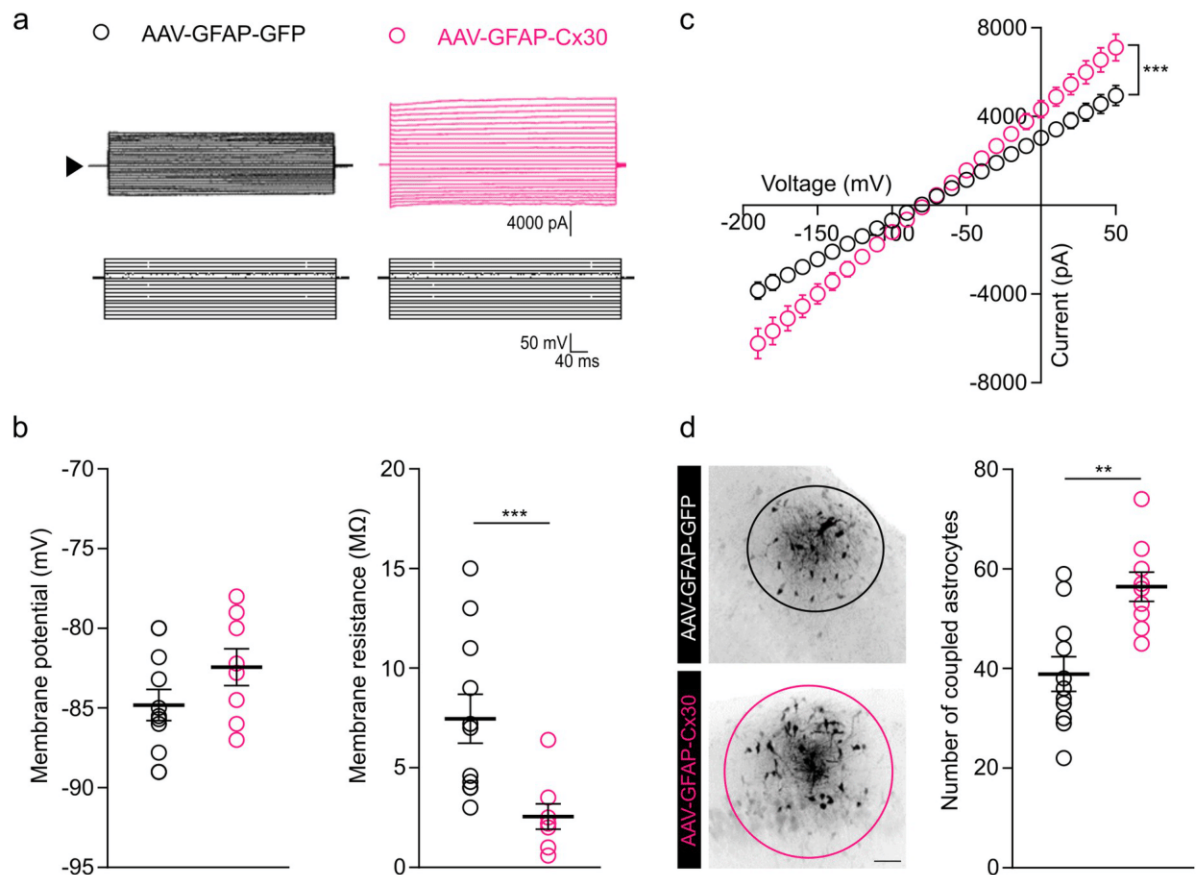


Fig 2. Upregulation of Cx30 increased passive astrocytic currents and the size of the astroglial network. (a) Representative whole-cell current profiles evoked by current injections from GFP-labeled astrocytes clamped at -80 mV. (b) The membrane potential of astrocytes is unchanged after AAV-GFAP-Cx30 ($n = 9$ astrocytes from 6 mice) compared to AAV-GFAP-GFP ($n = 11$ astrocytes from 5 mice) injection ($p = 0.1572$, Mann-Whitney test). Membrane resistance is decreased after AAV-GFAP-Cx30 ($n = 9$ astrocytes from 6 mice) compared to AAV-GFAP-GFP ($n = 11$ astrocytes from 5 mice) injection ($***p < 0.001$, Mann-Whitney test). (c) Current-voltage curve (IV curve) of astrocytes. Astrocytic currents were increased after AAV-GFAP-Cx30 ($n = 9$ astrocytes from 6 mice, pink) compared to AAV-GFAP-GFP transduction ($n = 11$ astrocytes from 5 mice, black) injection ($***p < 0.001$, interaction: $F(24,425) = 9.0$, two-way ANOVA). (d) Images of gap junction-mediated biocytin coupling in CA1 from brain slices following injection of AAV-GFAP-GFP (black) or AAV-GFAP-Cx30 (pink). Scale bar: $50 \mu\text{m}$. Gap junction coupling is significantly enhanced, as quantified by counting the number of coupled cells after 10 min of biocytin injection in a single astrocyte through a patch pipette after AAV-GFAP-Cx30 ($n = 9$ slices from 6 mice) transduction compared to AAV-GFAP-GFP transduction ($n = 11$ slices from 5 mice). Individual numerical values are indicated in *S1 Data*. $**p = 0.0012$, Welch t test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002075.g002>

the two gap junction subunits contributing to the direct intercellular coupling of astrocytes, we next investigated whether the increased Cx30 expression alters the size of the astroglial network. To do so, we infused biocytin, a low molecular weight tracer permeable to gap junction channels, for 10 min into single astrocytes via a patch pipette and found that the Cx30 upregulation markedly enhanced astroglial coupling, as assessed by the significantly increased number of coupled astrocytes (approximately 30%; Fig 2D).

Upregulation of astroglial Cx30 decreases hippocampal excitatory synaptic activity

As astrocytes are key regulatory elements of neuronal activity, we examine whether increased Cx30 expression regulates synaptic activity. We first measured basal evoked-synaptic responses at CA1 Schaffer collateral synapses. To do so, we compared the amplitude of the

presynaptic fiber volley (input) to the slope of the field excitatory postsynaptic potential (fEPSP) in acute hippocampal slices from AAV-GFAP-Cx30 or AAV-GFAP-GFP injected mice. We found an approximately 35% reduction in synaptic transmission in mice with increased astroglial Cx30 expression (Fig 3A). What might cause impaired synaptic transmission in mice with upregulated astroglial Cx30? To test for glutamate impairment, we first analyzed paired pulse facilitation (PPF), a form of short-term synaptic plasticity sensitive to changes in release probability. Using extracellular recordings of fEPSPs, we found that PPF was increased by approximately 20% in mice with upregulated astroglial Cx30, indicating a decrease in the probability of presynaptic release (Fig 3B). To further assess alteration in transmitter release, we recorded miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs) in CA1 pyramidal cells and found a strong reduction in their frequency (approximately 45%), with no change in their amplitude (Fig 3C), known to reflect vesicular glutamate content and/or the postsynaptic response. To directly test for changes in synaptic glutamate levels in mice with upregulated Cx30, we used γ -D-glutamylglycine (γ -DGG), a low-affinity and competitive antagonist of AMPARs, at nonsaturating concentration (500 μ M), and whose potency depends on glutamate levels. γ -DGG inhibition of synaptically evoked EPSCs was higher in CA1 pyramidal cells from mice with upregulated Cx30 than from control mice (Fig 3D). These results indicate that upregulation of astroglial Cx30 selectively alters excitatory synaptic transmission. Altogether, these data suggest that the decreased excitatory synaptic transmission in mice with upregulated Cx30 results from reduced synaptic glutamate levels rather than from postsynaptic defects.

Enhanced expression of astroglial Cx30 impairs long-term synaptic plasticity and recognition memory

Because Cx30 regulates synaptic efficacy, we then investigated its involvement in long-term synaptic plasticity. Following tetanic stimulation of Schaffer collaterals, we found that the amplitude of long-term potentiation (LTP) was significantly reduced (approximately 60%) in mice expressing increased levels of astroglial Cx30 (Fig 4A). To determine whether this alteration resulted from a defect in LTP induction, we analyzed posttetanic potentiation (PTP), a form of short-term plasticity resulting from an increase in neurotransmitter release induced by tetanic stimulation of Schaffer collaterals while blocking postsynaptic N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors (3-(RS)-(2-carboxypiperazin-4-yl)-propyl-1-phosphonic acid (CPP), 20 μ M). We found that the amplitude of PTP was significantly decreased in mice with upregulated astroglial Cx30 (Fig 4B), indicating an impairment in LTP induction resulting from reduced neurotransmitter release evoked by the tetanus. Altogether, these results show that upregulating Cx30 in astrocytes reduces both excitatory synaptic transmission and long-term plasticity.

Hippocampal long-term synaptic plasticity underlies learning and memory, including recognition memory [22]. Because synaptic glutamate is important for recognition memory [21], we investigated in vivo the contribution of an enhanced expression of astroglial Cx30 in this form of memory. To do so, we subjected adult mice bilaterally injected with AAV-GFAP-Cx30 or AAV-GFAP-GFP to a novel object recognition (NOR) test (Fig 4C). Because mice have an innate preference for novelty, we assessed recognition memory by quantifying the relative time spent exploring a novel versus a familiar object. Whereas control AAV-GFAP-GFP-injected mice spent more time exploring the novel object, the preference of the novel over the familiar object was absent in AAV-GFAP-Cx30-injected mice, pointing to an altered recognition memory (Fig 4D).

