



**HAL**  
open science

# Variabilité comportementale en réponse au stress social : influence du variant allélique VGLUT3-p.T8I sur l'acétylcholine et la dopamine dans le noyau accumbens

Marine Pujol

► **To cite this version:**

Marine Pujol. Variabilité comportementale en réponse au stress social : influence du variant allélique VGLUT3-p.T8I sur l'acétylcholine et la dopamine dans le noyau accumbens. Neurosciences [q-bio.NC]. Sorbonne Université, 2024. Français. NNT : 2024SORUS098 . tel-04648781

**HAL Id: tel-04648781**

**<https://theses.hal.science/tel-04648781>**

Submitted on 15 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.

# Sorbonne Université

École doctorale Cerveau, Cognition, Comportement

*Neuroscience Paris Seine / Équipe Neuropharmacologie des VGLUTs*

## **Variabilité comportementale en réponse au stress social :**

*Influence du variant allélique VGLUT3-p.T8I sur l'acétylcholine*

*et la dopamine dans le noyau accumbens*

Par Marine Pujol

Thèse de doctorat de Neurosciences

Dirigée par Stéphanie Daumas et Véronique Fabre

Présentée et soutenue publiquement le 03 juillet 2024

Devant un jury composé de :

Dr. Anna BEYELER, CR, INSERM

Pr. Jacques BARIK, PU, Université Côte d'Azur

Dr. Patricia BONNAVION, CR, Université Libre de Bruxelles

Pr. Sylvie GRANON, PU, Université Paris-Saclay

Pr. Stéphanie DAUMAS, PU, Sorbonne Université

Dr. Véronique FABRE, CR, INSERM

Rapportrice

Rapporteur

Examinatrice

Présidente/ Examinatrice

Directrice de thèse

Co-directrice de thèse



« - Mais je ne sais pas me transformer en vent.

- Celui qui vit sa Légende Personnelle sait tout ce qu'il a besoin de savoir. Il n'y a qu'une chose qui puisse rendre un rêve impossible : c'est la peur d'échouer.

- Je n'ai pas peur d'échouer. Simplement, je ne sais pas me transformer en vent.

- Eh bien, il faudra que tu apprennes ! Ta vie en dépend. »

Coelho, *L'Alchimiste*, 1988



# REMERCIEMENTS

---

Tout d'abord, je souhaiterais sincèrement remercier les membres de mon jury, Dr. Anna Beyeler, Pr. Jacques Barik, Dr. Patricia Bonnavion et Pr. Sylvie Granon d'avoir accepté d'évaluer mon travail. Je suis vraiment reconnaissante de pouvoir bénéficier de votre expertise scientifique, et je vous remercie pour le temps que vous y accorderez.

Plus particulièrement, je tiens à remercier chaleureusement Dr. Patricia Bonnavion et Pr. Sylvie Granon pour toutes les riches discussions lors de mes comités de suivi de thèse, l'accompagnement et le soutien tout au long de ma thèse, que ce soit au niveau scientifique ou professionnel.

J'ai eu la chance d'être accueillie par le B4 dès mon arrivée en M2 il y a maintenant quelques années, et de croiser le chemin de toutes ces personnes qui ont participé à mon apprentissage et mon expérience de recherche. Tout particulièrement, mes directrices de thèses.

Vero, je me souviens du premier jour où je suis arrivée, tu étais déjà là pour me préparer un espace cozy qui allait devenir mon bureau. Merci pour le petit nid douillet que tu as instauré entre nous. Je te remercie pour ta patience, ta pédagogie, ton écoute, ton esprit critique, ton soutien professionnel comme émotionnel, et ta sagesse. J'ai énormément appris grâce à toi et je te remercie d'avoir fait de cette première expérience dans la recherche une qui donne de l'espoir. Aucun mot ne pourra transmettre la reconnaissance que j'ai d'avoir pu commencer dans la recherche à tes côtés. Tout ce chemin parcouru, c'est aussi grâce à toi que je le dois. C'est aussi grâce à toi, que je suis devenue la chercheuse que je suis aujourd'hui.

Steph, dès le premier jour tu m'as fait me sentir à ma place en m'accueillant à bras ouverts dans ton équipe. Merci pour les étoiles dans les yeux, qui m'ont donné l'énergie et la motivation pour cette thèse. Merci aussi de m'avoir accordé ta confiance. Je me suis toujours demandée comment tu faisais, pour accepter si rapidement de faire confiance à tes étudiants. Tu ne sais pas à quel point ça m'a fait du bien de sentir dès mes débuts que j'avais l'espace pour apprendre et faire mes propres erreurs par moi-même, tout en sachant que j'avais ton soutien. Merci de m'avoir permis d'avancer à mon rythme, sans imposer le tien, et de m'avoir rapidement laissé cette liberté et cette indépendance. Merci de m'avoir permis de prendre de l'assurance qui me permet aujourd'hui de prendre mon envol avec confiance.

Cette co-direction, finalement, c'est un peu la co-direction du Yin et du Yang, alors elle a aussi le droit à son propre remerciement ! Steph et Véro, à tous les niveaux, vous êtes la parfaite complémentarité, c'est aussi ce qui fait la richesse de cet encadrement. J'ai vraiment eu de la chance de pouvoir apprendre de vous deux. Comme on dit, double PI, double trouble mais aussi double fun. Merci pour tout, sincèrement.

Évidemment, je tiens à remercier tous les membres de la VGLUTeam. Nicolas, merci pour ton accueil chaleureux, tes blagues pas toujours drôles, tes talents d'artiste et la liberté d'expression que le tableau de ton bureau permet d'affirmer, tes grandes explications de chimiste, et les bonbons dans ton bureau (on sait que c'est Odile qu'il faut remercier, mais comme c'est pour toi à la base, merci d'être là). Odile, merci, pas seulement pour tes bonbons, mais pour m'avoir accompagnée dès le début, mon coup de micropipette t'est dédié. Salah, merci pour ta passion, pour les discussions, pour les regains d'énergie qui permettent de tenir le coup et de ne pas baisser les bras. Véro B, merci pour ta gentillesse et ton aide précieuse

pour la microscopie. Sylvie, (le meilleur pour la fin ?), ton sourire et ta bonne humeur vont me manquer... Je ne sais pas comment je vais faire maintenant sans personne pour m'embêter. Il va falloir que tu viennes nous voir (Julie et moi) ! Pas le choix. Merci à tous les étudiants avec qui j'ai pu partager de bons moments. Merci à ceux qui ont été de passage et ont apporté de la bonne humeur, Naomie, Csilla, Jeanne, et à celle qui résiste après les départs de doctorantes de l'équipe, Elisa. Je te souhaite tout le meilleur pour ta thèse.

Merci également à tous les membres du B4, toujours prêts à aider et conseiller. Merci à Franck, Catalina, Vincent, Sophie, et Carole. Jean, merci d'avoir redonné vie au B7 et d'avoir toujours été là pour veiller sur nos animaux. Victor, toujours prêt à rendre service, merci pour ta générosité et ton aide. Mais surtout, merci pour ta présence inconditionnelle au B4 qui remonte le moral les week-end. Merci aux anciens, Laura, Flavio, Augusto, pour leur gentillesse et le quotidien partagé.

Enfin, que serait le B4, sans ces personnes (qui ont su m'apprivoiser), devenues de vraies amies.

Julie, j'ai commencé mon stage de M2, et 15 jours plus tard le confinement nous séparait. Mais dès le premier jour j'ai accroché à ta personnalité rayonnante. Il ne nous a pas fallu plus de 15 jours pour savoir que notre amitié était évidente. Merci de me transmettre tes passions, ta créativité, ton humour et ta bienveillance. Merci d'avoir illuminé mon quotidien lorsque tu étais là, et d'avoir su le faire aussi après ton départ pour Montréal. See you (very) soon.

Mazarine, ma colloc du fond du bureau. Merci d'avoir rendu ce lieu de travail si convivial (lol). Tes potins, tes expressions moyenâgeuses, tes viennoiseries du vendredi, tes délicieux gâteaux au chocolat, notre tiroir rempli de provisions en période de craving, tes histoires sans fin, nos petites plantes, et j'en passe, m'ont vraiment fait me sentir dans un petit cocon avec toi. Mais ce qui a rendu ces dernières années de thèse bien plus belles, ce n'est pas toutes tes petites attentions, c'est simplement toi. Merci pour ta gentillesse, ta bienveillance, ton soutien sans failles et ton ouverture d'esprit. J'ai hâte d'arriver au jour où tu réaliseras à quel point tu es une belle personne, parce que tu n'en sortiras que plus belle.

Adèle, mon boudi boudi. Je souhaite tout d'abord remercier the MC, la queen qui t'a mise au monde. Premièrement, je suis sa fan n°1, mais je dois avouer que je suis aussi la tienne. Tu m'impressionnes par celle que tu deviens chaque jour. Je ne sais pas comment j'aurais pu tenir toutes ces années de thèse sans toi. Merci de rester toi-même, à la fois complètement tarée et d'une sagesse incommensurable. Merci pour tout.

Justine, si j'avais deviné ton signe astro rien qu'en t'observant une soirée, jamais je n'aurais pu imaginer qu'on allait passer de moments si complices ensemble. Merci d'avoir animé le B4 avec ton grain de folie, et pour tous les moments à rire ensemble. Mais surtout, j'aimerais te remercier pour ... Marting. Ce petit rayon de soleil à quatre pattes a toujours su nous remotiver quand on en avait besoin. Quand tu en auras marre de tes petits loulous, rejoins moi avec Martin ouvrir un café céramique et élever des lamas tout doux.

Alice, crazy girl. Merci d'être qui tu es, débordante d'optimiste et de joie en toutes circonstances. J'admire ta détermination et ta motivation, qui avec ta bonne humeur m'ont fait beaucoup de bien durant cette thèse. Je t'attends à NYC, alors hop hop hop ! Et surtout, con il culo ciao ciao !

Lucille, qui l'eût cru, que tu aies réussi à me transformer en petit cœur tendre ! Merci d'avoir apporté ton grain de folie, d'avoir égayé mes chirurgies avec Friends et d'avoir rendu cette période de thèse plus joyeuse. Et évidemment, merci pour tes kirs pêche. Je croise les doigts pour que tu puisses être l'héritière officielle de mon bureau, tu le mérites tellement.

Merci à ceux qui rendent le B7 moins déprimant, Marie-Charlotte, Lisa, Estelle, Cécile, Laureline. Merci à Baptiste pour ton aide lors de ton M1, et merci à Ludovic et Katleen pour votre soutien et votre aide avec Python, dans la bonne humeur.

Un grand merci à Christelle Baunez de m'avoir donné l'opportunité de visiter son labo, et à Maya Williams pour m'avoir accompagnée dans la mise en place du système de fiber photometry. Merci pour ta gentillesse et tes précieux conseils.

J'aimerais également remercier du fond du cœur Rémi et Sebastien, qui au-delà de m'avoir formée à l'analyse Python, m'ont apporté un grand réconfort. C'est très rare les personnes comme vous, fondamentalement honnêtes, bienveillantes et curieuses. J'ai été ravie d'avoir échangé avec vous, et j'espère qu'on se reverra.

Merci également à Héloïse pour ses précieux conseils et relectures, ainsi que pour toutes les discussions intéressantes entre philosophie et neurosciences. J'en profite pour te remercier pour tous tes rappels et invitations aux conférences, qui malgré mes temps de réponses que je sais extrêmement longs, m'ont fait énormément plaisir et m'ont beaucoup aidée durant cette thèse.

Enfin, il me tient à cœur de remercier toutes les personnes qui m'accompagnent au quotidien et ce depuis des années, sans qui cette thèse n'aurait pas été possible.

Merci à mes amies de toujours, Galatée, Florine et Adriane. Je ne mesure pas la chance que j'ai de vous avoir dans ma vie, depuis 15 ans déjà, et pour encore longtemps. Je suis heureuse d'avoir grandi à côté de si belles personnes. Merci d'être vous.

Merci également à Zoé qui a été placée sur mon chemin comme une grande fleur pétillante de vie. Un petit mot aussi pour les deux pouerks, Nachos et Teub. Merci pour vos encouragements si spéciaux ces derniers mois. Julia, Lily, depuis le double cursus il y a 9 ans jusqu'à maintenant, j'ai eu la chance d'avoir des amies en or comme vous. Merci de remplir ma vie d'amour.

Salomé, sache que cette thèse n'aurait jamais vu le jour si tu n'avais pas été mon body double, alors congratulations pour ce double doctorat ! Merci d'être ma plus grande supportrice, ma plus grande admiratrice, ma manageuse de temps et d'organisation, ma partenaire de rêves toujours plus fous, mon retour à la réalité quand il le faut. Mais surtout, merci à tous les boomers n'ayant pas mis un pied de leur vie chez le psychologue pour tous les traumas et l'academic validation qui m'ont menés à toi, dans cette petite maison du 7 Queen Square. Merci pour tout ce que tu m'apportes au quotidien, merci d'être toi, merci pour ton cerveau, merci pour mon futur pied-à-terre à Shanghai, et merci pour mon futur poste en ambassade quand l'académie aura eu raison de moi.

Megan, mon petit *hoot*. Tu as été l'un de mes plus grands soutiens, par tes mots doux et encourageants, ton écoute attentive, ton humour inqualifiable, tes bras, et surtout, ton amour inconditionnel. C'est aussi grâce à ta manière d'observer le monde, que j'ai appris à enrichir la mienne. Peu importe les chemins que nous emprunterons, je sais qu'ils finiront par se rejoindre. C'est un drôle de concept la vie, je trouve. Si j'ai passé les vingt-sept dernières années de ma vie à essayer de le comprendre, en passant par cette thèse, et sans succès, je crois qu'il y a tout de même une certitude qui a pu se frayer un passage, et qui dépasse l'entendement : c'est seulement à tes côtés que j'accepterai de ne pas le comprendre.

Je tiens aussi à exprimer ma profonde gratitude envers ma famille, pour leur soutien tout au long de ce parcours. En particulier, Elise et Alix, merci pour les parenthèses de retour en enfance qui m'ont permis de reprendre des forces. Vous êtes ma source d'inspiration. Piero, merci pour ton soutien inconditionnel. Je suis vraiment reconnaissante que tu fasses partie de ma vie.

Enfin, je tiens à remercier mes parents. Papa, tu aurais été l'un des plus fiers. C'est toi qui m'a appris à rêver toujours plus, sans jamais laisser place au doute quant à la hauteur de mes

ambitions. Tu étais celui avec qui tout était facile, le seul qu'il était facile de comprendre. Peut-être m'a-t-il fallu te perdre, pour faire naître ce désir de compréhension du monde qui m'anime chaque jour, et qui m'a mené jusqu'à cette thèse. Maman, merci pour ton amour inconditionnel. Merci de t'être toujours battue pour moi, d'avoir porté tant de choses sur tes épaules pour me protéger, et de toujours croire en moi. Tu as su me transmettre ta force, ton courage, ta détermination, ta justice et ton amour. Merci d'être là. Cette thèse, c'est la continuité de tout ce que vous m'avez enseigné et de toutes les petites graines que vous avez plantées en moi. Elle est pour vous.

# TABLE DES MATIERES

---

<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>- 5 -</b>
<b>TABLE DES MATIERES</b>	<b>- 9 -</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b>	<b>- 12 -</b>
<b>RESUME</b>	<b>- 14 -</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>- 15 -</b>
<b>ABREVIATIONS</b>	<b>- 16 -</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>- 19 -</b>
1. AU-DELA DU CERVEAU : VERS UNE COMPREHENSION HOLISTIQUE DES EMOTIONS	- 21 -
1.1. <i>Le cerveau et les émotions : un dialogue entre philosophie et neurosciences</i>	- 22 -
1.1.1. Définir l'émotion en la différenciant de l'humeur	- 22 -
1.1.2. Définir l'émotion en remontant à son histoire évolutive	- 23 -
1.1.3. Les émotions enracinées dans le corps : une perspective périphéraliste	- 24 -
1.1.4. Les neurosciences contemporaines : quand émotions, cognition et adaptation s'entremêlent	- 26 -
1.2. <i>Étudier les émotions grâce aux neurosciences : des implicites méthodologiques et conceptuels à questionner</i>	- 29 -
1.2.1. Prendre pour objet d'étude les émotions suggère d'adopter une posture matérialiste associée à une démarche non réductionniste	- 29 -
1.2.2. Utiliser des modèles animaux non humains pour étudier les émotions	- 32 -
1.3. <i>Neurosciences et psychiatrie : définir et comprendre les troubles mentaux pour une recherche pertinente</i>	- 34 -
1.3.1. Définir le sain et le pathologique : un défi crucial pour les neurosciences	- 35 -
1.3.2. La classification des maladies mentales : un défi entre nature et construction sociale	- 38 -
1.3.3. Conclusion : repenser la recherche en psychiatrie en optant pour une approche multidimensionnelle en neurosciences	- 40 -
2. NEUROBIOLOGIE DU STRESS ET DES PATHOLOGIES ASSOCIEES	- 43 -
2.1. <i>Du système de réponse au stress à la susceptibilité individuelle</i>	- 43 -
2.1.1. Le système de réponse au stress	- 43 -
2.1.2. Le stress social : vers une meilleure compréhension des troubles mentaux	- 46 -
2.1.3. Résilience et susceptibilité : comprendre la variabilité inter-individuelle en réponse au stress	- 50 -
2.2. <i>Stress et sommeil : caractérisation des états de vigilance et de leurs perturbations</i>	- 53 -
2.2.1. Sommeil non stressé : bases neurales des états veille-sommeil	- 53 -
2.2.2. Sommeil et stress social : perturbations des états veille-sommeil	- 60 -
2.2.3. Sommeil et stress social : mécanismes neuronaux des états veille-sommeil	- 63 -
2.3. <i>Stress et psychiatrie : caractérisation des troubles anxio-dépressifs</i>	- 65 -
2.3.1. Exploration de l'anxiété et de la dépression à travers les modèles animaux	- 66 -
2.3.2. Des modèles aux mécanismes : exploration des circuits neuronaux de l'anxiété et de la dépression	- 69 -

2.3.3. Modulation des circuits de l'anxiété et de la dépression par le stress chronique de défaite sociale	- 72 -
3. LE NOYAU ACCUMBENS : ANATOMIE, PHYSIOLOGIE ET FONCTIONS DE CETTE STRUCTURE DU STRIATUM	- 76 -
3.1. Organisation anatomique et fonctionnelle du striatum: un fondement de son rôle clé dans le cerveau	- 76 -
3.1.1. Organisation compartimentale du striatum	- 76 -
3.1.2. Multiplicité des afférences du striatum : pôle d'intégration des informations	- 80 -
3.1.3. Hétérogénéité de la composition neuronale du striatum : intégration complexe des informations	- 82 -
3.2. Diversité des comportements liés NAc : aperçu de la richesse des fonctions de cette région cérébrale	- 87 -
3.2.1. Rôle du NAc dans l'apprentissage et la prise de décision	- 87 -
3.2.2. Le NAc et la régulation du sommeil	- 90 -
3.2.3. Le NAc et la susceptibilité au stress : de l'anxiété à la dépression	- 93 -
3.3. VGLUT3: un acteur clé dans le développement des troubles psychiatriques	- 95 -
3.3.1. Distribution anatomique et synergie vésiculaire de VGLUT3	- 95 -
3.3.2. Implication de VGLUT3 dans le développement des troubles psychiatriques	- 99 -
3.3.3. VGLUT3-p.T8I : enjeux translationnels de ce variant allélique	- 100 -
4. OBJECTIFS	- 104 -
<b>MATERIELS ET METHODES</b>	<b>- 107 -</b>
1. ANIMAUX	- 109 -
2. STRESS CHRONIQUE DE DEFAITE SOCIALE	- 109 -
3. TESTS COMPORTEMENTAUX	- 110 -
3.1. Test d'interaction sociale (SI)	- 111 -
3.2. Test des 3 chambres (3C)	- 111 -
3.3. Test de labyrinthe en zéro (EZM)	- 112 -
3.4. Test de compulsion de splash test chronique	- 113 -
4. PHARMACOLOGIE	- 113 -
4.1. Pharmacologie pour la photométrie de fibre	- 113 -
4.2. Traitements au donépézil	- 114 -
5. CHIRURGIES	- 114 -
5.1. Chirurgies de photométrie de fibre	- 115 -
5.2. Chirurgies sommeil	- 116 -
6. ACQUISITION ET ANALYSE DES ENREGISTREMENTS <i>IN VIVO</i>	- 116 -
6.1. Enregistrements de photométrie de fibre	- 116 -
6.2. Enregistrements polysomnographiques	- 118 -
7. IMMUNOFLOUORESCENCE	- 120 -
8. ACQUISITION DES IMAGES	- 121 -
9. STATISTIQUES	- 121 -
<b>RESULTATS</b>	<b>- 123 -</b>
1. ÉTUDE DU VARIANT VGLUT3-P.T8I EN REPONSE AU STRESS	- 125 -
2. ÉTUDE DU VARIANT P.T8I DANS LES ETATS VEILLE-SOMMEIL EN REPONSE AU STRESS	- 167 -
2.1. Introduction	- 167 -
2.2. Résultats	- 169 -
2.2.1. Étude des états veille-sommeil chez les souris mâles	- 169 -
2.2.2. Étude des états veille-sommeil chez les souris femelles	- 174 -

2.3.	<i>Discussion</i>	178 -
2.3.1.	Les perturbations de l'éveil induites par le CSDS et influence du variant p.T8I chez les souris mâles	179 -
2.3.2.	Les perturbations du sommeil induites par le CSDS sont liées au sexe	180 -
<b>DISCUSSION GENERALE</b>		<b>- 182 -</b>
1.	ROLE DU VARIANT P.T8I DANS LES COMPORTEMENTS LIES A LA SUSCEPTIBILITE AU STRESS	186 -
2.	ROLE DES NEUROTRANSMISSIONS CHOLINERGIQUE ET DOPAMINERGIQUE AU SEIN DU NAC DANS LA SUSCEPTIBILITE AU STRESS	192 -
3.	DIFFERENCES COMPORTEMENTALES LIEES AU SEXE	197 -
4.	ROLE DE VGLUT3-P.T8I DANS LA MODULATION DES REPNSES DE SOMMEIL INDUITES PAR LE CSDS	199 -
5.	LIMITES ET PERSPECTIVES	201 -
6.	CONCLUSION	202 -
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>		<b>- 204 -</b>
<b>ANNEXES</b>		<b>- 244 -</b>
1.	ARTICLE : HENDERSON ET AL. (SOU MIS), CELL REPORTS	246 -
2.	ARTICLE : PINTO ET AL. (2024), JOURNAL OF CELL BIOLOGY	269 -
3.	DONNEES COMPLEMENTAIRES: ÉTUDE DONEPEZIL	287 -
4.	DONNEES COMPLEMENTAIRES: ÉTUDE COMPULSION	288 -

# LISTE DES FIGURES

FIGURE 1. REPRESENTATION DES DIFFERENTS MODELES DE L'EXPERIENCE DE PEUR.....	- 29 -
FIGURE 2. ILLUSTRATION DES AXES HPA ET SAM ACTIVES PAR L'HYPOTHALAMUS EN REPONSE AU STRESS..	- 44 -
-	
FIGURE 3. REGIONS CEREBRALES IMPLIQUEES DANS LA REPONSE AU STRESS ET QUI SECRETENT LA CORTICOLIBERINE (OU CRH).....	- 45 -
FIGURE 4. PROTOCOLE MODIFIE DE STRESS CHRONIQUE DE DEFAITE SOCIALE (CSDS).....	- 48 -
FIGURE 5. PROTOCOLE DU TEST D'INTERACTION SOCIALE.....	- 49 -
FIGURE 6. REPRESENTATION DE LA CATEGORISATION DE LA SUSCEPTIBILITE ET RESILIENCE COMME REPONSE A UN CONDITIONNEMENT AVERSIF.....	- 52 -
FIGURE 7. TRACES POLYGRAPHIQUES TYPIQUES DE CHAQUE ETAT DE VIGILANCE ET ACTIVITES OSCILLATOIRES ASSOCIEES.....	- 54 -
FIGURE 8. REPRESENTATION DU PROCESSUS DE REGULATION CIRCADIENNE.....	- 55 -
FIGURE 9. ILLUSTRATIONS DES VOIES ASCENDANTES DE L'EVEIL (GAUCHE) ET DU ROLE CENTRAL DES NEURONES A HYPOCRETINES/OREXINES (DROITE).....	- 57 -
FIGURE 10. ILLUSTRATION DE LA LOCALISATION DES NEURONES DU SOMMEIL ET DU ROLE INHIBITEUR DES NEURONES DU VLPO SUR LE SYSTEME D'EVEIL.....	- 58 -
FIGURE 11. L'AIRE TEGMENTALE VENTRALE : UN NOUVEAU CENTRE DE REGULATION DE L'EVEIL ET DU SOMMEIL.....	- 59 -
FIGURE 12. CIRCUITS DU TRONC CEREBRAL REGULANT LE SOMMEIL PARADOXAL.....	- 60 -
FIGURE 13. REPRESENTATION DES DIFFERENTS TESTS LES PLUS UTILISES POUR EVALUER LES COMPORTEMENTS DE TYPE ANXIEUX.....	- 67 -
FIGURE 14. ILLUSTRATION DES PRINCIPAUX CIRCUITS IMPLIQUES DANS LES COMPORTEMENTS DE TYPE ANXIEUX CHEZ LE RONGEUR.....	- 71 -
FIGURE 15. ILLUSTRATION DE L'ORGANISATION DU STRIATUM CHEZ L'HUMAIN ET LA SOURIS EN FONCTION DE SES CONNEXIONS.....	- 77 -
FIGURE 16. ILLUSTRATION DE L'ORGANISATION EN GRADIENT DU STRIATUM DORSO-MEDIAN VERS LE STRIATUM VENTRO-LATERAL.....	- 78 -
FIGURE 17. REPRESENTATION DE L'ORGANISATION EN STRIOSOMES-MATRICE DU STRIATUM.....	- 79 -
FIGURE 18. SCHEMATISATION DES AFFERENCES STRIATALES.....	- 81 -
FIGURE 19. ILLUSTRATION DES NEURONES ET AFFERENCES DANS LE NOYAU ACCUMBENS.....	- 83 -
FIGURE 20. ILLUSTRATION DES VOIES DIRECTES ET INDIRECTES DES GANGLIONS DE LA BASE.....	- 84 -
FIGURE 21. SCHEMATISATION DE LA REGULATION DES ETATS VEILLE-SOMMEIL PAR LE NAC.....	- 92 -
FIGURE 22. DISTRIBUTION DES ARNm ET DE LA FORME PROTEIQUE DU TRANSPORTEUR VESICULAIRE DE GLUTAMATE 3 (VGLUT3).....	- 96 -
FIGURE 23. REPRESENTATION DES MECANISMES MOLECULAIRES DE LA SYNERGIE VESICULAIRE.....	- 98 -
FIGURE 24. REPRESENTATION DU MODELE HYPOTHETIQUE DE DISTRIBUTION ET DE PROPORTIONS DE VACHT ET VGLUT3 AU SEIN DES INTERNEURONES CHOLINERGIQUES.....	- 99 -
FIGURE 25. MODELISATION EN 3-DIMENSIONS DE VGLUT3 (A, B) ET VGLUT3-P.T8I (C, D).....	- 101 -
FIGURE 26. LE VARIANT P.T8I N'ALTERE PAS LE TRANSPORT DU GLUTAMATE.....	- 101 -
FIGURE 27. LE VARIANT P.T8I ALTERE LA LIBERATION D'ACETYLCHOLINE DANS LE STRIATUM DORSAL.....	- 102 -
FIGURE 28. LE VARIANT P.T8I DIMINUE LA LIBERATION DE DOPAMINE (DA) DANS LE STRIATUM DORSOMEDIAL. .....	- 102 -
FIGURE 29. PROTOCOLE DE STRESS CHRONIQUE DE DEFAITE SOCIALE CHEZ LES MALES ET FEMELLES.....	- 110 -
FIGURE 30. CHRONOLOGIE DE LA CARACTERISATION COMPORTEMENTALE.....	- 110 -
FIGURE 31. PROTOCOLE DU TEST D'INTERACTION SOCIALE.....	- 111 -
FIGURE 32. PROTOCOLE DU TEST DES 3 CHAMBRES.....	- 112 -
FIGURE 33. PROTOCOLE DE L'ELEVATED ZERO MAZE.....	- 113 -
FIGURE 34. PROTOCOLE DE L'EXPERIENCE DE TRAITEMENT AU DONEPEZIL.....	- 114 -
FIGURE 35. SCHEMA DES INJECTIONS VIRALES BILATERALES ET IMPLANTATIONS DES FIBRES OPTIQUES.....	- 116 -
FIGURE 36. CHRONOLOGIE DES EXPERIENCES D'ENREGISTREMENTS DE PHOTOMETRIE DE FIBRE.....	- 117 -
FIGURE 37. ÉTAPES DE NORMALISATION DES SIGNAUX DE PHOTOMETRIE.....	- 118 -
FIGURE 38. CHRONOLOGIE DES EXPERIENCES D'ENREGISTREMENTS DES ETATS DE VIGILANCE.....	- 120 -
FIGURE 39. DESIGN EXPERIMENTAL DES ENREGISTREMENTS POLYSOMNOGRAPHIQUES EN REPONSE AU CSDS.....	- 168 -
FIGURE 40. QUANTITES D'EVEIL, DE SOMMEIL LENT ET DE SOMMEIL PARADOXAL DURANT LES 3 HEURES QUI SUIVENT LA FIN DE LA DEFAITE SOCIALE.....	- 169 -

FIGURE 41. QUANTITES D'EVEIL, DE SOMMEIL LENT ET DE SOMMEIL PARADOXAL SUR 24 HEURES A L'ETAT BASAL ET APRES STRESS. ....	- 171 -
FIGURE 42. QUANTITES D'EVEIL A L'ETAT BASAL ET APRES STRESS EN FONCTION DES PERIODES DIURNE ET NOCTURNE. ....	- 172 -
FIGURE 43. QUANTITES DE SOMMEIL LENT A L'ETAT BASAL ET APRES STRESS EN FONCTION DES PERIODES DIURNE ET NOCTURNE. ....	- 173 -
FIGURE 44. QUANTITES D'EVEIL, DE SOMMEIL LENT ET DE SOMMEIL PARADOXAL DURANT LES 3 HEURES QUI SUIVENT LA FIN DE LA DEFAITE SOCIALE. ....	- 174 -
FIGURE 45. QUANTITES D'EVEIL, DE SOMMEIL LENT ET DE SOMMEIL PARADOXAL SUR 24 HEURES A L'ETAT BASAL ET APRES STRESS. ....	- 175 -
FIGURE 46. QUANTITES D'EVEIL A L'ETAT BASAL ET APRES STRESS EN FONCTION DES PERIODES DIURNE ET NOCTURNE. ....	- 176 -
FIGURE 47. QUANTITES DE SOMMEIL LENT A L'ETAT BASAL ET APRES STRESS EN FONCTION DES PERIODES DIURNE ET NOCTURNE. ....	- 177 -
FIGURE 48. QUANTITES DE SOMMEIL PARADOXAL A L'ETAT BASAL ET APRES STRESS EN FONCTION DES PERIODES DIURNE ET NOCTURNE. ....	- 178 -
FIGURE 49. REPRESENTATION DES DIFFERENTS FACTEURS IMPLIQUES DANS LA MODULATION DE LA REPONSE COMPORTEMENTALE AU CSDS. ....	- 185 -
FIGURE 50. . SCHEMA RECAPITULATIF DES DIFFERENTES REPONSES COMPORTEMENTALES INDUITES PAR LE CSDS EN FONCTION DE L'EVITEMENT SOCIAL. ....	- 187 -

# RESUME

---

Le stress représente un facteur de risque majeur dans le développement des troubles psychiatriques et des troubles du sommeil. La diversité des réponses émotionnelles au stress résulte de l'influence conjointe de facteurs environnementaux et génétiques. Le noyau accumbens (NAc) joue un rôle central dans la susceptibilité au stress et récemment, son implication dans la régulation du sommeil a été mise en évidence. Les adaptations comportementales liées à la résilience ou la susceptibilité au stress sont modulées par les transmissions dopaminergique et cholinergique au sein du NAc. L'acétylcholine (ACh) provient principalement des interneurons cholinergiques (CINs), qui communiquent à la fois avec du glutamate (Glut) et de l'ACh, respectivement grâce au transporteur vésiculaire du glutamate de type 3 (VGLUT3) et au transporteur vésiculaire d'acétylcholine (VACHT). L'équipe a récemment montré que le variant allélique p.T8I-VGLUT3 entraîne une diminution de la transmission cholinergique dans le striatum, sans affecter le transport du Glut.

Ainsi, l'objectif de ma thèse a été de caractériser le rôle du variant allélique p.T8I dans la réponse au stress en caractérisant le comportement et le sommeil ainsi que les transmissions d'ACh et de DA associées dans le NAc d'un modèle murin.

Pour cela, j'ai évalué le comportement social, de type anxieux et dépressif, ainsi que les cycles veille-sommeil des souris VGLUT3<sup>T8I/T8I</sup> et témoins mâles et femelles avant et après un stress chronique de défaite sociale (CSDS). Afin d'étudier le rôle de l'ACh et de la DA dans ces comportements, j'ai enregistré leur dynamique de libération par photométrie de fibre à l'aide de biosenseurs fluorescents dans ce modèle murin.

Les données obtenues montrent que le variant p.T8I est associé à un évitement social accru dépendant de la cible sociale, et de niveaux élevés d'anxiété, accompagnés d'une architecture du sommeil distincte en réaction au stress. De plus, ces comportements sont corrélés à une libération réduite d'ACh en réponse au stress chez les mâles. Ces travaux permettent ainsi de mettre en évidence la relation entre le variant p.T8I, les transmissions d'ACh et de DA, et la réponse au stress chronique social, impliquée dans la susceptibilité au stress.

# ABSTRACT

---

Stress is a risk factor for the development of psychiatric conditions such as generalized anxiety and major depressive disorder which are often associated with sleep disturbances. The behavioral adaptation to stress is influenced by a combination of environmental and genetic factors, leading to significant variability among individuals. The nucleus accumbens (NAc) plays a critical role in stress susceptibility and sleep regulation. In the NAc, the behavioral adaptations associated with resilience or susceptibility to stress are modulated by dopamine (DA) and acetylcholine (ACh) signals. The latter is predominantly released by cholinergic interneurons (CINs). Notably, CINs have the ability to signal with both ACh and glutamate through the expression of vesicular acetylcholine transporter (VAChT) and vesicular glutamate transporter 3 (VGLUT3). Our lab recently showed that the VGLUT3-p.T8I allelic variant results in a reduced ACh release from CINs without affecting glutamate release.

The objective of my PhD was to elucidate the role of the p.T8I variant in shaping behavioral and sleep responses to stress as well as the stress-associated neuronal ACh and DA dynamics in the NAc.

To address these questions, I took advantage of a mouse line carrying the p.T8I variant (VGLUT3<sup>T8I/T8I</sup>) to study social, anxiety- and depressive-like behaviors as well as sleep-wake patterns in male and female mice both before and after chronic social defeat stress (CSDS) exposure. Then, I measured *in vivo* ACh and DA dynamics in the NAc using fiber photometry coupled with fluorescent biosensors to assess their release in response to stress.

The findings indicate that the p.T8I variant is associated with enhanced social cue discrimination characterized by high target-dependent social avoidance, and elevated anxiety-like levels, accompanied by distinct acute stress-induced sleep changes. Moreover, these behaviors are associated with reduced stress-induced ACh release in the NAc in male mice. Together, these findings reveal the intricate relationship between the p.T8I variant, diminished cholinergic transmission within the NAc and susceptibility to stress.

# ABBREVIATIONS

---

5-HT	5-hydroxytryptamine, sérotonine
μH+	Gradient de pH
ACh	Acétylcholine
ACTH	Adénocorticotrope
AVP	Vasopressine
BF	Prosencéphale basal
BLA	Complexe basolatéral de l'amygdale
BNST	Noyau du lit de la strie terminale
BZ	Benzodiazépines
CeA	Noyau central de l'amygdale
CES	Stress émotionnel chronique
CINs	Interneurones cholinergiques
CM/Pf	Complexe centro-médian/parafasciculaire
CMS	Stress chronique modéré
CNO	Clozapine-N-oxyde
CORT	Corticostérone
CR	Calrétinine
CRH	Corticolibérine
CSDS	Stress chronique de défaite sociale
D1R	Récepteurs de la dopamine D1
D2R	Récepteurs de la dopamine D2
DA	Dopamine
DLS	Striatum dorsolatéral
DMS	Striatum dorsomédial
DMS-V	Manuel Diagnostique et Statistique des troubles mentaux, 5 <sup>ème</sup> édition
DRN	Noyau dorsal du raphé
EEG	Electro-encéphalogramme
eGFP	Protéine fluorescente verte
EMG	Electro-myogramme
EO	Electro-oculogramme
EPM	Elevated plus maze
EZM	Elevated zero maze
GABA	Acide γ-aminobutyrique
GC	Glucocorticoïde
Glut	Glutamate
GPe	Globus pallidus externe
GPI	Globus pallidus interne
GR	Récepteurs des glucocorticoïdes

Hcrt	Hypocrétine
HPA	Axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien
HPC	Hippocampe
IN	Interneurone
IN FAI	Interneurones à adaptation rapide
IN LTS	Interneurones à décharge à seuil bas
IN SABI <sub>s</sub>	Interneurones actifs spontanément par bouffées
IN THIN <sub>s</sub>	Interneurones exprimant la tyrosine hydroxylase
LC	Locus coeruleus
L/D	Light/dark
LDT	Noyau tegmental latéro-dorsal
LH	Hypothalamus lateral
M1-4R	Récepteurs muscariniques de sous-type 1-4
mGluRs	Récepteurs métabotropiques du glutamate
MSN ou SPN	Neurones épineux moyens
NAc	Noyau accumbens
nAChRs	Récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine
NGF	Neurogliaformes
NOS	Synthase oxyde nitrique
NOR	Noradrénaline
NPY	Neuropeptide Y
NT	Neurotransmetteur
OF	Open field
OMS	Organisation mondiale de la santé
PAG	Substance grise périaqueducule
PfN	Noyau parafasciculaire
PL	Cortex prélimbique
POA	Aire préoptique
PPN	Noyau pédonculopontin
PPT/LDT	Pédoncule pontique tegmental latéral/dorsal
PVN	Paraventriculaire
PV	Paralbumine
PVT	Thalamus paraventriculaire
RPE	Erreur de prédiction de la récompense
SAM	Axe sympatho-surrénalien
SL	Sommeil lent
SNc	Substance noire compacte
SNr	Substance noire réticulée
SOM	Somatostatine
SP	Sommeil paradoxal
TCA	Troubles du comportement alimentaire
Tph <sub>2</sub>	Tryptophane hydroxylase 2

V-ATPase	Pompe à protons vacuolaire
VACht	Transporteur vésiculaire de l'acétylcholine
vDG	Gyrus denté ventral
VGLUT1-3	Transporteurs vésiculaire du glutamate de types 1-3
vHPC	Hippocampe ventral
VMAT2	Transporteur vésiculaire des monoamines 2
vmPFC	Cortex préfrontal ventro-médial
vPFC	Cortex préfrontal ventral
VP	Pallidum ventral
VTA	Aire tegmentale ventrale

# INTRODUCTION

---



# Chapitre 1 –

## Introduction Générale

### 1. Au-delà du cerveau : vers une compréhension holistique des émotions

Avant d'entreprendre l'étude des mécanismes neurobiologiques qui sous-tendent les réponses émotionnelles au stress et aux troubles psychiatriques associés, il me semble essentiel de commencer par s'intéresser à ce que sont les émotions, et à leurs manifestations cognitives et comportementales. Si les neurosciences ont beaucoup progressé dans la description des processus neurobiologiques associés aux phénomènes émotionnels, il n'en demeure pas moins que la question de savoir ce qui caractérise précisément une émotion, et quelles en sont les composantes nécessaires et suffisantes, reste controversée. Que ce soit de manière implicite, par le choix des paramètres mesurés, ou de manière explicite, les études empiriques sur les émotions ne se réfèrent pas toutes aux mêmes définitions des émotions. Cet état de fait peut être problématique, en tant qu'il est possible que l'on ne s'intéresse pas exactement aux mêmes phénomènes, selon les définitions sous-jacentes à nos études.

Ainsi, il semble primordial de ne pas perdre de vue les aspects conceptuels qui sous-tendent ces recherches pour une compréhension complète et approfondie des émotions et de leur rapport à la santé mentale. Et pour avancer sur ce point, intégrer une perspective philosophique dans l'étude des émotions peut être intéressant. En effet, il existe une vaste littérature en philosophie des émotions, dont une partie s'intéresse de près à la question de la définition d'une émotion, de savoir quelles sont ses manifestations typiques, et comment la distinguer, en théorie et en pratique, d'autres états mentaux proches. La philosophie a donc des outils conceptuels intéressants pour accompagner nos recherches neuroscientifiques. Ces outils semblent d'autant plus intéressants à mobiliser dans le cadre des neurosciences translationnelles, qui impliquent non seulement de savoir identifier une émotion, mais aussi de posséder des critères pour différencier les émotions saines des émotions pathologiques, sur la base desquels concevoir des modèles d'étude pertinents.

Ce chapitre vise donc à initier une réflexion sur les études des émotions par les neurosciences à travers le prisme de la philosophie, et souligne ainsi l'importance d'accompagner nos recherches neuroscientifiques d'une réflexion philosophique. Ce chapitre défend l'idée que l'alliance des neurosciences et de la philosophie offre un cadre conceptuel robuste pour aborder les questions complexes et interdisciplinaires relatives aux émotions et aux troubles psychiatriques, facilitant ainsi le développement de recherches translationnelles plus efficaces et pertinentes. C'est par cette approche holistique, intégrant à la fois les réflexions philosophiques et les connaissances scientifiques, que ma thèse s'inscrit.

## **1.1. Le cerveau et les émotions : un dialogue entre philosophie et neurosciences**

### *1.1.1. Définir l'émotion en la différenciant de l'humeur*

Dans notre quête de compréhension de nos états affectifs internes, nous nous référons couramment, et de façon intuitive, au terme d'« émotions ». Dès lors, une première question se pose, qui est celle de sa définition : qu'est-ce qu'une émotion ? Malgré son importance dans nos existences quotidiennes, définir ce qu'est une émotion, et ce qui la distingue d'autres états affectifs n'est pas évident. Ce qu'on entend généralement par émotions est en effet un concept hétérogène et multidimensionnel englobant plusieurs autres phénomènes affectifs, tels que les sentiments, les humeurs, les désirs, les passions, les affections, les plaisirs, ou encore les mouvements. Une première difficulté de l'appréhension de cette notion vient donc du langage commun et de l'usage de différents termes pour exprimer parfois la même idée.

Alors choisir d'en faire un objet d'étude, philosophique ou scientifique, suggère d'abord de passer par une étape de clarification conceptuelle, et c'est justement une question qui occupe philosophes et scientifiques depuis des siècles. Mais aujourd'hui, il n'existe pas de théorie unifiée de l'émotion, et plusieurs conceptions rivales co-existent : c'est la deuxième difficulté à laquelle on se heurte quand on cherche à appréhender cette notion. Toutefois, il existe un premier point d'accord qui a tout de même fini par émerger quand il s'agit d'étudier les phénomènes affectifs : de nos jours, les concepts d'émotions et d'humeurs sont davantage préférés par les scientifiques, bien que souvent confondus, en particulier lorsqu'il est question de troubles émotionnels et troubles de l'humeur. Une première manière de comprendre l'émotion est donc d'opter pour une approche différentielle, en énumérant ses propriétés distinctives par rapport à cet autre état affectif qu'est l'humeur. Dans la littérature, on trouve trois critères utilisés à cette fin, qui concernent leur intentionnalité, leur chronométrie, et leur

effet qualitatif (*qualia*) (Prinz, 2004 ; Goldie, 2000). Les émotions sont des phénomènes intentionnels en ce sens qu'elles sont toujours dirigées vers un objet. Nous sommes en colère contre quelqu'un, nous avons peur de quelque chose, etc. A l'inverse, l'humeur ne porte pas sur un objet particulier. Nous sommes de bonne humeur ou de mauvaise humeur, il s'agit d'un état sans intentionnalité. L'émotion se distingue également de l'humeur par sa durée, plus courte. Alors que l'émotion présente un caractère volatil, l'humeur, elle, est longue et progressive, revêtant ainsi une certaine stabilité. Enfin, elles se distinguent par leur phénoménologie, autrement dit, par « l'effet qu'elles font », ou *qualia*. L'émotion est souvent ressentie avec une forte intensité, accompagnée d'une physiologie corporelle et cérébrale spécifique tandis que l'humeur présente une intensité plus modérée. Malgré leurs distinctions, il est important de souligner qu'il existe une relation bidirectionnelle de causalité entre l'émotion et l'humeur, qui s'influencent et agissent l'une sur l'autre, d'où la nécessité de les étudier, non pas seulement pour ce qu'elles sont en elles-mêmes, mais aussi pour leurs fonctions.

#### *1.1.2. Définir l'émotion en remontant à son histoire évolutive*

Une deuxième manière de comprendre le concept d'émotion est d'essayer de distinguer les différents types d'émotions qu'il comprend. Plusieurs listes d'émotions ont ainsi été proposées. Les Stoïciens, par exemple, ont identifié quatre émotions fondamentales : le plaisir, le déplaisir, l'appétit et la peur (Deonna et Teroni, 2008). Dans *Les Passions de l'Âme* (1990), Descartes dénombrait six émotions primitives telles que l'admiration-étonnement, l'amour, la haine, le désir, la joie et la tristesse. Cependant, il soutenait également l'idée qu'un grand nombre d'autres émotions tiraient leur origine de ces six émotions « primitives ». Malgré l'absence de consensus sur la catégorisation des émotions, cette idée selon laquelle il existerait des émotions de base, simples, desquelles dériveraient d'autres émotions complexes, est aujourd'hui un autre point d'accord sur lequel se rejoignent de nombreux philosophes et scientifiques.

Avec l'idée d'émotions de base, la question de leurs fonctions et de leur utilité s'est posée. Plusieurs théories ont émergé à la fin du XX<sup>ème</sup> siècle afin d'y répondre. Ces théories ont été influencées par les idées de Darwin, qui attribuait aux émotions une fonction évolutive. Dans *L'expression des émotions chez l'homme et les animaux* (2016), Darwin souligne l'avantage évolutif procuré par les émotions, notamment dans leur capacité à influencer la formation d'action habituelles. Il a également souligné le fait que les émotions, et en particulier leur expression,

sont relativement conservées entre les différentes espèces animales. Selon sa théorie sur la sélection naturelle, les émotions sont conservées car elles remplissent une fonction adaptative. Darwin a particulièrement mis l'accent sur la fonction sociale de l'expression des émotions, c'est-à-dire leur rôle dans la communication.

A partir de cette proposition de Darwin, des théories néo-darwinistes ont émergé. Dans ce contexte, la question se déplace un peu, et la grande préoccupation des néodarwiniens était alors de savoir si les émotions sont innées, c'est-à-dire issues d'une fonction biologique, ou bien acquises, c'est-à-dire influencées par l'environnement et les comportements. Ekman (1972) a tenté d'apporter des éléments de réponse à partir de l'idée que les émotions seraient universelles. Il fonde cette idée à partir des résultats d'une expérience, au cours de laquelle il a mesuré la reconnaissance des expressions faciales des émotions à travers différentes cultures. Il a ainsi identifié une liste d'émotions qui seraient universellement partagées : la surprise, la colère, la peur, le dégoût, la tristesse et la joie. Bien que cette vision universaliste de quelques émotions de base ait par la suite été réfutée, elle a néanmoins permis de fonder les bases d'une théorie psycho-évolutive selon laquelle certaines émotions primaires, d'origine biologique, sont nécessaires au développement d'émotions secondaires. Ainsi, Plutchik (1980), en s'inspirant des travaux d'Ekman, propose l'idée que les émotions font partie d'un système coordonné et programmé, dans lequel l'interaction entre les émotions primaires et secondaires module les changements physiologiques, cognitifs et comportementaux. En particulier, les émotions secondaires sont formées par la combinaison de deux émotions primaires. Cette théorie avait pour objectif principal d'aboutir à une catégorisation des émotions, et a permis de concevoir les émotions comme des « programmes affectifs », qui constitueraient un système organisé afin de favoriser la survie de l'individu.

### *1.1.3. Les émotions enracinées dans le corps : une perspective périphéraliste*

Cette conception des émotions comme étant utiles à la survie de l'individu est largement répandue dans la littérature scientifique contemporaine. Plusieurs théories de l'émotion s'ancrent dans ce cadre conceptuel général. Une troisième manière de comprendre ce dont il est question lorsque l'on parle d'émotions est de se référer à l'une de ces théories. L'une d'entre elles qui a fait date est la théorie périphéraliste de James et Lange (1884, 1885). Cette théorie accorde une place centrale aux sensations corporelles dans l'analyse de l'émotion.

Intuitivement, on a tendance à penser que les états émotionnels conditionnent les états physiologiques. On pense d'abord à une perception de l'environnement, puis à une émotion, et enfin à une expression de celle-ci. C'est parce que je suis triste, que je pleure. Selon James, c'est l'inverse : les réactions physiologiques comme le rythme cardiaque, les changements de la respiration, ou encore la sudation précèdent l'expression de l'émotion, et celle-ci peut être assimilée à la conscience par le sujet de ses modifications physiologiques. Ainsi, je ne pleure pas car je suis triste, mais je suis triste parce que je pleure.

Cette théorie a suscité de nombreuses critiques, la plus connue étant celle de Cannon (1927), qui dénonce l'impossibilité de différencier toutes les émotions uniquement par les réactions physiologiques viscérales. Cannon illustre ce point en prenant l'exemple de la colère et de la joie, qui, selon la théorie de James, se classeraient dans la même catégorie en ce qu'elles partagent des changements corporels similaires comme par exemple l'accélération du rythme cardiaque. De plus, Cannon souligne l'impossibilité pour les changements venant du système périphérique d'être à l'origine d'états émotionnels, puisqu'ils ne produisent pas systématiquement et de manière nécessaire de tels états. Par exemple, le tremblement qui précède la peur selon James peut se produire sans le ressenti de peur, notamment lorsque l'on a froid. Cette théorie ne tient pas non plus compte de l'absence de relation régulière entre les états physiologiques et l'émotion, qui peut varier d'un individu à l'autre. Par exemple, la honte peut se manifester par une sudation excessive chez un individu, mais par un rougissement associé à une dilatation vasculaire chez un autre.

Malgré son manque de rigueur et de précision, ainsi que les malentendus qu'elle a pu faire naître, la théorie de James-Lange a marqué l'histoire de la philosophie, de la psychologie et des neurosciences. Elle a en effet permis de mettre en lumière le rôle des sensations corporelles et donc de l'environnement dans les émotions, qui étaient auparavant surtout décrites comme des états mentaux, de l'âme et de l'esprit par les philosophes.

Aujourd'hui, la question de savoir si l'émotion est caractérisée de manière centrale par un centre cérébral des émotions ou si le système périphérique y a également chose à redire, reste débattue. En effet, cette intégration de l'aspect périphérique soulève une question fondamentale : comment et pourquoi les stimuli de l'environnement modulent-ils la réponse émotionnelle ? Bien que l'approche de Lange et James mette en avant le rôle des perceptions corporelles et des stimuli de l'environnement dans le déclenchement des émotions, elle ne prend pas suffisamment en compte l'aspect subjectif de la réponse émotionnelle, qui est

largement influencée par l'expérience sociale et le vécu individuel (Griffiths et Scarantino, 2005). Cette variabilité inter-individuelle laisse en suspens la question de savoir comment l'environnement peut moduler la réponse émotionnelle. Pour répondre à ces nouvelles problématiques, de nouvelles approches ont émergé : celles des neurosciences cognitives. De nombreuses recherches sur le rôle du système périphérique dans la causalité de l'émotion ont ainsi été initiées, et ont suscité un intérêt croissant pour l'implication des processus cognitifs qui font le lien entre la perception physiologique corporelle et l'émotion.

#### *1.1.4. Les neurosciences contemporaines : quand émotions, cognition et adaptation s'entremêlent*

Une quatrième manière de comprendre ce que sont les émotions est d'aller voir ce qu'il se passe aujourd'hui du côté des neurosciences contemporaines, et de comprendre comment elles tentent d'intégrer les réflexions précédentes.

Pour comprendre les émotions, les théories neuroscientifiques contemporaines associent le principe d'utilité des émotions issues des théories néodarwiniennes, reconnaissant une importance cruciale de ces dernières dans l'adaptation et la survie (Anderson et Adolphs, 2014). A cela, les neurosciences contemporaines intègrent également certains éléments des théories périphéralistes, mettant en avant l'importance des changements corporels, tout en insistant sur le rôle central du cerveau. Ainsi, les neurosciences contemporaines étudient les émotions en tenant compte de leurs causes, de leurs fonctions et de leurs conséquences, à la fois sur les plans comportemental et cognitif. Selon ces théories, les émotions émergent d'un processus d'évaluation cognitive, indispensable à la survie en ce qu'il permet de pouvoir rapidement réagir face aux stimuli environnementaux. Ces perspectives, qui accordent une place centrale à l'évaluation cognitive dans la genèse des émotions, est actuellement la plus explorée et étudiée dans le domaine des neurosciences (LeDoux, 2012 ; LeDoux et Pine, 2016 ; Quéré, 2023).

Pour désigner ce champ d'étude et les théories qui y sont associées, le concept de « neurosciences affectives » a été popularisé par Panksepp (1998). Ce dernier considère que les expériences affectives et émotionnelles émanent de systèmes opérationnels innés localisés dans le cerveau. Selon lui, l'interaction entre ces différents systèmes, conservés au cours de l'histoire évolutive, est à l'origine de diverses émotions, comme le suggère le développement d'émotions spécifiques suite à la stimulation de certaines régions cérébrales (Panksepp, 1982).

Il distinguait quatre systèmes principaux distincts : celui de la recherche, de la rage, de la peur et de la panique. Ces systèmes cognitifs, de par leur localisation centrale, peuvent interagir entre eux pour évaluer une situation et ainsi orchestrer une réponse comportementale en adéquation avec les besoins vitaux de l'individu.

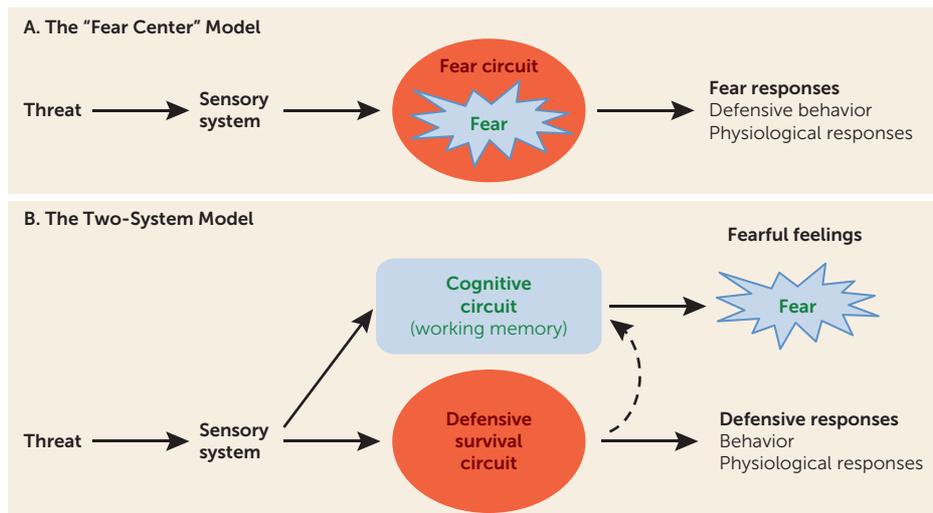
Depuis, plusieurs théories ont émergé, accordant toujours une place centrale à l'aspect cognitif des émotions. Je propose de résumer ici deux d'entre elles, qui ont été parmi les plus influentes dans le développement des neurosciences affectives : celle de Damasio, et celle de LeDoux.

Damasio, comme d'ailleurs tout le champ de la neurologie, a notamment été marqué par des observations de cas cliniques de patients présentant des lésions cérébrales et une incapacité à ressentir des émotions, comme le cas de Phineas Gage. Selon Damasio, il convient de distinguer l'émotion du ressenti de l'émotion, ou sentiment, afin de pouvoir expliquer l'expérience émotionnelle. Pour résumer sa pensée, la perception de l'émotion nous vient de stimuli environnementaux qui trouvent leur expression dans le corps, et repose sur des circuits neuronaux périphériques et centraux qui permettent l'intégration de cette perception. L'information sensorielle est donc traitée intracérébralement *via* une boucle entre le cortex somatosensoriel et certaines régions sous-corticales limbiques impliquées dans la réponse émotionnelle somatique. Cependant, l'expérience émotionnelle ne se réduit pas uniquement à cette réponse physiologique, puisque Damasio considère qu'elle s'accompagne d'un état de conscience, d'un mode de pensée, qui ne doit pas être confondu avec les mécanismes neuronaux qui sous-tendent l'émotion et qui servent seulement de cadre matériel pour rendre possibles les représentations mentales. Les signaux du corps vers le cerveau *permettent* un état de conscience émotionnel, mais n'informent pas sur la représentation mentale émotionnelle (sentiment), qui est uniquement cérébrale. Ainsi, d'après Damasio, l'expérience émotionnelle est le produit d'une interaction entre les processus mentaux (sentiments) et les réponses physiologiques du corps, dont le rôle réside dans la prise de décision et le comportement humain. Ironiquement, en voulant se poser en contradicteur de Descartes « sans ménagement et avec ingratitude » dans *L'Erreur de Descartes* (2010), Damasio se sera en réalité réapproprié la thèse cartésienne, en la consolidant par l'apport de nouvelles connaissances en neurobiologie.

La première théorie de LeDoux (1998) se place à l'opposé de celle de Damasio. Pendant longtemps, sa perception a influencé celle de la recherche en neurosciences. Celle-ci supposait

que l'émotion ne constitue pas un objet de perception, mais repose sur un état du cerveau et une réponse corporelle. A la différence de Damasio, LeDoux, considèrerait que le ressenti de l'émotion *est* l'activation de circuits cérébraux suite à la réponse corporelle provoquée par un stimulus. Fondant ses réflexions sur ses études empiriques de la peur, selon lui le sentiment de peur n'est pas autre chose que l'activation de systèmes neurobiologiques, notamment des boucles cortico-thalamo-amygdaliennes. Une conséquence de cette théorie est qu'il est tout à fait possible d'étudier les bases neurobiologiques qui sous-tendent les états émotionnels puisque ceux-ci s'y réduisent, et ont une utilité pour la survie. Remarquons que la position de LeDoux a évolué au cours du temps, pour se rapprocher de celle de Damasio (LeDoux, 2015 ; LeDoux et Pine, 2016). Contrairement au modèle traditionnel (Panksepp, 1998 ; Panksepp et al., 2011), qui suppose que l'expérience subjective de la peur est programmée par les mêmes circuits neuronaux que ceux qui contrôlent les comportements défensifs et les réponses physiologiques, LeDoux soutient désormais que ce sont deux circuits différents, bien que dépendants, qui sont à l'origine de chacune des deux parties de l'expérience émotionnelle (Figure 1) (LeDoux et Pine, 2016). Ainsi, nous avons tendance à utiliser le même terme pour désigner à la fois l'état subjectif et les réponses objectives de défense, qui sont deux phénomènes différents que nous gagnerions à dissocier pour nos études. Un point avec lequel ne sont pas d'accord tous les neuroscientifiques aujourd'hui. Fanselow par exemple, un autre grand spécialiste des émotions, soutient que l'expérience subjective de l'émotion est inséparable de ses causes et/ou effets comportementaux et physiologiques (Fanselow & Pennington, 2017).

Aujourd'hui, ce débat reste ouvert, et la question de savoir si en étudiant les réponses physiologiques associées aux émotions, nous étudions aussi et toujours l'expérience subjective qui y est associée, reste controversée. Ce point soulève de nombreuses questions quant aux apports potentiels des neurosciences fondamentales et des modèles animaux non humains pour comprendre les émotions et les pathologies qui sont associées. Cela pose tout particulièrement problème lorsque les études ont pour objectif le développement de traitements pour ces pathologies. Je propose d'adresser ces questions au cours du point suivant.



**Figure 1. Représentation des différents modèles de l'expérience de peur.**

(A) Ancien modèle de LeDoux, dans lequel l'expérience subjective de peur est indissociable des circuits neuronaux impliqués dans les réponses défensives de peur. (B) Modèle actuel de l'expérience de peur, par lequel les mécanismes neuronaux impliqués dans la réponse comportementale de peur sont dissociés de l'expérience consciente de peur mais y contribuent indirectement. *LeDoux et Pine (2016)*.

## 1.2. Étudier les émotions grâce aux neurosciences : des implicites méthodologiques et conceptuels à questionner

Proposer des explications de nos états mentaux et de nos émotions grâce à la recherche fondamentale en neurosciences affectives est une entreprise complexe, qui pose question. En effet, la question de la pertinence de ces recherches peut être abordée selon deux angles : celui de son objet (les états mentaux), et celui des moyens, ou modèles, mis en place pour ces études.

### 1.2.1. Prendre pour objet d'étude les émotions suggère d'adopter une posture matérialiste associée à une démarche non réductionniste

Concernant la pertinence de choisir les états mentaux comme objet d'étude, une première question relève de l'ambition de naturaliser ces états, et de la perspective réductionniste qui en découle. En particulier, les neurosciences affectives ont pour objets les émotions dans leur totalité, avec leurs composantes subjectives et objectives. Pour que les neurosciences affectives soient pertinentes, il faut donc que les objets d'étude « émotions » puissent être des objets d'étude pertinents pour les neurosciences, c'est-à-dire qu'ils soient relatifs aux neurones et leurs circuits. Les neurosciences en tant qu'étude du système nerveux ne peuvent donc pas, par définition, étudier les émotions si celles-ci ne sont pas matérielles. Il y a donc un

présupposé méthodologique sous-jacent important lorsque l'on adopte une approche neuroscientifique, qui est une certaine posture matérialiste, c'est-à-dire que l'on considère que les états émotionnels résultent de la matière.

Dans ce contexte, on peut se demander si adopter cette posture matérialiste nécessite d'adopter aussi une posture réductionniste, c'est-à-dire de tenter de réduire de nos états mentaux à des états neurochimiques. La question se pose, étant donné que dans la littérature, la démarche scientifique est souvent décrite comme impliquant une démarche réductionniste à plusieurs niveaux différents (Nagel, 1949 ; Hooker, 1981 ; Weinberg, 1988). Ernest Nagel décrit par exemple la *réduction interthéorique*, qui caractérise selon lui une démarche scientifique : elle consiste à traduire une théorie dans les termes d'une autre théorie plus générale ou plus fondamentale. La neurobiologie ne semble pas échapper à ce type de réduction. Dans le cas des neurosciences, nos concepts d'états mentaux émanant de la psychologie populaire sont, selon certains auteurs, destinés à être réduits à des concepts de biologie moléculaire et de génétique (Crommelinck, 1995). Selon cette idée, les états neurobiologiques pourraient ainsi un jour expliquer, en totalité, les états mentaux ; et nos émotions, désirs, pensées, croyances, ne seraient que des réactions neurochimiques émanant de nos neurones, qui les déterminent entièrement. Si l'on accepte ce point de vue, qui est celui d'un réductionnisme radical, les neurosciences seraient donc particulièrement pertinentes pour expliquer les états mentaux.

Ce type d'approche a notamment donné naissance à la neurophilosophie. Churchland (1999) affirmait que « les états mentaux n'existent pas, il n'y a que des états neurobiologiques ». Selon elle, les questions philosophiques et notamment en philosophie de l'esprit comme les émotions, la mémoire, la conscience, les désirs, peuvent non seulement être adressées par les neurosciences, mais surtout *sont* des questions de neurosciences. Les partisans de la neurophilosophie soutiennent la naturalisation des objets philosophiques, c'est-à-dire le fait que les neurosciences suffiraient pour les connaître et répondre à toutes les questions qui se posent à leur sujet. Parmi les théories réductionnistes, on retrouve notamment celle de l'identité des types qui consiste à attribuer un état mental à un état cérébral (Smart, 1959 ; Place, 1956). Selon cette théorie, un état mental X est identique à un état cérébral Y. Par exemple, on pourrait considérer que l'état d'anxiété X est identique à l'activation du circuit neuronal Y.

Dans le même ordre d'idée, un courant réductionniste existe en psychiatrie, et tente de réduire les troubles psychiatriques à des causes génétiques ou épigénétiques (Feder et al.,

2009 ; Lemoine, 2017 ; Murphy, 2006 ; Schaffner, 2008). Selon cette approche, les gènes et leur modulation déterminent la structure du cerveau, qui à son tour influence le développement de troubles psychiatriques.

Bien que ce type d'approches ait permis de progresser dans nos connaissances des bases biologiques des fonctions mentales, elles présentent des limites importantes. Par exemple, elle ne rend pas compte du fait qu'un même état émotionnel peut être causé par différents états neurobiologiques, comme le montre la recherche sur l'anxiété. Un comportement d'anxiété peut être induit à la fois par l'activation des fibres de l'amygdale projetant sur l'hippocampe, et par l'activation des fibres de l'amygdale projetant sur le cortex préfrontal, suggérant qu'il n'y a pas une identité unique entre un état mental et un état physique (Feliz-Ortiz et al., 2013 ; Felix-Ortiz et al., 2016). Une telle posture réductionniste a également du mal à rendre compte de la complexité des émotions, qui impliquent des facteurs multiples, allant des processus neurobiologiques aux influences génétiques et environnementales.

Les limites de l'approche matérialiste ancrée au sein d'un réductionnisme radical soulèvent à nouveau le problème de la pertinence des neurosciences (Rosenberg, 1978 ; Searle, 2002). Est-ce que les neurosciences peuvent être pertinentes si les états émotionnels ne sont pas réductibles aux états neurobiologiques ? Ont-elles besoin de pouvoir entièrement expliquer un état mental pour être pertinentes dans l'étude des états émotionnels, et si non, dans quelle mesure le sont-elles ?

Dans ce contexte, plusieurs théories matérialistes antiréductionnistes ont cherché à expliquer les états mentaux (Chalmers, 1996 ; Searle, 2002 ; Putnam, 1967). Ainsi, l'argument de la réalisabilité multiple de Putnam (1975) s'oppose au matérialisme réductionniste en affirmant qu'un état mental peut être réalisé par plusieurs états physiques. Ainsi, l'état d'anxiété n'est plus réalisé par l'état physique Y, mais par une multitude n d'états physiques (Y1, Y2, ..., Yn). Cette théorie, en affirmant le matérialisme des états mentaux tout en niant son réductionnisme, souligne la diversité des réalités physiques pouvant donner lieu à des phénomènes mentaux. Dans ce cas, les neurosciences redeviennent pertinentes pour étudier les états mentaux.

Mais aller au bout de l'approche antiréductionniste, c'est aussi tenter de prendre en compte l'influence d'autres facteurs, tels que l'environnement social ou culturel, sur le comportement humain. Plusieurs neuroscientifiques ont tenté de le faire, notamment grâce au concept de

plasticité cérébrale (Diamond et al., 1971 ; Malkasian et Diamond, 1971). Ce concept, introduit plus tardivement en France par Changeux, soutient que les processus et réseaux de neurones peuvent être amenés à modifier leurs connexions en fonction de l'expérience (Changeux, 2012). La plasticité cérébrale implique donc que le cerveau n'est pas statique mais modelé par l'environnement, permettant ainsi de prendre en compte aussi bien l'influence des états neuronaux que l'impact des facteurs externes. De ce fait, le courant réductionniste en psychiatrie qui tente d'expliquer les troubles mentaux par des causes génétiques ou épigénétiques peut être nuancé à la lumière de ce concept de plasticité cérébrale. En effet, si les gènes et leur modulation déterminent la structure du cerveau, il est important de considérer que cette structure n'est pas figée. Notamment, les modifications épigénétiques, induites par l'environnement, peuvent influencer l'expression des gènes et modifier les connexions neuronales associées aux états émotionnels (Nestler, 2014). Ainsi, ce cadre explicatif peut permettre de mettre en avant l'importance des facteurs génétiques et environnementaux dans le développement des troubles mentaux, sans pour autant les y réduire, ou considérer qu'ils les déterminent de manière absolue.

Le concept de plasticité cérébrale, qui permet de rendre en compte à la fois le rôle central des états neuronaux et l'influence de facteurs externes au cerveau, redonne sa place à l'individualité en nous montrant que les états mentaux et émotions peuvent être modélés différemment en fonction des expériences. Ce concept peut aussi permettre de dépasser une approche réductionniste neurobiologique qui serait radicale, et permet de considérer les émotions comme des phénomènes multidimensionnels impliquant des facteurs biologiques, génétiques, environnementaux et individuels.

### *1.2.2. Utiliser des modèles animaux non humains pour étudier les émotions*

Concernant les moyens, ou modèles, mis en place par les neurosciences affectives dans l'étude des émotions, une question majeure est celle de la pertinence des modèles animaux, et en particulier, des modèles rongeurs. En effet, il paraît contre-intuitif d'extrapoler des connaissances sur le *fonctionnement émotionnel neurobiologique* du rongeur à l'être humain. Une première difficulté repose donc sur la réalisabilité de la modélisation. Est-il possible de modéliser les états émotionnels sains et pathologiques, et si oui, sous quelles conditions ? Afin de pouvoir répondre à la question de la pertinence de l'utilisation de tels modèles, il est également nécessaire de considérer leurs implications. Est-ce que les résultats observés peuvent être extrapolés à l'être humain ?

A ce sujet, notons qu'adopter une position comme celle de LeDoux (2016) ou de Damasio que j'ai mentionnée ci-dessus, met en même temps en évidence la nature problématique des inférences que l'on peut faire concernant les *expériences conscientes subjectives* des animaux non humains, à partir de mesures physiologiques et comportementales. La question se pose de savoir si l'on doit limiter les études sur ces états au comportement et à la physiologie de ces sentiments : les modèles animaux peuvent-ils contribuer à la compréhension des mécanismes prédominants des sentiments conscients, au moins de manière indirecte ? S'interroger sur la validité et les limites des résultats apportés par la recherche en neurobiologie est essentiel afin de s'assurer que ces recherches ne sont pas seulement le reflet d'une anthropomorphisation qui les rendrait vaines, mais qu'elles ont effectivement un sens.

Pour estimer la pertinence de ses modèles animaux, la recherche actuelle se base sur des critères de validité, dont les plus utilisés nous viennent de Willner. Selon lui, la validité d'un modèle animal repose sur trois critères : la validité de prédictibilité, la validité de ressemblance et la validité de construction (Willner, 1984).

Le premier critère de validité concerne la prédictibilité du modèle en réponse au traitement. Ainsi, un modèle valide selon ce critère est un modèle pour lequel on peut prédire l'efficacité du traitement de manière corrélée au traitement de la pathologie humaine. Par exemple, dans le cadre de la dépression, un modèle animal doit pouvoir répondre aux antidépresseurs humains. Deuxièmement, la validité de ressemblance repose sur la similitude symptomatique entre le modèle et la pathologie humaine. Il faut que le modèle puisse modéliser des symptômes qui s'apparentent aux symptômes de la pathologie humaine. Enfin, la validité de construction évalue l'homologie des théories explicatives des mécanismes sous-jacents à la pathologie modélisée par le modèle. Cela implique que les théories permettant spécifiquement d'expliquer la pathologie doivent également pouvoir expliquer les effets d'un modèle. Bien que la ressemblance soit souvent considérée comme le critère le plus important à première vue, en réalité, la validité de construction et la validité prédictive sont souvent plus cruciales, car elles permettent de valider les inférences scientifiques. La validité d'un modèle repose donc sur la prise en compte de ces critères, indépendamment les uns des autres, dans la conception du modèle et ses limites.

Bien que les critères de Willner aient fourni un cadre utile pour l'évaluation des modèles animaux, leur caractère trop simpliste ne suffisait plus à répondre aux défis posés par la

psychiatrie actuelle. C'est face aux limites de ces critères, ne rendant pas compte de la complexité des pathologies mentales, que Belzung et Lemoine (2011) ont proposé une redéfinition plus complète et nuancée de ces critères de validité. Tout d'abord ils présentent la *validité homologique*, qui examine la correspondance évolutionnaire et anatomique entre le modèle et la pathologie. Ensuite, la *validité pathogénique* évalue la similarité des processus qui précipitent la maladie, qu'il s'agisse des facteurs de vulnérabilité précoces (*validité ontopathologique*) ou des déclencheurs observés à l'âge adulte (*validité de déclenchement*). La *validité mécanistique* se rapproche de la validité de construction de Willner en ce qu'elle concerne la similarité des mécanismes sous-jacents à l'action thérapeutique entre le modèle et la pathologie humaine, mais la complète en s'appliquant également aux symptômes de la pathologie. Par ailleurs, la *validité de ressemblance* s'intéresse à la similarité des observations comportementales (*validité éthologique*) et des biomarqueurs (*validité des biomarqueurs*) entre le modèle et la pathologie modélisée. Enfin, la *validité prédictive* reprend le sens willnerien, en évaluant dans quelle mesure le modèle permet de prédire la réponse au traitement (*validité de rémission*), mais évalue également la prédictibilité des facteurs causaux de la maladie (*validité inductive*). Ces critères, en fournissant une évaluation exhaustive de la pertinence du modèle animal, contribuent à améliorer la fiabilité et la validité des études précliniques en recherche biomédicale.

Ces critères plus complets et nuancés permettent d'évaluer de manière plus rigoureuse les modèles animaux et d'accroître la fiabilité des résultats obtenus dans les études précliniques, particulièrement dans le contexte psychiatrique. La validation de tous ces critères de manière simultanée présente évidemment des défis pour le modélisateur, mais l'enjeu est peut-être moins dans la possibilité d'obtenir un modèle parfait que dans la nécessité de définir précisément ce qu'il modélise. C'est le point que je propose d'aborder maintenant.

### **1.3. Neurosciences et psychiatrie : définir et comprendre les troubles mentaux pour une recherche pertinente**

La plupart des troubles psychiatriques impliquent des troubles des émotions. Ainsi, la neurobiologie psychiatrique vise à déterminer les phénomènes et mécanismes neurobiologiques qui sous-tendent ces troubles afin de les traiter. Mais afin de pouvoir déterminer si la recherche actuelle en neurosciences psychiatriques est pertinente *per se*, et au-delà de la question de la pertinence de son objet et des moyens utilisés, il est également

nécessaire d'être en capacité de définir la cible à modéliser (la pathologie), mais aussi de s'interroger sur sa nature.

### 1.3.1. *Définir le sain et le pathologique : un défi crucial pour les neurosciences*

Comprendre les pathologies psychiatriques nécessite de définir la notion de pathologie, et de pouvoir distinguer un état pathologique d'un état « normal », ou « sain ». Dans la recherche en neurosciences, la pathologie est généralement considérée comme une réponse émotionnelle désadaptative par rapport à celle d'un groupe témoin présentant une réponse adaptative. Cependant, cette définition implique à nouveau de devoir distinguer ce qui est adaptatif de ce qui ne l'est pas. Or, le caractère adaptatif d'une réponse émotionnelle est forcément dépendant du contexte. Souvent, les neuroscientifiques normalisent ce caractère et distinguent donc le « normal » du « non-normal », ou pathologique. Cette catégorisation du « normal » et du « pathologique » n'est néanmoins pas toujours contextualisée, ni vraiment dépendante d'une norme. Un exemple est la susceptibilité au stress chronique de défaite sociale : le caractère pathologique est défini comme un déficit par rapport à une réponse attendue, considérée comme adaptative, sans tenir compte du contexte, et qui ne représente même pas la norme (statistique) au niveau de la population (Krishnan et al., 2007 ; Ayash et al., 2023). Parce que cette réponse est influencée par les antidépresseurs, n'en fait pas nécessairement une réponse associée à la dépression, en particulier au regard de l'inefficacité des antidépresseurs pour traiter la dépression (Belzung, 2014). Savoir distinguer les émotions saines des émotions pathologiques relève ainsi d'un défi majeur de la neuropsychiatrie. A quel moment peut-on dire qu'une émotion devient pathologique ?

Plusieurs philosophes ont souligné l'importance des émotions, même négatives, dans la survie. Dans *Éthique à Nicomaque* (2004), Aristote a pour ambition de produire un traité pratique pour mener l'individu vers la vie bonne, vers son perfectionnement moral. Pour Aristote, être heureux équivaut à être vertueux, et la vertu correspond à une manière de se rapporter aux états affectifs, une manière de se comporter vis-à-vis de nos affections. La vertu est donc une manière de ressentir, qui doit être le juste milieu entre l'excès et le défaut, c'est-à-dire qui doit être modérée. Il met ainsi en avant l'importance du degré de l'émotion ressentie ainsi que le contrôle de celle-ci pour l'action morale et la survie. On retrouve ici le caractère adaptatif de l'émotion. Pour les Contemporains, on retrouve une ambiguïté vis-à-vis des émotions. Dans le *Gai Savoir* (2009), Nietzsche nous dit : « Dans la douleur il y a autant de sagesse que dans le plaisir : tous deux sont au premier chef des forces conservatrices de l'espèce. S'il n'en était pas ainsi de la douleur, il y a longtemps qu'elle aurait disparu ; qu'elle

fasse mal, ce n'est pas là un argument contre elle, c'est au contraire son essence ». Insistant sur l'importance du développement de l'émotivité pour une meilleure survie, on retrouve cependant dans sa philosophie la notion de contrôle de l'émotion. Nietzsche voit en l'émotion son potentiel ascensionnel sur le plan de l'élévation de l'être humain, mais est conscient de son potentiel destructeur et pathologique face à l'absence de maîtrise de l'émotion par la réorganisation du corps. D'après lui, la distinction entre pathologie ascendante et descendante vient de la réponse de l'organisme au dérangement pathologique. Ainsi, ces théories appuient l'idée que l'émotion, même négative, est nécessaire à la survie à condition qu'elle soit maîtrisée selon le contexte. Ainsi, en accord avec la théorie évolutionniste de l'émotion, ce n'est pas la valence de l'émotion qui permet de distinguer le sain du pathologique. En effet, les états émotionnels négatifs ne sont pas anormaux et participent également (et surtout) à nous maintenir en vie en réponse à un danger. Nous enlever la douleur, ou la tristesse, ou la peur, nous conduirait droit vers notre fin. Le sain et le pathologique sont définis par leur caractère adaptatif. Comment alors définir ce qui est adaptatif et ce qui ne l'est pas ? L'approche évolutionniste des émotions suggère que la valeur adaptative d'une émotion dépend de la normalité de la réponse émotionnelle de l'individu face à une situation. Par exemple, avoir peur face à une voiture qui manque de nous renverser est normal et adaptatif. En revanche, ne pas ressentir de peur dans cette situation indique un dysfonctionnement de la peur, et est donc pathologique. Cet exemple illustre bien l'idée que le pathologique s'explique par un dysfonctionnement d'un mécanisme sous-jacent de l'émotion, ici, la peur.

Cette approche soulève quelques problèmes, notamment qu'elle implique de connaître ce qu'est une capacité émotionnelle normale, ou adaptative. Il s'agit donc ici d'un problème normatif. En psychiatrie, la normativité a été débattue entre ceux qui la voient relative à la société et ceux qui la voient relative au vital (Canguilem, 1966 ; Foucault, 1999). L'histoire de la psychiatrie montre que cette dernière a été définie comme une anormalité dans sa quotidienneté, c'est-à-dire en tant que norme sociale. L'enjeu de la psychiatrie est donc de trouver un critère objectif, biologique, qui permette de distinguer le normal du pathologique. Bien que cette approche normative tente de résoudre le problème de la distinction du normal et du pathologique, elle n'y parvient pas. En effet, si le pathologique est simplement une variation quantitative du normal, il faudrait préalablement connaître quelles sont les variables qui varient et dans quelle mesure. Mais puisque la variation résulte de la comparaison de deux variables entre deux états distincts (supposément, l'un normal, et l'autre pathologique), sa détermination implique nécessairement de savoir quelles variables changent. Autrement dit, il faudrait déjà savoir où aller chercher la différence quantitative, et donc déjà connaître la

variable normale (Canghuilem, 1966). Ainsi, bien que la normativité biologique de la santé permette effectivement l'étude du normal et du pathologique, elle ne permet cependant pas leur définition (Lemoine, 2017).

La recherche d'une définition objective de la santé, et ainsi de la pathologie, a amené le philosophe Boorse à proposer une définition fondée sur la normalité statistique (Boorse, 1975 ; 1976). Selon lui, la santé se définit comme l'absence de pathologie. Il souligne cependant que les statistiques ne sont ni nécessaires ni suffisantes pour décrire ce qui est pathologique. En effet, certaines pathologies sont statistiquement normales, et certaines anomalies statistiques sont saines. De plus, l'approche statistique classique n'est pas compatible avec la variabilité inter-individuelle. Il est donc nécessaire de relier la normalité statistique à la fonction biologique (survie et reproduction) d'une classe de référence pour éviter ces confusions. Par conséquent, cette approche permet de définir la santé individuelle comme une adaptation à la normalité des fonctions biologiques de la classe de référence, permettant ainsi une généralisation et une mesure objective de la santé. En revanche, si la santé est un fonctionnement normal, c'est-à-dire une contribution statistiquement typique d'un individu à partir d'une classe de référence à leurs objectifs de base (survie et reproduction), il est nécessaire que chaque classe de référence ait un idéal empirique qui peut être représenté et articulé à partir des statistiques. Cette idéalisation statistique permet de définir le pathologique à travers une distribution gaussienne, classant ce qui est « normal » (moyen) et ce qui ne l'est pas dans le fonctionnement biologique. On a ainsi une mesure objective de la santé basée sur une normalité, mais seulement au niveau d'une population, et non à l'échelle individuelle. La santé individuelle est donc la conformité à la normalité médicale basée sur cette idéalisation statistique. Cependant, la normativité boorséenne de la santé pose des problèmes d'un point de vue épidémiologique en ce qu'elle est dépendante de la population de référence et fluctue donc selon les changements démographiques, qui font directement fluctuer la norme statistique (Giroux, 2009). De plus, cette classification naturaliste efface toute l'influence sociale de la pathologie.

En conclusion, définir le sain et le pathologique en neurosciences est un défi complexe et multidimensionnel. Les différentes approches présentées soulèvent toutes des questions et des limites. Néanmoins, il est crucial que les neuroscientifiques gardent ces questionnements à l'esprit lors de la modélisation des maladies psychiatriques dans leurs recherches, puisque la définition du sain et du pathologique influence directement la manière dont les troubles mentaux sont conceptualisés, étudiés et traités.

### 1.3.2. La classification des maladies mentales : un défi entre nature et construction sociale

Souvent, les neuroscientifiques s'appuient, comme les psychiatres, sur les classifications existantes des troubles mentaux selon des critères sur lesquels se sont mis d'accord un ensemble d'experts. Actuellement, le *Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux* (DSM) est largement utilisé à cette fin (American Psychiatric Association, 2013). Outre la question de savoir quels critères distinguent une émotion saine d'une émotion pathologique, la classification des maladies mentales pose un deuxième défi majeur en psychiatrie. En particulier, se pose la question de l'interaction des classifications avec les maladies mentales en tant que phénomènes naturels. Pour les constructivistes, les maladies mentales sont considérées comme des constructions sociales, une perspective qui s'oppose radicalement à la position naturaliste de la recherche actuelle en neurobiologie. Ainsi, afin de déterminer la pertinence des neurosciences pour l'étude des maladies mentales, il est crucial de se pencher sur cette question : comment les maladies mentales peuvent-elles être à la fois des phénomènes naturels et des constructions sociales ?

En tant qu'êtres sociaux, nous sommes quotidiennement confrontés au regard de l'autre, ainsi qu'à son influence. Même en partant du principe que les maladies mentales sont des phénomènes biologiques, on ne peut nier leur influence sociale, due à leur classification. Selon Hacking (2001), il existe plusieurs genres de classifications en fonction de si elles peuvent être modifiées ou pas par la conscience du classifié envers ces classifications. Il distingue ainsi le genre *interactif*, où la classification interagit avec les classifiés : les individus classifiés peuvent prendre conscience de leur classification et de la manière dont cette classification est perçue dans la société. Ils peuvent ainsi modifier leur comportement, soit en vue de ne plus faire partie de cette classe, soit par recherche de revendication et d'identification à celle-ci. D'autre part, cette modification du comportement peut à son tour influencer la classification. On parle donc d'interaction bidirectionnelle : la classification influence le classifié, qui à son tour influence la classification. Par exemple, la classification « femme » agit sur l'individu classifié en ce que son idée représente socialement, de manière stéréotypée, pouvant conduire l'individu classifié à vouloir changer son comportement pour mieux correspondre, ou à l'inverse s'éloigner, de la perception sociale de cette classification. Ainsi, comme une boucle de retour sur la classification, ce changement de comportement modifie l'idée que l'on a de la classification « femme ». C'est ce que Hacking appelle *boucle classificatoire*. A l'inverse, il identifie les classifications de genre *indifférent*, en ce qu'elles ne sont pas influencées par la conscience du

classifié de son appartenance à la classification. Selon lui, les maladies mentales sont des classifications de genre *interactif*. En effet, parce que les patients classifiés sont conscients de leur diagnostic, ils peuvent interagir avec celui-ci et le modifier : c'est l'effet de *boucle classificatoire*. Cependant, si les causes biologiques sont au cœur des troubles psychiatriques comme le prétendent les neurosciences, ceux-ci ne seraient pas du genre *interactif*, mais plutôt du genre *indifférent* (naturel). Si les maladies mentales sont du genre *interactif*, un dilemme se pose alors pour les neurosciences : comment est-il possible qu'une condition psychiatrique soit à la fois un type *interactif* et un type *indifférent* ?

Hacking propose une solution sémantique, qui justifierait la pertinence des neurosciences dans l'étude des maladies mentales. Considérant la pathologie P du genre indifférent (car c'est une maladie biologique), son nom n'est qu'un nom donné à ce genre (P). En revanche, l'*idée* de la pathologie P est un genre interactif. Il utilise l'autisme infantile comme exemple. La question sémantique suggère que si une pathologie biologique P existe derrière le terme d'« autisme infantile », la pathologie P est un genre indifférent, et « autisme infantile » est le nom utilisé pour désigner la pathologie. Autrement dit, « pathologie P » équivaut à « autisme infantile ». Ce n'est cependant pas tout à fait le cas, car généralement, les noms des pathologies sont biaisés par les idées stéréotypées des troubles. Par conséquent, dans l'exemple précédent, « autisme infantile » ne fait pas seulement référence à la pathologie P mais aussi à l'*idée* que nous avons de l'autisme infantile. Il n'est donc pas contradictoire de dire qu'une maladie mentale est à la fois biologique et une construction sociale. L'idée du trouble mental est façonnée par la société, y compris les psychiatres et les patients. Ainsi, il est important de tenir compte de la dynamique des classifications, qui se produit entre notre connaissance d'un trouble mental plutôt que de la sémantique. La question maintenant abordée est de savoir si la connaissance de la pathologie P affecte les patients et, le cas échéant, comment elle peut influencer les patients et/ou l'idée commune de la pathologie, c'est-à-dire, comment la pathologie est perçue dans la société.

La dynamique des classifications des maladies mentales est complexe, car elle implique à la fois une *boucle classificatoire* et une *bioboucle*. La *boucle classificatoire* se réfère à l'interaction entre l'idée de la maladie mentale et les individus classifiés, qui en modifiant leur comportement pour s'adapter aux catégories établies, modifie à son tour l'idée de la maladie mentale. Par exemple, un individu diagnostiqué avec une dépression peut ajuster son comportement pour sortir de cette classification diagnostique, ce qui peut influencer la façon dont la dépression est perçue et donc, classifiée. D'autre part, la *bioboucle* représente l'influence

du mental sur la physiologie. Par exemple, des études ont montré que des attitudes positives psychologiques peuvent avoir un impact sur la santé physique, comme dans le cas du cancer, qui influent sur les taux de rémission (Fontesse et al., 2023 ; Zhao et al., 2022). Ainsi, il existe également un effet de la *bioboucle* sur les classifications, en modifiant la réalité biologique de la pathologie classifiée. Lorsqu'une maladie mentale, telle que la dépression, est considérée à la fois comme un phénomène social et une réalité biologique, il y a une dynamique complexe qui se produit. Les actions de la *boucle classificatoire* et de la *bioboucle* interagissent simultanément : d'une part, les individus peuvent modifier leur comportement pour s'adapter aux normes sociales, ce qui influe sur la classification des maladies mentales, et d'autre part, ces changements comportementaux peuvent également modifier les corrélats neuronaux associés à la maladie mentale.

En résumé, définir les maladies mentales est un défi complexe qui nécessite de prendre en compte à la fois leur nature biologique et l'influence des facteurs sociaux. La dynamique des classifications des maladies mentales, caractérisée par la *boucle classificatoire* et la *bioboucle*, contribue à la redéfinition constante des troubles psychiatriques.

### *1.3.3. Conclusion : repenser la recherche en psychiatrie en optant pour une approche multidimensionnelle en neurosciences*

La recherche en psychiatrie et en neurosciences est confrontée à un défi majeur : définir la nature des maladies mentales et trouver des moyens efficaces pour les guérir. Pour conclure, je propose une réflexion critique sur les paradigmes dominants et suggère d'adopter une approche interdisciplinaire.

L'opposition traditionnelle entre les visions normativistes naturalistes et constructivistes de la pathologie ne permet pas de progresser significativement concernant la définition de la nature des maladies mentales et leur guérison. En effet, la recherche de la « vérité » sur la nature des maladies mentales s'avère stérile et ne semble pas répondre aux besoins concrets des patients. L'approche descriptive de la maladie uniquement pour son propre but (en soi), n'est pas pertinente quant à la recherche en neurosciences affectives et psychiatriques. L'objectif principal en matière de santé et pathologie, concerne moins sa description en elle-même que sa guérison. Même s'il est évident que la description de la pathologie est une étape vers la guérison, elle n'est cependant pas entièrement nécessaire afin de trouver des traitements adaptés pour l'être humain. Il est plus pertinent de se concentrer sur l'approche la

plus efficace pour soulager la souffrance et améliorer la qualité de vie des personnes touchées par des troubles mentaux. Une première étape consiste donc à se demander à qui cette question est adressée. Guérir la maladie mentale est le rôle des psychiatres : c'est un rôle clinique. Ce qui importe est donc de savoir quelle approche (naturaliste ou normativiste) serait la plus utile et la plus précise pour les cliniciens afin de les aider à soigner les maladies psychiatriques. En pratique, les psychiatres, lorsqu'ils sont confrontés à des patients, devraient être en mesure de prendre objectivement une décision sur le caractère normal ou pathologique d'une condition. Ils ont pour cela besoin de critères spécifiques. A cet égard, la vision naturaliste semble offrir des avantages concrets pour la pratique clinique. La théorie bio-statistique de Boorse, par exemple, permet d'établir une frontière objective entre le normal et le pathologique, ce qui est crucial pour le diagnostic et le traitement des maladies mentales. La mesure objective de la maladie mentale semble plus appropriée à la pratique clinique massive et réelle.

Toutefois, il est important de ne pas tomber dans un dogmatisme scientifique. La science clinique est une science empirique qui est en constante évolution et les connaissances scientifiques ne sont vraies que jusqu'à ce qu'elles soient réfutées (Popper, 1985). Il est donc essentiel de rester ouvert à la réévaluation des pathologies et à l'intégration de nouvelles perspectives issues d'autres disciplines, même si celle-ci résulte d'un jugement subjectif et social.

La complexité des maladies mentales exige une approche multidimensionnelle qui intègre les apports de la philosophie, de la psychologie, de la sociologie et d'autres disciplines de recherche. En effet, les causes des troubles mentaux ne sont pas uniquement biologiques, mais également sociales, environnementales et individuelles et il est essentiel de s'ouvrir au regard critique d'autres disciplines. La pertinence des neurosciences dépend en réalité du neuroscientifique et de son approche de la recherche. Par la complexité du réel, la recherche en neurosciences nécessite d'intégrer pleinement sa portée ainsi que l'évolution des connaissances sur les émotions grâce aux autres disciplines. Sans cela, la recherche en neurosciences pourrait presque en devenir contre-productive, cherchant à répondre à une question qui ne correspondrait pas à ce que l'on pense qu'elle représente. Il y a souvent une confusion entre les états émotionnels conscients et les réponses biologiques et comportementales associées, dont la différenciation pourrait permettre une amélioration des traitements. La meilleure approche concernant les troubles psychiatriques est celle qui vise à mieux les soigner. En ce sens, même si les neurosciences ne permettent pas à elles seules d'expliquer les états émotionnels pathologiques, elles participent, à leur échelle, à la

compréhension générale de celles-ci, en s'intégrant dans un système épistémologique de connaissances pluridisciplinaires dont l'apport de la philosophie, de la psychologie, de la sociologie, ne permettent pas seulement d'éclairer la connaissance scientifique, mais y participent au même titre.

Ces réflexions sur la nature des émotions saines et pathologiques ont joué un rôle déterminant dans l'orientation et la contextualisation de ma propre recherche présentée dans les prochains chapitres. En effet, la compréhension des différentes perspectives de philosophie des sciences, telles que les perspectives naturaliste et constructiviste concernant les émotions et les troubles psychiatriques, est indispensable pour guider les investigations scientifiques qui explorent les interactions complexes entre les facteurs génétiques et le stress environnemental dans le développement de pathologies psychiatriques. C'est dans ce contexte que mon travail de thèse permet l'étude des mécanismes neurobiologiques sous-tendant les réponses émotionnelles au stress et troubles psychiatriques associés.

## 2. Neurobiologie du stress et des pathologies associées

### 2.1. Du système de réponse au stress à la susceptibilité individuelle

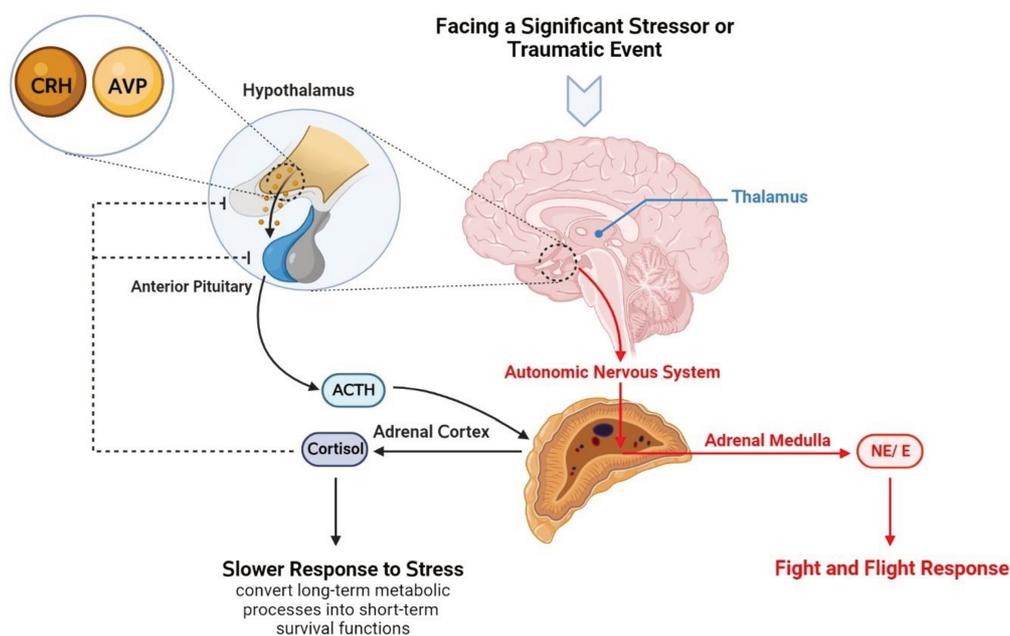
Les événements stressants et traumatiques marquent nos existences, nécessitant parfois une révision complète de nos modes de vie. Le stress est un terme courant désignant des expériences émotionnellement et/ou physiquement perturbantes. Nous distinguons souvent le « bon stress » (*eustress*) du « mauvais stress » (*distress*), reflétant deux réponses au stress opposées. En effet, le stress peut contribuer à stimuler les capacités cognitives par le biais de divers mécanismes physiologiques, mais peut également s'avérer contre-productif en réduisant les performances : la modulation des capacités cognitives par le stress suit une courbe en U inversée (Yerkes & Dodson, 1908; Diamond et al., 2007). Principalement, les réponses au stress visent à faire face à une menace et sont donc nécessaires pour la survie grâce à l'activation d'une combinaison de mécanismes physiologiques.

#### 2.1.1. Le système de réponse au stress

Le stress est défini comme une perturbation de l'homéostasie, l'équilibre interne de l'organisme, induisant une série de changements physiologiques et comportementaux visant à favoriser son adaptation à l'environnement. Cette réponse au stress est essentielle pour la survie, mais ses dysfonctionnements peuvent entraîner le développement de comportements inadaptés pouvant devenir pathologiques.

La fonction adaptative de la réponse au stress a été introduite par Cannon (1915) sous le nom de « réponse de combat ou de fuite » (*fight-or-flight*; Figure 2). Elle représente la réaction physiologique d'un individu face à un stimulus menaçant, et vise à déclencher un comportement de combat ou de fuite. La perception d'un stimulus stressant déclenche une cascade de modifications neuroendocrines *via* l'activation des axes sympatho-surrénalien (SAM) et hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA), permettant à la fois une réaction rapide face aux situations de danger immédiat, et une réponse plus lente qui médie les changements à long terme (Raise-Abdullahi et al., 2023). Cette activation des axes SAM et HPA induit, respectivement, une libération d'hormones adrénériques telles que l'adrénaline ou la noradrénaline, ainsi qu'une libération d'hormones cortico-surrénales. Face à un danger, les informations sensorielles sont transmises aux neurones paraventriculaires (PVN) de

l'hypothalamus qui sont alors activés et sécrètent la corticolibérine (CRH) et la vasopressine (AVP), stimulant ainsi la libération de l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) par l'hypophyse. Cette ACTH, à son tour, stimule la sécrétion de glucocorticoïdes (GC) par les glandes surrénales, tels que le cortisol chez l'humain et la corticostérone (CORT) chez le rongeur. La liaison de ces hormones avec les récepteurs des glucocorticoïdes (GR) ou les récepteurs minéralocorticoïdes (MR) permet un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion hypothalamique (Groeneweg et al., 2011). Ainsi, la perception d'un stimulus stressant (ou stresser) perturbe l'homéostasie, et les modifications physiologiques et comportementales qui en résultent visent à la rétablir en se soustrayant au stresser (Godoy et al., 2018).



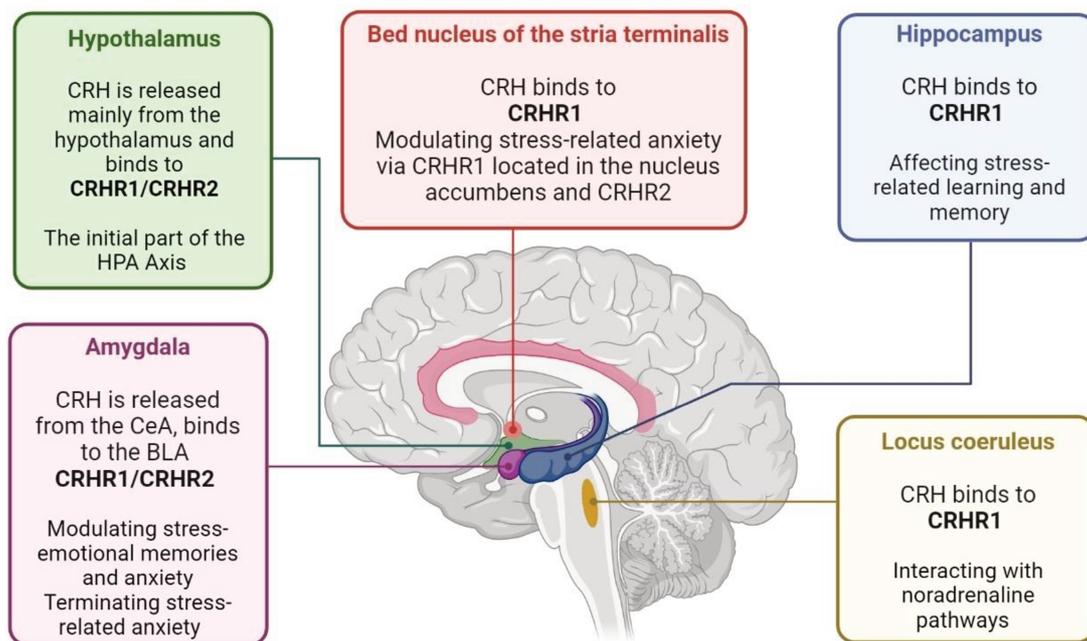
**Figure 2. Illustration des axes HPA et SAM activés par l'hypothalamus en réponse au stress.**

Le stress active deux voies : l'axe SAM et l'axe HPA. L'axe SAM permet une réponse rapide *via* la libération d'hormones adrénérgiques tandis que l'axe HPA permet une réponse plus lente par la libération de glucocorticoïdes. SAM : axe sympatho-surrénalien ; HPA : axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien ; CRH : corticolibérine ; AVP : vasopressine ; ACTH : hormone adrénocorticotrope ; NE/E : norépinéphrine/épinéphrine. *Adapté de Raise-Abdullahi et al. (2023).*

Chez l'humain, des troubles associés aux variations de ces hormones sont impliqués dans certaines pathologies psychiatriques telles que le syndrome de dépression majeure ou le trouble de stress post-traumatique (Stetler et al., 2011 ; Raise-Abdullahi et al., 2023). Chez le rongeur, plusieurs études ont mis en évidence le rôle de l'hyperactivité de l'axe HPA ainsi que

des GR dans la réponse au stress et le développement de troubles de type dépressif, et notamment dans l'aversion sociale (Barik et al., 2013 ; de Kloet et al., 2008). Ces hormones ciblent différentes régions cérébrales limbiques et corticales impliquées dans la modulation des réponses émotionnelle et comportementale au stress, telles que l'hippocampe, l'amygdale, le mésencéphale et le cortex préfrontal (Hariri et Holes, 2015 ; Ulrich-Lai and Herman, 2009).

Bien que tous les stressseurs induisent une activation des axes SAM et HPA, l'implication des circuits limbiques et pré-limbiques dépend de la nature du stressseur (voir Raise-Abdullahi et al., 2023 pour une revue). On peut ainsi distinguer les stressseurs de nature physique, tels qu'une agression ou un accident, de ceux de nature psychologique, par exemple l'anticipation d'une soutenance de thèse. Ces derniers exigent l'activation à la fois des circuits impliqués dans la réponse aux stressseurs physiques et ceux impliqués dans des processus cognitifs tels que la prise de décision ou la mémoire (Figure 3). Notamment, l'engagement des circuits de la récompense et de la mémoire implique l'activation de plusieurs régions cérébrales telles que l'aire tegmentale ventrale (VTA), le noyau accumbens (NAc), et l'amygdale basolatérale (BLA) qui seront détaillées par la suite (Godoy et al., 2018).



**Figure 3. Régions cérébrales impliquées dans la réponse au stress et qui sécrètent la corticolibérine (ou CRH).**

CRH : corticotropin releasing hormone ou corticolibérine ; CRHR : récepteur de la CRH ; HPA : axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien ; CeA : noyau central de l'amygdale ; BLA : amygdale basolatérale ; BNST : noyau du lit de la strie terminale. *Raise-Abdullahi et al. (2023).*

### 2.1.2. *Le stress social : vers une meilleure compréhension des troubles mentaux*

De manière intéressante, le stress interagit avec la vie sociale à plusieurs niveaux. D'une part, certains stressseurs peuvent avoir une dimension sociale, et d'autre part, les interactions sociales peuvent atténuer les effets négatifs du stress, agissant ainsi comme tampon social (*social buffering* ; Hennessy et al., 2009 ; Nosjean et Granon, 2022). Cette interaction souligne la pertinence de l'étude des comportements sociaux en parallèle du stress.

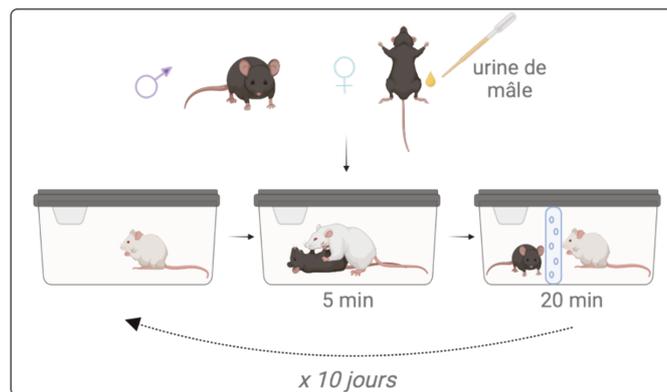
Dans le *Crépuscule des idoles* (1974), Nietzsche avance l'idée de la souffrance comme vertu : « Appris à l'École de Guerre de la vie : ce qui ne me tue pas me fortifie ». Toutefois, cette vision ne peut être simplement assimilée à la notion de résilience comme un processus automatique, mais plutôt comme une capacité qui n'est pas accessible à tous, s'inscrivant ainsi dans le concept nietzschéen d'*Übermensch* (Surhumain). Au-delà de cette perspective aristocratique, il est indéniable que tous les individus ne sont pas égaux dans leur capacité à surmonter les épreuves douloureuses, stressantes et traumatiques de la vie. Les réponses émotionnelles au stress, que celui-ci soit aigu ou chronique, sont influencées à la fois par des facteurs environnementaux mais aussi par une combinaison de facteurs génétiques (Charney et Manji, 2004). Ainsi, la manière dont chaque individu parvient à faire face au stress varie considérablement. Certains font preuve d'une capacité remarquable à surmonter ces événements stressants sans développer de troubles neuropsychiatriques, phénomène connu sous le nom de « résilience ». Introduit pour la première fois en France par Boris Cyrulnik, ce concept fait référence à la capacité de développer ou maintenir un fonctionnement psychologique et physiologique normal et non pathologique face à l'adversité (Cyrulnik, 1999; Russo et al., 2012 ; Southwick et al., 2023). Par conséquent, tous les individus ne réagissent pas de la même manière face aux situations stressantes. Certains se révèlent être plus vulnérables au développement de troubles liés au stress, tels que l'anxiété généralisée, le trouble dépressif majeur ou encore le trouble de stress post-traumatique, souvent étroitement associés à des dysfonctionnements du sommeil (Dean et Keshavan, 2017; American Psychiatric Association, 2013).

Pour ces raisons, de nombreuses recherches ont cherché à reproduire cette variabilité inter-individuelle chez le rongeur afin de comprendre les mécanismes neurobiologiques à l'origine de ces réponses opposées face à une même expérience de stress. En cela, le modèle de stress chronique de défaite sociale (CSDS) se révèle particulièrement pertinent, offrant un

cadre d'étude à la fois des mécanismes pathologiques impliqués dans la susceptibilité au stress, et des mécanismes protecteurs observés chez les individus résilients.

En effet, le CSDS est largement utilisé pour explorer les effets du stress social en raison de sa validité apparente, constructive et prédictive. Ce modèle repose sur une représentation assez naturelle de la dominance et de la subordination sociale. Il implique de confronter une souris expérimentale à une souris résidente mâle agressif de souche (CD-1) pendant 5 min en contact physique, suivies d'une séparation par une paroi en plexiglas perforée permettant un contact visuel, auditif et olfactif protégé pendant une durée variable, habituellement de 24 heures (Golden et al., 2011 ; Krishnan et al., 2007). Certaines variations du protocole impliquent des réductions de la période de contact physique et/ou de la période de contact protégé (Challis et al., 2013 ; Henderson et al., 2017 ; Chaudhury et al., 2013). La session de défaite sociale est répétée quotidiennement pendant plusieurs jours avec un nouvel agresseur CD-1 chaque jour (Figure 4). Traditionnellement, l'exposition au stress est répétée pendant 10 jours consécutifs, mais une durée moins longue, par exemple de 3 jours, est parfois utilisée pour mettre en évidence la temporalité des précipitations pathologiques (Francis et al., 2015 ; Morel et al., 2018). Les souris CD-1, anciens mâles reproducteurs sélectionnés pour leur agressivité, agissent comme facteur déclenchant du stress (stresseur). L'introduction d'une souris expérimentale dans la cage d'une souris CD-1 induit un comportement agressif de la souris CD-1 caractérisé par de nombreuses attaques envers la souris expérimentale qui présente une multitude de réponses comportementales, à la fois passives (subordination, fuite) et actives (riposte) (Willmore et al., 2023 ; Murra et al., 2022). Ce modèle permet donc d'évaluer les différentes stratégies d'adaptation face à un stress social (*coping*). A la suite de ce stress, les souris expérimentales développent des symptômes qui évoquent ceux de la dépression humaine, tels que l'évitement social, l'anhédonie, ou encore des comportements associés au désespoir (*despair*), qui sont inversés par un traitement antidépresseur chronique tel que la fluoxétine (Berton et al., 2006 ; Krishnan et al., 2007 ; Vialou et al., 2010). Des modifications physiologiques et métaboliques, telles que des changements des taux de cortisol et de leptine, qui s'accompagnent d'une prise de poids, sont également observées, de même que des comportements de type anxieux à long terme, faisant de ce modèle un outil couramment utilisé dans l'étude de la dépression (Krishnan et al., 2007).

### Stress chronique de défaite sociale

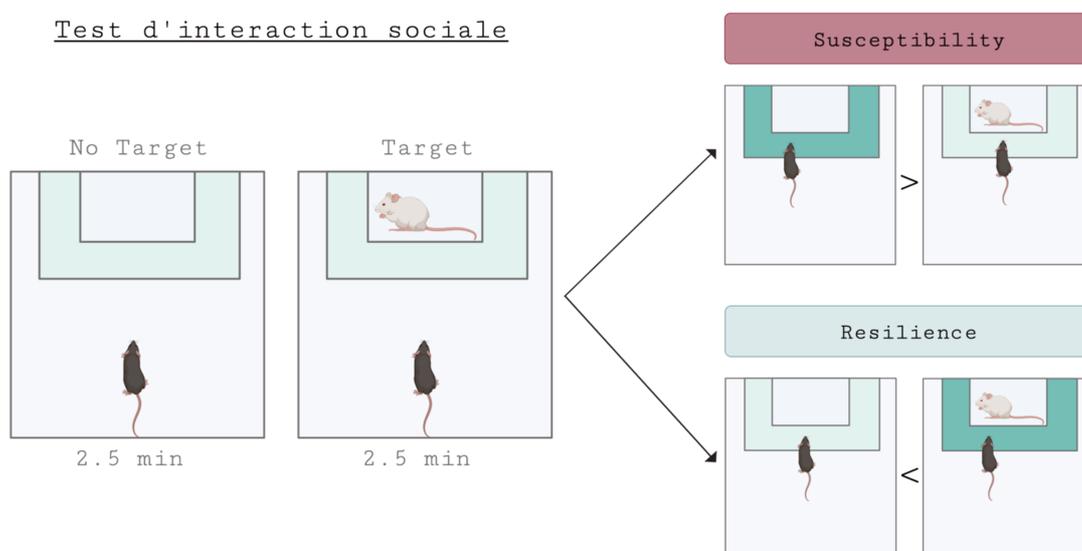


**Figure 4. Protocole modifié de stress chronique de défaite sociale (CSDS).**

Durant 10 jours consécutifs, les souris sont introduites dans la cage d'un mâle agressif (CD-1) pendant 5 minutes de contact physique suivi de 20 minutes de contact sensoriel protégé. Le modèle est adapté pour les femelles grâce à l'application d'urine de mâle autour de l'appareil génital (Harris et al., 2018).

Étant donné que ce test repose principalement sur une dimension sociale des comportements entre deux mâles, impliquant une agression physique, il ne pouvait pas s'appliquer en l'état aux femelles. En effet, les mâles CD-1 manifestent un comportement reproducteur plutôt qu'agressif envers les femelles. D'autres protocoles de stress social ont donc été modélisés afin d'étudier les réponses au stress chez les souris femelles impliquant soit une attaque femelle-femelle, soit une observation (*vicarious*) d'une attaque mâle-mâle (Iniguez et al., 2018 ; Newman et al., 2019 ; Logan et al., 2019 ; Takahashi, 2021). Néanmoins, ces protocoles présentent soit peu de validité éthologique, soit ne permettent pas de reproduire le même événement de stress que chez les mâles. A ces fins, plusieurs protocoles ont été développés engageant une attaque mâle-femelle, induite artificiellement par activation chémogénétique de l'hypothalamus, ou bien par application d'odeurs mâles permettant ainsi d'exposer les deux sexes à un stress social similaire et donc une comparaison directe des effets du stress entre mâles et femelles (Takahashi et al., 2017 ; Harris et al., 2018 ; van Doeselaar et al., 2020). Le modèle par application odorante mâle est particulièrement privilégié dans ce contexte et implique la collecte de l'urine de mâle ainsi que son application sur les parties génitales des femelles préalablement à leur introduction dans la cage de la souris CD-1 (Harris et al., 2018). L'odeur de l'urine de mâle suffit à masquer l'odeur de la femelle et ainsi tromper le mâle résident agressif qui présente alors un comportement agressif envers les femelles similaire à celui envers les mâles (Figure 4).

L'intérêt de ce modèle réside également dans sa capacité à induire et ainsi permettre l'observation de la variabilité inter-individuelle dans l'expression de la réponse au stress. En effet, ce protocole permet de distinguer deux catégories de souris sur la base de leur comportement social. Les souris dites « susceptibles » présentent des perturbations comportementales, physiologiques et métaboliques distinctes de celles des souris « résilientes ». Cette distinction repose sur la mesure de la réponse sociale habituellement évaluée à l'aide d'un test communément appelé « test d'interaction sociale ». Ce test est réalisé dans un environnement de boîte ouverte (*open field*) où le comportement d'exploration des souris expérimentales envers une souris CD-1 inconnue placée dans une boîte en plexiglas est évalué. L'intérêt des souris pour l'investigation de la souris CD-1 est mesuré à l'aide d'un ratio de préférence sociale calculé en comparant les temps d'exploration de la boîte vide (condition *No Target*) et de la boîte contenant la souris CD-1 (condition *Target*), ou bien en comparant les temps d'exploration en condition *Target* avant et après le CSDS (Figure 5) (Krishnan et al., 2007 ; Henderson et al., 2017). Ainsi, après le stress de CSDS, environ 70% des souris présentent une diminution de la préférence sociale, traduisant un évitement social, et sont ainsi qualifiées de « susceptibles », tandis qu'environ 30% des souris maintiennent une préférence sociale et sont qualifiées de « résilientes ». Ces deux phénotypes distincts illustrent la variabilité inter-individuelle et leur étude permet la compréhension des mécanismes et des facteurs qui sous-tendent le développement de troubles psychiatriques à la suite d'un stress, ainsi que ceux qui, à l'inverse, favorisent un comportement adaptatif.



**Figure 5. Protocole du test d'interaction sociale.**

Les souris sont catégorisées de susceptibles si elles passent plus de temps dans la zone d'interaction (en vert) en présence de la boîte vide plutôt qu'avec la CD-1. Dans le cas inverse, elles sont catégorisées de résilientes.

### *2.1.3. Résilience et susceptibilité : comprendre la variabilité inter-individuelle en réponse au stress*

Les études explorant les mécanismes sous-tendant la susceptibilité au stress considèrent la résilience comme la capacité à préserver la santé mentale face à des événements stressants, mettant ainsi en avant la passivité de ce phénomène (Kalisch et al., 2017). Les études pionnières sur la susceptibilité au stress de CSDS ont montré que cette susceptibilité était associée à des différences au niveau physiologique, neuroendocrinien, moléculaire, neuroanatomique, et comportemental (Nestler, 2015 ; Wood et al., 2010 ; Krishnan et al., 2007 ; Bagot et al., 2016 ; Anacker et al., 2016). En particulier, ces études ont souligné des variations dans le profil d'expression de certains gènes ainsi que dans l'anatomie de l'aire tegmentale ventrale (VTA) et du noyau accumbens (NAc) principalement. Au niveau comportemental, la susceptibilité est associée à un accroissement de l'évitement social, de l'anhédonie et des comportements addictifs. En revanche, les comportements de type anxieux sont retrouvés indépendamment de la susceptibilité et de la résilience (Kudryavtseva et al., 1991 ; Krishnan et al., 2007). Cependant, certaines études remettent en question la pertinence éthologique du test d'interaction sociale pour représenter spécifiquement l'évitement social comme symptôme dépressif, mais suggèrent qu'il mesurerait plutôt un comportement de type anxieux, en raison de la courte durée d'exposition à un nouvel environnement, potentiellement anxiogène (Henriques-Alves et Queiros, 2015 ; Meshalkina et Kalueff, 2016). Malgré différentes interprétations phénotypiques, ces recherches étudient la susceptibilité sous le prisme d'une réponse pathologique active et anormale qui se développe, plutôt que sous celui d'une réponse passive distinguée d'un processus de résilience actif. Néanmoins, certains ne s'accordent pas sur la caractérisation de la résilience comme trait et soulignent qu'elle doit être considérée comme un processus dynamique et actif, impliquant des mécanismes adaptatifs (Southwick et al., 2023). En particulier, la résilience se définirait plutôt comme la capacité à fonctionner malgré la présence de symptômes liés au stress.

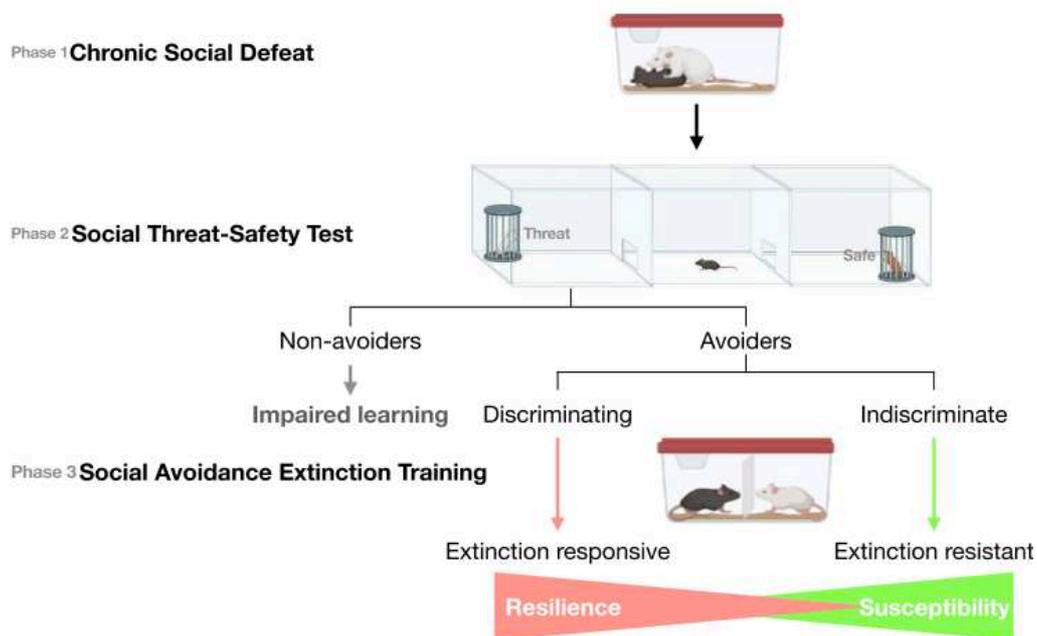
Des études récentes ont contribué à éclairer les diverses conceptions de la résilience, apportant des éléments de réponse quant à la question de son caractère passif ou actif. Elles ont notamment établi une corrélation entre la nature des réponses comportementales face au stress et la susceptibilité (Willmore et al., 2022 ; Wood et al., 2010). En effet, il est admis que le stress de CSDS provoque une multitude de comportements adoptés par les souris expérimentales tels que la riposte, la fuite, l'immobilité, l'évitement, ou encore la vigilance distante qui peuvent déterminer la susceptibilité des souris. En particulier, des réponses

associées à un comportement actif comme le fait d'adopter une posture moins soumise pendant les agressions physiques favorise la résilience en réduisant l'aversion sociale, tandis qu'un comportement de fuite favorise la susceptibilité (Wood et al., 2010). De plus, une attitude proactive de riposte lors de l'attaque est associée à la résilience (Willmore et al., 2022). Ces données mettent en avant l'observation de différentes stratégies entre les souris étant à l'origine de leur susceptibilité ou de leur résilience, suggérant ainsi l'existence d'un processus actif de résilience par le biais de stratégies d'adaptation spécifiques plutôt que de simples réponses passives.

Ainsi, une autre interprétation de la résilience la considère comme la capacité à adopter et à mettre en œuvre des stratégies de compensation face à des situations stressantes ou traumatisantes. Cette conception met en avant l'implication de mécanismes adaptatifs actifs et dynamiques plutôt que l'absence passive de réponses pathologiques ou l'insensibilité aux stressseurs (Russo et al., 2012). Chez l'humain, par exemple, les stratégies d'adaptation actives ont été associées négativement au développement de troubles dépressifs (Billings et Moos, 1984). Chez le rongeur, les comportements passifs ou proactifs sont liés à des régulations différentes des axes SAM et HPA (Walker et al., 2009 ; Wood et al., 2010 ; Murra et al., 2016). Par exemple, Wood et al. (2010) ont observé une corrélation entre la latence d'apparition de la posture de soumission et la régulation de la libération d'hormones de stress (CORT et ACTH). La stratégie proactive de résistance, caractérisée par une latence prolongée d'apparition de la subordination comportementale, est associée à une adaptation rapide de la libération de CORT et ACTH, dont les taux redescendent après 4 jours de CSDS, favorisant ainsi davantage le développement de ces comportements. En revanche, cette habituation de l'axe HPA n'est pas retrouvée chez les souris présentant une latence courte de subordination qui montrent donc, à l'inverse, une augmentation de l'activité de l'axe HPA qui persiste dans le temps également démontrée par l'augmentation de l'activité des neurones du PVN (étudiée grâce au marqueur d'activité c-Fos). Tous ces résultats suggèrent l'implication de processus cognitifs proactifs dans la résilience au stress de CSDS.

A travers une approche évolutionniste et adaptative, plusieurs études sont récemment venues interroger la classification actuelle de la susceptibilité et de la résilience (Ayash et al., 2020 ; Ayash et al., 2023 ; Murra et al., 2022 ; Diaz et Lin, 2020). Ils ont montré que la susceptibilité induite par le CSDS, caractérisée par un évitement social, était dépendante des caractéristiques phénotypiques de la souche CD-1 de l'agresseur. En effet, les souris susceptibles montrent une interaction significativement plus élevée avec des souris d'autres

souches présentant des caractéristiques phénotypiques distinctes des CD-1, indiquant une capacité à discriminer entre différentes cibles sociales (menace vs. sécurité). De plus, les auteurs ont montré que l'aversion sociale envers les CD-1 pouvait s'éteindre suite à un protocole d'extinction. Cela suggère que la susceptibilité au stress semble être davantage le résultat d'un processus d'apprentissage conditionné, où l'évitement social devient une réponse conditionnée au stimulus aversif que représente la souris CD-1, ainsi que ses caractéristiques physiques, plutôt que d'une prédisposition innée. Ils ont ainsi développé un nouveau modèle pour différencier les souris susceptibles des souris résilientes, en les classant en trois groupes distincts : les souris qui ne montrent aucun évitement social envers la CD-1, suggérant un déficit dans l'apprentissage conditionné (*i.e.* les souris traditionnellement résilientes) ; les souris qui évitent le contact social sans faire de distinction entre les différentes souches, démontrant ainsi une incapacité à discriminer de manière adaptative (*i.e.* les nouvelles susceptibles) ; et enfin, les souris qui évitent spécifiquement le contact avec les souris de la souche CD-1, montrant ainsi un apprentissage conditionné intact ainsi qu'une discrimination menace-sécurité intacte (*i.e.* les nouvelles résilientes) (Figure 6).



**Figure 6. Représentation de la catégorisation de la susceptibilité et résilience comme réponse à un conditionnement aversif.**

La première distinction se fait par rapport à l'apprentissage conditionné aversif. Les souris qui évitent le congénère-menace (CD-1), présentent un apprentissage aversif intact, tandis que celles qui n'évitent pas la CD-1 présentent un apprentissage altéré. Parmi les souris qui ont un apprentissage aversif intact, celles qui n'évitent pas le congénère-sécurité (B6) présentent une discrimination menace-sécurité intacte et sont qualifiées de résilientes. A l'inverse, celles qui généralisent l'évitement au congénère-sécurité présentent un défaut de discrimination menace-sécurité et sont susceptibles. *Ayash et al. (2023)*.

En résumé, bien que de nouvelles perspectives aient émergé pour clarifier et préciser la notion de susceptibilité au stress, celle-ci reste principalement évaluée en fonction de l'aversion sociale envers les souris CD-1 dans le test classique d' « interaction sociale ». Cette susceptibilité est néanmoins associée à divers comportements de type dépressifs ainsi qu'à des caractéristiques physiologiques variées. En effet, bien que le stress soit vital, il peut entraîner chez certains individus des comportements pathologiques inadaptés et favoriser le développement de troubles psychiatriques, tels que les troubles anxio-dépressifs mais également les troubles du sommeil, et dont les caractéristiques neuronales associées vont être présentées par la suite.

## **2.2. Stress et sommeil : caractérisation des états de vigilance et de leurs perturbations**

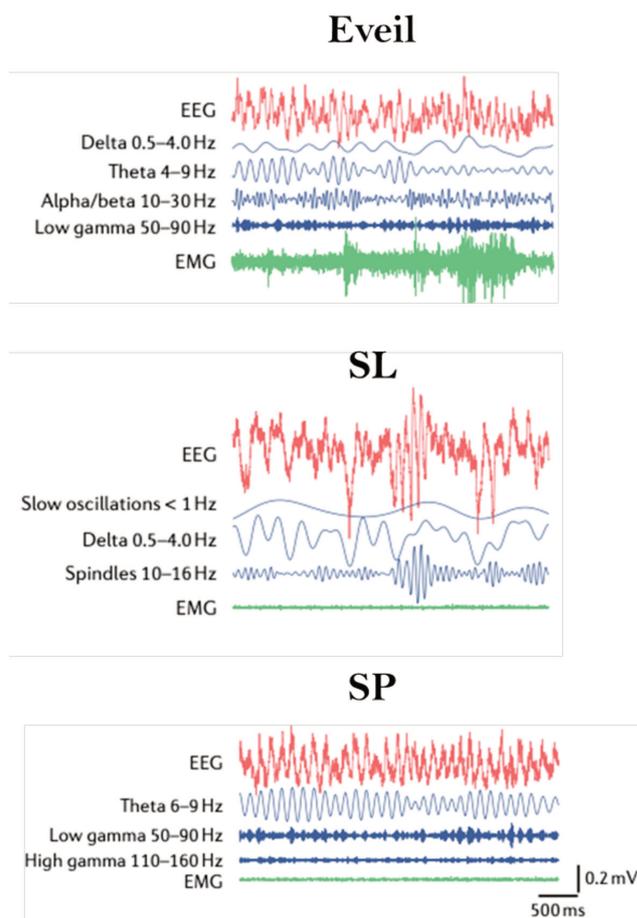
Le sommeil est un critère diagnostique pour de nombreux troubles anxio-dépressifs, souvent associés à des perturbations circadiennes dont la régulation des états de vigilance (American Psychiatric Association, 2013). Ainsi, des difficultés d'endormissement, des réveils nocturnes, de l'hypersomnolence ou encore de l'insomnie accompagnent fréquemment les troubles d'anxiété généralisée, dépressif majeur et de stress post-traumatique (American Psychiatric Association, 2013 ; Steiger et Kimura, 2010). Notamment, l'insomnie est retrouvée chez environ 80% des patients atteints de dépression, mais elle augmente également le risque de développer un trouble dépressif, soulignant la nécessité d'étudier l'interaction bidirectionnelle entre sommeil et troubles psychiatriques (Armitage, 2007 ; Franzen et Buysse, 2008 ; Li et al., 2016 ; Goldschmied et al., 2019).

### *2.2.1. Sommeil non stressé : bases neurales des états veille-sommeil*

Chez les mammifères, le cycle veille-sommeil est composé de trois états distincts qui se succèdent de manière régulée : l'éveil, le sommeil lent (SL) et le sommeil paradoxal (SP). Ces états sont distingués par leurs caractéristiques neurophysiologiques, dont l'activité cérébrale et le tonus musculaire mesurées respectivement par l'électro-encéphalogramme (EEG) et l'électro-myogramme (EMG) lors d'enregistrements polysomnographiques (Scammell et al., 2017 ; Sulaman et al., 2022 ; Adamantidis et al., 2019).

Chez le rongeur, l'éveil se caractérise par un état de vigilance et une réactivité aux stimuli externes élevée, avec un EEG et un EMG montrant une activité corticale à faible amplitude

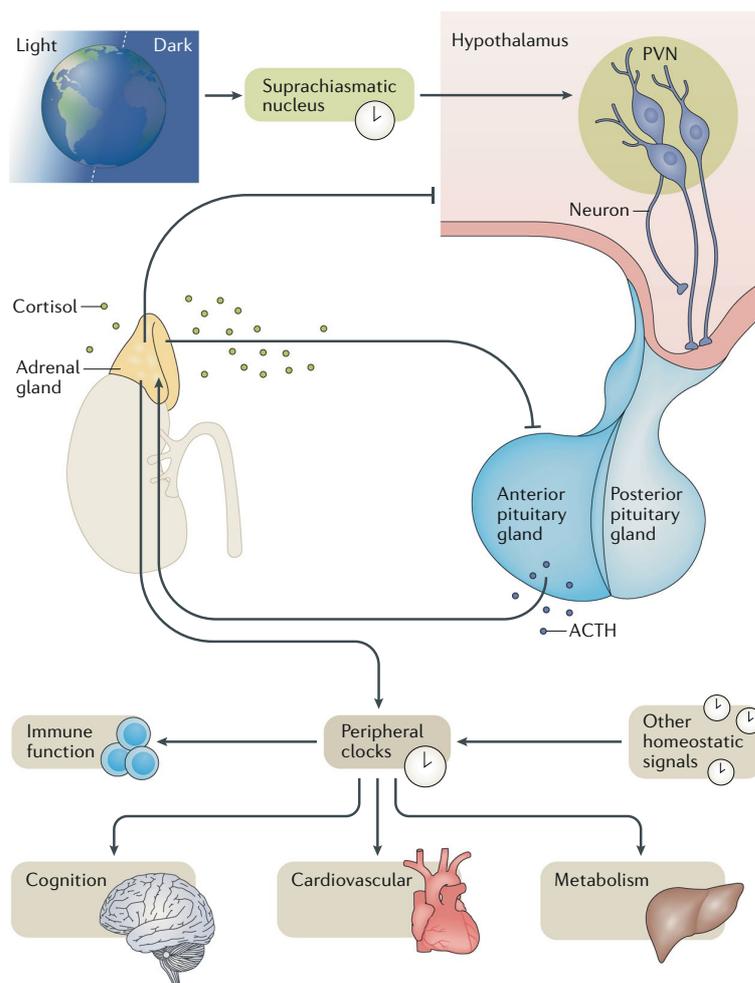
et haute fréquence, ainsi qu'une activité musculaire importante (Figure 7). On observe principalement des ondes alpha (10-13 Hz) en éveil calme et des ondes bêta rapides (13-30 Hz), thêta (5-9 Hz) et gamma (>30 Hz) en éveil actif. Le SL se manifeste par une diminution de la réactivité aux stimuli externes et une diminution du tonus musculaire. Il est caractérisé au niveau de l'EEG par des ondes lentes de grande amplitude, notamment des ondes delta (0,5-4,5 Hz), ainsi que par des oscillations lentes (<1Hz). En revanche, le SL est ponctué d'épisodes transitoires d'activité oscillatoire de plus grande fréquence, tels que les fuseaux de sommeil (11-15 Hz) et les *sharp wave-ripples* (100-200 Hz) générés par l'hippocampe. Enfin, le sommeil paradoxal (SP) doit son nom à sa caractéristique unique : il présente un EEG similaire à celui de l'éveil, avec des ondes à haute fréquence et faible amplitude telles que les ondes thêta (6-9 Hz) et gamma (30-90 Hz), mais il s'accompagne d'une atonie musculaire et de mouvements oculaires rapides.



**Figure 7. Tracés polygraphiques typiques de chaque état de vigilance et activités oscillatoires associées.**

L'éveil est caractérisé par un EEG désynchronisé et de faible amplitude comprenant les oscillations  $\theta$  et  $\gamma$ . Le tonus musculaire visible sur l'EMG est élevé et reflète les mouvements du corps. Le sommeil lent se définit par une synchronisation corticale avec des ondes lentes de grande amplitude (ondes  $\delta$  et oscillations lentes) et l'apparition d'activités oscillatoires transitoires (fuseaux de sommeil). L'activité musculaire réduite, visible sur l'EMG, reflète l'immobilité. Le sommeil paradoxal se caractérise par l'apparition d'ondes corticales désynchronisées de faible amplitude composé majoritairement d'ondes  $\theta$  et  $\gamma$ . L'atonie musculaire qui le caractérise est visible sur l'EMG. *Adapté de Adamantidis et al. (2019).*

Le bon fonctionnement d'un organisme repose sur l'initiation et l'alternance de ces états veille-sommeil, qui sont régulés par une coordination précise impliquant plusieurs régions cérébrales (Saper et al., 2010). En particulier, les états veille-sommeil sont le résultat d'une inhibition réciproque entre des systèmes promoteurs de l'éveil et ceux promoteurs du sommeil (Saper et al., 2010 ; Sulaman et al., 2022). Cet équilibre entre systèmes d'éveil et de sommeil est par ailleurs contrôlé par deux processus : un processus homéostatique et un processus circadien. Le processus homéostatique permet de moduler la quantité et la profondeur du sommeil en fonction de la durée d'éveil qui le précède. Plus l'éveil est long, plus la pression de sommeil augmente et le sommeil qui s'ensuit est important en quantité et profond, comme le reflète une plus forte activité des ondes delta en SL (Borbély, 1982, 2001 ; Achermann et al., 1993). En conséquence, l'activité delta en SL atteint son pic en début de période diurne chez le rongeur et est renforcée après la privation de sommeil (Franken et al., 1991 ; Huber et al., 2000). D'autre part, le processus circadien joue un rôle clé dans la régulation des états veille-sommeil chez les rongeurs, orchestrant l'alternance entre ces états sur une période de 24 heures (Figure 8 ; Achermann et Borbély, 2003 ; Russell et Lightman, 2019).



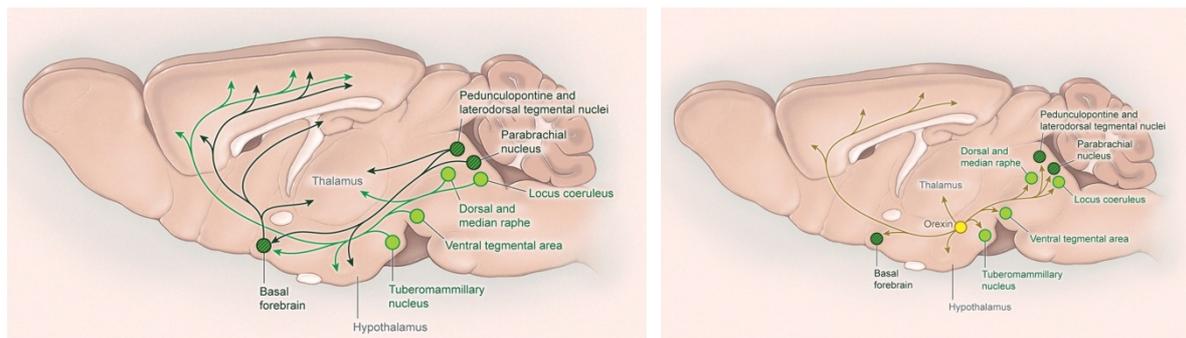
**Figure 8. Représentation du processus de régulation circadienne.**

Le noyau suprachiasmatique reçoit l'information lumineuse, ce qui permet la production de cortisol par l'activité des axes sympatho-surrénalien et hypothalamo-hypophysé-surrénalien. Cette libération hormonale permet en retour la synchronisation de divers processus de régulation de systèmes cognitifs, métaboliques, immunitaires et cardiovasculaires. PVN : neurones paraventriculaires ; ACTH : hormone adrénocorticotrope. Russel et Lightman (2019).

Ce processus est gouverné par une horloge interne localisée dans le noyau suprachiasmatique (SCN) de l'hypothalamus. Le SCN reçoit des informations lumineuses *via* les cellules rétiniennes et synchronise son rythme avec le cycle lumière-obscurité de l'environnement (Gooley et al., 2001). Le processus circadien module ainsi la pression de sommeil en fonction de la phase lumineuse, notamment à travers la régulation de la sécrétion de CRH et de mélatonine dépendante de la lumière et du SCN (Saper et al., 2005). Il participe également à la synchronisation des rythmes physiologiques tels que la température corporelle, la fréquence cardiaque ou encore la pression artérielle, qui contribue à préparer l'organisme au sommeil et à l'éveil. En résumé, l'interaction entre le processus circadien et le processus homéostatique détermine l'orchestration des états veille-sommeil chez les rongeurs. Le processus homéostatique module la quantité et la profondeur du sommeil en fonction de la durée d'éveil, tandis que le processus circadien dicte le moment optimal pour le sommeil et sa durée sur une période de 24 heures. Ainsi, chez les rongeurs, le sommeil est principalement présent la nuit.

Le système de l'éveil est une entité complexe impliquant de multiples régions cérébrales ainsi que différents types de neurones et neurotransmetteurs. Les neurones qui participent au système d'éveil se caractérisent tous par une activité de décharge maximale pendant l'éveil. Ce système comprend deux voies ascendantes qui prennent leur origine au niveau du tronc cérébral et se terminent dans le cortex (Scammell et al., 2017 ; Sulaman et al., 2023) et sont brièvement décrites ci-dessous.

La première voie réticulo-hypothalamo-corticale s'échelonne entre le tronc cérébral, et l'hypothalamus (Figure 9). Au niveau du tronc cérébral, elle comprend les neurones sérotoninergiques (sérotonine ou 5-HT) des noyaux du raphé, les neurones noradrénergiques du locus coeruleus (LC), les neurones dopaminergiques (dopamine ou DA) de la VTA. Ensuite, l'hypothalamus comprend comme neurones d'éveil, les neurones histaminergiques (histamine ou his) du noyau tubéromammillaire et les neurones à hypocrétines (Hcrt)/oréxines (Ox) de l'hypothalamus latéral.



**Figure 9. Illustrations des voies ascendantes de l'éveil (gauche) et du rôle central des neurones à hypocrétines/oréxines (droite).**

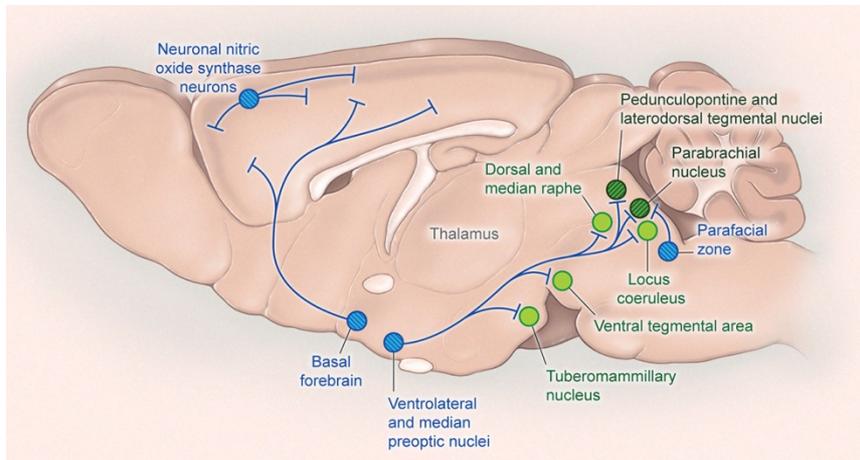
*Adapté de Scammell et al. (2017).*

La deuxième voie réticulo-thalamo/hypothalamo-corticale débute également dans le tronc cérébral. Elle comprend les neurones cholinergiques (acétylcholine ou ACh) du tegmentum latéro-dorsal/tegmentum pédonculo-pontin (LDT/PPT), ainsi que les neurones glutamatergiques du noyau parabrachial (PB). Enfin, le cerveau antérieur basal comprend des neurones d'éveil GABAergiques et cholinergiques.

Parmi les principaux acteurs des états veille-sommeil figurent les neurones à Hcrt, qui jouent un rôle important dans le passage du sommeil vers l'éveil ainsi que la stabilité de l'éveil (Figure 9). Ainsi, l'activation optogénétique ou chémogénétique des neurones Hcrt facilite la transition du sommeil vers l'éveil, tandis que leur inhibition diminue l'éveil au profit du SL (Adamantidis et al., 2007 ; Sasaki et al., 2011). Ces effets éveillants sont médiés par des projections vers les régions d'éveil, dont le LC (Carter et al., 2012). Ce rôle clé dans l'éveil est souligné par leur implication dans la narcolepsie, une pathologie caractérisée par une somnolence excessive diurne, une instabilité du sommeil et des attaques de cataplexie (Peyron et al., 2000 ; Thannickal et al., 2000).

Les systèmes inducteurs de sommeil sont majoritairement composés de neurones GABAergiques dont les neurones GABAergiques du noyau pré-optique ventrolatéral de l'hypothalamus (VLPO), du noyau tegmental rostro-médial ou RMTg, de la zone parafaciale du tronc cérébral et du cortex qui expriment la NO synthase (Figure 10) (Kroeger et al., 2018 ; Yang et al. 2018 ; Gerashchenko et al., 2008 ; Anacleit et al. 2014). Le VLPO joue un rôle majeur dans l'initiation du SL. En effet, sa lésion provoque une diminution de 50% des quantités de sommeil (Lu et al., 2000). Ces neurones inducteurs de sommeil agirait en

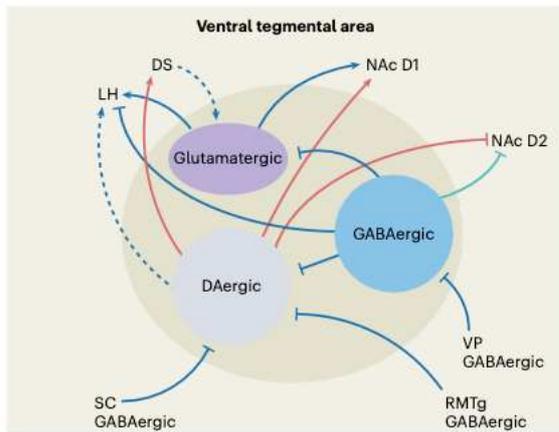
inhibant la quasi-totalité des centres responsables du maintien de l'éveil et notamment des neurones monoaminergiques et hypocrétinergiques (Gallopín et al., 2000 ; Lu et al., 2006).



**Figure 10. Illustration de la localisation des neurones du sommeil et du rôle inhibiteur des neurones du VLPO sur le système d'éveil.**

*Adapté de Scammell et al. (2017).*

Les apports relativement récents de nouveaux outils comme l'optogénétique et la chémogénétique, ainsi que le développement de nouvelles approches d'enregistrements *in vivo* chez la souris ont non seulement révélé de nouveaux acteurs dans la régulation de l'éveil et du sommeil, mais ont également mis en évidence des rôles spécifiques pour certaines populations. Ainsi, les neurones glutamatergiques du PB induisent de l'éveil en réponse à l'hypercapnie et les neurones DA du raphé dorsal sont importants pour le maintien de l'éveil face à des stimuli saillants (Kaur et al., 2017 ; Cho et al., 2017). Elles ont également montré la complexité de ces régulations au sein d'une même structure avec des exemples notables dans la VTA et le NAc (Figure 11). Ainsi, des manipulations optogénétiques et chémogénétiques ont montré que les neurones dopaminergiques de la VTA étaient nécessaires pour induire un état d'éveil (Eban-Rothschild et al., 2016). A l'inverse, leur inhibition favorise les comportements associés à la préparation du sommeil, tels que la construction du nid, et induit du SL et du SP. Ces neurones seraient par ailleurs très sensibles à la privation de sommeil et responsables de ses effets délétères sur le comportement comme l'hyperactivité locomotrice ou l'agressivité (Wu et al., 2024). Toutefois, l'effet de la modulation des états de vigilance par les neurones de la VTA dépend de leur nature neurochimique. L'activation des neurones dopaminergiques et glutamatergiques est promotrice d'éveil, tandis que l'activation des neurones GABAergiques induit du SL (Eban-Rothschild et al., 2016 ; Toth et al., 2023 ; Hasegawa et al., 2022 ; Yu et al., 2019). Malgré leur effet opposé sur les états de vigilance, toutes ces populations de neurones sont actives pendant l'éveil et non pendant le SL, suggérant un effet inducteur de SL par inhibition sur les autres neurones promoteurs d'éveil.



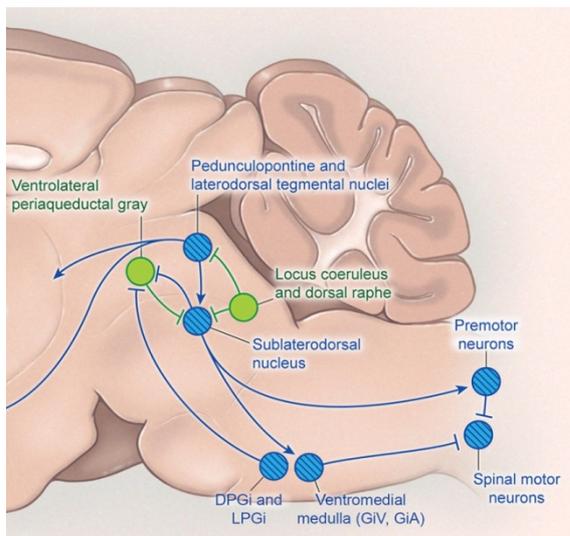
**Figure 11. L'aire tegmentale ventrale : un nouveau centre de régulation de l'éveil et du sommeil.**

*Adapté de Eban-R et al. (2023).*

Les modulations du sommeil par les neurones de la VTA sont principalement permises par les projections de la VTA vers le NAc et l'action de la DA sur les neurones GABAergiques du NAc qui expriment les récepteurs D1 (Eban-Rothschild et al., 2016 ; Luo et al., 2018). En effet, le NAc est une structure notamment impliquée dans la promotion de l'éveil. Outre les projections en provenance de la VTA, la stimulation des projections glutamatergiques en provenance du noyau paraventriculaire du thalamus (PVT) au sein du NAc induisent de l'éveil (Ren et al., 2018). En particulier, l'activation optogénétique de ces projections dans le NAc pendant le SL et le SP diminue la latence d'apparition de l'éveil. De plus, plusieurs études ont également montré que certaines populations neuronales du NAc pouvaient faciliter la survenue du sommeil. En particulier, l'activation des neurones GABAergiques qui expriment les récepteurs à adénosine A<sub>2A</sub> dans le NAc augmentent les quantités de sommeil lent (Oishi et al., 2017). Ces modulations de l'éveil et du sommeil par le NAc seraient liées aux niveaux de motivation. Ainsi, l'éveil causé par la présence d'une femelle chez une souris mâle est associé à l'inhibition de l'activité des neurones qui expriment les récepteurs à adénosine A<sub>2A</sub> dans le NAc (Oishi et al., 2017).

En ce qui concerne le sommeil paradoxal, les structures antérieures au tronc cérébral seraient suffisantes pour sa genèse. L'analyse du profil de décharge des neurones du tronc cérébral a initialement identifié des neurones actifs pendant le SP (neurones SP-on). Parmi ces neurones, on trouve les neurones glutamatergiques du noyau sub-latéro dorsal (SLD), les neurones GABAergiques du noyau paragigantocellulaire dorsal (DPGi) et de la substance grise périaqueducale ventrolatérale (vIPAG) et les cholinergiques du LDT/PPT (Figure 12). Il est maintenant admis que les neurones du SLD sont critiques pour induire l'atonie musculaire du SP (Valencia Garcia et al., 2017). Le SP est également caractérisé par un arrêt des transmissions monoaminergiques (neurones SP-off). Ainsi, les neurones SP-on s'opposent

aux neurones SP-off qui sont actifs à l'éveil, inhibiteurs du SP et inactifs pendant le SP. La régulation du SP n'est pas restreinte aux neurones du tronc cérébral et inclut également les neurones à MCH (*Melanin Concentrating Hormone*) de l'hypothalamus latéral et les neurones glutamatergiques du cortex (Luppi et al., 2024). Récemment un lien intéressant a été fait entre induction du sommeil paradoxal et les neurones DA de la VTA qui ciblent l'amygdale basolatérale (BLA), une structure clé dans le traitement des informations émotionnelles (Hasegawa et al., 2022). Ainsi, une augmentation transitoire de la DA dans la BLA permet une transition du SL vers le SP *via* les récepteurs D2.



**Figure 12. Circuits du tronc cérébral régulant le sommeil paradoxal.**

*Adapté de Scammell et al. (2017).*

Il existe donc de nombreux mécanismes à l'origine de la genèse et du maintien et des états de vigilance. Dans le cadre de ma thèse, je me suis intéressée aux liens entre sommeil et stress. Je vais maintenant aborder l'influence du stress sur le sommeil et décrire les circuits à l'origine de ces modifications dans la cadre de la défaite sociale.

### *2.2.2. Sommeil et stress social : perturbations des états veille-sommeil*

Le stress, en agissant sur les circuits qui régulent les états de vigilance, se répercute directement sur le sommeil. Les modifications du sommeil qui en découlent dépendent de divers facteurs tels que la durée, l'intensité, et la nature du stress (Meerlo et Turek, 2001; Kamphuis et al., 2015). Dans le cas des espèces sociales, les interactions entre individus sont d'une importance majeure pour un développement sain, et les altérations associées à la sociabilité ont des conséquences significatives sur la santé mentale étroitement liée au sommeil. Chez l'humain, le stress social chronique, par exemple, entraîne des perturbations du sommeil à long terme, telles que l'insomnie (Garefelt et al., 2020 ; Meaklim et al., 2021).

Chez la souris, le CSDS perturbe les cycles veille-sommeil à la fois pendant la période de stress, mais également à plus long terme, puisque des modifications sont observées cinq jours après la fin des 10 jours de CSDS (Henderson et al., 2017). Lorsqu'il est réalisé en période lumineuse (ZT3 ou 3 heures après le début de la période diurne), le CSDS a une influence immédiate sur les états de vigilance et ces modifications sont observées après chaque séance de défaite sociale du CSDS (Henderson et al., 2017). Dans les trois heures suivant la défaite sociale, on observe ainsi une augmentation du temps passé en éveil au détriment du sommeil lent ainsi qu'une très forte inhibition du sommeil paradoxal. Ces modifications semblent être indépendantes de la susceptibilité au stress (Henderson et al., 2017). Pendant la période nocturne qui suit, le stress de défaite sociale induit une augmentation de sommeil lent et paradoxal au détriment de l'éveil. Cette augmentation du temps de sommeil pendant la phase nocturne apparaît dès le premier jour et reste présente jusqu'au 10ème jour du CSDS. Elle ne résulte pas uniquement d'une réponse compensatoire liée à l'augmentation des quantités d'éveil après le stress. En effet, les effets de la défaite sur le sommeil sont beaucoup plus marqués que ceux liés à une privation de sommeil (Meerlo et al., 2001). Il convient de noter que certaines études ne tiennent pas compte de ces distinctions entre effets immédiats et tardifs observés après chaque séance de défaite sociale. Dans ce cas, seule une augmentation du temps passé en SP et SL est observée sur 24 heures à la fois après une défaite sociale aiguë, et sur la période totale des 10 jours de CSDS, accompagnée d'une diminution du temps passé en éveil (Wells et al., 2017 ; Feng et al., 2020). Par ailleurs, l'effet du CSDS sur le sommeil est dépendant du nyctémère. En effet, lorsque la défaite sociale est réalisée en fin de période lumineuse ou en période nocturne, seule l'augmentation de sommeil après stress est observée (Wells et al., 2017 ; Fujii et al., 2019 ; Feng et al., 2020 ; Bush et al., 2022). De façon intéressante, le sommeil pourrait être un facteur de résilience face à un stress. Ainsi, l'augmentation de sommeil serait plus importante chez les souris résilientes et l'empêcher rend toutes les souris susceptibles au CSDS (Bush et al., 2022). A l'inverse, la privation de sommeil après un stress social a des effets négatifs sur les comportements émotionnels (Feng et al., 2020 ; Yu et al., 2022).

Les perturbations du sommeil induites par le CSDS persistent à long terme. Deux jours après la fin d'un CSDS de 15 jours, les enregistrements de sommeil montrent une diminution de la durée de SL durant la période diurne chez toutes les souris stressées, qu'elles soient résilientes ou susceptibles (Radwan et al., 2021). En utilisant la même protocole, une autre étude ne trouve aucune différence dans les quantités de temps passé en éveil ou en sommeil, sans distinction des souris en fonction de leur susceptibilité au stress (Olini et al., 2017). De

même, peu de modifications ont été observées après un CSDS de 10 jours (Henderson et al., 2017). Dans cette étude, les souris susceptibles présentent un éveil anticipatoire cinq jours après la fin du CSDS, caractérisé par une augmentation de l'éveil à l'heure correspondant à la session de la défaite sociale. De manière intéressante, les réactions anticipées excessives aux menaces potentielles sont une caractéristique commune des troubles anxieux (Grupe et Nitschke, 2013).

En plus de l'altération quantitative du sommeil, le stress de CSDS détériore également la qualité du sommeil à long terme, en modifiant la puissance spectrale de l'activité EEG des états veille-sommeil (Henderson et al., 2017 ; Olini et al., 2017 ; Radwan et al., 2021). Chez les souris susceptibles et résilientes, on retrouve une baisse de l'activité EEG à basse fréquence (ondes delta) et une augmentation de l'activité EEG à haute fréquence (bêta et gamma) durant le SL. Ainsi, le CSDS génère une activité EEG pendant le SL qui s'apparente à celle de l'éveil, ce qui est cohérent avec des études reliant l'insomnie chronique à une augmentation de l'activité EEG à haute fréquence (Perlis et al., 2001 ; Riedner et al., 2016). Cette activité delta modifiée pendant le SL après le CSDS est en accord avec des études montrant une perturbation de l'homéostasie du sommeil en réponse à la privation de sommeil chez les souris après CSDS (Olini et al., 2017 ; Radwan et al., 2021). Des effets transitoires sont également observés entre le premier et le dixième jour du CSDS, avec une augmentation des ondes delta et thêta sur une période de 24 heures de SP (Wells et al., 2017). Cependant, ces observations ne tenaient pas compte de la susceptibilité au stress social. Une autre étude a réalisé un découpage temporel plus précis et montré une augmentation de l'activité delta en SL dans les trois heures qui suivent chaque séance de défaite sociale (Henderson et al., 2017). Ainsi, cette modulation des ondes delta qui a lieu à la fois après chaque séance de défaite mais également après le CSDS suggère que la profondeur du SL pourrait jouer un rôle important dans le processus de récupération après stress. En revanche, il reste à évaluer si cela peut influencer la susceptibilité au CSDS.

Les états veille-sommeil résultent d'une organisation coordonnée facilitant les transitions d'un état vers un autre, et une fragmentation du sommeil est considérée comme le reflet d'un sommeil de moins bonne qualité. Certaines études ont évalué l'effet du stress de CSDS sur les transitions des états veille-sommeil et ont révélé une fragmentation plus importante du SL associée à la susceptibilité au stress due à une augmentation des transitions entre le SL et l'éveil (Radwan et al., 2021 ; Bush et al., 2022). Cette organisation du sommeil n'a pas été retrouvée chez les souris résilientes alors qu'elle a été observable dès le premier jour de défaite

et a persisté de manière constante chez les souris susceptibles, suggérant un potentiel marqueur prédictif de la susceptibilité. Dans une autre étude, ces auteurs ont analysé les dynamiques de ces transitions, en distinguant les épisodes de SL en fonction de leur transition, soit directement vers l'éveil (sommeil court), soit vers le SP puis l'éveil (sommeil long) (Radwan et al., 2021). Ils ont ainsi montré que les souris susceptibles présentent une faible stabilité du SL lors du sommeil court, caractérisée par une augmentation du nombre de transitions entre le SL et l'éveil, reflétant une plus grande vulnérabilité de ces transitions au stress. A l'inverse, pour les souris résilientes, les épisodes de SL sont plus stables, avec une moindre probabilité de passer à l'état d'éveil, suggérant une meilleure régulation des transitions entre les états de sommeil et d'éveil en réponse au stress chronique.

Toutes ces observations suggèrent que le stress chronique de défaite sociale perturbe significativement la régulation et le maintien des états veille-sommeil, entraînant des altérations à la fois quantitatives et qualitatives de ces états à long terme. Certaines de ces altérations, comme la fragmentation ou les quantités de SL, semblent dépendre du statut de susceptibilité, soulignant la pertinence de ce modèle pour l'étude multidimensionnelle des troubles psychiatriques liés au stress. Ainsi, l'étude des mécanismes impliqués dans la modulation du sommeil en réponse au stress de CSDS pourrait révéler l'existence de circuits impliqués à la fois dans les troubles psychiatriques et du sommeil.

### *2.2.3. Sommeil et stress social : mécanismes neuronaux des états veille-sommeil*

Très peu d'études ont caractérisé les circuits impliqués dans la régulation du sommeil après un stress de CSDS. Elles ont mis en avant plusieurs régions clés impliquées dans les états émotionnels, telles que le cortex préfrontal ventromédial (vmPFC), le DRN, la VTA et le NAc (McCullough et al., 2021 ; Bush et al., 2022 ; Yu et al., 2022 ; Henderson et al., Annexe 1).

La susceptibilité au stress induite par le CSDS semble dépendre de la capacité à réguler le SL en réponse à ce stress, mais également de l'intensité du SL reflétée pas l'intensité des ondes deltas. Une étude a mis en évidence le rôle protecteur du sommeil, et en particulier du SL induit par l'aire préoptique (POA), après un stress social (Bush et al., 2022). Durant les 10 jours de CSDS, l'activation chémogénétique quotidienne du POA a permis d'augmenter les quantités de SL durant la période d'activité et de diminuer l'évitement social, révélant le rôle pro-résilient de la voie inductrice de SL venant du POA. Afin d'examiner les régions

impliquées, et compte tenu du rôle du vmPFC dans la promotion de la résilience, les auteurs ont réalisé des enregistrements de potentiels de champ local dans le vmPFC durant le SL. Ils ont montré que des différences d'intensité des ondes lentes du vmPFC étaient présentes à l'état basal entre les souris futures susceptibles et futures résilientes, et qu'une plus grande amplitude de ces ondes était prédictive de la résilience. En résumé, les différences d'intensité des ondes lentes durant le SL dans le vmPFC avant un stress de CSDS, ainsi que l'induction chronique de SL pendant le CSDS par l'activation du POA sont des mécanismes corrélés à la résilience.

Dans la mesure où le DRN est une région clé impliquée dans la réponse au stress et dans la régulation du sommeil, il n'est pas surprenant qu'il joue également un rôle dans la régulation du sommeil en réponse à un stress. En particulier, le DRN participe à la régulation de l'éveil après un stress social aigu (Henderson et al., Annexe 1). Les neurones glutamatergiques du DRN modulent les perturbations du sommeil induites par un stress aigu de CSDS. En effet, l'inactivation génétique du transporteur de glutamate du type 3, conférant à ces neurones leur phénotype glutamatergique dans le DRN, diminue la réponse éveillante induite par le stress durant les trois heures qui suivent la défaite. Durant la période d'activité qui suit, le rebond de SP induit par le stress de défaite sociale est absent chez les souris mutantes. Ces données suggèrent que le DRN module positivement à la fois l'effet immédiat des épisodes de défaites sociales sur l'éveil, et ses effets tardifs, sur le SP *via* les neurones glutamatergiques exprimant VGLUT3. L'injection d'un virus rétrograde dans la VTA ciblant spécifiquement les neurones glutamatergiques du DRN a permis de montrer une augmentation du marqueur d'activité neuronale c-Fos de ces neurones après un stress aigu de défaite sociale, plaçant la VTA comme cible potentielle du DRN dans la régulation du sommeil après stress.

La VTA est effectivement impliquée dans la modulation de la réponse de sommeil induite par un stress social, *via* ses neurones GABAergiques. C'est ce qu'a montré une étude très récente, qui a évalué le rôle de la voie VTA-LH dans l'induction du sommeil SL et SP en réponse à un stress aigu de défaite sociale (Yu et al., 2022). En particulier, la réactivation chimogénétique spécifique des neurones GABAergiques de la VTA activés par la défaite sociale suffit pour augmenter le temps passé en SL et SP. A l'inverse, leur inhibition chimogénétique diminue l'augmentation du sommeil induite par le stress. Plus précisément, la réactivation chimogénétique de seulement les neurones GABAergiques de la VTA projetant vers le LH qui ont spécifiquement été activés par le stress augmente les durées de

SL et SP. En résumé, le sommeil induit par le stress aigu de défaite sociale résulte de l'activation des neurones GABAergiques de la voie VTA-LH.

Une dernière étude a montré que la modulation de l'activité des neurones du NAc modulait les états veille-sommeil (McCullough et al., 2021). Ils ont ainsi pu identifier par manipulations chémogénétiques deux voies de sortie du NAc, l'une impliquée dans la promotion du sommeil lent et la suppression de l'éveil, et l'autre dans la suppression du sommeil paradoxal. Ces voies seront détaillées par la suite.

L'ensemble de ces données semblent conforter l'implication de régions essentiellement connues pour leur modulation de différents états émotionnels et des troubles affectifs, dans la réponse de sommeil suite à un stress. Cela suggère potentiellement une influence importante entre les circuits impliqués dans les états veille-sommeil et ceux impliqués dans le développement de troubles psychiatriques. En effet, de plus en plus de données suggèrent que le sommeil ne serait pas simplement un symptôme accompagnant les troubles psychiatriques, mais plutôt un acteur causal et régulateur de ceux-ci (Harvey, 2011). La littérature mettant en évidence le rôle du sommeil dans de nombreux processus cognitifs soutient également cette hypothèse (Pinto et al., 2024, Annexe 2 ; Li et al., 2017). Notamment, des perturbations du sommeil sont observées dans de nombreux troubles anxieux ou liés au stress (TSPT, anxiété généralisée, anxiété sociale) mais également aux troubles dépressifs dont l'intensité semble être corrélée à la sévérité des symptômes (Cox et Olatunji, 2016 ; Goldstein et al. 2013 ; Armitage, 2007). Ces interactions, à la fois entre le stress et le sommeil, le sommeil et les troubles psychiatriques, mais également entre le stress et les troubles anxio-dépressifs, soulignent l'urgence d'une étude interdisciplinaire sur les effets du stress.

### **2.3. Stress et psychiatrie : caractérisation des troubles anxio-dépressifs**

Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), environ 4% de la population mondiale souffre de troubles anxieux et dépressifs selon les critères du Manuel Diagnostique et Statistique des troubles mentaux (DSM-5, American Psychiatric Association, 2013 ; GBD Results Tool). En France, la prévalence des troubles anxieux est d'environ 14% sur une période de 12 mois. Bien que cela touche une grande partie de la population française, moins de deux personnes traitées sur 10 ont reçu un traitement efficace, soulignant la nécessité d'un meilleur ciblage des mécanismes neurobiologiques impliqués (Alonso et al., 2018).

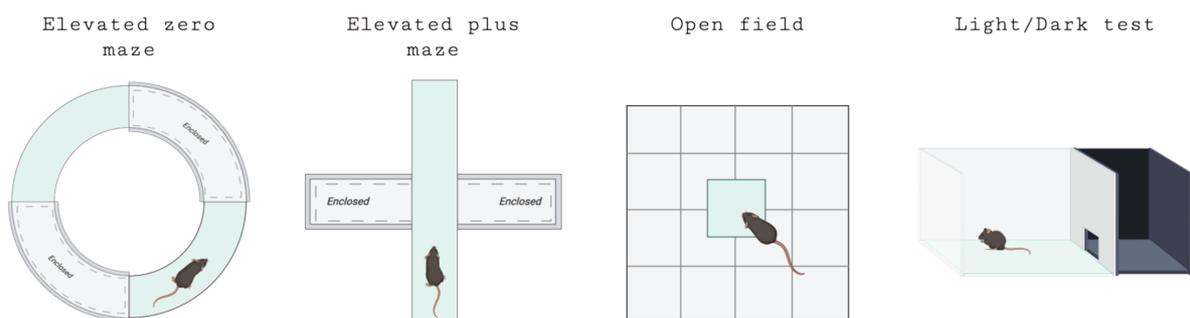
### *2.3.1. Exploration de l'anxiété et de la dépression à travers les modèles animaux*

La prévalence élevée des troubles anxio-dépressifs dans la population souligne l'importance de développer des modèles animaux adaptés. Par exemple, les facteurs environnementaux, tels que le stress, sont des facteurs de risque importants pour la dépression et sont souvent utilisés pour induire un phénotype de type anxio-dépressif chez le rongeur. Cependant, d'autres facteurs comme les facteurs génétiques ou les interactions entre facteurs environnementaux et génétiques doivent être également pris en compte pour générer des modèles précliniques qui se rapprochent de la pathologie humaine. Par ailleurs, on observe une prévalence environ deux fois plus élevée de ces troubles chez les femmes que chez les hommes ce qui souligne l'importance de développer des modèles adaptés. L'élaboration de tels modèles de recherche en psychiatrie s'avère d'une importance cruciale afin de permettre l'étude approfondie des troubles anxieux et dépressifs, souvent associés de manière comorbide (40-60%), témoignant ainsi d'une interaction non négligeable entre ces deux conditions psychiatriques (Kessler et al., 2003).

L'anxiété se caractérise par un sentiment persistant et désagréable d'inquiétude face à des menaces potentielles (Takagi et al., 2018 ; Daviu et al., 2019). Elle peut se manifester à travers des symptômes physiologiques tels que l'accélération du rythme cardiaque et de la respiration, des tremblements, ou encore une sudation excessive. On distingue deux types d'anxiété en fonction du contexte de leur apparition : l'anxiété « de trait » et l'anxiété « d'état » (voir Belzung et Grebiel, (2001) pour une revue sur la validité de ces modèles). L'anxiété d'état se manifeste de manière temporaire en réponse à une situation anxiogène spécifique. Sa modélisation permet ainsi l'étude de comportements anxieux considérés comme « normaux » ou non pathologiques. En revanche, l'anxiété de trait, comme un trait de personnalité, correspond à la vulnérabilité à présenter des réponses anxieuses de manière spontanée et indépendamment de la situation. La modélisation de ces deux types d'anxiété permet donc l'étude de comportements anxieux qualifiés d'« anormaux », ou pathologiques. Tandis que l'étude de l'anxiété état permet de mesurer un sentiment d'anxiété à un instant donné, l'étude de l'anxiété trait permet de mesurer l'anxiété chronique, pouvant atteindre un niveau pathologique (Wager et Sandi, 2018).

Certains modèles d'anxiété de trait reposent sur l'utilisation de lignées de souris génétiquement sélectionnées présentant un phénotype émotionnel marqué, notamment avec des niveaux d'anxiété accrus (Makino et al., 1991). D'autres modèles basés sur la présence de

comportements anxieux à l'état basal sont également utilisés pour étudier l'anxiété de trait, notamment comme facteur de vulnérabilité à développer des troubles anxieux et dépressifs (Weger et Sandi, 2018). Toutefois, la plupart des modèles d'anxiété se concentrent sur l'étude de l'anxiété d'état à travers des approches éthologiques fondées sur les réponses comportementales naturelles des souris face à des stimuli stressants, tels que la fuite, l'évitement, ou l'immobilité. Ces tests peuvent induire une réponse d'anxiété conditionnée, comme dans les modèles de peur conditionnée, ou une réponse non conditionnée qui découle d'un conflit naturel d'approche-évitement. Dans ce conflit, l'animal doit choisir entre deux comportements opposés face à une situation comportant à la fois une menace et une récompense (pour une revue, voir Kalueff et Tuohimaa, 2004). Parmi les tests basés sur ce conflit, les plus couramment utilisés sont les tests du labyrinthe en croix ou en zéro surélevé (EPM et EZM, respectivement), le test de la chambre claire/obscur (light/dark test, L/D), et le test à champ ouvert (*open field*, OF ; Figure 13). Ces tests exposent les animaux à des environnements présentant des caractéristiques anxiogènes telles que la nouveauté, la luminosité, l'espace et l'altitude. Ces comportements sont sensibles aux effets des anxiolytiques, notamment les benzodiazépines (BZ) qui modulent le comportement des animaux en réduisant l'évitement des zones anxiogènes (bras ouverts des EPM/EZM, partie éclairée du L/D, et centre de l'OF ; Lister, 1987 ; Pellow et al., 1985 ; voir Prut et Belzung (2003) pour une revue). Ainsi, ces tests permettent de mesurer éthologiquement l'effet aversif d'un paramètre (stress, traitement, ou génotype) sur ces comportements.



**Figure 13. Représentation des différents tests les plus utilisés pour évaluer les comportements de type anxieux.**

Chacun de ces tests présente une zone dite « anxiogène » pour la souris, identifiée sur les schémas par la zone bleutée.

Les tests utilisés pour mesurer les comportements de type dépressif sont nombreux, reflétant la diversité des symptômes cognitifs et émotionnels retrouvés dans la dépression (Nestler et Hyman, 2010 ; Becker et al., 2021). Parmi ceux qui peuvent être objectivement mesurés chez le rongeur, on retrouve l'anhédonie, l'apathie, la résignation (ou le désespoir), ou encore l'évitement social. D'une part, l'anhédonie se définit comme la perte de plaisir et est facilement évaluée par la consommation d'une substance appétitive, notamment à travers le test de préférence au sucrose (Liu et al., 2018). D'autre part, l'apathie représente la perte de motivation envers certains comportements volontaires, comme la perte de motivation à prendre soin de soi ou d'autres individus, qui se mesure par le toilettage (*grooming*) dans le test de pulvérisation d'une solution visqueuse (*splash test*), ou par l'absence de construction du nid (*nest-building*) ainsi que de soins maternels envers les portées. La dépression s'accompagne également d'une résignation plus importante, qui se modélise chez l'animal par sa réactivité (latence et durée d'immobilité) face à une situation désagréable inévitable et sans issue, notamment à travers le test de suspension par la queue ou le test de nage forcée (Cryan et Holmes, 2005 ; Yankelevitch-Yahav et al., 2015). Enfin, l'évitement social est caractérisé par la perte de préférence envers un congénère et peut se mesurer à travers divers tests de sociabilité tels que le test des trois chambres, ou encore le test d'interaction sociale (Crawley et al., 2007 ; Golden et al., 2011).