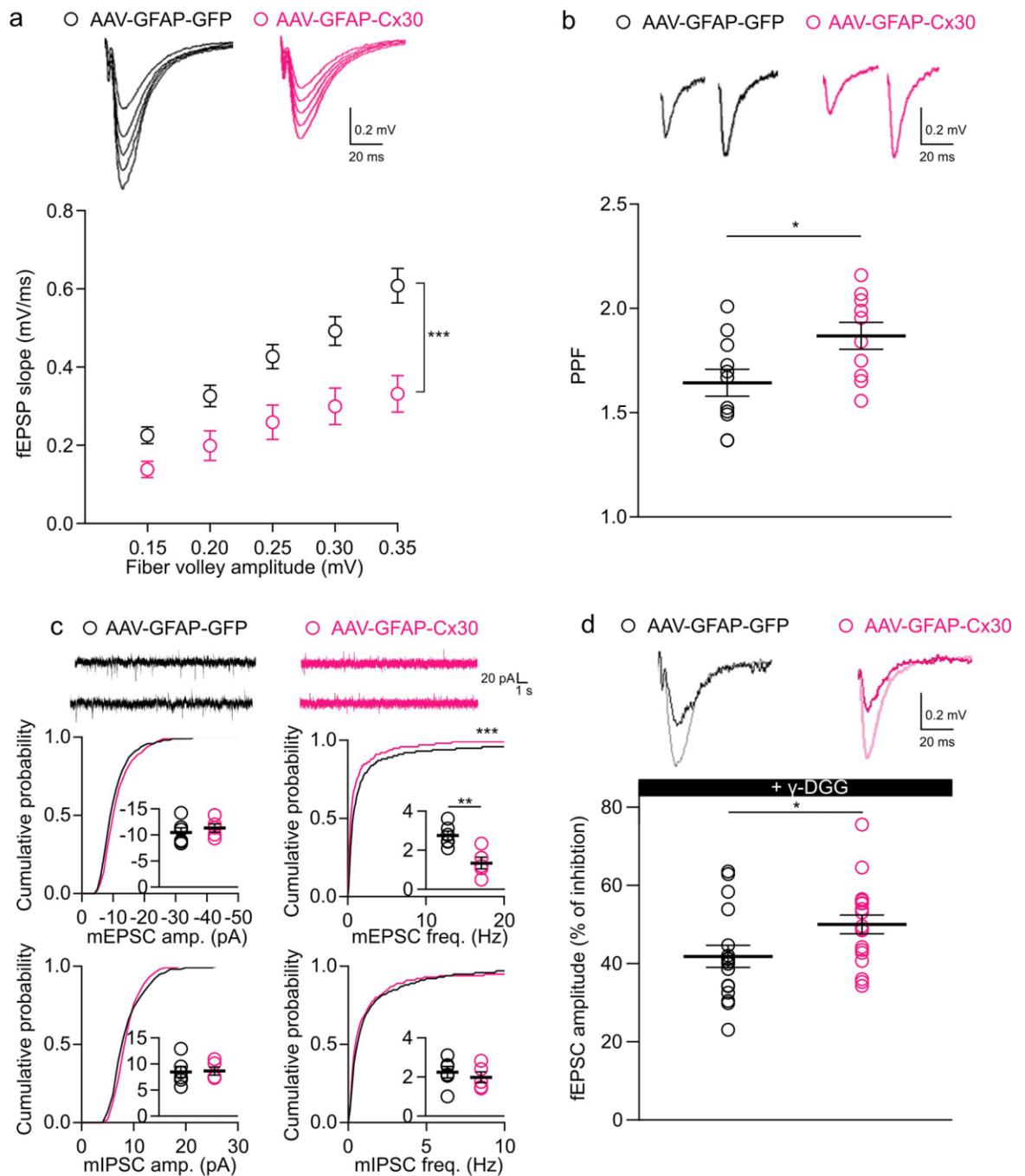


Fig 3. Cx30 upregulation in astrocytes alters excitatory synaptic transmission at CA1 Schaffer collateral synapses. (a) Input-output curves for basal synaptic transmission are illustrated in the sample traces and the graph below. fEPSP slope was decreased for AAV-GFAP-Cx30 ($n = 8$ slices from 5 mice) compared to AAV-GFAP-GFP ($n = 7$ slices from 5 mice; AAV: $***p < 0.001$, $F(1, 65) = 31.8$; fiber volley: $***p < 0.001$, $F(4, 65) = 17.4$, two-way ANOVA). (b) PPF ratio (2 stimulations, interval 40 ms) and representative traces. PPF was increased for AAV-GFAP-Cx30 ($n = 11$ slices from 5 mice) compared to AAV-GFAP-GFP ($n = 10$ slices from 5 mice). $p < 0.05$, unpaired t test. (c) (Upper) Sample traces from whole pyramidal cell recording. (Lower) Cumulative probability and mean values of mEPSCs and mIPSCs amplitudes and frequencies in both mice with AAV-GFAP-GFP ($n = 6$ from 5 mice) or AAV-GFAP-Cx30 ($n = 5$ from 5 mice). $*p < 0.01$, Mann-Whitney test, $***p < 0.001$ $K = 0.5466$, Kolmogorov-Smirnov test. (d) Synaptic glutamate levels revealed by γ -DGG (0.5 mM) inhibition of EPSC amplitude were reduced in mice with AAV-GFAP-Cx30 mice ($n = 19$ slices from 6 mice) compared to mice transduced with AAV-GFAP-GFP ($n = 17$ slices from 5 mice). Individual numerical values are indicated in [S1 Data](#). $*p < 0.05$; Mann-Whitney test. AAV, adeno-associated vector; EPSC, excitatory postsynaptic current; fEPSP, field excitatory postsynaptic potential; mEPSC, miniature excitatory postsynaptic current; mIPSC, miniature inhibitory postsynaptic current; PPF, paired pulse facilitation; γ -DGG, γ -D-glutamylglycine.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002075.g003>

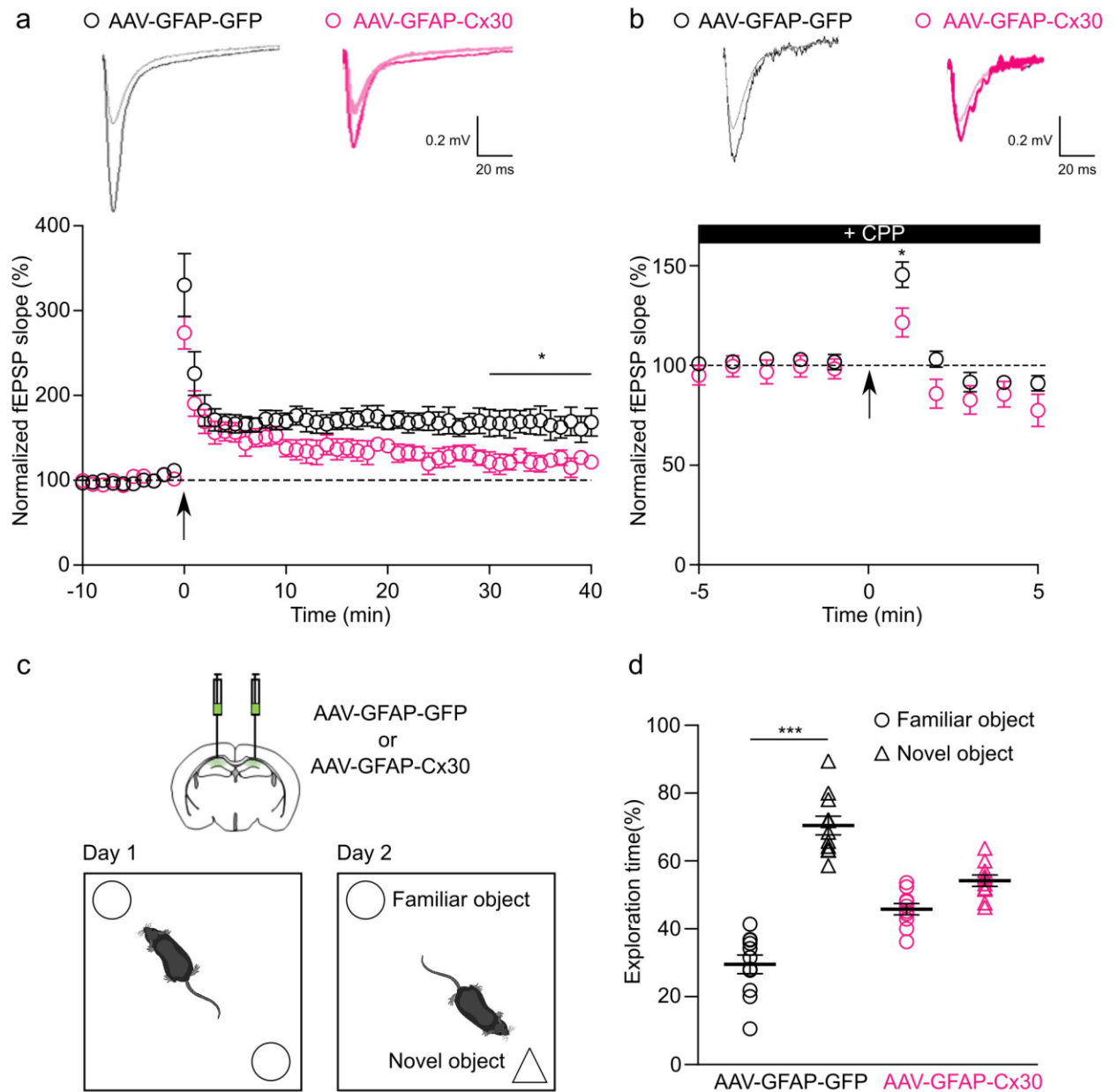


Fig 4. Upregulation of astroglial Cx30 decreased LTP and recognition memory. (a) Tetanus-induced LTP curves (arrow, two 100 Hz tetani for 1 s, interval 20 s) and representative traces. LTP maintenance for the last 10 min (30–40 min) was decreased for AAV-GFAP-Cx30 ($n = 9$ slices from 5 mice) compared to AAV-GFAP-GFP ($n = 8$ slices from 5 mice); $*p < 0.05$, Welch's t test). (b) Tetanus-induced PTP curves (arrow, two 100 Hz tetani for 1 s, interval 20 s and representative traces under CPP (20 μ M)). PTP was decreased for AAV-GFAP-Cx30 ($n = 12$ slices from 5 mice) compared to AAV-GFAP-GFP ($n = 12$ slices from 5 mice); $*p < 0.05$, Welch's t test). (c) Schematic of NOR memory test after bilateral hippocampal injections of AAV-GFAP-GFP or AAV-GFAP-Cx30 in mice. (d) Percentage exploration time for familiar versus novel object for AAV-GFAP-GFP ($n = 11$ mice) and AAV-GFAP-Cx30 ($n = 10$ mice). Individual numerical values are indicated in S1 Data. $***p < 0.001$, Kruskal-Wallis multiple comparison test. CPP, 3-(RS)-(2-carboxypiperazin-4-yl)-propyl-1-phosphonic acid; LTP, long-term potentiation; NOR, novel object recognition; PTP, posttetanic potentiation.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002075.g004>