L'étude de ces symptômes nécessite néanmoins l'existence de modèles induisant des troubles anxio-dépressifs. Certains modèles de dépression et d'anxiété sont induits pharmacologiquement, permettant l'étude de l'état pathologique de ces troubles (troubles traits ; Graeff et al., 2003). Toutefois, ils ne permettent pas de modéliser la complexité des facteurs impliqués dans le développement de leurs symptômes, ni de modéliser la variabilité inter-individuelle. Pour cela, des modèles de stress environnementaux sont souvent utilisés. On peut distinguer différents modèles de dépression et d'anxiété en fonction du stress environnemental, comme le stress moyen chronique (*chronic mild stress, CMS*), le stress de contention, le stress d'instabilité sociale, l'isolement social, la séparation maternelle, et bien entendu, le CSDS (Willner, 2005 ; Krishnan et al., 2007 ; Anacker et al., 2014). Le développement de tels modèles a ainsi permis la découverte des circuits neuronaux impliqués dans ces troubles, offrant ainsi des avancées significatives dans notre compréhension de la physiopathologie de l'anxiété et de la dépression.

### 2.3.2. *Des modèles aux mécanismes : exploration des circuits neuronaux de l'anxiété et de la dépression*

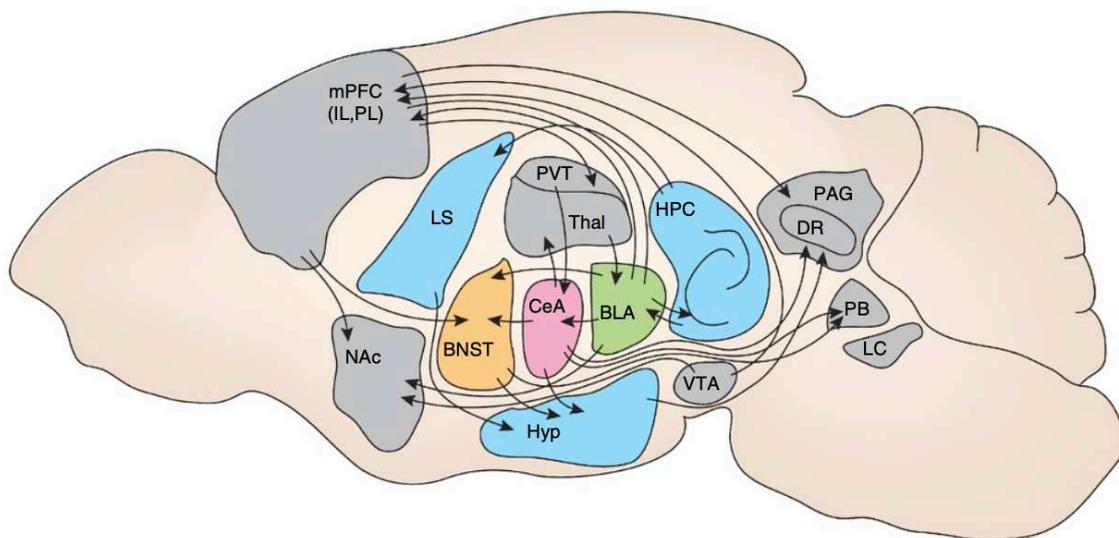
L'étude des modèles animaux de dépression et d'anxiété a permis de mettre en avant les mécanismes sous-jacents des troubles anxio-dépressifs, ouvrant ainsi la voie à des interventions thérapeutiques plus ciblées et efficaces. Plusieurs régions clés du cerveau interviennent dans le traitement de l'information sensorielle et l'attribution de valeur émotionnelle, telles que l'amygdale, le noyau du lit de la strie terminale (BNST), l'hippocampe (HPC), le DRN, le PFC, la VTA et le NAc (Russo et Nestler, 2013). Ces régions participent ainsi à la formation de plusieurs circuits neuronaux impliqués dans l'anxiété et la dépression (Figure 14).

Le système sérotoninergique est classiquement associé aux troubles anxio-dépressifs, lesquels se caractérisent notamment par une diminution de la transmission de 5-HT, même si elle a récemment été remise en question (Moncrieff et al., 2023). Cette neurotransmission est notamment la cible principale de la plupart des traitements antidépresseurs. Ces antidépresseurs sont des inhibiteurs sélectifs de la recapture de 5-HT, ou ISRSs (Fernandez et Gaspar, 2012). Le rôle de la 5-HT dans les comportements de type anxieux et dépressifs est notamment souligné par des recherches se basant sur la perturbation de la transmission 5-HT chez les rongeurs (Ansorge et al., 2004 ; Whitney et al., 2016 ; Fernandez et Gaspar, 2012). Les effets de la 5-HT sur les comportements émotionnels semblent être en partie développementaux dans la mesure où l'altération de la neurotransmission 5-HT a des effets variables selon le stade de développement (Gaspar et al., 2003 ; Ansorge et al., 2004 ; Urban et al. 2016 ; Vinkers et al., 2010 ; Rebello et al., 2014 ; Whitney et al. 2016). Son inhibition pharmacologique durant le premier mois de vie post-natale induit des comportements émotionnels pathologiques, tandis que son inhibition par délétion conditionnelle ou chémozogénétique à l'âge adulte n'a pas d'effets délétères sur ces comportements (Sarkar et al., 2014 ; Whitney et al., 2016 ; Teissier et al., 2017). De plus, l'augmentation de cette neurotransmission à un stade précoce de développement suite à l'administration d'ISRSs a un effet déprimeur tandis qu'elle a un effet antidépresseur à l'âge adulte (Ansorge et al., 2004 ; Rebello et al., 2014 ; Teissier et al. 2015). Par ailleurs, les comportements anxieux induits par ce modèle développemental peuvent être rétablis à l'âge adulte par inhibition chémozogénétique des neurones 5-HT du DRN, alors que celle-ci n'a aucun effet sur des souris adultes naïves (Teissier et al., 2015). Ces effets ne sont pas limités aux comportements émotionnels puisque

le sommeil et en particulier le sommeil paradoxal est augmenté après administration d'ISRSs lors du développement, évoquant les anomalies du sommeil observées chez les patients dépressifs (Popa et al., 2008). La transmission 5-HT semble également agir sur la neurogenèse hippocampique adulte, qui est elle-même responsable de la résilience au stress (Zhang et al., 2016 ; Anacker et al., 2018). Ainsi, les effets de la 5-HT seraient similaires à ceux de la neurogenèse hippocampique adulte sur la modulation des effets du CSDS (Zhang et al., 2016 ; Bickle et al., 2024). D'une part, l'activation des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> par traitement pharmacologique augmente la neurogenèse dans le gyrus denté ventral (vDG), et d'autre part, celle-ci diminue l'hyperactivité du vDG favorisant ainsi la résilience. De plus, le DRN est également impliqué dans la physiopathologie des troubles anxio-dépressifs, bien que son effet anxiolytique ou antidépresseur semble dépendre de ses afférences mais aussi de ses cibles spécifiques (Ren et al., 2018 ; Warden et al., 2012 ; Maseck et al., 2014). En effet, l'activation chémogénétique de ses projections vers l'amygdale centrale (CeA) a un effet anxiogène, augmentant les comportements de type anxieux dans un test d'EPM. D'autre part, la stimulation optogénétique dans le DRN des neurones de projections en provenance du mPFC a un effet antidépresseur dans le test de nage forcée (Warden et al., 2012). A l'inverse, l'inhibition des neurones sérotoninergiques du DRN induite par l'activation de la voie de signalisation Gi/o liée aux récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> a un effet anxiogène (Maseck et al., 2014). De plus, l'abolition de la production de 5-HT, induite par la déplétion de Tph2, une enzyme essentielle dans la biosynthèse de la 5-HT, dans les neurones du DRN projetant vers le cortex orbitofrontal (OFC) induit des comportements anxieux et dépressifs qui peuvent être inversés par une activation chémogénétique (Ren et al., 2018). Il est intéressant de noter que les souris présentant une telle déplétion de 5-HT dans tout le cerveau répondent aux ISRSs seulement si elles n'ont pas été soumises à un stress (Sachs et al., 2013). Après un stress de CSDS de 7 jours, ces souris présentent une susceptibilité accrue qui n'est pas inversée par un traitement chronique aux ISRSs, remettant en perspective les résistances aux traitements antidépresseurs retrouvés chez les humains (Sachs et al., 2015). Dans l'ensemble, ces données suggèrent un potentiel rôle antidépresseur et anxiolytique de la 5-HT.

Lorsqu'un stimulus est perçu, l'information sensorielle est transmise du cortex sensoriel et du thalamus à différentes régions cibles, dont le noyau amygdalien basolatéral (BLA), qui est le noyau d'entrée principal de l'amygdale permettant d'attribuer une valeur émotionnelle (positive ou négative) à ce stimulus (Tye et al., 2008 ; Paton et al., 2006). La BLA est organisée de manière topographique selon ses projections permettant ainsi de moduler cette valence émotionnelle en fonction de ses multiples projections, dont le NAc, la CeA, et l'HPC ventral

(Namburi et al., 2015 ; Beyeler et al., 2016 ; Beyeler et al., 2018). La voie BLA-CeA est particulièrement impliquée dans le développement de l'anxiété, comme en témoigne la modulation optogénétique des projections de la BLA vers la CeA. L'activation de ces fibres a un effet anxiolytique mesuré par un test d'EPM, tandis que leur inhibition potentialise des effets anxiogènes (Tye et al., 2011). La connectivité de la BLA avec l'HPC est également impliquée dans les circuits de l'anxiété, ce dernier étant sensible aux stimuli positifs et négatifs, ce qui pourrait potentiellement renforcer les associations de valence dans un réseau en état d'hyperactivité et d'hypervigilance (Beyeler et al., 2018). En effet, la modulation optogénétique des projections BLA-HPC est suffisante pour induire ou diminuer des comportements anxieux. Il a été observé que leur activation ou inhibition dans l'HPC augmentait ou diminuait, respectivement, les comportements de types anxieux évalués dans l'EPM et l'OF. De manière surprenante, ces effets sont observés très rapidement et à court terme, se manifestant seulement sur une période de 3 minutes d'activation ou d'inhibition, pour une durée totale de test de 9 minutes (Feliz-Ortiz et al., 2013).



**Figure 14. Illustration des principaux circuits impliqués dans les comportements de type anxieux chez le rongeur.**

BLA : amygdale basolatérale ; BNST: noyau du lit de la stria terminalis ; CeA: amygdale centrale ; CeL : amygdale centrale latérale ; CeM : amygdale centromédiale ; DR : raphé dorsal ; DVC : complexe vagal dorsal ; HPC : hippocampe ; Hyp : hypothalamus ; IL : cortex préfrontal infralimbique ; LC : locus coeruleus ; LH : hypothalamus latéral ; LS : septum latéral ; mPFC : cortex préfrontal médial ; NAc : noyau accumbens ; ov : noyau oval du BNST ; PAG : substance grise périaqueducale ; PB : noyau parabrachial ; PL : PFC prélimbique ; PVH : noyau paraventriculaire de l'Hyp ; PVT : thalamus paraventriculaire ; SI : substantia innominata ; Thal : thalamus ; v : noyau ventral du BNST ; vHPC : HPC ventral ; VTA : aire tegmentale ventrale. *Calhoon et Tye (2015).*

L'attribution de la valence émotionnelle à un stimulus dépend également des projections de la BLA vers le mPFC, dont la modulation optogénétique a des effets opposés sur l'interaction sociale ainsi que sur les comportements anxieux (Burgos-Robles et al., 2017 ; Felix-Ortiz et al., 2016). La modulation dopaminergique du mPFC, qui projette à son tour vers la PAG joue également un rôle dans la mise en place de comportements d'évitement (Vander Weele et al., 2018). De même, l'activation de la PAG par le BNST, qui est lui-même innervé par la BLA, module la réponse d'anxiété conditionnée (Walker et al., 2003). Ces données confirment le rôle central de la BLA dans l'interprétation émotionnelle des informations sensorielles. Celle-ci facilite la transmission de ces informations à d'autres régions essentielles pour l'apprentissage et la prise de décision afin de guider le comportement de l'individu.

Ces régions comprennent notamment la VTA et le NAc, qui sont particulièrement impliquées dans le développement des troubles anxio-dépressifs (Bewernick et al., 2010). Par exemple, l'activation chémo-génétique des neurones dopaminergiques de la VTA induit des comportements anxieux liés au stress (Qi et al., 2022). Plus spécifiquement, le rôle bidirectionnel de la VTA et du NAc dans l'induction de comportements anxio-dépressifs a été souligné par plusieurs études (Tye et al., 2013 ; Chaudhury et al., 2013). L'inhibition optogénétique des projections du NAc vers la VTA suffit à induire un phénotype anxieux, tandis que leur activation après stress permet de renverser ce phénotype. De plus, l'activation phasique des neurones de la VTA projetant vers le NAc réduit les phénotypes de désespoir et d'anhédonie traditionnellement associés à la dépression (Tye et al., 2013). Cependant, des données contradictoires sont observées en réponse au stress de CSDS (Cao et al., 2010 ; Chaudhury et al., 2013). Le CSDS induit une augmentation de l'activité phasique des neurones de la VTA associée à la susceptibilité, et leur activation phasique par optogénétique durant le CSDS précipite un phénotype dépressif. Malgré quelques résultats d'apparence contradictoire, ces études soulignent néanmoins l'importance des projections entre la VTA et le NAc dans la régulation des troubles émotionnels, et soulignent l'importance de la nature du stress sur les circuits impliqués dans la réponse au stress (Figure 14).

### *2.3.3. Modulation des circuits de l'anxiété et de la dépression par le stress chronique de défaite sociale*

Outre les différents aspects de validation mentionnés précédemment pour le modèle de CSDS, il est également considéré comme un outil de recherche translationnelle efficace. En

effet, les phénotypes anxiodépressifs qu'il induit sont sensibles aux traitements antidépresseurs chroniques, ce qui en fait un modèle pertinent pour l'étude des interventions thérapeutiques (Berton et al., 2006).

L'étude des mécanismes impliqués dans le CSDS a permis de révéler le rôle fondamental de la transmission dopaminergique mésencéphalique dans la réponse au stress (Krishnan et al., 2007 ; Berton et al., 2006 ; Netsler et Carlezon, 2006). Les enregistrements électrophysiologiques *ex vivo* sur tranche ont initialement révélé une augmentation de l'activité phasique des neurones de la VTA chez les souris stressées (Krishnan et al., 2007). Cette observation a été confirmée par électrophysiologie *in vivo* démontrant une augmentation de la fréquence de décharge des neurones VTA, mais également par microdialyse *in vivo* montrant une augmentation de la libération de DA après une défaite sociale aiguë (Barik et al., 2013). Cependant, une distinction importante entre les souris susceptibles et résilientes a été mise en évidence. Les souris susceptibles présentent une fréquence de décharge augmentée des neurones VTA au stress, tandis que les souris résilientes montrent des taux de décharge similaires à ceux des souris non stressées. Cette spécificité est corroborée par le fait que l'augmentation de l'activité dopaminergique de la VTA suite à la surexpression de Kir2.1, un canal ionique jouant un rôle dans la régulation de la polarisation membranaire des neurones, reproduit les effets pro-susceptibles du CSDS sur l'évitement social et l'anhédonie, tandis que sa diminution induit un phénotype résilient (Krishnan et al., 2007 ; Cao et al., 2010). La régulation du stress par la VTA passe par diverses voies neuronales. Tout d'abord, le rôle de ses projections vers le NAc a été mis en évidence par des études utilisant la modulation optogénétique des neurones dans la VTA projetant vers le NAc (Chaudhury et al., 2013). Ces études ont permis de préciser l'association entre la susceptibilité et l'activité de la VTA. L'activation phasique de ces neurones pendant le stress CSDS entraîne un phénotype de susceptibilité avec un évitement social accru qui s'accompagne d'anhédonie, tandis que leur inhibition pendant le test d'interaction sociale induit des effets opposés. Cependant, le stress de défaite sociale n'augmente pas seulement l'activité des neurones dopaminergiques de la VTA, mais également celle des neurones GABAergiques (Yu et al., 2022). Au moment de l'attaque, on observe une augmentation du signal calcique dans ces neurones enregistré par photométrie de fibre. Le stress aigu de défaite sociale active ces neurones et en particulier ceux qui projettent sur le LH. On retrouve également une augmentation de l'activité des afférences de la VTA par le CSDS, dont notamment le LDT, le LC et le DRN (Fernandez et al., 2018 ; Isingrini et al., 2016 ; Henderson et al., Annexe 1). L'ensemble de ces données souligne l'influence des multiples projections de et vers la VTA dans la réponse au stress social.

Récemment, l'utilisation de senseurs calciques ou de senseurs dopaminergiques fluorescents, couplés à la photométrie de fibre, a permis d'explorer en temps réel l'effet du CSDS, en mettant particulièrement en lumière l'impact de l'attaque sur la transmission DAergique dans le NAc (Willmore et al., 2022 ; Dai et al., 2022). Contrairement aux recherches précédentes qui montraient une hyperactivité de la VTA liée à la susceptibilité au stress, celles-ci montrent une diminution de l'activité dopaminergique des neurones VTA-NAc dans le NAc au moment de l'attaque lors de la défaite positivement corrélée à la susceptibilité, tandis que leur activation optogénétique augmente la résilience (Chaudhury et al., 2013 ; Willmore et al., 2022 ; Dai et al., 2022). Ces divergences peuvent être dues aux approches expérimentales utilisées avec l'avantage de la photométrie de fibre de pouvoir synchroniser l'activité calcique à un comportement particulier, et la possibilité d'identifier une activité spécifique qui jouerait un rôle clé dans la modulation de l'intérêt social. De plus, il est probable que l'effet modulateur de la DA dans la VTA sur la résilience ne soit pas seulement de nature quantitative, mais plutôt de nature qualitative, impliquant la plasticité de l'excitabilité des neurones DAergiques de la VTA et en particulier ceux qui ciblent le NAc. C'est ce qu'indiquent les résultats d'une étude électrophysiologique *ex vivo* qui a montré que les neurones DAergiques de la VTA des souris résilientes présentent une activité de décharge normale malgré une augmentation des courants entrants  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  activés par hyperpolarisation qui n'est pas retrouvée chez les souris susceptibles (Friedman et al., 2014). Étonnamment, les souris susceptibles sont caractérisées par une hyperexcitabilité des neurones DAergiques de la VTA, alors qu'elles ne présentent pas une augmentation des courants potassiques. Le fait que l'augmentation de ces courants chez les souris susceptibles, tout comme l'activation optogénétique des neurones DAergiques de la VTA aient restauré un phénotype résilient, souligne le rôle de la régulation de cette activité par les courants entrants plutôt que l'activité elle-même, dans le processus de résilience. Cela a également été confirmé par l'activation optogénétique des neurones DAergiques de la VTA, mettant ainsi en valeur le rôle de la régulation de cette activité, plutôt que l'activité elle-même, dans le processus de résilience. De plus, cette plasticité différentielle entre souris résilientes et susceptibles est spécifique des neurones DAergiques de la VTA qui projettent vers le NAc, renforçant à nouveau l'importance de la voie VTA-NAc dans les effets comportementaux de la CSDS.

La susceptibilité au stress est également corrélée à une hyperactivité de la région hippocampique ventrale (vHPC ; Anacker et al., 2018). Cette réaction pro-dépressive implique les projections du vHPC vers le NAc, comme le suggère l'effet induit par l'activation

optogénétique de ces fibres, favorisant la susceptibilité (Bagot et al., 2015). Ces résultats soulignent ainsi l'effet pro-dépression du NAc par ses connexions avec l'hippocampe.

Contrairement aux neurones de la VTA qui projettent vers le NAc, ceux projetant vers le cortex préfrontal médian (mPFC) semblent jouer un rôle dans la résilience, comme le suggère l'effet induit par leur inhibition optogénétique, qui favorise la susceptibilité en réduisant l'interaction sociale (Chaudhury et al., 2013). De plus, leur activation phasique chronique par optogénétique chez les souris susceptibles restaure la résilience en augmentant le temps passé dans la zone d'interaction (Friedman et al., 2014). Cette influence pourrait être attribuée aux projections glutamatergiques du mPFC vers le NAc, qui favorisent la résilience, comme l'ont indiqué plusieurs études démontrant que l'activation optogénétique de ces neurones induit la résilience en augmentant l'interaction sociale et la préférence pour le sucrose, sans affecter les comportements anxieux (Christoffel et al., 2015; Bagot et al., 2015 ; Vialou et al., 2014).

En résumé, le stress de CSDS entraîne une modulation de l'activité neuronale qui conduit au développement de réponses physiologiques et comportementales, pouvant se traduire soit par une réponse adaptative de résilience, soit par une réponse pathologique de susceptibilité. L'ensemble des données disponibles suggère fortement que la direction de cette réponse est en grande partie dépendante du NAc.

### 3. Le Noyau Accumbens : anatomie, physiologie et fonctions de cette structure du striatum

Le striatum est une région clé impliquée dans de nombreux comportements, qu'ils soient sains ou pathologiques. En tant qu'entrée principale des ganglions de la base et en raison de son organisation anatomique, le striatum est une structure fonctionnelle d'intégration capitale pour la régulation d'une multitude de comportements complexes, allant du contrôle moteur aux comportements motivationnels. Il est donc primordial de comprendre son organisation, dans laquelle réside la complexité de ses conséquences comportementales.

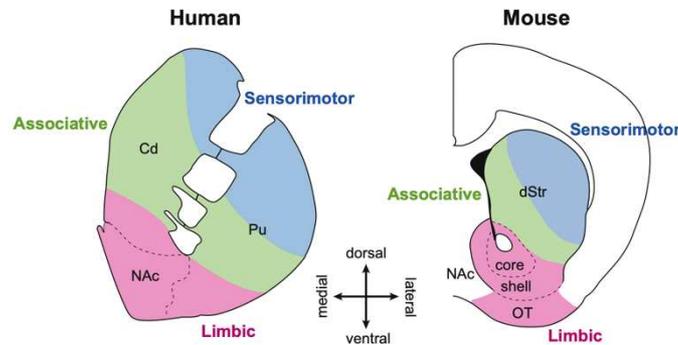
#### **3.1. Organisation anatomique et fonctionnelle du striatum: un fondement de son rôle clé dans le cerveau**

##### *3.1.1. Organisation compartimentale du striatum*

Étant donné l'importance du striatum au sein des ganglions de la base et son rôle dans divers comportements moteurs et émotionnels, sa structure a longuement été étudiée. D'un point de vue évolutif, le striatum est une région relativement bien conservée chez les vertébrés (Stephenson-Jones et al., 2011). De manière commune et rudimentaire, on observe une structure divisée en deux compartiments assez similaires entre l'humain et le rongeur : le striatum dorsal et ventral. Chez l'humain, le striatum dorsal est constitué du noyau caudé et du putamen, tandis que chez le rongeur, on parle du striatum dorso-médian (DMS) et dorso-latéral (DLS ; Figure 15). Dans les deux espèces, le striatum ventral est principalement constitué du noyau accumbens (NAc), lui-même subdivisé en deux parties : le cœur (*core*) et l'enveloppe (*shell*). Chez l'humain, le striatum ventral comprend le NAc ainsi que la région ventrale du putamen et du noyau caudé. Chez le rongeur, il comprend le NAc et une partie du bulbe olfactif.

Traditionnellement, le striatum a été divisé anatomiquement en fonction du rôle de ses afférences corticales. Les projections venant du cortex moteur délimitent la région dorsale du DMS, tandis que la région du DLS est connue pour recevoir principalement des fibres provenant du cortex associatif, conférant ainsi au striatum dorsal son rôle dans le contrôle moteur (Chuhma et al., 2017). Enfin, le NAc reçoit préférentiellement des afférences en

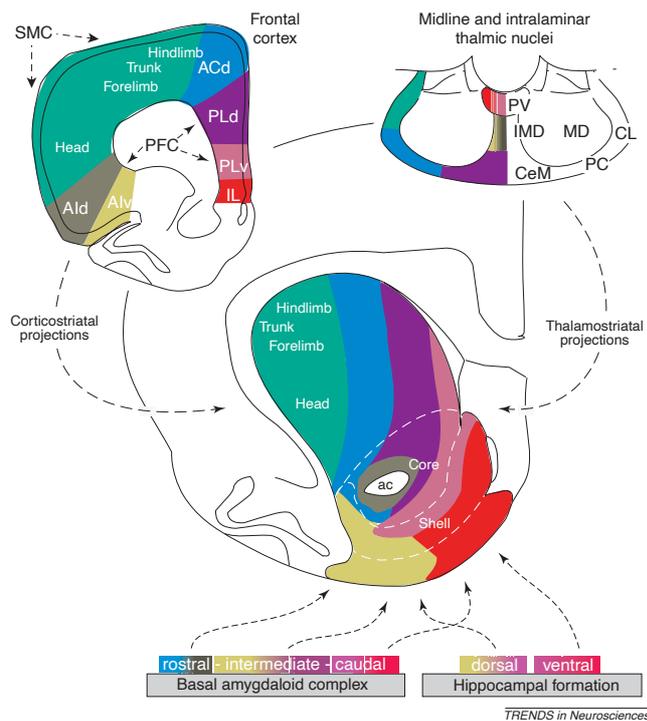
provenance de régions limbiques sous-corticales, associant cette région à des fonctions telles que la récompense, la motivation et l'apprentissage.



**Figure 15. Illustration de l'organisation du striatum chez l'humain et la souris en fonction de ses connexions.**

Cd : noyau caudé ; Pu : putamen ; NAc : noyau accumbens ; dSt : striatum dorsal ; OT : tubercule olfactif. *Chuhma et al. (2017)*.

La topographie dualiste classique du striatum, associant la partie dorsale aux comportements sensori-moteurs et la partie ventrale aux comportements d'origine limbique, est de plus en plus remise en question, notamment en raison de l'absence de délimitations histologiques strictes entre le DMS, le DLS et le NAc (Voorn et al., 2004). Ces auteurs proposent une organisation en gradient allant du striatum dorso-médian (complexe caudé-putamen) vers le striatum ventro-latéral (Figure 16). Par ailleurs, des études cytologiques et histologiques ont révélé une similitude dans la composition cellulaire et l'organisation, nommée en « striosome-matrice », entre le striatum dorsal et ventral, favorisant la pertinence d'une subdivision entre striosomes et matrice (Graybiel et Ragsdale, 1978 ; Flaherty et Graybiel, 1994).

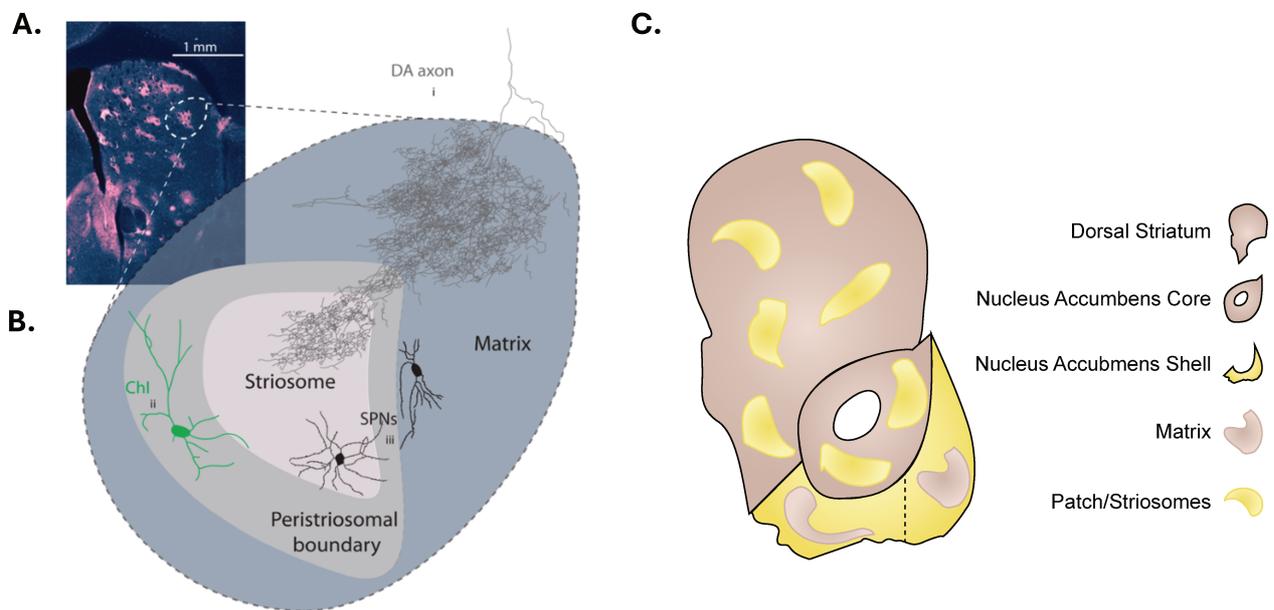


**Figure 16. Illustration de l'organisation en gradient du striatum dorso-médian vers le striatum ventro-latéral.**

Ac : commissure antérieure ; ACd : cortex cingulé dorsal antérieur ; Aid/v : cortex agrulaire insulaire dorsal/ventral ; CeM : noyau thalamique centro-médial ; CL : noyau thalamique centro-latéral ; IL : cortex infralimbique ; IMD : noyau thalamique intermediodorsal ; MD : noyau thalamique mediodorsal ; PC : noyau thalamique paracentral ; PFC : cortex préfrontal ; PLd/v : cortex prélimbique dorsal/ventral ; PV : noyau thalamique paraventriculaire ; SMC : cortex sensorimoteur. *Voorn et al. (2004)*

Le striatum présente une hétérogénéité complexe dans sa distribution cellulaire, ce qui permet de distinguer les zones à densité cellulaire élevée (striosomes) des zones moins denses (matrice ; Figure 17 ; Gerfen, 1992 ; Brimblecombe et Cragg, 2017 ; Castro et Bruchas, 2019). La plupart des études ont mis en évidence le rôle spécifique de chaque compartiment tant au niveau neurochimique que comportemental. Les striosomes, qui représentent 10 à 15 % du volume striatal, se différencient de la matrice par leur histochimie. Ils n'expriment pas certains marqueurs neurochimiques présents dans la matrice, notamment certains marqueurs cholinergiques et dopaminergiques (Brimblecombe et Cragg, 2017). En effet, ils ont d'abord été identifiés comme étant pauvres en acétylcholine estérase et enrichis en récepteurs de la dopamine de type 1 (D1R) et en récepteurs des opioïdes  $\mu$ . En revanche, la matrice est enrichie en acétylcholine estérase ainsi qu'en récepteurs de la dopamine de type 2 (D2R ; Graybiel et Ragsdale, 1978 ; Herkenham et Pert, 1981). En plus des différences neurochimiques, on observe également une ségrégation entre les striosomes et la matrice en fonction des connexions afférentes, appuyant l'idée d'une compartimentalisation du striatum basée sur les différences neurochimiques entre les striosomes et la matrice plutôt que sur une organisation dorso-ventrale. Les striosomes semblent être principalement innervés par des fibres corticales limbiques et sous-corticales, tandis que la matrice est préférentiellement innervée par le cortex sensori-moteur (Flaherty et Graybiel, 1994 ; Dudman et Gerfen, 2015). Cette distinction compartimentale est également soutenue par des études démontrant un lien entre un

déséquilibre striosomes-matrice et des pathologies neurologiques liées au striatum, telles que la maladie de Huntington ou de Parkinson (Crittenden et Graybiel, 2011).



**Figure 17. Représentation de l'organisation en striosomes-matrice du striatum.**

(A) Coupe de striatum de souris avec les striosomes caractérisés par les régions roses. (B) Schématisation de la composition cellulaire au sein des striosomes et de la matrice. (C) Schématisation de la composition en striosomes-matrice au sein du striatum dorsal et ventral (noyau accumbens). ChI : interneurons cholinergiques ; SPNs : neurones épineux moyens ; DA : dopamine. *Adapté de Brimblecombe et Cragg (2017) et de Castro et Bruchas (2019).*

Cependant, la dichotomie binaire et spécifique à chaque compartiment entre les striosomes et la matrice ne semble pas non plus refléter la complexité des mécanismes neuronaux sous-jacents. Par exemple, des études utilisant des traceurs viraux ont montré que les récepteurs D1 et D2 sont tous deux exprimés dans chaque compartiment (Fujiyama et al., 2011). Malgré des différences quantitatives dans l'expression de ces récepteurs entre les striosomes et la matrice, on n'observe néanmoins pas de ségrégation neuronale associant un compartiment à un circuit spécifique. De plus, des études récentes ont mis en évidence les circuits neuronaux sous-jacents de manière spécifique grâce à l'utilisation de lignées de souris exprimant la protéine fluorescente verte (eGFP) ou la recombinaise Cre sous des promoteurs neuronaux spécifiques à la matrice ou aux striosomes (Davis and Puhl, 2011 ; Smith et al., 2016). Ainsi, Smith et al. (2016) ont montré que le cortex limbique, moteur et associatif innerve de la même manière les striosomes et la matrice, même si les striosomes reçoivent des afférences

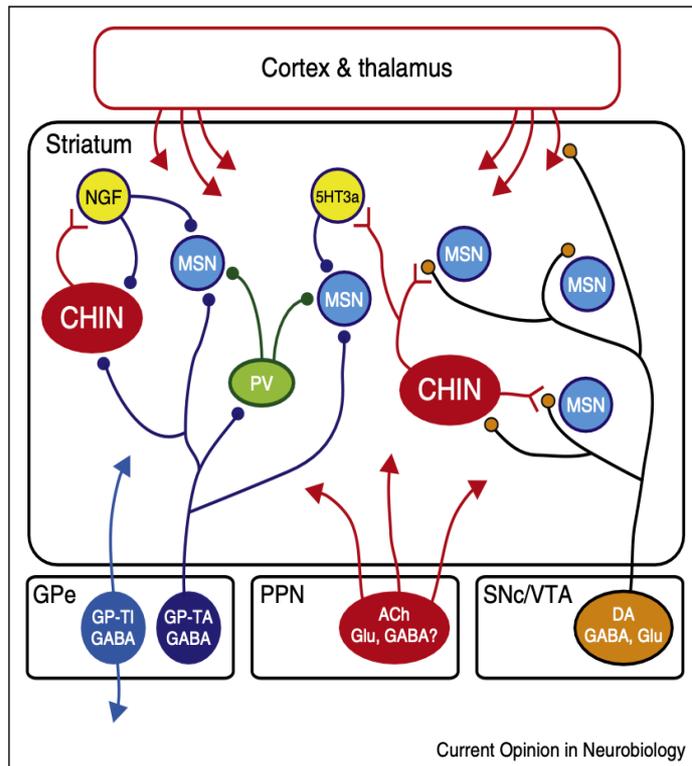
supplémentaires de régions sous-corticales telles que le noyau central de l'amygdale (CeA) ou le noyau du lit de la stria terminalis (BNST). De plus, l'enregistrement des courants ioniques par électrophysiologie *ex-vivo* sur des cellules spécifiques des striosomes et de la matrice a montré une excitabilité plus importante et plus sensible des membranes dans les cellules des striosomes, suggérant des rôles fonctionnels différents entre les compartiments (Smith et al., 2016 ; Crittenden et al., 2017). Selon Brimblecombe & Cragg (2017), la question des conséquences fonctionnelles de l'organisation en striosomes-matrice est au cœur de l'intérêt pour celle-ci. Ils mettent en avant l'idée d'une coopération fonctionnelle des deux compartiments qui, par leurs différences dans les modulateurs neuronaux, permettent un traitement de l'information plus fin. Afin de mieux comprendre cette régulation inter- et intra-compartimentale, il est essentiel de se pencher d'abord sur les différentes sources d'information neuronale qui convergent vers le striatum.

### *3.1.2. Multiplicité des afférences du striatum : pôle d'intégration des informations*

Le striatum reçoit un large éventail d'informations en provenance de diverses régions et impliquant différents neurotransmetteurs (Figure 18). Les principales sources afférentes proviennent du cortex et du thalamus, ciblant l'ensemble des types neuronaux du striatum, détaillés dans la section suivante (Bolam et al., 2000 ; Silberberg et Bolam, 2015).

Ces afférences sont majoritairement glutamatergiques, constituant ainsi une source principale d'excitation pour le striatum. D'autres sources glutamatergiques viennent de l'amygdale (CeA) et de l'hippocampe (HPC ; Gardoni et Bellone, 2015). Concernant les afférences corticales, elles proviennent de diverses régions corticales, incluant le cortex sensoriel, le cortex moteur et prémoteur, ainsi que le cortex limbique (Bolam et al., 2000 ; Gerfen et al., 2002). Les afférences thalamiques, quant à elles, émanent principalement du complexe centro-médian/parafasciculaire (CM/Pf) et du noyau parafasciculaire (PfN ; Assous et al., 2017). Des études immunohistochimiques ont été menées pour comprendre la topographie de ces projections et mettre en évidence la pertinence fonctionnelle de leur organisation. Traditionnellement, les afférences corticales et thalamiques n'étaient pas décrites comme spécifiques à certains types neuronaux, ciblant de manière égale tous les neurones GABAergiques du striatum (Doig et al., 2010). Cependant, des recherches récentes ont révélé la spécificité de certaines afférences corticales pour certains types d'interneurones GABAergiques (Assous et al., 2017). De plus, une topographie spécifique aux différents compartiments de l'organisation en striosomes-matrice a été observée, avec une préférence

des afférences glutamatergiques corticales pour la matrice plutôt que pour les striosomes (Fujiyama et al., 2016). Une étude récente de connectomique a également révélé que le striatum présente une organisation en réseau similaire à celle du cortex afférent, mettant en évidence le rôle déterminant du striatum dans la ségrégation et l'intégration de l'information sensorielle corticale (Hintiryan et al., 2016).



**Figure 18. Schématisation des afférences striatales.**

GPe : globus pallidus externe; PPN : noyau pédonculopontin ; SNc : substance noire compacte ; CHIN : interneurones cholinergiques ; MSN : medium spiny neurons ; NPY-NGF : interneurones neurogliaformes exprimant le neuropeptide-Y ; 5HT3a : interneurones exprimant le récepteur 5-hydroxytryptamine 3a ; PV : interneurones exprimant la parvalbumine ; GP-TI : neurones prototypiques du GPe prototypic ; GP-TA : neurones arkypallidaux du GP ; Glu : glutamate ; ACh : acétylcholine. *Silberberg et Bolam (2015).*

En plus des afférences glutamatergiques, le striatum reçoit également des projections GABAergiques. Ces projections peuvent être divisées en deux catégories : celles d'origine extrinsèque, qui proviennent de régions externes au striatum, et celles d'origine intrinsèque, générées au sein du striatum lui-même et agissant localement. Les sources extrinsèques comprennent les projections provenant du Globus Pallidus externe (GPe) ainsi que celles du mésencéphale (Silberberg et Bolam, 2015 ; Tritsch et al., 2012). Par exemple, Tritsch et al. (2012) ont montré une activation des neurones GABAergiques striataux suite à l'activation optogénétique de la VTA et de la substance noire compacte (SNc). Leur étude a spécifiquement révélé, à l'aide d'antagonistes, que cette activation ne dépendait pas de la dopamine, mais plutôt du GABA, suggérant une co-transmission DA/GABA provenant du mésencéphale. Des recherches récentes ont également souligné le rôle essentiel de la modulation GABAergique intrinsèque au striatum (voir Assous et Tepper, (2019) pour une revue). En effet, un nombre

croissant d'études a mis en évidence une neuromodulation locale du striatum par les interneurones et neurones GABAergiques.

Comme évoqué ci-dessus, le striatum reçoit des afférences mésencéphaliques, notamment de la VTA et de la SNc. Bien que certaines utilisent du GABA comme neurotransmetteur, la plupart sont dopaminergiques (Silberberg et Bolam, 2015). Ces fibres axonales en provenance du mésencéphale établissent des synapses sur les dendrites et le cou des épines des neurones principaux du striatum (Smith et al., 1994).

Outre les afférences dopaminergiques, les afférences cholinergiques jouent également un rôle significatif. Bien que l'acétylcholine soit principalement produite par les interneurones cholinergiques locaux, des études ont révélé l'existence d'afférences cholinergiques provenant du noyau pédonculopontin (PPN) et du noyau tegmental latérodorsal (LDT) (Dautan et al., 2014).

De plus, le striatum, et en particulier le NAc, reçoit des afférences sérotoninergiques en provenance du DRN (Geyer et al., 1976 ; Waselus et al., 2006). Ces projections inhibent leurs cibles par la libération de sérotonine (5-HT), bien qu'une sous-population co-libère à la fois la 5-HT et le glutamate (Glut ; Gras et al., 2002 ; Amilhon et al., 2010).

La richesse et la diversité des régions corticales et sous-corticales, ainsi que des différents neurotransmetteurs impliqués dans l'intégration et la modulation de l'information, mettent en évidence le rôle essentiel du striatum en tant que centre d'intégration des ganglions de la base. Cela souligne également la complexité de la composition neuronale du striatum nécessaire au traitement et au relais de l'information, qui sera explorée en détails dans la partie suivante.

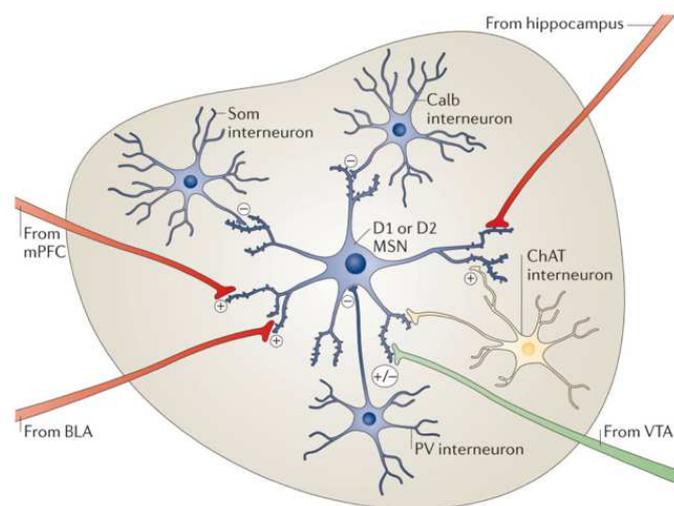
### *3.1.3. Hétérogénéité de la composition neuronale du striatum : intégration complexe des informations*

La population neuronale du striatum peut être divisée en deux catégories en fonction de ses propriétés anatomiques : les neurones épineux et non-épineux (Figure 19).

Les neurones épineux, appelés neurones épineux moyens (MSN) ou neurones de projection du striatum (SPN), représentent 90 à 95 % de la population cellulaire totale du striatum (Bolam et al., 2000). Leur appellation découle de leur densité importante d'épines dendritiques en arborisation sphérique. Les MSN sont des neurones GABAergiques inhibiteurs qui peuvent

être subdivisés en plusieurs catégories en fonction de leurs propriétés histochimiques et de leurs projections.

D'une part, les MSN-D1R se caractérisent par une expression dominante des récepteurs D1, des récepteurs muscariniques de sous-type 4 (M4R) et de la substance P (Gerfen 1992). Il est important de souligner que les récepteurs D1 et M4 induisent des effets opposés sur les MSN-D1R suite à leur liaison avec leur neurotransmetteur respectif. D'autre part, les MSN-D2R expriment principalement les récepteurs D2, les récepteurs muscariniques M1, ainsi que les récepteurs A2a de l'adénosine, ces derniers exerçant des effets opposés aux récepteurs D2R en activant les MSN (Ena et al. 2011 ; Goldberg et al., 2012). Il existe également une troisième population de MSN, moins connue, exprimant à la fois les D1R mais également les D2R (Perreault et al., 2011 ; Bonnavion et al., 2022).

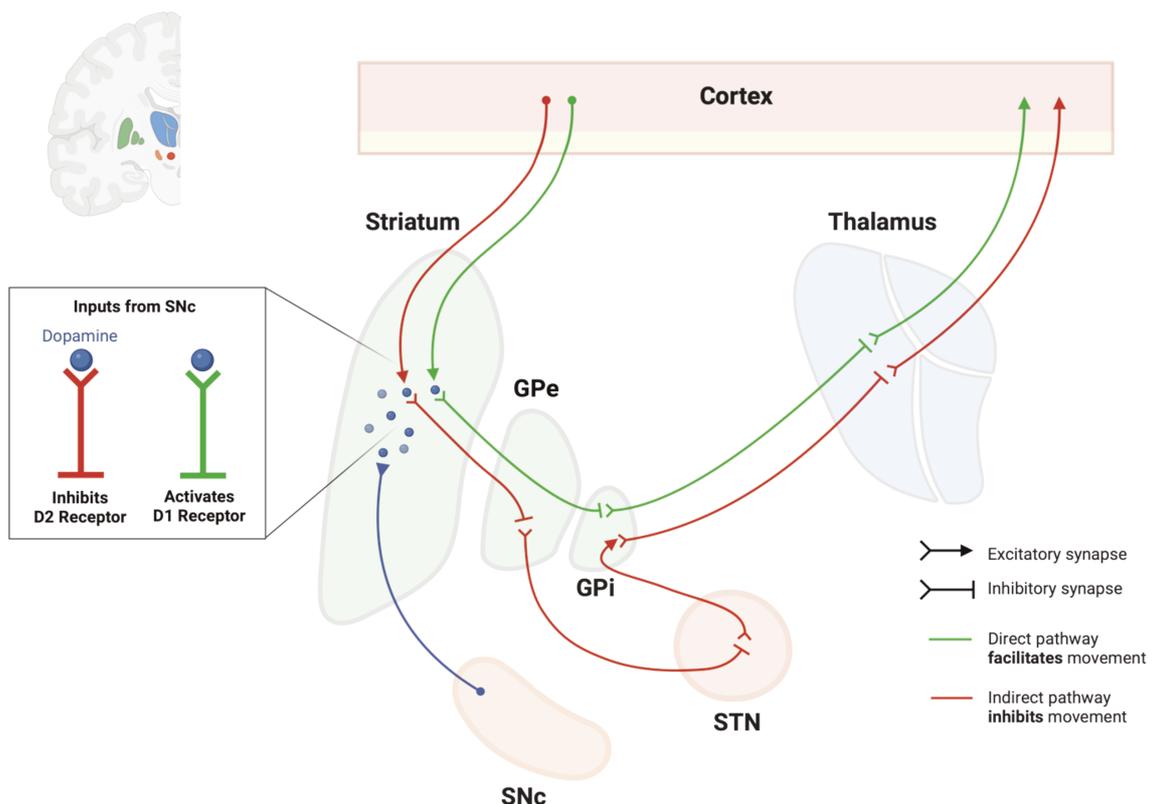


**Figure 19. Illustration des neurones et afférences dans le noyau accumbens.**

Les neurones épineux ou MSN et leurs connexions aux interneurons locaux (ChAT et GABAergiques : Som, Calb, PV) sont représentés ainsi que les afférences extra-striatales. ACh : acétylcholine ; BLA : amygdale basolatérale ; Calb interneuron : interneurone exprimant la calbindine ; ChAT interneuron : interneurone exprimant l'acétylcholine transférase ; DA : dopamine ; Glu : glutamate ; mPFC : cortex préfrontal médian ; MSN : medium spiny neurons ou neurones épineux moyens ; PV interneuron : interneurone exprimant la parvalbumine ; Som interneuron : interneurone exprimant la somatostatine ; VTA : aire tegmentale ventrale. *Russo et Nestler (2013)*.

Les MSN peuvent se distinguer par leurs sites de projection, bien qu'ils possèdent également des cibles communes. En effet, dans le striatum ventral (NAc), ces neurones

projetent vers la VTA (Xia et al., 2011). Dans le striatum dorsal, les deux types de neurones se distinguent également par leurs sites de projection. Alors que les MSN-D1R ciblent directement la partie interne du globus pallidus (GPi) ainsi que la substance noire réticulée (SNr), les MSN-D2R projettent indirectement vers le GPi avec un relais *via* la partie externe du globus pallidus (GPe). Cette ségrégation axonale met en évidence l'existence de deux voies neuronales aux conséquences motrices opposées : la voie directe, ou voie des MSN-D1R, qui facilite l'action motrice par une désinhibition de la voie thalamique excitatrice vers le cortex moteur, et la voie indirecte, ou voie des MSN-D2R, qui inhibe l'action motrice en renforçant l'inhibition de la voie thalamique excitatrice sur le cortex moteur (Figure 20). En revanche, ce modèle semble plus complexe, puisque le contrôle moteur par les MSN-D1R/D2R, ciblant exclusivement le GPe, dépend du type de MSN (D1 ou D2) conjointement activé (Bonnaïon et al., 2022). Ainsi, ils réduisent l'action motrice des MSN-D1R et favorisent l'engagement moteur des MSN-D2R, mais de façon dépendante de la valence affective du contexte comportemental, soulignant ainsi un rôle critique dans la régulation fine des circuits moteurs et comportements émotionnels du striatum.



**Figure 20. Illustration des voies directes et indirectes des ganglions de la base.**

GPi/GPe : globus pallidus interne et externe ; SNc : substance noire compacte ; STN : noyau subthalamique. De "Direct and Indirect Pathways of the Basal Ganglia", par BioRender.com (2024).

En raison des propriétés histochimiques des MSN, la DA exerce une modulation différente sur les deux types de neurones. En effet, les MSN-D1R expriment des récepteurs D1R, qui sont des récepteurs couplés à la protéine activatrice Gs, et sont donc activés par la DA. Au contraire, la DA exerce une action inhibitrice sur les MSN-D2R en raison du couplage de leurs récepteurs à la protéine inhibitrice Gi (Surmeier et al., 2007 ; Kreitzer, 2009). Ainsi, malgré des effets opposés des deux voies de signalisation des MSN, l'action de la DA sur le contrôle moteur reste la même (*i.e.* promotion de l'action motrice), indépendamment des MSN ciblés (Albin et al., 1989).

Les interneurons (IN) non-épineux constituent entre 5 et 10 % de la population neuronale du striatum. Bien que numériquement minoritaires, ils exercent une modulation significative sur la connectivité striatale, avec pour cibles principales les autres neurones du striatum, dont notamment les MSN et les autres IN. Parmi ces interneurons, on distingue les interneurons GABAergiques et les interneurons cholinergiques (Figure 19).

Plusieurs populations d'interneurons GABAergiques ont été identifiées. Traditionnellement, trois populations ont été identifiées, comprenant les interneurons exprimant la parvalbumine (PV), ceux exprimant la somatostatine (SOM), le neuropeptide Y (NPY) et la synthase oxyde nitrique (NOS), ainsi que ceux exprimant la calrétinine (CR) (Kubota et Kawaguchi, 1993 ; Vincent et Johansson, 1983). Des études ont mis en lumière des différences significatives dans les caractéristiques électrophysiologiques de ces interneurons. Les interneurons positifs à la PV se distinguent par une réponse excitatrice rapide, une fréquence de décharge élevée et des potentiels d'action de courte durée. En revanche, les interneurons SOM/NPY/NOS se caractérisent par un taux de décharge plus faible, des potentiels d'action de longue durée et une excitabilité à bas seuil suivie d'un plateau, ce qui les qualifie d'interneurons à décharge à seuil bas (LTS ; Kawaguchi, 1993 ; Tepper et al., 2010). Plus récemment, d'autres sous-populations d'IN GABAergiques ont été identifiées grâce à l'utilisation de lignées de souris transgéniques ciblant sélectivement certains marqueurs spécifiques. L'étude de leurs propriétés électrophysiologiques et de leur morphologie a permis d'identifier les sous-populations suivantes : les IN neurogliaformes (NGF), les IN à adaptation rapide (FAI), les IN actifs spontanément par bouffées (SABIs) et les IN exprimant la tyrosine hydroxylase (THINs ; voir Trapper et al., 2018 pour une revue). La diversité et la complexité des interneurons GABAergiques permettent donc une modulation fine du signal de sortie du striatum.

En plus des interneurons GABAergiques, le striatum est également composé d'interneurones cholinergiques (CINs), constituant la principale source d'ACh striatale. Représentant environ 2 % de la population neuronale du striatum, les CINs se distinguent des interneurons GABAergiques par la densité de leurs varicosités et la taille de leur soma, généralement comprise entre 20 et 50 microns (Bolam et al., 1984, Zhou et al., 2002). Ces caractéristiques morphologiques en font les principaux modulateurs des neurones striataux, qui expriment tous des récepteurs de l'ACh, grâce à une innervation locale étendue au sein du réseau striatal. Les CINs se distinguent également par leurs propriétés électrophysiologiques, présentant une activité *in vivo* dite tonique, caractérisée par une décharge spontanée continue (Wilson et al., 1990). De plus, ils sont reconnus pour leur réponse rapide à un stimulus saillant, suivi d'une pause, bien que leur rôle dans la réponse dopaminergique demeure toujours mystérieux (Cragg, 2006).

Les CINs ainsi que certains IN GABAergiques tels que les LTS et CR-positifs se localisent préférentiellement à la jonction entre les striosomes et la matrice, suggérant ainsi leur importance dans la régulation inter-compartimentale du striatum (Figure 17 ; Crittenden et al., 2017). De plus, Salinas et al. (2016) ont montré qu'il n'y avait pas de différence de modulation dopaminergique entre les compartiments médiée par les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine (nAChRs), suggérant donc que les CINs régulent la transmission DAergique de manière similaire à travers les différents compartiments (Brimblecombe et Cragg, 2017).

L'hétérogénéité des populations neuronales du striatum permet ainsi une intégration et un traitement des informations sensori-motrices en provenance des afférences corticales notamment grâce à la diversité phénotypique intrinsèque de chaque type d'interneurone GABAergiques et cholinergiques. Ces interneurons, par leurs caractéristiques anatomiques, morphologiques, histochimiques et électrophysiologiques, influencent la réponse relayée par les MSN vers les structures de sortie des GB. Ils agissent soit directement sur les MSN, soit en modulant les interneurons GABAergiques, facilitant ainsi l'exécution des réponses comportementales (Assous et Tepper, 2019). En particulier, le NAc est une région fascinante de par la diversité des comportements qu'il régule.

### 3.2. Diversité des comportements liés NAc : aperçu de la richesse des fonctions de cette région cérébrale

La structure complexe du striatum occupe une position centrale dans le traitement de l'information, comme nous l'avons exploré précédemment sur le plan anatomique et fonctionnel. Cela se traduit par son implication dans une variété de comportements. En particulier, le noyau accumbens, en raison de ses caractéristiques anatomiques, agit comme une interface entre les régions limbiques et motrices. Il présente ainsi une importance significative dans les comportements liés à la motivation, la récompense, l'aversion, ainsi que dans les processus d'apprentissage et de mémoire (Mogenson et al., 1980 ; Volkow et al., 2017).

#### 3.2.1. Rôle du NAc dans l'apprentissage et la prise de décision

Le noyau accumbens (NAc) occupe une position centrale dans le circuit de la récompense et la prise de décision, étroitement liés à l'apprentissage associatif. Ce type d'apprentissage implique l'association entre un stimulus neutre de l'environnement et une valeur émotionnelle saillante, qu'elle soit appétitive ou aversive. Cette association permet de guider la réponse comportementale motivée, en favorisant l'approche des récompenses et l'évitement des situations aversives, ce qui est essentiel pour notre survie.

Le NAc est impliqué dans une variété de comportements associés à la recherche de la récompense, tels que la recherche de nourriture, l'usage de drogues ou encore les interactions sociales. Ces comportements découlent d'apprentissages de types pavloviens, contextuels ou opérants, dans lesquels le NAc joue un rôle central, notamment grâce à l'implication du système dopaminergique dans le renforcement positif (Saunders et al., 2018 ; Tsai et al., 2009 ; Parker et al., 2016).

La théorie classique de l'apprentissage associatif postule que la dopamine agit comme un signal d'apprentissage, contribuant au renforcement des associations conditionnées (Keiflin et Janak, 2015 ; Schultz et Dickinson, 2000; Hart et al., 2024). Plus spécifiquement, la dopamine encode un signal d'erreur de prédiction de la récompense (RPE), reflétant la différence entre la récompense prédite et celle reçue (Schultz, 1998 ; Dayan et Balleine, 2002). Des enregistrements électrophysiologiques et des manipulations optogénétiques chez des animaux vigiles ont révélé une augmentation de l'activité phasique des fibres dopaminergiques de la VTA suite à la présentation de stimuli appétitifs non prédits mais également de stimuli

prédictifs de la récompense, tandis que les stimuli attendus ne changent pas leur activité (Mirenowicz et Schultz, 1994 ; Pan et al., 2005 ; Cohen et al., 2012). De plus, l'absence de récompense préalablement prédite induit une diminution de leur activité (Schultz et al., 1993).

En particulier, le circuit des neurones de projection de la VTA vers le NAc (VTA-NAc) a été associé à la consommation conditionnée de nourriture appétitive (Parker et al., 2016 ; Day et al., 2007 ; Saunders et al., 2018). Par exemple, Parker et al. (2016) ont observé, lors d'une tâche de conditionnement opérant probabilistique, une activation préférentielle de ce circuit lors de la consommation de nourriture appétitive et lors de la présentation d'un stimulus prédictif de la récompense. Ce circuit dopaminergique est essentiel pour cet apprentissage, comme le montre l'absence d'apprentissage en cas d'inhibition de ce circuit. De plus, la dopamine provenant de la VTA semble suffire pour induire un nouvel apprentissage et moduler le comportement (Pascoli et al., 2015 ; Witten et al., 2011). De ce fait, la dopamine est traditionnellement considérée comme un signal de récompense, mais des études récentes suggèrent que son signal peut également encoder l'aversion, à travers une diminution de la libération de DA ou une diminution de l'activité des neurones DAergiques dans le NAc (Oleson et al., 2012 ; Matsumoto et Hikosaka, 2009). Cependant, la modulation de ce signal suite à un stimulus aversif dépend de la région du NAc vers laquelle la VTA projette. En particulier, tandis que l'activité des fibres DAergiques en provenance de la VTA est augmentée dans la partie ventro-médiale du NAc shell, elle est inhibée dans les parties dorso-médiale et latérale du NAc shell en réponse à des chocs électriques ou de stimuli qui les prédisent (de Jong et al., 2019).

Très récemment, des chercheurs ont également montré que la DA n'agit pas comme une récompense puisque l'activation seule des neurones DAergiques de la VTA en guise de récompense ne parvient pas à reproduire comportementalement les effets de renforcement d'une récompense (Blanco-Pozo et al., 2024). Bien que la transmission DAergique de la VTA soit suffisante pour induire un apprentissage par renforcement, cela ne découle pas du fait que la DA agit intrinsèquement comme une récompense en soi. De plus, la théorie de la dopamine comme signal RPE est en partie remise en question par des découvertes montrant que certaines projections dopaminergiques de la VTA ne signalent pas de RPE (Parker et al., 2016 ; de Jong et al., 2024). Par exemple, de Jong et al. (2024) ont montré à l'aide d'enregistrements par sonde Neuropixels qu'une sous-population de neurones DAergiques de la VTA projetant dans le NAc médian ne signalait pas de RPE, contrairement à ceux du NAc latéral. A l'inverse, ces neurones présentent une activité continue entre le stimulus et la

récompense, codant ainsi une valeur d'état. Cette différence d'activité a été confirmée par photométrie de fibre couplée à un capteur dopaminergique (D-light) dans une tâche basée sur une récompense probabiliste, où le signal DAergique varie en fonction de l'anticipation de la récompense. Ainsi, ces données récentes mettent en avant la diversité et la complexité du rôle des signaux dopaminergiques dans le NAc dans l'apprentissage et la récompense.

Une exploration plus fine des sous-populations neuronales du NAc impliquées dans ces processus d'apprentissage, notamment en ciblant spécifiquement les MSN-D1R ou MSN-D2R à l'aide de virus conditionnels et de marqueurs spécifiques, a mis en évidence des variations dans l'intégration du signal (Zachry et al., 2024). Ces auteurs ont montré que les MSN-D1R et -D2R réagissent aux stimuli indépendamment de leur valence émotionnelle, mais que seuls les MSN-D2R suivent un signal de prédiction nécessaire à l'apprentissage, contrairement aux MSN-D1R.

Plusieurs études suggèrent un rôle conjoint de la transmission DAergique et de la transmission cholinergique dans l'apprentissage associatif (Cragg, 2006 ; Krok et al., 2023 ; Chantranupong et al., 2023). En effet, les CINs sont reconnus pour signaler la saillance des stimuli, dû à leur activation par des événements saillants et prédictifs de la récompense (Aosaki et al., 1994 ; Ravel et al., 2003 ; Morris et al., 2004 ; Picciotto et al., 2012). Leur activité suite à un stimulus se caractérise par une montée rapide suivie d'une pause. Bien que le rôle de cette pause dans l'apprentissage soit encore en cours d'investigation, plusieurs études ont mis en lumière la contribution modulatrice des CINs dans ce processus (Belilos et al., 2023 ; Lee et al., 2016 ; Picciotto et al., 2012). Par exemple, Lee et al. (2016) ont observé que l'activation des CINs après un conditionnement de préférence de place induit par la cocaïne favorisait l'apprentissage d'extinction. A l'inverse, leur inhibition par modulation optogénétique entravait cet apprentissage. Toutefois, de manière surprenante, la modulation optogénétique bidirectionnelle n'a pas immédiatement affecté le comportement de conditionnement, suggérant que, contrairement à la dopamine, les CINs n'agissent pas directement comme des signaux de renforcement de l'apprentissage, mais plutôt comme des modulateurs influençant son efficacité. La libération d'ACh est en effet augmentée suite à un choc électrique et son augmentation est proportionnelle à l'intensité du stimulus aversif (Belilos et al., 2023). Ces résultats s'alignent avec la littérature montrant que les CINs présentent des réponses similaires de pause aux stimuli appétitifs et aversifs, ne fournissant pas d'indication sur la direction de l'apprentissage, mais seulement sur son importance (Ravel et al., 2003).

Des études ont également souligné l'importance des projections glutamatergiques vers le NAc dans les comportements de recherche de récompense, en particulier dans le contexte de l'interaction sociale. Par exemple, Murugan et al. (2017) ont identifié un circuit reliant les neurones de projection du cortex prélimbique au NAc (PL-NAc) qui joue un rôle dans la formation d'associations sociales (appétitives) et spatiales. À l'aide de virus conditionnels rétrogrades et de manipulations optogénétiques *in vivo*, ils ont démontré que certains de ces neurones ne répondaient qu'à la localisation de la souris expérimentale ou au stimulus social (congénère), témoignant ainsi de leur spécificité fonctionnelle. Dans un test de préférence de place conditionnée socialement, ils ont montré que les neurones PL-NAc intégraient à la fois des informations spatiales et sociales pour former des associations socio-spatiales impliquées dans l'apprentissage social.

En résumé, le NAc joue un rôle central dans l'apprentissage et le renforcement positif au travers d'un réseau complexe. De manière simplifiée, ce réseau implique les projections dopaminergiques de la VTA pour signaler la valence émotionnelle (appétitive ou aversive) et la prédiction des stimuli, ainsi que les interneurones cholinergiques pour coder la saillance des stimuli. Les comportements motivationnels et d'apprentissages influencent un large éventail de nos actions, et leurs dysfonctionnements sont associés à diverses pathologies neurologiques telles que la maladie de Parkinson et la maladie de Huntington, ainsi qu'à de nombreux troubles psychiatriques tels que la dépression, l'addiction, les troubles de l'attention et les troubles compulsifs (Salamone et al., 2015). Comprendre et traiter ces comportements inadaptés nécessite donc une étude approfondie des mécanismes neuronaux sous-jacents.

### *3.2.2. Le NAc et la régulation du sommeil*

Les troubles du sommeil, fréquemment observés dans les troubles psychiatriques et neurologiques associés à des dysfonctionnements du NAc, soulignent l'importance de cette région cérébrale dans la régulation du sommeil (Russo et Nestler, 2013 ; Lazarus et al., 2012). Chez l'humain, des dysfonctionnements du NAc sont également associés à des troubles du sommeil, tels que l'insomnie (Shao et al., 2020). Des observations similaires ont été faites chez la souris, où des lésions du NAc sont associées à une augmentation de l'éveil (Qiu et al., 2012).

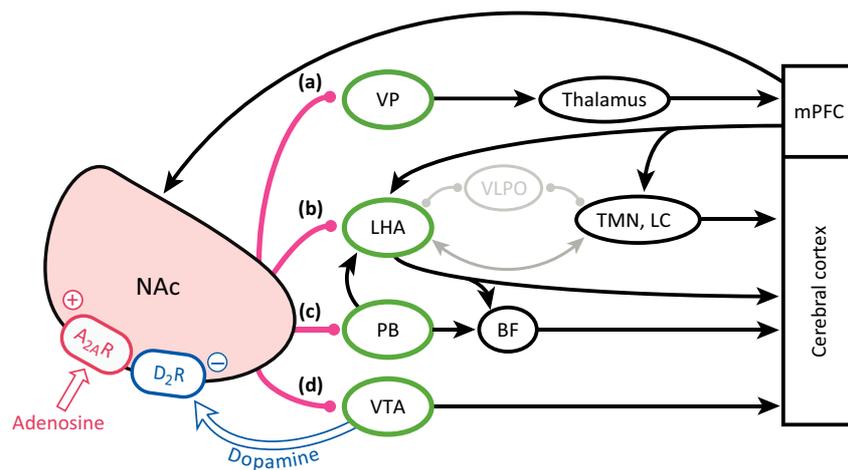
Des recherches ont initialement identifié le rôle de la transmission dopaminergique provenant de la VTA dans la régulation des états veille-sommeil, en particulier dans la promotion de l'éveil (Léna et al., 2005 ; Eban-Rothschild et al., 2016 ; Toth et al., 2023). En

effet, l'inhibition chémogénétique de ces neurones est associée à une diminution de l'éveil et à une augmentation de la durée des épisodes de sommeil lent ainsi que du nombre de phases de sommeil paradoxal (SP) (Eban-Rothschild et al., 2016). Afin d'approfondir le lien causal entre les neurones de la VTA et l'éveil, les auteurs ont effectué des manipulations optogénétiques dans la VTA et ses régions cibles. Les résultats suggèrent que l'activation optogénétique aiguë des neurones dopaminergiques de la VTA pendant le sommeil lent (SL) facilite la transition vers l'éveil, en particulier *via* ses projections dans le NAc, le DLS, et la CeA. En revanche, seule l'activation optogénétique semi-chronique de la voie VTA-NAc a induit un état d'éveil au détriment du SL et du SP, mettant en évidence un rôle prédominant du NAc dans la promotion de l'éveil. En lien avec ces constatations, il a été observé que des taux plus élevés de dopamine dans le NAc sont associés à l'état d'éveil par rapport au sommeil lent, comme démontré *in vivo* par des enregistrements par microdialyse ou photométrie de fibre utilisant le senseur fluorescent de la dopamine dLight1.1 (Léna et al., 2005 ; Toth et al., 2023). Par ailleurs, on retrouve également des taux plus élevés de DA dans le NAc (core et shell) pendant le SP que dans les autres états (Toth et al., 2023).

L'utilisation de récepteurs artificiels activés par ligand de synthèse (DREADDs), exprimés de manière sélective dans les MSN-D1R ou -D2R, a permis d'affiner le rôle du NAc dans la régulation des états veille-sommeil, révélant des différences dans l'activité de ces neurones dans la modulation du sommeil. Une étude menée par Luo et al. (2018) a mis en évidence, grâce à l'enregistrement des MSN-D1R par photométrie de fibre couplé à des enregistrements EEG et EMG, une corrélation entre les états veille-sommeil et l'activité de ces neurones. Leurs résultats ont montré une augmentation de l'activité des MSN-D1R pendant les phases d'éveil et de SP. L'activation chémogénétique par injection du ligand clozapine-N-oxyde (CNO) des MSN-D1R dans le NAc prolonge les périodes d'éveil, indépendamment du cycle jour-nuit. De plus, leur activation optogénétique facilite la transition du SL vers l'éveil. Ces observations démontrent ainsi une association entre l'activation de la voie des MSN-D1R et l'éveil. De plus, une autre étude a également montré que l'activation chémogénétique des MSN-D1R est associée à une diminution du SP, tandis que leur inhibition est liée à une augmentation du SP, soutenant ainsi le rôle des MSN-D1R dans le sommeil paradoxal (McCullough et al., 2021). En revanche, ces auteurs n'ont pas observé directement d'effet de l'activation de ces neurones sur l'éveil, ni sur le SL.

Contrairement à la voie des MSN-D1R, la voie des MSN-D2R a plutôt été associée au sommeil (Figure 21). En effet, en ciblant spécifiquement les neurones qui expriment le

récepteur A<sub>2a</sub> (A<sub>2a</sub>R), correspondant aux neurones MSN-D<sub>2</sub>R, Oishi et al. (2017) ont montré que leur activation chémo génétique dans le NAc augmente les quantités de SL. Ces résultats ont été corroborés par McCullough et al. (2021) chez des souris exprimant la Cre sous le promoteur du récepteur D<sub>2</sub>, ciblant plus spécifiquement les MSN-D<sub>2</sub>R, où l'activation chémo génétique des MSN-D<sub>2</sub>R est associée à une augmentation du SL ainsi qu'à une diminution de l'éveil. De plus, des modulations optogénétiques, ont révélé que le SL était rapidement induit par l'activation des MSN-D<sub>2</sub>R. Afin de déterminer les voies neuronales impliquées dans cette induction de SL, Oishi et al. (2017) ont stimulé différentes régions cibles des MSN-D<sub>2</sub>R, notamment la VTA et le VP. Ils ont constaté que la stimulation optogénétique des MSN-D<sub>2</sub>R projetant spécifiquement vers le VP, et non vers la VTA, entraînait une augmentation du SL. Ces résultats suggèrent que l'effet inducteur de sommeil lent par les neurones MSN-D<sub>2</sub>R est principalement favorisé par la voie NAc-VP. De plus, ces effets ont été observés spécifiquement dans le NAc *core* et non dans le *shell*.



**Figure 21. Schématisation de la régulation des états veille-sommeil par le NAc.**

L'activation par les récepteurs A<sub>2a</sub>R des projections inhibitrices du NAc vers le VP, LHA, PB et VTA participent à l'éveil. A l'inverse, l'inhibition du NAc par les récepteurs D<sub>2</sub>R inhibe le système d'éveil. A<sub>2a</sub>R : récepteurs d'adénosine A<sub>2a</sub> ; D<sub>2</sub>R : récepteurs dopaminergiques D<sub>2</sub> ; NAc : noyau accumbens ; VP : pallidum ventral ; LHA ; hypothalamus latéral ; PB : noyau parabrachial ; VTA : aire tegmentale ventrale ; BF : prosencéphale basal ; VLPO : aire optique préventrale ; TMN : noyau hypothalamique tubéromammillaire ; LC : locus coeruleus ; mPFC : cortex préfrontal médial. Lazarus et al. (2012).

Alors que la recherche sur le rôle du NAc dans la régulation du sommeil est toujours en cours, plusieurs résultats robustes suggèrent son implication dans l'induction de l'éveil ou du

sommeil. Notamment, il semble que la voie des MSN-D1R soit principalement associée à l'éveil, tandis que la voie des MSN-D2R est plutôt liée au sommeil. La présence de troubles du sommeil dans diverses maladies psychiatriques souligne l'importance d'explorer les mécanismes du NAc dans le sommeil en interaction avec ces pathologies.

### 3.2.3. *Le NAc et la susceptibilité au stress : de l'anxiété à la dépression*

De nombreuses études se sont intéressées au rôle du NAc dans les troubles de l'humeur dont la dépression et l'anxiété, en mettant en évidence l'importance de la voie mésolimbique (de la VTA vers le NAc) en particulier dans des modèles de dépression induite par un stress chronique.

Notamment, la susceptibilité au stress et les symptômes anxio-dépressifs ont été étudiés à travers le modèle de CSDS. Ces études ont souligné la fonction essentielle des projections de la VTA vers le NAc dans l'apparition des symptômes dépressifs, lesquels peuvent être atténués par un traitement chronique aux antidépresseurs (Berton et al., 2006 ; Krishnan et al., 2007 ; Cao et al., 2010). Plus précisément, la susceptibilité au stress est corrélée à une augmentation de l'activité phasique de ces neurones. Des enregistrements *ex vivo* et *in vivo* ont révélé une augmentation de la fréquence de libération par bouffées (*bursts*), ainsi qu'une augmentation du nombre d'impulsions (*spikes*) par bouffée après un stress chronique de défaite sociale (Krishnan et al., 2007 ; Cao et al., 2010 ; Barik et al., 2013). En outre, une modulation bidirectionnelle des neurones VTA-NAc a été réalisée grâce à des techniques d'injection de virus rétrogrades dans le NAc et d'expression de la channelrhodopsine dans la VTA. L'activation phasique par optogénétique de la voie mésolimbique pendant le CSDS induit un phénotype de susceptibilité, caractérisé par une diminution de l'interaction sociale et une anhédonie, tandis que son inhibition favorise la résilience (Chaudhury et al., 2013).

De façon étonnante, cette modulation de l'activité dopaminergique n'a aucun effet sur les comportements de type anxieux, suggérant des mécanismes neuronaux distincts entre la susceptibilité et les comportements de type anxieux (Krishnan et al., 2007 ; Chaudhury et al., 2013). Ces données mettent donc en avant la contextualité de cette adaptation comportementale d'anxiété par rapport au type de stress. Ces résultats sont en accord avec d'autres études utilisant d'autres modèles de stress. Par exemple, dans le stress chronique modéré (CMS), la stimulation phasique des neurones VTA-NAc promeut la résilience en inversant le phénotype dépressif (Tye et al., 2013 ; Tanaka et al., 2012). De plus, les

comportements de type anxieux qui ne sont pas liés à la susceptibilité déterminée par l'évitement social dans le CSDS, peuvent être influencés par d'autres formes de stress telles que le stress émotionnel chronique (CES), impliquant également le NAc. En effet, l'inhibition des projections du NAc vers la VTA induit des comportements de type anxieux, tandis que leur activation chronique au moment du stress inverse ce phénotype (Qi et al., 2022). De plus, l'étude des réponses comportementales pendant le stress de défaite sociale combinée à l'enregistrement de l'activité calcique des neurones VTA-NAc par photométrie de fibre a permis d'associer la susceptibilité au stress au contexte de l'activité dopaminergique dans le NAc pendant la période de confrontation entre la souris expérimentale et son agresseur CD1. Ainsi, la stimulation des neurones VTA-NAc pendant un comportement de riposte envers l'agresseur induit un phénotype résilient, tandis que leur stimulation durant un comportement d'évitement actif (par échappement) ou passif (par séparation post-attaque) est plutôt associée à un phénotype de susceptibilité (Willmore et al., 2022).

Les recherches récentes ont identifié le rôle des différentes sous-populations cellulaires du NAc dans la susceptibilité au stress (Francis et al., 2015 ; Muir et al., 2018). Chez les souris susceptibles, le stress de défaite sociale induit des effets opposés dans les deux sous-types de MSN, avec une diminution de la fréquence d'excitation pré-synaptique dans les MSN-D1R accompagné de son augmentation dans les MSN-D2R (Francis et al., 2015). La susceptibilité au stress est ainsi bi-directionnellement modulée par les MSN-D1R, dont l'activation optogénétique induit un phénotype résilient tandis que leur inhibition conduit à un phénotype susceptible (Francis et al., 2015). De plus, une étude utilisant la photométrie de fibre pour enregistrer l'activité des MSN-D1R et MSN-D2R a montré que le profil d'activité de ces neurones pouvait être prédictif de la susceptibilité au stress (Muir et al., 2018). Avant l'exposition à un stress chronique de défaite sociale, l'amplitude des transients des MSN-D1R est réduite chez les souris futures susceptibles, tandis qu'elle ne change pas chez les souris futures résilientes. Cette différence suggère un possible marqueur neuronal prédictif de la susceptibilité au stress. Ces résultats indiquent une modulation différentielle des MSN, ce qui pourrait être expliqué par les différentes cibles de projection des MSN-D1R, projetant principalement vers la VTA, par opposition aux MSN-D2 qui projettent principalement vers le pallidum ventral (Smith et al., 2013). Ces observations appuient l'idée d'une neuro-adaptation différentielle dépendante des sous-populations neuronales du NAc et des voies impliquées dans la réponse au stress.

Notamment, alors que le rôle des CINs dans la régulation de l'activité du NAc est bien établi, leur implication dans la réponse au stress a moins été étudiée. Seules quelques études ont démontré l'implication des CINs dans la susceptibilité au stress (Warner-Schmidt et al., 2012 ; Cheng et al., 2019). Par exemple, une diminution de l'activité des CINs dans le NAc shell a été observée chez les souris susceptibles suite à un stress de défaite sociale, mais pas chez les souris résilientes (Cheng et al., 2019). Cette étude a également montré un contrôle bidirectionnel de l'activité des CINs dans la susceptibilité au stress. L'inhibition chimogénétique de ces neurones lors d'une défaite sociale aiguë entraîne un phénotype de susceptibilité, caractérisé par une diminution de l'interaction sociale et de la préférence pour le sucrose. À l'inverse, une activation chronique des CINs conduit à une inversion de ces phénotypes, suggérant un rôle dynamique de ces neurones dans la réponse au stress. Ces résultats concordent avec d'autres études démontrant que la destruction sélective des CINs, réalisée par expression de t-toxines, induit des comportements dépressifs tels que l'anhédonie (Warner-Schmidt et al., 2012).

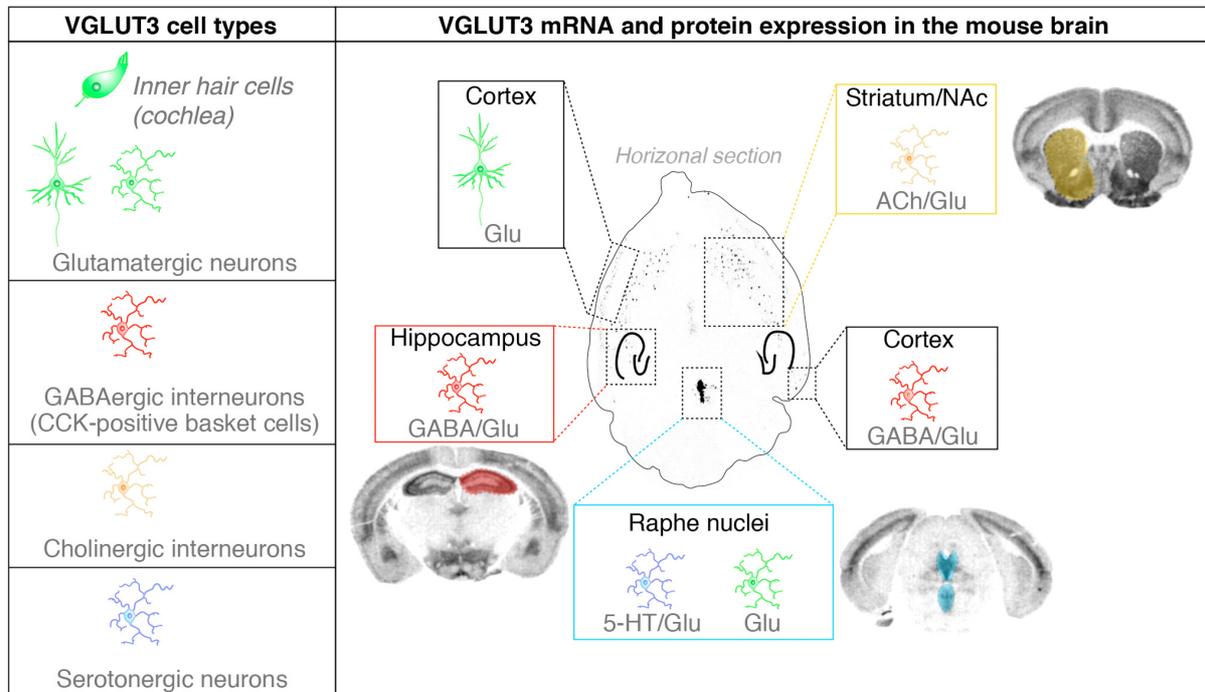
Bien que peu nombreuses, ces données mettent en évidence l'importance des CINs, et par conséquent, l'importance de la transmission cholinergique dans les comportements de susceptibilité au stress. Cependant, il est important de noter que la neurotransmission des CINs ne se limite pas à l'acétylcholine, car ceux-ci co-libèrent également du glutamate grâce au transporteur vésiculaire de glutamate de type 3 (VGLUT3 ; Gras et al., 2008). Ainsi, les méthodes de neuromodulation utilisées dans les études réalisées sur les CINs affectent également la transmission glutamatergique des CINs, et soulignent le rôle potentiel de VGLUT3 dans les comportements associés à la susceptibilité au stress.

### **3.3. VGLUT3: un acteur clé dans le développement des troubles psychiatriques**

#### *3.3.1. Distribution anatomique et synergie vésiculaire de VGLUT3*

Les transporteurs vésiculaires de glutamate (VGLUTs) permettent l'accumulation de glutamate dans les vésicules synaptiques, participant ainsi à la neurotransmission glutamatergique (pour revue, voir El Mestikawy et al., 2011). Trois isoformes de VGLUTs ont été identifiées. Parmi eux, VGLUT1 et VGLUT2 se distinguent par leur profil d'expression prédominant dans les régions corticales et sous-corticales respectivement, principalement, mais pas strictement, associée aux neurones glutamatergiques (Ni et al., 1995 ; Frémeau et al., 2001 ; Herzog et al., 2001). À l'inverse, l'expression de VGLUT3 est plus restreinte. Sa forme

protéique et son ARNm sont retrouvés dans diverses populations de neurones, à la fois corticales et sous-corticales (Figure 22). Par ailleurs, il est également retrouvé dans la moelle épinière et dans le système nerveux périphérique, notamment dans les cellules amacrines de la rétine, les cellules ciliées de la cochlée, ainsi que dans le foie et le rein (Cheng et al., 2017 ; Lee et al., 2014 ; Ruel et al., 2008 ; Gras et al., 2002 ; Frémeau et al., 2001).



**Figure 22. Distribution des ARNm et de la forme protéique du transporteur vésiculaire de glutamate 3 (VGLUT3).**

Glu : glutamate ; ACh : acétylcholine ; GABA : acide gamma-aminobutyrique ; 5-HT : sérotonine ; CCK : cholécystokinine. *Favier et al. (2021).*

En plus de son expression régionale différentielle, VGLUT3 se démarque également par la nature des neurones au sein desquels il est exprimé. En effet, on le retrouve dans des neurones initialement identifiés comme non-glutamatergiques (Gras et al., 2002 ; Schafer et al., 2002 ; Herzog et al., 2004). Ainsi, il est exprimé des neurones sérotoninergiques du noyau du raphé, et dans des neurones cholinergiques du prosencéphale basale (BF ; Favier et al., 2021). D'autre part, il est également retrouvé au niveau de divers interneurons corticaux et sous-corticaux tels que les interneurons GABAergiques du cortex, de l'hippocampe, et de la BLA, ainsi que les interneurons cholinergiques du striatum (Gras et al., 2002 ; Gras et al., 2008 ; Hioki et al., 2010 ; Somogyi et al., 2004 ; Omiya et al., 2015 ; Fasano et al., 2017). Ainsi,

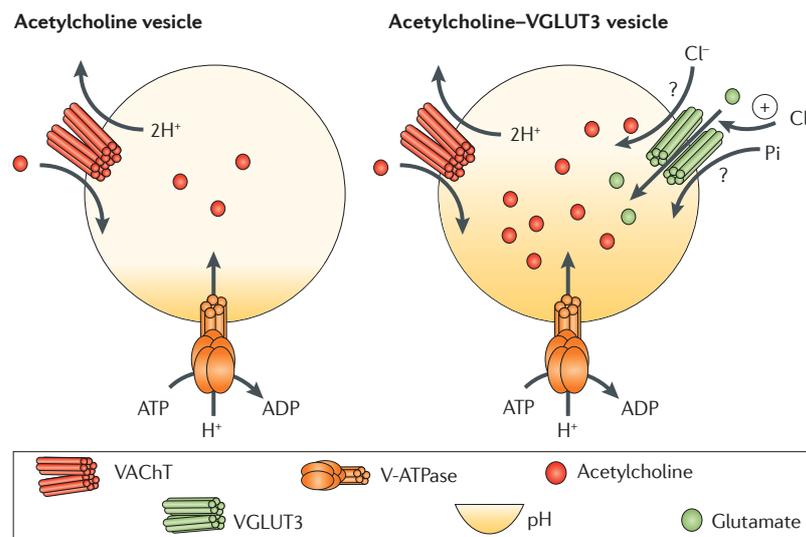
la présence de VGLUT3 est remarquée dans de nombreuses structures impliquées dans les comportements émotionnels.