Astroglial Cx30 enhanced expression impairs CA1 pyramidal cells excitability and action potential properties

We then investigated how does increased expression of astroglial Cx30 alters synaptic glutamate levels. To this end, we tested for changes in CA1 pyramidal cell intrinsic membrane properties and excitability. Recordings of pyramidal cell electrophysiological responses to hyperpolarizing and depolarizing current pulses and analysis of 28 discriminative electrophysiological parameters did not reveal changes in their passive membrane properties (resting membrane potential and capacitance) in mice with enhanced expression of astroglial Cx30 (Fig 5A and 5B). However, the number of action potentials evoked by depolarizing pulses was lower in CA1 pyramidal cells from AAV-GFAP-Cx30-injected mice (Fig 5C). Previous work on mice deficient for astroglial connexins reported a decrease in the amplitude and duration of CA1 pyramidal cells afterhyperpolarization (AHP) [23–25], i.e., the refractory period following action potential discharges during which neuron membrane potential is hyperpolarized (undershoot). We thus investigated AHP in mice with upregulated Cx30 and found an increased amplitude (approximately 40%) and duration (approximately 15%). These results indicate that upregulation of astroglial Cx30 alters pyramidal cell excitability and action potential properties.

Modulation of AHP in pyramidal cells restores normal excitatory synaptic transmission in mice with upregulated astroglial Cx30

AHP inhibits the rapid initiation of subsequent action potentials and thereby regulates neuronal excitability by setting the frequency of action potential discharge [26,27]. AHP has several components and is mediated by voltage-gated K⁺ channels, such as Kv7.2/7.3/KCNQ subunits or HCN channels [26]. Kv7.2/7.3/KCNQ channels are abundantly expressed in CA1 and CA3 pyramidal cells and generate the M-current (I(M)) underlying the AHP medium component, whereas HCN channels mediate the voltage sag following hyperpolarization [7,18]. In addition, here, we did not observe any significant effect on the sag response of pyramidal cells from mice with upregulated Cx30 compared to pyramidal cell sag responses from control mice (88.82 ± 2.21 versus 83.72 ± 2.86 ; $p = 0.16$), while it has recently been reported that astroglial gap junctions strengthen hippocampal network activity by sustaining AHP via Kv7.2/7.3/KCNQ channels [25].

We thus investigated whether the decreased neuronal excitability in mice with enhanced expression of astroglial Cx30 resulted from increase in medium AHP component. To do so, we tested whether a reduction of AHP by XE-991 (10 μ M), a specific Kv7.2/7.3/KCNQ K⁺ channel inhibitor altering AHP medium component [26–28], could rescue normal excitability of CA1 pyramidal cells in mice with increased levels of astroglial Cx30. To this end, we first tested whether XE-991 alters CA1 pyramidal cell properties and synaptic transmission in control mice transduced with AAV-GFAP-GFP. We found that XE991 had no effect on CA1 pyramidal cell resting potential, membrane resistance, and AHP duration in these mice (Fig 6A). Furthermore, XE-991 also had no effect on cell excitability and basal synaptic transmission, assessed by the number of action potential per current step intensity and mEPSC frequency (Fig 6A), which were both altered by Cx30 upregulation, as mentioned above (Figs 3C and 5C). Altogether, these data indicate that in control condition, XE-991 had no effect on CA1 pyramidal cell properties (Fig 6A).

We then determined the effects of XE-991 on the properties of CA1 pyramidal cells from mice with upregulated Cx30 expression, transduced with AAV-GFAP-Cx30. We found that XE-991 decreased AHP duration (approximately 35%) to control values and that this was sufficient to restore normal excitability and mEPSCs frequency in CA1 pyramidal cells (Fig 6A).

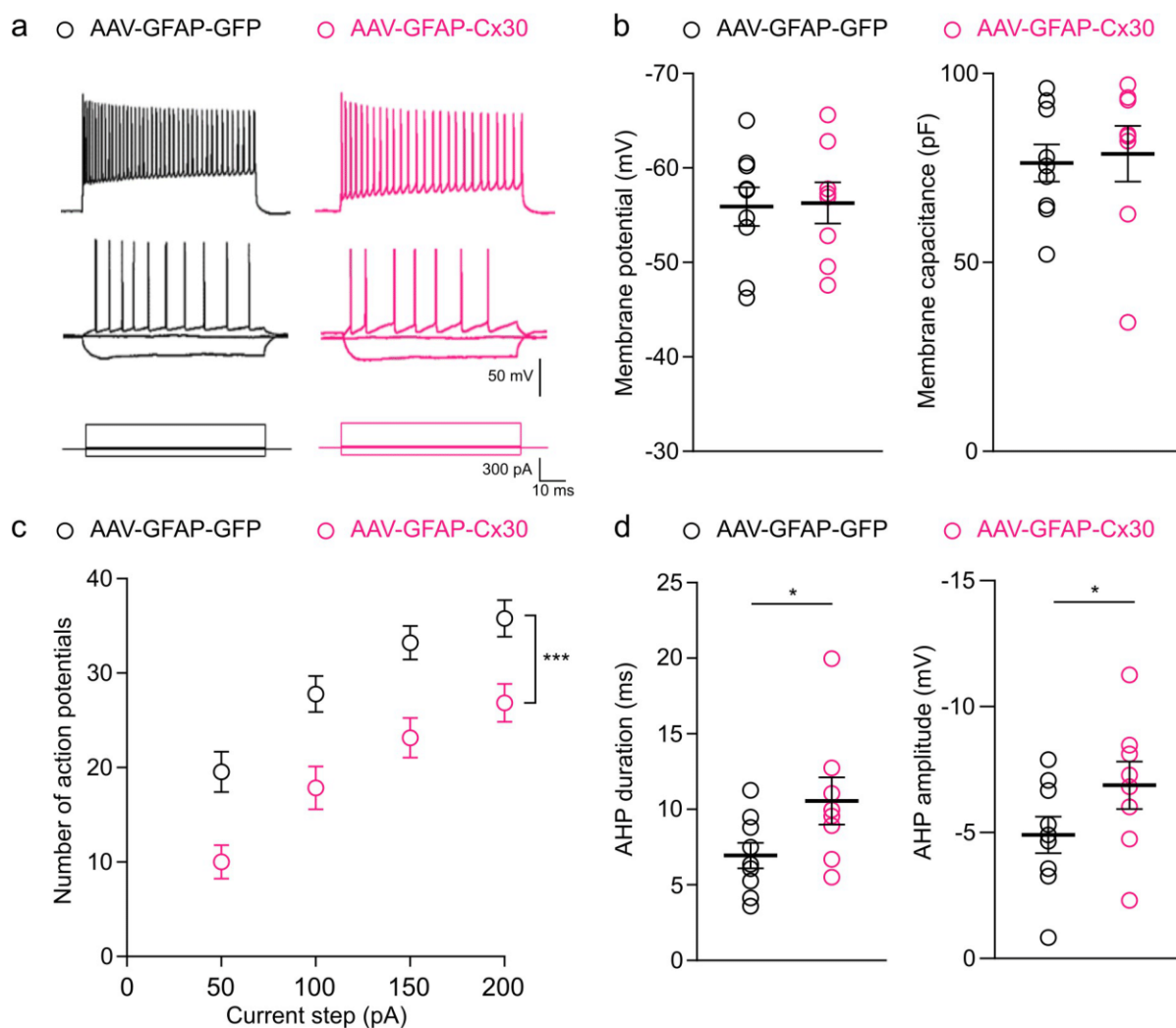


Fig 5. Upregulation of Cx30 impairs pyramidal cell excitability and action potential properties. (a) Typical electrophysiological response of CA1 pyramidal cells from control and Cx30 enhanced expression mice. CA1 pyramidal cells were recorded using whole-cell patch-clamp recordings in response to current pulses (bottom traces). Strong depolarizing current (top trace) evoked a high and sustained firing. (b) Resting membrane potential and membrane capacitance were unchanged in CA1 pyramidal cells from mice injected with AAV-GFAP-GFP ($n = 9$ neurons from 5 mice) or AAV-GFAP-Cx30 ($n = 8$ neurons from 5 mice; $p = 0.9825$ for membrane potential, $p = 0.4807$ for membrane capacitance, Mann-Whitney test). (c) Excitability curve with the number of action potentials evoked by current step for AAV-GFAP-GFP ($n = 9$ neurons from 5 mice) and AAV-GFAP-Cx30 ($n = 8$ neurons from 5 mice) transduced mice (AAV: $***p < 0.0001$, $F(1, 71) = 46.6$; current step: $***p < 0.0001$, $F(4, 71) = 101.8$, two-way ANOVA). (d) AHP duration and amplitude were increased for AAV-GFAP-Cx30 ($n = 8$ neurons from 5 mice) compared to AAV-GFAP-GFP ($n = 9$ neurons from 5 mice) transduced mice. Individual numerical values are indicated in [S1 Data](#). * $p < 0.05$, Mann-Whitney test. AAV, adeno-associated vector; AHP, afterhyperpolarization; fEPSP, field excitatory postsynaptic potential.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002075.g005>