L'expression atypique de VGLUT3 dans des neurones non-glutamatergiques souligne son rôle potentiel dans la régulation de la neurotransmission de ces neurones, notamment à travers sa co-libération. Des études ont révélé la co-expression de VGLUT3 avec d'autres transporteurs vésiculaires de neurotransmetteurs, comme le transporteur vésiculaire de l'acétylcholine (VACHT) dans les CINs ou le transporteur vésiculaire des monoamines 2 (VMAT2) dans les neurones sérotoninergiques du raphé ou de l'hippocampe (Gras et al., 2008 ; Amilhon et al., 2010 ; Shutoh et al., 2008). Cette co-expression suggère une libération simultanée de glutamate et d'ACh/5-HT dans ces différentes populations neuronales. Par exemple, plusieurs études ont démontré par activation optogénétique la co-transmission de glutamate et de 5-HT dans l'amygdale basale, la VTA et le NAc (Sengupta et al., 2017 ; Liu et al., 2014). De plus, il a été montré que la photo-activation des CINs induit des courants glutamatergiques (Higley et al., 2011). D'autre part, l'inactivation du gène codant VGLUT3 (VGLUT3<sup>-/-</sup>), entraîne une diminution de l'accumulation vésiculaire d'ACh et de 5-HT radiomarquées, ainsi qu'une diminution des courants glutamatergiques et cholinergiques après photo-activation, suggérant que VGLUT3 potentialise l'accumulation vésiculaire de ces neurotransmetteurs et renforce ainsi leur transmission, un phénomène connu sous le nom de « synergie vésiculaire » (Gras et al., 2008, Nelson et al., 2014 ; Amilhon et al., 2010).

La synergie vésiculaire désigne l'augmentation de l'accumulation vésiculaire et de la taille du quantum de libération à la fois pour le glutamate et son co-neurotransmetteur (co-NT) (Gras et al., 2008 ; Amilhon et al., 2010). Plusieurs hypothèses ont été avancées afin d'expliquer ce phénomène. El Mestikawy et al. (2011) ont proposé que la synergie vésiculaire repose sur des modifications des propriétés électrochimiques des membranes des vésicules suite à l'entrée de glutamate. Cette hypothèse suggère que l'apport de charges négatives par le glutamate, en acidifiant la vésicule, augmente le gradient de pH ( $\mu\text{H}^+$ ) dans ces membranes, dépendant de la pompe à protons vacuolaire (V-ATPase). Cette augmentation du  $\mu\text{H}^+$  rallongerait le temps d'accumulation vésiculaire des co-NT, entraînant ainsi une augmentation de leur accumulation vésiculaire (Figure 23).

La question de savoir si cette co-transmission résulte d'une libération simultanée des deux NT au sein de la même vésicule ou bien d'une libération différentielle par des populations vésiculaires distinctes reste ouverte. En effet, plusieurs études ont montré par activation

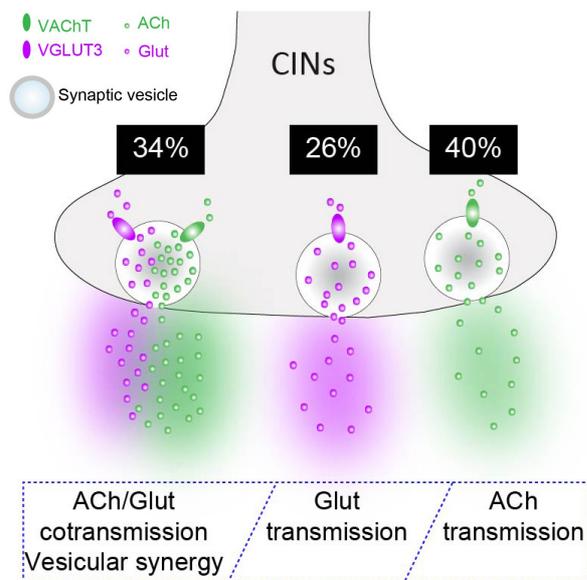
optogénétique que les CINs pouvaient libérer soit uniquement du glutamate, soit uniquement de l'ACh (Ren et al., 2011). Récemment, une étude de la distribution des transporteurs vésiculaires VACHT et VGLUT3 dans les vésicules isolées du striatum par microscopie à super-résolution couplée à des ligands fluorescents a montré une distribution mixte (Cristofari et al., 2022). Environ 34% de vésicules contenaient à la fois VACHT et VGLUT3, 40% contenaient uniquement VACHT et 26% contenaient uniquement VGLUT3 (Figure 24). Cette répartition suggère qu'une libération simultanée pourrait avoir lieu, ce qui renforce la théorie de la synergie vésiculaire.



**Figure 23. Représentation des mécanismes moléculaires de la synergie vésiculaire.**

VACHT : transporteur vésiculaire de l'acétylcholine ; VGLUT3 : transporteur vésiculaire du glutamate ; V-ATPase : pompe à protons vacuolaire. *El Mestikawy et al. (2011).*

La présence de VGLUT3 dans les régions impliquées dans diverses fonctions cognitives et émotionnelles, ainsi que son rôle dans la co-transmission, confèrent à VGLUT3 une importance capitale dans la régulation de nombreux processus émotionnels, et dans les dysfonctionnements associés.



**Figure 24. Représentation du modèle hypothétique de distribution et de proportions de VACHT et VGLUT3 au sein des interneurons cholinergiques.**

CINs : interneurons cholinergiques ; VACHT : transporteur vésiculaire d'acétylcholine ; VGLUT3 : transporteur vésiculaire de glutamate 3 ; ACh : acétylcholine ; Glut : glutamate. *Adapté de Cristofari et al. (2022).*

### 3.3.2. Implication de VGLUT3 dans le développement des troubles psychiatriques

Plusieurs études ont mis en évidence le rôle de VGLUT3 dans les troubles associés aux comportements motivationnels (Sakae et al., 2015 ; Qi et al., 2014 ; Wang et al., 2019). Par exemple, l'absence de VGLUT3 dans un modèle murin (VGLUT3<sup>-/-</sup>) a été associée à un renforcement des comportements addictifs dans un protocole d'auto-administration de cocaïne (Sakae et al., 2015). Dans le NAc, la libération de glutamate dépendante de VGLUT3 par les CINs induit une diminution de la transmission dopaminergique en agissant sur les récepteurs métabotropiques (mGluRs), régulant ainsi négativement les propriétés renforçantes de la cocaïne. De plus, la modulation de l'apprentissage associatif par VGLUT3 ne s'effectue pas seulement par les CINs, mais aussi par les fibres VGLUT3/5-HT. En effet, l'activation optogénétique dans la VTA des fibres VGLUT3/5-HT provenant du raphé dorsal augmente la libération de DA dans le NAc, renforçant ainsi l'apprentissage induit par une récompense dans le conditionnement de préférence de place (Qi et al., 2014 ; Wang et al., 2019).

VGLUT3 est également impliqué dans les troubles de peur et de l'anxiété. Les souris invalidées pour le gène codant VGLUT3 présentent des comportements de type anxieux, tels qu'une réduction du temps passé dans les bras ouverts du labyrinthe en croix surélevé, ainsi que des comportements de stéréotypie (Amilhon et al., 2010 ; Balázsfi et al., 2018). Les auteurs ont montré que VGLUT3 modulait la transmission sérotoninergique dans l'hippocampe, et ont suggéré l'hypothèse d'un lien potentiel entre cette transmission et les comportements d'anxiété observés. De plus, VGLUT3 a été impliqué dans la mémoire aversive et la généralisation de la peur. Les souris VGLUT3<sup>-/-</sup> soumises à un paradigme de peur

conditionnée à un contexte par chocs électriques présentent des taux d'immobilité plus élevés, une mémoire contextuelle accrue ainsi qu'une peur généralisée à différents contextes (de Almeida et al., 2023 ; Balázsfi et al., 2018).

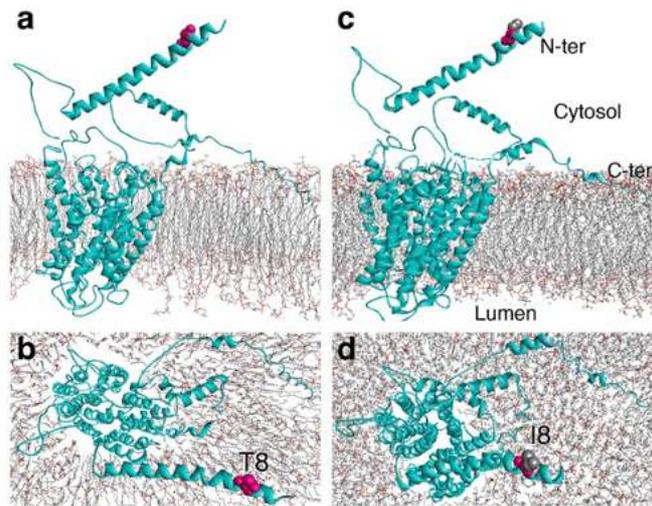
Enfin, plusieurs études ont établi un lien entre VGLUT3 et la réponse au stress, dont le dysfonctionnement conduit au développement de troubles psychiatriques associés à ce stress. Dans la VTA, l'inhibition chronique par optogénétique des fibres VGLUT3/5-HT provenant du DRN chez des souris résilientes après un stress de défaite sociale induit un phénotype de susceptibilité (Zou et al., 2020). De plus, dans le DRN, l'étude quantitative des neurones VGLUT3-positifs exprimant la protéine c-Fos comme marqueur de leur activité, a révélé leur activation après un stress de défaite sociale aiguë, soulignant ainsi leur implication dans la réponse au stress (Henderson et al., Annexe 1). De manière surprenante, la suppression conditionnelle de VGLUT3 dans ces neurones affecte également la réponse adaptative au stress des états veille-sommeil. Ainsi, l'éveil induit par le stress, puis l'augmentation du sommeil qui s'ensuit sont atténués en l'absence de VGLUT3 dans le raphé dorsal.

Ces recherches ont ainsi mis en lumière l'importance du rôle de VGLUT3 dans divers comportements pathologiques liés à la récompense, à l'apprentissage et à la mémoire, à l'humeur, ainsi qu'au sommeil, offrant ainsi de nouvelles perspectives thérapeutiques ciblant VGLUT3.

### *3.3.3. VGLUT3-p.T8I : enjeux translationnels de ce variant allélique*

En raison de son implication dans l'addiction évaluée par un protocole d'auto-administration de cocaïne, et en particulier dans la rechute, une étude s'est intéressée au rôle des variations alléliques du gène codant VGLUT3 (*SLC17A8*) dans l'addiction chez l'humain (Sakae et al., 2015). Le séquençage du gène *SLC17A8* chez des patients souffrant d'addiction sévère à la cocaïne et/ou aux opiacés a permis d'isoler sept variants alléliques. Parmi eux, le variant p.T8I, caractérisé par la substitution d'une thréonine par une isoleucine en position 8, a été retrouvé à 9 reprises dans cette population et se trouve principalement identifié chez des patients d'origine nord-africaine (Figure 25). L'analyse de la fréquence allélique de ce variant chez des sujets sains d'origine africaine a confirmé sa spécificité ethnique, étant présent dans 1,8% de cette population. Une étude d'association gène-candidat complémentaire portant sur des patients souffrant d'addiction sévère et de troubles du comportement alimentaire (TCA) a révélé que le variant p.T8I était présent chez 1,4% des patients et était associé à des

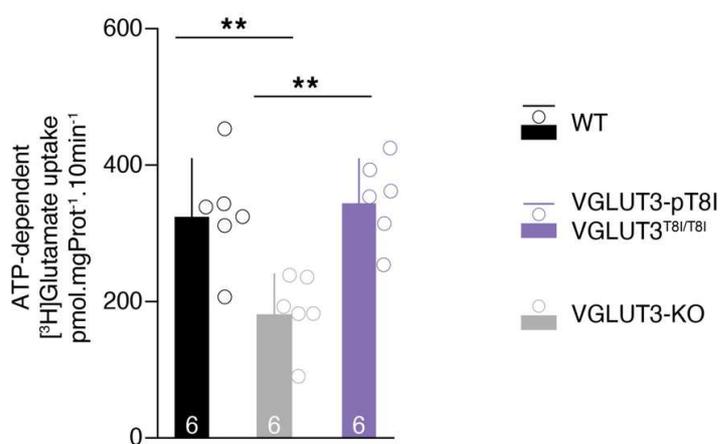
symptômes psychotiques ainsi qu'à une prévalence élevée de dépendance à d'autres substances, telles que l'alcool (Favier et al., 2024).



**Figure 25. Modélisation en 3-dimensions de VGLUT3 (a, b) et VGLUT3-p.T8I (c, d).**

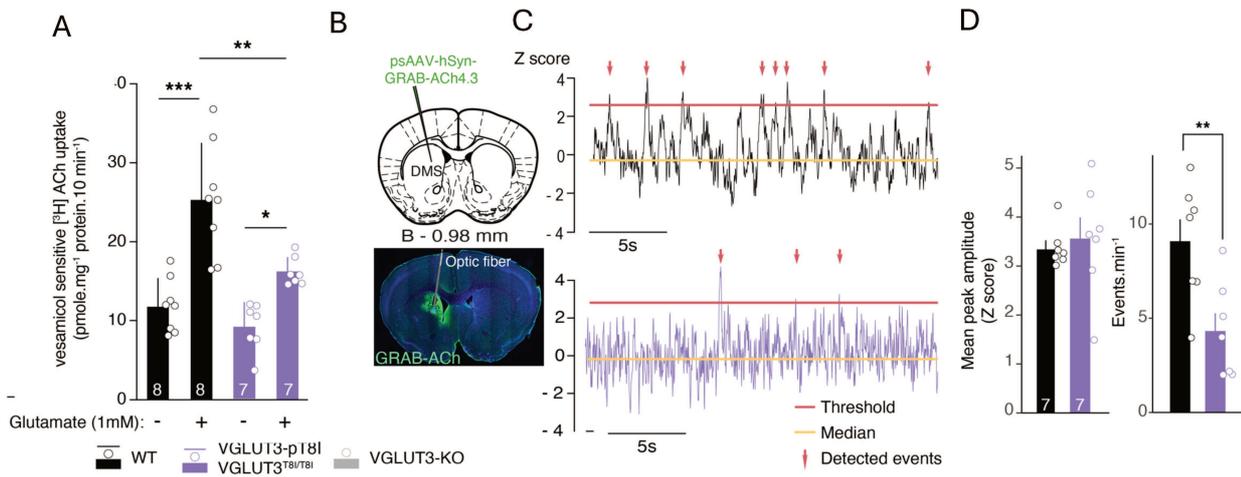
*Favier et al. (2024)*

Afin d'étudier le rôle de ce variant, une lignée de souris a été créée par l'introduction de l'allèle muté p.T8I dans le gène SLC17A8 (souris VGLUT3<sup>T8I/T8I</sup>). Les recherches menées par Favier et al. (2024) ont montré que le variant n'avait aucun impact sur l'expression ni sur la fonction de VGLUT3. En effet, l'analyse de la distribution de VGLUT3 dans le cerveau, effectuée par immunoradioactivité, n'a révélé aucune modification. De plus, l'étude de l'accumulation vésiculaire de glutamate radioactif ( $[^3\text{H}]$ ) sur des vésicules isolées du striatum a montré que le transport du glutamate n'était pas affecté par le variant (Figure 26).



**Figure 26. Le variant p.T8I n'altère pas le transport du glutamate. e**

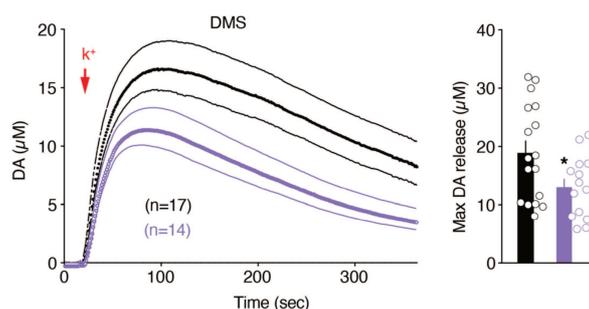
Recapture vésiculaire de glutamate sur vésicules isolées fonctionnelles de striatum. *Favier et al. (2024).*



**Figure 27. Le variant p.T8I altère la libération d'acétylcholine dans le striatum dorsal.**

(A) Recapture vésiculaire d'acétylcholine sur vésicules isolées fonctionnelles de striatum en absence (-) ou présence (+) de glutamate (1mM) ; (B) Injection virale du capteur GRAB-ACh4.3 dans le DMS ; (C) Exemples d'enregistrements par photométrie de fibre ( $\Delta F/F$ ) pour des souris VGLUT3<sup>+/+</sup> (noir) ou VGLUT3<sup>T8I/T8I</sup> (violet) ; (D) Amplitude de pic moyenne et fréquence d'événements spontanés d'acétylcholine. Adapté de Favier et al. (2024).

Cependant, on observe une baisse de l'accumulation vésiculaire d' [<sup>3</sup>H]ACh induite par le variant uniquement en présence de glutamate, suggérant son implication dans la diminution de la synergie vésiculaire (Figure 27A). Ces résultats obtenus *ex vivo* ont été confirmés *in vivo* par des enregistrements de photométrie de fibre couplée au capteur fluorescent de l'ACh (GACH) dans le DMS de souris vigiles à l'état basal, montrant une diminution de la fréquence des transients cholinergiques chez les souris VGLUT3<sup>T8I/T8I</sup> (Figure 27B). Après avoir établi que le variant p.T8I réduit la co-transmission Glut/ACh dans le striatum, l'équipe s'est interrogée sur son effet sur la libération de DA, étant donné que plusieurs études ont montré que la transmission DAergique était régulée par l'ACh *via* les nAChRs (Favier et al., 2020 ; Cachope et al., 2012 ; Threlfell et al., 2012). Ainsi, Favier et al. (2024) ont observé, par voltamétrie *in vivo*, une baisse de la concentration de DA dans le DMS des souris VGLUT3<sup>T8I/T8I</sup> (Figure 28).



**Figure 28. Le variant p.T8I diminue la libération de dopamine (DA) dans le striatum dorsomédial.**

Concentration et valeur maximale de DA mesurée par voltammétrie *in vivo*. Favier et al. (2024).

Du fait des effets biochimiques et neurophysiologiques du variant p.T8I et de leur pertinence dans les comportements motivationnels sains et pathologiques, Favier et al. (2024) ont étudié le comportement compulsif chez les souris VGLUT3<sup>T8I</sup>/T8I. Leurs résultats ont révélé une plus grande propension à développer des troubles du comportement alimentaire illustrés par une consommation excessive de nourriture dans un paradigme de binge eating et une perte de poids accélérée dans un protocole d'anorexie basée sur l'activité. De plus, ces souris présentent une tendance accrue à la rechute dans un modèle d'auto-administration de cocaïne. Ces observations suggèrent une association entre le variant VGLUT3-p.T8I et une susceptibilité importante aux troubles psychiatriques à composante compulsive, soulignant l'importance de l'étude de ce variant dans les différentes comorbidités de ces troubles.

## 4. Objectifs

L'exposition au stress est un facteur de risque reconnu dans le développement de troubles psychiatriques tels que les troubles anxio-dépressifs. En France, la prévalence des troubles anxieux est d'environ 14% sur une période de 12 mois (Alonso et al., 2018). Ces troubles sont souvent associés à des perturbations du sommeil (American Psychiatric Association, 2013). Par exemple, environ 80% des patients atteints de dépression présentent de l'insomnie, cette dernière favorisant également le développement de troubles psychiatriques (Goldschmied et al., 2019 ; Armitage et al., 2007). Face à un événement stressant, tous les individus ne sont pas affectés de la même manière. En effet, chez certains, le stress va induire une réponse émotionnelle altérée qui, lorsque présente de façon chronique, peut conduire à des troubles psychiatriques. A l'inverse, certains individus ont la capacité de surmonter l'adversité et arrivent à maintenir un fonctionnement non pathologique malgré l'expérience stressante (Southwick et al., 2023). Cette résilience est le résultat d'un processus d'adaptation cognitive et comportementale et est influencée à la fois par des facteurs environnementaux mais également génétiques, expliquant la grande variabilité observée entre les individus.

Cette adaptation comportementale est en grande partie médiée par les régulations dopaminergique et cholinergique du striatum, et du noyau accumbens plus particulièrement. De nombreuses études ont mis en évidence le rôle de la dopamine (DA) dans le NAc dans la modulation de la susceptibilité et de la résilience au stress (Chaudhury et al., 2013 ; Willmore et al., 2022). A l'inverse, le rôle de l'ACh au sein du NAc dans la régulation des réponses au stress reste relativement inexploré. Dans le NAc, l'ACh est principalement libérée par les interneurons cholinergiques (CINs) grâce au transporteur vésiculaire d'ACh (VAcHT) et quelques études ont démontré que la susceptibilité au stress était modulée par les CINs (Gras et al., 2008 ; Warner-Schmidt et al., 2012 ; Cheng et al., 2019). Cependant, les CINs ont la capacité de co-libérer l'ACh et le glutamate grâce à la co-expression de VAcHT et du transporteur vésiculaire du glutamate 3 (VGLUT3). De plus, l'accumulation vésiculaire de glutamate potentialise celle de l'ACh (Gras et al., 2008). Ainsi, une meilleure compréhension du rôle des CINs dans la susceptibilité au stress nécessite de distinguer les effets spécifiques de l'ACh et du glutamate.

Récemment, un variant allélique rare (p.T8I) de VGLUT3 a été identifié chez des patients polytoxicomanes et son implication dans divers comportements pathologiques liés à la

compulsion et l'addiction a été démontrée dans un modèle murin (Sakae et al., 2015 ; Favier et al., 2024). De façon intéressante, ce variant réduit l'accumulation vésiculaire d'ACh dans le striatum sans affecter celle du glutamate. Ces modifications semblent liées à une diminution de la synergie vésiculaire dans le striatum, comme l'ont montré des travaux de l'équipe (Favier et al., 2024). Cette perte de synergie vésiculaire est probablement généralisable aux autres sous-populations neuronales qui expriment VGLUT3 telles que certains neurones sérotoninergiques des noyaux du raphé ou encore les interneurons GABAergiques de l'hippocampe et de l'amygdale basolatérale. Néanmoins, les souris p.T8I présentent des altérations de la fonction striatale dont une diminution de la libération d'ACh et de DA ainsi que des comportements associés au striatum comme l'addiction et la compulsion, permettant ainsi d'évaluer le rôle d'une transmission cholinergique réduite dans le striatum en réponse au stress.

Dans ce contexte, l'objectif de mon travail de thèse a été d'évaluer le rôle du variant p.T8I dans la régulation de la réponse comportementale sociale et de type anxieuse et des états de vigilance après un stress chronique social chez un modèle murin. Dans un second temps, les dynamiques dopaminergique et cholinergique au sein du NAc pendant le stress et dans le comportement social ont également été évaluées à l'aide d'enregistrements de photométrie de fibre couplés à des biosenseurs fluorescents de DA et d'ACh. Les résultats obtenus permettent ainsi de mieux comprendre le rôle de l'ACh dans le NAc dans l'adaptation comportementale au stress social et contribuent ainsi à l'apport de nouvelles connaissances sur les troubles liés au stress.



# MATERIELS ET METHODES

---



## Chapitre 2 –

# Matériels et Méthodes

### 1. Animaux

Les expériences ont été réalisées conformément à la directive européenne relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (86/809/CEE et 2010/63/UE) et ont été approuvées par le ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (numéro d'agrément APAFIS #31718-2021051822188705). Les animaux ont été élevés dans les animaleries de la NAC et du CEFI (hôpital de la Pitié-Salpêtrière et campus Pierre et Marie Curie, Sorbonne Université) et ont été hébergés dans une pièce à température et humidité contrôlées ( $21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  ; 40 % d'humidité) avec un cycle lumière/obscurité de 12 heures (07h30-19h30), ainsi qu'un accès *ad libitum* à la nourriture et à l'eau, conformément aux conditions d'élevage standard.

Toutes les expériences ont été réalisées sur des souris adultes mâles et femelles (2-6 mois) témoins (VGLUT3<sup>+/+</sup>) ou exprimant le variant allélique VGLUT3-p.T8I homozygote (VGLUT3<sup>T8I/T8I</sup>) ou hétérozygote (VGLUT3<sup>T8I/+</sup>), de fond génétique C57BL/6N. Des souris mâles adultes SWISS (CD-1) obtenues des laboratoires Janvier (Le Genest St. Isle, France) ont également été utilisées pour le protocole de stress social chronique et le test d'interaction sociale. Tous les animaux ont été habitués à la manipulation humaine une semaine en amont des expériences afin de minimiser le stress lié à la manipulation.

### 2. Stress chronique de défaite sociale

Durant 10 jours consécutifs, les souris expérimentales ont été quotidiennement soumises à un protocole modifié de défaite sociale (Figure 29) (Challis et al., 2013 ; Henderson et al., 2017). Chaque jour, une souris expérimentale était placée dans la cage d'une souris mâle CD-1 agressive pendant 5 minutes de contact physique. Ce contact physique était suivi d'une période de contacts sensoriels protégés de 20 minutes (visuels, olfactifs, tactiles et auditifs) au cours

desquels la souris expérimentale était séparée de l'agresseur CD-1 par une paroi en plexiglas perforé. Après ces 25 minutes de défaite sociale, les souris expérimentales étaient isolées dans leur cage individuelle. Le lendemain, la procédure était répétée avec un nouvel agresseur CD-1. A la différence des souris expérimentales mâles, chaque souris femelle était associée spécifiquement à l'urine d'un mâle CD-1 non agresseur pour éviter une habitation olfactive des mâles CD-1 agresseurs. Juste avant le contact physique de 5 minutes, de l'urine du mâle correspondant était appliquée autour de l'appareil génital de la femelle expérimentale (environ 50 µL) (Harris et al., 2018).

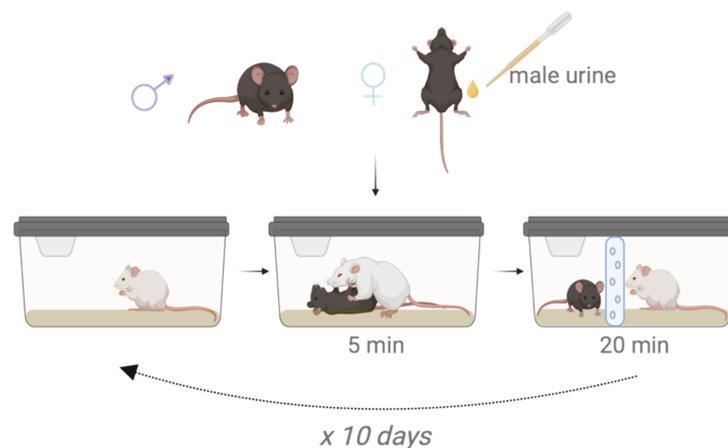


Figure 29. Protocole de stress chronique de défaite sociale chez les mâles et femelles.

### 3. Tests comportementaux

Tous les tests comportementaux qui suivent, à l'exception du test de compulsion de splash test chronique, ont été effectués le matin à l'état basal avant le stress chronique de défaite sociale (CSDS), ainsi qu'après les 10 jours de CSDS (Figure 30).

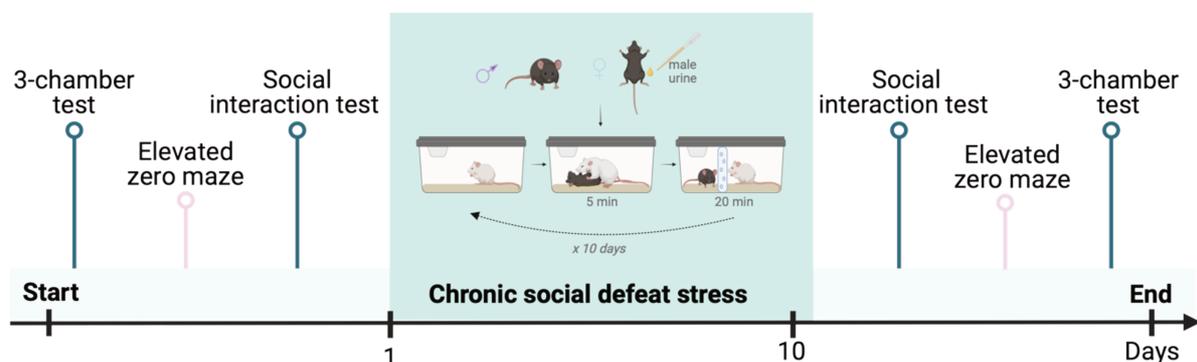


Figure 30. Chronologie de la caractérisation comportementale.

### 3.1. Test d'interaction sociale (SI)

Le test d'interaction sociale est composé de deux phases. Lors de la première phase de 2,5 minutes, la souris expérimentale explorait une arène blanche en plexiglas (42 x 42 x 26 cm ; pièce éclairée à 10 lux) contenant une boîte transparente vide en plexiglas perforé (condition "No Target" ; 10 x 7 x 15 cm). Dans la deuxième phase de 2,5 minutes, une souris CD-1 inconnue était placée dans la boîte perforée (condition "Target" ; Figure 31). Le temps passé dans la zone d'interaction (8 cm autour de la boîte) a été mesuré à l'aide du logiciel EthoVision 14.0 de Noldus® (Wageningen, Pays-Bas). En fonction de ces temps, des ratios d'interaction ont été calculés  $\left[ \frac{\text{temps passé dans la zone d'interaction, condition "Target" après CSDS}}{\text{temps passé dans la zone d'interaction, condition "Target" avant CSDS}} \right]$  et utilisés pour distinguer les souris susceptibles (ratio < 1) des souris résilientes (ratio > 1).

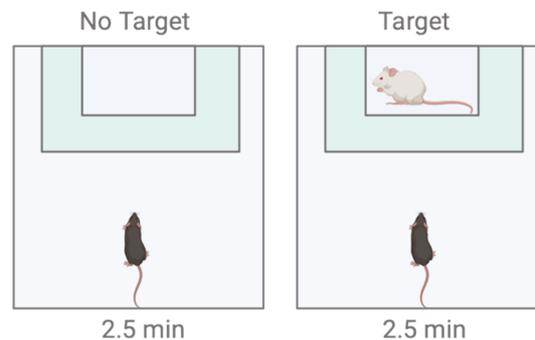
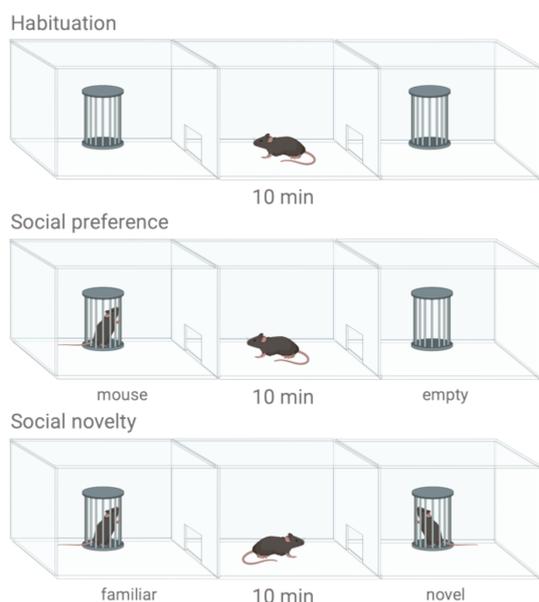


Figure 31. Protocole du test d'interaction sociale.

### 3.2. Test des 3 chambres (3C)

Ce test a permis d'évaluer la préférence sociale et la préférence pour la nouveauté sociale à travers trois phases (Figure 32). Dans chaque phase, les souris expérimentales étaient placées dans le compartiment central d'une boîte en plexiglas opaque à trois compartiments de 40x20x22 cm reliés par des ouvertures (5x5 cm). Ce test a été réalisé dans une pièce éclairée à 15 lux. Durant la première phase, les souris expérimentales ont été placées seules dans le compartiment central avec les portes fermées pendant 10 minutes pour s'habituer à l'environnement. Lors de la deuxième phase de préférence sociale, une souris inconnue juvénile (6 semaines) de même sexe a été placée dans une petite cage grillagée à l'intérieur d'un compartiment, tandis qu'une cage vide a été placée dans l'autre compartiment. Enfin, une nouvelle souris inconnue juvénile de même sexe a été placée dans la cage vide restante pour la troisième phase de préférence pour la nouveauté sociale. Le temps passé par la souris

expérimentale en interaction rapprochée avec chaque cage (3 cm autour de la cage) a été mesuré pendant 10 minutes afin d'évaluer la préférence sociale et la préférence pour la nouveauté sociale avec le logiciel EthoVision 14.0 de Noldus® (Wageningen, Pays-Bas). Les indices (Ix) de préférence sociale et de préférence pour la nouveauté sociale ont été calculés avant et après stress en fonction des temps passé dans la zone proche des différents facteurs a VS b (souris VS boîte vide et souris familière VS nouvelle souris) tels que :  $I_x = (a-b)/(a+b)$ . Afin de comparer l'effet du stress sur ces indices de préférence entre les groupes, ils ont été normalisés par un calcul de z-score standard :  $(\text{data individuelle} - \text{moyenne}(\text{data du groupe avant stress})) / \text{écart-type}(\text{data du groupe avant stress})$ . Ces z-scores ont ainsi permis d'observer la position de chaque individu après stress par rapport au groupe avant stress.

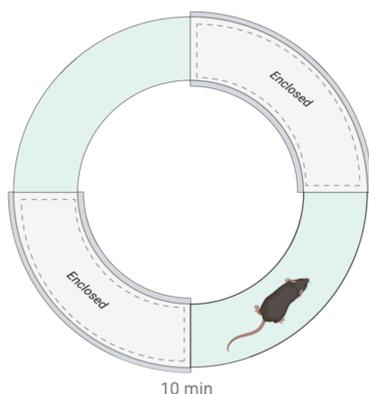


**Figure 32. Protocole du test des 3 chambres.**

### 3.3. Test de labyrinthe en zéro (EZM)

Le labyrinthe en croix surélevé (EZM, pour « *Elevated Zero Maze* ») est une plateforme annulaire en polychlorure de vinyle (PVC) blanc de 7 cm de largeur, 57 cm de diamètre externe, placée à 90 cm du sol (Figure 33). Le labyrinthe était divisé en deux sections ouvertes opposées et deux sections fermées opposées de 17 cm de hauteur et de longueur égale, avec une intensité lumineuse de 30 lux dans les parties ouvertes. Pendant le test, les souris expérimentales étaient placées dans une section fermée, face à la section ouverte, et pouvaient explorer librement le labyrinthe pendant 10 minutes (Figure 33). Les déplacements des souris étaient suivis à l'aide du logiciel EthoVision 14.0 de Noldus® (Wageningen, Pays-Bas) afin de mesurer le temps de latence avant d'entrer dans les sections ouvertes, le nombre d'entrées et le temps passé dans ces sections.

**Figure 33. Protocole de l'elevated zero maze.**



### **3.4. Test de compulsion de splash test chronique**

Ce test a été réalisé à l'état basal, en dehors du CSDS, pour mesurer la compulsion suite à l'exposition chronique de 10 jours à solution sucrée. Les souris expérimentales étaient placées dans une arène à champs ouvert (42x42x42 cm) soumis à une intensité lumineuse de 200 lux en son centre, pendant 4 minutes d'habituation, puis elles ont été sorties et une solution de sucrose 20 % était pulvérisée sur leur dos (3 fois) avant d'être remises dans l'arène. Leur comportement de toilettage était alors enregistré pendant les 6 minutes suivantes par vidéo. Ce protocole a été répété pendant 10 jours consécutifs. La durée, le nombre et la durée moyenne de toilettage ont été manuellement analysés et calculés (Annexe 4).

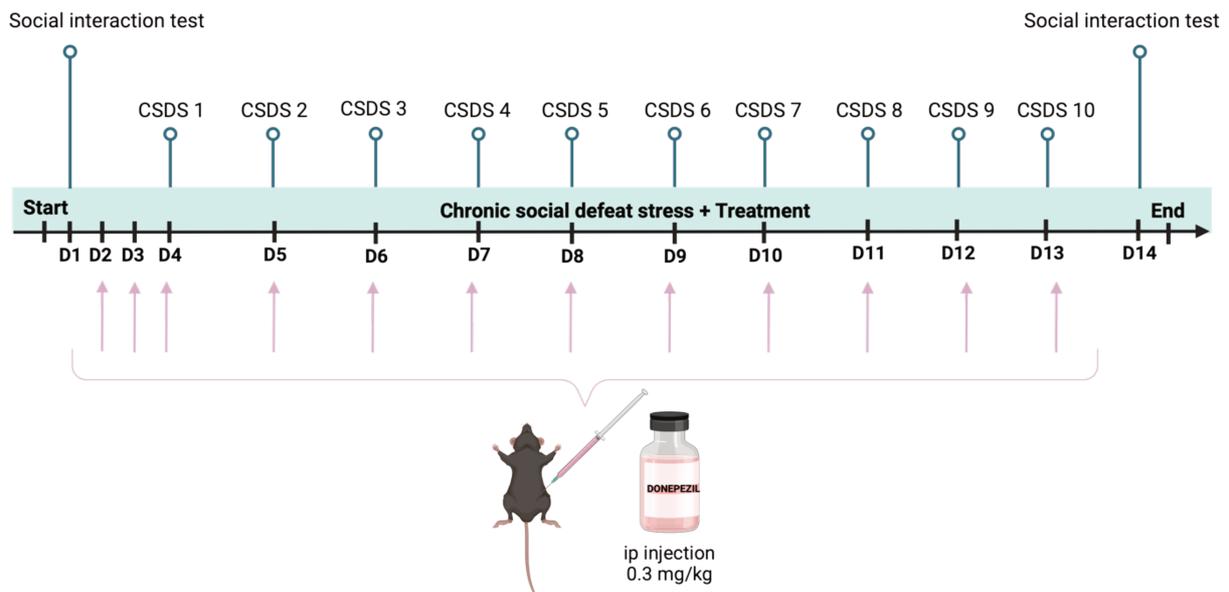
## **4. Pharmacologie**

### **4.1. Pharmacologie pour la photométrie de fibre**

Dans le cadre des expériences de photométrie de fibre, et ceci dans le but de contrôler le signal enregistré, des souris ont été injectées par voie intrapéritonéale avec des composés pharmacologiques agissant soit sur la transmissions dopaminergique ou cholinergique. Tous les composés pharmacologiques injectés ont été dilués dans une solution saline (NaCl 0,9 %) en présence ou pas de diméthylsulfoxyde (DMSO ; 1 %). Les souris ont ainsi été injectées avec du sulfate de d-amphétamine (3 mg/kg ; A5880 ; Sigma-Aldrich), ou de l'atropine (12,5 mg/kg ; A0132 ; Sigma-Aldrich).

## 4.2. Traitements au donépézil

Pour une autre étude, et afin d'évaluer si les comportements d'évitement social induits par le CSDS pouvaient être inversés par augmentation des taux d'acétylcholine (ACh), un lot de souris mâles a été traité au donépézil, un inhibiteur de l'acétylcholine estérase (Annexe 3). Ces souris ont été quotidiennement injectées en intrapéritonéal avec une solution de donépézil hydrochloride (0,3 mg/kg ; D6821 ; Sigma-Aldrich) ou une solution saline (NaCl 0,9 %) à partir du premier jour de CSDS et jusqu'au dixième. Les injections avaient lieu 30 minutes avant le début de la défaite sociale (Figure 34).



**Figure 34. Protocole de l'expérience de traitement au donépézil.**

Les souris ont d'abord été soumises au test d'interaction sociale à l'état basal, sans traitement. Puis, à partir du premier jour de chronic social defeat stress (CSDS) et jusqu'au dixième, elles ont reçu un traitement (0,9% NaCl ou Donépézil (DPZ) 0,3mg/kg) 30 minutes avant chaque session de défaite sociale. Elles ont ensuite été à nouveau testées dans le test d'interaction sociale 2 jours après la fin du CSDS.

## 5. Chirurgies

Toutes les chirurgies ont été réalisées chez des souris adultes (2 à 4 mois) sous anesthésie générale. Les animaux ont reçu une injection intrapéritonéale d'un mélange de kétamine/xylozine (90 et 10 mg/kg, respectivement) suspendu dans une solution saline (NaCl

0,9 %), puis ont été fixés dans un appareil stéréotaxique (David Kopf Instruments). Pour soulager la douleur, de la lidocaïne (5 mg/kg) a été appliquée localement sur le crâne des souris, et du méloxicam (1 mg/kg) a été injecté par voie sous-cutanée à la fin de l'intervention ainsi que le lendemain.

### 5.1. Chirurgies de photométrie de fibre

Afin d'évaluer les taux de DA et d'ACh dans le NAc des souris mâles, j'ai réalisé des injections avec les vecteurs viraux AAV2/9-hsyn-DA3h, ou GRAB-DA3h ( $5,85 \times 10^{12}$  vg/mL ; Brain-VTA, Wuhan, China) et AAV2/9-hsyn-ACh3.8, ou GCh3.8 ( $2,05 \times 10^{12}$  vg/mL ; Brain-VTA, Wuhan, China). Chacun a été mélangé (proportion 1 :1) avec le vecteur viral ssAAV-5/2-hSyn1-mCherry-WPRE-hGHp(A) ( $6.0 \times 10^{12}$  vg/mL ; Viral Vector Facility, Université de Zurich, Suisse) dilué au  $\frac{1}{2}$  avec du PBS 1x qui permet de faire exprimer une protéine fluorescente mCherry qui est insensible à la DA et à l'ACh permettant de normaliser les signaux de DA et d'ACh (Figure 35). Ces deux mélanges viraux ont été injectés bilatéralement chez des souris mâles, de manière alternée entre chaque souris pour éviter un biais de latéralisation. Un volume de 0,5  $\mu$ L de ces deux mélanges viraux a été injecté bilatéralement dans le noyau accumbens shell (coordonnées antéro-postérieures (AP) : + 1,4 mm ; médio-latérales (ML) :  $\pm$  1,6 mm ; dorso-ventrales (DV) : - 4,6 mm ; angle de  $10^\circ$ ) à un débit de 0,2  $\mu$ L/min à l'aide d'une seringue de 10  $\mu$ L (modèle 1701, Hamilton, PHYMEP, Paris, France) et d'une aiguille avec pointe en fibre de silice (100  $\mu$ m ; PHYMEP, Paris, France). Cinq minutes après la fin de l'injection, l'aiguille est remontée et une fibre optique (diamètre du cœur de 200  $\mu$ m ; diamètre de la virole en céramique de 1,25 mm ; NA 0,37 ; longueur de 7,5 mm ; Neurophotometrics LLC, San Diego, Etats-Unis) est implantée dans le noyau accumbens (AP : + 1,4 mm ; ML :  $\pm$  1,6 mm ; DV : - 4,4 mm ; angle de  $10^\circ$ ). Ces fibres ont ensuite été fixées au crâne à l'aide de ciment dentaire (SuperBond, Sun Medical, PHYMEP, Paris, France) mélangé à du charbon végétal en poudre pour minimiser l'absorption lumineuse ambiante. Pour permettre la récupération et l'expression virale, une période de 4 semaines est respectée avant que les souris soient soumises aux expériences de photométrie de fibre optique.

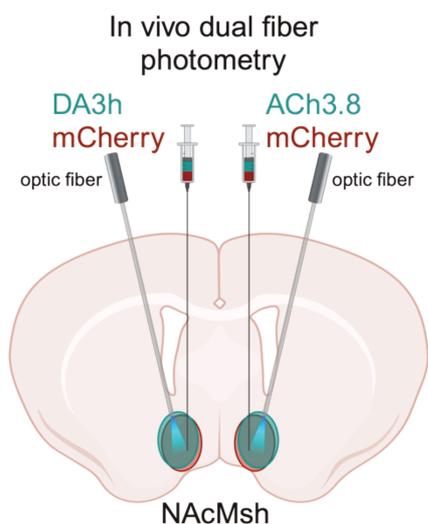


Figure 35. Schéma des injections virales bilatérales et implantations des fibres optiques.

## 5.2. Chirurgies sommeil

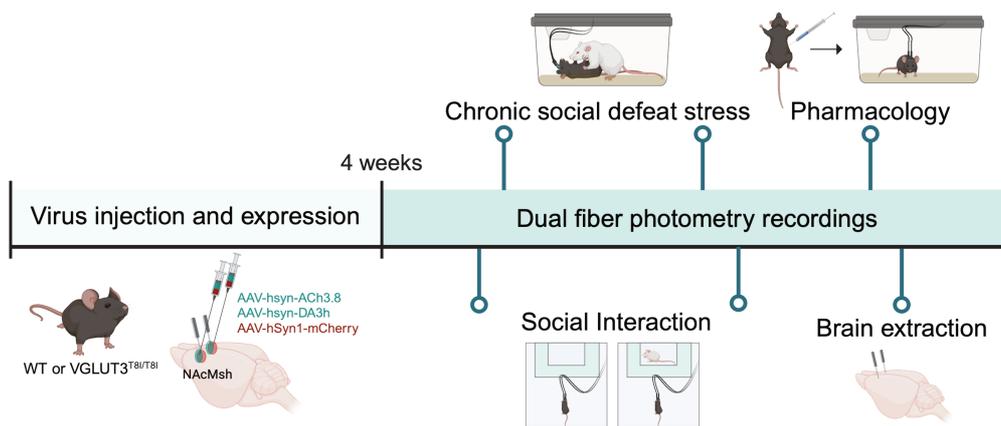
Des électrodes électroencéphalogramme (EEG) et électromyogramme (EMG) ont été implantées chez les souris mâles et femelles afin d'effectuer des enregistrements polysomnographiques (fil de nichrome émaillé, 150  $\mu\text{m}$  de diamètre) (Figure 38). Quatre électrodes EEG ont été implantées sur la dure-mère à travers l'os crânien, à la fois au-dessus du lobe frontal gauche (AP : + 2 mm ; ML : - 2 mm), ainsi que du cortex pariétal droit (AP : - 2 mm ; ML : 2 mm), et au-dessus du cervelet gauche et droit (sur la ligne médiane, 2 mm en arrière de lambda), selon les coordonnées de l'atlas de Franklin et Paxinos (2008). Cette configuration permet d'enregistrer deux signaux EEG : l'EEG frontal (EEGFr) et l'EEG pariétal (EEGPr). Ensuite, deux électrodes EMG ont été placées dans les muscles du cou. Toutes les électrodes ont été fixées au crâne avec de l'acrylique dentaire et soudées à un miniconnecteur (Antelec, La Queue en Brie, France). Une période d'une semaine permettait aux souris de récupérer de l'intervention.

## 6. Acquisition et analyse des enregistrements *in vivo*

### 6.1. Enregistrements de photométrie de fibre

Les niveaux d'ACh et de DA ont été mesurés *in vivo* par fluorescence à l'aide de biosenseurs GACH3.8 et GRABDA3h injectés dans le NAc couplés à un système de photométrie de fibre

(FP3002 ; Neurophotometrics LLC, San Diego, USA) (Figure 36). Le système de photométrie de fibre comprenait une console à LED qui délivrait deux lumières d'excitation (LED 470 nm et LED 560 nm ; 50  $\mu$ W). Les deux lumières LED étaient filtrées par bande passante, réfléchies par un miroir et focalisées par un objectif x20 (NA : 0,4). Les lumières d'excitation ainsi que les lumières d'émission étaient transmises par un cordon de raccordement à fibre optique à faible autofluorescence (MFP\_200/220/900-0.37\_2m\_SMA-MF1.25\_LAF ; Doric Lenses) qui était connecté à l'implant de fibre optique de l'animal (FOC\_BF\_200um/1.25mm ; Neurophotometrics LLC, San Diego, USA) à l'aide d'une gaine en céramique (ADAL1-5 ; Thorlabs). Le signal était acquis à une fréquence d'échantillonnage de 75 Hz et synchronisé à l'enregistrement de la vidéo *via* Bonsai 2.4 (<http://bonsai-rx.org>). Une semaine avant les expériences, les souris ont été habituées au branchement de leurs fibres. Les enregistrements ont été réalisés pendant le test d'interaction sociale avant et après le CSDS, ainsi que le premier et le dixième jour du CSDS. Le premier et le dixième jour de la CSDS, les souris ont été enregistrées dans leur cage individuelle pendant une période de 2 minutes avant l'attaque, puis pendant les 5 minutes d'attaque ainsi que pendant les deux premières minutes de contact protégé sensoriel. A la fin des enregistrements liés au CSDS, les souris ont été enregistrées dans leur cage individuelle lors de contrôles pharmacologiques qui comprenaient 5 minutes d'enregistrement basal, et 15 minutes d'enregistrement après injection intrapéritonéale de l'agent pharmacologique (voir section Pharmacologie, 4.1).



**Figure 36. Chronologie des expériences d'enregistrements de photométrie de fibre.**

Toutes les données de photométrie de fibre ont été analysées en Python. Principalement, après avoir supprimé le 5 premières secondes, les signaux 470nm (signal du capteur) et 560

(signal du contrôle mCherry) ont été ajustés à l'aide de régressions exponentielles doubles, puis redressées en les divisant par leur courbe ajustée respective obtenue par moindres carrés non linéaires. Le signal contrôle 560 redressé a ensuite été ajusté au signal 470 par régression linéaire (ie. *fitted 560*). La variation de fluorescence en  $\Delta F/F$  a ensuite été calculée comme suit :  $(\text{signal } 470 - \text{fitted } 560) / \text{fitted } 560$ . Puis, les z-scores de  $\Delta F/F$  ont été calculés selon la formule standard:  $(\Delta F/F - \text{moyenne}(\Delta F/F)) / \text{écart type}(\Delta F/F)$ . Les signaux normalisés ont été synchronisés avec le comportement afin d'obtenir des histogrammes de temps péri-événements (PETH). Enfin, les aires sous la courbe ainsi que les valeurs maximales de ces PETH ont été calculées puis analysées (Figure 37).

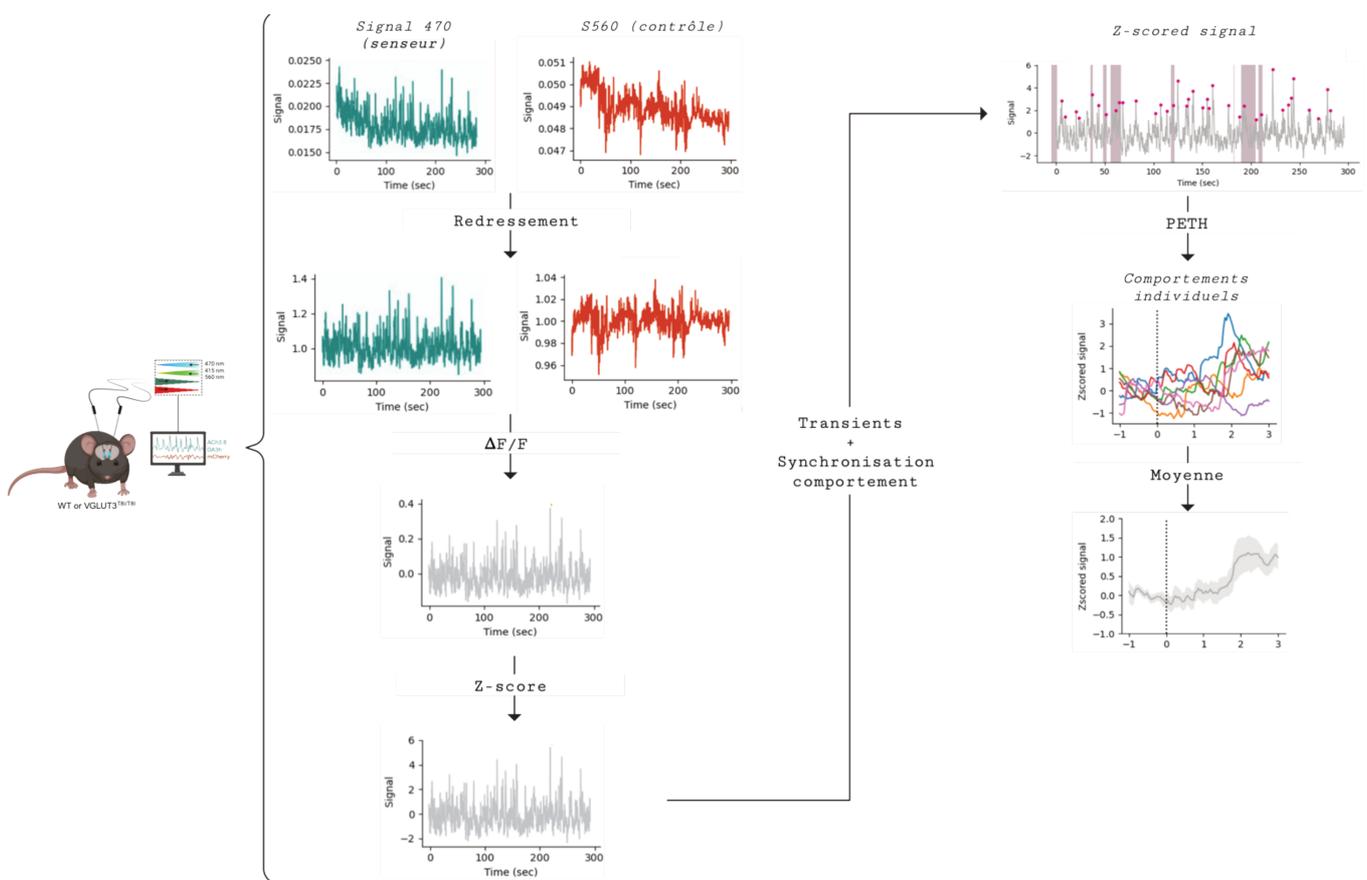


Figure 37. Étapes de normalisation des signaux de photométrie.

## 6.2. Enregistrements polysomnographiques

Afin d'habituer les souris aux conditions d'enregistrement, celles-ci ont été placées individuellement dans des cages en plexiglas (19×19×30 cm) dans une chambre d'enregistrement et connectées aux câbles d'enregistrement pendant 4-7 jours avant le début

des enregistrements polysomnographiques. Les enregistrements polysomnographiques ont été réalisés à l'aide d'un système d'enregistrement comprenant un câble léger relié à un pivot, permettant des mouvements libres. Deux jours avant le début du protocole CSDS, un enregistrement basal de 24 heures (BL) a été effectué. Pendant le protocole de CSDS, les enregistrements EEG/EMG ont commencé à 10h30 du matin, après les sessions de défaite sociale des jours 1 (SD1), 3 (SD3) et 10 (SD10), et se sont poursuivis jusqu'au lendemain. Cinq jours après la fin du protocole CSDS un enregistrement de 24 heures (Recovery 5, R5) a été réalisé (Figure 38). Les signaux EEG/EMG ont été amplifiés, filtrés (EEG 0,5-90 Hz ; EMG 0,5-45 Hz) et numérisés à une fréquence d'échantillonnage de 200 Hz (EEG) et 100 Hz (EMG) à l'aide du module Embla (Medcare, Reykjavik, Islande). Les états de vigilance (éveil, sommeil lent et sommeil paradoxal) ont été analysés visuellement par périodes de 10 secondes à l'aide du logiciel Somnologica® (Medcare, Reykjavik, Islande), selon des critères standards. Les durées des états de vigilance pour chaque animal ont été exprimées en minutes par intervalles de 3 heures ou 12 heures. L'architecture du sommeil a été évaluée en calculant la durée moyenne et la fréquence des épisodes d'états de vigilance (un épisode pouvant être aussi court qu'une seule période). Le signal EEG a été traité pour l'analyse des spectres de puissance les jours suivants : BL, SD1, SD3, SD10 et R5. Sur la base de l'analyse visuelle et spectrale, les épisodes de 10 secondes présentant des artefacts ont été omis de l'analyse spectrale. Ensuite, les époques consécutives de 10 secondes ont été soumises à une transformation de Fourier (FFT), produisant des spectres de puissance entre 0,4 et 50 Hz avec des intervalles de fréquence de 0,4 Hz. Pour chaque animal et état de vigilance, un spectrogramme a été obtenu et les valeurs des spectres de puissance ont été divisées en 5 bandes de fréquence : delta (0,5–4,99 Hz), thêta (5–9,99 Hz), alpha (10–12,99 Hz), bêta (13–29,99 Hz) et bas gamma (30–50 Hz). Le spectre de puissance EEG moyen a été obtenu en moyennant les spectres de puissance de toutes les époques de 10 secondes d'un état donné sur des intervalles de 3 ou 12 heures. Les spectres de puissance EEG pour chacune des cinq bandes de fréquence sont exprimés sous forme de rapport de la puissance EEG moyenne sur toutes les bandes de fréquence (valeurs relatives) et sont comparés à BL.

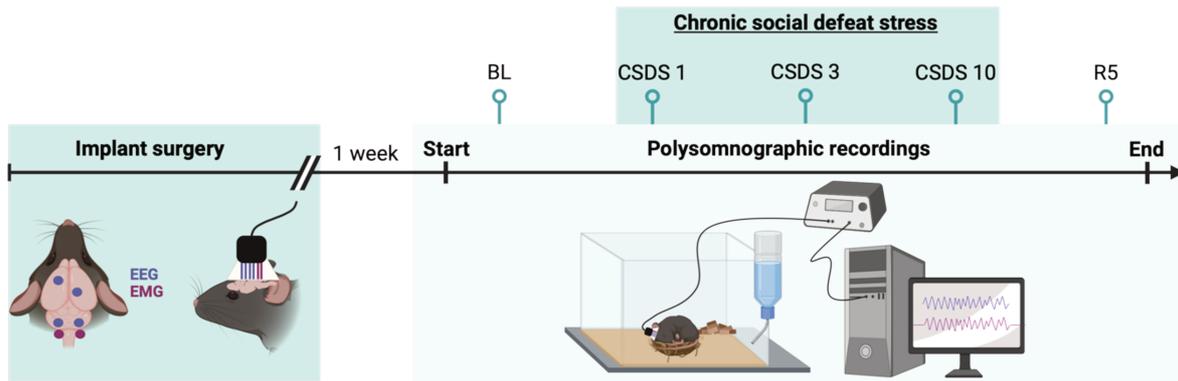


Figure 38. Chronologie des expériences d'enregistrements des états de vigilance.

## 7. Immunofluorescence

A la fin des expériences de photométrie de fibre, les souris sont perfusées et leur cerveau prélevé pour réaliser des expériences d'immunofluorescence afin de valider le ciblage du NAc et l'expression des virus injectés.

Les souris ont été injectées en intrapéritonéal avec de l'euthasol (400 mg/kg) puis perfusées par voie intracardiaque avec 100 mL de solution de paraformaldehyde (PFA) à 4 % tamponnée au phosphate (PBS). Les cerveaux ont été prélevés et conservés à 4°C dans une solution de PFA à 4 % pendant 24 heures avant d'être transférés dans une solution de PBS avec de l'azide (0,03 %). Ensuite, les cerveaux ont été coupés en sections de 35  $\mu\text{m}$  à l'aide d'un vibratome (VT-1000, Leica Microsystèmes, Rueil-Malmaison, France) et stockés à 4°C. Les coupes cérébrales ont ensuite été rincées puis incubées dans un tampon de blocage *Normal Horse Serum* (NHS) 4 % dilué dans du PBS 1x et Triton 0,3 % pendant une heure. Puis, les coupes ont été incubées la nuit à 4°C avec des anticorps primaires anti-GFP poulet (1/1000 ; AVES) permettant de visualiser les senseurs et anti-DSred lapin (1/1000 ; Abcam) permettant de visualiser la protéine mCherry dilués dans une solution de PBS 1x, Triton 0,3 % et NHS 1 %. Le lendemain, les coupes ont été rincées puis incubées pendant une heure avec des anticorps secondaires anti-poulet conjugué à la GFP (1/2000 ; Alexa Fluor, 488 nm) et anti-lapin conjugué à la DSred (1/2000 ; Alexa Fluor, 594 nm) dilués dans du PBS 1x. Après rinçage, les coupes ont été montées entre lame et lamelle avec du Fluoromount (Sigma-Aldrich, F4680) puis conservées à 4°C.

## 8. Acquisition des images

Les images ont été acquises à l'aide d'un macroapote (microscope à fluorescence Zeiss apote). À des fins d'illustration, les images ont été exportées au format TIFF puis corrigées pour le contraste, recadrées et assemblées sur Photoshop CS2 (version 9.0 ; Adobe Systems, Mountain View, CA, USA). Enfin, des indications supplémentaires et/ou des repères anatomiques ont été incorporés.

## 9. Statistiques

Toutes les données ont été analysées à l'aide du logiciel Prism 10.0 (GraphPad). Les analyses statistiques ont été choisies en fonction du protocole expérimental. Si la distribution des données suivait une loi normale, celles-ci ont été analysées soit par le test t de Student, soit par des ANOVA répétées ou non à deux facteurs ou des modèles mixtes lorsque certaines données étaient manquantes en raison de problèmes d'enregistrements de photométrie. Le test de comparaisons multiples de Sidak a été effectué pour l'analyse post-hoc lorsque cela était nécessaire, sauf indication contraire. Les données sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  l'erreur standard de la moyenne (SEM), ou bien médiane  $\pm$  les valeurs minimales et maximales dans les boîtes à moustaches. Les différences sont considérées comme significatives lorsque  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$ . L'analyse en composante principale (*Principal Component Analysis*, PCA) a été effectuée sur Prism 10.0 sur les données normalisées par un z-score (EZM, 3CP, et SI). Le calcul du z-score suivant a permis de normaliser les données par rapport à un groupe contrôle non stressé :  $z = (\text{data} - \text{moyenne}(\text{data groupe contrôle})) / \text{écart-type}(\text{data groupe contrôle})$ . Les proportions de variances expliquées par chaque PC et les contributions de variables pour chaque PC ont également été calculées.



# RESULTATS

---



### 1. Étude du variant VGLUT3-p.T8I en réponse au stress

#### **Acetylcholine dynamics in the Nucleus Accumbens: Implications for Stress Susceptibility and Resilience Revealed by a Variant of VGLUT3**

**Marine Pujol<sup>1</sup>, Odile Poirel<sup>1</sup>, Véronique Bernard<sup>1</sup>, Nicolas Pietrancosta<sup>1,3,4</sup>, Salah El Mestikawy<sup>1,2</sup>, Véronique Fabre<sup>1#</sup> and Stéphanie Daumas<sup>1#\*</sup>.**

<sup>1</sup>Sorbonne Université, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Centre National de la Recherche Scientifique, Neurosciences Paris Seine – Institut de Biologie Paris Seine (NPS – IBPS), Paris 75005, France

<sup>2</sup>Douglas Mental Health University Institute, Department of Psychiatry, McGill University, Montreal, QC, H4H 1R3, Canada.

<sup>3</sup>Sorbonne Université, École normale supérieure, PSL University, CNRS, Laboratoire des Biomolécules, LBM, 75005 Paris, France.

<sup>4</sup>LCBPT, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, UMR 8601, CNRS, Paris, 75006, France.

# Co-last and co-corresponding authors

\* Correspondence: [veronique.fabre@inserm.fr](mailto:veronique.fabre@inserm.fr) and [stephanie.daumas@sorbonne-universite.fr](mailto:stephanie.daumas@sorbonne-universite.fr)

**Six keywords:** Nucleus Accumbens, Acetylcholine, Dopamine, Stress susceptibility, Sex differences, VGLUT3

**Short title:** Acetylcholine dynamics in the NAc and Stress Susceptibility

## **Abstract**

### **BACKGROUND:**

Susceptibility and resilience to chronic social stress are characterized by distinct behavioral profiles associated with specific dopamine (DA) dynamics in the nucleus accumbens (NAc). Local DA fibers and cholinergic interneurons (CINs) are pivotal regulators of NAc functions. While inactivating CINs in the NAc promotes susceptibility to social defeat, this effect cannot solely be attributed to acetylcholine (ACh) release. Indeed, CINs also express the vesicular glutamate transporter 3 (VGLUT3), enabling additional glutamate signaling. Therefore, the specific role of ACh or glutamate released by CINs within the NAc in the modulation of the behavioral responses to stress remains to be clarified. Recently, a rare p.T8I missense variant of the gene encoding VGLUT3 (*Slc17a8*) was found in patients with substance use disorders, offering new opportunities for understanding the role of VGLUT3 in striatal-related dysfunctions including those triggered by chronic stress.

### **METHODS:**

We investigated the effect of the VGLUT3-p.T8I variant on behavioral susceptibility after a 10-day of chronic social defeat stress (CSDS) in male and female mice. Fiber photometry was then used to record ACh and DA dynamics in the NAc in response to CSDS.

### **RESULTS:**

We found that, following a 10-day CSDS, VGLUT3<sup>T8I/T8I</sup> mice showed higher social cue discrimination characterized by target-dependent social avoidance, and higher anxiety-like behaviors. Moreover, the p.T8I variant was associated with reduced CSDS-induced ACh response in the NAc.

### **CONCLUSIONS:**

Our findings revealed that the p.T8I variant affects ACh transmission in the NAc during CSDS, influencing susceptibility to stress.

## Introduction

Exposure to stress, especially social stressors, is recognized to increase the risk of developing psychiatric conditions such as generalized anxiety and major depressive disorder (1-3). However, the emotional response to stress is influenced by a combination of environmental factors and genetics, leading to significant variability among individuals. While resilience has traditionally been understood as the ability to withstand stressful events without developing associated psychiatric conditions, recent research suggests it entails more than just the absence of stress-related disorders – it encompasses a multifaceted, active cognitive coping mechanism (1, 4-6). In both humans and rodents, proactive behaviors have been linked with resilience (7-10). Resilience, rather than solely maintaining normal functioning in the face of stress, refers to the ability to adapt behaviorally to the environment despite experiencing psychiatric symptoms (6, 10).

This behavioral adaptation arises from decision-making in part orchestrated by the complex interaction between striatal dopamine (DA) and acetylcholine (ACh) signals (11, 12). DA transmission is thought to regulate motivational processes, while ACh, released by cholinergic interneurons (CINs), is involved in regulating complex learning behaviors by signaling stimulus salience. Consequently, both transmissions facilitate behavioral adaptation in response to changes in the environment (13-16). Specifically, DA release in the nucleus accumbens (NAc) as well as the firing pattern of dopaminergic terminals from the ventral tegmental area (VTA) mediate behavioral responses to social stress associated with susceptibility and resilience (8, 17-23). Despite its importance in regulating local striatal circuitry, the role of ACh signaling within the NAc in mediating stress responses remains relatively unexplored. Some studies suggest that modulating the activity of CINs can either induce or alleviate stress susceptibility (24, 25). However, these manipulations affect both ACh and glutamate signaling, posing challenges for interpretation.

Notably, CINs have the ability to signal with both ACh and glutamate, through the expression of the vesicular acetylcholine transporter (VACHT) and the vesicular glutamate transporter 3 (VGLUT3), respectively (26-29). Furthermore, VGLUT3 enhances the vesicular loading of ACh *via* a process known as vesicular synergy (26). Recently, we identified a rare allelic variant (p.T8I) of the gene encoding VGLUT3 (*Slc17a8*) (30). This variant reduces ACh release from CINs without affecting glutamate release, thereby enabling specific investigations of the functional impact of reduced striatal ACh transmission (31). Therefore, mice carrying the p.T8I mutation (VGLUT3<sup>T8I/T8I</sup>) exhibit reduced DA levels in the dorsomedial striatum and

maladaptive reward-based behaviors such as excessive habits, eating disorders and substance use disorders (31).

Considering the role of DA and ACh transmissions in stress susceptibility, our study aims to evaluate the impact of the p.T8I variant on behavioral responses to stress. We subjected VGLUT3<sup>T8I/T8I</sup> male and female mice to chronic social defeat stress (CSDS) and assessed their social and anxiety-like behaviors. We then examined whether these behavioral responses reflected specific DA and ACh dynamics within the NAc of mice both during CSDS and the social interaction test, which assesses the behavioral effect of stress on susceptibility. Our findings indicate a sex- and genotype-dependent stress response. The female sex, along with the p.T8I variant solely in male, are factors promoting social cue discrimination, characterized by threat-cue-dependent social avoidance, and heightened levels of CSDS-induced anxiety-like behaviors. In control male mice, we observed a progressive stress-induced ACh increase in the NAc at the onset of the attack during the social defeat. Strikingly, this increase was blunted in mice carrying the p.T8I variant. While ACh release remained unaffected in control male mice during post-CSDS social threat-cue approach, mutant mice exhibited increased ACh release. Collectively, our data suggest a role for VGLUT3-mediated ACh transmission within the NAc in regulating behavioral adaptation in response to CSDS.

## **Methods and Materials**

### *Mice*

Experiments adhered to the European directive on the protection of animals used for scientific purposes (European Committee Council Directive 2010/63/EU) and were in compliance with the French Ministère de l'Agriculture et de la Forêt, Service Vétérinaire de la Santé et de la Protection Animale (authorization #31718-2021051822188705 from ethics committee Darwin CEEA #5). VGLUT3<sup>+/+</sup> and VGLUT3<sup>T8I/T8I</sup> mice were bred at Sorbonne University Rodent facilities. Mice were housed in standard conditions with controlled temperature (21°C ± 2°C), humidity (40 %) and a 12h light/dark cycle (07:30-19:30), with free access to food and water. Experiments were conducted on male and female mice aged 8 to 16 weeks. For the chronic social defeat stress, adult male CD1 mice (12-20 weeks-old, body weight: 30-35g) were used as aggressors (Janvier Laboratories, France). For the 3-chamber test, juvenile C56BL6 mice (aged 6 weeks, sex-matched) were used as social cues.

### *Surgeries*

For all surgeries, mice were anesthetized with a mixture of ketamine/xylazine (90/10 mg/kg) with local lidocaine (5 mg/kg) and postoperative meloxicam (1 mg/kg) for pain relief. For fiber photometry, viral vectors (0.5 µL) were bilaterally infused into the NAc (anteroposterior (AP) coordinates : +1.4 mm; mediolateral (ML) : ±1.6 mm; dorsoventral (DV) : -4.6 mm; angle of 10°). AAV2/9-hsyn-DA3h and AAV2/9-hsyn-ACh3.8 (5.85x10<sup>12</sup> vg/mL, 2.05x10<sup>12</sup> vg/mL; Brain-VTA, China) mixed (1:1 ratio) with AAV5/2-hSyn1-mCherry (6x10<sup>12</sup> vg/mL; Viral Vector Facility, University of Zurich, Switzerland) were bilaterally infused in male mice. Optical fibers (200 µm core diameter; NA 0.37; Neurophotometrics, USA) were implanted above injection sites and secured with dental cement (SuperBond, PHYMEP, France) mixed with powdered charcoal. Mice recovered for 3 weeks before testing.

### *Chronic social defeat stress*

The CSDS paradigm, as previously described (28-31), involved pairing mice with a new male CD1 mouse every day for 10 consecutive days. Briefly, this included a 5-minute physical contact session followed by a 20-minute protected sensory interaction. Female mice were

specifically paired and marked with unknown male CD1 urine before each social defeat as previously described (30-31).

### ***Behavior***

All behavior assays, conducted both pre- and post-CSDS exposure, included the social interaction (SI) test, the 3-chamber test (3C) and the elevated zero maze test (EZM). In order to assess social behaviors in mice, we used the SI and the 3C tests. The SI test was performed as previously described and consisted of two 150-second trials in an open arena (42×42×26 cm; 10 lux), where mice interacted with either an empty cage (first trial; no target) or an unknown male CD1 mouse (second trial; target). The 3C test was performed in a 3-chamber arena (40x20x22 cm; 15 lux), with mice exploring for 10 minutes while an unfamiliar sex-matched juvenile mouse was in one chamber within a wire cage and an empty cage was placed in the other chamber. Anxiety-like behavior was assessed using the EZM. The EZM test consisted of an annular platform (width 7 cm; outer diameter 57 cm; elevated 90 cm; 30 lux) with mice exploring it for 10 minutes. Procedures were recorded and analyzed using EthoVision 14.0 (Noldus, Wageningen, Netherlands). See *Supplement* for a complete description.

### ***Data acquisition***

DA and ACh dynamics were recorded using fiber photometry (FP3002; Neurophotometrics, USA) by connecting mice to the system using a multiple branching patch cord (Doris Lenses). Signals were acquired and synchronized with video recording *via* Bonsai 2.4 (75 Hz; <http://bonsai-rx.org>) on days 1 and 10 of CSDS and SI pre- and post-CSDS. Data were analyzed in Python. Briefly, the 470-nm-sensor signals and the 560-nm-control signal were regressed, detrended and then fitted. Z-scores of  $\Delta F/F$  were calculated using the standard formula. See *Supplement* for detailed procedure.

### ***Immunohistochemistry***

At the end of fiber photometry experiments, histological analysis was performed to control for location of AAV injections and expressions. Mice that did not show viral expression (GFP and mCherry fluorescence) or proper NAc targeting were not included in subsequent data analysis.

Mice were injected with euthasol (ip. 400 mg/kg) and intracardially perfused with 4 % paraformaldehyde (PFA) solution buffered in phosphate-buffered saline (PBS). Brains were postfixed overnight at 4°C in a 4 % PFA solution, then cut at 35 µm using a vibratome (Leica, France) and stored at 4°C. Brain sections were incubated at 4 °C for 24 hours with primary antibodies in PBS containing 0.3% Triton X-100 (Sigma Aldrich) and 4% normal horse serum (Thermo Fisher Scientific). Sensors were detected with a chicken polyclonal anti-GFP (1:2000; Aves Labs, Portland, OR, USA; #1020, Lot #3717982) and control mCherry with a mouse monoclonal anti-RFP (1:1000; ChromoTek; #5F8, Lot #104272-05). Sections were rinsed after incubation with primary antibodies in PBS and incubated for 1 hour with anti-rabbit IgG coupled to Alexa Fluor 594 (1/1000; Thermo Fisher Scientific; Cat# A-21207), and anti-chicken IgY coupled to Alexa Fluor 488 (1:1000; Thermo Fisher Scientific; Cat# A32931). After rinsing, sections were coverslipped with Fluoromount-G® mounting medium (Thermo Fisher Scientific) and stored in the dark at 4 °C before microscopy and imaging.

### ***Image acquisition and processing***

After dual fluorescent immunolabeling, images were acquired using microscope Zeiss apotome (Axio Zoom V16). For illustration purposes, the images were exported in TIFF format and were then corrected for contrast, cropped and assembled on Photoshop CS2 (version 9.0; Adobe Systems, Mountain View, CA, USA). Finally, additional indications and/or anatomical landmarks were incorporated.

### ***Statistics***

Analyses were performed using Prism 10.0 software (GraphPad Software, USA). Data were tested for normality using the Shapiro-Wilk test and then were analyzed using *t* tests or two-way analysis of variance including repeated measures. For photometry data, mixed-effects models were used due to missing data points resulting from recording issues. Sidak's multiple comparisons test was performed for post-hoc analysis when necessary. See *Supplement* for more details.

## Results

### The p.T8I variant increases social cue discrimination and anxiety following CSDS in male mice

We first investigated whether the CSDS-induced behavioral phenotypes were affected by the p.T8I variant. To this end, we used a mouse line engineered to express the p.T8I allelic variant within the *Slc17a8* gene, on a C57BL/6N background (31). Male mice of both VGLUT3<sup>+/+</sup> (control) or VGLUT3<sup>T8I/T8I</sup> (mutant) genotypes underwent a battery of behavioral assays, including social interaction (SI), 3-chamber (3C), and elevated zero maze (EZM) tests, both before and after exposure to a modified CSDS paradigm (Figure 1A) (32, 33). We observed a significant reduction in interaction time post-CSDS in both VGLUT3<sup>+/+</sup> and VGLUT3<sup>T8I/T8I</sup> mice in the SI test. However, this reduction was more pronounced in mutant mice (Figure 1B). Additionally, social preference (SP) indexes, calculated as the preference for the CD1 target over the empty box, were significantly decreased after CSDS in both genotypes (Figure 1B). However, CSDS affected differently SP across groups with VGLUT3<sup>T8I/T8I</sup> mice exhibiting a reduced SP index compared to VGLUT3<sup>+/+</sup> mice (Figure 1B). These findings suggest heightened social avoidance behaviors towards CD1 mice following CSDS exposure in VGLUT3<sup>T8I/T8I</sup> male mice compared to controls. To explore the specificity of this social avoidance, we investigated social preference towards the C57BL/6N (B6) strain using the 3C test (Figure 1C). We found no significant effect of stress or genotype on SP indexes in the B6 strain. To quantify the effects of CSDS on SP for both CD1 and B6 mice, and to compare it between genotypes, we performed a z-score standardization of SP indexes obtained from the SI and 3C tests (34). This statistical approach enabled analysis of social behavioral patterns following CSDS exposure. Within each genotype, z-scored SP was calculated by subtracting the mean of the genotype group's scores pre-CSDS from an individual value of the genotype group's score post-CSDS, and dividing this by the standard deviation from the genotype group's pre-CSDS. This normalization process uncovered notable differences in behavioral responses between genotypes post-CSDS. Specifically, we observed genotype-dependent dynamics of social avoidance, with the p.T8I variant inducing a marked decrease in SP towards CD1 mice in the SI test but no effect on SP towards B6 mice in the 3C test. Consequently, VGLUT3<sup>T8I/T8I</sup> mice exhibited a significant difference in CSDS-induced SP towards CD1 compared to B6 mice (Figure 1D). Categorization based on z-scored SP highlighted the divergent patterns of social avoidance behaviors between VGLUT3<sup>T8I/T8I</sup> and VGLUT3<sup>+/+</sup> mice (Figure 1D). Moreover, we quantified the variability in CSDS-induced effects on SP by calculating delta changes in z-

scored SP between SI and 3C tests. It is striking to note that VGLUT3<sup>+/+</sup> mice exhibited delta changes around 0, indicative of a consistent avoidance pattern towards CD1 and B6 mice, whereas VGLUT3<sup>T8I/T8I</sup> mice displayed delta changes around 3, suggesting a target-dependent social avoidance behavior specific to the CD1 strain (Figure 1D).

The categorization of mice into distinct groups was further revealed through scatter plotting of z-scored social preference data, with delineating red lines indicating lower performances in both tests (Figure 1E). This method revealed two primary groups: mutants exhibiting social avoidance towards CD1 mice but not B6 mice, and control mice demonstrating social avoidance towards B6 mice but not CD1 mice. To assess predictive capability of this classification, multiple logistic regression analysis was conducted, resulting in an 80% probability for wild-type genotype and 86.7% for the mutant genotype. The performance of this classification model was further evaluated through receiver operating characteristic (ROC) curve analysis, demonstrating high accuracy in genotype classification, with an area under the curve (AUC) of 0.9533, and confirmed by the high true-positive and low false-positive rate (Figure 1E). Furthermore, correlation matrix analysis provided insights into the relationship between social behaviors and genotype. The model exhibited a high positive correlation with the SI test (SP for CD1 mice) and a negative correlation with the 3C test (SP for B6 mice), suggesting that the VGLUT3<sup>+/+</sup> genotype is accurately predicted based on decreased SP for B6 mice post-CSDS.

In the EZM test, VGLUT3<sup>T8I/T8I</sup> mice exhibited a significant decrease in the time spent in open arms, indicative of heightened anxiety-like behaviors following CSDS exposure, as compared to VGLUT3<sup>+/+</sup> mice (Figure 1F). Moreover, a finer principal component analysis (PCA) further delineated distinct behavioral phenotypes associated with each genotype, effectively segregating control and mutant mice primarily based on PC1 values, with 79.33 % of variance explained by components 1 and 2 (Figure 1F). The loading values of PC1 indicated that this component increases when SP for CD1 mice is low (SI: -0.72), while the SP for B6 mice and anxiety levels are high (3C: 0.47; EZM: 0.82), thereby reflecting the mutant phenotype.

Together, these findings emphasize the differential impact of CSDS on male mice's social and anxiety-like behaviors. In particular, VGLUT3<sup>T8I/T8I</sup> mice showed enhanced social cue discrimination, characterized by specific social avoidance towards CD1 cues, alongside heightened anxiety-like behaviors.

## **Female mice display a male-mutant-like phenotype regardless of genotype**

We next sought out to investigate the influence of sex and the p.T8I variant on behavioral responses to stress. Female VGLUT3<sup>+/+</sup> and VGLUT3<sup>T8I/T8I</sup> mice underwent identical behavioral assessments as male mice (SI, 3C and EZM) before and after female-adapted CSDS (35, 36) (Figure 2A). In the SI test, post-CSDS, female control mice exhibited a significant reduction in the time spent in the interaction zone, coupled with a significant decline in SP index (Figure 2B). As opposed to male mice, stress exerted a consistent effect on social avoidance behaviors towards CD1 targets in both control and mutant female mice (Figure 2B). Assessing avoidance generalization through the 3C test revealed no discernable effect of stress or genotype (Figure 2C). However, the impact of stress on z-scored SP between SI and 3C tests revealed notable changes in VGLUT3<sup>+/+</sup> mice. It was indeed marked by a decrease in SP towards CD1 while maintaining consistent performance in the 3C test, which in turn suggests a CD1-specific social preference loss (Figure 2D). This pattern was mirrored in VGLUT3<sup>T8I/T8I</sup> mice (Figure 2D). Particularly, delta changes in SP were significantly greater than 0 in both control and mutant female mice, implying a significant CSDS-induced variation between SI and 3C tests, indicative of CD1-specific avoidance. In female mice, the presence of the p.T8I variant did not influence the observed CSDS-induced behavioral phenotypes witnessed in control mice. Rather, all female mice displayed a loss of SP for CD1 but not B6 mice, resembling a male-mutant-like phenotype (Figure 2E). These findings were further supported by logistic analysis, as evidenced by the ROC curve closely resembling the red line revealing the model's inability to accurately predict genotype based on these social scores (Figure 2E). Moreover, the predicted probability around 0.5 accentuated randomness in genotype prediction, confirming that female VGLUT3<sup>+/+</sup> and VGLUT3<sup>T8I/T8I</sup> mice display analogous CSDS-induced behavioral responses. Regarding anxiety-like levels, one week post-CSDS exposure, both control and mutant mice manifested decreased time spent in open arms, with effects persisting for up to one month in both groups (Figure 2F).

## **CSDS-induced behavioral responses are sex-dependent**

Due to distinct behavioral outcomes to CSDS observed between male and female control mice, we aimed to assess sex-dependent behavioral characteristics in response to CSDS. Remarkably, in VGLUT3<sup>+/+</sup> mice, we observed a marked sex-specific disparity in anxiety response. Specifically, one week post-stress exposure, female control mice exhibited a larger decrease in

the time spent in open arms (approximately 50% decrease) compared to male conspecifics (Figure 3A). This emphasizes the heightened anxiety-like levels displayed in female mice following CSDS. Conducting PCA to statistically represent behavioral responses allowed to distinguish between male and female mice (with 82.94% of variance being explained by principal components 1 and 2; Figure 3B). Female mice were associated with negative PC1 values, while male mice exhibited positive values of PC1. The loading values of PC1 suggest that higher SP for CD1 mice (SI: 0.79) coupled with reduced anxiety-like behaviors (EZM: -0.82) and reduced SP for B6 mice (3C: -0.68) were indicative of higher values of PC1, primarily characterizing male mice, with opposite profile delineating the female phenotype. Leveraging z-scored data from the SI and EZM tests, we identified two distinct phenotype clusters: female mice exhibiting reduced SP for CD1 mice in the SI test alongside heightened anxiety-like levels in the EZM test, and male mice predominantly demonstrating unaltered SI scores and anxiety levels (Figure 3C1). These behavioral scores served as robust determinants for constructing an accurate sex-based classification model, evidenced by a negative predictive power of 85.71% and a positive predictive power of 77.78%, corroborated by the ROC AUC of 0.86 (Figure 3C2, 3C3). Further examination through correlation matrix analysis revealed a strong negative correlation between SI and EZM, indicating that as anxiety-like behavior increased, SP for CD1 mice decreased, with this pattern being particularly observed in female mice (Figure 3C4). In conclusion, our findings highlight a sex-dependent distinct phenotype in control mice in response to stress, wherein females demonstrate elevated CSDS-induced anxiety-like levels and a decreased SP for CD1 mice, contrasting with males showing opposite CSDS-induced behavioral responses.