Subsequently, we tested whether the alteration in AHP mediating the decreased neuronal excitability accounts for the reduced excitatory synaptic transmission in mice with upregulated astroglial Cx30. To this end, we recorded fEPSPs evoked by Schaffer collateral stimulation in the presence of XE-991 and found that this also rescued excitatory synaptic transmission to control levels in AAV-GFAP-GFP-injected mice (Fig 6B). This rescue is observed for high amplitudes of fiber volley when differences of fEPSP slope are more pronounced between control and enhanced Cx30 expression conditions (Fig 3A). Moreover, we found in mice with upregulated Cx30 that the AHP reduction induced by XE-991 fully rescued LTP (Fig 6B).

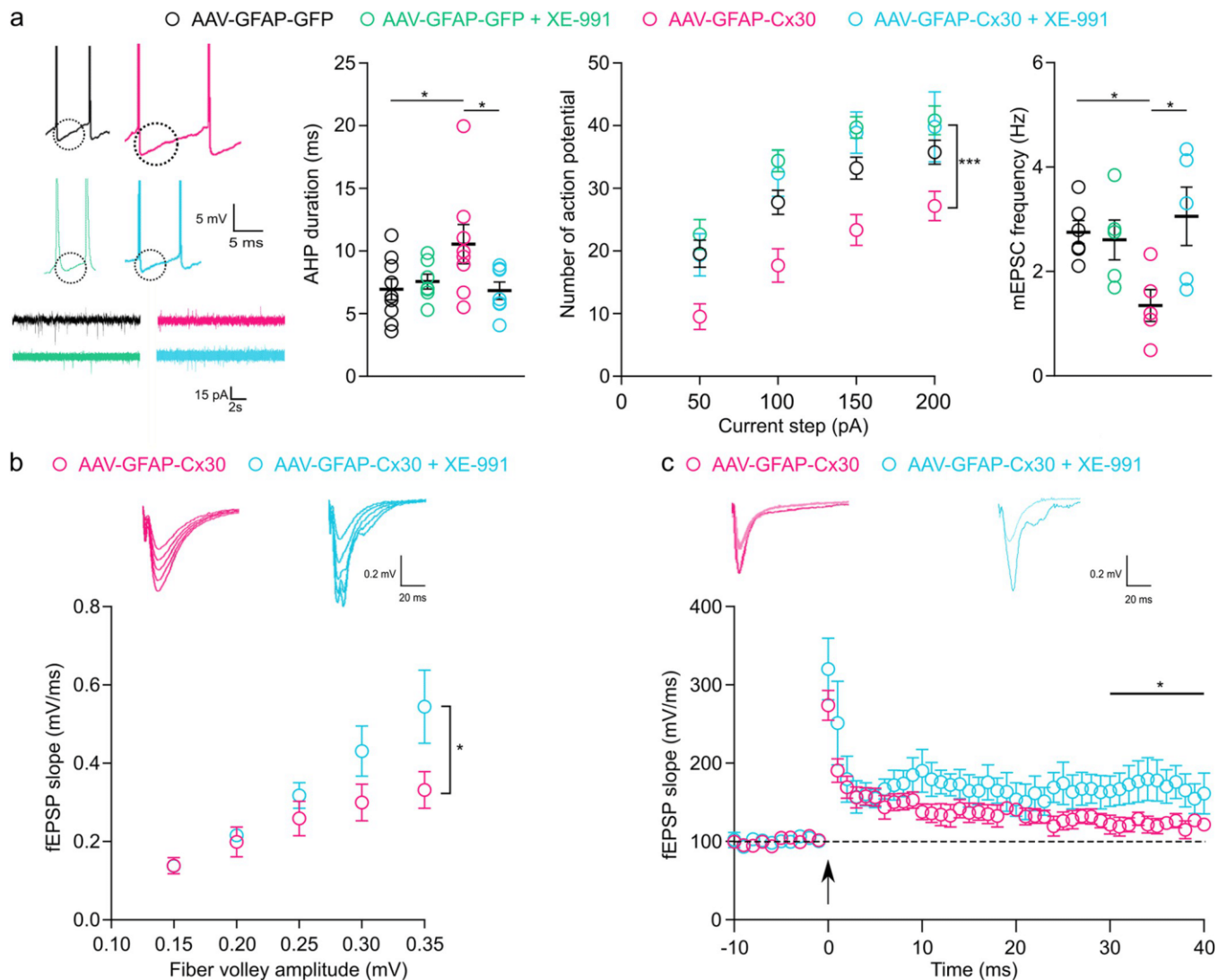


Fig 6. Reducing AHP duration in mice with upregulated astroglial Cx30 restores pyramidal cell excitability and excitatory synaptic transmission. (a) (Left) Sample traces of whole CA1 pyramidal cell recording from mice stereotaxically injected with AAV in the hippocampus in the presence or not of XE-991. The dotted circles delineate the AHP. (Middle Left) AHP durations in CA1 pyramidal cells was unchanged after the application of XE-991 in mice injected with AAV-GFAP-GFP ($n = 8$ neurons from 5 mice), AAV-GFAP-GFP with XE-991 ($10 \mu\text{M}$, $n = 7$ neurons from 5 mice), and AHP was restored by the application of XE-911 in AAV-GFAP-Cx30 mice ($n = 8$ neurons from 5 mice), AAV-GFAP-Cx30 with XE-991 ($10 \mu\text{M}$, $n = 7$ neurons from 5 mice). $*p < 0.05$, Mann-Whitney test. (Middle right) Excitability curve with the number of action potentials evoked by current step for mice injected in the hippocampus with AAV-GFAP-GFP ($n = 9$ neurons from 5 mice), AAV-GFAP-Cx30 ($n = 8$ neurons from 5 mice), or AAV-GFAP-Cx30 + XE-991 ($n = 8$ neurons from 5 mice) (AAV: $***p < 0.001$, $F(2, 93) = 18.6$; current step: $***p < 0.001$, $F(4, 93) = 96.38$, two-way ANOVA). (Right) mEPSCs frequencies were not affected by the application of XE-991 in mice injected with AAV-GFAP-GFP ($n = 6$ from 5 mice) AAV-GFAP-GFP with XE-991 ($10 \mu\text{M}$, $n = 5$ neurons from 5 mice), but mEPSC frequencies were restored by the application of XE-991 in mice injected with AAV-GFAP-Cx30 ($n = 5$ from 5 mice) AAV-GFAP-Cx30 with XE-991 ($10 \mu\text{M}$, $n = 5$ neurons from 5 mice). $*p < 0.05$, Mann-Whitney test. (b) Input-output curves for basal synaptic transmission. fEPSP slope was increased after the application of XE-991 in mice injected in the hippocampus with AAV-GFAP-Cx30 ($n = 10$ slices recording from 5 mice) compared to mice injected with AAV-GFAP-Cx30 ($n = 8$ slices recording from 5 mice) (XE-991: $*p < 0.05$, $F(1, 75) = 6.623$; fiber volley: $***p < 0.001$, $F(4, 75) = 10.85$, two-way ANOVA). (c) Tetanus-induced LTP curves (arrow, two 100 Hz tetani for 1 s, interval 20 s) and representative traces. LTP maintenance for the last 10 min (30–40 min) was restored for AAV-GFAP-Cx30 in the presence of XE-991 ($n = 9$ slices from 5 mice) compared to AAV-GFAP-Cx30 ($n = 7$ slices from 5 mice). Individual numerical values are indicated in S1 Data. $*p < 0.05$, Welch's t test. AAV, adeno-associated vector; AHP, afterhyperpolarization; fEPSP, field excitatory postsynaptic potential; LTP, long-term potentiation; mEPSC, miniature excitatory postsynaptic current.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002075.g006>

These results indicate that Cx30 upregulation in astrocytes decreases glutamatergic synaptic transmission via AHP regulation of neuronal excitability.

Discussion

By combining local molecular approaches in the CA1 region of the hippocampus and electrophysiological recordings, we here show that increased expression, in a physiological range, of Cx30 selectively in astrocytes decreases excitatory synaptic transmission and alters LTP induction, as well as recognition memory. To some extent, these results are similar to those obtained in mice deficient for astroglial Cx30, where hippocampal excitatory synaptic strength was also reduced, as well as long-term synaptic plasticity and memory [21].

Levels of Cx30 regulate synaptic glutamate concentration, hippocampal excitatory synaptic strength, plasticity, and memory

Here, we found that enhanced expression of Cx30 in astrocytes decreases the levels of glutamate released at synapses, leading to impaired excitatory synaptic transmission and LTP induction and translating to the behavioral level in a loss of recognition memory.