### **The p.T8I variant alters ACh release in the NAc after CSDS**

DA in the NAc has been proposed to encode the valence of social experiences and some studies indicate that ACh release from CINs drive DA release (8, 20, 37, 38). Consequently, we investigated potential associations between ACh and DA within the NAc and social experiences in VGLUT3<sup>T8I/T8I</sup> and VGLUT3<sup>+/+</sup> mice. To achieve this, we bilaterally infused AAVs enabling expression of GRAB-DA3h and GACH3.8 sensors, along with an AAV enabling expression of a non-sensor fluorophore (mCherry), into the NAc medial shell (NAcMsh) of male mutant and control mice. Then, they were implanted with two optic fibers (Figures 4A-C). Monitoring of ACh and DA signals by fiber photometry were conducted on the first (CSDS1) and the last (CSDS10) social defeat of the CSDS and during the SI tests prior to and post-CSDS. Signals

were synchronized with the onset of attacks during CSDS or with nose-touching the box containing the CD1 mouse during the SI test (Figure 4D). Our findings revealed a significant increase in ACh release in response to attack onset on CSDS10 compared to CSDS1 in VGLUT3<sup>+/+</sup> mice, as evidenced by increased AUC and maximum z-scored values (Figure 4E1). Strikingly, this CSDS-induced elevation in ACh release was not observed in mutant mice. This suggests that ACh release at attack onset across the CSDS paradigm did adapt over time in control mice, but not in VGLUT3<sup>T8I/T8I</sup> mice. Conversely, DA signals remained unaltered across the CSDS exposure in both control and mutant mice suggesting that ACh and DA release can be independently regulated in response to social stress in the NAcMsh (Figure 4E2). Furthermore, when ACh and DA signals were time-locked to nose-to-box interaction during the target condition of the SI test, no alterations to ACh or DA signals were observed in control mice after CSDS exposure (Figure 4F). Intriguingly, mutant mice displayed a significant increase in ACh release during post-CSDS SI test (Figure 4F1). As for control mice, VGLUT3<sup>T8I/T8I</sup> mice displayed no significant modification in DA release across the SI test, despite an upwards trend (Figure 4F2). Together, these results suggest that ACh release from CINs within the NAcMsh may signal social encoding of aversive experiences. Furthermore, they underscore the modulatory function of VGLUT3 in this context through the study of the p.T8I variant.

## Discussion

Deciphering maladaptive traumatic responses to stress and elucidating their underlying alterations in the balance of neurotransmitters are critical for prevention and the development of effective treatments. While the modulation of DA signaling in the NAc is well-documented in regulating stress susceptibility and related psychiatric disorders, the contribution of ACh has received less attention (8, 17-20). In the striatum, ACh is primarily released by CINs, which also have the ability to release glutamate *via* VGLUT3 expression (26). Importantly, VGLUT3 not only enables CINs to signal with glutamate but also enhances the uptake of ACh into synaptic vesicles through vesicular synergy (26, 27). Considering ACh and glutamate co-transmission by CINs, along with vesicular synergy, is crucial for understanding the role of ACh in modulating striatal functions. Recently, the VGLUT3-p.T8I variant has been identified in patients with severe substance use disorders (30, 31). Mice carrying this mutation displayed unchanged glutamate signaling, but reduced vesicular synergy and ACh release in the dorsomedial striatum (31). Here, we employed CSDS, a well-established paradigm for examining NAc-dependent stress vulnerability, to explore the effects of this variant on stress-related disorders. Using fiber photometry to uncover neurotransmitter dynamics, we reveal a unique cholinergic signature in the NAc associated with specific social behavioral responses of contrasting adaptiveness to stress. Notably, this signature is influenced by VGLUT3, but only in males, shedding light on the potential NAc mechanisms underlying stress susceptibility.

We first investigated the impact of the p.T8I variant on CSDS-induced behavioral changes in both male and female mice. We observed pronounced behavioral differences in stress-induced social responses in male. Specifically, mice carrying the p.T8I variant displayed heightened social avoidance towards threat-cues mice with intact social preference for B6 mice, along with increased anxiety-like behavior following CSDS. Enhanced social avoidance toward threat-cues mice in the SI test post-CSDS is commonly interpreted as indicative of greater susceptibility to CSDS (18). Based on this classification, the majority of VGLUT3<sup>T8I/T8I</sup> mice fall under the categorization of susceptible to social stress. However, recent research has questioned the CSDS model and suggested that it rather models aversive conditioning (39). The classification of susceptible and resilience therefore was revisited, by investigating social interactions towards both threat- and safe-cues (other mice strains such as C57BL/6J) (39). Following CSDS, mice that show intact aversive learning characterized by social avoidance

towards threat-cues (CD-1 mice) along with intact threat-safety discrimination characterized by unaltered social approach towards B6 mice are considered to display adaptive responses similar to human resilience. In contrast, CSDS induced maladaptive responses in mice showing intact aversive learning but generalized social avoidance, as seen here in control male mice. This maladaptive response reflects impaired threat-cue discrimination, emphasizing the necessity of redefining resilience as behavior that adapts relative to the context (34, 39, 40). Given that the p.T8I variant enhances the learning of threat-associated cues and discrimination between threat and safe cues in male mice, it may be considered as a protective factor promoting certain adaptive responses to social stress. Future investigations should validate this hypothesis across different learning paradigms, such as Pavlovian fear conditioning. This heightened discrimination of social cues following CSDS aligns with previous research indicating altered reward learning in male mice carrying the p.T8I variant (31). Specifically, mutant mice displayed excessive habit formation and a more gradual escalation compared to control mice in behaviors associated with reward, such as cocaine self-administration. However, male mice with the p.T8I variant exhibit enhanced reinstatement after extinction in this paradigm, potentially reflecting strengthened memory processes, reported to be associated with the reactivation of engram cells in the context of cocaine exposure and Pavlovian learning (41-44).

Because ACh and DA in the NAc have been involved in associative learning and CSDS susceptibility, we recorded their dynamics in the NAc during stress exposure of male mutant and control mice (8, 13, 15-17, 20, 24-25, 45, 46). In control male mice, attack-induced ACh release on the final day of CSDS, but not on the first day, are likely due to ongoing adaptations in the NAc that shape behavioral outcomes to chronic stress. Notably, after CSDS, control male mice exhibited a reduced social avoidance towards CD-1 conspecifics compared to mutant mice, a trait often associated with resilience (18). Considering evidence indicating that silencing CINs increases stress susceptibility (i.e. social CD-1 avoidance), it is likely that the observed increase in ACh release during the tenth day of CSDS in control mice may modulate social approach towards social threat cues in this context (24,25). Accordingly, mutant male mice exhibited higher social avoidance towards threat cues in the SI test, but no significant changes in ACh dynamics across CSDS. Another potential interpretation arises from data suggesting that CSDS induces cue-dependent aversive learning with mice efficiently discriminating between threat- and safe-cues exhibiting adapted behavior, while others generalize the threat response to safe cues, indicating an inability to adaptively respond to chronic stress displaying maladaptive behavior (39). Here, mutant male mice presented higher threat-safety

discrimination after CSDS compared to controls suggesting that the pT8I variant might be protective against stress-induced effects. The mechanisms underlying differences in threat discrimination across the two genotypes may involve ACh dynamics in the NAc during CSDS. Accordingly, attack-induced ACh release on the tenth day of CSDS, but not on the first day, might contribute to a strong encoding of threat-cue salience in control male mice (45, 47). This could lead to diminished discrimination of social cues and a higher rate of generalization post-CSDS. In contrast, absence of sensitized ACh response across CSDS in mutant male mice may result in enhanced social cue discrimination. This hypothesis is supported by existing literature reporting that ACh release encodes stimulus salience (45, 47). Furthermore, stress-scaling of ACh dynamics in the NAc is critical to Pavlovian fear conditioning learning (48). Further research aiming at inhibiting sensitized attack-induced ACh release in NAc is necessary to test our hypothesis. Another striking difference in ACh dynamics between genotypes emerged during the SI test with increased ACh release during approach toward the social threat after CSDS solely in mutant male mice. Since ACh signaling in the NAc has been reported to play a role in aversive learning, thus, enhanced ACh signaling during social approach might reflect better encoding of aversive stimuli, as indicated by the negative SI index after CSDS, in mutant male mice (48).

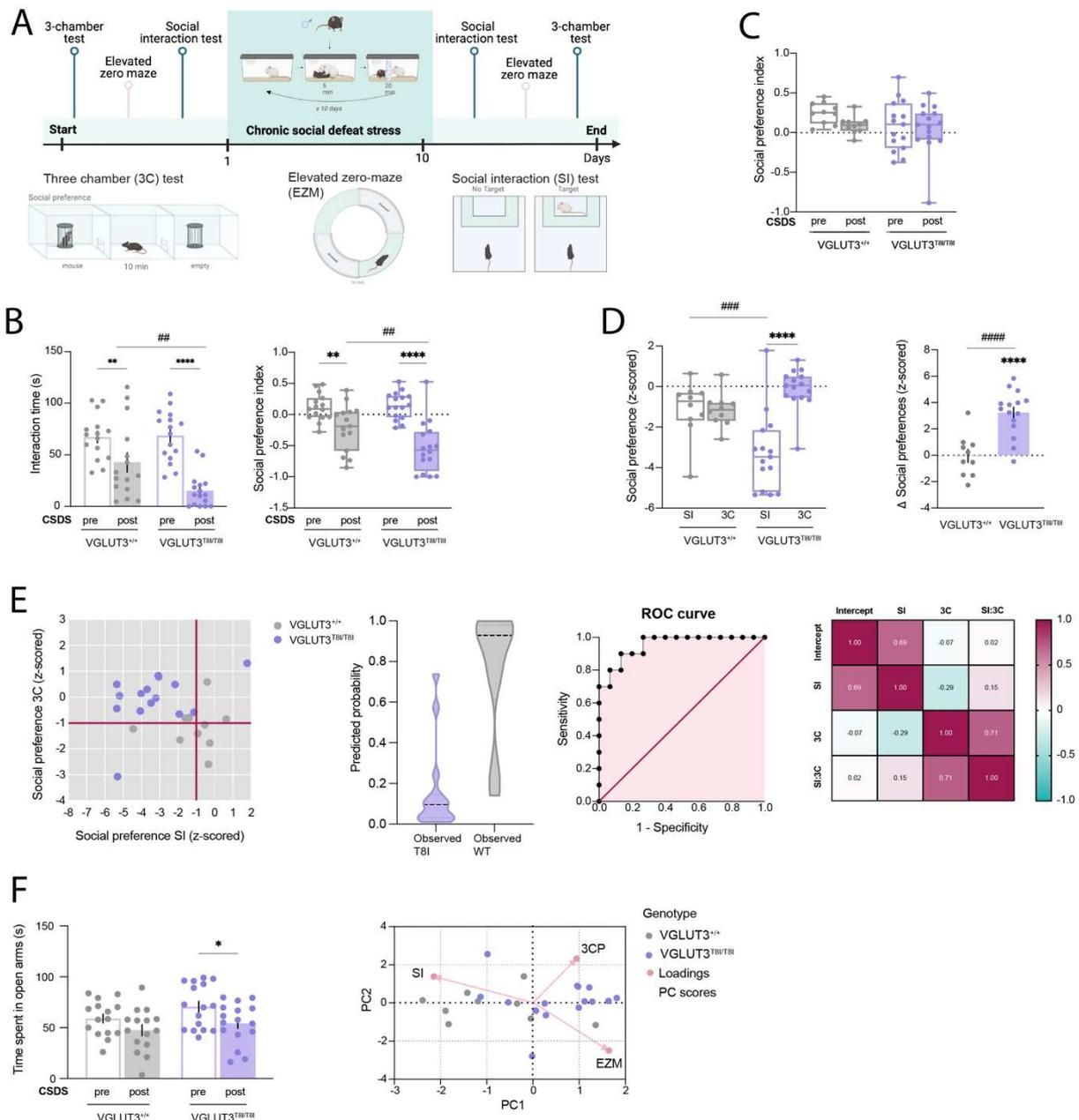
Although VTA(DA)-NAc and DA release are known to drive stress susceptibility, our study found no change in DA release in the NAcMsh during both CSDS and SI tests across different genotypes and time points (8, 17, 19, 20). These findings differ from a previous study showing reduced DA signaling in the NAc core at the onset of attacks (20). However, DA dynamics vary across distinct NAc subregions, with the NAc core and lateral shell implicated in reward and aversion, while the medial shell is associated with signaling state value (8, 20, 44, 49). In the striatum, ACh and DA have been proposed to influence each other within *in vitro* studies showing direct positive influence of ACh on DA release (38, 50). However, *in vivo* evidence has uncovered more intricate relationships between DA and ACh. For instance, ACh and DA signals in the dorsal striatum of mice have been shown to be driven by separate inputs despite being coordinated (16). Similarly, ACh release from CINs does not impact DA dynamics during reward-based decision making in the dorsal striatum (13). Our findings also suggest independent regulation of DA and ACh dynamics in the NAcMsh, as evidenced by increased ACh but not DA signal at attack onset on the 10<sup>th</sup> day of CSDS in control male mice and at social approach in SI tests in mutant male mice. This also aligns with the opposed effects of ACh on DA release, contingent upon the firing patterns of DA terminals, and considering that

tonic firing is associated with social approach whereas phasic firing with social avoidance, this may account for the similar DA dynamics observed across different genotypes (19, 51).

Finally, we report sex-specific responses to CSDS. Unlike male counterparts, female mice exhibited behavioral patterns similar to those observed in mutant males, regardless of their genotype. These patterns were characterized by a specific reduction in social preference for threat cues, suggesting appropriate threat-safe discrimination, alongside elevated anxiety levels. Considering the correlation between behavioral differences in mutant and control males and ACh dynamics in the NAc during CSDS, the observed variance in behavior between male and female control mice may also imply differences in ACh response. Differential cholinergic signaling is observed between sexes, particularly given the regulatory influence of estrogen on ACh dynamics (52, 53). However, additional confirmation is necessary through future investigations.

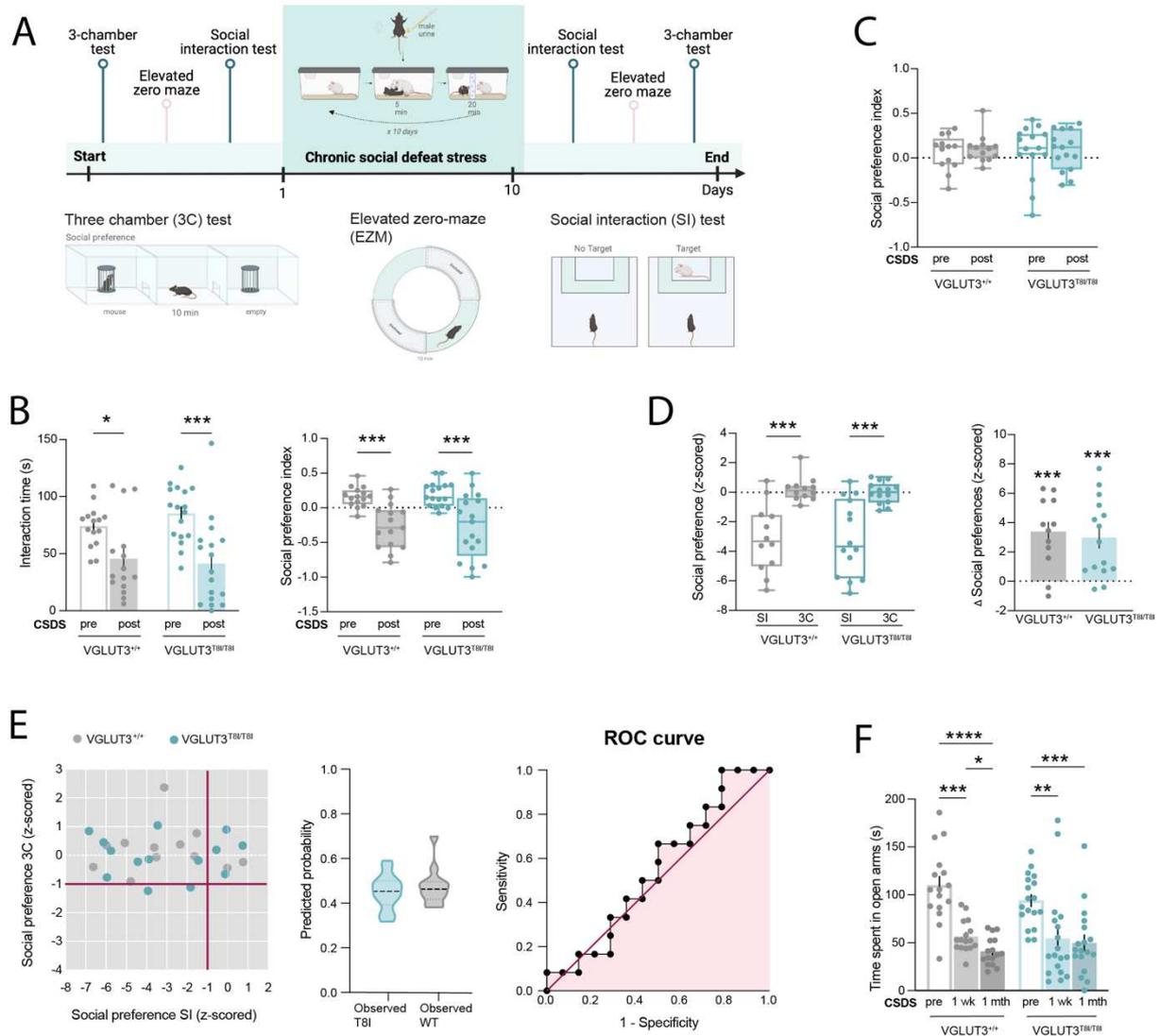
In summary, our study reports for the first time the progressive modulation of ACh release in the NAcMsh in response to social defeat, which correlates with impaired threat-safe discrimination, indicative of maladaptive behavior. Through a multidisciplinary approach encompassing behavioral and neurochemical analyses, we aimed to elucidate the intricate relationship between the p.T8I variant associated with reduced cholinergic transmission within the NAcMsh and susceptibility to stress. Future investigations should aim to enhance our comprehension of resilience by integrating contextual notions of adaptive behavior and incorporating emerging insights on aversive learning. The insights obtained from this research have significant translational value for the development of targeted therapeutic interventions aimed at restoring aberrant ACh signaling pathways, although its causal implication in stress-related psychiatric disorders is yet to be confirmed. In essence, our results underscore the pivotal influence of genetic determinants, particularly the p.T8I variant, and sex in shaping stress responsiveness in murine models.

## Figures



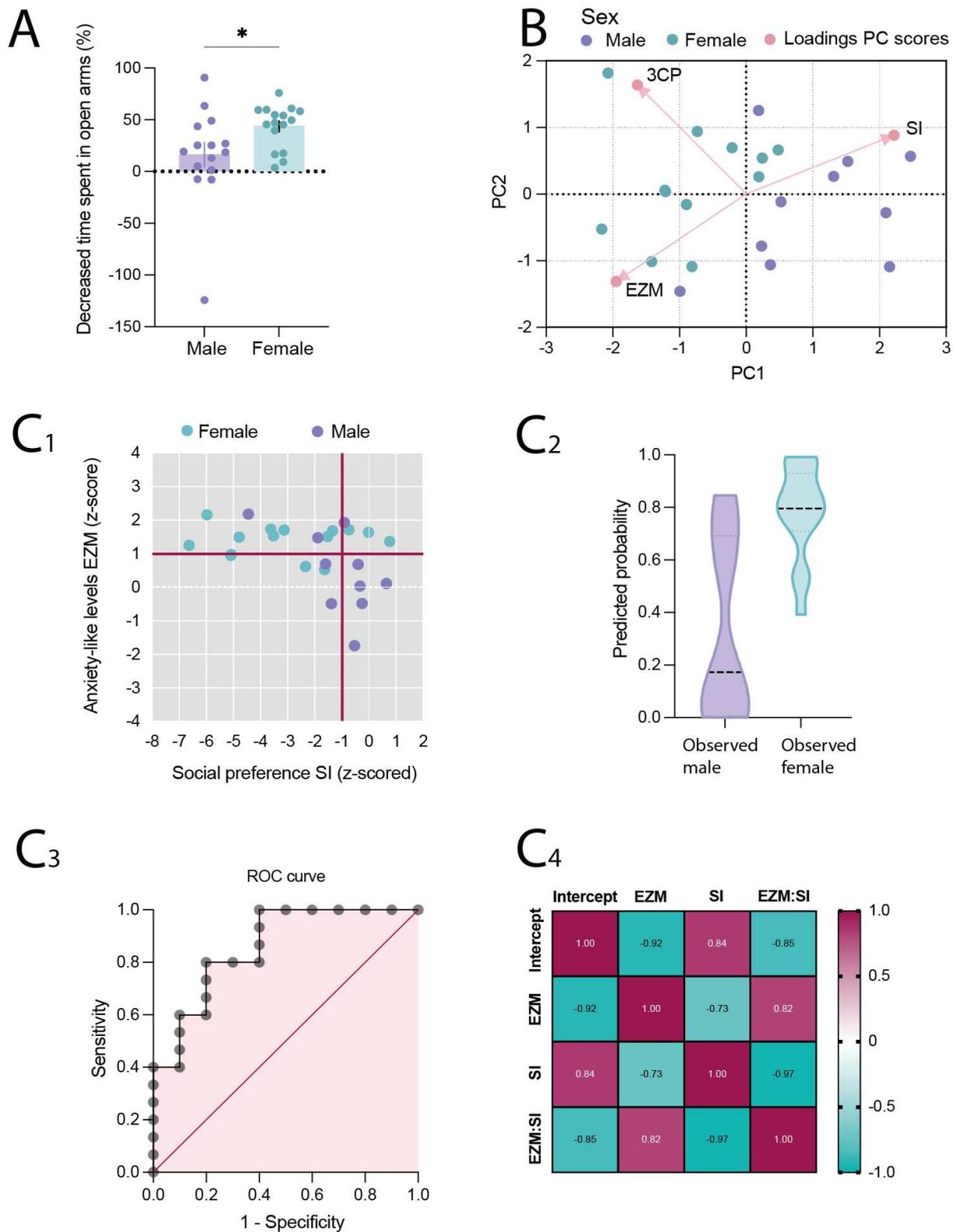
**Figure 1. The p.T81 variant confers an enhanced social cue discrimination and higher anxiety-like levels following CSDS in male mice.** (A) Experimental design and tests timeline pre- and post-CSDS for male mice. (B-F)  $VGLUT3^{+/+}$  and  $VGLUT3^{T81/T81}$  mice present distinct CSDS-induced social alterations. (B) An overall stress effect is observed for SI and SP ( $F(1,29)=51.62$ ,  $p<0.0001$ ;  $F(1,29)=55.88$ ,  $p<0.0001$  respectively) with  $VGLUT3^{T81/T81}$  mice (purple) showing a larger decreased SI time ( $p<0.0001$  vs.  $P=0.002$ ) and SP ( $p<0.0001$  vs.  $p=0.002$ ) for CD1 mice post-CSDS compared to  $VGLUT3^{+/+}$  mice (grey). (C) SP indexes for B6 mice pre- and post-CSDS. Only  $VGLUT3^{+/+}$  mice (grey) show positive social preference index pre and post CSDS ( $t=5.853$ ,  $df=9$ ,  $p=0.0002$ ;  $t=2.63$ ,  $df=9$ ,  $p=0.03$  respectively compared to 0). (D-E) Z-scored normalization of CSDS-induced effects on SP in SI and 3C tests indicates distinct target-dependent responses across genotypes (D)  $VGLUT3^{T81/T81}$  mice exhibited distinct CSDS-induced social avoidance behaviors towards CD1 (SI test) and B6 (3C test) mice (test x genotype interaction:  $F(1,23)=22.54$ ,  $p<0.0001$  and test effect  $F(1,23)=21.18$ ,  $p=0.0001$ ; post

hoc  $P < 0.0001$ ) with significant delta changes between both tests compared to VGLUT3<sup>+/+</sup> mice ( $t = 4.748$ ,  $df = 23$ ,  $p < 0.0001$ , unpaired t test;  $t = 7.145$ ,  $df = 14$ ,  $p < 0.0001$ , one sample t test for VGLUT3<sup>T8I/T8I</sup> mice). **(E)** Scatterplot and multiple logistic regression of SP in the SI (odds ratio estimate = 2.49,  $p = 0.0475$ ) and in the 3C (odds ratio estimate = 0.07430,  $p = 0.0206$ ) tests showing a clear separation between VGLUT3<sup>+/+</sup> and VGLUT3<sup>T8I/T8I</sup> mice (Tjur's R squared = 0.6135,  $p = 0.8152$ , Hosmer-Lemeshow test) and predictive logistic regression model's probabilities (86.67% negative predictive power, 80% positive predictive power), ROC curve (area = 0.9533,  $p = 0.0002$ ) and covariance matrix. **(F)** VGLUT3<sup>T8I/T8I</sup> mice display decreased time spent in open arms in the EZM post-CSDS (stress effect:  $F(1,29) = 8.862$ ,  $p = 0.006$ ; post hoc  $p = 0.03$ ). PCA scores plot with loading values along PC1 (cumulative proportion of variance: 47.11%) and PC2 (cumulative proportion of variance: 79.33%) showing distinct genotype-dependent clusters. Each point represents one animal. CSDS: chronic social defeat; 3C: three chamber; SI: social interaction; EZM: elevated zero maze; SP: social preference; PCA: principal component analysis; PC: principal component.



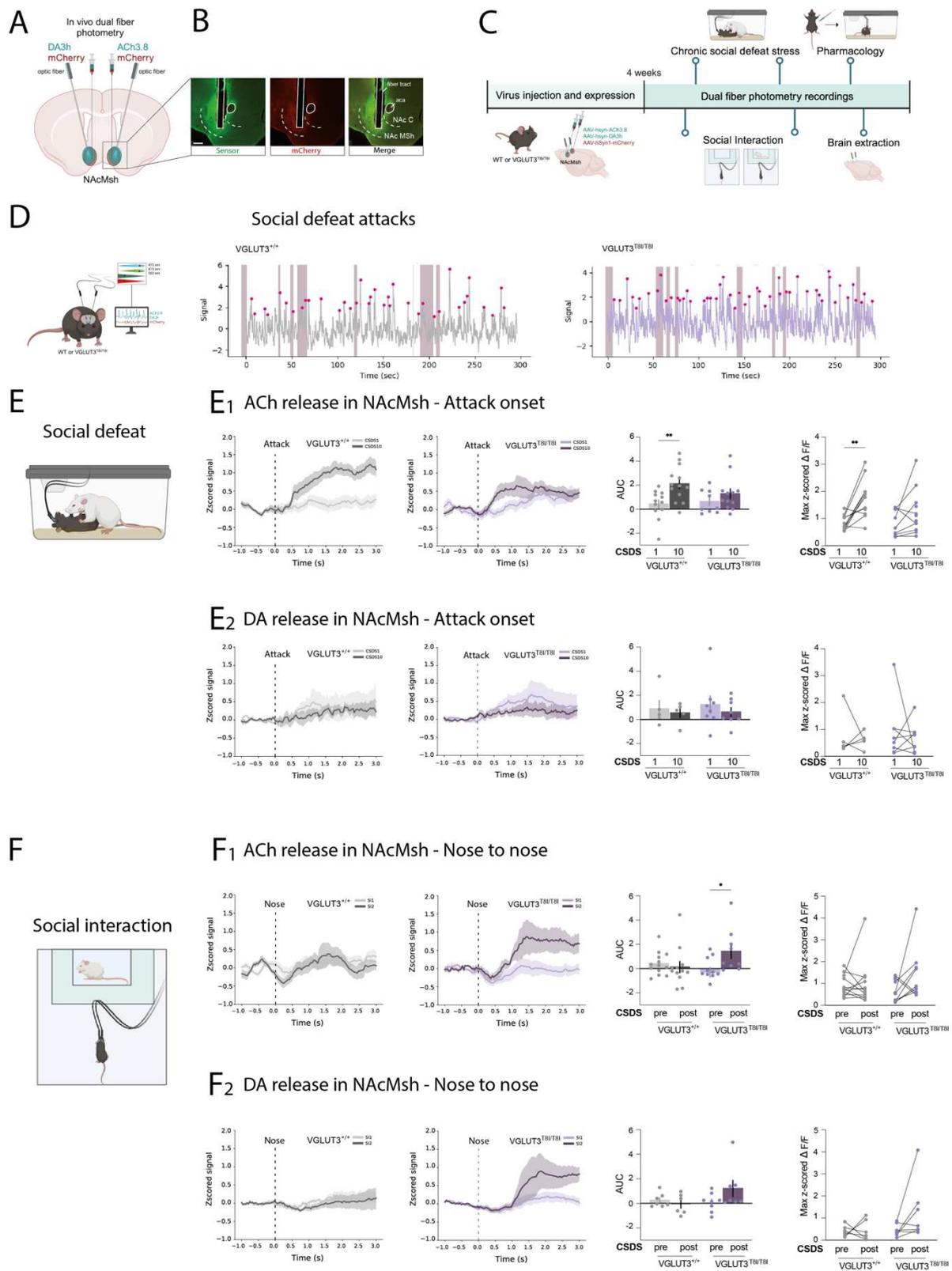
**Figure 2. Female mice display a male-mutant-like phenotype regardless of genotype.** (A) Experimental design and tests timeline pre- and post-CSDS for female mice. (B) SI time and SP for CD1 mice are decreased in both VGLUT3<sup>+/+</sup> (grey) and VGLUT3<sup>T81/T81</sup> (blue) mice post-CSDS (stress effect: SI:  $F(1,30)=21$ ,  $p<0.0001$ , post hoc for VGLUT3<sup>+/+</sup>  $p=0.04$  and for VGLUT3<sup>T81/T81</sup>  $p=0.0007$ ; SP:  $F(1,30)=37.74$ ,  $p<0.0001$ ; post hoc for VGLUT3<sup>+/+</sup>  $p=0.0007$  and for VGLUT3<sup>T81/T81</sup>  $p=0.0001$ ). (C) SP indexes for B6 mice pre- and post-CSDS. Only VGLUT3<sup>+/+</sup> mice (grey) show positive social preference index post CSDS ( $t=2.34$ ,  $df=12$ ,  $p=0.04$  compared to 0). (D-E) Z-scored normalization of CSDS-induced effects on SP in SI and 3C tests indicates similar target-specific responses in both genotypes. (D) CSDS induces the same changes in SP for CD1 and B6 mice across genotypes (test effect:  $F(1,24)=40.32$ ,  $p<0.0001$ ; post hoc for both genotypes  $p=0.0003$ ). Both VGLUT3<sup>+/+</sup> and VGLUT3<sup>T81/T81</sup> mice show a significant delta changes between both tests (VGLUT3<sup>+/+</sup>:  $t=4.757$ ,  $df=11$ ,  $p=0.0006$ ; VGLUT3<sup>T81/T81</sup>:  $t=4.294$ ,  $df=14$ ,  $p=0.0007$ , one sample t test). (E) Scatterplot and multiple logistic regression of the SP in the SI (odds ratio estimate=0.9976,  $p=0.9889$ ) and in the 3C (odds ratio estimate=1.873,  $p=0.5848$ ) tests showing no separation between VGLUT3<sup>+/+</sup> and VGLUT3<sup>T81/T81</sup> mice (Tjur's R squared=0.02478,  $p=0.8483$ , Hosmer-Lemeshow test) and predictive logistic regression model's probabilities (52.38% negative predictive power, 40% positive predictive power), ROC curve (area=0.5476,  $p=0.6807$ ) and covariance matrix. (F) CSDS decreased time spent in open arms

in the EZM for up to one month in both genotypes (stress effect:  $F(1.831,58.61)=48.67$ ,  $p<0.0001$ ). CSDS: chronic social defeat; 3C: three chamber; SI: social interaction; EZM: elevated zero maze; SP: social preference.



**Figure 3. CSDS-induced behavioral responses are sex-dependent. (A)** Female  $VGLUT3^{+/+}$  (blue) mice show greater CSDS-induced decreased time spent in open arms (%) compared to male  $VGLUT3^{+/+}$  (purple) mice ( $t=2.117$ ,  $df=29$ ,  $p=0.04$ ). **(B)** PCA score plot with loading values showing distinct sex-dependent clusters depending on anxiety-like levels (EZM) and SP for CD1 mice (SI test) through PC1 (cumulative proportion of variance: 58.61%) and PC2 (cumulative proportion of variance: 82.94%). **(C1)** Scatterplot and multiple logistic

regression of the SP in the SI test (odds ratio estimate=0.09513,  $p=0.0750$ ) and anxiety levels (odds ratio estimate=22.92,  $p=0.0475$ ) showing a clear separation between male and female mice (Tjur's R squared=0.4584,  $p=0.8033$ , Hosmer-Lemeshow test), **(C2)** and predictive logistic regression model's probabilities (85.71% negative predictive power, 77.78% positive predictive power), **(C3)** ROC curve (area=0.8600,  $p=0.0027$ ), **(C4)** and covariance matrix.



**Figure 4. The p.T8I variant alters the CSDS-induced temporal modulation of ACh levels in the NAc. (A)** Schematic representation of GRAB-DA3h and GCh3.8 viral injections in the NAcMsh and optic fibers implantation. **(B)** Representative image of injection site. Representative images of the NAc showing optic fiber location and expression of the sensor (green), mCherry (red) and both (merge). Scale bar = 200  $\mu$ m. Abbreviations: Aca: anterior commissure; NAc, nucleus accumbens; NAc C: nucleus accumbens core ; NAc MSh : nucleus

accumbens medial shell. **(C)** Experimental design and fiber photometry recordings timeline in male mice. **(D)** Representative traces of z-scored  $\Delta F/F$  GCh3.8 during social defeat from one example VGLUT3<sup>+/+</sup> (grey) and one VGLUT3<sup>T8I/T8I</sup> (purple) mouse. Attack behavior corresponds to the shaded color. **(E)** Representation of ACh **(E1)** and DA **(E2)** release in NAcMsh at attack onset. **(E1)** CSDS induces an increased ACh response on CSDS10 compared to CSDS1 only in VGLUT3<sup>+/+</sup> mice (AUC analysis: time effect:  $F(1,42)=9.041$ ,  $p=0.004$ ; VGLUT3<sup>+/+</sup> post hoc,  $p=0.005$ ; Max z-scored  $\Delta F/F$ : time effect:  $F(1,18)=16.26$ ,  $p=0.0008$ ; VGLUT3<sup>+/+</sup> post hoc,  $p=0.0016$ ) and **(E2)** no changes in DA signals. **(F)** Representation of ACh **(F1)** and DA **(F2)** release in NAcMsh at nose to nose contact. **(F1)** CSDS induces an increased ACh response during nose touching in the SI test in VGLUT3<sup>T8I/T8I</sup> mice only (AUC analysis: time x genotype interaction:  $F(1,19)=5.848$ ,  $p=0.02$ ; VGLUT3<sup>T8I/T8I</sup> post hoc,  $p=0.02$ ) with **(F2)** no DA changes.

## **Acknowledgments and Disclosures**

We thank the IBPS Animal facility for breeding and care, the IBPS-NPS Phenotypic core facility, especially Jean Vincent; Jean-François Gilles and France Lam from the Photon microscopy facility of the Institut de Biologie Paris-Seine (Sorbonne Université); Aquineuro and especially Sebastien Delcasso and Rémi Proville for their valuable scientific insights and support for fiber photometry pipeline analysis; and undergraduate students Khadija Laurent-Haond and Lucille Boyer, for technical help.

Figures created with BioRender.com.

### **Fundings:**

This research was supported by funds from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Sorbonne Université and Fédération pour la Recherche sur le Cerveau (FRC 2019; Le cerveau agressé par son environnement). MP has benefited from support by the French Ministry of Research and by the Société Française de Recherche et Médecine du Sommeil (SFRMS). These funders had no role in the study design, data collection, and analysis, decision to publish, and preparation of the manuscript.

## References

1. Russo, S. J., Murrough, J. W., Han, M. H., Charney, D. S., & Nestler, E. J. (2012). Neurobiology of resilience. *Nature neuroscience*, *15*(11), 1475-1484.
2. Dean, J., & Keshavan, M. (2017). The neurobiology of depression: An integrated view. *Asian journal of psychiatry*, *27*, 101-111.
3. American Psychiatric Association, D. S. M. T. F., & American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5* (Vol. 5, No. 5). Washington, DC: American psychiatric association.
4. Kalisch, R., Baker, D. G., Basten, U., Boks, M. P., Bonanno, G. A., Brummelman, E., ... & Kleim, B. (2017). The resilience framework as a strategy to combat stress-related disorders. *Nature human behaviour*, *1*(11), 784-790.
5. Charney, D. S. (2004). Psychobiological mechanisms of resilience and vulnerability: implications for successful adaptation to extreme stress. *American journal of Psychiatry*, *161*(2), 195-216.
6. Southwick, S. M., Bonanno, G. A., Masten, A. S., Panter-Brick, C., & Yehuda, R. (2014). Resilience definitions, theory, and challenges: interdisciplinary perspectives. *European journal of psychotraumatology*, *5*(1), 25338.
7. Billings, A. G., & Moos, R. H. (1984). Coping, stress, and social resources among adults with unipolar depression. *Journal of personality and social psychology*, *46*(4), 877.
8. Willmore, L., Cameron, C., Yang, J., Witten, I. B., & Falkner, A. L. (2022). Behavioural and dopaminergic signatures of resilience. *Nature*, *611*(7934), 124-132.
9. Wood, S. K., Walker, H. E., Valentino, R. J., & Bhatnagar, S. (2010). Individual differences in reactivity to social stress predict susceptibility and resilience to a depressive phenotype: role of corticotropin-releasing factor. *Endocrinology*, *151*(4), 1795-1805.
10. Southwick, S.M., Charney, D.S., and DePierro, J.M. (2023). Resilience: the Science of Mastering Life's Greatest Challenges, 3<sup>rd</sup> edition (Cambridge University Press).
11. Cragg, S. J. (2006). Meaningful silences: how dopamine listens to the ACh pause. *Trends in neurosciences*, *29*(3), 125-131.
12. Berke, J. D. (2018). What does dopamine mean?. *Nature neuroscience*, *21*(6), 787-793.
13. Chantranupong, L., Beron, C. C., Zimmer, J. A., Wen, M. J., Wang, W., & Sabatini, B. L. (2023). Dopamine and glutamate regulate striatal acetylcholine in decision-making. *Nature*, *621*(7979), 577-585.
14. Prado, V. F., Janickova, H., Al-Onaizi, M. A., & Prado, M. A. (2017). Cholinergic circuits in cognitive flexibility. *Neuroscience*, *345*, 130-141.
15. Bradfield, L. A., Bertran-Gonzalez, J., Chieng, B., & Balleine, B. W. (2013). The thalamostriatal pathway and cholinergic control of goal-directed action: interlacing new with existing learning in the striatum. *Neuron*, *79*(1), 153-166.
16. Krok, A. C., Maltese, M., Mistry, P., Miao, X., Li, Y., & Tritsch, N. X. (2023). Intrinsic dopamine and acetylcholine dynamics in the striatum of mice. *Nature*, *621*(7979), 543-549.
17. Chaudhury, D., Walsh, J. J., Friedman, A. K., Juarez, B., Ku, S. M., Koo, J. W., ... & Han, M. H. (2013). Rapid regulation of depression-related behaviours by control of midbrain dopamine neurons. *Nature*, *493*(7433), 532-536.
18. Krishnan, V., Han, M. H., Graham, D. L., Berton, O., Renthal, W., Russo, S. J., ... & Nestler, E. J. (2007). Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell*, *131*(2), 391-404.
19. Cao, J. L., Covington, H. E., Friedman, A. K., Wilkinson, M. B., Walsh, J. J., Cooper, D. C., ... & Han, M. H. (2010). Mesolimbic dopamine neurons in the brain reward circuit

- mediate susceptibility to social defeat and antidepressant action. *Journal of Neuroscience*, 30(49), 16453-16458.
20. Dai, B., Sun, F., Tong, X., Ding, Y., Kuang, A., Osakada, T., ... & Lin, D. (2022). Responses and functions of dopamine in nucleus accumbens core during social behaviors. *Cell reports*, 40(8).
  21. Friedman, A. K., Walsh, J. J., Juarez, B., Ku, S. M., Chaudhury, D., Wang, J., Li, X., Dietz, D. M., Pan, N., Vialou, V. F., Neve, R. L., Yue, Z., & Han, M. H. (2014). Enhancing depression mechanisms in midbrain dopamine neurons achieves homeostatic resilience. *Science*, 344(6181), 313–319.
  22. Qi, G., Zhang, P., Li, T., Li, M., Zhang, Q., He, F., ... & Tian, B. (2022). NAc-VTA circuit underlies emotional stress-induced anxiety-like behavior in the three-chamber vicarious social defeat stress mouse model. *Nature communications*, 13(1), 577.
  23. Barik, J., Marti, F., Morel, C., Fernandez, S. P., Lanteri, C., Godeheu, G., ... & Tronche, F. (2013). Chronic stress triggers social aversion via glucocorticoid receptor in dopaminergic neurons. *Science*, 339(6117), 332-335.
  24. Warner-Schmidt, J. L., Schmidt, E. F., Marshall, J. J., Rubin, A. J., Arango-Lievano, M., Kaplitt, M. G., ... & Greengard, P. (2012). Cholinergic interneurons in the nucleus accumbens regulate depression-like behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(28), 11360-11365.
  25. Cheng, J., Umschweif, G., Leung, J., Sagi, Y., & Greengard, P. (2019). HCN2 channels in cholinergic interneurons of nucleus accumbens shell regulate depressive behaviors. *Neuron*, 101(4), 662-672.
  26. Gras, C., Amilhon, B., Lepicard, E. M., Poirel, O., Vinatier, J., Herbin, M., ... & Mestikawy, S. E. (2008). The vesicular glutamate transporter VGLUT3 synergizes striatal acetylcholine tone. *Nature neuroscience*, 11(3), 292-300.
  27. El Mestikawy, S., Wallén-Mackenzie, Å., Fortin, G. M., Descarries, L., & Trudeau, L. E. (2011). From glutamate co-release to vesicular synergy: vesicular glutamate transporters. *Nature Reviews Neuroscience*, 12(4), 204-216.
  28. Favier, M., Janickova, H., Justo, D., Kljakic, O., Runtz, L., Natsheh, J. Y., ... & El Mestikawy, S. (2020). Cholinergic dysfunction in the dorsal striatum promotes habit formation and maladaptive eating. *The Journal of clinical investigation*, 130(12), 6616-6630.
  29. Higley, M. J., Gittis, A. H., Oldenburg, I. A., Balthasar, N., Seal, R. P., Edwards, R. H., ... & Sabatini, B. L. (2011). Cholinergic interneurons mediate fast VGLUT3-dependent glutamatergic transmission in the striatum. *PloS one*, 6(4), e19155.
  30. Sakae, D. Y., Marti, F., Lecca, S., Vorspan, F., Martín-García, E., Morel, L. J., ... & El Mestikawy, S. (2015). The absence of VGLUT3 predisposes to cocaine abuse by increasing dopamine and glutamate signaling in the nucleus accumbens. *Molecular psychiatry*, 20(11), 1448-1459.
  31. Favier, M., Martin Garcia, E., Ickick, R., de Almeida, C., Jehl, J., Desplanque, M., Zimmermann, J., Henrion, A., Mansouri-Guilani, N., Mounier, C., Ribeiro, S., Henderson, F., Geoffroy, A., Mella, S., Poirel, O., Bernard, V., Fabre, V., Li, Y., Rosenmund, C., Jamain, S., ... El Mestikawy, S. (2024). The human VGLUT3-pT8I mutation elicits uneven striatal DA signaling, food or drug maladaptive consumption in male mice. *Nature communications*, 15(1), 5691.
  32. Challis, C., Boulden, J., Veerakumar, A., Espallergues, J., Vassoler, F. M., Pierce, R. C., ... & Berton, O. (2013). Raphe GABAergic neurons mediate the acquisition of avoidance after social defeat. *Journal of Neuroscience*, 33(35), 13978-13988.
  33. Henderson, F., Vialou, V., El Mestikawy, S., & Fabre, V. (2017). Effects of social defeat stress on sleep in mice. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 11, 227.

34. Li, H., Kawatake-Kuno, A., Inaba, H., Miyake, Y., Itoh, Y., Ueki, T., ... & Uchida, S. (2024). Discrete prefrontal neuronal circuits determine repeated stress-induced behavioral phenotypes in male mice. *Neuron*.
35. Harris, A. Z., Atsak, P., Bretton, Z. H., Holt, E. S., Alam, R., Morton, M. P., ... & Gordon, J. A. (2018). A novel method for chronic social defeat stress in female mice. *Neuropsychopharmacology*, 43(6), 1276-1283.
36. van Doeselaar, L., Yang, H., Bordes, J., Brix, L., Engelhardt, C., Tang, F., & Schmidt, M. V. (2021). Chronic social defeat stress in female mice leads to sex-specific behavioral and neuroendocrine effects. *Stress*, 24(2), 168-180.
37. Chuhma, N., Mingote, S., Kalmbach, A., Yetnikoff, L., & Rayport, S. (2017). Heterogeneity in dopamine neuron synaptic actions across the striatum and its relevance for schizophrenia. *Biological psychiatry*, 81(1), 43-51.
38. Threlfell, S., Lalic, T., Platt, N. J., Jennings, K. A., Deisseroth, K., & Cragg, S. J. (2012). Striatal dopamine release is triggered by synchronized activity in cholinergic interneurons. *Neuron*, 75(1), 58-64.
39. Ayash, S., Lingner, T., Ramisch, A., Ryu, S., Kalisch, R., Schmitt, U., & Müller, M. B. (2023). Fear circuit-based neurobehavioral signatures mirror resilience to chronic social stress in mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(17), e2205576120.
40. Bordes, J., Miranda, L., Müller-Myhsok, B., & Schmidt, M. V. (2023). Advancing social behavioral neuroscience by integrating ethology and comparative psychology methods through machine learning. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 105243.
41. Reijmers, L. G., Perkins, B. L., Matsuo, N., & Mayford, M. (2007). Localization of a stable neural correlate of associative memory. *Science*, 317(5842), 1230-1233.
42. Khalaf, O., Resch, S., Dixsaut, L., Gorden, V., Glauser, L., & Gräff, J. (2018). Reactivation of recall-induced neurons contributes to remote fear memory attenuation. *Science*, 360(6394), 1239-1242.
43. Sallery, M., Godino, A., Xu, Y. Q., Fullard, J. F., Durand-de Cuttoli, R., LaBanca, A. R., ... & Nestler, E. J. (2023). Transcriptional correlates of cocaine-associated learning in striatal ARC ensembles. *bioRxiv*, 2023-12.
44. de Jong, J. W., Liang, Y., Verharen, J. P., Fraser, K. M., & Lammel, S. (2024). State and rate-of-change encoding in parallel mesoaccumbal dopamine pathways. *Nature Neuroscience*, 1-10.
45. Aosaki, T., Graybiel, A. M., & Kimura, M. (1994). Effect of the nigrostriatal dopamine system on acquired neural responses in the striatum of behaving monkeys. *Science*, 265(5170), 412-415.
46. Zhang, Y., Zhu, Y., Cao, S. X., Sun, P., Yang, J. M., Xia, Y. F., ... & Li, X. M. (2020). MeCP2 in cholinergic interneurons of nucleus accumbens regulates fear learning. *Elife*, 9, e55342.
47. Ravel, S., Legallet, E., & Apicella, P. (2003). Responses of tonically active neurons in the monkey striatum discriminate between motivationally opposing stimuli. *Journal of Neuroscience*, 23(24), 8489-8497.
48. Belilos, A., Gray, C., Sanders, C., Black, D., Mays, E., Richie, C., ... & Francis, T. C. (2023). Nucleus accumbens local circuit for cue-dependent aversive learning. *Cell reports*, 42(12).

49. Yuan, L., Dou, Y. N., & Sun, Y. G. (2019). Topography of reward and aversion encoding in the mesolimbic dopaminergic system. *Journal of Neuroscience*, 39(33), 6472-6481.
50. Cachope, R., Mateo, Y., Mathur, B. N., Irving, J., Wang, H. L., Morales, M., ... & Cheer, J. F. (2012). Selective activation of cholinergic interneurons enhances accumbal phasic dopamine release: setting the tone for reward processing. *Cell reports*, 2(1), 33-41.
51. Zhang, H., & Sulzer, D. (2004). Frequency-dependent modulation of dopamine release by nicotine. *Nature neuroscience*, 7(6), 581-582.
52. Gibbs, R. B. (1996). Fluctuations in relative levels of choline acetyltransferase mRNA in different regions of the rat basal forebrain across the estrous cycle: effects of estrogen and progesterone. *Journal of Neuroscience*, 16(3), 1049-1055.
53. Razidlo, J. A., Fausner, S. M., Ingebretson, A. E., Wang, L. C., Petersen, C. L., Mirza, S., ... & Lemos, J. C. (2022). Chronic loss of muscarinic M5 receptor function manifests disparate impairments in exploratory behavior in male and female mice despite common dopamine regulation. *Journal of Neuroscience*, 42(36), 6917-6930.

## Supplementary Materials and Methods

### *Mice*

Experiments adhered to the European directive on the protection of animals used for scientific purposes (European Committee Council Directive 2010/63/EU) and were in compliance with the French Ministère de l'Agriculture et de la Forêt, Service Vétérinaire de la Santé et de la Protection Animale (authorization #31718-2021051822188705 from ethics committee Darwin CEEA #5). VGLUT3<sup>+/+</sup> and VGLUT3<sup>T8I/T8I</sup> mice were bred at Sorbonne University Rodent facilities. Mice were housed in standard conditions with controlled temperature (21°C ± 2°C), humidity (40 %) and a 12h light/dark cycle (07:30-19:30), with free access to food and water. Experiments were conducted on male and female mice aged 8 to 16 weeks. For the chronic social defeat stress, adult male CD1 mice (12-20 weeks-old, body weight: 30-35g) were used as aggressors (Janvier Laboratories, France). For the 3-chamber test, juvenile C56BL6 mice (aged 6 weeks, sex-matched) were used as social cues.

### *Chronic social defeat stress*

For this paradigm, CD-1 male mice were selected according to published methods (Berton et al., 2006). To tailor the paradigm for female mice, we used a modified version of the chronic social defeat stress paradigm (CSDS) paradigm (Henderson et al., 2017; Challis et al., 2013). In this CSDS paradigm, mice were exposed to a selected CD-1 aggressor for a 5-minute physical interaction. This physical contact was followed by a 20-minute period of protected sensory contact, during which the experimental mice were separated from the aggressor by a perforated Plexiglas partition allowing visual, olfactory, tactile and auditive contact. After each 25-minute stress session, mice were isolated and returned to their home cages. This cycle was repeated for 10 consecutive days (day 1 to day 10), with each day involving exposure to a new aggressor. Adapting the paradigm to female mice involved specific pairing with the urine of non-aggressive CD-1 male mice and urine application (approximately 50 µL) around the genitals of female mice just before the 5-minute physical contact (Harris et al., 2018; van Doeselaar et al., 2021).

### ***Social Interaction test***

Social approach or avoidance behavior toward an unfamiliar CD-1 aggressor was assessed using the two-trial social interaction test. In the first 2.5-minute trial, the experimental mouse explored a white plexiglass arena (42×42×26 cm; 10 lux illuminated room) containing an empty transparent perforated plexiglass box ('No target' condition; 10x7x15cm). In the second 2.5-minute trial, an unfamiliar CD-1 mouse was placed inside the perforated box while the experimental mouse was placed in the arena ('Target' condition). Time spent in the interaction zone (defined as an 8 cm around the box) was recorded with Ethovision 14.0 software from Noldus® (Wageningen, Netherlands). Based on these measurements, interaction ratios were calculated as follows: SI Ratio = [(interaction time, "Target" condition after CSDS)/(interaction time, "Target" condition before CSDS)]. These ratios were then used to distinguish susceptible mice (ratio < 1) from resilient mice (ratio > 1).

### ***Three-chamber test***

Social preference was assessed through the three-chamber test. In each phase, experimental mice were placed in the central compartment of an opaque plexiglass box divided into three compartments (40x20x22 cm; 15 lux illuminated room) interconnected by openings (5x5 cm) allowing them to explore all three chambers. During the first phase, experimental mice were placed alone in the central compartment with the doors closed for 10 minutes to acclimate to the environment. In the second 10-minute phase of social preference, an unfamiliar sex-matched juvenile mouse (C57BL/6, 6 weeks old) was placed in a small weighted wire cage within a chamber, while an empty cage was placed in the other chamber. The time spent by the experimental mouse in close interaction with each cage was recorded for 10 minutes to measure social preference preference using EthoVision 14.0 software from Noldus® (Wageningen, Netherlands). Social preference indexes (Ix) were calculated before and after stress based on the time spent near the different stimuli a vs. b (mouse vs. empty cage and familiar mouse vs. new mouse), such as:  $I_x = (a-b)/(a+b)$ . To compare the effect of stress on these preference indexes between groups, they were normalized using standard z-score calculation: (individual data - mean(group data before stress))/standard deviation(group data before stress). These z-scores allowed the observation of each individual's position after stress relative to the group before stress.

### ***Elevated-zero maze (EZM)***

The elevated-zero maze (EZM) was a white polyvinyl chloride (PVC) annular platform (width 7 cm; outer diameter 57 cm) and was elevated 90 cm above the floor. The EZM was divided into 4 sections of equal lengths: two opposing open arms and two opposing closed arms (height of 17 cm), with an illuminance of 30 lux in the open areas. During the test, experimental mice were placed in a closed section, facing the open section, and allowed to freely explore the maze for 10 min. Mice were tracked using Ethovision 14.0 software from Noldus® (Wageningen, Netherlands) to measure the latency to enter open sections, the number of entries, and the time spent in these sections.

### ***Pharmacology***

At the end of the fiber photometry experiments, mice were intraperitoneally injected with several solutions affecting dopaminergic and cholinergic transmissions to control the recorded signals. All solutions were prepared by diluting pharmacological agents in saline solution (0.9 % NaCl). Mice were injected with d-amphetamine sulfate (3 mg/kg; A5880 ; Sigma-Aldrich) and atropine (12.5 mg/kg; A0132; Sigma-Aldrich).

### ***Surgeries***

For all surgeries, animals were anesthetized with an intraperitoneal mixture of ketamine/xylazine (90 and 10mg/kg, respectively) diluted in saline solution (0.9 % NaCl). They were then head-fixed in a stereotaxic frame (David Kopf Instruments). To alleviate pain, lidocaine (5 mg/kg) was applied locally, and meloxicam (1 mg/kg) was administered subcutaneously at the end of the procedure and the following day.

The viral vectors AAV2/9-hsyn-DA3h ( $5.85 \times 10^{12}$  vg/mL ; Brain-VTA, Wuhan, China) and AAV2/9-hsyn-ACh3.8 ( $2.05 \times 10^{12}$  vg/mL; Brain-VTA, Wuhan, China) were each mixed (1:1 ratio) with  $\frac{1}{2}$  PBS-1x-diluted AAV5/2-hSyn1-mCherry ( $6 \times 10^{12}$  vg/mL; Viral Vector Facility, University of Zurich, Switzerland). These two viral mixtures were separately injected in male mice. Injection was alternated between each mouse to avoid lateralization bias. A volume of 0.5  $\mu$ L of these two viral mixtures was bilaterally injected into the nucleus accumbens shell (anteroposterior coordinates (AP): +1.4 mm; mediolateral (ML):  $\pm 1.6$  mm; dorsoventral (DV):

-4.6 mm; angle of 10°) at a rate of 0.2  $\mu$ L/min using a 10  $\mu$ L syringe (model 1701, Hamilton, PHYMED, Paris, France) and a needle with a silica fiber tip (100  $\mu$ m; PHYMED, Paris, France). Five minutes after injection, the syringe needle was withdrawn, and an optical fiber (200  $\mu$ m core diameter; 1.25 mm ceramic ferrule diameter; NA 0.37; length 7.5 mm; Neurophotometrics LLC, San Diego, USA) was implanted into the nucleus accumbens (AP: +1.4 mm; ML:  $\pm$ 1.6 mm; DV: -4.4 mm; angle of 10°). Fiber implants were then fixed to the skull with dental cement (SuperBond, Sun Medical, PHYMED, Paris, France) mixed with powdered charcoal to minimize ambient light absorption. After a recovery period of 4 weeks to allow for viral expression, mice were used for fiber photometry experiments. Viral expressions and optical fiber implantation are shown in Figure 4A.

### ***In vivo fiber photometry data acquisition and analysis***

Fluorescent measurements of ACh and DA were measured *in vivo* using AAV2/9-hsyn-ACh3.8 and AAV2/9-hsyn-DA3h biosensors bilaterally injected into the NAc coupled with a fiber photometry system (FP3002; Neurophotometrics LLC, San Diego, USA). The fiber photometry system included an LED console that delivered two excitation lights (LED 470 nm and LED 560 nm; 50  $\mu$ W). Both LED lights were bandpass filtered, reflected by a mirror, and focused by a x20 objective lens (NA: 0.4). The excitation lights and emission lights were transmitted through a low autofluorescence optical fiber patch cord (MFP\_200/220/900-0.37\_2m\_SMA-MF1.25\_LAF; Doric Lenses) which was connected to the animal's optical fiber implant (FOC\_BF\_200um/1.25mm; Neurophotometrics LLC, San Diego, USA) using a ceramic ferrule (ADAL1-5; Thorlabs). The signal was acquired at a sampling frequency of 75 Hz and synchronized with video recording *via* Bonsai 2.4 (<http://bonsai-rx.org>). One week before the experiments, mice were habituated to the fiber branching system. Recordings were conducted during the social interaction test before and after CSDS, as well as on the first and tenth day of CSDS. On the first and tenth day of CSDS, mice were recorded in their individual cages for a period of 2 minutes before the attack, then during the 5-minute attack, and during the first two minutes of protected sensory contact. At the end of the experiment, mice were recorded in their individual cages during pharmacological controls, which included 5 minutes of baseline recording and 15 minutes of recording after intraperitoneal injection of the pharmacological agent (see “Pharmacology” section). All fiber photometry data were analyzed in Python. Briefly, after removing the first 5 seconds, the 470nm (sensor signal) and 560nm (control signal) signals were fitted using double exponential regressions, then detrended by dividing them by

their respective fitted curve obtained by nonlinear least squares. The detrended 560 control was then fitted to the 470 signal by linear regression (i.e., fitted 560). The change in fluorescence  $\Delta F/F$  was then calculated as follows: (fitted 560 - signal 470) / fitted 560. Subsequently, z-scores of  $\Delta F/F$  were calculated using the standard formula:  $(\Delta F/F - \text{mean}(\Delta F/F)) / \text{standard deviation}(\Delta F/F)$ . The normalized signals were time-locked with the behavioral events to obtain peri-event time histograms (PETH). Finally, the areas under the curve and the maximum z-scored values of these PETHs were calculated and analyzed.

### ***Immunohistochemistry***

Mice were anesthetized by intraperitoneal injection of euthasol (400 mg/kg) and perfused intracardially with 100 mL of 4 % paraformaldehyde (PFA) solution buffered in phosphate-buffered saline (PBS). Brains were then removed and kept at 4°C in a 4 % PFA solution for 24 hours before being transferred to a PBS solution with azide added (0.03 %). Brains were then sliced into 35  $\mu\text{m}$  sections using a vibratome (VT-1000, Leica Microsystems, Rueil-Malmaison, France) and stored at 4°C. Brain slices were then rinsed and incubated in a 4 % normal horse serum (NHS) blocking buffer diluted in 1x PBS and 0.3 % Triton for one hour. Afterwards, the sections were incubated overnight at 4°C with primary antibodies against GFP (1/1000; chicken; AVES) and against DSred (1/1000; rabbit; Abcam) diluted in a solution of 1x PBS, 0.3 % Triton, and 1 % NHS. The next day, the sections were rinsed and incubated for one hour with secondary antibodies anti-chicken conjugated to GFP (1/2000; Alexa Fluor 488 nm) and anti-rabbit conjugated to DSred (1/2000; Alexa Fluor 594 nm) diluted in 1x PBS. After rinsing, brain slices were mounted between a slide and a coverslip using Fluoromount (Sigma-Aldrich, F4680) and stored at 4°C.

### ***Statistics***

All data were analyzed using Prism 10.0 software (GraphPad). Statistical analyses were chosen based on the experimental protocol. Data were either analyzed using Student's t-test (if their distribution followed a normal distribution) or by two-way repeated measures ANOVA. Sidak's multiple comparisons test was performed for post-hoc analysis when necessary, unless otherwise stated. All data are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM), with differences considered significant when  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ , and  $p < 0.001$ . Principal Component Analysis (PCA) was performed using Prism 10.0 software on data normalized by z-score (EZM,

3CP, SI). The z-score calculation normalized the data relative to an unstressed control group:  $z = (\text{data} - \text{mean}(\text{data unstressed control group})) / \text{standard deviation}(\text{data unstressed control group})$ . The proportions of variance explained by each PC and the contributions of variables for each PC were also calculated.

## Supplementary table: Statistical analyses

Figure	n	Statistical analyses	Value	p-value
<b>Fig. 1B</b>	VGLUT3 <sup>+/+</sup> : n=15	Interaction Time		
		Two-way RM ANOVA	Stress	F (1, 29) =51.62
	Genotype		F (1, 29) =3.043	=0.0917
	Interaction		F (1, 29) =7.125	<0.0123
	VGLUT3 <sup>T8I/T8I</sup> : n=16	Uncorrected Fisher's LSD		
		<u>VGLUT3<sup>+/+</sup></u> Pre-CSDS vs. Post-CSDS		t = 3,143 et DF = 29,00
	<u>VGLUT3<sup>T8I/T8I</sup></u> Pre-CSDS vs. Post-CSDS		t = 7.083 et DF = 29.00	<0.0001
	Pre-CSDS VGLUT3 <sup>+/+</sup> vs. VGLUT3 <sup>T8I/T8I</sup>		t = 0,1428 et DF = 58,00	0,8869
	Post-CSDS VGLUT3 <sup>+/+</sup> vs. VGLUT3 <sup>T8I/T8I</sup>		t = 2,975 et DF = 58,00	0.0043
	Social preference index			
	Two-way RM ANOVA	Stress	F(1,29) = 55,88	<0.0001
		Genotype	F(1, 29) = 2,452	0,1282
		Interaction	F (1,29) = 6,718	0,0148
	Uncorrected Fisher's LSD			
	<u>VGLUT3<sup>+/+</sup></u> Pre-CSDS vs. Post-CSDS			=0.0020
	<u>VGLUT3<sup>T8I/T8I</sup></u> Pre-CSDS vs. Post-CSDS			<0,0001
Pre-CSDS VGLUT3 <sup>+/+</sup> vs. VGLUT3 <sup>T8I/T8I</sup>			=0,7820	
Post-CSDS VGLUT3 <sup>+/+</sup> vs. VGLUT3 <sup>T8I/T8I</sup>			0,0070	
<b>Fig.1C</b>	VGLUT3 <sup>+/+</sup> : n=10	Social preference index		
		Two-way RM ANOVA	Stress	F(1,23) = 2,737
	Genotype		F(1,23) = 1,227	= 0,2795
VGLUT3 <sup>T8I/T8I</sup> : n=15				

			Interacti on	F(1,23) = 1,428	=0,2442
<b>Fig. 1D</b>	VGLUT3 <sup>+/+</sup> : n=10  VGLUT3 <sup>T8I/T8I</sup> : n=15	Social preference (z-scored)			
		Two-way RM ANOVA	Test	F(1,23) = 21,18	=0.0001
			Genotyp e	F(1,23) = 1,433	=0.2435
			Interacti on	F(1,23) = 22,54	<0.0001
		Uncorrected Fisher's LSD			
		<u>VGLUT3<sup>+/+</sup></u> SI vs. 3C		t = 0.09424 et DF = 23,00	=0,9257
		<u>VGLUT3<sup>T8I/T8I</sup></u> SI vs. 3C		t = 7,391 et DF = 23,00	<0,0001
		<u>SI</u> VGLUT3 <sup>+/+</sup> vs. VGLUT3 <sup>T8I/T8I</sup>		t = 3,818 et DF = 48,00	=0,0004
		<u>3C</u> VGLUT3 <sup>+/+</sup> vs. VGLUT3 <sup>T8I/T8I</sup>		t = 1,908 et DF = 48,00	=0,0626
		Delta social preferences (z-scored)			
		Unpaired t test two- tailed		t = 4,748 et DF = 23	<0,0001
		One sample t test (VGLUT3 <sup>T8I/T8I</sup> ) (VGLUT3 <sup>+/+</sup> )		t = 7,145 et DF = 14	<0,0001
	t = 0.09986 et DF = 9		=0.9226		
<b>Fig. 1E</b>	VGLUT3 <sup>+/+</sup> : n=10  VGLUT3 <sup>T8I/T8I</sup> : n=15	Multiple logistic regression (dependant variable = genotype)			
		Odds ratios	Intercep t SI 3C SI:3C	Estimate = 2.088 Estimate = 2,49 Estimate = 0,07430 Estimate = 0.7347	
		Hosmer- Lemeshow test			=0,8152

		Tjur's R squared=			=0,6135	
		Area under the ROC Curve		Area = 0,9533	=0,0002	
<b>Fig. 1F</b>	VGLUT3 <sup>+/+</sup> : n=10  VGLUT3 <sup>T8I/T8I</sup> : n=15	Time spent in open arms (EZM)				
		Two-way RM ANOVA	Stress	F(1,29) = 8,862	=0,0058	
			Genotype	F (1,29) = 2,677	=0,1126	
			Interaction	F(1,29) = 0,6022	=0,6022	
		Sidak's multiple comparisons test				
		<u>Pre CSDS - Post CSDS</u>			t = 1,705 et DF = 29,00	=0,1880
		VGLUT3 <sup>+/+</sup> VGLUT3 <sup>T8I/T8I</sup>			t = 2,519 et DF = 29,00	=0,0348
		Principal Component Analysis (PCA)				
		Eigenvalue	PC1	1,413		
			PC2	0,9667		
			PC3	0,6201		
		Proportion of variance	PC1	47.11%		
			PC2	32.22%		
			PC3	20.67%		
Loading values PC1	SI	-0.7187				
	3C	0.4702				
	EZM	0.8219				
Loading values PC2	SI	0.5010				
	3C	0.8447				
	EZM	-0.0451				
<b>Fig. 2B</b>	VGLUT3 <sup>+/+</sup> : n=15  VGLUT3 <sup>T8I/T8I</sup> : n=17	Interaction Time				
		Two-way RM ANOVA	Stress	F(1,30) = 21,00	<0,0001	
			Genotype	F(1,30) = 0,2363	=0,6305	
			Interaction	F(1,30) = 0,9470	=0,3383	
		Sidak's multiple comparisons test				
		<u>Pre CSDS - Post CSDS</u>			t = 2,476 et DF = 30,00	=0,0379
		VGLUT3 <sup>+/+</sup> VGLUT3 <sup>T8I/T8I</sup>			t = 4,057 et DF = 30,00	=0,0007
		Social preference index				
		Two-way RM ANOVA	Stress	F(1,30) = 37,74	<0.0001	
			Genotype	F(1,30) = 0,06772	=0,7965	
Interaction	F(1,30) = 0,06286		=0,8037			

		Sidak's multiple comparisons test			
		Pre CSDS - Post CSDS VGLUT3 <sup>+/+</sup> VGLUT3 <sup>T8I/T8I</sup>		t = 4,042 et DF = 30,00 t = 4,670 et DF = 30,00	=0,0007 =0,0001
<b>Fig.2c</b>	VGLUT3 <sup>+/+</sup> : n=13  VGLUT3 <sup>T8I/T8I</sup> : n=15	Social preference index			
		Two-way RM ANOVA	Stress	F(1,24) = 0,1567	=0,6957
			Genotype	F(1,26) = 0,9257	=0,9257
			Interaction	F(1,29) = 0,7992	=0,7992
<b>Fig.2D</b>	VGLUT3 <sup>+/+</sup> : n=13  VGLUT3 <sup>T8I/T8I</sup> : n=15	Social preference (z-scored)			
		Two-way RM ANOVA	Stress	F(1,24) = 40,32	<0,0001
			Genotype	F(1,24) = 0,05223	=0,8212
			Interaction	F(1,24) = 0,05661	=0,8139
		Sidak's multiple comparisons test			
		SI -3C VGLUT3 <sup>+/+</sup> VGLUT3 <sup>T8I/T8I</sup>		t = 4,489 et DF = 24,00 t = 4,498 et DF = 24,00	=0,0003 =0,0003
		Delta social preferences (z-scored)			
		Unpaired t test two-tailed (VGLUT3 <sup>+/+</sup> )		t = 0,3934 et DF = 25	=0,6973
		One sample t test (VGLUT3 <sup>T8I/T8I</sup> )		t = 4,757 et DF = 11	<0,0006
		<b>Fig.2E</b>	VGLUT3 <sup>+/+</sup> : n=13  VGLUT3 <sup>T8I/T8I</sup> : n=15	Multiple logistic regression (dependant variable = genotype)	
Odds ratios	Intercept SI 3C SI :3C			Estimate=0.8231 Estimate=0.9976 Estimate=1.873 Estimate=1.064	=0.7707 =0,9889 =0,5848 =0.8423
Hosmer-Lemeshow test					= 0,8483
Tjur's R squared					=0,02478
ROC Curve				Area = 0,5476	=0,6807
<b>Fig.2F</b>	VGLUT3 <sup>+/+</sup> : n=16			Time spent in open arms	
			Stress	F(1,831, 58,61) = 48,67	<0,0001

	VGLUT3 <sup>T8I/T8I</sup> : n=18	Two-way RM ANOVA	Genotype	F(1,32) = 0,1159	=0,7358	
			Interaction	F(2,64) = 2,063	=0,1355	
		Sidak's multiple comparisons test				
		VGLUT3 <sup>+/+</sup> Pre CSDS vs. 1 week post-CSDS Pre CSDS vs. 1 month post CSDS 1 week post-CSDS vs. 1 month post CSDS		t = 5,807 et DF = 15 t = 6,820 et DF = 15,00 t = 3,257 et DF = 15,00	=0,0001 <0,0001 =0,0158	
VGLUT3 <sup>T8I/T8I</sup> Pre CSDS vs. 1 week post-CSDS Pre CSDS vs. 1 month post CSDS 1 week post-CSDS vs. 1 month post CSDS		t = 4,197 et DF = 17,00 t = 5,301 et DF = 17,00 t = 0,5150 et DF = 17,00	=0,0018 =0,0002 =0,9421			
<b>Fig.3A</b>	VGLUT3 <sup>+/+</sup> male: n=15  VGLUT3 <sup>+/+</sup> female: : n=16	% baisse EZM				
		Unpaired t-test		t = 2,117 et DF = 29	=0,0429	
<b>Fig.3B</b>	VGLUT3 <sup>+/+</sup> male: n=10 VGLUT3 <sup>+/+</sup> female: n=14	PCA				
		Eigenvalue	PC1	1.758		
			PC2	0.7299		
			PC3	0.5117		
		Proportion of variance	PC1	58.61%		
			PC2	24.33%		
			PC3	17.06%		
		Loading values PC1	SI	0.7902		
3C	-0.6836					
EZM	-0.8165					
Loading values PC2	SI	0.3904				
	3C	0.7246				
	EZM	-0.2289				
<b>Fig.3C</b>	VGLUT3 <sup>+/+</sup> male: n=10 VGLUT3 <sup>+/+</sup> female: n=14	Multiple logistic regression (dependant variable = genotype)				
		Odds ratios estimate	Intercept	=0,09513	=0.0743	
			EZM	=4.499	=0.1168	
			SI	=0.4770	=0.1391	

			EZM:SI	=1,430	0.3047	
		Hosmer-Lemeshow test			= 0,8033	
		Tjur's R squared		0,4584		
		ROC Curve		Area = 0,8600	=0,0027	
<b>Fig.4E</b>	VGLUT3 <sup>+/+</sup> : n=12-13  VGLUT3 <sup>T8I/T8I</sup> : n=9-12	AUC analysis ACh				
		Mixed-effects model	Stress	F(1,42) = 9,041	=0.0044	
			Genotype	F(1,42) = 0,6319	=0,4311	
			Interaction	F(1,42)=1,742	=0.1940	
		Sidak's multiple comparisons test				
		CSDS 1 - CSDS 10 VGLUT3 <sup>+/+</sup> VGLUT3 <sup>T8I/T8I</sup>		t = 3,218 et DF= 42 t = 1,139 et DF= 42	=0,0050 =0,4540	
		Max z-score ACh				
		Mixed-effects model	Stress	F(1,18) = 16,28	=0,0008	
			Genotype	F(1,23) = 1,719	=0,2028	
			Interaction	F(1,18)=2,040	=0,1704	
<b>Fig.4F</b>	VGLUT3 <sup>+/+</sup> : n=5  VGLUT3 <sup>T8I/T8I</sup> : n=8	Sidak's multiple comparisons test				
		CSDS 1 - CSDS 10 VGLUT3 <sup>+/+</sup> VGLUT3 <sup>T8I/T8I</sup>		t = 4,0.34 et DF= 18 t = 1,768 et DF= 18	=0,0016 =0,1791	
		AUC analysis DA				
		Mixed-effects model	Stress	F(1,22) = 0,6001	=0,4468	
			Genotype	F(1,22) = 0,1206	=0,7317	
			Interaction	F(1,22)=0,04498	=0,8340	
		Max z-score DA				
		Mixed-effects model	Stress	F(1,22) = 0,4108	=0,5282	
			Genotype	F(1,22) = 0,1126	=0,7404	
			Interaction	F(1,22)=0,01802	=0,01802	
<b>Fig.4F</b>	AUC analysis ACh					
		Stress	F(1,19)= 3,059	=0,0964		

		Mixed-effects model	Genotype	$F(1,22) = 0,4053$	$=0,5309$	
			Interaction	$F(1,19)=5,848$	$=0.0258$	
	Max z-score ACh					
	VGLUT3 <sup>+/+</sup> : n=6-7	Mixed-effects model	Stress	$F(1,19)=3.512$	$=0.0764$	
			Genotype	$F(1,22)=0.2464$	$=0.6245$	
			Interaction	$F(1,19)=2.070$	$=0.1665$	
	AUC analysis DA					
	VGLUT3 <sup>T8I/T8I</sup> : n=7-8	Mixed-effects model	Stress	$F(1,11)= 1,093$	$=0,3183$	
			Genotype	$F(1,13) = 1,509$	$=0,2411$	
			Interaction	$F(1,11)=3,471$	$=0,0893$	
	Max z-score DA					
		Mixed-effects model	Stress	$F(1,11)=3.135$	$=0.1043$	
			Genotype	$F(1,13)=2.335$	$=0.1505$	
			Interaction	$F(1,11)=2.493$	$=0.1427$	

## 2. Étude du variant p.T8I dans les états veille-sommeil en réponse au stress

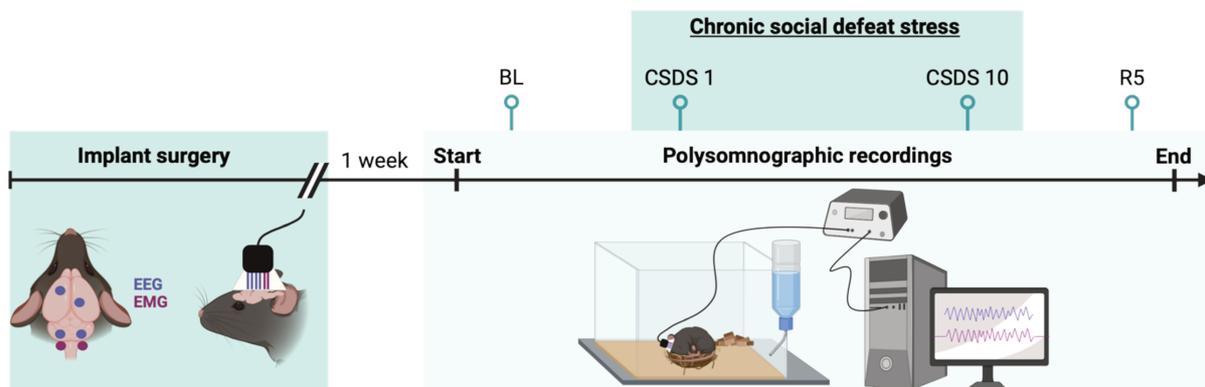
### **2.1. Introduction**

Le stress, qu'il soit aigu ou chronique, exerce une influence considérable sur le sommeil, impactant sa qualité et sa durée sur le long terme (Garefelt et al., 2020 ; Meaklim et al., 2021). Cette relation complexe est modulée par divers facteurs, notamment la durée, l'intensité et la nature du stress lui-même (Meerlo et Turek, 2001; Kamphuis et al., 2015). Chez l'humain, de nombreux troubles psychiatriques présentent une comorbidité importante avec des perturbations du sommeil (Goldstein et al. 2013 ; Armitage, 2007 ; Harvey, 2011). Au-delà d'être de simples symptômes des troubles anxio-dépressifs, les troubles du sommeil, tels que l'insomnie, sont des facteurs de risque et des contributeurs majeurs à leur développement (Armitage, 2007 ; Harvey, 2011 ; Cox et Olatunji, 2016). Par conséquent, une détection précoce et une prise en charge des troubles du sommeil pourraient potentiellement contribuer à prévenir l'apparition de troubles psychiatriques (Harvey, 2011 ; Cox et Olatunji, 2016). Chez la souris, le modèle de défaite sociale chronique (CSDS) est couramment utilisé pour étudier les effets du stress social chronique sur les comportements de type anxieux et dépressifs, et peut également être employé pour étudier ses effets sur le sommeil (Krishnan et al., 2007 ; Berton et al., 2006 ; Henderson et al., 2017). Ce modèle induit des perturbations des cycles veille-sommeil à la fois pendant la période de stress et à plus long terme (Henderson et al., 2017 ; Wells et al., 2017 ; Radwan et al., 2021 ; Feng et al., 2020 ; Bush et al., 2022). Ainsi, le CSDS permet l'étude des interactions complexes entre le stress social chronique, les perturbations du sommeil et les troubles psychiatriques.

De plus, les troubles du sommeil sont fréquemment observés dans les troubles psychiatriques associés à des dysfonctionnements du nucleus accumbens (NAc), suggérant un rôle commun du NAc dans les circuits impliqués dans la régulation de ces troubles (Russo et Nestler, 2013 ; Shao et al., 2020). Des études récentes chez les rongeurs ont mis en évidence l'importance du NAc dans la régulation des états de vigilance en conditions basales et en réponse au stress (Qiu et al., 2012 ; Eban-Rothschild et al., 2016 ; Toth et al., 2023 ; McCullough et al., 2021). Par ailleurs, l'activation chémogénétique de la voie des MSN-D1 dans le NAc est associée à un éveil prolongé, tandis que l'activation chémogénétique des MSN-D2 dans le NAc augmente les quantités de sommeil lent (Luo et al., 2018 ; Oishi et al., 2017).

De ce fait, des dysfonctionnements du NAc pourraient contribuer aux perturbations du sommeil observées dans ces troubles, et inversement, les troubles du sommeil pourraient exacerber les symptômes des troubles psychiatriques.

Les troubles anxio-dépressifs et les troubles du sommeil présentent des interactions étroites, et le NAc est un acteur central dans la régulation de ces troubles. Dans le cadre de mes recherches, j'ai donc étudié l'influence du variant VGLUT3-p.T8I sur les états de vigilance en réponse au CSDS. Cette étude s'appuie sur mes travaux antérieurs démontrant l'impact de ce variant sur la réponse comportementale au stress (voir section Résultats, 1). L'objectif principal de cette étude était de caractériser les états de vigilance chez des souris mâles et femelles VGLUT3<sup>+/+</sup> et VGLUT3<sup>T8I/T8I</sup> dans les conditions suivantes : avant l'exposition au stress (état basal, BL), durant la période de CSDS (1<sup>er</sup> et 10<sup>ème</sup> jour), ainsi que pendant la période de récupération post-CSDS (5<sup>ème</sup> jour, R5) (Figure 39). Pour cela, des enregistrements polysomnographiques ont été réalisés chez ces souris après implantation d'électrodes EEG et EMG (voir section Matériels et Méthodes, 5.2, 6.2).



**Figure 39. Design expérimental des enregistrements polysomnographiques en réponse au CSDS.**

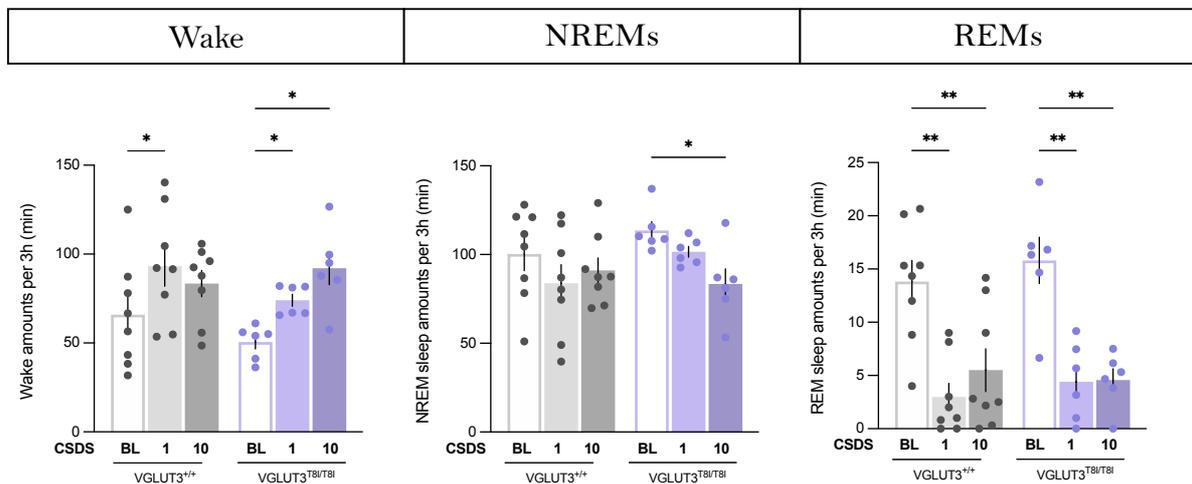
Des électrodes sont implantées au-dessus des lobes frontal et pariétal, et du cervelet pour enregistrer l'activité EEG. Des électrodes sont ensuite placées dans les muscles du cou pour visualiser l'activité musculaire sur l'EMG. Les états veille-sommeil sont ensuite enregistrés à l'état basal (BL), durant le CSDS (jour 1 et 10), ainsi que 5 jours après la fin du CSDS. EEG : électroencéphalogramme ; EMG : électrocardiogramme ; CSDS : chronic social defeat stress ; BL : baseline ; R5 : jour 5 de récupération post-CSDS.

## 2.2. Résultats

### 2.2.1. Étude des états veille-sommeil chez les souris mâles

#### Les perturbations immédiates du sommeil induites par le CSDS sont prolongées par le variant p.T8I

Les données de la littérature montrent que lorsqu'il est réalisé pendant la période diurne, le stress de défaite sociale induit un éveil marqué et une inhibition prolongée du sommeil paradoxal (Henderson et al., 2017; Meerlo et al., 2001). Par ailleurs, ces effets sont identiques après chaque séance de défaite sociale lors du CSDS (Henderson et al., 2017). Ici, nous avons tout d'abord étudié les effets du CSDS sur le sommeil lors du 1<sup>er</sup> et du 10<sup>ème</sup> jour de CSDS. Afin d'étudier les effets immédiats du CSDS sur le sommeil, notre analyse s'est concentrée sur l'intervalle de 3 heures suivant une défaite sociale de 25 minutes. Le stress de CSDS a eu un effet immédiat indépendamment du génotype sur l'éveil ( $F(1.919, 23.02)=10.40$  ;  $p=0.0007$  ; ANOVA répétées à deux facteurs), le sommeil lent ( $F(1.917 ; 23.01)=4.591$  ;  $p=0.0234$  ; ANOVA répétées à deux facteurs) et le sommeil paradoxal ( $F(1.973, 23.68)=31.69$  ;  $p<0.0001$  ; ANOVA répétées à deux facteurs ; Figure 40).



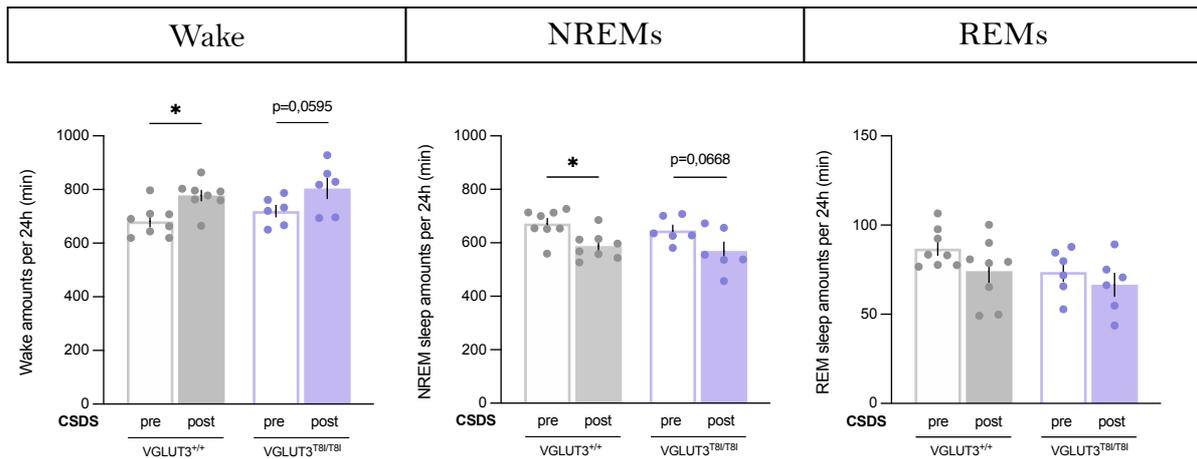
**Figure 40.** Quantités d'éveil, de sommeil lent et de sommeil paradoxal durant les 3 heures qui suivent la fin de la défaite sociale.