This reduced extracellular glutamate is associated with an increased size of the astroglial network that allows for better diffusion of glutamate and thus increased uptake. This suggests that the release probability could be, at least partially, regulated by the size of the gap junction-mediated astroglial network. The extent of these networks indeed determines the diffusion of the cleared neuroactive molecules, i.e., K^+ and glutamate, in these networks, and, thus, the extracellular levels of these molecules, which can regulate neuronal excitability and release probability. This hypothesis is based on previous work showing that gap junctional networking facilitates extracellular glutamate and K^+ removal during synaptic activity through modulation of astroglial clearance rate [2]. Disconnected astrocytes in mice deficient for both astroglial Cxs indeed fail to properly remove the enhanced extracellular glutamate and K^+ levels during synaptic activity, as indicated by the slower decay kinetics of both, glutamate transporter currents and membrane potential depolarization, reflecting K^+ uptake, evoked synaptically in astrocytes. Thus, although disconnected astrocytes can still take up released K^+ and glutamate during synaptic activity, they are unable to redistribute them via the network due to the absence of gap junction channels. This alters the concentration gradients for K^+ and glutamate and, thus, their clearance efficiency.

Interestingly, a similar decrease in synaptic glutamate levels was observed in constitutive Cx30-deficient mice, however, via a different mechanism [21]. In these mice, release probability was indeed unaltered, but astroglial glutamate transport was strongly increased. This directly reduced synaptic glutamate levels and, thus, excitatory synaptic transmission and induction of LTP, which translated into a loss of contextual fear memory. Remarkably, the regulation of glutamate transport by Cx30 was independent of its channel function and was mediated by structural changes, which controlled the synaptic insertion of fine astroglial processes, known to be enriched in glutamate transporters.

Thus, although Cx30 upregulation or deficiency apparently leads to similar phenotypes at the synaptic and behavioral levels, namely reduced synaptic glutamate levels and excitatory synaptic transmission associated with defective LTP induction and memory (recognition and contextual fear memory, respectively), the underlying molecular mechanisms likely differ. This suggests that Cx30, whose expression can be dynamically up- or downregulated in various physiological or pathological contexts, is a critical regulator of synaptic function and behavior, with an optimal expression level required for proper synaptic and cognitive functions.

In future studies, it will be interesting to quantify the impact of the size of the astrocyte network on extracellular levels of K^+ using K^+ -sensitive electrodes in control and enhanced Cx30 expression conditions. Quantifying K^+ and glutamate uptake would also confirm that the increased size of the astrocytic network acts directly on uptake facilitation. It would also be interesting to study to what extent the activation of metabotropic glutamate receptors (mGluRs) in pyramidal cells participates in the inhibition of K_v channels. Finally, testing whether increased Cx30 levels have a role in the structural properties of astrocytes and their coverage of synapses using super-resolution STED microscopy would be important to assess the involvement of channel and nonchannel function of Cx30 in the regulation of neuronal activity and plasticity that we here describe. Altogether, this would reinforce the possible mechanism linking the reduced neuronal excitability to the increased size of the astrocytic network via an enhanced K^+ and glutamate uptake.

Enhanced Cx30 expression in astrocytes regulates action potential properties and neuronal excitability

To evaluate the impact of astroglial Cx30 upregulation on neuronal properties, we recorded the electrophysiological properties of neighboring pyramidal cells. We found that Cx30 upregulation in astrocytes reduces the frequency of action potential discharge in CA1 pyramidal cells via modulation of the medium AHP, as shown by the effect of XE-991, an inhibitor of $K_v7.2/7.3$ /KCNQ channels mediating the medium AHP, which fully rescued excitability in CA1 pyramidal cells from mice with upregulated Cx30 expression. Interestingly, astroglial gap junctions mediated by Cx30 and Cx43 were also recently reported to regulate neuronal activity, i.e., strengthen hippocampal network activity, by controlling AHP via KCNQ channels [25].

Remarkably, we here report that XE-991 also restored excitatory synaptic transmission in mice with upregulated Cx30. These results are consistent with previous observations indicating that modulation of the K^+ voltage-dependent channels $K_v7.2$ and $K_v7.3$ can regulate neuronal excitability [26,29–31]. K_v7 channels are voltage-sensing channels; they open and close upon changes in transmembrane potential to selectively let K^+ ions pass through the channel. Hence, an increase in extracellular K^+ favors the closure of these channels, thereby enhancing neuronal activity [32]. In the pancreas, gap junction channels formed by the Cx36 subunit were shown to regulate K^+ channels to coordinate insulin secretion [33]. Notably, K_v7 channels are also negatively regulated by activation of group I mGluRs [34]. Interestingly, activation of mGluRs suppresses the AHP and increases the magnitude of LTP [35,36]. Hence, it is possible that enhanced glutamate and possibly K^+ uptake by a larger gap junction-mediated astroglial network in mice with increased expression of Cx30 may inhibit the negative regulations of K_v7 channels by activation of mGluRs and reduction of extracellular K^+ levels. The decrease in K_v7 channel's closure might thereby increase K^+ efflux and thus reduce neuronal excitability and synaptic transmission.

Putative physiological role of increasing astrocytic networks to limit neuronal activity

Physiologically, it has already been shown that hippocampal Cx30 protein levels, as well as astrocytic network size, can be modulated by neuronal activity [18,37], suggesting that there is a close relationship between astrocytic network size and the activation of underlying neuronal networks. However, this modulation is complex, as it differentially impacts the principal cells and the interneurons [23]. In addition, Cx30 can also act via other mechanisms, such as signaling and protein interactions. It has indeed recently been shown that the increase in Cx30 levels that occurs between P10 to P50 controls the closure of critical period

in the mouse visual cortex, via a signaling pathway regulating the extracellular matrix and interneuron maturation [38].

Altogether, our results reveal that while neuronal activity increases the functional connectivity of the gap junction-mediated astroglial network by increasing the permeability of gap junction channels [37,39], directly increasing the number of these channels via increased expression of astroglial Cx30 on the contrary reduces neuronal excitability and synaptic transmission via modulation of K_v7 channel activity. These results highlight the existence of a negative retro-control loop to maintain neuronal excitability within physiological ranges. We thus propose that the size of the astroglial network has a physiologically optimized configuration to tightly and appropriately regulate neuronal functions and networks. They are finely regulated, neither too large nor too reduced, to respond to neuronal demand, and allow brain efficient neuronal network activities and processes such as learning and memory.

Methods

Mice

Male and female C57BL/6J mice at P26 to 32 were used for electrophysiological experiments and between 8 and 10 weeks for NOR experiments. The effects were similar in both mice groups; thus, data obtained from male and female mice were pooled. All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed. Adult mice were housed under a 12-h light/12-h dark cycle, with ad libitum access to food and water, in accordance with European Community (Directive 2010-63/EEC) and French regulations (Code Rural R214/87–130). Experimental procedures were approved by the local ethics committee and registered with the French Research Ministry (CEEA, Paris 6, #14604). A total of 102 mice were used for all experiments.

AAV production and injections

The AAV-GFAP-Cx30 construct consisted in a transgene composed, from 5' to 3', of GFP, the 2A peptide coding sequence and mouse Cx30 cDNAs in a single open reading frame, was placed under the control of a GFAP-specific promoter in an AAV shuttle plasmid containing the inverted terminal repeats (ITRs) of AAV2 [14]. The 2A signal allowed that GFP and Cx30 were expressed as distinct polypeptides, thus preventing bias on Cx30 function and localization potentially induced by a fusion protein. The AAV-GFAP-GFP control vector encoded GFP only. Serotype 9 adeno-associated viruses (AAVs) particles were produced by transient cotransfection of HEK-293T cells, as previously described [40]. Viral titers were determined by quantitative PCR amplification of the ITR on DNase-resistant particles and expressed as vector genomes per ml (vg/ml). Juvenile mice were injected with AAV at $P18 \pm 2$ days for 2 main reasons: At this time point, electrophysiological recordings are facilitated, and Cx30 has not yet reached its maxima expression level. Animals were deeply anesthetized with a mixture of ketamine (95 mg/kg, Merial) and xylazine (10 mg/kg, Bayer) in 0.9% NaCl and placed in a stereotaxic frame, with constant body heat regulation. Injections were unilaterally performed in the right hippocampus at the following stereotaxic coordinates: AP: -1.85 mm; L: 1.6 mm to the bregma at a depth of -1.5 mm to the skull. We injected 1 μ L of virus AAV-GFAP-GFP or AAV-GFAP-Cx30 at 1.10^{13} vg/mL, with a 29-gauge blunt-tipped needle linked to a 2- μ L Hamilton syringe by a polyethylene catheter, at a rate of 0.1 μ L/min, with an automatic pump. After the injection, the needle was left in place for 5 min before being slowly removed. The skin was glued, and mice recovery was checked for the next 24 h.

Electrophysiology

Two weeks after AAV injection, mice were decapitated. Their brains were quickly extracted and submerged in cold slicing artificial cerebrospinal fluid (aCSF, 4°C) containing (in mM): 119 NaCl; 2.5 KCl; 2.5 CaCl₂; 26.2 NaHCO₃; 1 NaH₂PO₄; 1.3 MgSO₄; 11 D-glucose (pH 7.35). Brains were constantly oxygenated with 95% O₂–5% CO₂. Hippocampal brain slices (400 μm thick) were cut with a vibratome (VT1200S; Leica) and transferred to a constantly oxygenated (95% O₂–5% CO₂) holding chamber containing aCSF for at least 1 h prior to recording. Subsequently, individual slices were placed in a submerged recording chamber maintained at 32°C and perfused with oxygenated aCSF, and placed under an upright microscope (AxioScop, Zeiss) equipped with a Neo sCMOS camera (ANDOR technology) for observation. Only GFP fluorescent slices were recorded.

Extracellular fields and whole-cell patch-clamp recordings were performed. For extracellular field recordings, experiments were performed in the presence of picrotoxin (100 μM, Sigma), and a cut was made between CA1 and CA3 to prevent the propagation of epileptiform activity. Evoked postsynaptic potentials were induced by stimulating Schaffer collaterals (0.1 Hz, 0.1 s pulse duration), in CA1 stratum radiatum with ACSF-filled glass pipettes. Similar stimulation intensities were used to evoke fEPSPs in mice with normal or upregulated Cx30 levels. PPF was evoked by 2 repetitive stimulations at 40 ms interstimulus interval. LTP was induced by tetanic stimulation of Schaffer collaterals (2 trains of 100 Hz for 1 s, 20 s apart). PTP was induced with the same tetanic stimulation, but in presence of CPP (20 μM, Sigma).

Recordings in the whole-cell patch-clamp configuration were performed with patch-clamp pipettes (3 to 6 MΩ) filled with an internal solution containing (in mM): 129 K-gluconate; 10 EGTA; 10 HEPES and 2 ATP-Mg (pH 7.2 and 285 to 295 mOsm). About 2 mg/mL biocytin (Sigma) was added to this internal solution to assess the extent of gap junction-mediated astrocytic network. The recorded astrocytes were located in CA1 stratum radiatum. For each neuron, 28 electrophysiological parameters were measured according to the Petilla terminology [41]. For parameter 1 (**p1**), the resting membrane potential was measured immediately after passing to the whole-cell configuration. (**p2**) Input resistance (R_m) and (**p3**) the membrane time constant (τ_m) was determined at the beginning of the voltage response of a hyperpolarization current step (–10 pA, 800 ms). The time constant was determined by fitting this voltage response to a single exponential. (**p4**) The membrane capacitance (C_m) was calculated according to the equation $C_m = \tau_m / R_m$. Under our conditions, injection of hyperpolarizing current pulses often induced a hyperpolarization-activated cationic current (I_h) that followed the initial hyperpolarization peak, known as a sag. (**p5**) R_{hyp} was measured as the slope of the linear portion of an I–V plot, measured at the beginning (0 to 0.1 s; –100 to 0 pA). (**p6**) R_{sag} was measured as the slope of the linear portion of a current–voltage (IV) plot, measured at the end of the hyperpolarizing current pulses (0.7 to 0.8 s; –100 to 0 pA). (**p7**) ΔR_{sag} corresponds to (R_{sag} – R_{hyp}) / R_{sag}. (**p8**) Action potential threshold corresponded to the voltage threshold of the first action potential elicited by a current ramp. (**p9**) The rheobase was the minimum current that elicited an action potential. (**p10**) The first spike latency was computed as the time needed to elicit a spike after the onset of a current pulse corresponding to the rheobase. Neurons have been described to exhibit a wide range of firing behaviors around the threshold, some exhibiting bursting, adapting, regular, or irregular trains of action potentials. To describe this variety of behaviors with quantitative parameters, the interspaced intervals measured in response to the minimal current injection eliciting more than 3 action potentials were plotted and fitted to a linear curve. (**p11**) Adaptation (m_{threshold}) was computed as the slope of the linear fit and (**p12**) the minimal steady-state frequency (F_{threshold}). (**p13** and **p15**) Amplitudes of the first (A1) and second (A2) action potential (AP) were measured from the threshold to the

positive peak on the first step, where at least 3 APs were induced. (p14 and p16) AP durations were measured at half-amplitude (D1 and D2). (p17) The amplitude and (p18) duration of the maximal AHP was measured for the first AP. (p19) The amplitude and (p20) duration of the maximal afterdepolarization (ADP) was measured for the first AP. (p21) Amplitude variation (Var A) and (p22) duration variation (Var D) were computed as $(A1 - A2) / A1 * 1,000$ and $(D2 - D1) / D1 * 1,000$, respectively. At higher stimulation intensities, the maximal firing rate was defined as the last trace before the prominent reduction of the action potential amplitude, indicative of a saturated discharge. (p23) I_{max} is the minimal current-inducing saturating frequencies. To take into account the biphasic spike frequency adaptation (early and late), instantaneous firing frequency was fitted to a single exponential with a sloping baseline, according to the equation $F_{sat} = A_{sat} \times E^{-t/\tau_{sat}} + t \times m_{sat} + F_{max}$, where (p24) A_{sat} corresponds to the amplitude of early frequency adaptation, (p25) τ_{sat} to the time constant of early adaptation, (p26) F_{max} the maximal steady-state frequency, and (p27) m_{sat} to the slope of late adaptation. During the 800 ms depolarization protocol, a pronounced reduction of the amplitude of the action potentials was followed by an increase in the spike amplitude. This difference in action potential amplitude was termed the amplitude accommodative hump (p28).

Miniature postsynaptic currents were recorded in voltage-clamp mode at a holding potential of -60 mV, which was less negative than the reversal potential for mIPSCs. The pipette solution contained a low concentration of Cl (1 mM), resulting in an E_{Cl} of -111 mV. Therefore, inward currents were considered as mEPSCs and outward currents as mIPSCs [42]. Miniature events were recorded by including tetrodotoxin (TTX, 1 μ M, Sigma) in the aCSF. IV curves were performed in voltage-clamp by applying voltage step of 800 ms from -200 to 50 mV. During 10 min, the biocytin diffused through the astrocytic gap junction network. Intrinsic neuronal properties were assessed in current-clamp by applying current steps (800 ms) from -100 pA until firing saturation, in 10 pA increments. Data were acquired using a Multi-Clamp700B (Axon Instruments) amplifier connected to an acquisition board (Digidata 1440; Axon Instruments) attached to a computer running the pCLAMP software (Axon Instruments). They were filtered at 2 kHz, digitized at 10 kHz. All electrophysiological recordings were analyzed using Clampfit and Igor.

Drugs

TTX (1 μ M, Sigma) and XE-991 dihydrochloride (10 μ M; Sigma) were applied 15 min prior recordings and then throughout recordings. γ -DGG (0.5 mM, Tocris) and CPP (10 μ M, Tocris) were used to assess glutamate level at synapses.

Immunohistochemistry

Mice were deeply anesthetized with Doletal (Pentobarbital) and perfused intracardially with PFA (2%) 2 weeks after AAV injection. The brains were carefully dissected and postfixed overnight with PFA 2% at 4°C. The next day, PFA was removed and the brains were cryoprotected overnight in PBS containing 30% sucrose. The brains were then cut into 40 μ m sections with a freezing microtome (Leica, Germany). Slices were stored in PBS at 4°C until use. For immunohistochemistry, slices were blocked with PBS-Gelatin-Triton (PBS with 0.2% of gelatin and 0.25% of Triton), for 1 h at room temperature, incubated overnight at 4°C with primary antibodies (S100 β : at 1:500, GFP: Abcam, chicken, ab13970 at 1:500, Cx30: Life Technologies, Rabbit, 712200 at 1:500) in the blocking solution, then washed 1 h at room temperature with PBS-Gelatin-Triton, and incubated 2 h with secondary antibodies (Streptavidin: Molecular Probes, 1:200, goat anti-chicken 488: 1:2,000, goat anti-mouse 555: 1:2,000) and DAPI (1:1,000) in the blocking solution and washed 3 times with PBS before mounting with

Fluoromount (Invitrogen). Z-stack images were acquired at a confocal microscope with a 63× magnification with the same laser intensity, gain, and offset parameters (Leica SP5 inverted confocal) and then reconstructed using ImageJ software. GFP⁺ and S100β⁺ cells were counted manually, in the same number of slices in a Z-stack, in at least 1 region of interest (ROI) per slice per animal, and at least in 3 mice. Average fluorescence intensities for Cx30 were measured in hippocampal CA1 astrocytes in at least 3 nonoverlapping ROI per slice, 3 slices per animal, and 3 mice injected with AAV-GFAP-GFP or AAV-GFAP-Cx30 and were then normalized to AAV-GFAP-GFP expression. Isolated astrocytes were selected based on their GFP staining. After biocytin immunolabeling, Z-stack images were acquired at a confocal microscope with a 20× magnification (Leica SP5 inverted confocal). With ImageJ software, the number of labeled astrocytes was counted to determine the size of the astroglial network.

iDISCO

Mice were deeply anesthetized with Doletal (Pentobarbital) and perfused intracardially with PFA (4%) 2 weeks after AAV injections. The brains were carefully dissected and postfixed overnight with PFA 4% at 4°C. We used the iDISCO protocol [43] to quantify the volume of AAV injections in the hippocampus. Fixed samples were dehydrated progressively in methanol/PBS, 20%, 40%, 60%, 80%, and 100% for 1 h each. They were then incubated overnight in a solution of methanol 33%/dichloromethane 66% (DCM) (Sigma 270997). After 2 × 1 h washes with methanol 100%, samples were bleached with 5% H₂O₂ in methanol at 4°C overnight. After bleaching, samples were rehydrated in methanol for 1 h each, 80%, 60%, 40%, 20%, and PBS. Samples were washed rapidly with PBS and then incubated 2 × 1 h in PTx2 (PBS/0.2% Triton X-100). Pretreated samples were incubated in permeabilization solution (8% PBS/0.16% Triton X-100/20% DMSO/Glycine 23 mg.mL⁻¹) at 37°C for 48 h and then incubated in Blocking Solution (8.4% PBS/0.168% Triton X-100/10% DMSO/6% NGS) at 37°C for 48 h. Samples were incubated in primary antibody dilutions in PTwH (10% PBS/0.2% Tween-20/0.1% heparin)/5% DMSO/3% NGS at 37°C for 7 days. Samples were washed 5 times in PTwH until the next day and then incubated in secondary antibody dilutions in PTwH/3% NGS at 37°C for 6 days. Samples were finally washed in PTwH 5 times until the next day before clearing and imaging. After immunolabeling, samples were dehydrated progressively in methanol in PBS, 20%, 40%, 60%, 80%, and 100% each for 1 h. They were then incubated overnight in a solution of methanol 33%/DCM 66%, followed by incubation in 100% DCM for 2 × 15 min to wash the methanol. Finally, samples were incubated in dibenzyl ether (DBE) (without shaking) until cleared (4 h) and then stored in DBE at room temperature before imaging. Brains were imaged with a light sheet Ultra Microscope II Lavisision-BioTec. The volume reconstruction was performed with Imaris software.