Wake : éveil ; NREM : sommeil lent ; REM : sommeil paradoxal ; CSDS : chronic social defeat stress ; BL : état basal. Comparaisons post-hoc: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

Chez les souris mâles  $VGLUT3^{+/+}$ , une augmentation de l'éveil a été observée le premier jour du CSDS par rapport à l'état basal ( $p=0.0461$  ; Dunnett's multiple comparisons test), au détriment du sommeil paradoxal (REM ;  $p=0.0011$  ; Dunnett's multiple comparisons test), sans effet notable sur le sommeil lent (NREM ; Figure 40). Au dixième jour, les souris témoins montrent toujours une baisse des quantités de sommeil paradoxal ( $p=0.0086$  ; Dunnett's multiple comparisons test). Cette réponse éveillante du sommeil induite par le CSDS est également observée chez les souris mâles  $VGLUT3^{Tsl/Tsl}$  lors du premier jour de CSDS ( $p=0.0242$  ; Dunnett's multiple comparisons test), et est également retrouvée lors du dixième jour ( $p=0.0125$  ; Dunnett's multiple comparisons test). Contrairement aux souris témoins, l'augmentation des quantités d'éveil au 10<sup>ème</sup> jour se fait au détriment du sommeil lent ( $p=0.0465$  ; Dunnett's multiple comparisons test) et du sommeil paradoxal ( $p=0.0077$  ; Dunnett's multiple comparisons test ; Figure 40). Ces différences suggèrent une influence progressive du variant p.T8I sur l'architecture du sommeil en réponse immédiate au CSDS.

#### Le variant p.T8I n'altère pas les effets à long terme sur une période de 24 heures

Compte tenu des différences entre les souris témoins et p.T8I au niveau des perturbations immédiates du sommeil, nous nous sommes ensuite intéressés aux effets à long terme. Pour cela, nous avons quantifié les durées d'éveil, sommeil lent et sommeil paradoxal sur une période de 24 heures à l'état basal (pre-CSDS) ainsi que 5 jours après la fin du CSDS (post-CSDS). Le CSDS a eu un effet à long terme indépendamment du génotype sur l'éveil ( $F(1,12)=15.81$  ;  $p=0.0018$  ; ANOVA répétées à deux facteurs), le sommeil lent ( $F(1,12)=14.17$  ;  $p=0.0027$  ; ANOVA répétées à deux facteurs) mais pas sur le sommeil paradoxal. Les souris  $VGLUT3^{+/+}$  présentent une augmentation des durées d'éveil ( $p=0.0142$  ; Sidak's multiple comparisons test), qui se fait au détriment du sommeil lent ( $p=0.0225$  ; Sidak's multiple comparisons test) sans affecter le sommeil paradoxal (Figure 41). Bien qu'elle ne soit pas significative, on observe la même tendance des effets à long terme chez les souris  $VGLUT3^{Tsl/Tsl}$  (Figure 41).



**Figure 41. Quantités d'éveil, de sommeil lent et de sommeil paradoxal sur 24 heures à l'état basal et après stress.**

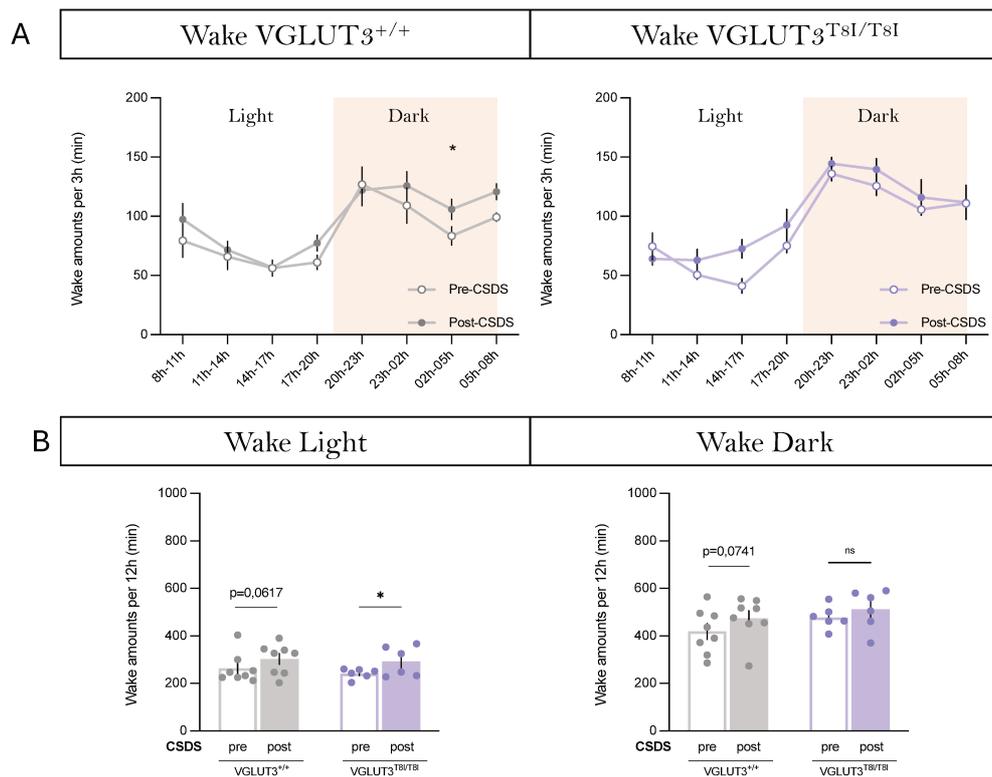
Wake : éveil ; NREM : sommeil lent ; REM : sommeil paradoxal ; CSDS : chronic social defeat stress. Comparaisons post-hoc: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

#### Le variant p.T8I influence la réponse éveillante seulement sur la période nocturne

Comme nous ne trouvons pas d'effet du variant au niveau des effets à long terme du CSDS, et que plusieurs études ont montré que ceux-ci dépendant du nyctémère, nous avons distingué les quantités d'éveil, de sommeil lent et de sommeil paradoxal en fonction de la période diurne (*light*) ou nocturne (*dark*). Sur une période de 24 heures, la quantification des durées d'éveil par créneau de 3 heures pre- et post-CSDS a montré un impact du temps ( $F(7,56)=7.142$  ;  $p < 0.0001$  ; ANOVA répétées à deux facteurs) et du stress ( $F(1,56)=18.83$  ;  $p < 0.0001$  ; ANOVA répétées à deux facteurs) chez les souris témoins (Figure 42A). En particulier, on observe une augmentation des quantités d'éveil durant la période nocturne, sur le créneau de 02-05 heures ( $p=0.0466$  ; Sidak's multiple comparisons test). Cet effet spécifique à la période nocturne n'est pas retrouvé chez les souris p.T8I malgré un effet du temps ( $F(7,40)=21.88$  ;  $p < 0.0001$  ; ANOVA répétées à deux facteurs) et du stress ( $F(7,40)=5.878$  ;  $p=0.0199$  ; ANOVA répétées à deux facteurs) sur les quantités d'éveil par créneau de 3 heures (Figure 42A). En revanche, on retrouve cet effet éveillant du CSDS sur la période de 12 heures nocturnes, qui est indépendant du génotype ( $F(1,12)=5.983$  ;  $p=0.0308$  ; ANOVA répétées à deux facteurs ; Figure 42B). Cependant, cet effet semble n'être présent que chez les souris témoins (VGLUT3<sup>+/+</sup> :  $p=0.0741$  ; VGLUT3<sup>T8I/T8I</sup> :  $p=0.4337$  ; Sidak's multiple comparisons test). A l'inverse, l'effet éveillant sur la période diurne ( $F(1,12)=12.96$  ;  $p=0.0036$  ; ANOVA répétées à deux facteurs) est retrouvé à la fois chez les souris p.T8I ( $p=0.0418$  ; Sidak's multiple comparisons test), et chez les souris témoins ( $p=0.0617$  ; Sidak's multiple

comparisons test ; Figure 42B). Il faudra cependant confirmer ces tendances sur un effectif plus important.

En résumé, le CSDS induirait des effets éveillants à long terme à la fois durant la période diurne et à la fois durant la période nocturne chez les souris témoins. Durant la nuit, cette réponse éveillante ne serait pas retrouvée chez les souris p.T8I, suggérant que le variant influence l'éveil en réponse au CSDS durant la période d'activité des souris.



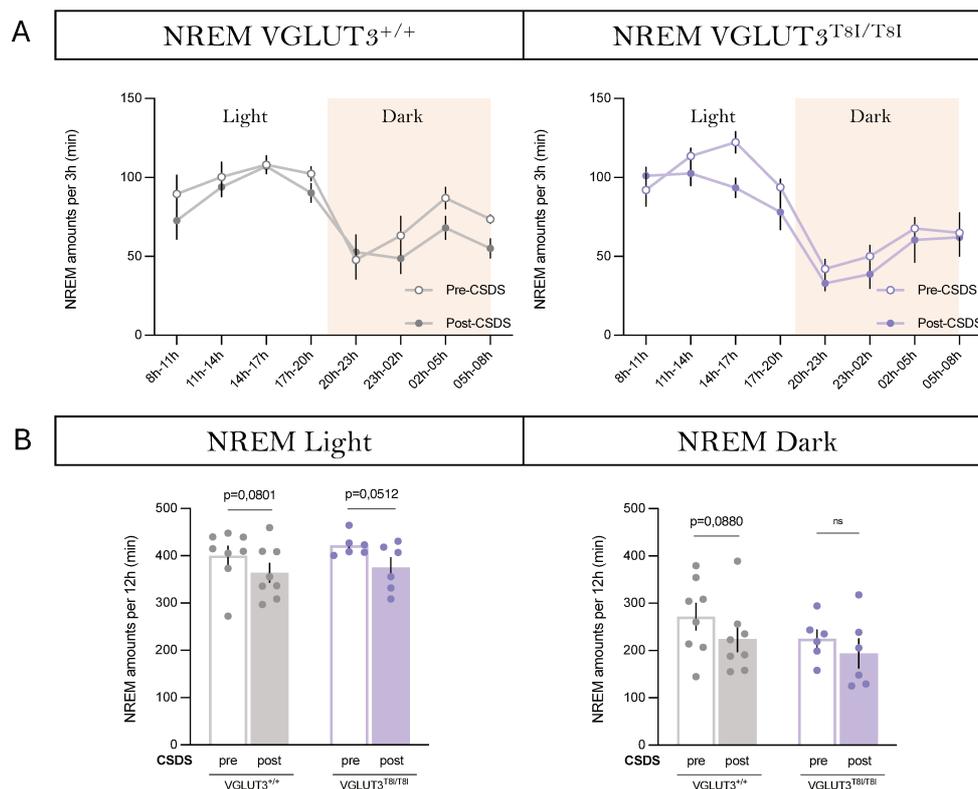
**Figure 42. Quantités d'éveil à l'état basal et après stress en fonction des périodes diurne et nocturne.**

Les quantités d'éveil ont été quantifiées soit sur une période de 24 heures par créneaux de 3 heures (A), soit par périodes de 12 heures (B). Wake : éveil ; CSDS : chronic social defeat stress ; Light : période diurne ; Dark : période nocturne. Comparaisons post-hoc: \*p < 0.05, \*\*p < 0.01.

### Le variant p.T8I influence la réponse de sommeil lent seulement sur la période nocturne

Comme le variant influence les quantités d'éveil en période nocturne seulement, nous avons analysé si cet effet était aussi observé sur le sommeil lent. Chez les souris témoins, on observe un effet du temps ( $F(7,56)=7.197$  ;  $p<0.0001$  ; ANOVA répétées à deux facteurs) et du stress ( $F(1,56)=17.43$  ;  $p=0.0001$  ; ANOVA répétées à deux facteurs) sur les durées de sommeil lent

par créneaux de 3 heures (Figure 43A). Ces effets du temps ( $F(7,40)=19.37$  ;  $p<0.0001$  ; ANOVA répétées à deux facteurs) et du stress ( $F(7,40)=5.698$  ;  $p=0.0218$  ; ANOVA répétées à deux facteurs) sont également observés chez les souris p.T8I (Figure 43A). En effet, le CSDS diminue les quantités de sommeil lent durant la période diurne ( $F(1,12)=11.70$  ;  $p=0.0051$  ; ANOVA répétées à deux facteurs) chez les souris témoins ( $p=0.0801$  ; Sidak's multiple comparisons test) et chez les souris p.T8I ( $p=0.0512$  ; Sidak's multiple comparisons test ; Figure 43B). Cependant, le CSDS semble diminuer le sommeil lent ( $F(1,12)=5.843$  ;  $p=0.0325$  ; ANOVA répétées à deux facteurs) également durant la période nocturne, mais seulement chez les souris témoins ( $p=0.0880$  ; Sidak's multiple comparisons test ; Figure 43B). Ainsi, les effets à long terme du CSDS sur le SL sont en miroir de ceux observés pour l'éveil et indiqueraient que le variant pT8I influence la balance éveil/sommeil sur la période nocturne uniquement. A nouveau, ces données sont à confirmer sur un effectif plus important.



**Figure 43. Quantités de sommeil lent à l'état basal et après stress en fonction des périodes diurne et nocturne.**

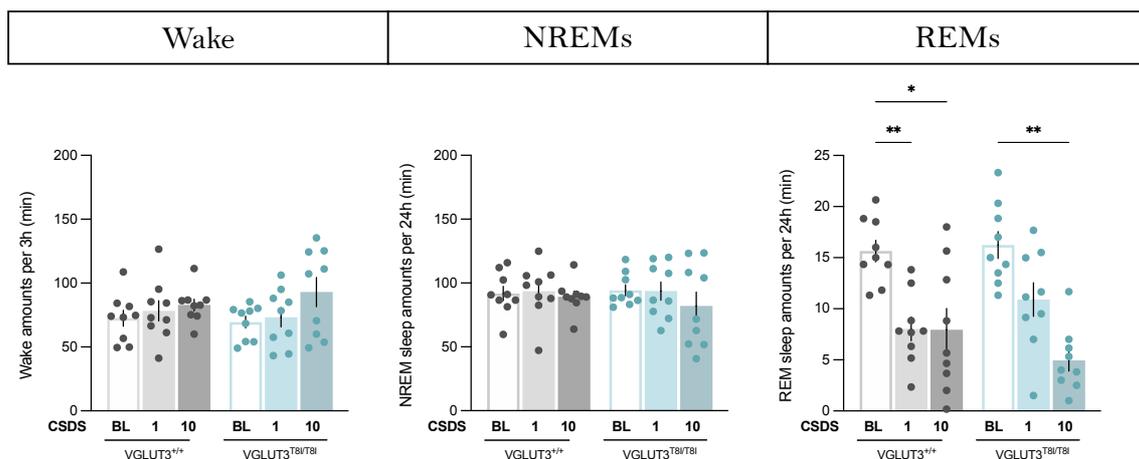
Les quantités de sommeil lent ont été quantifiées soit sur une période de 24 heures par créneaux de 3 heures (A), soit par périodes de 12 heures (B). NREM : sommeil lent ; CSDS : chronic social defeat stress ; Light : période diurne ; Dark : période nocturne. Comparaisons post-hoc: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

L'ensemble des analyses réalisées sur le SP ne montrant ni effet du stress, ni effet du génotype à la fois sur la période diurne (stress :  $F(1,12)=0.9039$ ,  $p=0.3605$ , génotype :  $F(1,12)=0.01077$ ,  $p=0.9191$ , stress x génotype :  $F(1,12)=0.00063$ ,  $p=0.9804$ ; ANOVA répétées à deux facteurs) mais également sur la période nocturne (stress :  $F(1,12)=4.675$ ,  $p=0.0515$ , génotype :  $F(1,12)=2.268$ ,  $p=0.1579$ , stress x génotype :  $F(1,12)=1.211$ ,  $p=0.2927$ ; ANOVA répétées à deux facteurs), ne sont pas illustrées.

### 2.2.2. Étude des états veille-sommeil chez les souris femelles

#### Le variant p.T8I n'influence pas la réponse immédiate au CSDS sur les états de vigilance

Comme la réponse comportementale au stress de CSDS était différente entre les souris mâles et femelles, nous nous sommes intéressés à son impact sur les états de vigilance chez les femelles. Contrairement aux souris mâles, le CSDS n'a pas eu d'effets immédiats sur l'éveil ni sur le sommeil lent, au premier jour comme au dixième jour (Figure 44). En revanche, nos résultats montrent que le CSDS a un effet sur le sommeil paradoxal ( $F(1,998,31.96)=20.97$ ;  $p<0.0001$ ; ANOVA répétées à deux facteurs). En effet, chez les souris témoins, on observe une diminution immédiate des quantités de sommeil paradoxal qui apparaissent dès les premiers jours ( $p=0.0013$ ; Dunnett's multiple comparisons test) et persistent jusqu'au dixième jour ( $p=0.0157$ ; Dunnett's multiple comparisons test; Figure 44). Cette diminution du sommeil paradoxal est également retrouvée chez les souris p.T8I, mais seulement au dixième jour ( $p=0.0010$ ; Dunnett's multiple comparisons test; Figure 44).

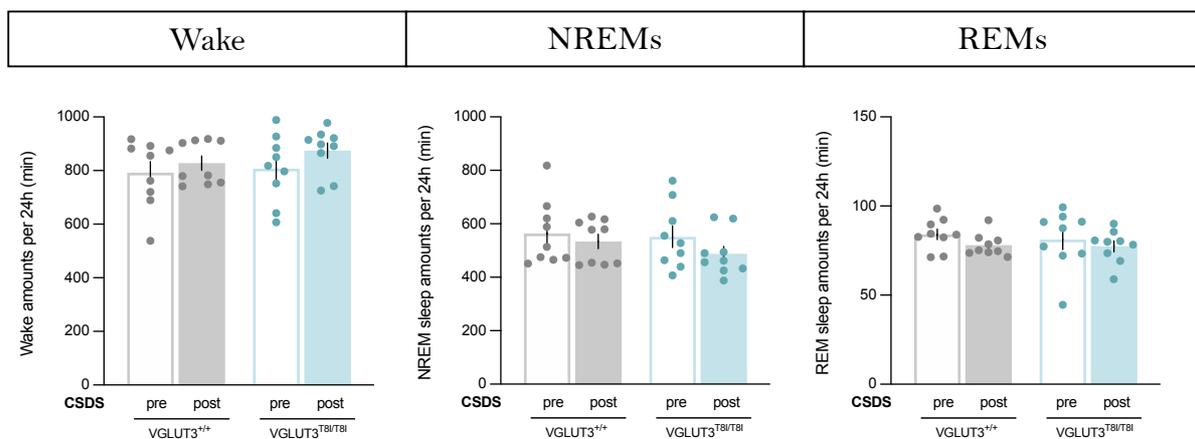


**Figure 44. Quantités d'éveil, de sommeil lent et de sommeil paradoxal durant les 3 heures qui suivent la fin de la défaite sociale.**

Wake : éveil ; NREM : sommeil lent ; REM : sommeil paradoxal ; CSDS : chronic social defeat stress ; BL : état basal. Comparaisons post-hoc: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

## Le variant p.T8I n'influence pas la réponse à long terme induite par CSDS sur les états de vigilance

Afin d'explorer les effets du CSDS à long terme chez les souris femelles, nous avons quantifié les quantités d'éveil, de sommeil lent et de sommeil paradoxal sur une période de 24 heures avant et 5 jours après le CSDS. Contrairement aux souris mâles, le CSDS n'induit pas de perturbations de ces états de vigilance ni chez les souris témoins, ni chez les souris p.T8I (Figure 45). Ces résultats suggèrent que le variant p.T8I n'a pas d'influence sur la modulation des états de vigilance à long terme par le CSDS.



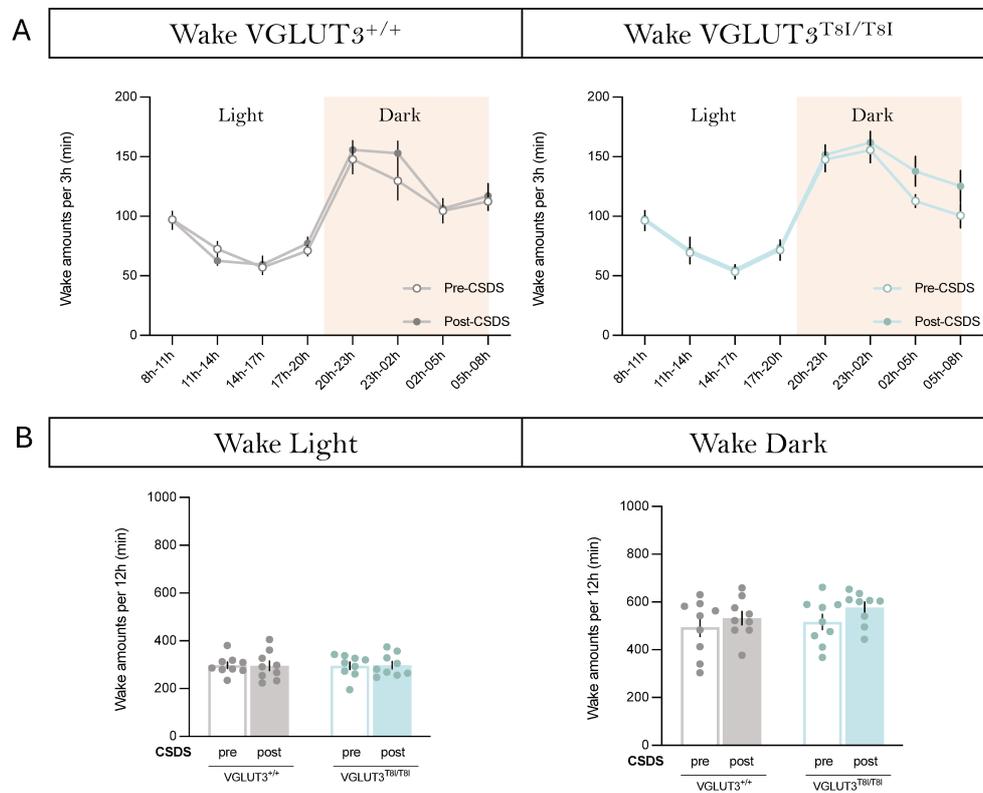
**Figure 45. Quantités d'éveil, de sommeil lent et de sommeil paradoxal sur 24 heures à l'état basal et après stress.**

Wake : éveil ; NREM : sommeil lent ; REM : sommeil paradoxal ; CSDS : chronic social defeat stress.

## Le variant p.T8I influence la réponse éveillante durant la période nocturne

Afin de voir si les réponses au stress sur les états de vigilance étaient présentes mais masquées par la période de 24 heures, nous avons quantifié les quantités d'éveil sur des périodes de 3 heures et 12 heures en fonction du jour et de la nuit. Chez les souris témoins, le CSDS n'a pas eu d'effet sur les durées d'éveil analysées par créneaux de 3 heures ( $F(1,64)=1.984$  ;  $p=0.1638$  ; ANOVA répétées à deux facteurs ; Figure 46A). A l'inverse, on retrouve un effet du stress ( $F(1,64)=4.728$  ;  $p=0.0334$  ; ANOVA répétées à deux facteurs) chez les souris p.T8I (Figure 46A). Cependant, l'analyse post-hoc ne révèle aucune différence sur les quantités d'éveil quel que soit le créneau analysé chez les souris témoins et mutantes. L'analyse des quantités d'éveil par créneaux de 12 heures indique que le CSDS n'a pas d'effet durant la période diurne (Figure 46B). En revanche, le CSDS affecte les quantités d'éveil durant la période nocturne

( $F(1,16)=6.064$  ;  $p=0.0255$  ; ANOVA répétées à deux facteurs), avec une tendance à la hausse chez les souris p.T8I ( $p=0.0943$  ; Sidak's multiple comparisons test) qui n'est pas retrouvée chez les souris témoins ( $p=0.3559$  ; Sidak's multiple comparisons test ; Figure 46B). Comme pour les souris mâles, il faudra augmenter l'effectif pour confirmer ces tendances.

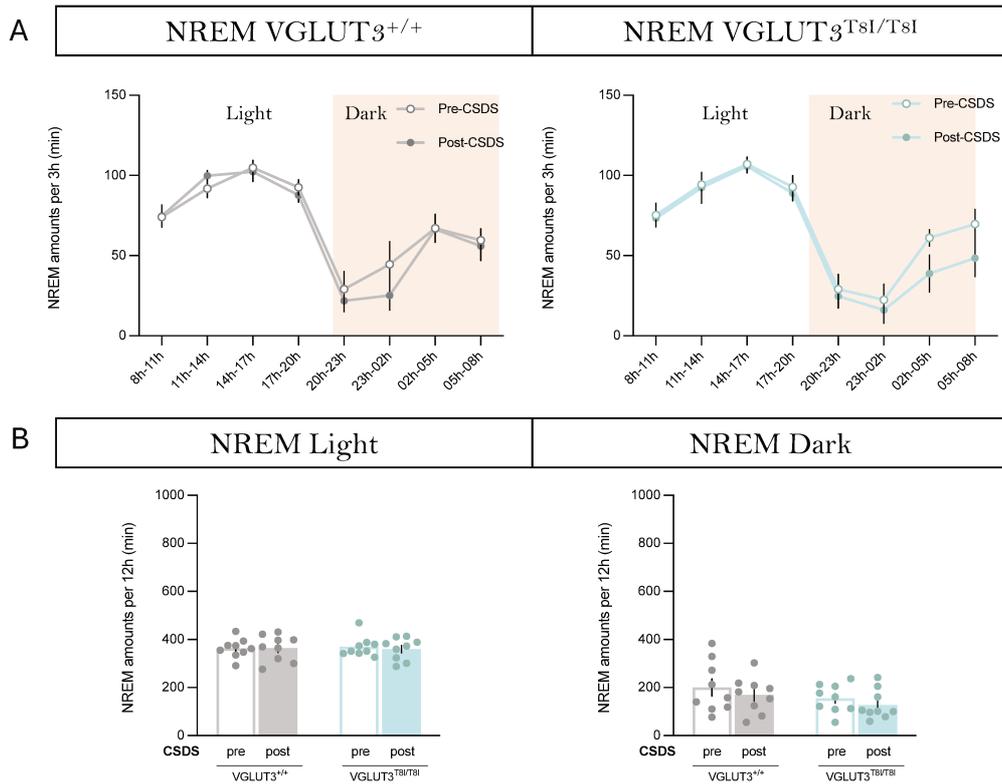


**Figure 46. Quantités d'éveil à l'état basal et après stress en fonction des périodes diurne et nocturne.**

Les quantités d'éveil ont été quantifiées soit sur une période de 24 heures par créneaux de 3 heures (A), soit par périodes de 12 heures (B). Wake : éveil ; CSDS : chronic social defeat stress ; Light : période diurne ; Dark : période nocturne.

#### Le variant p.T8I influence le dérouls temporel de la réponse de sommeil lent

Le CSDS n'a pas eu d'effet chez les souris témoins sur les durées de sommeil lent par créneaux de 3 heures, tandis qu'il en a eu un chez les souris p.T8I ( $F(1,64)=5.532$  ;  $p=0.0218$  ; ANOVA répétées à deux facteurs ; Figure 47A). Cependant, l'analyse post-hoc ne révèle aucune différence sur les quantités de sommeil lent quel que soit le créneau analysé. De même, l'analyse sur 12 heures a montré que le CSDS n'impactait pas les durées de sommeil lent pendant la période diurne, ni pendant la période nocturne (Figure 47B).



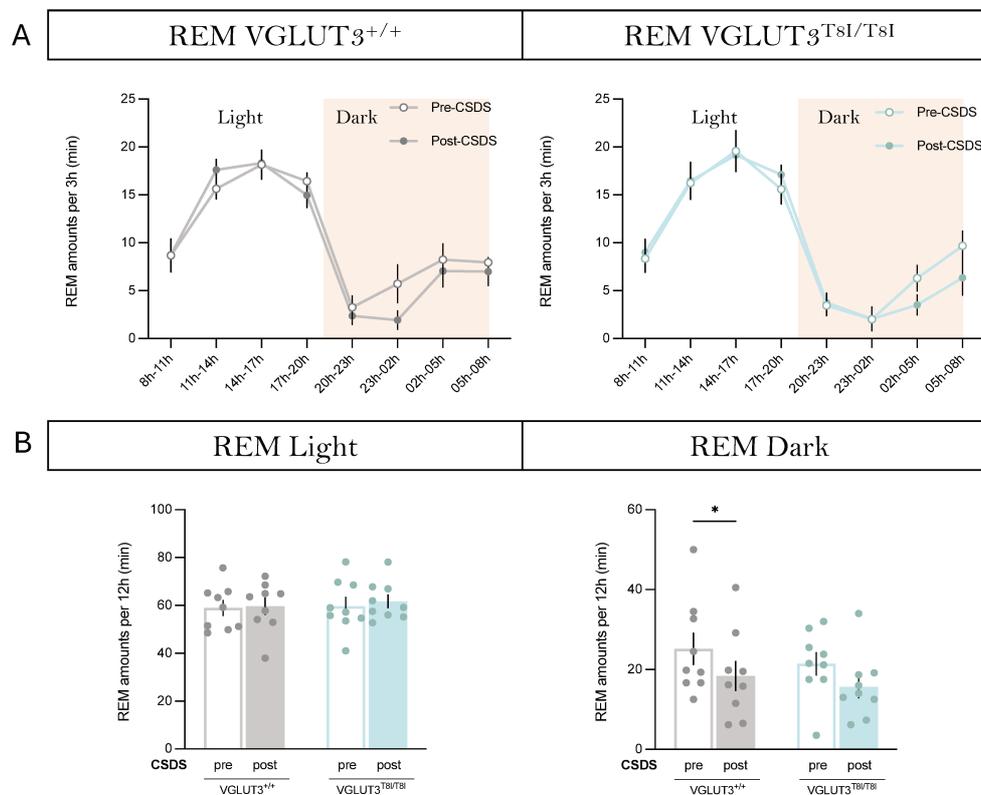
**Figure 47. Quantités de sommeil lent à l'état basal et après stress en fonction des périodes diurne et nocturne.**

Les quantités de sommeil lent ont été quantifiées soit sur une période de 24 heures par créneaux de 3 heures (A), soit par périodes de 12 heures (B). NREM : sommeil lent ; CSDS : chronic social defeat stress ; Light : période diurne ; Dark : période nocturne.

### Le variant p.T8I influence le déroulement temporel de la réponse de sommeil paradoxal

Étant donné que le CSDS induit des perturbations liées au sommeil paradoxal (Figure 44), et que le variant influence la réponse éveillante seulement durant la période nocturne (Figure 46), nous avons analysé les durées de sommeil paradoxal en fonction des périodes diurne et nocturne. Nos résultats indiquent que le CSDS n'induit pas de perturbations sur les quantités de sommeil paradoxal mesurées par créneaux de 3 heures ni chez les souris témoins ( $F(1,64)=1.869$ ,  $p=0.1764$  ; ANOVA répétées à deux facteurs), ni chez les souris p.T8I ( $F(1,64)=0.4969$ ,  $p=0.4834$  ; ANOVA répétées à deux facteurs ; Figure 48A). Les analyses sur 12 heures ont montré que le CSDS n'avait pas non plus d'effet sur le sommeil paradoxal durant la période diurne (Figure 48B). En revanche, il induit des perturbations durant la période nocturne ( $F(1,16)=10.64$  ;  $p=0.0049$  ; ANOVA répétées à deux facteurs ; Figure 48B). Tandis que le CSDS induit une réduction du sommeil paradoxal à long terme chez les souris témoins ( $p=0.0467$  ; Sidak's multiple comparisons test), il n'affecte pas significativement celui des

souris p.T8I (Figure 48B). Ainsi, le variant p.T8I semble est impliqué dans la modulation des effets à long terme du CSDS sur les quantités de sommeil paradoxal.



**Figure 48. Quantités de sommeil paradoxal à l'état basal et après stress en fonction des périodes diurne et nocturne.**

Les quantités de sommeil lent ont été quantifiées soit sur une période de 24 heures par créneaux de 3 heures (A), soit par périodes de 12 heures (B). REM : sommeil paradoxal ; CSDS : chronic social defeat stress ; Light : période diurne ; Dark : période nocturne. Comparaisons post-hoc: \*p < 0.05.

### 2.3. Discussion

Les résultats obtenus sur la durée des états de vigilance pendant et après le CSDS suggèrent que le variant p.T8I pourrait moduler les effets du stress de défaite sociale. Cependant, il est important de noter que ces données demeurent préliminaires. Pour déterminer l'influence du variant p.T8I, il sera nécessaire d'augmenter le nombre de souris enregistrées et de raffiner notre analyse. En effet, celle-ci ne comprend pas la caractérisation de l'architecture des états de vigilance ni celle de la puissance spectrale de l'EEG. Celles-ci sont riches en informations, notamment car elles permettent d'évaluer respectivement la stabilité et la profondeur du

sommeil, qui sont des indicateurs de sa qualité. Malgré ces limitations, nous discutons les données obtenues dans les paragraphes suivants.

### *2.3.1. Les perturbations de l'éveil induites par le CSDS et influence du variant p.T8I chez les souris mâles*

Chez les souris mâles, la défaite sociale induit un hyperéveil et une très forte inhibition des quantités de sommeil paradoxal. Cet effet sur l'éveil est principalement observé au 1<sup>er</sup> jour du CSDS chez les souris témoins (Figure 40). En revanche, cette augmentation des durées d'éveil est significative au 1<sup>er</sup> et au 10<sup>ème</sup> jour du CSDS chez les souris p.T8I suggérant que ces dernières sont affectées de manière plus prolongée et stables par ce stress. L'augmentation de l'éveil en réponse immédiate au stress est interprétée comme permettant à l'animal d'adopter une réponse comportementale adaptée face au danger. Ainsi, une interprétation de ces résultats pourrait être que les souris témoins sont moins vigilantes suite à un conditionnement aversif (CSDS) et dont l'absence peut entraîner des perturbations cognitives et comportementales. Elle résulte de l'activation des systèmes autonome et neuroendocrinien qui permet à l'organisme de faire face aux événements menaçants mais également des neurones de l'éveil (Dampney, 2015 ; Ceccatelli et al., 1989 ; España et al., 2003 ; Nollet et al., 2011 ; Li et al., 2020). Récemment, il a également été montré que les neurones glutamatergiques de la VTA régulent l'éveil et les comportements défensifs par le biais de leurs projections dans la CeA (Chen et al., 2022). Une autre étude souligne également le rôle de l'amygdale, mais cette fois-ci en lien avec le thalamus paraventriculaire, dans l'hyperéveil induit par l'odeur d'un prédateur (Zhao et al., 2022). Il serait intéressant d'évaluer plus précisément l'influence de l'amygdale dans l'hyperéveil induit par la défaite sociale et cela de façon longitudinale lors du CSDS chez les souris témoins et p.T8I. En ce qui concerne l'inhibition du sommeil paradoxal après stress, il est intéressant de noter qu'il perdure plus longtemps que l'hyperéveil. Cependant, le rôle de cette inhibition dans la réponse au stress reste à déterminer expérimentalement.

Nous avons également observé une augmentation de l'éveil pendant la période de récupération post-CSDS chez les souris mâles témoins (Figure 41). Cet hyperéveil pourrait être interprété comme un phénotype de type insomniaque révélateur des effets délétères du stress chronique sur le sommeil. De plus, l'hyperéveil est reconnu comme un symptôme central de plusieurs autres troubles, y compris la phase maniaque du trouble bipolaire ou le trouble de stress post-traumatique. Pour le confirmer, il est cependant nécessaire d'évaluer si cet

hyperéveil s'accompagne d'un sommeil plus fragmenté et moins profond. De même, les études chez l'humain et l'animal suggèrent que l'insomnie est un trouble de l'hyperéveil résultant d'un défaut de coordination entre les neurones de l'éveil et du sommeil, avec des groupes de neurones de l'éveil actifs alors que l'état dominant est le sommeil (Nofzinger et al., 2004 ; Cano et al., 2008). Il serait donc intéressant d'évaluer si cette augmentation de l'éveil post-CSDS est associée à une activation anormale des neurones de l'éveil grâce au marqueur d'activation neuronale c-Fos (Cano et al., 2008). Notamment, il serait pertinent de conduire cette étude spécifiquement au niveau des neurones du NAc, qui est une région modulatrice à la fois des effets comportementaux du CSDS, mais également des états de vigilance. Cependant, l'influence du variant p.T8I sur le sommeil et l'éveil semble mineure pendant la période de récupération et il est difficile de lui imputer un rôle sans études plus approfondies.

### *2.3.2. Les perturbations du sommeil induites par le CSDS sont liées au sexe*

Bien que de plus en plus d'études examinent les effets comportementaux en réponse au stress en fonction du sexe, cet aspect demeure largement sous-exploré dans le domaine de la régulation du sommeil. Ici, nous avons observé que l'effet immédiat du CSDS sur les états de vigilance diffère entre les souris mâles et femelles. Ainsi, seules les souris mâles se caractérisent par un effet éveillant immédiat du stress. Ces données sont en accord avec celles obtenues après stress de contention qui montrent un impact plus important du stress chez les souris mâles en comparaison des souris femelles (Koehl et al., 2006). Dans cette étude, le stress est réalisé en période diurne et des différences entre les deux sexes sont également observées dans la période nocturne qui suit. Ainsi, les souris mâles présentent un rebond de sommeil paradoxal beaucoup plus marqué que les souris femelles. L'ensemble de ces effets est dépendant des hormones sexuelles qui peuvent directement agir sur les neurones de l'éveil et du sommeil (Paul et al., 2009 ; Dorsey et al., 2021). De plus, les effets du CSDS sur les états de vigilance dépendent fortement du moment où le stress a été délivré. En effet, lorsqu'il est réalisé en période diurne, il a également des effets promoteurs de sommeil dans la période nocturne qui suit le CSDS chez les souris mâles (Henderson et al., 2017; Meerlo et al., 2001). Dans ce contexte, il serait intéressant d'analyser le sommeil des souris témoins et mutantes mâles et femelles dans la phase nocturne qui suit la défaite sociale. En revanche, le CSDS a un effet inhibiteur majeur sur le sommeil paradoxal indépendamment du sexe suggérant qu'il est critique dans la réponse au stress. Les données obtenues pendant la période de récupération semblent également indiquer une modulation de l'éveil et du sommeil lent plus marquée chez les souris mâles. En revanche, le sommeil paradoxal est diminué uniquement chez les souris

femelles pendant la période de récupération. Bien que ces données suggèrent à nouveau des différences liées au sexe en post-CSDS, ces tendances restent à confirmer sur de plus grandes cohortes de souris. Enfin, chez les souris femelles, le variant p.T8I n'influence pas les quantités d'éveil et de sommeil lors du CSDS et en post-CSDS, renforçant les observations comportementales en réponse au CSDS.

Ainsi, bien que certaines données de notre étude sur le sommeil soient encore préliminaires, elles soulignent l'importance d'explorer les différences liées au sexe pour approfondir notre compréhension des effets du stress sur les états de vigilance, avant d'établir des liens plus précis entre perturbations du sommeil et comportements émotionnels.

# DISCUSSION GENERALE

---



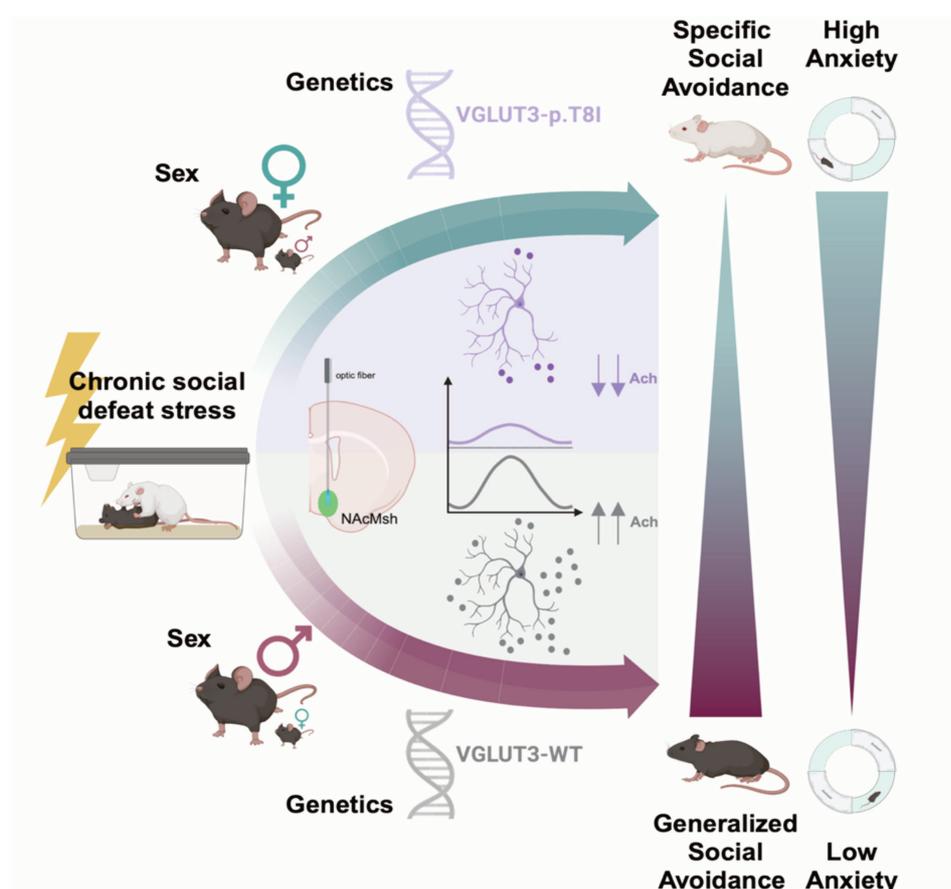
# Discussion Générale

La compréhension de la modulation des réponses inadaptées au stress revêt une importance capitale pour la recherche translationnelle en psychiatrie, qui vise à prévenir et traiter les troubles psychiatriques liés au stress. Tandis que la dopamine (DA) dans le noyau accumbens (NAc) a fait l'objet de nombreuses études concernant son rôle dans la régulation de la susceptibilité au stress et des troubles psychiatriques associés, l'importance de l'acétylcholine (ACh) a été sous-estimée (Chaudhury et al., 2013 ; Cao et al., 2010 ; Willmore et al., 2022 ; Dai et al., 2022). Une des difficultés de l'étude du rôle de l'ACh dans le striatum est due au fait que les interneurons cholinergiques (CINs), principale source d'ACh dans le striatum, co-libèrent également du glutamate (Gras et al., 2008). Des travaux princeps de l'équipe ont montré que la présence de VGLUT3 dans les CINs favorise l'accumulation d'ACh dans les vésicules synaptiques *via* un mécanisme nommé synergie vésiculaire (Gras et al., 2008). Ainsi, il peut être difficile d'identifier le rôle spécifique de chaque neurotransmetteur, et cela plus particulièrement lorsque l'activité des CINs est manipulée par des approches de chimogénétique ou d'optogénétique. Ces considérations montrent l'intérêt d'étudier le variant VGLUT3-p.T8I. Suite à l'identification de ce variant chez des patients polytoxicomanes, notre équipe a mis en évidence qu'il entraîne une diminution de la libération d'ACh par les CINs liée à une diminution de la synergie vésiculaire par un mécanisme qui reste à déterminer, sans toutefois affecter la libération de glutamate. Cette diminution d'ACh est associée à une baisse de la libération de DA dans le striatum dorsal, suggérant que l'ACh peut moduler la libération de DA dans le striatum (Favier et al., 2024). Ainsi, à travers l'étude de ce variant induisant une hypocholinergie striatale, l'étude du rôle de l'ACh dans la susceptibilité au stress et la résilience est rendue possible.

L'objectif de mon travail de thèse a donc été d'évaluer l'influence du variant p.T8I sur la réponse au stress chronique de défaite sociale (CSDS) à l'aide d'un modèle murin génétiquement modifié pour exprimer ce variant dans le gène *Slc17a8*. Pour cela, j'ai d'abord étudié la modulation du comportement en réponse au CSDS chez des souris témoins (VGLUT3<sup>+/+</sup>) ou mutantes portant ce variant (VGLUT3<sup>T8I/T8I</sup>), mâles et femelles. En particulier, je me suis intéressée aux comportements sociaux et de types anxieux. Compte tenu

du rôle déterminant des transmissions cholinergique et dopaminergique au sein du NAc dans la susceptibilité au stress, j'ai également étudié l'influence de ce variant sur la libération de ces neurotransmetteurs *in vivo* lors de comportements sociaux chez les souris mâles. Puis, du fait de la forte comorbidité entre troubles anxio-dépressifs et pathologies liées au sommeil, ainsi que des études récentes mettant en avant l'implication du NAc dans la régulation des états de vigilances, j'ai évalué ces derniers en réponse au CSDS chez des souris témoins ou mutantes mâles et femelles.

L'ensemble des résultats obtenus soulignent l'impact de deux facteurs sur la réponse comportementale au stress environnemental de CSDS : le sexe et le variant allélique p.T8I. Suite au CSDS, ces deux facteurs favorisent une meilleure discrimination sociale, caractérisée par un évitement social spécifique du stimulus menaçant et des niveaux plus élevés d'anxiété. Chez les souris mâles, des enregistrements *in vivo* par photométrie de fibre ont permis de mettre en évidence, pour la première fois, des signatures cholinergiques distinctes au sein du NAc, associées à des comportements opposés en termes d'adaptation. Ces résultats, schématisés dans la Figure 49, soulignent le rôle de l'ACh dans le NAc dans la régulation de la réponse comportementale liée à la susceptibilité au stress, et seront discutés plus en détails ici.



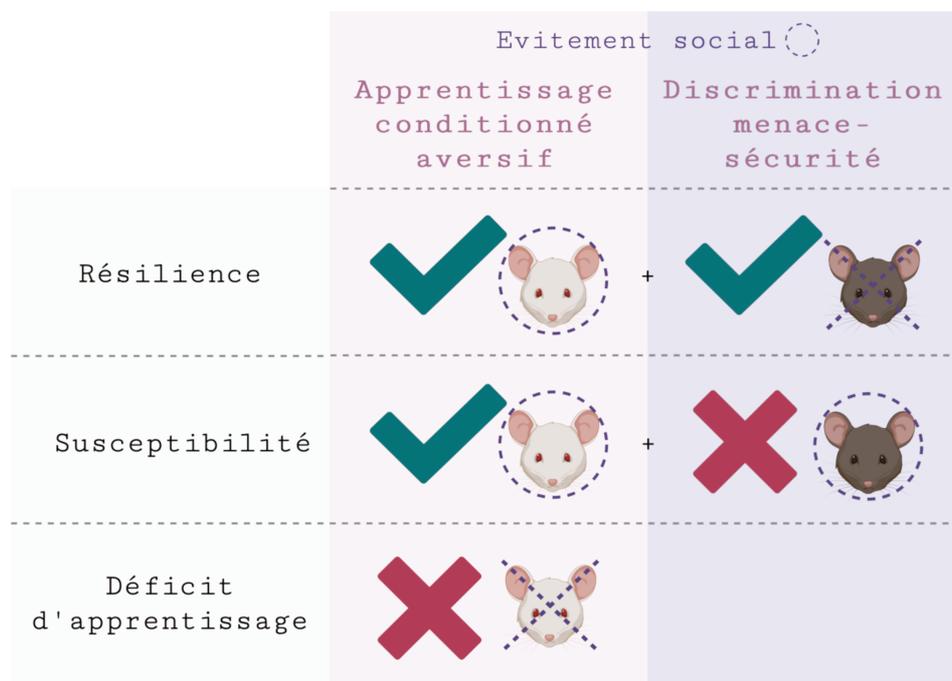
**Figure 49.** Représentation des différents facteurs impliqués dans la modulation de la réponse comportementale au CSDS.

## 1. Rôle du variant p.T8I dans les comportements liés à la susceptibilité au stress

Chez les souris mâles, l'étude de la modulation de la réponse comportementale suite au CSDS a révélé une distinction nette entre les souris témoins et celles portant le variant p.T8I. Après 10 jours de CSDS, le test d'interaction sociale (SI) est traditionnellement employé pour distinguer les souris résilientes, qui présentent une préférence sociale envers la souris CD-1, des souris susceptibles, chez qui l'on observe une perte de préférence sociale pour ces souris (Krishnan et al., 2007). Les résultats obtenus pour ce test montrent un temps passé dans la zone d'interaction plus réduit, ainsi qu'une perte de préférence sociale pour les souris CD-1 plus importante chez les souris  $VGLUT3^{T8I/T8I}$  en comparaison des souris témoins, suggérant ainsi une plus grande susceptibilité au stress.

Cependant, cette catégorisation fait depuis peu l'objet d'une reconsidération. Notamment, plusieurs études rapportent l'implication de l'apprentissage conditionné dans le modèle de CSDS, avec un évitement social spécifique des caractéristiques physiques de la souche de l'agresseur (CD-1) et qui n'est donc pas généralisé à d'autres souches. De plus, cet évitement social peut être supprimé suite à un protocole d'extinction, appuyant l'hypothèse d'un comportement conditionné (Ayash et al., 2020 ; Murra et al., 2022). Une première limite de ces études était qu'elles ne tenaient pas compte de la variabilité inter-individuelle en réponse au stress initialement observée avec le test classique d'interaction sociale, puisque les comportements décrits étaient observés à l'échelle du groupe. D'un point de vue translationnel, cette remise en question de la définition de résilience était nécessaire, en revanche, il était également primordial de s'interroger sur de nouveaux paradigmes permettant de modéliser cette variabilité inter-individuelle. C'est ce qu'a récemment permis une étude, en distinguant les souris selon leurs performances sociales conditionnées basées sur la discrimination entre le stimulus associé à la menace (souris CD-1) et le stimulus sans menace (souris C57BL6) après un stress de CSDS (Ayash et al., 2023). Il a ainsi été mis en évidence plusieurs types de réponses suite au CSDS, avec des souris ne présentant pas de perte de préférence sociale envers le congénère associé à la menace. Ces souris sont donc caractérisées par un déficit d'apprentissage aversif conditionné, un comportement inadapté, alors que ce phénotype était auparavant assimilé à la résilience. Selon ces auteurs, la résilience serait plutôt caractérisée par un apprentissage aversif conditionné intact reflété par l'évitement de la CD-1, mais également une discrimination réussie entre les stimuli menaçant et non menaçant

(discrimination menace-sécurité), c'est-à-dire par un évitement social spécifique de la cible associée à la menace (CD-1), qui ne se généralise pas aux autres souches. A l'inverse, les souris désormais qualifiées de susceptibles sont celles qui montrent un apprentissage aversif intact mais une discrimination menace-sécurité altérée, caractérisée par un évitement social généralisé à tout autre congénère (non restreint aux CD-1) (Figure 50). Cette approche, en recontextualisant le comportement en réponse au CSDS, conduit à une analyse plus fine permettant de capturer la complexité des comportements induits par le stress et des mécanismes qui les sous-tendent. En prenant ces considérations en compte, j'ai pu approfondir mes analyses de comportements d'approche sociale à travers une normalisation z-score.



**Figure 50. Schéma récapitulatif des différentes réponses comportementales induites par le CSDS en fonction de l'évitement social.**

D'après ce modèle, les souris qui évitent la souris CD-1 ont un apprentissage aversif intact. Si elles n'évitent pas la souris C57BL6, elles présentent une discrimination menace-sécurité intacte, et sont donc qualifiées de résilientes. Les souris qui évitent la souris CD-1, ayant donc un apprentissage intact, mais qui évitent également la souris C57BL6, présentant donc une discrimination altérée, sont qualifiées de susceptibles. Enfin, les souris qui n'évitent pas la souris CD-1 présenteraient un déficit d'apprentissage aversif. *Selon les critères d'Ayash et al. (2023).*

Mes résultats montrent que les préférences sociales des souris témoins sont affectées négativement de manière similaire par le CSDS vis-à-vis de différentes cibles sociales (CD-1 et C57BL6), suggérant une perte de préférence sociale non spécifique envers le stimulus associé au danger. En effet, en plus de présenter un évitement social envers les souris CD-1,

les souris  $VGLUT3^{+/+}$  montrent également une perte de préférence sociale envers les souris C57BL6, indiquant une faible discrimination des indices sociaux menace-sécurité, ce qui est associé à une réponse inadaptée après 10 jours de CSDS. À l'inverse, les souris  $VGLUT3^{T8I/T8I}$  présentent une perte de préférence sociale accrue envers la souris CD-1 tandis que la préférence sociale envers la souris C57BL6 n'est pas affectée. La quantification de cette différence de modulation du CSDS sur la préférence sociale entre deux cibles sociales distinctes représente donc la capacité à discriminer entre un stimulus social associé à la menace et un autre associé à la sécurité, caractérisant une réponse adaptée au stress. De plus, une modélisation par régression logistique a permis d'appuyer l'importance de ce phénotype comportemental dans la prédiction du génotype (Résultats 1.1., Figure 1E). Il est intéressant de noter qu'ici, le phénotype des souris  $VGLUT3^{+/+}$  suggère une incapacité à répondre de manière adaptative au CSDS, tandis que le variant p.T8I semble conférer une capacité de résistance à ce stress, associée à une réponse de peur non-pathologique d'après le contexte de CSDS.

La réponse de peur conditionnée est souvent associée à de l'anxiété, comme le confirment mes résultats, mais leur relation reste cependant controversée. Chez l'humain, l'anxiété est une émotion normale et adaptative, définie par son caractère anticipatoire par rapport à une menace potentielle qui permet de mieux faire face à un environnement et d'éviter cette menace (Belzung et Griebel, 2001 ; Daviu et al., 2019 ; Takagi et al., 2018). L'anxiété devient pathologique seulement lorsqu'elle n'est plus régulée, qu'elle persiste de façon chronique, ou encore lorsqu'elle est présente à l'état basal en l'absence de stimuli menaçants. Dans l'étude des réponses au CSDS, l'anxiété est mesurée suite à 10 jours consécutifs d'attaque sociale. Dans ce contexte, la présence d'un état d'anxiété semble adaptative, visant à empêcher l'exposition à des menaces potentielles. Alors que le protocole classique de CSDS induit des comportements de type anxieux indépendamment du statut de susceptibilité, nous n'avons pas observé d'augmentation des comportements de types anxieux suite au CSDS chez les souris  $VGLUT3^{+/+}$  (Krishnan et al., 2007). Cela peut s'expliquer dans un premier temps par le protocole modifié de CSDS utilisé, qui réduit de 24 heures à 20 minutes le temps de contact sensoriel protégé avec l'agresseur CD-1 suivant les 5 minutes de contact non protégé. L'exposition sensorielle protégée est classiquement utilisée pour renforcer l'intensité de ce stress chronique *via* l'exposition auditive, visuelle et olfactive à son agresseur. Toutefois, cette phase protégée peut également être interprétée comme une phase d'extinction (Ayash et al., 2023). Dans l'étude menée par Ayash et al. (2023), le contact physique protégé pendant plusieurs jours est en effet utilisé comme un paradigme d'extinction. En effet, l'agresseur est

alors incapable d'attaquer physiquement, ce qui diminue sa valence aversive. De ce fait, une exposition sensorielle réduite comme employée dans notre étude, ne permettrait pas la mise en place de ce phénomène d'extinction. Ainsi, notre protocole pourrait induire un stress plus intense, amplifiant la valeur aversive du stimulus agresseur (CD-1). Dans ce contexte, il est possible que la valeur saillante du stimulus agresseur soit trop forte pour les souris témoins, entraînant une incapacité à développer une réponse adaptative d'anxiété. Ainsi, il serait intéressant d'étudier la réponse au CSDS en utilisant des protocoles à sous-seuil (*subthreshold*), afin de pouvoir déterminer à partir de quel moment la réponse devient non-adaptative et mettre en exergue la variabilité inter-individuelle.

A l'inverse, le variant p.T8I est associé à la fois à une meilleure discrimination entre les stimuli de menace et de sécurité, et à des niveaux d'anxiété plus élevés. Plusieurs études chez l'humain s'accordent sur un lien entre une réponse de peur pathologique liée à l'anxiété, tandis que d'autres ont montré une corrélation positive entre la discrimination menace-sécurité et les niveaux d'anxiété (Rehbein et al., 2015 ; Beckers et al., 2023). L'anxiété est notamment associée à des processus cognitifs attentionnels, et plus particulièrement envers des stimuli aversifs (Eysenck, 1992 ; Richards et al., 2014 ; Valadez et al., 2022). En effet, la détection des stimuli associés à une menace est essentielle afin de pouvoir réagir de manière adaptative face à une situation et implique des processus cognitifs tels que l'hypervigilance ou encore l'attention sélective, qui permettent de diriger et maintenir l'attention vers des stimuli saillants et pertinents par rapport au contexte (voir Richards et al. (2014) pour une revue). Ainsi, la réponse d'anxiété des souris  $VGLUT3^{T8I/T8I}$  pourrait refléter des capacités cognitives d'attention plus performantes en réponse au stress et participer ainsi à une réponse adaptative. Alors que l'anxiété et les processus attentionnels peuvent encourager une réponse adaptative, comme observée chez les souris p.T8I, des dysfonctionnements de ces processus peuvent également devenir pathologiques. Par exemple, l'incapacité à diriger son attention vers des informations saillantes de l'environnement, de la maintenir, ou à l'inverse d'attribuer une saillance aversive à des stimuli neutres (généralisation) sont caractéristiques de plusieurs troubles psychiatriques dont le trouble déficit de l'attention avec ou sans hyperactivité, les troubles anxieux généralisés, ou encore les troubles de stress post-traumatique (TSPT) (Iacoviello et al., 2014). L'ensemble de ces résultats fait donc particulièrement écho à la recherche clinique sur les TSPT où les patients atteints de ces troubles présentent une peur généralisée affectant leur fonctionnement quotidien (Lissek et al., 2010).

En résumé, bien que les souris mâles  $VGLUT3^{Tsl/Tsl}$  présentent un évitement social envers la souris CD-1 significativement plus important que les souris témoins, ce qui est classiquement associé à une plus grande susceptibilité au stress, mes résultats montrent que cet évitement est spécifique de la souche CD-1 associée à la menace, traduisant ainsi une meilleure discrimination sociale en réponse au stress chronique, se rapprochant de la définition de résilience humaine (Southwick et al., 2023). A l'inverse, les souris témoins montrent à l'échelle du groupe une absence de discrimination menace-sécurité, rappelant les comportements observés dans certaines pathologies psychiatriques telles que le trouble d'anxiété généralisée ou le TSPT.

Afin d'approfondir l'influence du variant p.T8I sur les comportements en réponse au stress observés à l'échelle du groupe, il serait intéressant d'étudier les comportements d'apprentissage des souris mâles après un protocole d'extinction du CSDS (Ayash et al., 2023). Cette étude a montré que les souris présentant un évitement social non généralisé présentent une meilleure extinction après un protocole d'extinction de 16 jours où les souris expérimentales étaient soumises à 15 minutes de contact sensoriel protégé avec les souris CD-1 du CSDS. Selon cette étude, les mâles  $VGLUT3^{Tsl/Tsl}$ , qui ont une discrimination intacte, devraient également présenter une meilleure extinction que les souris témoins. La compréhension de ces mécanismes chez les rongeurs pourrait également éclairer la recherche chez l'humain, où des données montrent que les biais résultant de l'apprentissage conditionné peuvent être atténués par l'entraînement (Ereira et al., 2021). Cela pourrait ainsi ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques par la réévaluation des stimuli chez les individus souffrant de troubles anxieux et de TSPT. Puis, afin de préciser la variabilité inter-individuelle et d'étudier l'influence du variant p.T8I sur celle-ci, il serait intéressant par la suite de sous-catégoriser les phénotypes à l'échelle individuelle. Cette catégorisation comportementale des souris  $VGLUT3^{Tsl/Tsl}$  couplée à l'étude des neurotransmissions au sein du NAc, permettrait de clarifier les mécanismes neuronaux mis en jeu dans la susceptibilité et la résilience. Enfin, on peut supposer que si ce variant est associé à une meilleure discrimination en réponse à un stress chronique dans un contexte social, il peut aussi potentiellement l'être dans un contexte environnemental non social. Cela pourrait être testé dans un protocole de peur conditionnée chronique qui reproduirait le CSDS mais dans un contexte non social. Au cours d'un protocole de 10 jours, les animaux seraient introduits le jour 1 dans un contexte A, où après un délai de 3 minutes, des chocs électriques seraient délivrés à intervalles irréguliers et couplés à un stimulus discret (*i.e.* auditif de fréquence X). Les jours suivants, les souris seraient introduites à 2 heures d'intervalle et de façon randomisée, soit d'abord dans le contexte A où elles seraient

à nouveau soumises à l'association son X/choc électrique, soit dans ce même contexte A mais où l'émission du son Y (de fréquence différente) ne serait jamais associée au choc électrique. Le comportement d'immobilité (*freezing*) des animaux, classiquement associés à l'expression de la peur, serait relevé lors des 3 premières minutes avant l'émission des sons. Cela nous permettrait de suivre l'évolution de l'apprentissage aversif ainsi que la discrimination entre le son X (stimulus aversif conditionné/menace) et le son Y (stimulus neutre/sécurité). Ce protocole, inspiré de celui classiquement utilisé pour mettre en évidence la capacité de séparation de pattern, nous permettrait d'évaluer la variation des niveaux d'immobilisation des animaux en présence des deux stimuli (Sahay et al., 2011). Cette variation représenterait la discrimination menace-sécurité, de la même manière qu'entre les souris CD-1 et C57BL6 dans le CSDS, mais cette fois-ci dans un contexte non social. Puis, un protocole d'extinction de peur du son X (*i.e.* 10 jours de présentation du son X dans le contexte A en absence de choc électrique) permettrait d'affiner davantage le phénotype induit par le variant à la suite de ce protocole.

Cependant, l'ensemble de ces observations reste très peu éthologique, et réduit donc la justesse des phénotypes observés qui ne reflètent pas la complexité des comportements motivationnels et des facteurs les influençant. Il est probable que pour cette raison nous ne puissions accéder à l'ensemble des facteurs caractérisant la résilience. En effet, dans ces protocoles nous ne pouvons pas isoler et contrôler tous ces facteurs. Par exemple, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que la décision d'approche de la souris CD-1 lors du test d'interaction sociale prenne en compte certes les caractéristiques physiques de la souris associée à la menace, mais également son contexte. Dans ce test, la souris CD-1 est située à l'intérieur d'une boîte en plexiglas qui protège la souris expérimentale d'une potentielle attaque, pouvant interférer avec l'évaluation de la situation sur laquelle se base le comportement d'approche ou d'évitement. De plus, il pourrait paraître adaptatif de ne pas être affecté par un stress et de continuer à présenter un comportement habituel, comme approcher un congénère ressemblant à l'agresseur. Si dans certaines situations cette absence d'évitement peut être en faveur de la survie, ce n'est pas systématiquement le cas, et le fait qu'un comportement ne soit pas modifié après un événement traumatique est plutôt considéré comme pathologique en termes d'adaptation. Ici, c'est justement parce que les souris n'ont pas été soumises à un protocole d'extinction que le comportement d'approche est inadapté. Toutes ces réflexions sont primordiales pour les futures recherches sur la résilience qui devraient prendre en compte ces considérations afin de concevoir des protocoles plus éthologiques,

permettant ainsi de contrôler divers aspects influençant la prise de décision dans un contexte reflétant les dynamiques naturelles propres à l'espèce étudiée.

## 2. Rôle des neurotransmissions cholinergique et dopaminergique au sein du NAc dans la susceptibilité au stress

Compte tenu des données de l'équipe montrant l'influence du variant VGLUT3-p.T8I sur la libération d'ACh, en plus de l'implication de celle-ci ainsi que de celle de la DA dans le NAc dans l'apprentissage associatif et la susceptibilité au CSDS, nous avons enregistré leurs dynamiques dans le NAc pendant l'exposition au stress de CSDS ainsi que pendant le test d'interaction sociale (Picciotto et al., 2012 ; Warner-Schmidt et al., 2012 ; Cheng et al., 2019 ; Chaudhury et al., 2013). Nos résultats montrent que la transmission cholinergique dans le NAc est modulée par la défaite sociale et le test d'interaction sociale. En particulier, nous avons observé une modulation graduelle de la dynamique de libération de l'ACh dans le NAc au début de l'attaque par la souris CD-1, qui est significativement augmentée entre le 1<sup>er</sup> et le 10<sup>ème</sup> jour de CSDS chez les souris mâles témoins. Chez les souris témoins, cette réponse cholinergique modulée par le CSDS est associée comportementalement à une absence de discrimination sociale menace-sécurité post-CSDS suggérant une incapacité à répondre de manière adaptative après un stress répété. L'ACh étant connue pour encoder la saillance des stimuli, cette réponse induite par l'attaque de la CD-1 associée à la menace pourrait indiquer une plus forte association de la valeur aversive de la CD-1 chez les souris témoins (Ravel et al., 2003 ; Aosaki et al., 1994 ; Blasquez et al., 2002 ; Picciotto et al., 2012 ; Belilos et al., 2023). Après 10 jours de CSDS, cette association aversive serait trop importante chez les souris témoins, altérant ainsi la capacité à discriminer un congénère associé à la menace d'un autre associé à la sécurité, comme le suggère l'influence en U inversé du stress sur les performances cognitives (Yerkes & Dodson, 1908 ; Russo et al., 2012). Par ailleurs, une étude a montré que l'injection chronique d'antagonistes des récepteurs nicotiques  $\alpha 7$  avant chaque défaite sociale augmente les temps d'interaction avec la souris CD-1 post-CSDS (Morel et al., 2018). Dans mon étude, l'augmentation des taux d'ACh au moment du conditionnement par CSDS chronique pourrait induire une désensibilisation des récepteurs nicotiques, reproduisant l'effet des antagonistes (Morel et al., 2018 ; Besson et al., 2007). Notamment, plusieurs études ont montré que les souris knock-out pour la sous-unité  $\beta 2$  des récepteurs nicotiques,

semblables à une désensibilisation de ces récepteurs suite à une exposition prolongée d'ACh, présentent une flexibilité cognitive sociale altérée (Granon et al., 2003; Serreau et al., 2011 ; Avale et al., 2011 ; Chabout et al., 2013). En particulier, la transmission cholinergique dépendante des récepteurs  $\beta 2$  est impliquée dans la flexibilité sociale en réponse au stress (Nosjean et al., 2015). De plus, Belilos et al. (2023) ont montré que la libération d'ACh est augmentée par les stimuli aversifs après un choc électrique et que cette libération est proportionnelle à l'intensité du stimulus aversif. Dans mon étude, le signal cholinergique en réponse à l'attaque de la souris CD-1 coïncide avec le stimulus aversif (CD-1), mais aussi avec la conséquence aversive (attaque), auquel cas nous retrouvons cette réponse cholinergique qui serait liée à l'association aversive. Par ailleurs, plusieurs études ont montré que l'inhibition des CINs, et donc celle de la libération d'ACh, est nécessaire au développement des comportements classiquement attribués à la susceptibilité (c'est-à-dire l'absence de préférence sociale pour les souris CD-1 post-CSDS), et donc potentiellement à ceux observés chez les souris p.T8I qui montrent une perte de préférence plus importante pour les CD-1 (Warner-Schmidt et al., 2012 ; Cheng et al., 2019). Par ailleurs, l'inhibition des CINs par la DA sur les récepteurs D2 semble également nécessaire à l'apprentissage (Chantranupong et al., 2023 ; Martyniuk et al., 2022 ; Chancey et al., 2023). Étant donné que nous ne retrouvons pas cette réponse graduelle du signal cholinergique chez les souris mâles p.T8I et que celles-ci présentent un comportement adaptatif lié à une meilleure discrimination menace-sécurité, il est possible que le variant p.T8I, en diminuant une réactivité cholinergique trop intense, ait pu empêcher cette association trop saillante à l'origine d'une moindre discrimination. Cette absence d'augmentation graduelle de la libération d'ACh, directement liée au variant, a ainsi pu atténuer les effets aversifs du stress et prévenir les réponses comportementales pathologiques. À l'inverse, la répétition trop intense du CSDS chez les souris témoins a exacerbé la réponse d'ACh liée à l'aversion lors du 10<sup>ème</sup> jour de CSDS, promouvant une réponse comportementale non-adaptative.

En accord avec cette hypothèse, plusieurs études ont démontré le rôle de l'ACh et des CINs dans la réponse comportementale après un apprentissage conditionné (Mark et al., 1995 ; Hoebel et al., 1999 ; Hoebel et al., 2007 ; Collins et al., 2019). Ainsi, Collins et al. (2019) ont montré qu'après un apprentissage de récompense conditionnée, l'inhibition chémo-génétique des CINs pendant la présentation du stimulus conditionné augmente les comportements motivationnels conditionnés. À l'inverse, l'activation optogénétique des CINs au moment de la présentation du stimulus conditionné, après l'apprentissage, supprime ces comportements motivationnels. Cette réponse est médiée par les récepteurs nicotiques  $\beta 7$ , qui lorsqu'activés

par l'ACh lors de la présentation du stimulus conditionné, réduisent le comportement motivationnel conditionné (Collins et al., 2019). Dans le cadre du CSDS, l'approche vers la CD-1 lors du test d'interaction post-CSDS passe également par la modulation des récepteurs nicotiques  $\beta 2$  puisque le blocage aigu par antagonistes de ces récepteurs seulement au moment de ce test augmente le temps passé dans la zone d'interaction (Morel et al., 2018). Cela pourrait ainsi expliquer ce que l'on retrouve lors du test d'interaction sociale post-CSDS dans mon étude (Figure 1B-D). En effet, on observe une réduction du comportement motivationnel d'approche de la CD-1 conditionnée chez les souris p.T8I tandis qu'elles présentent une augmentation de la libération d'ACh à ce moment-là, comme nous le voyons au moment de l'approche vers la CD-1 (nose-to-box). A l'inverse, le comportement d'approche est facilité chez les souris témoins qui ne présentent pas d'augmentation de la libération d'ACh au moment de l'approche. De plus, des études ont montré que la libération d'ACh était augmentée lors de la réponse aversive suite à un apprentissage conditionné aversif, et que son augmentation pharmacologique à l'état basal par infusion locale dans le NAc de néostigmine, un inhibiteur d'acétylcholinestérase, est suffisante pour induire une aversion conditionnée (Mark et al., 1995 ; Hoebel et al., 1999 ; Hoebel et al., 2007). Le signal cholinergique observé lors de l'approche vers la souris CD-1 dans le test d'interaction sociale post-CSDS qui est retrouvé chez les souris p.T8I suggère donc un apprentissage aversif intact tandis que l'absence de ce signal cholinergique chez les souris témoins souligne un apprentissage aversif altéré. Cette capacité est pourtant nécessaire pour guider la réponse comportementale adaptée, et son absence pourrait donner des informations supplémentaires sur la réponse cholinergique dans l'apprentissage aversif (Bradfield et al., 2013 ; Apicella et al., 2017 ; Prado et al., 2017). Il est envisageable que l'intensité du stress, caractérisée par l'augmentation d'un signal d'association aversive cholinergique durant l'apprentissage conditionné du CSDS, ait pu « court-circuiter » les voies impliquées dans l'apprentissage non pathologique de la valeur de l'agresseur CD-1 résultant en un comportement social altéré. On peut également émettre l'hypothèse que le test d'interaction sociale post-CSDS agisse comme un apprentissage d'extinction, puisque la souris CD-1 placée dans une cage en plexiglas ne peut pas attaquer la souris expérimentale. Dans ce contexte, mes observations sont en accord avec la littérature suggérant que l'ACh striatale est impliquée dans la flexibilité cognitive par laquelle un apprentissage passé est désappris en fonction d'un nouveau contexte (ici non dangereux dans la boîte ouverte du test d'interaction sociale) et fait place à un nouvel apprentissage (Ragozzino et Choi, 2004 ; Apicella et al., 2011 ; Bradfield et al., 2013). Plus particulièrement, la transmission cholinergique joue un rôle dans la cognition sociale et l'organisation des comportements sociaux (Granon et al., 2003). Ainsi, l'augmentation du signal cholinergique

observé durant ce qui pourrait être une extinction chez les souris p.T8I pourrait suggérer une meilleure flexibilité cognitive qui est reflétée dans le phénotype induit par le CSDS. À l'inverse, les souris témoins ne présentent pas cette réponse cholinergique et se caractérisent par une mauvaise stratégie comportementale de choix d'approche-évitement. En résumé, l'étude du variant p.T8I, révèle que des signatures cholinergiques distinctes sont corrélées à des réponses comportementales d'adaptation contrastées, offrant une nouvelle compréhension de la susceptibilité au stress.

Par ailleurs, bien que la DA joue un rôle dans la modulation de la susceptibilité au stress, notre étude n'a révélé aucun changement dans la libération dopaminergique pendant le CSDS et les tests d'interaction sociale, ni chez les souris témoins, ni chez les souris p.T8I (Chaudhury et al., 2013 ; Willmore et al., 2022 ; Dai et al., 2022). Notamment, la littérature rapporte une diminution de la signalisation de la DA au début des attaques, que nous ne retrouvons pas (Willmore et al., 2022 ; Dai et al., 2022). Ces divergences pourraient être liées à la région du NAc enregistrée. En effet, ces études ont ciblé le core du NAc, tandis que mes enregistrements étaient menés dans le shell médian du NAc. Plusieurs études rapportent que la dynamique de libération des neurotransmetteurs varie selon les différentes sous-régions du NAc (de Jong et al., 2019 ; de Jong et al., 2023). Ces observations fonctionnelles ne sont pas surprenantes au vu des différences anatomiques entre le core et shell du NAc. En effet, le NAc shell contient plus de striosomes associés à des taux d'acétylcholinestérase plus élevés, faisant de cette région notre région d'intérêt (Brimbelcombe et al. ; Castro et Bruchas, 2019). Malgré une plus grande libération d'ACh au moment de l'attaque lors du 10<sup>ème</sup> jour de CSDS observée chez les souris témoins par rapport aux souris mutantes, il n'y a pas de différence de libération de DA entre les deux groupes au 10<sup>ème</sup> jour. Ces résultats sont surprenants puisque les données de la littérature rapportent une influence réciproque importante (Morris et al., 2004 ; Cragg et al., 2006 ; Chuhma et al., 2014 ; Threlfell et al., 2012 ; Sakae et al., 2015). Ainsi, nous nous serions attendus à avoir également une libération de DA plus importante au moment de l'attaque du 10<sup>ème</sup> jour chez les souris témoins par rapport aux souris mutantes, notamment par l'activation des fibres DAergiques de la VTA par l'ACh *via* les récepteurs nicotiniques (Sakae et al., 2015). Le fait que malgré la différence de libération d'ACh, la libération de DA soit similaire implique que soit la libération d'ACh n'a pas eu, ou très peu, d'influence sur la libération de DA dans le NAcMsh, soit que les résultats de cette influence sont masqués par un autre mécanisme. La première hypothèse est en accord avec des études qui ont récemment remis en question l'influence réciproque entre l'ACh et la DA à travers des études basées sur des comportements plus éthologiques et complexes qui suggèrent en réalité une influence limitée de l'ACh striatale

sur la DA dans la prise de décision basée sur la récompense (Krok et al., 2023 ; Chantranupong et al., 2023 ; Mamaligas et al., 2019). Cependant, il est également possible que mes résultats reflètent un mécanisme de régulation de la DA par l'ACh plus complexe, notamment par les effets opposés qu'exerce l'ACh sur la libération de DA dans le striatum en fonction des profils de décharge des terminaisons dopaminergiques de la VTA. En effet, l'ACh diminue la libération de DA en conditions toniques alors qu'elle augmente la libération de DA en conditions phasiques (Zhang et al., 2004 ; Rice et Cragg, 2004 ; Zhang et al., 2009 ; Threlfell et Cragg, 2011). Par ailleurs, les profils de décharge des terminaisons DAergiques de la VTA déterminent la susceptibilité et la résilience au CSDS (Chaudhury et al., 2013). Ainsi, les neurones DAergiques de la VTA ont une décharge phasique chez les souris susceptibles tandis qu'ils ont une décharge tonique chez les souris résilientes. Par conséquent, l'ACh diminuerait la libération de DA dans le NAc des souris résilientes et l'augmenterait chez les souris susceptibles. Si nous utilisons la classification traditionnelle, c'est-à-dire prenant seulement en compte l'évitement social envers les CD-1, ici les souris témoins présentent un comportement traditionnellement associé à la résilience, et les souris p.T8I présentent un phénotype traditionnellement associé à la susceptibilité. Dès lors, on devrait observer une diminution de la libération de DA par l'ACh chez les souris témoins, mais une augmentation de celle-ci par l'ACh chez les souris p.T8I. Cependant, une conséquence directe de ce variant est de réduire les taux d'ACh dans le striatum. De ce fait, malgré la modulation positive de l'ACh sur les fibres DAergiques dans le NAc due à leur décharge phasique, la libération est tout de même diminuée du fait d'une diminution de la quantité d'ACh pour effectuer cette modulation positive. Le variant p.T8I, en réduisant les taux d'ACh dans le NAc, ramènerait au même niveau la libération de DA que les souris témoins en post CSDS. De plus, l'inhibition des CINs par la DA par le biais des récepteurs D2 nécessaire pour la flexibilité cognitive et l'apprentissage pourrait également expliquer mes résultats comportementaux. Chez les souris témoins, une libération de DA comparable à celle observée chez les p.T8I n'est pas suffisante pour inhiber les CINs, pouvant expliquer l'augmentation de la libération d'ACh observée au 10<sup>ème</sup> jour de CSDS. Chez les souris p.T8I, cette inhibition des CINs par la DA ne serait pas nécessaire puisque la libération d'ACh est directement réduite par le variant.

Ainsi, le variant permettrait de compenser la dérégulation de la balance ACh/DA induite par le CSDS dans le NAc, en diminuant directement la signature cholinergique associée à l'aversion et modulant la réponse aversive conditionnée dans le comportement social.

### 3. Différences comportementales liées au sexe

Il est intéressant de noter que le variant p.T8I chez les souris femelles n'a pas d'influence sur la modulation de la réponse comportementale par le stress de CSDS. En effet, les souris femelles témoins comme les souris portant le variant p.T8I présentent le même phénotype caractérisé par un évitement social spécifique du congénère associé à la menace (CD-1) et qui s'accompagne d'une augmentation des niveaux d'anxiété. La présence d'une discrimination adéquate des stimuli sociaux chez les femelles témoins les distingue de leurs congénères mâles témoins, et suggère une différence de comportement adaptatif dépendant du sexe. Une modélisation par régression logistique a montré que le sexe d'une souris expérimentale pouvait être prédit en fonction des réponses comportementales d'anxiété et d'évitement social (Figure 2E). En accord avec ces différences, plusieurs études ont démontré des variations dépendantes du sexe dans la réponse au stress et notamment dans l'anxiété (Bangasser et Cuarenta, 2021 ; Baugher et al., 2022).

De façon surprenante, le sexe femelle serait donc ici un facteur promouvant des comportements adaptatifs, plutôt que favorisant le développement de troubles psychiatriques. Cette hypothèse ne rentre pas nécessairement en contradiction avec les données humaines qui montrent que les femmes sont presque deux fois plus touchées par des troubles anxio-dépressifs (Kessler et al., 2003). En effet, ces évaluations sont le reflet d'un phénotype observé dans un contexte sociétal, où il est largement documenté que les femmes sont sujettes à un nombre plus important de violences physiques, psychologiques et sexuelles (INSEE, 2019). La prévalence des troubles anxio-dépressifs n'est donc pas nécessairement liée à une cause biologique, même s'il est indéniable que les mécanismes neuronaux impliqués dans la réponse au stress soient influencés par des différences au niveau des cibles physiologiques de régulation liées au sexe (Hodes et al., 2015 ; Lorsch et al., 2018). La différence de prévalence de ces troubles entre les deux genres n'exclue donc pas l'existence de facteurs de résistance au stress liés au sexe biologique, qui ne serait pas observé à l'échelle globale de la population car masquée par la présence d'autres facteurs, notamment sociaux, précipitant ces troubles chez les femmes. La recherche sur les différences liées au sexe est nécessaire pour comprendre les différences entre les genres, mais n'est pas suffisante pour rendre compte de la complexité des phénomènes observés. C'est un défi essentiel pour la recherche translationnelle que de

prendre conscience des interactions entre sexe et genre dans la modulation des troubles psychiatriques afin d'appréhender précisément les mécanismes sous-jacents (Ritz et Greaves, 2024).

Outre les dimensions sociologiques, le fait que les femelles présentent des réponses au stress plus adaptatives que les mâles dans mon étude, en accord avec une autre étude, pourrait également être spécifique de la dimension sociale du stress de CSDS (Baugher et al., 2022). En effet, d'autres études effectuées chez la souris montrent que les femelles sont plus vulnérables au développement de symptômes dépressifs dans d'autres types de stress tels que le stress chronique variable (Hodes et al., 2015 ; Muir et al., 2020). Plus particulièrement, plusieurs études ont montré qu'il existait des différences transcriptionnelles dépendantes du sexe au sein du NAc en réponse au stress (Hodes et al., 2015 ; Pfau et al., 2016 ; Lorsch et al., 2018). Ici, des différences épigénétiques dans le fonctionnement du NAc pourraient expliquer que nous n'observions pas d'effet du variant p.T8I sur le comportement des femelles, notamment si la résilience observée est effectivement dépendant de la libération d'ACh dans le NAc durant le stress. En effet, quelques études ont montré des différences dépendantes du sexe dans la transmission cholinergique en réponse au stress (Bangasser et al., 2019 ; Ortiz et al., 2022 ; Baugher et al., 2022). En particulier, il existe dans le NAc un rôle différentiel de la transmission cholinergique lors des comportements d'exploration chez les mâles et les femelles (Razidlo et al., 2021). En effet, tandis que la délétion du récepteur muscarinique M5 dans la VTA chez les femelles induit des comportements liés à la vigilance, elle est associée chez les mâles à une perte d'exploration liée à la nouveauté. De plus, les auteurs de cette étude ont montré que la fonction de ce récepteur était affectée par un stress répété, appuyant l'hypothèse selon laquelle la transmission cholinergique dans le NAc durant le CSDS module les comportements adaptatifs et qu'elle est différentiellement régulée par le stress chez les femelles. Afin d'étudier l'influence du sexe sur la neuromodulation dans le NAc lors du CSDS, il serait pertinent d'enregistrer par photométrie de fibre les dynamiques d'ACh et de DA chez les femelles. Étant donné que mes données suggèrent que le phénotype des femelles s'apparente à celui des mâles portant le variant p.T8I, il serait intéressant de voir si ces mêmes phénotypes sont associés à une même signature cholinergique, c'est-à-dire une absence de réponse cholinergique a contrario de celle observée chez les souris mâles témoins lors du 10<sup>ème</sup> jour de CSDS.

Enfin, bien que le protocole de CSDS adapté aux femelles puisse générer un stress quasi similaire entre les mâles et les femelles, il est important de noter quelques limites de ce modèle.

Tout d'abord, ce protocole implique une manipulation supplémentaire envers les femelles avant chaque défaite sociale puisque celles-ci sont maintenues en contention afin de leur appliquer de l'urine autour des parties génitales. Cette manipulation stressante pourrait potentiellement interagir avec les effets du CSDS. D'autre part, tandis que le stress vécu par les souris mâle est un stress éthologiquement valide, puisque naturellement observé entre les deux mâles, ce n'est pas le cas des femelles. C'est d'ailleurs pour cette raison que le protocole classique de CSDS a dû être adapté aux femelles afin d'induire artificiellement une attaque mâle-femelle. Ce protocole n'est donc peut-être pas le plus adéquat à l'étude des réponses éthologiques face à un stress. Néanmoins, il permet d'observer les comportements attendus dans le test d'interaction sociale et les tests d'anxiété, dont l'étude mécanistique reste informative quant aux différences liées au sexe biologique dans la résilience. En somme, son utilité n'est pour le moment pas négligeable et constitue une première base de recherche sur les différences liées au sexe. Dans ce contexte il serait intéressant d'évaluer les effets d'un test de CSDS modifié, dans lequel la souris femelle est le "témoin" de l'agression d'une souris mâle soumise au CSDS (Iniguez et al., 2018).

#### 4. Rôle de VGLUT3-p.T8I dans la modulation des réponses de sommeil induites par le CSDS

Les événements stressants provoquent des altérations des états de vigilance. Nos résultats indiquent que les altérations du sommeil induites par le CSDS sont régulées différenciellement par le variant p.T8I. Chez les souris mâles, les enregistrements durant les 3 heures qui suivent la défaite sociale montrent chez les souris témoins une augmentation de l'éveil au détriment du sommeil paradoxal seulement lors du premier jour de CSDS, par rapport à l'état basal. En revanche, l'effet éveillant du CSDS est prolongé chez les souris p.T8I jusqu'au 10<sup>ème</sup> jour de CSDS et affecte à la fois le sommeil lent et le sommeil paradoxal. Cette disparité temporelle suggère une influence prolongée du variant p.T8I sur l'architecture du sommeil suite au CSDS. Ces temporalités divergentes peuvent représenter des différences de réactivité au stress. Chez les souris témoins, une réactivité précoce mais qui ne perdure pas lors du CSDS pourrait contribuer à la discrimination sociale altérée, et donc aux associations d'apprentissage non-adaptatives. L'hyperéveil est un indicateur d'une plus importante hypervigilance. Ainsi, l'absence de cet hyperéveil présent dès le début du protocole de CSDS mais absent à la fin des 10 jours de stress, pourrait être associée à des perturbations de la mémoire, notamment quant à la discrimination entre les stimuli menaçants et sécurisants dont l'altération est

caractéristique des TSPT (American Psychiatric Association, 2013 ; Nixon et al., 2007 ; Colvonen et al., 2019 ; Pawlyk et al., 2005). Ce marqueur de la réactivité aiguë au stress renforce l'idée que les souris témoins ont été rapidement affectées par le stress, mais que des adaptations physiologiques et comportementales facilitant un comportement adaptatif n'ont pas tenues dans le temps, soulignant une réactivité au stress aiguë et transitoire. En revanche, les souris p.T8I présentent une mise en place plus progressive des effets induits par le stress, qui sont observés depuis le 1<sup>er</sup> jour de stress et jusqu'au dixième jour du CSDS, suggérant une vigilance plus importante aux stimuli aversifs qui pourrait participer à la prévention des associations d'apprentissage non-adaptatives (Ressler et al., 2022 ; Acheson et al., 2015). De plus, le variant p.T8I semble impliqué dans la modulation à long terme de l'éveil et du sommeil lent seulement pendant la nuit. En effet, les souris mâles témoins présentent une augmentation des durées d'éveil 5 jours après la fin du CSDS et cela est observé à la fois durant le jour et la nuit. A l'inverse, cette réponse éveillante à long terme n'est observée que le jour chez les souris p.T8I. Contrairement aux réponses immédiates, les réponses à long terme suggèrent que les souris témoins sont plus sensibles et affectées par le CSDS. Il est important de noter que la période de perturbations du sommeil liées au stress pourrait souligner différents engagements des processus circadiens et homéostatiques qui se reflèteraient comportementalement. Pendant la période qui suit directement la défaite sociale, un hyperéveil pourrait permettre un meilleur encodage des stimuli aversifs, tandis que pendant la nuit, éloignée temporellement du CSDS, un hyperéveil pourrait interagir avec les processus de consolidation de la mémoire. L'influence de ce variant sur l'hypervigilance en réponse au stress fait écho à une autre étude de l'équipe montrant le rôle causal de VGLUT3 dans le raphé dorsal sur l'hyperéveil induit par un stress aigu de défaite sociale (Henderson et al., Annexe 1). On ne peut pas exclure l'hypothèse que l'hyperéveil prolongé observé chez les souris p.T8I au cours du CSDS soit causé par l'activation des fibres de projections des neurones VGLUT3 du raphé dorsal et non du NAc directement, bien que ce dernier soit une cible des projections du raphé. Plusieurs études ont montré l'implication du NAc dans l'éveil et notamment dans le cadre du CSDS (McCullough et al., 2021 ; Luo et al., 2018 ; Oishi et al., 2017). Il serait intéressant d'évaluer le lien causal du NAc dans cet hyperéveil, en délétant VAcHT ou VGLUT3 dans le NAc pour cibler spécifiquement la transmission cholinergique ou glutamatergique. Par ailleurs, les observations à long terme suggèrent une modulation plus prononcée de l'éveil et du sommeil lent chez les souris mâles par rapport aux souris femelles. En effet, le CSDS n'a pas eu d'effet à long terme sur l'éveil ni le sommeil lent. De même, le CSDS n'a pas induit de perturbations immédiates sur l'éveil et le sommeil lent. En revanche, le sommeil paradoxal semble plus critique chez les souris femelles, qui présentent une importante inhibition du sommeil

paradoxal immédiatement après la première défaite sociale, jusqu'au 10<sup>ème</sup> jour de CSDS. Cette perturbation perdure dans le temps, jusqu'à 5 jours après la fin du CSDS. Ces résultats soulignent des différences potentielles dépendantes du sexe après le CSDS, qui nécessitent d'être confirmées. De plus, chez les souris femelles, le variant p.T8I n'affecte pas les niveaux d'éveil et de sommeil pendant et après le CSDS, en accord avec les réponses comportementales observées.

## 5. Limites et perspectives

L'interprétation des données de cette étude doit être nuancée à la lumière des limites énoncées ci-dessous, propres à notre modèle et aux techniques employées.

Tout d'abord, il est important de noter que notre modèle p.T8I n'est pas spécifique du NAc. En effet, le variant allélique p.T8I est retrouvé dans l'ensemble des régions cérébrales exprimant VGLUT3, tels que l'hippocampe, l'amygdale, ou encore le raphé dorsal qui sont également impliquées dans de nombreux comportements émotionnels. Il n'y a donc pas de lien de causalité entre les observations des transmissions cholinergique et dopaminergique dans le NAc et les comportements observés. En outre, il est essentiel de démontrer que la modulation de la transmission cholinergique, que ce soit par activation ou inhibition, peut reproduire ou inverser les comportements observés. Afin de mettre en évidence ce lien causal, il faudrait cibler spécifiquement la transmission cholinergique du NAc. Cependant, la modulation *in vivo* par optogénétique ou chémogénétique des CINs ne permet pas de cibler spécifiquement la signalisation cholinergique puisqu'elle implique également un effet sur la co-transmission glutamatergique. Il est en revanche possible d'étudier les effets de l'inhibition de la transmission cholinergique des CINs dans le NAc par une approche génétique utilisant la lignée VAcT-lox associée à l'injection d'un virus Cre dans le NAc, qui permettrait d'obtenir un knock-out conditionnel du transporteur vésiculaire VAcT dans cette région. Cependant, cette approche manque de résolution temporelle et ne permet pas de moduler la libération d'ACh à des moments précis comme lors de l'attaque ou de l'approche sociale pour reproduire ce que nous avons observé chez les souris mâles témoins et p.T8I. Une approche pharmacologique semble plus pertinente pour montrer qu'une augmentation d'ACh durant le CSDS chez les souris p.T8I permet de reproduire les effets comportementaux observés chez les souris témoins. Par exemple, il serait intéressant d'injecter à l'aide d'une canule couplée à un implant de fibre optique dans le NAc un inhibiteur d'acétylcholinestérase, le donépézil, qui

permet en réduisant l'hydrolyse d'ACh, d'augmenter sa concentration localement. Ces approches pourraient éventuellement permettre l'identification de potentiels traitements pour les TSPT.

Plusieurs facteurs limitants sont également à mentionner concernant la technique de photométrie par fibre couplée à des biosenseurs fluorescents. Notamment, il est primordial de contrôler que le signal lié au biosenseur est bien dépendant du neurotransmetteur étudié. Un moyen classiquement utilisé est de normaliser le signal du senseur avec le signal acquis à une longueur d'onde qui assure que le signal observé est un signal qui ne dépend plus du neurotransmetteur. Cette longueur d'onde, autrement appelée point isobestique, est retrouvée d'après les courbes d'absorption de lumière des senseurs fluorescents et se trouve autour de 405-415 nm pour la plupart des senseurs calciques. En revanche, ce n'est pas le cas pour GRAB-DA<sup>3h</sup> et GACH<sup>3.8</sup>, dont les courbes d'absorption montrent en réalité que le signal récupéré à 415 nm présente une spécificité supérieure à celle du signal récupéré à 470 nm. Ainsi, la normalisation des signaux d'ACh et de DA par le signal récupéré à 415 nm inverse les dynamiques réelles. Pour ces raisons, les signaux de senseurs ont dans cette étude été normalisés à l'aide d'un autre virus mCherry non-spécifique des neurotransmetteurs étudiés, et permettant ainsi de contrôler les mouvements. Il serait également important de réaliser ces expériences avec un senseur muté qui ne lie pas l'ACh ou la DA afin de confirmer que les dynamiques des signaux que nous observons sont bien liées à la libération de ces deux neurotransmetteurs.

## 6. Conclusion

À travers une approche multidisciplinaire englobant des analyses comportementales et neurochimiques ainsi que des enregistrements polysomnographiques, j'ai cherché lors de ma thèse à élucider la relation complexe entre le variant p.T8I, associé à une transmission cholinergique réduite dans le NAc, et la susceptibilité au stress.

En résumé, mon étude présente pour la première fois une modulation graduelle de la libération d'ACh dans le NAcMsh en réponse au CSDS chez les souris mâles, associée à une altération de la discrimination menace-sécurité, illustrant un comportement inadapté. Cette étude a permis de mettre en évidence la modulation de cette dynamique cholinergique par le variant p.T8I qui est associée à une meilleure association aversive ainsi qu'à une meilleure

discrimination des indices sociaux. Mon travail a également montré que l'effet éveillant à long terme du stress au détriment du sommeil lent pendant la période nocturne n'était pas observé chez les souris p.T8I. Par ailleurs, mon étude pilote suggère qu'augmenter pharmacologiquement les taux d'ACh de façon chronique durant le CSDS permet d'augmenter l'index de préférence sociale (z-score) envers la souris CD-1 post-CSDS, et ainsi d'altérer l'apprentissage aversif conditionné (Annexe 3). Il serait maintenant intéressant de regarder la réponse lors du test des 3C suite à un traitement, mais également de suivre la transmission d'ACh par photométrie de fibre durant l'approche de la souris B6 dans le 3C.

L'ensemble de ces résultats souligne l'influence déterminante des facteurs génétiques, en particulier du variant p.T8I, ainsi que du sexe dans la régulation de la réponse au stress social chronique, offrant de nouvelles perspectives dans le domaine de la susceptibilité au stress et de l'apprentissage aversif. Alors que le variant p.T8I a initialement été identifié chez des patients présentant des troubles addictifs et des comportements alimentaires compulsifs, que j'ai également pu observer chez des souris mâles, mon étude de réponse au stress suggère qu'il pourrait être un facteur de protection. Ces observations soulèvent de nombreuses questions concernant les mécanismes sous-jacents communs aux apprentissages conditionnés. Bien que dans certains contextes d'apprentissage, leur régulation puisse orienter les comportements vers une adaptation positive, la frontière entre comportements adaptatifs et pathologiques demeure extrêmement subtile, pouvant conduire, dans d'autres contextes, à une bascule vers la pathologie.

Cette étude présente ainsi une grande importance translationnelle quant à l'identification de cibles thérapeutiques afin de rétablir la transmission cholinergique anormale dans le NAc, bien que son implication causale dans les troubles psychiatriques liés au stress reste à confirmer.

# BIBLIOGRAPHIE

---



- Achermann, P., Dijk, D. J., Brunner, D. P., & Borbély, A. A. (1993). A model of human sleep homeostasis based on EEG slow-wave activity: quantitative comparison of data and simulations. *Brain research bulletin*, 31(1-2), 97–113.
- Achermann, P., & Borbély, A. A. (2003). Mathematical models of sleep regulation. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 8, s683–s693.
- Acheson, D. T., Geyer, M. A., Baker, D. G., Nievergelt, C. M., Yurgil, K., Risbrough, V. B., & Team, M. I. (2015). Conditioned fear and extinction learning performance and its association with psychiatric symptoms in active duty Marines. *Psychoneuroendocrinology*, 51, 495–505.
- Adamantidis, A. R., Zhang, F., Aravanis, A. M., Deisseroth, K., & De Lecea, L. (2007). Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons. *Nature*, 450(7168), 420–424.
- Adamantidis, A. R., Gutierrez Herrera, C., & Gent, T. C. (2019). Oscillating circuitries in the sleeping brain. *Nature reviews. Neuroscience*, 20(12), 746–762.
- Albin, R. L., Young, A. B., & Penney, J. B. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends in neurosciences*, 12(10), 366–375.
- Alonso, J., Liu, Z., Evans-Lacko, S., Sadikova, E., Sampson, N., Chatterji, S., Abdulmalik, J., Aguilar-Gaxiola, S., Al-Hamzawi, A., Andrade, L. H., Bruffaerts, R., Cardoso, G., Cia, A., Florescu, S., de Girolamo, G., Gureje, O., Haro, J. M., He, Y., de Jonge, P., Karam, E. G., ... WHO World Mental Health Survey Collaborators (2018). Treatment gap for anxiety disorders is global: Results of the World Mental Health Surveys in 21 countries. *Depression and anxiety*, 35(3), 195–208.
- American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th ed.)*.
- Amilhon, B., Lepicard, E., Renoir, T., Mongeau, R., Popa, D., Poirel, O., ... & El Mestikawy, S. (2010). VGLUT3 (vesicular glutamate transporter type 3) contribution to the regulation of serotonergic transmission and anxiety. *Journal of Neuroscience*, 30(6), 2198–2210.

- Anacker, C., O'Donnell, K. J., & Meaney, M. J. (2014). Early life adversity and the epigenetic programming of hypothalamic-pituitary-adrenal function. *Dialogues in clinical neuroscience*, 16(3), 321-333.
- Anacker, C., Scholz, J., O'Donnell, K. J., Allemang-Grand, R., Diorio, J., Bagot, R. C., ... & Meaney, M. J. (2016). Neuroanatomic differences associated with stress susceptibility and resilience. *Biological psychiatry*, 79(10), 840-849.
- Anacker, C., Luna, V. M., Stevens, G. S., Millette, A., Shores, R., Jimenez, J. C., Chen, B., & Hen, R. (2018). Hippocampal neurogenesis confers stress resilience by inhibiting the ventral dentate gyrus. *Nature*, 559(7712), 98-102.
- Anaclet, C., Ferrari, L., Arrigoni, E., Bass, C. E., Saper, C. B., Lu, J., & Fuller, P. M. (2014). The GABAergic parafacial zone is a medullary slow wave sleep-promoting center. *Nature neuroscience*, 17(9), 1217-1224.
- Anderson, D. J., & Adolphs, R. (2014). A framework for studying emotions across species. *Cell*, 157(1), 187-200.
- Ansorge, M. S., Zhou, M., Lira, A., Hen, R., & Gingrich, J. A. (2004). Early-life blockade of the 5-HT transporter alters emotional behavior in adult mice. *Science*, 306(5697), 879-881.
- Aosaki, T., Graybiel, A. M., & Kimura, M. (1994). Effect of the nigrostriatal dopamine system on acquired neural responses in the striatum of behaving monkeys. *Science*, 265(5170), 412-415.
- Apicella, P. (2017). The role of the intrinsic cholinergic system of the striatum: What have we learned from TAN recordings in behaving animals?. *Neuroscience*, 360, 81-94.
- Apicella, P., Ravel, S., Deffains, M., & Legallet, E. (2011). The role of striatal tonically active neurons in reward prediction error signaling during instrumental task performance. *Journal of Neuroscience*, 31(4), 1507-1515.
- Armitage, J. (2007). The safety of statins in clinical practice. *The Lancet*, 370(9601), 1781-1790.
- Assous, M., Kaminer, J., Shah, F., Garg, A., Koós, T., & Tepper, J. M. (2017). Differential processing of thalamic information via distinct striatal interneuron circuits. *Nature communications*, 8(1), 15860.

- Assous, M., & Tepper, J. M. (2019). Excitatory extrinsic afferents to striatal interneurons and interactions with striatal microcircuitry. *European Journal of Neuroscience*, 49(5), 593-603.
- Avale, M. E., Chabout, J., Pons, S., Serreau, P., De Chaumont, F., Olivo-Marin, J. C., ... & Granon, S. (2011). Prefrontal nicotinic receptors control novel social interaction between mice. *The FASEB Journal*, 25(7), 2145-2155.
- Ayash, S., Lingner, T., Ramisch, A., Ryu, S., Kalisch, R., Schmitt, U., & Müller, M. B. (2023). Fear circuit-based neurobehavioral signatures mirror resilience to chronic social stress in mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(17), e2205576120.
- Ayash, S., Schmitt, U., & Müller, M. B. (2020). Chronic social defeat-induced social avoidance as a proxy of stress resilience in mice involves conditioned learning. *Journal of psychiatric research*, 120, 64-71.
- Bagot, R. C., Parise, E. M., Peña, C. J., Zhang, H. X., Maze, I., Chaudhury, D., Persaud, B., Cachope, R., Bolaños-Guzmán, C. A., Cheer, J. F., Deisseroth, K., Han, M. H., & Nestler, E. J. (2015). Ventral hippocampal afferents to the nucleus accumbens regulate susceptibility to depression. *Nature communications*, 6, 7062.
- Bagot, R. C., Cates, H. M., Purushothaman, I., Lorsch, Z. S., Walker, D. M., Wang, J., ... & Nestler, E. J. (2016). Circuit-wide transcriptional profiling reveals brain region-specific gene networks regulating depression susceptibility. *Neuron*, 90(5), 969-983.
- Balázsfői, D., Fodor, A., Török, B., Ferenczi, S., Kovács, K. J., Haller, J., & Zelena, D. (2018). Enhanced innate fear and altered stress axis regulation in VGluT3 knockout mice. *Stress*, 21(2), 151-161.
- Bangasser, D. A., & Cuarenta, A. (2021). Sex differences in anxiety and depression: circuits and mechanisms. *Nature Reviews Neuroscience*, 22(11), 674-684.
- Bangasser, D. A., Eck, S. R., & Ordoñez Sanchez, E. (2019). Sex differences in stress reactivity in arousal and attention systems. *Neuropsychopharmacology*, 44(1), 129-139.
- Barik, J., Marti, F., Morel, C., Fernandez, S. P., Lanteri, C., Godeheu, G., ... & Tronche, F. (2013). Chronic stress triggers social aversion via glucocorticoid receptor in dopaminergic neurons. *Science*, 339(6117), 332-335.

- Becker, M., Pinhasov, A., & Ornoy, A. (2021). Animal Models of Depression: What Can They Teach Us about the Human Disease?. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 11(1), 123.
- Beckers, T., Hermans, D., Lange, I., Luyten, L., Scheveneels, S., & Vervliet, B. (2023). Understanding clinical fear and anxiety through the lens of human fear conditioning. *Nature Reviews Psychology*, 2(4), 233-245.
- Belilos, A., Gray, C., Sanders, C., Black, D., Mays, E., Richie, C., ... & Francis, T. C. (2023). Nucleus accumbens local circuit for cue-dependent aversive learning. *Cell reports*, 42(12).
- Belzung, C., & Griebel, G. (2001). Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. *Behavioural brain research*, 125(1-2), 141-149.
- Berton, O., McClung, C. A., DiLeone, R. J., Krishnan, V., Renthal, W., Russo, S. J., ... & Nestler, E. J. (2006). Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science*, 311(5762), 864-868.
- Besson, M., Granon, S., Mameli-Engvall, M., Cloëz-Tayarani, I., Maubourguet, N., Cormier, A., ... & Faure, P. (2007). Long-term effects of chronic nicotine exposure on brain nicotinic receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(19), 8155-8160.
- Beyeler, A., Namburi, P., Glober, G. F., Simonnet, C., Calhoon, G. G., Conyers, G. F., Luck, R., Wildes, C. P., & Tye, K. M. (2016). Divergent Routing of Positive and Negative Information from the Amygdala during Memory Retrieval. *Neuron*, 90(2), 348-361.
- Beyeler, A., Chang, C. J., Silvestre, M., Lévêque, C., Namburi, P., Wildes, C. P., & Tye, K. M. (2018). Organization of Valence-Encoding and Projection-Defined Neurons in the Basolateral Amygdala. *Cell reports*, 22(4), 905-918.
- Bewernick, B. H., Hurlemann, R., Matusch, A., Kayser, S., Grubert, C., Hadrysiewicz, B., Axmacher, N., Lemke, M., Cooper-Mahkorn, D., Cohen, M. X., Brockmann, H., Lenartz, D., Sturm, V., & Schlaepfer, T. E. (2010). Nucleus accumbens deep brain stimulation decreases ratings of depression and anxiety in treatment-resistant depression. *Biological psychiatry*, 67(2), 110-116.
- Bickle, J. G., Li, Y., Millette, A., Dixon, R., Wu, S., Arias, E. C., Luna, V. M., & Anacker, C. (2024). 5-HT1A Receptors on Dentate Gyrus Granule Cells Confer Stress Resilience. *Biological psychiatry*, 95(8), 800-809.

- Billings, A. G., & Moos, R. H. (1984). Coping, stress, and social resources among adults with unipolar depression. *Journal of personality and social psychology*, 46(4), 877.
- Blanco-Pozo, M., Akam, T., & Walton, M. E. (2024). Dopamine-independent effect of rewards on choices through hidden-state inference. *Nature Neuroscience*, 1-12.
- Blazquez, P. M., Fujii, N., Kojima, J., & Graybiel, A. M. (2002). A network representation of response probability in the striatum. *Neuron*, 33(6), 973-982.
- Bolam, J. P., Wainer, B. H., & Smith, A. D. (1984). Characterization of cholinergic neurons in the rat neostriatum. A combination of choline acetyltransferase immunocytochemistry, Golgi-impregnation and electron microscopy. *Neuroscience*, 12(3), 711-718.
- Bolam, J. P., Hanley, J. J., Booth, P. A., & Bevan, M. D. (2000). Synaptic organisation of the basal ganglia. *Journal of anatomy*, 196 ( Pt 4)(Pt 4), 527-542.
- Bonnavion, P., Varin, C., Fakhfouri, G., Olondo, P. M., De Groote, A., Cornil, A., ... & Giros, B. (2022). Unexpected contributions of striatal projection neurons coexpressing dopamine D1 and D2 receptors in balancing motor control. *BioRxiv*, 2022-04
- Boorse, C. (1975). On the distinction between disease and illness. *Philosophy & public affairs*, 49-68.
- Boorse, C. (1976). What a theory of mental health should be. *Journal for the Theory of Social Behaviour*.
- Borbély A. A. (1982). A two process model of sleep regulation. *Human neurobiology*, 1(3), 195-204.
- Borbély A. A. (2001). From slow waves to sleep homeostasis: new perspectives. *Archives italiennes de biologie*, 139(1-2), 53-61.
- Bradfield, L. A., Bertran-Gonzalez, J., Chieng, B., & Balleine, B. W. (2013). The thalamostriatal pathway and cholinergic control of goal-directed action: interlacing new with existing learning in the striatum. *Neuron*, 79(1), 153-166.
- Brimblecombe, K. R., & Cragg, S. J. (2017). The striosome and matrix compartments of the striatum: a path through the labyrinth from neurochemistry toward function. *ACS chemical neuroscience*, 8(2), 235-242.

- Burgos-Robles, A., Kimchi, E. Y., Izadmehr, E. M., Porzenheim, M. J., Ramos-Guasp, W. A., Nieh, E. H., Felix-Ortiz, A. C., Namburi, P., Leppla, C. A., Presbrey, K. N., Anandalingam, K. K., Pagan-Rivera, P. A., Anahtar, M., Beyeler, A., & Tye, K. M. (2017). Amygdala inputs to prefrontal cortex guide behavior amid conflicting cues of reward and punishment. *Nature neuroscience*, *20*(6), 824–835.
- Bush, B. J., Donnay, C., Andrews, E. J. A., Lewis-Sanders, D., Gray, C. L., Qiao, Z., ... & Ehlen, J. C. (2022). Non-rapid eye movement sleep determines resilience to social stress. *Elife*, *11*, e80206.
- Calhoun, G. G., & Tye, K. M. (2015). Resolving the neural circuits of anxiety. *Nature neuroscience*, *18*(10), 1394–1404.
- Canguilhem, G. (1966). *Le normal et le pathologique*.
- Cannon, W. B. (1927). The James-Lange theory of emotions: A critical examination and an alternative theory. *The American journal of psychology*, *39*(1/4), 106-124.
- Cao, J. L., Covington, H. E., Friedman, A. K., Wilkinson, M. B., Walsh, J. J., Cooper, D. C., ... & Han, M. H. (2010). Mesolimbic dopamine neurons in the brain reward circuit mediate susceptibility to social defeat and antidepressant action. *Journal of Neuroscience*, *30*(49), 16453-16458.
- Carter, M. E., Brill, J., Bonnavion, P., Huguenard, J. R., Huerta, R., & de Lecea, L. (2012). Mechanism for Hypocretin-mediated sleep-to-wake transitions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(39), E2635–E2644.
- Castro, D. C., & Bruchas, M. R. (2019). A motivational and neuropeptidergic hub: anatomical and functional diversity within the nucleus accumbens shell. *Neuron*, *102*(3), 529-552.
- Chabout, J., Serreau, P., & Granon, S. (2013). 733–Neural bases of flexible behaviours during social interaction: role of the prefrontal cortex and neuronal nicotinic receptors in mice models. *European Psychiatry*, *28*, 1.
- Challis, C., Boulden, J., Veerakumar, A., Espallergues, J., Vassoler, F. M., Pierce, R. C., ... & Berton, O. (2013). Raphe GABAergic neurons mediate the acquisition of avoidance after social defeat. *Journal of Neuroscience*, *33*(35), 13978-13988.
- Chalmers, D. J. (1998). On the search for the neural correlate of consciousness. Toward a science of consciousness II: The second Tucson discussions and debates, *2*, 219.

- Chancey, J. H., Kellendonk, C., Javitch, J. A., & Lovinger, D. M. (2023). Dopaminergic D2 receptor modulation of striatal cholinergic interneurons contributes to sequence learning. *bioRxiv*.
- Changeux, J. P. (2012). *L'homme neuronal*. Hachette Pluriel Reference
- Chantranupong, L., Beron, C. C., Zimmer, J. A., Wen, M. J., Wang, W., & Sabatini, B. L. (2023). Dopamine and glutamate regulate striatal acetylcholine in decision-making. *Nature*, *621*(7979), 577-585.
- Charney, D. S., & Manji, H. K. (2004). Life stress, genes, and depression: multiple pathways lead to increased risk and new opportunities for intervention. *Science's STKE*, *2004*(225), re5-re5.
- Chaudhury, D., Walsh, J. J., Friedman, A. K., Juarez, B., Ku, S. M., Koo, J. W., ... & Han, M. H. (2013). Rapid regulation of depression-related behaviours by control of midbrain dopamine neurons. *Nature*, *493*(7433), 532-536.
- Cheng, L., Duan, B., Huang, T., Zhang, Y., Chen, Y., Britz, O., ... & Ma, Q. (2017). Identification of spinal circuits involved in touch-evoked dynamic mechanical pain. *Nature neuroscience*, *20*(6), 804-814.
- Cheng, J., Umschweif, G., Leung, J., Sagi, Y., & Greengard, P. (2019). HCN2 channels in cholinergic interneurons of nucleus accumbens shell regulate depressive behaviors. *Neuron*, *101*(4), 662-672.
- Cho, J. R., Treweek, J. B., Robinson, J. E., Xiao, C., Bremner, L. R., Greenbaum, A., & Gradinaru, V. (2017). Dorsal Raphe Dopamine Neurons Modulate Arousal and Promote Wakefulness by Salient Stimuli. *Neuron*, *94*(6), 1205-1219.e8.
- Christoffel, D. J., Golden, S. A., Walsh, J. J., Guise, K. G., Heshmati, M., Friedman, A. K., Dey, A., Smith, M., Rebusi, N., Pfau, M., Ables, J. L., Aleyasin, H., Khibnik, L. A., Hodes, G. E., Ben-Dor, G. A., Deisseroth, K., Shapiro, M. L., Malenka, R. C., Ibanez-Tallon, I., Han, M. H., ... Russo, S. J. (2015). Excitatory transmission at thalamo-striatal synapses mediates susceptibility to social stress. *Nature neuroscience*, *18*(7), 962-964.
- Chuhma, N., Mingote, S., Moore, H., & Rayport, S. (2014). Dopamine neurons control striatal cholinergic neurons via regionally heterogeneous dopamine and glutamate signaling. *Neuron*, *81*(4), 901-912.

- Chuhma, N., Mingote, S., Kalmbach, A., Yetnikoff, L., & Rayport, S. (2017). Heterogeneity in dopamine neuron synaptic actions across the striatum and its relevance for schizophrenia. *Biological psychiatry*, 81(1), 43-51.
- Churchland, P. S. (1999). Toward a natural science of the mind. *Consciousness at the crossroads*, 17-31.
- Cohen, J. Y., Haesler, S., Vong, L., Lowell, B. B., & Uchida, N. (2012). Neuron-type-specific signals for reward and punishment in the ventral tegmental area. *nature*, 482(7383), 85-88.
- Collins, A. L., Aitken, T. J., Huang, I. W., Shieh, C., Greenfield, V. Y., Monbouquette, H. G., ... & Wassum, K. M. (2019). Nucleus accumbens cholinergic interneurons oppose cue-motivated behavior. *Biological psychiatry*, 86(5), 388-396.
- Colvonen, P. J., Straus, L. D., Acheson, D., & Gehrman, P. (2019). A review of the relationship between emotional learning and memory, sleep, and PTSD. *Current Psychiatry Reports*, 21, 1-11.
- Cox, R. C., & Olatunji, B. O. (2016). A systematic review of sleep disturbance in anxiety and related disorders. *Journal of anxiety disorders*, 37, 104-129.
- Cragg, S. J. (2006). Meaningful silences: how dopamine listens to the ACh pause. *Trends in neurosciences*, 29(3), 125-131.
- Crawley, J. N., Chen, T., Puri, A., Washburn, R., Sullivan, T. L., Hill, J. M., ... & Young, W. S. (2007). Social approach behaviors in oxytocin knockout mice: comparison of two independent lines tested in different laboratory environments. *Neuropeptides*, 41(3), 145-163.
- Cristofari, P., Desplanque, M., Poirel, O., Hébert, A., Dumas, S., Herzog, E., ... & Bernard, V. (2022). Nanoscopic distribution of VAcHT and VGLUT3 in striatal cholinergic varicosities suggests colocalization and segregation of the two transporters in synaptic vesicles. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 15, 991732.
- Crittenden, J. R., & Graybiel, A. M. (2011). Basal Ganglia disorders associated with imbalances in the striatal striosome and matrix compartments. *Frontiers in neuroanatomy*, 5, 59.

- Crittenden, J. R., Lacey, C. J., Weng, F. J., Garrison, C. E., Gibson, D. J., Lin, Y., & Graybiel, A. M. (2017). Striatal cholinergic interneurons modulate spike-timing in striosomes and matrix by an amphetamine-sensitive mechanism. *Frontiers in Neuroanatomy*, 11, 20.
- Crommelinck, M. (1995). Quand la trace des souvenirs se dévoile au fond d'une coupelle: A propos du réductionnisme et des neurosciences. *Revue philosophique de Louvain*, 140-175
- Cryan, J. F., & Holmes, A. (2005). The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nature reviews Drug discovery*, 4(9), 775-790.
- Cyrułnik, B. (1999). *Un merveilleux malheur*. Odile Jacob.
- Dai, B., Sun, F., Tong, X., Ding, Y., Kuang, A., Osakada, T., ... & Lin, D. (2022). Responses and functions of dopamine in nucleus accumbens core during social behaviors. *Cell reports*, 40(8).
- Damasio, A. (2010). *L'Erreur de Descartes : la raison des émotions*. Paris, Odile Jacob.
- Darwin, C. (2016). *L'Expression des émotions chez l'homme et les animaux*. Rivages poche. Petite bibliothèque
- Dautan, D., Huerta-Ocampo, I., Witten, I. B., Deisseroth, K., Bolam, J. P., Gerdjikov, T., & Mena-Segovia, J. (2014). A major external source of cholinergic innervation of the striatum and nucleus accumbens originates in the brainstem. *Journal of Neuroscience*, 34(13), 4509-4518.
- Davis, M. I., & Puhl III, H. L. (2011). Nr4a1-eGFP is a marker of striosome-matrix architecture, development and activity in the extended striatum. *PloS one*, 6(1), e16619.
- Daviu, N., Bruchas, M. R., Moghaddam, B., Sandi, C., & Beyeler, A. (2019). Neurobiological links between stress and anxiety. *Neurobiology of stress*, 11, 100191.
- Day, J. J., Roitman, M. F., Wightman, R. M., & Carelli, R. M. (2007). Associative learning mediates dynamic shifts in dopamine signaling in the nucleus accumbens. *Nature neuroscience*, 10(8), 1020-1028.
- Dayan, P., & Balleine, B. W. (2002). Reward, motivation, and reinforcement learning. *Neuron*, 36(2), 285-298.

- Dean, J., & Keshavan, M. (2017). The neurobiology of depression: An integrated view. *Asian journal of psychiatry*, 27, 101-111.
- de Almeida, C., Chabbah, N., Eyraud, C., Fasano, C., Bernard, V., Pietrancosta, N., ... & Daumas, S. (2023). Absence of VGLUT3 expression leads to impaired fear memory in mice. *Eneuro*, 10(2).
- de Jong, J. W., Afjei, S. A., Dorocic, I. P., Peck, J. R., Liu, C., Kim, C. K., ... & Lammel, S. (2019). A neural circuit mechanism for encoding aversive stimuli in the mesolimbic dopamine system. *Neuron*, 101(1), 133-151.
- de Jong, J. W., Liang, Y., Verharen, J. P., Fraser, K. M., & Lammel, S. (2024). State and rate-of-change encoding in parallel mesoaccumbal dopamine pathways. *Nature Neuroscience*, 1-10.
- de Kloet, E. R., Karst, H., & Joëls, M. (2008). Corticosteroid hormones in the central stress response: quick-and-slow. *Frontiers in neuroendocrinology*, 29(2), 268-272.
- Deonna, J., & Teroni, F. (2008). Qu'est-ce qu'une émotion?. *Vrin*
- Descartes, R. (1990). *Les passions de l'âme*. Le Livre de Poche.
- Diamond, D. M., Campbell, A. M., Park, C. R., Halonen, J., & Zoladz, P. R. (2007). The temporal dynamics model of emotional memory processing: a synthesis on the neurobiological basis of stress-induced amnesia, flashbulb and traumatic memories, and the Yerkes-Dodson law. *Neural plasticity*, 2007.
- Diaz, V., & Lin, D. (2020). Neural circuits for coping with social defeat. *Current opinion in neurobiology*, 60, 99-107.
- Doig, N. M., Moss, J., & Bolam, J. P. (2010). Cortical and thalamic innervation of direct and indirect pathway medium-sized spiny neurons in mouse striatum. *Journal of Neuroscience*, 30(44), 14610-14618.
- Dudman, J. T., & Gerfen, C. R. (2015). The basal ganglia. In *The rat nervous system* (pp. 391-440). Academic Press.
- Eban-Rothschild, A., Rothschild, G., Giardino, W. J., Jones, J. R., & de Lecea, L. (2016). VTA dopaminergic neurons regulate ethologically relevant sleep-wake behaviors. *Nature neuroscience*, 19(10), 1356-1366.

- Ekman, P. (1973). Universal facial expressions in emotion. *Studia Psychologica*, 15(2), 140-147.
- El Mestikawy, S., Wallén-Mackenzie, Å., Fortin, G. M., Descarries, L., & Trudeau, L. E. (2011). From glutamate co-release to vesicular synergy: vesicular glutamate transporters. *Nature Reviews Neuroscience*, 12(4), 204-216.
- Ena, S., De Kerchove D'Exaerde, A., & Schiffmann, S. N. (2011). Unraveling the differential functions and regulation of striatal neuron sub-populations in motor control, reward, and motivational processes. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 5, 47.
- Ereira, S., Pujol, M., Guitart-Masip, M., Dolan, R. J., & Kurth-Nelson, Z. (2021). Overcoming Pavlovian bias in semantic space. *Scientific reports*, 11(1), 3416.
- Eysenck, M.W. (1992). *Anxiety: The Cognitive Perspective* (1st ed.). Psychology Press.
- Fanselow, M. S., & Pennington, Z. T. (2017). The danger of LeDoux and Pine's two-system framework for fear. *American Journal of Psychiatry*, 174(11), 1120-1121.
- Fasano, C., Rocchetti, J., Pietrajtis, K., Zander, J. F., Manseau, F., Sakae, D. Y., Marcus-Sells, M., Ramet, L., Morel, L. J., Carrel, D., Dumas, S., Bolte, S., Bernard, V., Vigneault, E., Goutagny, R., Ahnert-Hilger, G., Giros, B., Daumas, S., Williams, S., & El Mestikawy, S. (2017). Regulation of the Hippocampal Network by VGLUT3-Positive CCK-GABAergic Basket Cells. *Frontiers in cellular neuroscience*, 11, 140.
- Favier, M., Pietrancosta, N., El Mestikawy, S., & Gangarossa, G. (2021). Leveraging VGLUT3 functions to untangle brain dysfunctions. *Trends in Pharmacological Sciences*, 42(6), 475-490.
- Favier, M., Garcia, E. M., Icick, R., de Almeida, C., Jehl, J., Desplanque, M., Zimmermann, J., Henrion, A., Mansouri-Guilani, N., Mounier, C., Ribeiro, S., Henderson, F., Geoffroy, A., Mella, S., Poirel, O., Bernard, V., Fabre, V., Steiger, H., Li, Y., Rosenmund, C., Jamain, S., Vorspan, F., Mourot, A., Duriez, P., Pinhas, L., Maldonado, R., Pietrancosta, N., Daumas, S., & El Mestikawy, S. (2024). Investigation of the VGLUT3-pT8I mutation unveils mechanisms involved in habit formation, cocaine misuse and maladaptive eating, paving the way for a novel treatment of anorexia nervosa. *Nature Neuroscience* [accepted]

- Feder, A., Nestler, E. J., & Charney, D. S. (2009). Psychobiology and molecular genetics of resilience. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(6), 446-457.
- Felix-Ortiz, A. C., Beyeler, A., Seo, C., Leppla, C. A., Wildes, C. P., & Tye, K. M. (2013). BLA to vHPC inputs modulate anxiety-related behaviors. *Neuron*, 79(4), 658-664.
- Felix-Ortiz, A. C., Burgos-Robles, A., Bhagat, N. D., Leppla, C. A., & Tye, K. M. (2016). Bidirectional modulation of anxiety-related and social behaviors by amygdala projections to the medial prefrontal cortex. *Neuroscience*, 321, 197-209.
- Feng, X., Zhao, H. Y., Shao, Y. J., Lou, H. F., Zhu, L. Y., Duan, S., & Yu, Y. Q. (2020). Anxiolytic effect of increased NREM sleep after acute social defeat stress in mice. *Neuroscience bulletin*, 36, 1137-1146.
- Fernandez, S. P., & Gaspar, P. (2012). Investigating anxiety and depressive-like phenotypes in genetic mouse models of serotonin depletion. *Neuropharmacology*, 62(1), 144-154.
- Fernandez, S. P., Broussot, L., Marti, F., Contesse, T., Mouska, X., Soiza-Reilly, M., ... & Barik, J. (2018). Mesopontine cholinergic inputs to midbrain dopamine neurons drive stress-induced depressive-like behaviors. *Nature Communications*, 9(1), 4449.
- Flaherty, A. W., & Graybiel, A. M. (1994). Input-output organization of the sensorimotor striatum in the squirrel monkey. *Journal of Neuroscience*, 14(2), 599-610.
- Fontesse, S., Fournier, V., Gérain, P., Dassonneville, C., Lelorain, S., Duprez, C., ... & Grynberg, D. (2023). Happy thus survivor? A systematic review and meta-analysis on the association between cancer survival and positive states, emotions, and traits. *Psycho-Oncology*, 32(11), 1631-1643.
- Foucault, M. (1999). *Les Anormaux: Cours au Collège de France, 1974-1975*. Hautes Etudes
- Francis, T. C., Chandra, R., Friend, D. M., Finkel, E., Dayrit, G., Miranda, J., ... & Lobo, M. K. (2015). Nucleus accumbens medium spiny neuron subtypes mediate depression-related outcomes to social defeat stress. *Biological psychiatry*, 77(3), 212-222.
- Franzen, P. L., & Buysse, D. J. (2008). Sleep disturbances and depression: risk relationships for subsequent depression and therapeutic implications. *Dialogues in clinical neuroscience*, 10(4), 473-481.

- Freneau, R. T., Troyer, M. D., Pahner, I., Nygaard, G. O., Tran, C. H., Reimer, R. J., ... & Edwards, R. H. (2001). The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. *Neuron*, 31(2), 247-260.
- Friedman, A. K., Walsh, J. J., Juarez, B., Ku, S. M., Chaudhury, D., Wang, J., Li, X., Dietz, D. M., Pan, N., Vialou, V. F., Neve, R. L., Yue, Z., & Han, M. H. (2014). Enhancing depression mechanisms in midbrain dopamine neurons achieves homeostatic resilience. *Science (New York, N.Y.)*, 344(6181), 313-319.
- Fujii, S., Kaushik, M. K., Zhou, X., Korkutata, M., & Lazarus, M. (2019). Acute social defeat stress increases sleep in mice. *Frontiers in neuroscience*, 13, 432788.
- Fujiyama, F., Sohn, J., Nakano, T., Furuta, T., Nakamura, K. C., Matsuda, W., & Kaneko, T. (2011). Exclusive and common targets of neostriatofugal projections of rat striosome neurons: a single neuron-tracing study using a viral vector. *European Journal of Neuroscience*, 33(4), 668-677.
- Fujiyama, F., Nakano, T., Matsuda, W., Furuta, T., Udagawa, J., & Kaneko, T. (2016). A single-neuron tracing study of arky pallidal and prototypic neurons in healthy rats. *Brain Structure and Function*, 221, 4733-4740.
- Gallopín, T., Fort, P., Eggermann, E., Cauli, B., Luppi, P. H., Rossier, J., Audinat, E., Mühlethaler, M., & Serafin, M. (2000). Identification of sleep-promoting neurons in vitro. *Nature*, 404(6781), 992-995.
- Gardoni, F., & Bellone, C. (2015). Modulation of the glutamatergic transmission by Dopamine: a focus on Parkinson, Huntington and Addiction diseases. *Frontiers in cellular neuroscience*, 9, 25.
- Garefelt, J., Platts, L. G., Hyde, M., Magnusson Hanson, L. L., Westerlund, H., & Åkerstedt, T. (2020). Reciprocal relations between work stress and insomnia symptoms: A prospective study. *Journal of Sleep Research*, 29(2), e12949.
- Gaspar, P., Cases, O., & Maroteaux, L. (2003). The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nature reviews. Neuroscience*, 4(12), 1002-1012.
- Gerashchenko, D., Wisor, J. P., Burns, D., Reh, R. K., Shiromani, P. J., Sakurai, T., de la Iglesia, H. O., & Kilduff, T. S. (2008). Identification of a population of sleep-active cerebral

- cortex neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(29), 10227–10232.
- Gerfen, C. R. (1992). The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization. *Trends in neurosciences*, 15(4), 133-139.
- Gerfen, C. R., Miyachi, S., Paletzki, R., & Brown, P. (2002). D1 dopamine receptor supersensitivity in the dopamine-depleted striatum results from a switch in the regulation of ERK1/2/MAP kinase. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(12), 5042–5054.
- Geyer, M. A., Puerto, A., Dawsey, W. J., Knapp, S., Bullard, W. P., & Mandell, A. J. (1976). Histologic and enzymatic studies of the mesolimbic and mesostriatal serotonergic pathways. *Brain research*, 106(2), 241-256.
- Giroux, É. (2009). Définir objectivement la santé: une évaluation du concept bio statistique de Boorse à partir de l'épidémiologie moderne. *Revue philosophique de la France et de l'étranger*, 134(1), 35-58.
- Godoy, L. D., Rossignoli, M. T., Delfino-Pereira, P., Garcia-Cairasco, N., & de Lima Umeoka, E. H. (2018). A comprehensive overview on stress neurobiology: basic concepts and clinical implications. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 12, 127.
- Goldberg, J. A., Ding, J. B., & Surmeier, D. J. (2012). Muscarinic modulation of striatal function and circuitry. *Muscarinic receptors*, 223-241.
- Golden, S. A., Covington III, H. E., Berton, O., & Russo, S. J. (2011). A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. *Nature protocols*, 6(8), 1183-1191.
- Goldie, P. (2000). *The emotions: A philosophical exploration*. Oxford University Press.
- Goldschmied, J. R., Cheng, P., Armitage, R., & Deldin, P. J. (2019). A preliminary investigation of the role of slow-wave activity in modulating waking EEG theta as a marker of sleep propensity in major depressive disorder. *Journal of affective disorders*, 257, 504–509.
- Goldstein, A. N., Greer, S. M., Saletin, J. M., Harvey, A. G., Nitschke, J. B., & Walker, M. P. (2013). Tired and apprehensive: anxiety amplifies the impact of sleep loss on aversive brain anticipation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 33(26), 10607–10615.

- Gooley, J. J., Lu, J., Chou, T. C., Scammell, T. E., & Saper, C. B. (2001). Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract. *Nature neuroscience*, 4(12), 1165-1165.
- Graeff, F. G., Parente, A. C. B. V., Del-Ben, C. M., & Guimarães, F. S. (2003). Pharmacology of human experimental anxiety. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36, 421-432.
- Granon, S., Faure, P., & Changeux, J. P. (2003). Executive and social behaviors under nicotinic receptor regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(16), 9596-9601.
- Gras, C., Herzog, E., Bellenchi, G. C., Bernard, V., Ravassard, P., Pohl, M., ... & El Mestikawy, S. (2002). A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *Journal of Neuroscience*, 22(13), 5442-5451.
- Gras, C., Amilhon, B., Lopicard, E. M., Poirel, O., Vinatier, J., Herbin, M., ... & Mestikawy, S. E. (2008). The vesicular glutamate transporter VGLUT3 synergizes striatal acetylcholine tone. *Nature neuroscience*, 11(3), 292-300.
- Graybiel, A. M., & Ragsdale Jr, C. W. (1978). Histochemically distinct compartments in the striatum of human, monkeys, and cat demonstrated by acetylthiocholinesterase staining. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75(11), 5723-5726.
- Griffiths, P. E., & Scarantino, A. (2005). Emotions in the wild: The situated perspective on emotion.
- Groeneweg, F. L., Karst, H., de Kloet, E. R., & Joëls, M. (2011). Rapid non-genomic effects of corticosteroids through the membrane-associated MR and GR and their role in the central stress. *J. Endocrinol*, 2, 153-167.
- Grupe, D. W., & Nitschke, J. B. (2013). Uncertainty and anticipation in anxiety: an integrated neurobiological and psychological perspective. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(7), 488-501.
- Hacking, I. (2001). *Entre science et réalité: la construction sociale de quoi?*. Paris: La découverte.
- Harris, A. Z., Atsak, P., Bretton, Z. H., Holt, E. S., Alam, R., Morton, M. P., ... & Gordon, J. A. (2018). A novel method for chronic social defeat stress in female mice. *Neuropsychopharmacology*, 43(6), 1276-1283.

- Hart, G., Burton, T. J., & Balleine, B. W. (2024). What role does striatal dopamine play in goal-directed action?. *Neuroscience*.
- Harvey A. G. (2011). Sleep and circadian functioning: critical mechanisms in the mood disorders?. *Annual review of clinical psychology*, 7, 297–319.
- Hasegawa, E., Miyasaka, A., Sakurai, K., Cherasse, Y., Li, Y., & Sakurai, T. (2022). Rapid eye movement sleep is initiated by basolateral amygdala dopamine signaling in mice. *Science (New York, N.Y.)*, 375(6584), 994–1000.
- Henderson, F., Vialou, V., El Mestikawy, S., & Fabre, V. (2017). Effects of social defeat stress on sleep in mice. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 11, 227.
- Hennessy, M. B., Kaiser, S., & Sachser, N. (2009). Social buffering of the stress response: diversity, mechanisms, and functions. *Frontiers in neuroendocrinology*, 30(4), 470–482.
- Henriques-Alves, A. M., & Queiroz, C. M. (2016). Ethological evaluation of the effects of social defeat stress in mice: beyond the social interaction ratio. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 9, 364.
- Herkenham, M., & Pert, C. B. (1981). Mosaic distribution of opiate receptors, parafascicular projections and acetylcholinesterase in rat striatum. *Nature*, 291(5814), 415–418.
- Herzog, E., Bellenchi, G. C., Gras, C., Bernard, V., Ravassard, P., Bedet, C., ... & El Mestikawy, S. (2001). The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. *The Journal of Neuroscience*, 21(22), RC181.
- Herzog, E., Gilchrist, J., Gras, C., Muzerelle, A., Ravassard, P., Giros, B., ... & El Mestikawy, S. (2004). Localization of VGLUT3, the vesicular glutamate transporter type 3, in the rat brain. *Neuroscience*, 123(4), 983–1002.
- Higley, M. J., Gittis, A. H., Oldenburg, I. A., Balthasar, N., Seal, R. P., Edwards, R. H., Lowell, B. B., Kreitzer, A. C., & Sabatini, B. L. (2011). Cholinergic interneurons mediate fast VGluT3-dependent glutamatergic transmission in the striatum. *PloS one*, 6(4), e19155.
- Hintiryan, H., Foster, N. N., Bowman, I., Bay, M., Song, M. Y., Gou, L., ... & Dong, H. W. (2016). The mouse cortico-striatal projectome. *Nature neuroscience*, 19(8), 1100–1114.
- Hioki, H., Nakamura, H., Ma, Y. F., Konno, M., Hayakawa, T., Nakamura, K. C., ... & Kaneko, T. (2010). Vesicular glutamate transporter 3-expressing nonserotonergic projection

- neurons constitute a subregion in the rat midbrain raphe nuclei. *Journal of Comparative Neurology*, 518(5), 668-686.
- Hodes, G. E., Pfau, M. L., Purushothaman, I., Ahn, H. F., Golden, S. A., Christoffel, D. J., ... & Russo, S. J. (2015). Sex differences in nucleus accumbens transcriptome profiles associated with susceptibility versus resilience to subchronic variable stress. *Journal of Neuroscience*, 35(50), 16362-16376.
- Hoebel, B. G., Avena, N. M., & Rada, P. (2007). Accumbens dopamine-acetylcholine balance in approach and avoidance. *Current opinion in pharmacology*, 7(6), 617-627.
- Hoebel, B. G., Rada, P. V., Mark, G. P., & Pothos, E. N. (1999). Neural systems for reinforcement and inhibition of behavior: relevance to eating, addiction, and depression.
- Hooker, C. A. (1981). Towards a general theory of reduction. Part I: Historical and scientific setting. *Dialogue: Canadian Philosophical Review/Revue canadienne de philosophie*, 20(1), 38-59.
- Iacoviello, B. M., Wu, G., Abend, R., Murrough, J. W., Feder, A., Fruchter, E., ... & Charney, D. S. (2014). Attention bias variability and symptoms of posttraumatic stress disorder. *Journal of traumatic stress*, 27(2), 232-239.
- Iñiguez, S. D., Flores-Ramirez, F. J., Riggs, L. M., Alipio, J. B., Garcia-Carachure, I., Hernandez, M. A., ... & Castillo, S. A. (2018). Vicarious social defeat stress induces depression-related outcomes in female mice. *Biological psychiatry*, 83(1), 9-17.
- Institut National de la Statistique et des Études Économiques. (2019). Rapport d'enquête « Cadre de vie et sécurité ».
- Isingrini, E., Perret, L., Rainer, Q., Amilhon, B., Guma, E., Tanti, A., Martin, G., Robinson, J., Moquin, L., Marti, F., Mechawar, N., Williams, S., Gratton, A., & Giros, B. (2016). Resilience to chronic stress is mediated by noradrenergic regulation of dopamine neurons. *Nature neuroscience*, 19(4), 560-563.
- James, W. (1884). What is an emotion? *Mind*, 9, 188-205.
- Kalisch, R., Baker, D. G., Basten, U., Boks, M. P., Bonanno, G. A., Brummelman, E., ... & Kleim, B. (2017). The resilience framework as a strategy to combat stress-related disorders. *Nature human behaviour*, 1(11), 784-790

- Kalueff, A. V., & Tuohimaa, P. (2004). Experimental modeling of anxiety and depression. *Acta neurobiologiae experimentalis*, 64(4), 439–448.
- Kamphuis, J., Lancel, M., Koolhaas, J. M., & Meerlo, P. (2015). Deep sleep after social stress: NREM sleep slow-wave activity is enhanced in both winners and losers of a conflict. *Brain, behavior, and immunity*, 47, 149-154.
- Kaur, S., Wang, J. L., Ferrari, L., Thankachan, S., Kroeger, D., Venner, A., Lazarus, M., Wellman, A., Arrigoni, E., Fuller, P. M., & Saper, C. B. (2017). A Genetically Defined Circuit for Arousal from Sleep during Hypercapnia. *Neuron*, 96(5), 1153–1167.e5.
- Kawaguchi, Y. (1993). Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum. *Journal of Neuroscience*, 13(11), 4908-4923.
- Kawaguchi, Y., & Kubota, Y. (1997). GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cerebral cortex (New York, NY: 1991)*, 7(6), 476-486.
- Keiflin, R., & Janak, P. H. (2015). Dopamine prediction errors in reward learning and addiction: from theory to neural circuitry. *Neuron*, 88(2), 247-263.
- Kessler, R. C., Berglund, P., Demler, O., Jin, R., Koretz, D., Merikangas, K. R., ... & Wang, P. S. (2003). The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). *Jama*, 289(23), 3095-3105.
- Kreitzer, A. C. (2009). Physiology and pharmacology of striatal neurons. *Annual review of neuroscience*, 32, 127-147.
- Krishnan, V., Han, M. H., Graham, D. L., Berton, O., Renthal, W., Russo, S. J., ... & Nestler, E. J. (2007). Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell*, 131(2), 391-404.
- 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. (2018). Galanin neurons in the ventrolateral preoptic area promote sleep and heat loss in mice. *Nature communications*, 9(1), 4129.
- Krok, A. C., Maltese, M., Mistry, P., Miao, X., Li, Y., & Tritsch, N. X. (2023). Intrinsic dopamine and acetylcholine dynamics in the striatum of mice. *Nature*, 621(7979), 543-549.

- Kudryavtseva, N. N., Bakshtanovskaya, I. V., & Koryakina, L. A. (1991). Social model of depression in mice of C57BL/6J strain. *Pharmacology biochemistry and behavior*, 38(2), 315-320.
- Lange, C. G. (1885). *Om Sindsbevagelser* [The mechanisms of the emotions: A psychophysiological study]. Copenhagen, Denmark: Kronar.
- Lazarus, M., Huang, Z. L., Lu, J., Urade, Y., & Chen, J. F. (2012). How do the basal ganglia regulate sleep–wake behavior?. *Trends in neurosciences*, 35(12), 723-732.
- LeDoux, J. E. (1998). *The emotional brain: The mysterious underpinnings of emotional life*. Simon and Schuster.
- LeDoux, J. (2012). Rethinking the emotional brain. *Neuron*, 73(4), 653-676.
- LeDoux, J. E., & Pine, D. S. (2016). Using neuroscience to help understand fear and anxiety: a two-system framework. *American journal of psychiatry*, 173(11), 1083-1093.
- Lee, S., Chen, L., Chen, M., Ye, M., Seal, R. P., & Zhou, Z. J. (2014). An unconventional glutamatergic circuit in the retina formed by vGluT3 amacrine cells. *Neuron*, 84(4), 708-715.
- Lee, J., Finkelstein, J., Choi, J. Y., & Witten, I. B. (2016). Linking cholinergic interneurons, synaptic plasticity, and behavior during the extinction of a cocaine-context association. *Neuron*, 90(5), 1071-1085.
- Lemoine, M. (2017). *Introduction à la philosophie des sciences médicales*. Hermann
- Léna, I., Parrot, S., Deschaux, O., Muffat-Joly, S., Sauvinet, V., Renaud, B., Suaud-Chagny, M. F., & Gottesmann, C. (2005). Variations in extracellular levels of dopamine, noradrenaline, glutamate, and aspartate across the sleep–wake cycle in the medial prefrontal cortex and nucleus accumbens of freely moving rats. *Journal of neuroscience research*, 81(6), 891-899
- Li, L., Wu, C., Gan, Y., Qu, X., & Lu, Z. (2016). Insomnia and the risk of depression: a meta-analysis of prospective cohort studies. *BMC psychiatry*, 16, 1-16.
- Liu, M. Y., Yin, C. Y., Zhu, L. J., Zhu, X. H., Xu, C., Luo, C. X., ... & Zhou, Q. G. (2018). Sucrose preference test for measurement of stress-induced anhedonia in mice. *Nature protocols*, 13(7), 1686-1698.

- Lissek, S., Rabin, S., Heller, R. E., Lukenbaugh, D., Geraci, M., Pine, D. S., & Grillon, C. (2010). Overgeneralization of conditioned fear as a pathogenic marker of panic disorder. *American Journal of Psychiatry*, 167(1), 47-55.
- Lister R. G. (1987). The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*, 92(2), 180-185.
- Liu, Z., Zhou, J., Li, Y., Hu, F., Lu, Y., Ma, M., Feng, Q., Zhang, J. E., Wang, D., Zeng, J., Bao, J., Kim, J. Y., Chen, Z. F., El Mestikawy, S., & Luo, M. (2014). Dorsal raphe neurons signal reward through 5-HT and glutamate. *Neuron*, 81(6), 1360-1374.
- Logan, R. W. (2019). Adapting social defeat stress for female mice using species-typical interfemale aggression. *Biological Psychiatry*, 86(9), e31-e32.
- Lorsch, Z. S., Loh, Y. H. E., Purushothaman, I., Walker, D. M., Parise, E. M., Salery, M., ... & Nestler, E. J. (2018). Estrogen receptor  $\alpha$  drives pro-resilient transcription in mouse models of depression. *Nature communications*, 9(1), 1116.
- Lu, J., Greco, M. A., Shiromani, P., & Saper, C. B. (2000). Effect of lesions of the ventrolateral preoptic nucleus on NREM and REM sleep. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(10), 3830-3842.
- Lu, J., Sherman, D., Devor, M., & Saper, C. B. (2006). A putative flip-flop switch for control of REM sleep. *Nature*, 441(7093), 589-594.
- Luo, Y. J., Li, Y. D., Wang, L., Yang, S. R., Yuan, X. S., Wang, J., Cherasse, Y., Lazarus, M., Chen, J. F., Qu, W. M., & Huang, Z. L. (2018). Nucleus accumbens controls wakefulness by a subpopulation of neurons expressing dopamine D1 receptors. *Nature communications*, 9(1), 1576.
- Luppi, P. H., Chancel, A., Malcey, J., Cabrera, S., Fort, P., & Maciel, R. M. (2024). Which structure generates paradoxical (REM) sleep: The brainstem, the hypothalamus, the amygdala or the cortex?. *Sleep medicine reviews*, 74, 101907.
- Makino, J., Kato, K., & Maes, F. W. (1991). Temporal structure of open field behavior in inbred strains of mice. *Japanese Psychological Research*, 33(4), 145-152.
- Mamaligas, A. A., Barcomb, K., & Ford, C. P. (2019). Cholinergic transmission at muscarinic synapses in the striatum is driven equally by cortical and thalamic inputs. *Cell reports*, 28(4), 1003-1014.

- Mark, G. P., Weinberg, J. B., Rada, P. V., & Hoebel, B. G. (1995). Extracellular acetylcholine is increased in the nucleus accumbens following the presentation of an aversively conditioned taste stimulus. *Brain research*, 688(1-2), 184-188.
- Martyniuk, K. M., Torres-Herraez, A., Lowes, D. C., Rubinstein, M., Labouesse, M. A., & Kellendonk, C. (2022). Dopamine D2Rs coordinate cue-evoked changes in striatal acetylcholine levels. *Elife*, 11, e76111.
- Masseck, O. A., Spoida, K., Dalkara, D., Maejima, T., Rubelowski, J. M., Wallhorn, L., Deneris, E. S., & Herlitze, S. (2014). Vertebrate cone opsins enable sustained and highly sensitive rapid control of Gi/o signaling in anxiety circuitry. *Neuron*, 81(6), 1263-1273.
- Matsumoto, M., & Hikosaka, O. (2009). Two types of dopamine neuron distinctly convey positive and negative motivational signals. *Nature*, 459(7248), 837-841.
- McCullough, K. M., Missig, G., Robble, M. A., Foilb, A. R., Wells, A. M., Hartmann, J., ... & Carlezon Jr, W. A. (2021). Nucleus accumbens medium spiny neuron subtypes differentially regulate stress-associated alterations in sleep architecture. *Biological psychiatry*, 89(12), 1138-1149.
- Meaklim, H., Junge, M. F., Varma, P., Finck, W. A., & Jackson, M. L. (2021). Pre-existing and post-pandemic insomnia symptoms are associated with high levels of stress, anxiety, and depression globally during the COVID-19 pandemic. *Journal of Clinical Sleep Medicine*, 17(10), 2085-2097.
- Meerlo, P., & Turek, F. W. (2001). Effects of social stimuli on sleep in mice: non-rapid-eye-movement (NREM) sleep is promoted by aggressive interaction but not by sexual interaction. *Brain research*, 907(1-2), 84-92.
- Meerlo, P., Easton, A., Bergmann, B. M., & Turek, F. W. (2001). Restraint increases prolactin and REM sleep in C57BL/6J mice but not in BALB/cJ mice. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 281(3), R846-R854.
- Meshalkina, D. A., & Kalueff, A. V. (2016). Commentary: ethological evaluation of the effects of social defeat stress in mice: beyond the social interaction ratio. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 10, 155.
- Mirenowicz, J., & Schultz, W. (1994). Importance of unpredictability for reward responses in primate dopamine neurons. *Journal of neurophysiology*, 72(2), 1024-1027.

- Mogenson, G. J., Jones, D. L., & Yim, C. Y. (1980). From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. *Progress in neurobiology*, 14(2-3), 69-97.
- Morel, C., Fernandez, S. P., Pantouli, F., Meye, F. J., Marti, F., Tolu, S., ... & Faure, P. (2018). Nicotinic receptors mediate stress-nicotine detrimental interplay via dopamine cells' activity. *Molecular psychiatry*, 23(7), 1597-1605.
- Morris, G., Arkadir, D., Nevet, A., Vaadia, E., & Bergman, H. (2004). Coincident but distinct messages of midbrain dopamine and striatal tonically active neurons. *Neuron*, 43(1), 133-143.
- Muir, J., Lorsch, Z. S., Ramakrishnan, C., Deisseroth, K., Nestler, E. J., Calipari, E. S., & Bagot, R. C. (2018). In vivo fiber photometry reveals signature of future stress susceptibility in nucleus accumbens. *Neuropsychopharmacology*, 43(2), 255-263.
- Muir, A. M., Hedges-Muncy, A., Clawson, A., Carbine, K. A., & Larson, M. J. (2020). Dimensions of anxiety and depression and neurophysiological indicators of error-monitoring: Relationship with delta and theta oscillatory power and error-related negativity amplitude. *Psychophysiology*, 57(9), 603-624.
- Murphy, D. (2012). *Psychiatry in the scientific image*. Mit Press.
- Murra, D., Hilde, K. L., Fitzpatrick, A., Maras, P. M., Watson, S. J., & Akil, H. (2022). Characterizing the behavioral and neuroendocrine features of susceptibility and resilience to social stress. *Neurobiology of Stress*, 17, 100437.
- Murugan, M., Jang, H. J., Park, M., Miller, E. M., Cox, J., Taliaferro, J. P., ... & Witten, I. B. (2017). Combined social and spatial coding in a descending projection from the prefrontal cortex. *Cell*, 171(7), 1663-1677.
- Nagel, E. (1949). In defense of logic without metaphysics. *The Philosophical Review*, 58(1), 26-34.
- Namburi, P., Beyeler, A., Yorozu, S., Calhoon, G. G., Halbert, S. A., Wichmann, R., Holden, S. S., Mertens, K. L., Anahtar, M., Felix-Ortiz, A. C., Wickersham, I. R., Gray, J. M., & Tye, K. M. (2015). A circuit mechanism for differentiating positive and negative associations. *Nature*, 520(7549), 675-678.

- Nelson, A. B., Bussert, T. G., Kreitzer, A. C., & Seal, R. P. (2014). Striatal cholinergic neurotransmission requires VGLUT3. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *34*(26), 8772–8777.
- Nestler, E. J., & Hyman, S. E. (2010). Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nature neuroscience*, *13*(10), 1161-1169.
- Nestler, E. J. (2015). Role of the brain's reward circuitry in depression: transcriptional mechanisms. *International review of neurobiology*, *124*, 151-170.
- Nestler, E. J., & Carlezon, W. A., Jr (2006). The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biological psychiatry*, *59*(12), 1151–1159.
- Nestler, E. J. (2014). Epigenetic mechanisms of depression. *JAMA psychiatry*, *71*(4), 454-456.
- Newman, E. L., Covington III, H. E., Suh, J., Bicakci, M. B., Ressler, K. J., DeBold, J. F., & Miczek, K. A. (2019). Fighting females: neural and behavioral consequences of social defeat stress in female mice. *Biological psychiatry*, *86*(9), 657-668.
- Ni, B. I. N. H. U. I., Wu, X., Yan, G. M., Wang, J., & Paul, S. M. (1995). Regional expression and cellular localization of the Na (+)-dependent inorganic phosphate cotransporter of rat brain. *Journal of Neuroscience*, *15*(8), 5789-5799.
- Nietzsche, F. (1989) *Le Gai Savoir*. Folio poche
- Nixon, R. D., Nehmy, T., & Seymour, M. (2007). The effect of cognitive load and hyperarousal on negative intrusive memories. *Behaviour Research and Therapy*, *45*(11), 2652-2663.
- Nosjean, A., Cressant, A., De Chaumont, F., Olivo-Marin, J. C., Chauveau, F., & Granon, S. (2015). Acute stress in adulthood impoverishes social choices and triggers aggressiveness in preclinical models. *Frontiers in behavioral neuroscience*, *8*, 447.
- Nosjean, A., & Granon, S. (2022). Brain adaptation to acute stress: effect of time, social buffering, and nicotinic cholinergic system. *Cerebral Cortex*, *32*(18), 3990-4011.
- Oishi, Y., Xu, Q., Wang, L., Zhang, B. J., Takahashi, K., Takata, Y., ... & Lazarus, M. (2017). Slow-wave sleep is controlled by a subset of nucleus accumbens core neurons in mice. *Nature communications*, *8*(1), 1-12.

- Oleson, E. B., Gentry, R. N., Chioma, V. C., & Cheer, J. F. (2012). Subsecond dopamine release in the nucleus accumbens predicts conditioned punishment and its successful avoidance. *Journal of Neuroscience*, *32*(42), 14804-14808.
- Olini, N., Rothfuchs, I., Azzinnari, D., Pryce, C. R., Kurth, S., & Huber, R. (2017). Chronic social stress leads to altered sleep homeostasis in mice. *Behavioural brain research*, *327*, 167-173.
- Omiya, Y., Uchigashima, M., Konno, K., Yamasaki, M., Miyazaki, T., Yoshida, T., Kusumi, I., & Watanabe, M. (2015). VGluT3-expressing CCK-positive basket cells construct invaginating synapses enriched with endocannabinoid signaling proteins in particular cortical and cortex-like amygdaloid regions of mouse brains. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *35*(10), 4215-4228.
- Ortiz, V., Costa Campos, R., Fofó, H., Fernandez, S. P., & Barik, J. (2022). Nicotinic receptors promote susceptibility to social stress in female mice linked with neuroadaptations within VTA dopamine neurons. *Neuropsychopharmacology*, *47*(9), 1587-1596.
- Pan, W. X., Schmidt, R., Wickens, J. R., & Hyland, B. I. (2005). Dopamine cells respond to predicted events during classical conditioning: evidence for eligibility traces in the reward-learning network. *Journal of Neuroscience*, *25*(26), 6235-6242.
- Panksepp, J. (1982). Toward a general psychobiological theory of emotions. *Behavioral and Brain sciences*, *5*(3), 407-422.
- Panksepp, J. (1998). The periconscious substrates of consciousness: Affective states and the evolutionary origins of the self. *Journal of consciousness studies*, *5*(5-6), 566-582.
- Panksepp, J., & Watt, D. (2011). What is basic about basic emotions? Lasting lessons from affective neuroscience. *Emotion review*, *3*(4), 387-396.
- Parker, N. F., Cameron, C. M., Taliaferro, J. P., Lee, J., Choi, J. Y., Davidson, T. J., Daw, N. D., & Witten, I. B. (2016). Reward and choice encoding in terminals of midbrain dopamine neurons depends on striatal target. *Nature neuroscience*, *19*(6), 845-854.
- Pascoli, V., Terrier, J., Hiver, A., & Lüscher, C. (2015). Sufficiency of mesolimbic dopamine neuron stimulation for the progression to addiction. *Neuron*, *88*(5), 1054-1066.

- Paton, J. J., Belova, M. A., Morrison, S. E., & Salzman, C. D. (2006). The primate amygdala represents the positive and negative value of visual stimuli during learning. *Nature*, 439(7078), 865-870.
- Pawlyk, A. C., Jha, S. K., Brennan, F. X., Morrison, A. R., & Ross, R. J. (2005). A rodent model of sleep disturbances in posttraumatic stress disorder: the role of context after fear conditioning. *Biological psychiatry*, 57(3), 268-277.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., & Briley, M. (1985). Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of neuroscience methods*, 14(3), 149-167.
- Perlis, M. L., Smith, M. T., Andrews, P. J., Orff, H., & Giles, D. E. (2001). Beta/Gamma EEG activity in patients with primary and secondary insomnia and good sleeper controls. *Sleep*, 24(1), 110-117.
- Perreault, M. L., Hasbi, A., O'Dowd, B. F., & George, S. R. (2011). The dopamine d1-d2 receptor heteromer in striatal medium spiny neurons: evidence for a third distinct neuronal pathway in Basal Ganglia. *Frontiers in neuroanatomy*, 5, 31.
- Peyron, C., Faraco, J., Rogers, W., Ripley, B., Overeem, S., Charnay, Y., Nevsimalova, S., Aldrich, M., Reynolds, D., Albin, R., Li, R., Hungs, M., Pedrazzoli, M., Padigaru, M., Kucherlapati, M., Fan, J., Maki, R., Lammers, G. J., Bouras, C., Kucherlapati, R., ... Mignot, E. (2000). A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nature medicine*, 6(9), 991-997.
- Pfau, M. L., Purushothaman, I., Feng, J., Golden, S. A., Aleyasin, H., Lorsch, Z. S., ... & Russo, S. J. (2016). Integrative analysis of sex-specific microRNA networks following stress in mouse nucleus accumbens. *Frontiers in molecular neuroscience*, 9, 144.
- Picciotto, M. R., Higley, M. J., & Mineur, Y. S. (2012). Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. *Neuron*, 76(1), 116-129.
- Pinto, M. J., Bizien, L., Fabre, J. M., Đukanović, N., Lepetz, V., Henderson, F., ... & Bessis, A. (2024). Microglial TNF $\alpha$  controls daily changes in synaptic GABAARs and sleep slow waves. *Journal of Cell Biology*, 223(7), e202401041.

- Place, U. T. (1956). Is consciousness a brain process?. *British journal of psychology*, 47(1), 44-50.
- Plutchik, R. (1980). A general psychoevolutionary theory of emotion. In *Theories of emotion* (pp. 3-33). Academic press.
- Popa, D., Léna, C., Alexandre, C., & Adrien, J. (2008). Lasting syndrome of depression produced by reduction in serotonin uptake during postnatal development: evidence from sleep, stress, and behavior. *Journal of Neuroscience*, 28(14), 3546-3554.
- Popper, K. R. (1966). *Logik der forschung* (1934). Tübingen: Mohr & Siebeck.
- Prado, V. F., Janickova, H., Al-Onaizi, M. A., & Prado, M. A. (2017). Cholinergic circuits in cognitive flexibility. *Neuroscience*, 345, 130-141.
- Prinz, J. J. (2004). *Gut reactions: A perceptual theory of emotion*. Oxford university Press.
- Prut, L., & Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European journal of pharmacology*, 463(1-3), 3-33.
- Putnam, H. (1967). Psychological predicates. *Art, mind, and religion*, 1, 37-48.
- Qi, J., Zhang, S., Wang, H. L., Wang, H., de Jesus Aceves Buendia, J., Hoffman, A. F., ... & Morales, M. (2014). A glutamatergic reward input from the dorsal raphe to ventral tegmental area dopamine neurons. *Nature communications*, 5(1), 5390.
- Qi, G., Zhang, P., Li, T., Li, M., Zhang, Q., He, F., ... & Tian, B. (2022). NAc-VTA circuit underlies emotional stress-induced anxiety-like behavior in the three-chamber vicarious social defeat stress mouse model. *Nature communications*, 13(1), 577.
- Qiu, M. H., Liu, W., Qu, W. M., Urade, Y., Lu, J., & Huang, Z. L. (2012). The role of nucleus accumbens core/shell in sleep-wake regulation and their involvement in modafinil-induced arousal.
- Quéré, L. (2023). *Il n'y a pas de cerveau des émotions*. PUF.
- Radwan, B., Yanez Touzet, A., Hammami, S., & Chaudhury, D. (2021). Prolonged exposure to social stress impairs homeostatic sleep regulation. *Frontiers in Neuroscience*, 15, 633955.

- Radwan, B., Jansen, G., & Chaudhury, D. (2021). Sleep-wake dynamics pre-and post-exposure to chronic social stress. *IScience*, 24(10).
- Radwan, B., Jansen, G., & Chaudhury, D. (2021). Abnormal sleep signals vulnerability to chronic social defeat stress. *Frontiers in Neuroscience*, 14, 610655.
- Ragozzino, M. E., & Choi, D. (2004). Dynamic changes in acetylcholine output in the medial striatum during place reversal learning. *Learning & Memory*, 11(1), 70-77.
- Raise-Abdullahi, P., Meamar, M., Vafaei, A. A., Alizadeh, M., Dadkhah, M., Shafia, S., ... & Rashidy-Pour, A. (2023). Hypothalamus and post-traumatic stress disorder: a review. *Brain sciences*, 13(7), 1010.
- Ravel, S., Legallet, E., & Apicella, P. (2003). Responses of tonically active neurons in the monkey striatum discriminate between motivationally opposing stimuli. *Journal of Neuroscience*, 23(24), 8489-8497.
- Razidlo, J. A., Fausner, S. M., Ingebretson, A. E., Wang, L. C., Petersen, C. L., Mirza, S., ... & Lemos, J. C. (2022). Chronic loss of muscarinic M5 receptor function manifests disparate impairments in exploratory behavior in male and female mice despite common dopamine regulation. *Journal of Neuroscience*, 42(36), 6917-6930.
- Rebello, T. J., Yu, Q., Goodfellow, N. M., Cagliostro, M. K. C., Teissier, A., Morelli, E., ... & Ansorge, M. S. (2014). Postnatal day 2 to 11 constitutes a 5-HT-sensitive period impacting adult mPFC function. *Journal of Neuroscience*, 34(37), 12379-12393.
- Rehbein, M. A., Wessing, I., Zwitserlood, P., Steinberg, C., Eden, A. S., Dobel, C., & Junghöfer, M. (2015). Rapid prefrontal cortex activation towards aversively paired faces and enhanced contingency detection are observed in highly trait-anxious women under challenging conditions. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 9, 155.
- Ren, J., Qin, C., Hu, F., Tan, J., Qiu, L., Zhao, S., Feng, G., & Luo, M. (2011). Habenula "cholinergic" neurons co-release glutamate and acetylcholine and activate postsynaptic neurons via distinct transmission modes. *Neuron*, 69(3), 445-452.
- Ren, S., Wang, Y., Yue, F., Cheng, X., Dang, R., Qiao, Q., ... & Hu, Z. (2018). The paraventricular thalamus is a critical thalamic area for wakefulness. *Science*, 362(6413), 429-434.

- Ressler, K. J., Berretta, S., Bolshakov, V. Y., Rosso, I. M., Meloni, E. G., Rauch, S. L., & Carlezon Jr, W. A. (2022). Post-traumatic stress disorder: clinical and translational neuroscience from cells to circuits. *Nature Reviews Neurology*, 18(5), 273-288.
- Rice, M. E., & Cragg, S. J. (2004). Nicotine amplifies reward-related dopamine signals in striatum. *Nature neuroscience*, 7(6), 583-584.
- Richards, H. J., Benson, V., Donnelly, N., & Hadwin, J. A. (2014). Exploring the function of selective attention and hypervigilance for threat in anxiety. *Clinical psychology review*, 34(1), 1-13.
- Riedner, B. A., Goldstein, M. R., Plante, D. T., Rumble, M. E., Ferrarelli, F., Tononi, G., & Benca, R. M. (2016). Regional Patterns of Elevated Alpha and High-Frequency Electroencephalographic Activity during Nonrapid Eye Movement Sleep in Chronic Insomnia: A Pilot Study. *Sleep*, 39(4), 801-812.
- Ritz, S. A., & Greaves, L. (2024). We need more-nuanced approaches to exploring sex and gender in research. *Nature*, 629(8010), 34-36.
- Rosenberg, A. (1978). The supervenience of biological concepts. *Philosophy of Science*, 45(3), 368-386.
- Ruel, J., Emery, S., Nouvian, R., Bersot, T., Amilhon, B., Van Rybroek, J. M., ... & Puel, J. L. (2008). Impairment of SLC17A8 encoding vesicular glutamate transporter-3, VGLUT3, underlies nonsyndromic deafness DFNA25 and inner hair cell dysfunction in null mice. *The American Journal of Human Genetics*, 83(2), 278-292.
- Russell, G., & Lightman, S. (2019). The human stress response. *Nature reviews endocrinology*, 15(9), 525-534.
- Russo, S. J., Murrough, J. W., Han, M. H., Charney, D. S., & Nestler, E. J. (2012). Neurobiology of resilience. *Nature neuroscience*, 15(11), 1475-1484.
- Russo, S. J., & Nestler, E. J. (2013). The brain reward circuitry in mood disorders. *Nature reviews neuroscience*, 14(9), 609-625.
- Sachs, B. D., Rodriguiz, R. M., Siesser, W. B., Kenan, A., Royer, E. L., Jacobsen, J. P., Wetsel, W. C., & Caron, M. G. (2013). The effects of brain serotonin deficiency on behavioural disinhibition and anxiety-like behaviour following mild early life stress. *The international journal of neuropsychopharmacology*, 16(9), 2081-2094.

- Sachs, B. D., Ni, J. R., & Caron, M. G. (2015). Brain 5-HT deficiency increases stress vulnerability and impairs antidepressant responses following psychosocial stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(8), 2557–2562.
- Sakae, D. Y., Marti, F., Lecca, S., Vorspan, F., Martín-García, E., Morel, L. J., ... & El Mestikawy, S. (2015). The absence of VGLUT3 predisposes to cocaine abuse by increasing dopamine and glutamate signaling in the nucleus accumbens. *Molecular psychiatry*, 20(11), 1448-1459.
- Salamone, J. D., Koychev, I., Correa, M., & McGuire, P. (2015). Neurobiological basis of motivational deficits in psychopathology. *European Neuropsychopharmacology*, 25(8), 1225-1238.
- Salinas, A. G., Davis, M. I., Lovinger, D. M., & Mateo, Y. (2016). Dopamine dynamics and cocaine sensitivity differ between striosome and matrix compartments of the striatum. *Neuropharmacology*, 108, 275-283.
- Saper, C. B., Scammell, T. E., & Lu, J. (2005). Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature*, 437(7063), 1257–1263.
- Saper, C. B., Fuller, P. M., Pedersen, N. P., Lu, J., & Scammell, T. E. (2010). Sleep state switching. *Neuron*, 68(6), 1023-1042.
- Sarkar, A., Chachra, P., & Vaidya, V. A. (2014). Postnatal fluoxetine-evoked anxiety is prevented by concomitant 5-HT<sub>2A/C</sub> receptor blockade and mimicked by postnatal 5-HT<sub>2A/C</sub> receptor stimulation. *Biological psychiatry*, 76(11), 858-868.
- Sasaki, K., Suzuki, M., Mieda, M., Tsujino, N., Roth, B., & Sakurai, T. (2011). Pharmacogenetic modulation of orexin neurons alters sleep/wakefulness states in mice. *PloS one*, 6(5), e20360.
- Saunders, B. T., Richard, J. M., Margolis, E. B., & Janak, P. H. (2018). Dopamine neurons create Pavlovian conditioned stimuli with circuit-defined motivational properties. *Nature neuroscience*, 21(8), 1072–1083.
- Scammell, T. E., Arrigoni, E., & Lipton, J. O. (2017). Neural Circuitry of Wakefulness and Sleep. *Neuron*, 93(4), 747–765.

- Schäfer, M. K. H., Varoqui, H., Defamie, N., Weihe, E., & Erickson, J. D. (2002). Molecular cloning and functional identification of mouse vesicular glutamate transporter 3 and its expression in subsets of novel excitatory neurons. *Journal of Biological Chemistry*, 277(52), 50734-50748.
- Schaffner, K. F. (1967). Approaches to reduction. *Philosophy of science*, 34(2), 137-147.
- Schultz, W., Apicella, P., & Ljungberg, T. (1993). Responses of monkey dopamine neurons to reward and conditioned stimuli during successive steps of learning a delayed response task. *Journal of neuroscience*, 13(3), 900-913.
- Schultz, W. (1998). Predictive reward signal of dopamine neurons. *Journal of neurophysiology*.
- Schultz, W., & Dickinson, A. (2000). Neuronal coding of prediction errors. *Annual review of neuroscience*, 23, 473-500.
- Searle, J. R. (2002). Why I am not a property dualist. *Journal of consciousness studies*, 9(12), 57-64.
- Sengupta, A., Bocchio, M., Bannerman, D. M., Sharp, T., & Capogna, M. (2017). Control of Amygdala Circuits by 5-HT Neurons via 5-HT and Glutamate Cotransmission. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 37(7), 1785-1796.
- Serreau, P., Chabout, J., Suarez, S. V., Naudé, J., & Granon, S. (2011). Beta2-containing neuronal nicotinic receptors as major actors in the flexible choice between conflicting motivations. *Behavioural brain research*, 225(1), 151-159.
- Shao, Z., Xu, Y., Chen, L., Wang, S., Zhang, M., Liu, S., ... & Yuan, K. (2020). Dysfunction of the NAc-mPFC circuit in insomnia disorder. *NeuroImage: Clinical*, 28, 102474.
- Shutoh, F., Ina, A., Yoshida, S., Konno, J., & Hisano, S. (2008). Two distinct subtypes of serotonergic fibers classified by co-expression with vesicular glutamate transporter 3 in rat forebrain. *Neuroscience letters*, 432(2), 132-136.
- Silberberg, G., & Bolam, J. P. (2015). Local and afferent synaptic pathways in the striatal microcircuitry. *Current opinion in neurobiology*, 33, 182-187.
- Smart, J. J. (1959). Sensations and brain processes. *The Philosophical Review*, 68(2), 141-156.

- Smith, Y., Bennett, B. D., Bolam, J. P., Parent, A., & Sadikot, A. F. (1994). Synaptic relationships between dopaminergic afferents and cortical or thalamic input in the sensorimotor territory of the striatum in monkey. *The Journal of comparative neurology*, 344(1), 1–19.
- Smith, R. J., Lobo, M. K., Spencer, S., & Kalivas, P. W. (2013). Cocaine-induced adaptations in D1 and D2 accumbens projection neurons (a dichotomy not necessarily synonymous with direct and indirect pathways). *Current opinion in neurobiology*, 23(4), 546–552.
- Smith, J. B., Klug, J. R., Ross, D. L., Howard, C. D., Hollon, N. G., Ko, V. I., ... & Jin, X. (2016). Genetic-based dissection unveils the inputs and outputs of striatal patch and matrix compartments. *Neuron*, 91(5), 1069–1084.
- Somogyi, J., Baude, A., Omori, Y., Shimizu, H., El Mestikawy, S., Fukaya, M., Shigemoto, R., Watanabe, M., & Somogyi, P. (2004). GABAergic basket cells expressing cholecystokinin contain vesicular glutamate transporter type 3 (VGLUT3) in their synaptic terminals in hippocampus and isocortex of the rat. *The European journal of neuroscience*, 19(3), 552–569.
- Southwick, S. M., Bonanno, G. A., Masten, A. S., Panter-Brick, C., & Yehuda, R. (2014). Resilience definitions, theory, and challenges: interdisciplinary perspectives. *European journal of psychotraumatology*, 5(1), 25338.
- Southwick, S.M., Charney, D.S., and DePierro, J.M. (2023). *Resilience: the Science of Mastering Life's Greatest Challenges*, 3rd edition (Cambridge University Press).
- Steiger, A., & Kimura, M. (2010). Wake and sleep EEG provide biomarkers in depression. *Journal of psychiatric research*, 44(4), 242–252.
- Stephenson-Jones, M., Samuelsson, E., Ericsson, J., Robertson, B., & Grillner, S. (2011). Evolutionary conservation of the basal ganglia as a common vertebrate mechanism for action selection. *Current biology : CB*, 21(13), 1081–1091.
- Stetler, C., & Miller, G. E. (2011). Depression and hypothalamic-pituitary-adrenal activation: a quantitative summary of four decades of research. *Psychosomatic medicine*, 73(2), 114–126.
- Sulaman, B. A., Wang, S., Tyan, J., & Eban-Rothschild, A. (2023). Neuro-orchestration of sleep and wakefulness. *Nature neuroscience*, 26(2), 196–212.