Novel object recognition test

Mice were injected bilaterally in the hippocampi with AAV-GFAP-GFP or AAV-GFAP-Cx30 at P21. After 3 weeks, mice were exposed to the NOR test [44]. NOR apparatus consisted of a dark-gray polypropylene box (40 × 30 × 23 cm, length, width, height). A glass cube (5 × 5 × 5 cm) and a ceramic bowl (8 cm in diameter, 5 cm in height) were used for object recognition. Objects were too heavy to be displaced by the animal and were positioned at 2 corners of the apparatus. The mice did not show any preference for either of the 2 objects. Behavioral tests were conducted during the light phase of the 12-h light/dark cycle under dim illumination (50 lux), between Zeitgeber time (ZT)-7 and ZT-9, so between 7 and 9 hours after the light was switched on in the animal house, and recorded using LifeCam Studio camera and software (Microsoft). Before the first NOR test, for 3 consecutive days, animals were handled for 2 min per day. On the day preceding each

NOR test, animals were allowed to freely explore the empty (without objects) apparatus for 10 min for habituation. The NOR test consisted of 2 trials (T1 and T2) separated by an intertrial time interval (ITI). On T1 (acquisition trial), subjects were placed in the apparatus containing 2 identical objects for 20 min before being returned to their home cage for an ITI of 24 h. Then, they were placed back in the NOR apparatus containing a familiar and a novel object for 10 min (T2, restitution trial). The type (familiar or novel) and the position (left or right) of the 2 objects were counterbalanced and randomized within each experimental group during T2. Between each trial, the NOR apparatus was cleaned with water and the objects with 70% ethanol. Exploration was defined as the animal directing the nose within 0.5 cm of the object while looking at, sniffing or touching it, excluding accidental contact with it (backing into, standing on the object. . .). The raw exploration data were normalized to the total object exploration time.

Statistical analysis

All data are expressed as mean \pm SEM. Prior statistical comparison, normality tests, as well as variance analysis were performed, and the appropriate two-sided parametric or nonparametric statistical test was used. Two-tailed unpaired was used for between-group comparisons. Statistical significance for within-group comparisons was determined by one-way or two-way ANOVAs followed by post hoc tests. The Kolmogorov–Smirnov test was used for cumulative distribution comparison. Statistical analysis was performed using Prism (GraphPad software, version 8, CA, USA).

Supporting information

S1 Data. Supplementary data containing all the individual numerical values.
(XLSX)

Acknowledgments

We thank all members of the animal house facility from the Collège de France. We thank Dr. Jeffrey Mc Hugh for the English proofreading.

Author Contributions

Conceptualization: Mathieu Charvériat, Nathalie Rouach, Armelle Rancillac.

Data curation: Eléonore Hardy, Julien Moulard, Augustin Walter, Pascal Ezan.

Formal analysis: Eléonore Hardy.

Funding acquisition: Franck Mouthon, Mathieu Charvériat, Nathalie Rouach.

Methodology: Armelle Rancillac.

Project administration: Armelle Rancillac.

Resources: Alexis-Pierre Bemelmans.

Software: Eléonore Hardy.

Supervision: Mathieu Charvériat, Nathalie Rouach, Armelle Rancillac.

Validation: Mathieu Charvériat, Nathalie Rouach, Armelle Rancillac.

Writing – original draft: Armelle Rancillac.

Writing – review & editing: Nathalie Rouach, Armelle Rancillac.

References

1. Dallérac G, Chever O, Rouach N. How do astrocytes shape synaptic transmission? Insights from electrophysiology. *Front Cell Neurosci.* 2013; 7:159. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00159> PMID: 24101894
2. Pannasch U, Vargová L, Reingruber J, Ezan P, Holcman D, Giaume C, et al. Astroglial networks scale synaptic activity and plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108:8467–8472. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016650108> PMID: 21536893
3. Lutz SE, Zhao Y, Gulinello M, Lee SC, Raine CS, Brosnan CF. Deletion of Astrocyte Connexins 43 and 30 Leads to a Dysmyelinating Phenotype and Hippocampal CA1 Vacuolation. *J Neurosci.* 2009; 29:7743–7752. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0341-09.2009> PMID: 19535586
4. Pannasch U, Rouach N. Emerging role for astroglial networks in information processing: From synapse to behavior. *Trends Neurosci.* 2013;405–417. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.04.004> PMID: 23659852
5. Theis M, Söhl G, Eiberger J, Willecke K. Emerging complexities in identity and function of glial connexins. *Trends Neurosci.* 2005; 28:188–195. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2005.02.006> PMID: 15808353
6. Rozental R, Srinivas M, Gökhan S, Urban M, Dermietzel R, Kessler JA, et al. Temporal expression of neuronal connexins during hippocampal ontogeny. *Brain Res Rev.* 2000; 32:57–71. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(99\)00096-X](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(99)00096-X) PMID: 10751657
7. Spray DC, Duffy HS, Scemes E. Gap Junctions in Glia. 1999:339–359. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4685-6_27
8. Loewenstein WR. Junctional intercellular communication: the cell-to-cell membrane channel. *Physiology (Bethesda).* 1981; 61:829–913. <https://doi.org/10.1152/physrev.1981.61.4.829> PMID: 6270711
9. Rouach N, Koulakoff A, Abudara V, Willecke K, Giaume C. Astroglial Metabolic Networks Sustain Hippocampal Synaptic Transmission. *Science.* 1979; 2008(322):1551–1555.
10. Chever O, Lee C-Y, Rouach N. Astroglial connexin43 hemichannels tune basal excitatory synaptic transmission. *J Neurosci.* 2014; 34:11228–11232. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0015-14.2014> PMID: 25143604
11. Roux L, Madar A, Lacroix MM, Yi C, Benchenane K, Giaume C. Astroglial Connexin 43 Hemichannels Modulate Olfactory Bulb Slow Oscillations. *J Neurosci.* 2015; 35:15339–15352. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0861-15.2015> PMID: 26586821
12. Sibille J, Pannasch U, Rouach N. Astroglial potassium clearance contributes to short-term plasticity of synaptically evoked currents at the tripartite synapse. *J Physiol.* 2014; 592:87–102. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.261735> PMID: 24081156
13. Ribot J, Breton R, Calvo C-F, Moulard J, Ezan P, Zapata J, et al. Astrocytes close the mouse critical period for visual plasticity. *Science.* 2021; 373:77–81. <https://doi.org/10.1126/science.abf5273> PMID: 34210880
14. Ghézali G, Calvo C-F, Pillet L-E, Llense F, Ezan P, Pannasch U, et al. Connexin 30 controls astroglial polarization during postnatal brain development. *Development.* 2018; 145:dev155275. <https://doi.org/10.1242/dev.155275> PMID: 29475972
15. Pannasch U, Dossi E, Ezan P, Rouach N. Astroglial Cx30 sustains neuronal population bursts independently of gap-junction mediated biochemical coupling. *Glia.* 2019; 67:1104–1112. <https://doi.org/10.1002/glia.23591> PMID: 30794327
16. Elias LAB, Wang DD, Kriegstein AR. Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex. *Nature.* 2007; 448:901–907. <https://doi.org/10.1038/nature06063> PMID: 17713529
17. Nagy JI, Patel D, Ochalski PAY, Stelmack GL. Connexin30 in rodent, cat and human brain: selective expression in gray matter astrocytes, co-localization with connexin43 at gap junctions and late developmental appearance. *Neuroscience.* 1999; 88:447–468. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(98\)00191-2](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(98)00191-2) PMID: 10197766
18. Ghézali G, Vasile F, Curry N, Fantham M, Cheung G, Ezan P, et al. Neuronal Activity Drives Astroglial Connexin 30 in Perisynaptic Processes and Shapes Its Functions. *Cereb Cortex.* 2020; 30:753–766. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhz123> PMID: 31271200
19. Rampon C, Jiang CH, Dong H, Tang Y-P, Lockhart DJ, Schultz PG, et al. Effects of environmental enrichment on gene expression in the brain. *Proc Natl Acad Sci.* 2000; 97:12880–12884. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.23.12880> PMID: 11070096
20. Dere E, De Souza-Silva MA, Frisch C, Teubner B, Sohl G, Willecke K, et al. Connexin30-deficient mice show increased emotionality and decreased rearing activity in the open-field along with neurochemical changes. *Eur J Neurosci.* 2003; 18:629–638. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02784.x> PMID: 12911759

21. Pannasch U, Freche D, Dallérac G, Ghézali G, Escartin C, Ezan P, et al. Connexin 30 sets synaptic strength by controlling astroglial synapse invasion. *Nat Neurosci*. 2014; 17:549–558. <https://doi.org/10.1038/nn.3662> PMID: 24584052
22. Broadbent NJ, Gaskin S, Squire LR, Clark RE. Object recognition memory and the rodent hippocampus. *Learn Mem*. 2010; 17:5–11. <https://doi.org/10.1101/lm.1650110> PMID: 20028732
23. Hardy E, Cohen-Salmon M, Rouach N, Rancillac A. Astroglial Cx30 differentially impacts synaptic activity from hippocampal principal cells and interneurons. *Glia*. 2021; 69:2178–2198. <https://doi.org/10.1002/glia.24017> PMID: 33973274
24. Chever O, Dossi E, Pannasch U, Derangeon M, Rouach N. Astroglial networks promote neuronal coordination. *Sci Signal*. 2016; 9:1–9. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aad3066> PMID: 26758214
25. Dossi E, Zonca L, Pivonkova H, Vargova L, Chever O, Holcman D, et al. Astroglial gap junctions strengthen hippocampal network activity by sustaining afterhyperpolarization via KCNQ channels. *bioRxiv*. 2022.
26. Gu N, Vervaeke K, Hu H, Storm JF. Kv7/KCNQ/M and HCN/h, but not KCa2/SK channels, contribute to the somatic medium after-hyperpolarization and excitability control in CA1 hippocampal pyramidal cells. *J Physiol*. 2005; 566:689–715. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.086835> PMID: 15890705
27. Leão RN, Tan HM, Fisahn A. Kv7/KCNQ channels control action potential phasing of pyramidal neurons during hippocampal gamma oscillations in vitro. *J Neurosci*. 2009; 29:13353–13364. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1463-09.2009> PMID: 19846723
28. Schwarz JR, Glassmeier G, Cooper EC, Kao TC, Nodera H, Tabuena D, et al. KCNQ channels mediate I_{Ks}, a slow K⁺ current regulating excitability in the rat node of Ranvier. *J Physiol*. 2006; 573:17–34. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.106815> PMID: 16527853
29. Bond CT, Herson PS, Strassmaier T, Hammond R, Stackman R, Maylie J, et al. Small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel knock-out mice reveal the identity of calcium-dependent afterhyperpolarization currents. *J Neurosci*. 2004; 24:5301–5306. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0182-04.2004> PMID: 15190101
30. Peters HC, Hu H, Pongs O, Storm JF, Isbrandt D. Conditional transgenic suppression of M channels in mouse brain reveals functions in neuronal excitability, resonance and behavior. *Nat Neurosci*. 2005; 8:51–60. <https://doi.org/10.1038/nn1375> PMID: 15608631
31. Tzingounis AV, Nicoll RA. Contribution of KCNQ2 and KCNQ3 to the medium and slow afterhyperpolarization currents. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105:19974–19979. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810535105> PMID: 19060215
32. Larsen AP, Steffensen AB, Grunnet M, Olesen SP. Extracellular potassium inhibits Kv7.1 potassium channels by stabilizing an inactivated state. *Biophys J*. 2011; 101:818–827. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.06.034> PMID: 21843472
33. Farnsworth NL, Benninger RKP. New insights into the role of connexins in pancreatic islet function and diabetes. *FEBS Lett*. 2014; 1278–1287. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.02.035> PMID: 24583073
34. Marrion NV. Does r-EAG contribute to the M-current? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997.
35. Cohen AS, Coussens CM, Raymond CR, Abraham WC. Long-lasting increase in cellular excitability associated with the priming of LTP induction in rat hippocampus. *J Neurophysiol*. 1999; 82:3139–3148. <https://doi.org/10.1152/jn.1999.82.6.3139> PMID: 10601447
36. Sourdet V, Russier M, Daoudal G, Ankri N, Debanne D. Long-Term Enhancement of Neuronal Excitability and Temporal Fidelity Mediated by Metabotropic Glutamate Receptor Subtype 5. *J Neurosci*. 2003; 23:10238–10248. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-32-10238.2003> PMID: 14614082
37. Rouach N, Glowinski J, Giaume C. Activity-dependent Neuronal Control of gap-junctional Communication in astrocytes. *J Cell Biol*. 2000; 149:1513–1526. <https://doi.org/10.1083/jcb.149.7.1513> PMID: 10871289
38. Ribot J, Breton R, Calvo C-F, Moulard J, Ezan P, Zapata J, et al. Astrocytes close the mouse critical period for visual plasticity. *Science*. 1979; 202(373):77–81. <https://doi.org/10.1126/science.abf5273> PMID: 34210880
39. Kristian Enkvist MO, McCarthy KD. Astroglial Gap Junction Communication Is Increased by Treatment with Either Glutamate or High K⁺ Concentration. *J Neurochem*. 1994; 62:489–495. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1994.62020489.x> PMID: 7905024
40. Berger A, Lorain S, Joséphine C, Desrosiers M, Peccate C, Voit T, et al. Repair of rhodopsin mRNA by spliceosome-mediated RNA trans-splicing: a new approach for autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Mol Ther*. 2015; 23:918–930. <https://doi.org/10.1038/mt.2015.11> PMID: 25619725
41. Ascoli GA, Alonso-Nanclares L, Anderson SA, Barrionuevo G, Benavides-Piccione R, Burkhalter A, et al. Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci*. 2008; 9:557–568. <https://doi.org/10.1038/nrn2402> PMID: 18568015

42. Sangare A, Dubourget R, Geoffroy H, Gallopin T, Rancillac A. Serotonin differentially modulates excitatory and inhibitory synaptic inputs to putative sleep-promoting neurons of the ventrolateral preoptic nucleus. *Neuropharmacology*. 2016; 109:29–40. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.05.015> PMID: 27238836
43. Renier N, Wu Z, Simon DJ, Yang J, Ariel P, Tessier-Lavigne M. iDISCO: a simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. *Cell*. 2014; 159:896–910. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.010> PMID: 25417164
44. Lueptow LM. Novel Object Recognition Test for the Investigation of Learning and Memory in Mice. *J Vis Exp*. 2017. <https://doi.org/10.3791/55718> PMID: 28892027

Détermination du rôle de la plasticité morphologique des astrocytes dans la régulation du sommeil

Bien que le sommeil soit un processus biologique essentiel à la vie, ses troubles touchent encore un tiers de la population occidentale et représentent un problème majeur de santé publique en favorisant l'apparition de nombreuses autres pathologies telles que le diabète, l'hypertension ou encore la dépression. Pourtant, les mécanismes de régulation du sommeil ne restent que partiellement caractérisés. Récemment, le rôle des astrocytes et du BDNF dans la régulation du sommeil lent ont été mis en évidence. Toutefois, leurs modes d'action restent largement méconnus et n'ont encore jamais été étudiés spécifiquement au niveau du noyau préoptique ventrolatéral (VLPO), une structure clef dans la régulation du sommeil lent.

Nous avons émis l'hypothèse que le BDNF puisse induire une plasticité morphologique des astrocytes du VLPO qui régulerait l'activité des réseaux neuronaux sous-jacents. En combinant des techniques d'hybridation d'ARNm, d'immunomarquages, de microscopie confocale et d'enregistrements du sommeil en cages piézoélectriques, chez des souris à P30-50, nous avons pu mettre en évidence une plasticité morphologique circadienne des astrocytes du VLPO. Nous avons montré que cette plasticité est dépendante de l'expression de la connexine 30, une protéine astrocytaire constitutive des jonctions communicantes, qui joue aussi un rôle important dans la régulation de la proximité des prolongements astrocytaires aux synapses. Le BDNF, suit également une expression circadienne qui pourrait moduler la morphologie des astrocytes. De plus, nos résultats nous ont permis de supposer que l'ARNm du BDNF est principalement synthétisé par les neurones promoteurs du sommeil lent du VLPO et qu'il subirait une maturation au sein des astrocytes. Enfin, j'ai pu montrer, *in vivo*, que l'injection de BDNF dans le VLPO favorise le sommeil.

L'ensemble de ces résultats suggère que le BDNF participe à la régulation du sommeil via une modulation de la morphologie des astrocytes du VLPO. Ce dernier est majoritairement exprimé en fin de période lumineuse et pourrait servir à l'induction du sommeil ou à sa consolidation lorsque la pression de sommeil est faible.

Determining the role of astrocytes morphological plasticity in sleep regulation

Although sleep is a vital biological process, sleep disorders still affect one-third of the Western population and pose a major public health problem by promoting the development of various other pathologies such as diabetes, hypertension, and depression. However, the mechanisms underlying sleep regulation remain only partially characterized. Recently, the role of astrocytes and Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) in slow-wave sleep regulation has been highlighted. Nevertheless, their modes of action remain largely unknown and have never been specifically studied in the Ventrolateral Preoptic Nucleus (VLPO), a key structure in the regulation of slow-wave sleep.

We hypothesized that BDNF might induce morphological plasticity in VLPO astrocytes, which would regulate the activity of underlying neuronal networks. By combining mRNA hybridization, immunostaining, confocal microscopy and sleep recordings in piezoelectric cages in P30-50 mice, we demonstrated circadian morphological plasticity of VLPO astrocytes. We showed that this plasticity depends on the expression of connexin 30, an astrocytic protein involved in gap junctions that also plays a crucial role in regulating the proximity of astrocytic processes to synapses. BDNF also follows a circadian expression pattern that could modulate astrocyte morphology. Additionally, our results led us to speculate that BDNF mRNA is primarily synthesized by sleep-promoting neurons in the VLPO and undergoes maturation within astrocytes. Finally, *in vivo* experiments revealed that BDNF injection into the VLPO promotes sleep.

Taken together, these findings suggest that BDNF participates in sleep regulation through modulation of VLPO astrocyte morphology. VLPO is predominantly expressed late in the light period and may contribute to sleep induction or consolidation when sleep pressure is low.