- Surmeier, D. J., Ding, J., Day, M., Wang, Z., & Shen, W. (2007). D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends in neurosciences*, *30*(5), 228–235.
- Takagi, Y., Sakai, Y., Abe, Y., Nishida, S., Harrison, B. J., Martínez-Zalacaín, I., ... & Tanaka, S. C. (2018). A common brain network among state, trait, and pathological anxiety from whole-brain functional connectivity. *Neuroimage*, *172*, 506–516.
- Takahashi, A., Chung, J. R., Zhang, S., Zhang, H., Grossman, Y., Aleyasin, H., ... & Russo, S. J. (2017). Establishment of a repeated social defeat stress model in female mice. *Scientific reports*, *7*(1), 12838.
- Takahashi, A. (2021). Toward understanding the sex differences in the biological mechanism of social stress in mouse models. *Frontiers in psychiatry*, *12*, 644161.
- Tanaka, K., Furuyashiki, T., Kitaoka, S., Senzai, Y., Imoto, Y., Segi-Nishida, E., ... & Narumiya, S. (2012). Prostaglandin E2-mediated attenuation of mesocortical dopaminergic pathway is critical for susceptibility to repeated social defeat stress in mice. *Journal of Neuroscience*, *32*(12), 4319–4329.
- Teissier, A., Chemiakine, A., Inbar, B., Bagchi, S., Ray, R. S., Palmiter, R. D., ... & Ansorge, M. S. (2015). Activity of raphe serotonergic neurons controls emotional behaviors. *Cell reports*, *13*(9), 1965–1976.
- Teissier, A., Soiza-Reilly, M., & Gaspar, P. (2017). Refining the role of 5-HT in postnatal development of brain circuits. *Frontiers in cellular neuroscience*, *11*, 139.
- Tepper, J. M., Tecuapetla, F., Koós, T., & Ibáñez-Sandoval, O. (2010). Heterogeneity and diversity of striatal GABAergic interneurons. *Frontiers in neuroanatomy*, *4*, 150.
- Thannickal, T. C., Moore, R. Y., Nienhuis, R., Ramanathan, L., Gulyani, S., Aldrich, M., ... & Siegel, J. M. (2000). Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. *Neuron*, *27*(3), 469–474.
- Threlfell, S., & Cragg, S. J. (2011). Dopamine signaling in dorsal versus ventral striatum: the dynamic role of cholinergic interneurons. *Frontiers in systems neuroscience*, *5*, 11.
- Threlfell, S., Lalic, T., Platt, N. J., Jennings, K. A., Deisseroth, K., & Cragg, S. J. (2012). Striatal dopamine release is triggered by synchronized activity in cholinergic interneurons. *Neuron*, *75*(1), 58–64.

- Toth, B. A., Chang, K. S., Fechtali, S., & Burgess, C. R. (2023). Dopamine release in the nucleus accumbens promotes REM sleep and cataplexy. *Iscience*, 26(9), 107613.
- Tritsch, N. X., & Sabatini, B. L. (2012). Dopaminergic modulation of synaptic transmission in cortex and striatum. *Neuron*, 76(1), 33-50.
- Tsai, H. C., Zhang, F., Adamantidis, A., Stuber, G. D., Bonci, A., De Lecea, L., & Deisseroth, K. (2009). Phasic firing in dopaminergic neurons is sufficient for behavioral conditioning. *Science*, 324(5930), 1080-1084.
- Tye, K. M., Stuber, G. D., De Ridder, B., Bonci, A., & Janak, P. H. (2008). Rapid strengthening of thalamo-amygdala synapses mediates cue-reward learning. *Nature*, 453(7199), 1253-1257.
- Tye, K. M., Prakash, R., Kim, S. Y., Fenno, L. E., Grosenick, L., Zarabi, H., Thompson, K. R., Gradinaru, V., Ramakrishnan, C., & Deisseroth, K. (2011). Amygdala circuitry mediating reversible and bidirectional control of anxiety. *Nature*, 471(7338), 358-362.
- Tye, K. M., Mirzabekov, J. J., Warden, M. R., Ferenczi, E. A., Tsai, H. C., Finkelstein, J., Kim, S. Y., Adhikari, A., Thompson, K. R., Andalman, A. S., Gunaydin, L. A., Witten, I. B., & Deisseroth, K. (2013). Dopamine neurons modulate neural encoding and expression of depression-related behaviour. *Nature*, 493(7433), 537-541.
- Urban, D. J., Zhu, H., Marcinkiewicz, C. A., Michaelides, M., Oshibuchi, H., Rhea, D., ... & Roth, B. L. (2016). Elucidation of the behavioral program and neuronal network encoded by dorsal raphe serotonergic neurons. *Neuropsychopharmacology*, 41(5), 1404-1415.
- Valadez, E. A., Pine, D. S., Fox, N. A., & Bar-Haim, Y. (2022). Attentional biases in human anxiety. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 142, 104917.
- Valencia Garcia, S., Libourel, P. A., Lazarus, M., Grassi, D., Luppi, P. H., & Fort, P. (2017). Genetic inactivation of glutamate neurons in the rat sublateralodorsal tegmental nucleus recapitulates REM sleep behaviour disorder. *Brain*, 140(2), 414-428.
- Vander Weele, C. M., Siciliano, C. A., Matthews, G. A., Namburi, P., Izadmehr, E. M., Espinel, I. C., Nieh, E. H., Schut, E. H. S., Padilla-Coreano, N., Burgos-Robles, A., Chang, C. J., Kimchi, E. Y., Beyeler, A., Wichmann, R., Wildes, C. P., & Tye, K. M. (2018). Dopamine

- enhances signal-to-noise ratio in cortical-brainstem encoding of aversive stimuli. *Nature*, 563(7731), 397–401.
- van Doeselaar, L., Yang, H., Bordes, J., Brix, L., Engelhardt, C., Tang, F., & Schmidt, M. V. (2021). Chronic social defeat stress in female mice leads to sex-specific behavioral and neuroendocrine effects. *Stress*, 24(2), 168-180.
- Vialou, V., Robison, A. J., LaPlant, Q. C., Covington III, H. E., Dietz, D. M., Ohnishi, Y. N., ... & Nestler, E. J. (2010).  $\Delta$ FosB in brain reward circuits mediates resilience to stress and antidepressant responses. *Nature neuroscience*, 13(6), 745-752.
- Vialou, V., Bagot, R. C., Cahill, M. E., Ferguson, D., Robison, A. J., Dietz, D. M., Fallon, B., Mazei-Robison, M., Ku, S. M., Harrigan, E., Winstanley, C. A., Joshi, T., Feng, J., Berton, O., & Nestler, E. J. (2014). Prefrontal cortical circuit for depression- and anxiety-related behaviors mediated by cholecystokinin: role of  $\Delta$ FosB. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 34(11), 3878–3887.
- Vincent, S. R., & Johansson, O. (1983). Striatal neurons containing both somatostatin- and avian pancreatic polypeptide (APP)-like immunoreactivities and NADPH-diaphorase activity: a light and electron microscopic study. *The Journal of comparative neurology*, 217(3), 264–270.
- Vinkers, C. H., Oosting, R. S., van Bogaert, M. J., Olivier, B., & Groenink, L. (2010). Early-life blockade of 5-HT<sub>1A</sub> receptors alters adult anxiety behavior and benzodiazepine sensitivity. *Biological psychiatry*, 67(4), 309-316.
- Volkow, N. D., Wise, R. A., & Baler, R. (2017). The dopamine motive system: implications for drug and food addiction. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(12), 741-752.
- Voorn, P., Vanderschuren, L. J., Groenewegen, H. J., Robbins, T. W., & Pennartz, C. M. (2004). Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum. *Trends in neurosciences*, 27(8), 468–474.
- Walker, D. L., Toufexis, D. J., & Davis, M. (2003). Role of the bed nucleus of the stria terminalis versus the amygdala in fear, stress, and anxiety. *European journal of pharmacology*, 463(1-3), 199-216.

- Walker, F. R., Masters, L. M., Dielenberg, R. A., & Day, T. A. (2009). Coping with defeat: acute glucocorticoid and forebrain responses to social defeat vary with defeat episode behaviour. *Neuroscience*, 162(2), 244-253.
- Wang, H. L., Zhang, S., Qi, J., Wang, H., Cachope, R., Mejias-Aponte, C. A., ... & Morales, M. (2019). Dorsal raphe dual serotonin-glutamate neurons drive reward by establishing excitatory synapses on VTA mesoaccumbens dopamine neurons. *Cell reports*, 26(5), 1128-1142.
- Warden, M. R., Selimbeyoglu, A., Mirzabekov, J. J., Lo, M., Thompson, K. R., Kim, S. Y., Adhikari, A., Tye, K. M., Frank, L. M., & Deisseroth, K. (2012). A prefrontal cortex-brainstem neuronal projection that controls response to behavioural challenge. *Nature*, 492(7429), 428-432.
- Warner-Schmidt, J. L., Schmidt, E. F., Marshall, J. J., Rubin, A. J., Arango-Lievano, M., Kaplitt, M. G., ... & Greengard, P. (2012). Cholinergic interneurons in the nucleus accumbens regulate depression-like behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(28), 11360-11365.
- Waselus, M., Galvez, J. P., Valentino, R. J., & Van Bockstaele, E. J. (2006). Differential projections of dorsal raphe nucleus neurons to the lateral septum and striatum. *Journal of chemical neuroanatomy*, 31(4), 233-242.
- Weger, M., & Sandi, C. (2018). High anxiety trait: A vulnerable phenotype for stress-induced depression. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 87, 27-37.
- Weinberg, S. (1988). The limits of reductionism. *Nature*, 331(6156), 475-476.
- Wells, A. M., Ridener, E., Bourbonais, C. A., Kim, W., Pantazopoulos, H., Carroll, F. I., ... & Carlezon, W. A. (2017). Effects of chronic social defeat stress on sleep and circadian rhythms are mitigated by kappa-opioid receptor antagonism. *Journal of neuroscience*, 37(32), 7656-7668.
- Whitney, M. S., Shemery, A. M., Yaw, A. M., Donovan, L. J., Glass, J. D., & Deneris, E. S. (2016). Adult Brain Serotonin Deficiency Causes Hyperactivity, Circadian Disruption, and Elimination of Siestas. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 36(38), 9828-9842.

- Willmore, L., Cameron, C., Yang, J., Witten, I. B., & Falkner, A. L. (2022). Behavioural and dopaminergic signatures of resilience. *Nature*, *611*(7934), 124-132.
- Willner, P. (1984). The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology*, *83*(1), 1-16.
- Willner, P. (2005). Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology*, *52*(2), 90-110.
- Wilson, C. J., Chang, H. T., & Kitai, S. T. (1990). Firing patterns and synaptic potentials of identified giant aspiny interneurons in the rat neostriatum. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *10*(2), 508-519.
- Witten, I. B., Steinberg, E. E., Lee, S. Y., Davidson, T. J., Zalocusky, K. A., Brodsky, M., ... & Deisseroth, K. (2011). Recombinase-driver rat lines: tools, techniques, and optogenetic application to dopamine-mediated reinforcement. *Neuron*, *72*(5), 721-733.
- Wood, S. K., Walker, H. E., Valentino, R. J., & Bhatnagar, S. (2010). Individual differences in reactivity to social stress predict susceptibility and resilience to a depressive phenotype: role of corticotropin-releasing factor. *Endocrinology*, *151*(4), 1795-1805
- Wu, M., Zhang, X., Feng, S., Freda, S. N., Kumari, P., Dumrongprechachan, V., & Kozorovitskiy, Y. (2024). Dopamine pathways mediating affective state transitions after sleep loss. *Neuron*, *112*(1), 141-154.
- Xia, Y., Driscoll, J. R., Wilbrecht, L., Margolis, E. B., Fields, H. L., & Hjelmstad, G. O. (2011). Nucleus accumbens medium spiny neurons target non-dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *31*(21), 7811-7816
- Yang, C., Jeong, S., Ku, S., Lee, K., & Park, M. H. (2018). Use of gasotransmitters for the controlled release of polymer-based nitric oxide carriers in medical applications. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, *279*, 157-170.
- Yankelevitch-Yahav, R., Franko, M., Huly, A., & Doron, R. (2015). The forced swim test as a model of depressive-like behavior. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (97), e52587.
- Yerkes, R. M., & Dodson, J. D. (1908). The relation of strength of stimulus to rapidity of habit-formation.

- Yu, X., Li, W., Ma, Y., Tossell, K., Harris, J. J., Harding, E. C., Ba, W., Miracca, G., Wang, D., Li, L., Guo, J., Chen, M., Li, Y., Yustos, R., Vyssotski, A. L., Burdakov, D., Yang, Q., Dong, H., Franks, N. P., & Wisden, W. (2019). GABA and glutamate neurons in the VTA regulate sleep and wakefulness. *Nature neuroscience*, *22*(1), 106–119.
- Yu, X., Zhao, G., Wang, D., Wang, S., Li, R., Li, A., Wang, H., Nollet, M., Chun, Y. Y., Zhao, T., Yustos, R., Li, H., Zhao, J., Li, J., Cai, M., Vyssotski, A. L., Li, Y., Dong, H., Franks, N. P., & Wisden, W. (2022). A specific circuit in the midbrain detects stress and induces restorative sleep. *Science (New York, N.Y.)*, *377*(6601), 63–72.
- Zachry, J. E., Kutlu, M. G., Yoon, H. J., Leonard, M. Z., Chevée, M., Patel, D. D., ... & Calipari, E. S. (2024). D1 and D2 medium spiny neurons in the nucleus accumbens core have distinct and valence-independent roles in learning. *Neuron*, *112*(5), 835–849.
- Zhang, H., & Sulzer, D. (2004). Frequency-dependent modulation of dopamine release by nicotine. *Nature neuroscience*, *7*(6), 581–582.
- Zhang, T., Zhang, L., Liang, Y., Siapas, A. G., Zhou, F. M., & Dani, J. A. (2009). Dopamine signaling differences in the nucleus accumbens and dorsal striatum exploited by nicotine. *Journal of Neuroscience*, *29*(13), 4035–4043.
- Zhang, J., Cai, C. Y., Wu, H. Y., Zhu, L. J., Luo, C. X., & Zhu, D. Y. (2016). CREB-mediated synaptogenesis and neurogenesis is crucial for the role of 5-HT1a receptors in modulating anxiety behaviors. *Scientific reports*, *6*(1), 29551.
- Zhao, X., Tong, S., & Yang, Y. (2022). The correlation between quality of life and positive psychological resources in cancer patients: a meta-analysis. *Frontiers in psychology*, *13*, 883157.
- Zhou, F. M., Wilson, C. J., & Dani, J. A. (2002). Cholinergic interneuron characteristics and nicotinic properties in the striatum. *Journal of neurobiology*, *53*(4), 590–605.
- Zou, W. J., Song, Y. L., Wu, M. Y., Chen, X. T., You, Q. L., Yang, Q., ... & Gao, T. M. (2020). A discrete serotonergic circuit regulates vulnerability to social stress. *Nature Communications*, *11*(1), 4218.



# ANNEXES

---

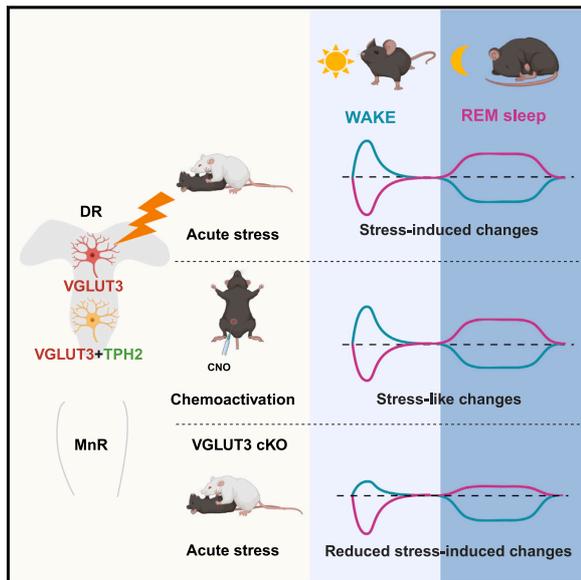


1. Article : Henderson et al. (soumis), Cell Reports

« Regulation of stress-induced sleep perturbations by dorsal raphe VGLUT3 neurons in male mice »

# Regulation of stress-induced sleep perturbations by dorsal raphe VGLUT3 neurons in male mice

Graphical abstract



Authors

Fiona Henderson, Sylvie Dumas, Giuseppe Gangarossa, ..., Salah El Mestikawy, Stéphanie Daumas, Véronique Fabre

Correspondence

stephanie.daumas@sorbonne-universite.fr (S.D.), veronique.fabre@inserm.fr (V.F.)

In brief

Psychological stressors can induce maladaptive disruptions in sleep patterns. Henderson et al. show that neurons expressing VGLUT3 in the dorsal raphe nucleus (DR) are involved in the stress response and contribute to the circuit mechanisms mediating the effects of acute stress on sleep.

Highlights

- VGLUT3 expression identifies subsets of 5-HT and non-5-HT DR neurons activated by acute stress
- Selective activation of VGLUT3-expressing neurons in the DR modulates wake and REMS
- Reduced VGLUT3 expression in the DR attenuates stress-induced sleep perturbations
- VGLUT3 expression in 5-HT neurons exerts minimal influence on sleep



Henderson et al., 2024, Cell Reports 43, 114411  
 July 23, 2024 © 2024 The Authors. Published by Elsevier Inc.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.114411>



## Report

## Regulation of stress-induced sleep perturbations by dorsal raphe VGLUT3 neurons in male mice

Fiona Henderson,<sup>1</sup> Sylvie Dumas,<sup>2</sup> Giuseppe Gangarossa,<sup>3,4</sup> Véronique Bernard,<sup>1</sup> Marine Pujol,<sup>1</sup> Odile Poirel,<sup>1</sup> Nicolas Pietrancosta,<sup>1,5</sup> Salah El Mestikawy,<sup>1,6</sup> Stéphanie Dumas,<sup>1,7,\*</sup> and Véronique Fabre<sup>1,7,8,\*</sup><sup>1</sup>Sorbonne Université, CNRS UMR 8246, INSERM U1130 - Neuroscience Paris Seine - Institut de Biologie Paris Seine (NPS - IBPS), 75005 Paris, France<sup>2</sup>Oramacell, 75006 Paris, France<sup>3</sup>Université Paris Cité, CNRS, Unité de Biologie Fonctionnelle et Adaptative, 75013 Paris, France<sup>4</sup>Institut Universitaire de France (IUF), Paris, France<sup>5</sup>Sorbonne Université, CNRS UMR 7203, Laboratoire des BioMolécules, 75005 Paris, France<sup>6</sup>Department of Psychiatry, Douglas Mental Health University Institute, McGill University, Montréal, QC H4H 1R3, Canada<sup>7</sup>Senior author<sup>8</sup>Lead contact\*Correspondence: [stephanie.dumas@sorbonne-universite.fr](mailto:stephanie.dumas@sorbonne-universite.fr) (S.D.), [veronique.fabre@inserm.fr](mailto:veronique.fabre@inserm.fr) (V.F.)<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.114411>

## SUMMARY

Exposure to stressors has profound effects on sleep that have been linked to serotonin (5-HT) neurons of the dorsal raphe nucleus (DR). However, the DR also comprises glutamatergic neurons expressing vesicular glutamate transporter type 3 (DR<sup>VGLUT3</sup>), leading us to examine their role. Cell-type-specific tracing revealed that DR<sup>VGLUT3</sup> neurons project to brain areas regulating arousal and stress. We found that chemogenetic activation of DR<sup>VGLUT3</sup> neurons mimics stress-induced sleep perturbations. Furthermore, deleting VGLUT3 in the DR attenuated stress-induced sleep perturbations, especially after social defeat stress. In the DR, VGLUT3 is found in subsets of 5-HT and non-5-HT neurons. We observed that both populations are activated by acute stress, including those projecting to the ventral tegmental area. However, deleting VGLUT3 in 5-HT neurons minimally affected sleep regulation. These findings suggest that VGLUT3 expression in the DR drives stress-induced sleep perturbations, possibly involving non-5-HT DR<sup>VGLUT3</sup> neurons.

## INTRODUCTION

Acute stress leads to a transient and sustained increase in wake to ensure proper adaptive behaviors. Subsequently, it produces a delayed increase in sleep during the recovery period.<sup>1,2</sup> Among other structures, the dorsal raphe nucleus (DR) is involved in the stress response and stress-related psychiatric disorders, with a key role assigned to serotonin (5-HT) neurons.<sup>3,4</sup> Acute stress exposure produces a sustained release of 5-HT within DR-projecting brain areas,<sup>5–8</sup> which contributes to the delayed effects of stress on rapid eye movement sleep (REMS).<sup>5,9</sup> Accordingly, constitutive deletion of 5-HT-related genes has been associated with a blunted increase in REMS after exposure to acute restraint stress (RS).<sup>1,10</sup> However, these seminal studies have manipulated the 5-HT system without considering its cellular and neurochemical heterogeneity.<sup>11,12</sup> Recent studies have revealed the great diversity of 5-HT DR (DR<sup>5-HT</sup>) neurons in terms of cell types,<sup>13–15</sup> connectivity,<sup>16,17</sup> and/or electrophysiological properties.<sup>18–20</sup> In addition to 5-HT neurons, the DR also harbors GABA, dopamine (DA), and glutamate neurons.<sup>21</sup> Recently, considerable efforts have been dedicated to understanding the role of different subsets of DR neurons, with notable examples linked to stress and

emotional behaviors.<sup>17,22</sup> For instance, a subset of DR<sup>5-HT</sup> neurons that target the ventral tegmental area (VTA) influences susceptibility to social stress.<sup>23</sup> DA and GABA neurons of the DR have additionally been implicated in stress responses<sup>24,25</sup> and arousal.<sup>25,26</sup> Together, these studies suggest a model in which stress engages distinct DR neuronal populations to promote adaptive responses.

A neuronal population of the DR that has received less attention consists of neurons expressing the vesicular glutamate transporter type 3 (VGLUT3), conferring these neurons the ability to signal through glutamate.<sup>27–30</sup> Interestingly, VGLUT3 is also present in a subset of DR<sup>5-HT</sup> neurons, enabling glutamate co-transmission<sup>12</sup> and enhancing 5-HT vesicular filling through a process known as vesicular synergy.<sup>31–33</sup> VGLUT3 neurons of the DR (DR<sup>VGLUT3</sup>) are implicated in motivated behaviors,<sup>30,34–37</sup> feeding,<sup>38,39</sup> and neuropathic pain.<sup>40</sup> However, it is unknown whether DR<sup>VGLUT3</sup> neurons play a role in the regulation of sleep. Here, we examined the contribution of DR<sup>VGLUT3</sup> neurons in the stress response and stress-induced sleep perturbations by using conditional gene deletion and chemogenetics coupled with polygraphic sleep recordings. Additionally, potential targets were identified through conditional viral tracing and c-Fos immunolabeling.





## RESULTS

### Anatomical organization of DR<sup>VGLUT3</sup> neurons

In the raphe, expression of VGLUT3 defines restricted subsets of neurons, as revealed by the seminal study conducted by Hioki in the rat DR.<sup>41</sup> Co-expression profiles in 5-HT neurons vary across raphe nuclei, with the median raphe nucleus (MnR) showing higher levels of segregation between 5-HT and VGLUT3 neurons.<sup>12,42</sup> We thus systematically mapped the expression pattern of VGLUT3 mRNA in relation to 5-HT neurons in the anterior raphe nuclei by dual fluorescence *in situ* hybridization (FISH; Figures 1A, S1A, and S1B). Tryptophan hydroxylase type 2 (TPH2) mRNA was used as a 5-HT marker. We found that VGLUT3 neurons co-expressing TPH2 mRNA were mostly observed in the caudal (DRc) and ventral (DRv) parts of the DR (Figure 1B). Consistent with previous findings,<sup>41,42</sup> single-labeled VGLUT3 mRNA neurons were more prevalent in B9, MnR, the interpeduncular nucleus (IP), and the dorsal part of the DR, while the lateral wings of the DR contained few VGLUT3 mRNA-expressing neurons (Figures 1A and 1B).

Next, we generated a VGLUT3<sup>Cre</sup> mouse line (Figure 1C for visualizing Cre expression in DR<sup>VGLUT3</sup> neurons) to map DR<sup>VGLUT3</sup> projections by micro-injecting an adeno-associated virus (AAV) enabling Cre-dependent expression of the fluorescent protein tdTomato into their DR (AAV-Flex-tdTomato, Figures 1D, 1E, and S1C). DR<sup>VGLUT3</sup> neurons heavily projected to the diagonal band nucleus/magnocellular nucleus (NDB/MA), the cortex, the basolateral (BLA) and cortical amygdala, the submedial thalamic nucleus, the anterior pretectal nucleus, and the VTA (Figure 1F; Table S1). Projections were dense in the prelimbic cortex (PL), the nucleus accumbens (NAc), the locus coeruleus (LC), and the parabrachial nucleus (PB) (Figure 1F; Table S1). This projection pattern closely resembles the distribution of DR<sup>5-HT</sup> terminals within the mouse brain.<sup>16</sup> Additional immunostaining with 5-HT (Figures 1G and S1D) showed that the majority of DR<sup>VGLUT3</sup>-tdTomato fibers were 5-HT positive in the PL and NDB/MA, as previously found in the cortex.<sup>17</sup> Many DR<sup>VGLUT3</sup>-tdTomato fibers were 5-HT negative in the amygdala, VTA, PB, and LC despite dense 5-HT labeling, consistent with previous data in the amygdala<sup>17,29</sup> and VTA.<sup>16,35</sup> While being involved in several other functions, these structures regulate the stress responses<sup>14</sup> and/or promote wake,<sup>45</sup> suggesting that DR<sup>VGLUT3</sup> neurons may contribute to stress-induced arousal.

### Chemoactivation of DR<sup>VGLUT3</sup> neurons modulates vigilance states

To reveal which downstream target is functionally connected to DR<sup>VGLUT3</sup> neurons, we mapped c-Fos expression, a *bona fide* marker of molecular neuronal activity, after selective activation of DR<sup>VGLUT3</sup> neurons with the excitatory hM3(Gq) designer receptors exclusively activated by designer drugs (DREADDs; Figures 2A and 2B). Indeed, c-Fos expression, assessed 90 min after administration of the DREADD ligand clozapine N-oxide (CNO; 1 mg/kg, intraperitoneally) at zeitgeber time (ZT) 3, was significantly increased in the DR of mice expressing hM3(Gq) (VGLUT3-Gq) compared to mice expressing mCherry (VGLUT3-mCh; Figures 2C and 2D). Further analysis revealed increased c-Fos expression in the NAc, VTA, and PB of

VGLUT3-Gq compared to VGLUT3-mCh mice (Figures 2E and 2F), indicating functional connectivity of DR<sup>VGLUT3</sup> neurons to arousal-driving brain regions.<sup>46–48</sup> Accordingly, we analyzed vigilance states after CNO (1 mg/kg) or saline injections to VGLUT3-Gq and VGLUT3-mCh mice at ZT3 (Figures 2G and S2A). Across the first 3 h after injection in the light-inactive period (ZT3–ZT6), CNO increased wake amounts compared with saline-treated animals in VGLUT3-Gq mice (Figure 2H). In parallel, REMS amounts were decreased in CNO-treated VGLUT3-Gq mice compared with respective controls. This decrease was accounted for by a decrease in the number of state bouts (Table S2). Delayed effects included increased REMS amounts, at the expense of wake, during the first 6 h of the following dark-inactive period in CNO- compared with saline-injected VGLUT3-Gq mice due to a higher number of state bouts (Figure 2H; Table S2). Predominant targeting of the DR is further shown by mapping the injection sites in VGLUT3-Gq mice (Figures S2C and S2D). In a few mice, a sparse number of transduced cells was also observed in the upper part of the MnR.

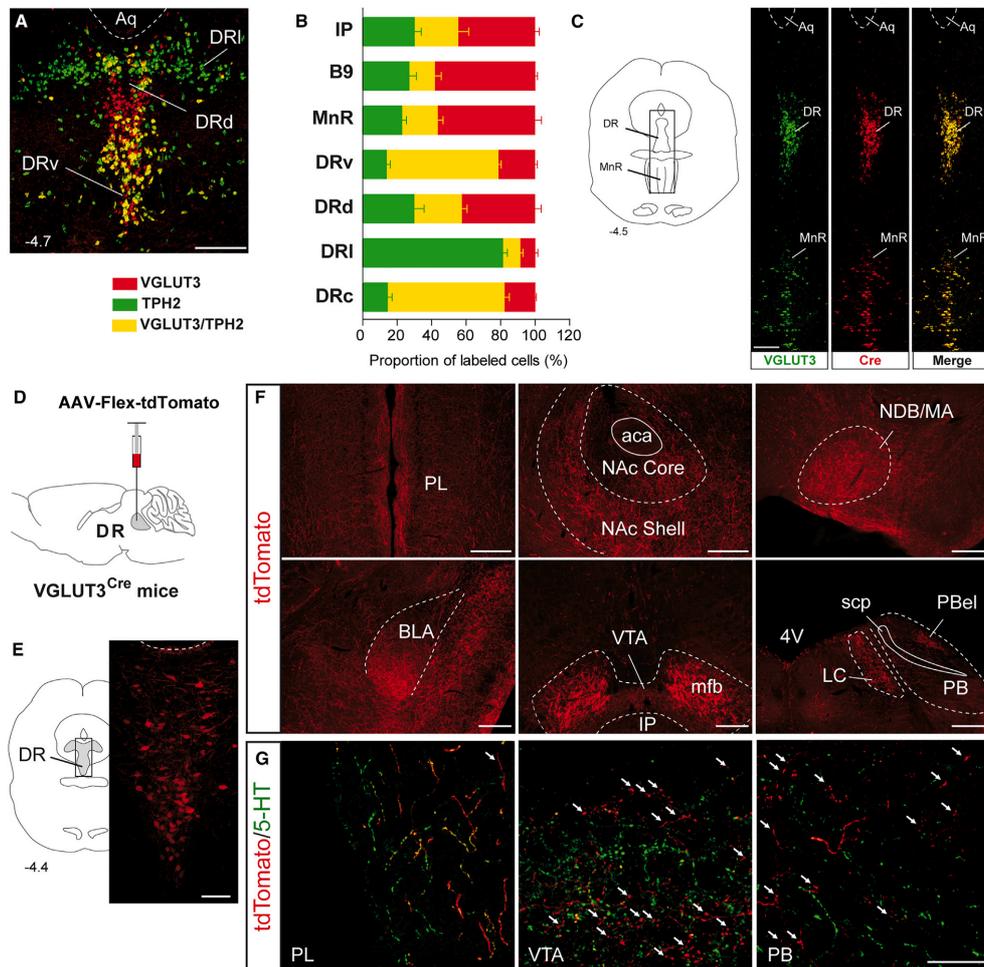
Given the involvement of the DR in thermoregulation,<sup>50</sup> we monitored skin and brown adipose tissue temperatures in VGLUT3-mCh and VGLUT3-Gq mice before and 3 h after CNO injection (Figure S2B). No significant modifications were observed, suggesting that the sleep changes induced by chemoactivation are unlikely to be associated with changes in energy expenditure.

### DR<sup>VGLUT3</sup> neurons are involved in the stress response

Chemoactivation of DR<sup>VGLUT3</sup> neurons at ZT3 mimics sleep-wake effects observed after acute social defeat (SD) stress during the light-inactive period.<sup>2,51</sup> Consequently, we investigated the role of DR<sup>VGLUT3</sup> neurons in mediating SD-induced sleep perturbations.

SD (25 min session ending at ZT3) increased the activity of DR<sup>VGLUT3</sup> neurons (Figures 3A–3C), including both 5-HT and non-5-HT types (Figures 3D and 3E). The VTA receives dense innervation from DR<sup>VGLUT3</sup> neurons and is a key node for mediating SD-induced sleep changes.<sup>52</sup> We therefore evaluated whether DR<sup>VGLUT3</sup> neurons projecting to the VTA were activated by SD. To identify VTA-projecting DR<sup>VGLUT3</sup> neurons, a retrograde AAV enabling the conditional expression of the green fluorescence protein (GFP) was injected into the VTA of VGLUT3<sup>Cre</sup> mice (Figures 3F and 3G). Consistent with earlier findings,<sup>35,41,53</sup> we identified GFP neurons in the DRv and the ventral part of the DRc, the IP, and the MnR. VTA-projecting DR<sup>VGLUT3</sup> neurons, mainly those that are non-5-HT, were activated by SD (Figures 3H–3J).

Next, we investigated the impact on sleep of VGLUT3 deletion mediated by AAV-Cre-EGFP injection in the DR of VGLUT3<sup>lox/lox</sup> mice (+Cre; Figure 3K). VGLUT3 mRNA expression was significantly reduced in the DR (Figures 3L and 3M) and the MnR (52% ± 9%; data not shown) of +Cre mice compared with –Cre controls, while TPH2 mRNA expression remained unaffected (Figure 3L). Then, we examined the impact of VGLUT3 deletion on sleep-wake states. At baseline, +Cre mice spent more time in non-REMS (NREMS) and less time in wake during the dark-active period compared with –Cre mice (Figure S3A; Table S3). The consequences of SD were evaluated in +Cre



**Figure 1. Distribution and projections of DR<sup>VGLUT3</sup> neurons**

(A and B) Representative image (A) and quantification (B) of cells expressing VGLUT3, TPH2, and both mRNAs in mouse anterior raphe nuclei. Data (mean  $\pm$  SEM) are expressed as a percentage over the total number of VGLUT3-cells ( $n = 3$ ).

(C) Distribution of cells expressing VGLUT3, Cre, and both (merged image) mRNAs in the anterior raphe nuclei of VGLUT3<sup>Cre</sup> mice.

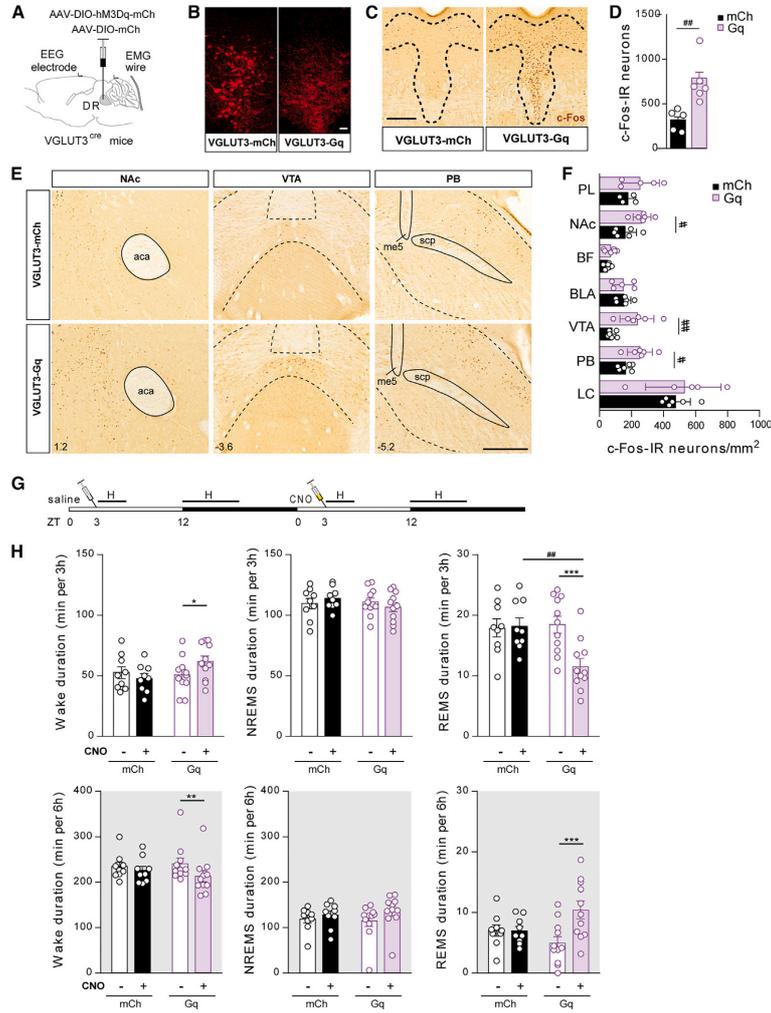
(D) Schematic of virus injection.

(E) Image showing tdTomato (red) expression in the DR of VGLUT3<sup>Cre</sup> mice.

(F) Anterolabeled terminals (red) are present in the PL, NAc shell, NDB/MA, BLA, VTA, LC, and PB nuclei.

(G) 5-HT immunolabeling (green), tdTomato anterolabeled (red), and double-labeled (yellow) terminals in the PL, VTA, and PB of VGLUT3<sup>Cre</sup> mice. White arrows: single tdTomato anterolabeled terminals. Coronal sections were adapted from the stereotaxic atlas.<sup>43</sup> Distance from bregma is indicated in mm.<sup>43</sup>

Scale bars: 250  $\mu$ m in (A), 150  $\mu$ m in (C), 100  $\mu$ m in (E), 300  $\mu$ m in (F), and 25  $\mu$ m in (G).



**Figure 2. Chemogenetic activation of DR<sup>VGLUT3</sup> neurons modulates wake and REMS**

(A) Schematic of virus injection and electrode implantation.

(B) Representative images showing mCherry (red) expression in the DR of VGLUT3-Gq and VGLUT3-mCh mice.

(C and D) Representative images (C) and quantification (D) of c-Fos-immunoreactive (C-Fos-IR) cells in the DR of VGLUT3-Gq (Gq;  $n = 6$ ) and VGLUT3-mCh (mCh;  $n = 5$ ) mice after CNO injection.

(E and F) Representative images (E) and quantification (F) of c-Fos-IR cells in brain areas of interest of VGLUT3-Gq (Gq;  $n = 6$ ) and VGLUT3-mCh (mCh;  $n = 5$ ) mice after CNO injection. Distance from bregma is indicated in mm.<sup>49</sup>

(G) Experimental design. Letters above the horizontal bars represent the time window analyzed in (H).

(H) State amounts during the first 3 h (top) and the first 6 h of the dark period (bottom) following saline (-) or CNO (+) injections at ZT3 in hM3Dq-expressing (Gq;  $n = 11$ ) and control (mCh;  $n = 9$ ) mice.

Scale bars: 50  $\mu\text{m}$  in (B), 250  $\mu\text{m}$  in (C), and 300  $\mu\text{m}$  in (E). Data represent the mean  $\pm$  SEM. Post hoc comparisons: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$  for CNO effects; # $p < 0.05$  and ## $p < 0.01$  for group effects. See also Table S6.

and  $-Cre$  mice (Figures S3N and S3B). In control mice, SD elicited an immediate and robust increase in wake amounts and a concomitant decrease in NREMS and REMS amounts (ZT3–ZT6 of the light-inactive period; Figure 3O). These changes were mainly accounted for by changes in bout mean duration (Table S4). During the subsequent dark-active period (ZT12–ZT0),  $-Cre$  mice exhibited increased REMS amounts following SD resulting from an increased number of bouts (Figure 3O; Table S4). Strikingly, a clear phenotype emerged after SD. Short-term wake enhancement elicited by SD was attenuated in  $+Cre$  mice (Figure 3O). Moreover,  $+Cre$  mice lacked the REMS sleep rebound elicited by SD in the following dark-active period (Figure 3O). This sleep phenotype, likely linked to DR neurons, suggests a role for VGLUT3 in both SD-mediated immediate wake promotion (at the expense of NREMS) and delayed REMS facilitation, although MnR involvement cannot be discounted.

RS is a common model used in rodents, engaging similar circuits as SD.<sup>54</sup> RS at the end of the light-inactive period enhances sleep during the subsequent dark-active period, primarily affecting REMS through the DR and the 5-HT system.<sup>1,5,10,55</sup> Consequently, we investigated DR<sup>VGLUT3</sup> neuron activity in response to RS (Figure 4A), finding increased c-Fos expression (Figures 4B and 4C) in both 5-HT and non-5-HT DR<sup>VGLUT3</sup> neurons (Figures 4D and 4E). We next tested the impact of RS on sleep and wake in mice with AAV-Cre-mediated deletion of VGLUT3 expression in the DR (Figure 4F). In  $-Cre$  mice, RS applied at the end of the light-inactive period produced an increase in sleep amounts throughout the following dark-active period (Figures 4G and S3C). Notably, REMS amounts were enhanced by  $\sim 2$ -fold as a result of an increase in both the number and mean duration of REMS bouts (Table S4). After RS,  $+Cre$  mice exhibited more REMS compared to the sham condition (Figure 4G). However, analysis of delta changes suggests that RS affected REMS differently across groups, with  $+Cre$  mice exhibiting a reduced REMS rebound (Figure 4G). In addition,  $+Cre$  mice exhibited more REMS compared to  $-Cre$  mice in the sham condition (Figure 4G). This could have been a consequence of the experimental paradigm, in which mice were gently woken up in the sham condition (see STAR Methods).

Psychological stressors trigger a rapid increase in body temperature through VGLUT3 neurons.<sup>56,57</sup> However, skin temperature measurements after SD and RS showed stress-induced hyperthermia in both  $-Cre$  and  $+Cre$  mice (Figure S4). This suggests that stress-induced sleep perturbations in  $+Cre$  mice occurred independently of the potentially confounding effects of body temperature.

#### VGLUT3 in 5-HT neurons has limited effects on vigilance states

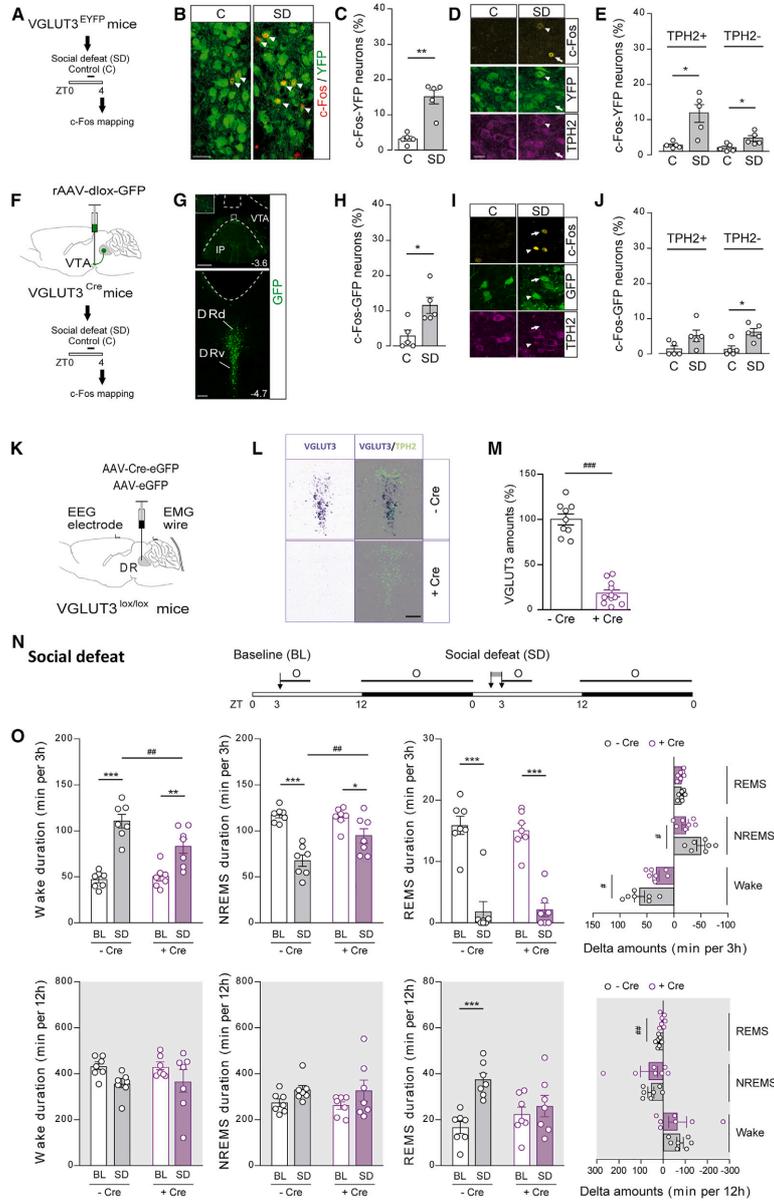
Considering the key role of 5-HT neurons in sleep-wake regulation,<sup>58</sup> we investigated the impact of VGLUT3 in these neurons by generating mice lacking VGLUT3 in 5-HT neurons. Mice expressing Cre recombinase under the control of the serotonin transporter (SERT) promoter were crossed with VGLUT3<sup>lox/lox</sup> mice (SERT<sup>VGLUT3.cKO</sup>, where cKO is conditional knockout) (Figure 5A). Validation confirmed specific Cre-mediated deletion of VGLUT3 in 5-HT neurons (Figures 5B and S5). In

SERT<sup>VGLUT3.cKO</sup> mice, DR neurons expressed either TPH2 mRNA or VGLUT3 mRNA, but co-labeled neurons (as observed in control SERT<sup>Cre</sup> mice) were not detected. Next, sleep-wake patterns were analyzed in SERT<sup>VGLUT3.cKO</sup> mice and control (VGLUT3<sup>lox/lox</sup> and SERT<sup>Cre</sup>) mice. VGLUT3 deletion in 5-HT neurons did not alter sleep-wake amounts at baseline (Figure S6; Table S3). Then, we assessed the consequences of chemoactivation of DR<sup>5-HT</sup> neurons with or without VGLUT3. AAV-DIO-hM3(Gq)-mCh or AAV-DIO-mCh was injected into the DR of SERT<sup>Cre</sup> (SERT-Gq and SERT-mCh) and SERT<sup>VGLUT3.cKO</sup> (SERT<sup>VGLUT3.cKO</sup>-Gq and SERT<sup>VGLUT3.cKO</sup>-mCh) mice (Figure 5A). Sleep-wake states were analyzed after administration of CNO or saline at ZT3 (Figure 5C). As reported by others,<sup>59,60</sup> we observed non-specific effects of CNO on REMS in SERT-mCh and SERT<sup>VGLUT3.cKO</sup>-mCh mice (Figure 5D). However, the use of non-DREADD-expressing control groups has enabled comparisons with DREADD-expressing groups to identify the effects of chemoactivation of DR<sup>5-HT</sup> neurons. These off-target CNO effects were absent in VGLUT3<sup>Cre</sup> mice (Figure 2), possibly due to genetic background differences (see STAR Methods).

NREMS amounts increased in the 3 h post-CNO injection compared with saline injection in SERT-Gq mice, while REMS amounts decreased significantly compared to saline injection and with CNO-treated SERT-mCh mice (Figures 5D and S7A). These effects were due to the longer mean duration of NREMS bouts and fewer REMS bouts, respectively (Table S2). Similar immediate effects were observed in SERT<sup>VGLUT3.cKO</sup> mice after chemoactivation of DR<sup>5-HT</sup> neurons (Figure 5D, S7B, and S7C). During the first 6 h of the following dark-active period, CNO did not alter sleep-wake states in SERT-Gq mice (Figures 5D and S7A; Table S2). In SERT<sup>VGLUT3.cKO</sup>-Gq mice, CNO induced a significant increase in wake amounts at the expense of NREMS compared with saline injection and had a limited impact on REMS amounts (Figures 5D and S7B). Thus, chemoactivation of DR<sup>5-HT</sup> neurons had a delayed impact on wake and NREMS in SERT<sup>VGLUT3.cKO</sup> mice only (Figure S7D). These results collectively suggest that VGLUT3 in 5-HT neurons plays a limited role in sleep regulation, a role that becomes apparent solely during the dark-active period following chemoactivation of DR<sup>5-HT</sup> neurons.

Because RS produces a delayed increase in REMS that depends on the DR serotonergic system,<sup>55</sup> SERT<sup>VGLUT3.cKO</sup> mice and their respective controls were subjected to RS (Figures 5E and S8; Table S5). After RS, SERT<sup>VGLUT3.cKO</sup> mice showed enhanced NREMS and REMS during the following dark-active period, as observed in control groups (Figure 5F). VGLUT3 is also expressed by subsets of GABA and cholinergic neurons.<sup>33,61</sup> We then evaluated the impact of RS in cKO mice lacking VGLUT3 in GABA or cholinergic neurons (Figures S9; Table S5). No differences were observed in the sleep-promoting effects of RS in cKO mice compared with their respective controls. Together, these results suggest that VGLUT3 expression in 5-HT, GABA, or cholinergic neurons does not contribute to sleep-wake regulation after RS.

Beyond their role in sleep regulation, VGLUT3 and 5-HT neurons have been identified as modulators of various functions, including anxiety and locomotion.<sup>12,32,38</sup> Consequently, we conducted behavioral assessments across our different models and



(legend on next page)

found that expression of VGLUT3 in DR or DR<sup>VGLUT3</sup> neuron activation does not affect anxiety-like behaviors and locomotor activity (Figure S10).

## DISCUSSION

Emotional events, especially stress, influence sleep-wake patterns. Our results suggest that DR<sup>VGLUT3</sup> neurons are involved in mediating acute stress-induced sleep perturbations. Chemoduction of DR<sup>VGLUT3</sup> neurons promotes wakefulness by inhibiting REMS and subsequently promoting REMS, resembling stress-like effects. Further, reduced VGLUT3 expression mediated by AAV-Cre injection in the DR leads to compromised stress-induced sleep changes. Our data align with previous studies demonstrating VGLUT3 expression in subsets of 5-HT and non-5-HT neurons in the raphe nuclei.<sup>41,42,62</sup> Both types of DR<sup>VGLUT3</sup> neurons are activated by stressors and project to PB, VTA, and NAc nuclei. Additional loss-of-function experiments suggest a minimal contribution of VGLUT3 in 5-HT neurons to sleep regulation. These findings suggest that non-5-HT VGLUT3 neurons, especially in the DR, modulate stress-induced sleep perturbations likely through mechanisms involving downstream structures that regulate emotional arousal and sleep recovery.

### VGLUT3 in the DR modulates the stress response

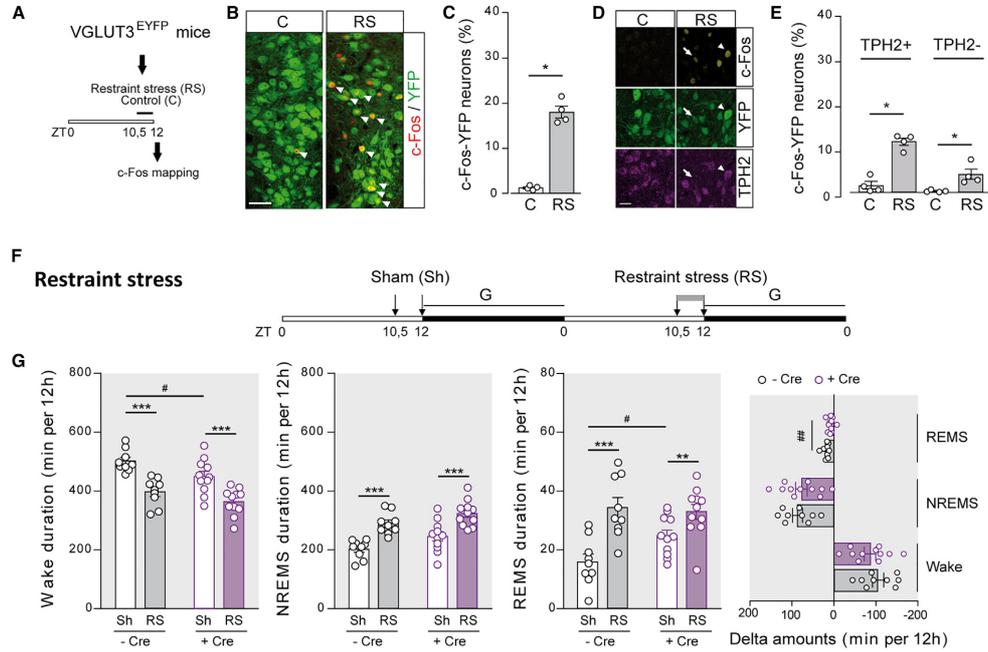
In animals, arousal is an initial response to stress, and it seems to be regulated by VGLUT3 in the DR. Reduced VGLUT3 expression mediated by AAV-Cre injection in the DR was sufficient to attenuate arousal elicited by social stress. However, we could not assess this response after RS, as it did not induce arousal, likely due to differences in timing (ZT3 for SD versus ZT10.5 for RS) and/or duration of stressors (25 min for SD versus 90 min for RS), since both factors influence the sleep response to stress.<sup>2,52,63,64</sup> Results from social stress, coupled with reduced wake at baseline in mice lacking VGLUT3 in the DR and

increased wake after activating DR<sup>VGLUT3</sup> neurons, support their role in wake promotion. Previous studies also suggest that most DR neurons are wake promoting<sup>25,26,45,58</sup> and responsive to emotionally salient stimuli.<sup>25,65–69</sup> In agreement, we found that DR<sup>VGLUT3</sup> neurons are activated by stress, including both 5-HT and non-5-HT DR<sup>VGLUT3</sup> neurons. Together, these independent observations suggest that groups of DR neurons could promote arousal when a salient stimulus, such as facing a stressor, is perceived in the environment.

The initial stress response is followed by an increase in sleep during the subsequent dark-active period. Our results suggest that DR<sup>VGLUT3</sup> neurons are involved in the delayed increase of sleep, particularly after exposure to social stress. Therefore, reduced VGLUT3 expression mediated by AAV-Cre injection in the DR dampens the delayed increase in REMS elicited by acute stress. This long-lasting impact of DR<sup>VGLUT3</sup> neurons on sleep is also supported by our chemogenetic experiments showing that activation of DR<sup>VGLUT3</sup> neurons produces a delayed increase in REMS amounts. In rodents, sleep enhancement is commonly observed in response to psychological stressors, SD,<sup>51,52,64,70</sup> or RS<sup>10,63,71–73</sup> and is not the sole consequence of the sleep loss associated with the stress procedure.<sup>51,72</sup> Strikingly, SD<sup>51,52,64,70</sup> or RS<sup>10,63,71–73</sup> trigger sleep enhancement independently of the stress schedule used. This highlights the crucial role of sleep in the stress response, supported by studies showing the beneficial effects of stress-induced sleep enhancement.<sup>74</sup> Conversely, sleep deprivation after social stress has negative effects on emotional behaviors.<sup>52,75,76</sup> It is therefore likely that the function of sleep after stress is to restore emotional reactivity, as proposed for REMS, which is thought to play an important role in processing emotional experiences<sup>77–79</sup> and potentiated fear responses.<sup>80,81</sup> DR<sup>VGLUT3</sup> neurons may thus facilitate sleep-dependent adaptations to aversive experiences. Interestingly, constitutive VGLUT3 KO mice exhibit anxiety-like behavior,<sup>32</sup> innate fear,<sup>82</sup> and impaired fear memory.<sup>83</sup> Further research is needed to determine whether animals with VGLUT3 loss of

**Figure 3. DR<sup>VGLUT3</sup> neurons contribute to the response to SD stress**

(A) Experimental design for c-Fos immunolabeling.  
 (B and C) Representative images (B) and quantification (C) of c-Fos immunolabeling in DR<sup>VGLUT3</sup> neurons (c-Fos-YFP) after social defeat (SD) or in control (C) condition. White arrowheads: c-Fos/VGLUT3-positive neurons. Scale bar: 50  $\mu$ m.  $n = 5$ .  
 (D and E) Representative images (D) and quantification (E) of c-Fos immunolabeling in DR<sup>VGLUT3</sup> neurons (c-Fos-YFP) expressing (+) or not (–) TPH2 after SD or in control (C) condition. White arrowheads: triple c-Fos/TPH2/VGLUT3-positive neuron. White arrows: dual c-Fos/VGLUT3-positive neuron. Scale bar: 50  $\mu$ m.  $n = 5$ .  
 (F) Experimental design for c-Fos immunolabeling in DR<sup>VGLUT3</sup> neurons projecting to the VTA.  
 (G) Representative images showing rAAV-dlox-GFP injection site in the VTA (top, scale bar: 150  $\mu$ m, the framed region corresponds to the inset in the left corner of the image) and GFP-expressing cells in the DR (bottom, scale bar: 100  $\mu$ m) of VGLUT3<sup>Cre</sup> mice.  
 (H) Quantification of c-Fos immunolabeling in VTA-projecting DR<sup>VGLUT3</sup> neurons (c-Fos-GFP) after SD stress or in control (C) condition.  $n = 5$ .  
 (I and J) Representative images (I) and quantification (J) of c-Fos immunolabeling in VTA-projecting DR<sup>VGLUT3</sup> neurons (c-Fos-GFP) expressing (+) or not (–) TPH2 after SD or in control (C) condition. White arrowheads: triple c-Fos/TPH2/VGLUT3-positive neuron. White arrows: dual c-Fos/VGLUT3-positive neuron. Scale bar: 50  $\mu$ m.  $n = 5$ .  
 (K) Schematic of virus injection and electrode implantation.  
 (L) Representative image of the DR showing VGLUT3 (blue, bright field) and TPH2 (green, fluorescence) mRNAs in the DR of control (–Cre) and conditional knockout (+Cre) mice detected by dual ISH. Scale bar: 200  $\mu$ m.  
 (M) Percentage of VGLUT3 mRNA expression in the DR of control (–Cre, black;  $n = 9$ ) and conditional knockout (+Cre, purple,  $n = 11$ ) mice.  
 (N) Experimental design. Letters above the horizontal bars represent the time windows analyzed in (O).  
 (O) State amounts during the first 3 h (top) and 12 h of the dark period (bottom) at baseline (BL) and after acute SD stress in control (–Cre,  $n = 7$ ) and conditional knockout (+Cre,  $n = 7$ ) mice. Delta amounts: difference between state amounts in SD and BL conditions. Data represent the mean  $\pm$  SEM. Post hoc comparisons: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$  for stress effects; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , and ### $p < 0.001$  for group effects.  
 See also Table S6.



**Figure 4. DR<sup>VGLUT3</sup> neurons contribute to the response to RS**

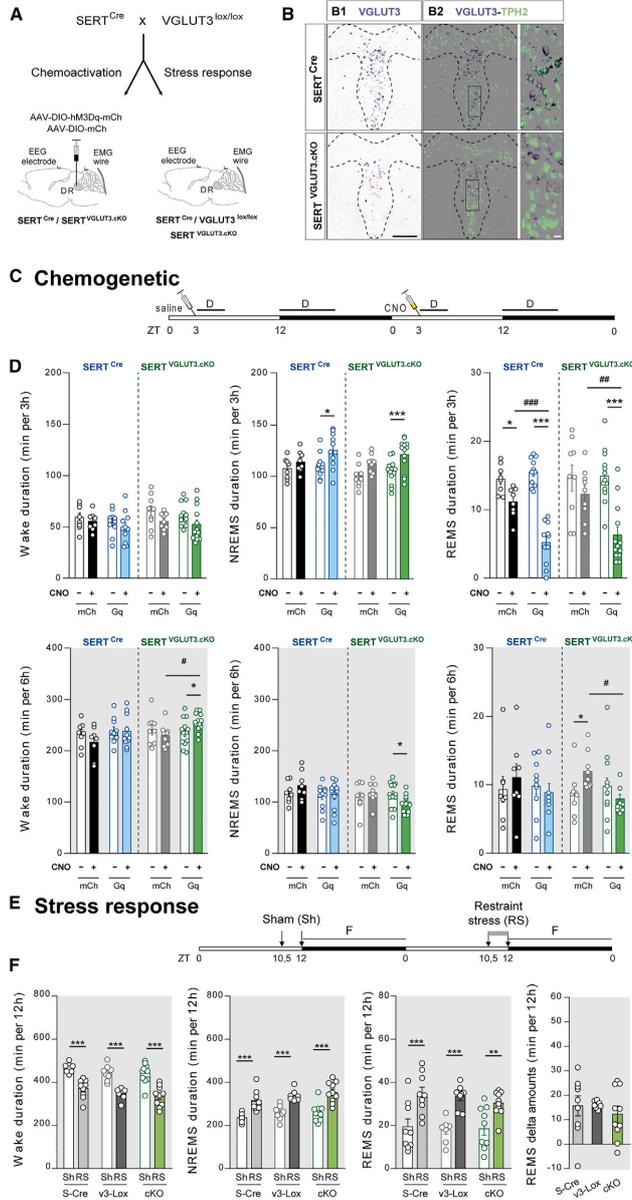
(A) Experimental design for c-Fos immunolabeling. (B and C) Representative images (B) and quantification (C) of c-Fos immunolabeling in DR<sup>VGLUT3</sup> neurons (c-Fos-YFP) after restraint stress (RS) or in control (C) condition. White arrowheads: c-Fos/VGLUT3-positive neurons. Scale bar: 50  $\mu$ m.  $n = 4$ . (D and E) Representative images (D) and quantification (E) of c-Fos immunolabeling in DR<sup>VGLUT3</sup> neurons (c-Fos-YFP) expressing (+) or not (-) TPH2 after RS or in control (C) condition. White arrowheads: triple c-Fos/TPH2/VGLUT3-positive neuron. White arrows: dual c-Fos/VGLUT3-positive neuron. Scale bar: 50  $\mu$ m.  $n = 4$ . (F) Experimental design. Letters above the horizontal bars represent the time window analyzed in (G). (G) State amounts during the first 12 h following sham (Sh) or acute RS in control (-Cre,  $n = 9$ ) and conditional knockout (+Cre,  $n = 11$ ) mice. Delta amounts: difference between state amounts in RS and Sh conditions. Data represent the mean  $\pm$  SEM. Post hoc comparisons: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$  for stress effects; # $p < 0.05$  and ## $p < 0.01$  for group effects. See also Table S6.

function in the DR are more susceptible to developing anxiety- and depression-like behaviors in response to stress and/or sleep disturbances.

#### Role of VGLUT3 expression in 5-HT neurons in the modulation of sleep-wake states

The DR contains distinct populations of neurons,<sup>21,84</sup> including non-5-HT and 5-HT neurons, with VGLUT3 expression observed in both types (Figure 1).<sup>15,17,41</sup> In 5-HT neurons, VGLUT3 enables glutamate co-release from 5-HT terminals, as shown in the VTA,<sup>23,30,36</sup> amygdala,<sup>29</sup> and olfactory bulb.<sup>28</sup> While a few studies have shown the involvement of glutamate co-release in reward,<sup>30,36</sup> little is known about the behavioral consequences of VGLUT3 expression in DR<sup>5-HT</sup> neurons. Given their role in sleep-wake regulation,<sup>58</sup> some effects of manipulating VGLUT3 neurons may involve DR<sup>5-HT</sup>

neurons. To probe this hypothesis, we used mice with VGLUT3 deletion in SERT neurons. We found that chemoactivation of DR<sup>5-HT</sup> neurons had major effects on REMS that are independent from the presence of VGLUT3. This was further supported by the finding that deletion of VGLUT3 in 5-HT neurons does not impact sleep-wake amounts at baseline or after RS. From these experiments, we concluded that 5-HT neurons likely regulate sleep-wake states by signaling through 5-HT. Similarly, a prominent role for 5-HT over glutamate signaling has been reported in the amygdala during fear processing.<sup>85</sup> Independent of sleep regulation, the involvement of 5-HT-positive DR<sup>VGLUT3</sup> neurons in the stress response is supported by their activation following acute stress and a recent study indicating that mutant mice lacking VGLUT3 in 5-HT neurons exhibit heightened active coping behavior in response to swim stress.<sup>86</sup>



**Figure 5. VGLUT3 expression in 5-HT neurons is not essential for sleep modulation**

(A) Conditional knockout ( $SERT^{VGLUT3.cKO}$ ) mice are generated by crossing  $SERT^{Cre}$  and  $VGLUT3^{lox/lox}$  mice. Schematic of viral injection and electrode implantation strategies for assessing sleep response to chemoactivation of  $DR^{5-HT}$  neurons or stress.

(B) Validation of VGLUT3 mRNA deletion in 5-HT neurons in  $SERT^{VGLUT3.cKO}$  mice. VGLUT3 mRNA expression (blue, bright-field ISH, B1) and combined VGLUT3 (blue, bright-field ISH) and TPH2 (green, FISH) mRNA expression (B2) in the DR of control ( $SERT^{Cre}$ , top) and conditional knockout ( $SERT^{VGLUT3.cKO}$ , bottom) mice. Scale bar: 250  $\mu$ m. Boxed areas in (B2) are magnified on the right. Double-labeled neurons (pointed at by a black arrowhead) are not observed in  $SERT^{VGLUT3.cKO}$  mice. Scale bar: 25  $\mu$ m.

(C) Experimental design. Letters above the horizontal bars represent the time windows analyzed in (D).

(D) State amounts during the first 3 h (top) or during the first 6 h of the dark period (bottom) following saline (-) or CNO (+) injections in (1) control (mCh)  $SERT^{Cre}$  (black,  $n = 8$ ) and  $SERT^{VGLUT3.cKO}$  ( $n = 9$ ) mice and (2) hm3Dq-expressing (Gq)  $SERT^{Cre}$  ( $n = 11$ ) and  $SERT^{VGLUT3.cKO}$  ( $n = 13$ ) mice. Data represent the mean  $\pm$  SEM. Post hoc comparisons: \* $p < 0.05$  and \*\*\* $p < 0.001$  for CNO effects; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , and ### $p < 0.001$  for group effects. See also Table S6.

(E) Experimental design. Letters above the horizontal bars represent the time window analyzed in (F).

(F) State amounts during the first 12 h following Sh or acute RS in  $SERT^{Cre}$  (S-Cre;  $n = 9$ ),  $VGLUT3^{lox/lox}$  (v3-Lox;  $n = 8$ ), and  $SERT^{VGLUT3.cKO}$  (cKO;  $n = 10$ ) mice. Delta amounts: difference between REMS amounts in RS and Sh conditions. Data represent the mean  $\pm$  SEM. Post hoc comparisons: \* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  for stress effects. See also Table S6.



Our experiments suggest a role for non-5-HT DR<sup>VGLUT3</sup> neurons in sleep regulation. Accordingly, wake-active non-5-HT neurons are distributed throughout the DR,<sup>87</sup> including the dorsal part, where many non-5-HT DR<sup>VGLUT3</sup> neurons are found. However, expression of VGLUT3 in the DR is not reduced to the same extent in +Cre mice (–80%) and SERT<sup>VGLUT3.cKO</sup> mice (–50%, in agreement with results of dual FISH). This difference may explain why the two models differ in their stress responses. Additionally, AAV-Cre injection into the DR affects VGLUT3 expression not only in the DR (–80%) but also in the MnR (–50%). This suggests that the observed effects may also involve MnR neurons. However, these neurons are not activated by RS (Figure S11). While the influence of MnR neurons on sleep-wake patterns remains scarcely explored and cannot be discounted, they are implicated in emotional behaviors.<sup>88,89</sup>

We also observed that DR<sup>5-HT</sup> and DR<sup>VGLUT3</sup> neurons can exert cell type-specific modulation on sleep-wake states. Using chemogenetics, we found that DR<sup>VGLUT3</sup> neurons enhance wake amounts and subsequently promote REMS, whereas chemoactivation of DR<sup>5-HT</sup> neurons primarily promotes NREMS without delayed effects. The functional diversity within the DR is further supported by electrophysiological studies showing heterogeneous activity patterns of neurons based on their neurotransmitter released<sup>18</sup> or sleep-wake states.<sup>87,90</sup> In the MnR of anesthetized rats, non-5-HT VGLUT3 neurons exhibit more sustained responses to sensory stimuli compared to 5-HT neurons.<sup>62</sup> Heterogeneity is further revealed by optogenetic studies showing that inhibition of DR<sup>5-HT</sup> neurons or DR<sup>VGLUT3</sup> neurons prior to the conditioning has an opposite impact on cocaine-induced place preference.<sup>37</sup> However, it is important to note that both populations can also have synergistic actions. Thus, we found that chemogenetic activation of DR<sup>5-HT</sup> neurons and/or DR<sup>VGLUT3</sup> neurons decreased REMS amounts. Overall, our chemogenetic approaches suggest that DR<sup>5-HT</sup> and DR<sup>VGLUT3</sup> neurons have complex and partially opposite roles in sleep regulation.

#### Downstream targets of DR<sup>VGLUT3</sup> neurons involved in sleep regulation

Using conditional viral tracing, we observed DR<sup>VGLUT3</sup> neuron terminals in multiple brain structures implicated in the regulation of sleep including the medial pre-frontal cortex, NAc, basal forebrain, BLA, VTA, PB, and LC.<sup>47,91–95</sup> By mapping c-Fos expression following chemoactivation of DR<sup>VGLUT3</sup> neurons, we identified increased activity in the NAc, VTA, and PB. Elevated PB activity may mediate wakefulness elicited by DR<sup>VGLUT3</sup> neurons, as local deletion of VGLUT2 reduces wake amounts in mice.<sup>46,96</sup> The VTA houses neuronal populations with opposite roles in sleep-wake regulation: dopaminergic and glutamatergic/nitric neurons promote wakefulness, while somatostatin/GABAergic neurons induce sleep.<sup>47,97</sup> Notably, VTA somatostatin/GABAergic neurons facilitate sleep recovery after social stress,<sup>52</sup> suggesting that they may be key targets of DR<sup>VGLUT3</sup> neurons. Our findings also suggest that DR<sup>VGLUT3</sup> neurons projecting to the VTA, particularly non-5-HT ones, are activated by social stress, further implicating them in stress responses. In addition, VTA neurons promote wake through projections to the NAc, which is functionally targeted by DR<sup>VGLUT3</sup> neurons. In the NAc, neurons that express the adenosine A<sub>2A</sub> receptor or the

DA D1 receptor promote NREMS or behavioral arousal, respectively.<sup>48,91</sup> Thus, the PB, VTA, and NAc could represent the potential mediators of a network involving DR<sup>VGLUT3</sup> neurons. This hypothesis is coherent with the presence of many 5-HT-negative terminals originating from DR<sup>VGLUT3</sup> neurons and the role we propose for non-5-HT DR<sup>VGLUT3</sup> neurons in driving stress-induced sleep changes.

#### Limitations of the study

Our findings suggest a role for non-5-HT DR<sup>VGLUT3</sup> neurons in stress-induced sleep perturbations. However, we inhibited VGLUT3 expression in both 5-HT and non-5-HT neurons, as well as solely in 5-HT neurons. Targeted manipulation of non-5-HT DR<sup>VGLUT3</sup> neurons through intersectional strategy is warranted to confirm their role in sleep-wake regulation. Additionally, it is crucial to assess the impact of our viral strategy on the MnR, which contains a high number of non-5-HT VGLUT3 neurons. Pathway-specific genetic and neuronal manipulations can help differentiate the contributions of the DR versus the MnR. Furthermore, the precise mechanisms underlying stress-induced sleep perturbations by VGLUT3 neurons remain incompletely understood. To gain further insights, manipulating VGLUT3 terminals in functionally connected brain regions like the VTA could provide valuable information.

#### STAR+METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- RESOURCE AVAILABILITY
  - Lead contact
  - Materials availability
  - Data and code availability
- EXPERIMENTAL MODEL AND STUDY PARTICIPANT DETAILS
  - Ethical issues
  - Animals
  - Viral vectors
- METHOD DETAILS
  - Experimental design
  - Stereotaxic AAV injection
  - EEG and EMG surgical procedures
  - Pharmacogenetic manipulation
  - Stress protocols
  - Sleep/wake monitoring
  - Infrared thermography
  - Behavioral tests
  - Anatomical validation of AAV injections
  - *In situ* hybridization (ISH)
  - Immunohistochemistry (IHC)
  - Nomenclature and abbreviations
- QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS
  - Sleep analysis
  - Image acquisition and processing
  - Quantification of labeling
  - Statistics

#### SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.114411>.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank the IBPS Behavioral Core Facility for excellent technical assistance and especially Marine Robouam and Jean Vincent; Stéphane Fouquet, David Godefroy, and Marie-Laure Niepon of the Imaging Facility at Institut de la Vision (Sorbonne Université); Susanne Bolte, Jean-François Gilles, and France Lam from the Photon Microscopy Facility of the Institut de Biologie Paris-Seine (Sorbonne Université); Sébastien Parnaudeau for lending us the CD1 aggressors; and undergraduate students Hugo Bonnefou, Eleonore Hardy, Juliette Kallaydjian, Khadija Laurent-Haond, and Kévin Milliet for technical help. We thank Patricia Gaspar and Thierry Galopin for the stimulating discussions we had throughout this project. We thank BioRender for their assistance in creating the graphical abstract. This research was supported by funds from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Centre National de la Recherche Scientifique, Sorbonne Université et Fédération pour la Recherche sur le Cerveau (FRC 2016; Le Sommeil et les Rythmes Circadiens). F.H. has benefited from support by the Investissements d'Avenir program managed by the ANR under reference ANR-11-IDEX-0004-02 (Laboratoire d'Excellence de Biologie pour la Psychiatrie, Bio-Psy) and the Société Française de Recherche et Médecine du Sommeil (SFRMS). These funders had no role in the study design, data collection, and analysis, decision to publish, and preparation of the manuscript.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, F.H., V.F., S.E.M., and S.D.; formal analysis, F.H., V.B., and V.F.; funding acquisition, N.P., S.D., S.E.M., and V.F.; investigation, F.H., S.D., O.P., G.G., V.B., M.P., N.P., S.D., S.E.M., and V.F.; writing – original draft, F.H. and V.F.; writing – review & editing, F.H., S.D., G.G., V.B., N.P., S.D., S.E.M., and V.F.;

#### DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

#### DECLARATION OF GENERATIVE AI AND AI-ASSISTED TECHNOLOGIES IN THE WRITING PROCESS

During the preparation of this work, the authors used ChatGPT 3.5 (OpenAI) in order to improve the readability and language of the manuscript. After using this tool, the authors reviewed and edited the content as needed and take full responsibility for the content of the published article.

Received: February 23, 2023

Revised: May 7, 2024

Accepted: June 12, 2024

#### REFERENCES

- Rachalski, A., Alexandre, C., Bernard, J.-F., Saurini, F., Lesch, K.-P., Hamon, M., Adrien, J., and Fabre, V. (2009). Altered sleep homeostasis after restraint stress in 5-HTT knock-out male mice: a role for hypocretins. *J. Neurosci.* 29, 15575–15585. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3138-09.2009>.
- Henderson, F., Vialou, V., El Mestikawy, S., and Fabre, V. (2017). Effects of Social Defeat Stress on Sleep in Mice. *Front. Behav. Neurosci.* 11, 227. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2017.00227>.
- Franklin, T.B., Saab, B.J., and Mansuy, I.M. (2012). Neural mechanisms of stress resilience and vulnerability. *Neuron* 75, 747–761. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.016>.
- Paul, E.D., and Lowry, C.A. (2013). Functional topography of serotonergic systems supports the Deakin/Graeff hypothesis of anxiety and affective disorders. *J. Psychopharmacol.* 27, 1090–1106. <https://doi.org/10.1177/0269881113490328>.
- Houdouin, F., Cespuglio, R., Gharib, A., Sarda, N., and Jouvett, M. (1991). Detection of the release of 5-hydroxyindole compounds in the hypothalamus and the n. raphe dorsalis throughout the sleep-waking cycle and during stressful situations in the rat: a polygraphic and voltammetric approach. *Exp. Brain Res.* 85, 153–162.
- Amat, J., Baratta, M.V., Paul, E., Bland, S.T., Watkins, L.R., and Maier, S.F. (2005). Medial prefrontal cortex determines how stressor controllability affects behavior and dorsal raphe nucleus. *Nat. Neurosci.* 8, 365–371. <https://doi.org/10.1038/nn1399>.
- Mongeau, R., Martin, C.B.P., Chevarin, C., Maldonado, R., Hamon, M., Robledo, P., and Lanfumey, L. (2010). 5-HT<sub>2C</sub> receptor activation prevents stress-induced enhancement of brain 5-HT turnover and extracellular levels in the mouse brain: modulation by chronic paroxetine treatment. *J. Neurochem.* 115, 438–449. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06932.x>.
- Ahnaou, A., and Drinkenburg, W.H.I.M. (2016). Simultaneous Changes in Sleep, qEEG, Physiology, Behaviour and Neurochemistry in Rats Exposed to Repeated Social Defeat Stress. *Neuropsychobiology* 73, 209–223. <https://doi.org/10.1159/000446284>.
- Cespuglio, R., Marinesco, S., Baubet, V., Bonnet, C., and el Kafi, B. (1995). Evidence for a sleep-promoting influence of stress. *Adv. Neuroimmunol.* 5, 145–154. [https://doi.org/10.1016/0960-5428\(95\)00005-m](https://doi.org/10.1016/0960-5428(95)00005-m).
- Boutrel, B., Monaca, C., Hen, R., Hamon, M., and Adrien, J. (2002). Involvement of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in homeostatic and stress-induced adaptive regulations of paradoxical sleep: studies in 5-HT<sub>1A</sub> knock-out mice. *J. Neurosci.* 22, 4686–4692. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-11-04686.2002>.
- Gaspar, P., and Lillesaar, C. (2012). Probing the diversity of serotonin neurons. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 367, 2382–2394. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0378>.
- Okaty, B.W., Commons, K.G., and Dymecki, S.M. (2019). Embracing diversity in the 5-HT neuronal system. *Nat. Rev. Neurosci.* 20, 397–424. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0151-3>.
- Huang, K.W., Ochandarena, N.E., Philson, A.C., Hyun, M., Birnbaum, J.E., Cicconet, M., and Sabatini, B.L. (2019). Molecular and anatomical organization of the dorsal raphe nucleus. *Elife* 8, e46464. <https://doi.org/10.7554/eLife.46464>.
- Ren, J., Isakova, A., Friedmann, D., Zeng, J., Grutzner, S.M., Pun, A., Zhao, G.Q., Kolluru, S.S., Wang, R., Lin, R., et al. (2019). Single-cell transcriptomes and whole-brain projections of serotonin neurons in the mouse dorsal and median raphe nuclei. *Elife* 8, e49424. <https://doi.org/10.7554/eLife.49424>.
- Okaty, B.W., Sturrock, N., Escobedo Lozoya, Y., Chang, Y., Senft, R.A., Lyon, K.A., Alekseyenko, O.V., and Dymecki, S.M. (2020). A single-cell transcriptomic and anatomic atlas of mouse dorsal raphe Pet1 neurons. *Elife* 9, e55523. <https://doi.org/10.7554/eLife.55523>.
- Muzerelle, A., Scotto-Lomassese, S., Bernard, J.F., Soiza-Reilly, M., and Gaspar, P. (2016). Conditional anterograde tracing reveals distinct targeting of individual serotonin cell groups (B5–B9) to the forebrain and brainstem. *Brain Struct. Funct.* 221, 535–561. <https://doi.org/10.1007/s00429-014-0924-4>.
- Ren, J., Friedmann, D., Xiong, J., Liu, C.D., Ferguson, B.R., Weerakkody, T., DeLoach, K.E., Ran, C., Pun, A., Sun, Y., et al. (2018). Anatomically Defined and Functionally Distinct Dorsal Raphe Serotonin Sub-systems. *Cell* 175, 472–487.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.043>.
- Allers, K.A., and Sharp, T. (2003). Neurochemical and anatomical identification of fast- and slow-firing neurones in the rat dorsal raphe nucleus using juxtacellular labelling methods in vivo. *Neuroscience* 122, 193–204. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(03\)00518-9](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(03)00518-9).
- Kocsis, B., Varga, V., Dahan, L., and Sik, A. (2006). Serotonergic neuron diversity: identification of raphe neurons with discharges time-locked to the hippocampal theta rhythm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 1059–1064. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508360103>.
- Fernandez, S.P., Cauli, B., Cabezas, C., Muzerelle, A., Poncer, J.-C., and Gaspar, P. (2016). Multiscale single-cell analysis reveals unique



- phenotypes of raphe 5-HT neurons projecting to the forebrain. *Brain Struct. Funct.* 221, 4007–4025. <https://doi.org/10.1007/s00429-015-1142-4>.
21. Fu, W., Le Maitre, E., Fabre, V., Bernard, J.-F., David Xu, Z.-Q., and Hökfelt, T. (2010). Chemical neuroanatomy of the dorsal raphe nucleus and adjacent structures of the mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 518, 3464–3494. <https://doi.org/10.1002/cne.22407>.
  22. Yu, X.-D., Zhu, Y., Sun, Q.-X., Deng, F., Wan, J., Zheng, D., Gong, W., Xie, S.-Z., Shen, C.-J., Fu, J.-Y., et al. (2022). Distinct serotonergic pathways to the amygdala underlie separate behavioral features of anxiety. *Nat. Neurosci.* 25, 1651–1663. <https://doi.org/10.1038/s41593-022-01200-8>.
  23. Zou, W.-J., Song, Y.-L., Wu, M.-Y., Chen, X.-T., You, Q.-L., Yang, Q., Luo, Z.-Y., Huang, L., Kong, Y., Feng, J., et al. (2020). A discrete serotonergic circuit regulates vulnerability to social stress. *Nat. Commun.* 11, 4218. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18010-w>.
  24. Challis, C., Boulden, J., Veerakumar, A., Espallergues, J., Vassoler, F.M., Pierce, R.C., Beck, S.G., and Berton, O. (2013). Raphe GABAergic neurons mediate the acquisition of avoidance after social defeat. *J. Neurosci.* 33, 13978–13988. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2383-13.2013>.
  25. Cho, J.R., Treweek, J.B., Robinson, J.E., Xiao, C., Bremner, L.R., Greenbaum, A., and Gradinaru, V. (2017). Dorsal Raphe Dopamine Neurons Modulate Arousal and Promote Wakefulness by Salient Stimuli. *Neuron* 94, 1205–1219.e8. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.05.020>.
  26. Gazea, M., Furdan, S., Sere, P., Oesch, L., Molnár, B., Di Giovanni, G., Fenno, L.E., Ramakrishnan, C., Mattis, J., Deisseroth, K., et al. (2021). Reciprocal Lateral Hypothalamic and Raphe GABAergic Projections Promote Wakefulness. *J. Neurosci.* 41, 4840–4849. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2850-20.2021>.
  27. Varga, V., Losonczy, A., Zemelman, B.V., Borhegyi, Z., Nyiri, G., Domonkos, A., Hangya, B., Holderith, N., Magee, J.C., and Freund, T.F. (2009). Fast synaptic subcortical control of hippocampal circuits. *Science* 326, 449–453. <https://doi.org/10.1126/science.1178307>.
  28. Kapoor, V., Provost, A.C., Agarwal, P., and Murthy, V.N. (2016). Activation of raphe nuclei triggers rapid and distinct effects on parallel olfactory bulb output channels. *Nat. Neurosci.* 19, 271–282. <https://doi.org/10.1038/nn.4219>.
  29. Sengupta, A., Bocchio, M., Bannerman, D.M., Sharp, T., and Capogna, M. (2017). Control of Amygdala Circuits by 5-HT Neurons via 5-HT and Glutamate Cotransmission. *J. Neurosci.* 37, 1785–1796. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2238-16.2016>.
  30. Wang, H.-L., Zhang, S., Qi, J., Wang, H., Cachope, R., Mejias-Aponte, C.A., Gomez, J.A., Mateo-Semidey, G.E., Beaudoin, G.M.J., Paladini, C.A., et al. (2019). Dorsal Raphe Dual Serotonin-Glutamate Neurons Drive Reward by Establishing Excitatory Synapses on VTA Mesoaccumbens Dopamine Neurons. *Cell Rep.* 26, 1128–1142.e7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.014>.
  31. Gras, C., Amilhon, B., Lepicard, E.M., Poirel, O., Vinatier, J., Herbin, M., Dumas, S., Tzavara, E.T., Wade, M.R., Nomikos, G.G., et al. (2008). The vesicular glutamate transporter VGLUT3 synergizes striatal acetylcholine tone. *Nat. Neurosci.* 11, 292–300. <https://doi.org/10.1038/nn2052>.
  32. Amilhon, B., Lepicard, E., Renoir, T., Mongeau, R., Popa, D., Poirel, O., Miot, S., Gras, C., Gardier, A.M., Gallego, J., et al. (2010). VGLUT3 (vesicular glutamate transporter type 3) contribution to the regulation of serotonergic transmission and anxiety. *J. Neurosci.* 30, 2198–2210. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5196-09.2010>.
  33. Favier, M., Pietrancosta, N., El Mestikawy, S., and Gangarossa, G. (2021). Leveraging VGLUT3 Functions to Untangle Brain Dysfunctions. *Trends Pharmacol. Sci.* 42, 475–490. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2021.03.003>.
  34. McDevitt, R.A., Tiran-Cappello, A., Shen, H., Balderas, I., Britt, J.P., Marino, R.A.M., Chung, S.L., Richie, C.T., Harvey, B.K., and Bonci, A. (2014). Serotonergic versus nonserotonergic dorsal raphe projection neurons: differential participation in reward circuitry. *Cell Rep.* 8, 1857–1869. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.037>.
  35. Qi, J., Zhang, S., Wang, H.-L., Wang, H., de Jesus Aceves Buendia, J., Hoffman, A.F., Lupica, C.R., Seal, R.P., and Morales, M. (2014). A glutamatergic reward input from the dorsal raphe to ventral tegmental area dopamine neurons. *Nat. Commun.* 5, 5390. <https://doi.org/10.1038/ncomms6390>.
  36. Liu, Z., Zhou, J., Li, Y., Hu, F., Lu, Y., Ma, M., Feng, Q., Zhang, J.-E., Wang, D., Zeng, J., et al. (2014). Dorsal raphe neurons signal reward through 5-HT and glutamate. *Neuron* 81, 1360–1374. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.02.010>.
  37. Fontaine, H.M., Silva, P.R., Neiswanger, C., Tran, R., Abraham, A.D., Land, B.B., Neumaier, J.F., and Chavkin, C. (2022). Stress decreases serotonin tone in the nucleus accumbens in male mice to promote aversion and potentiate cocaine preference via decreased stimulation of 5-HT1B receptors. *Neuropsychopharmacology* 47, 891–901. <https://doi.org/10.1038/s41386-021-01178-0>.
  38. Nectow, A.R., Schneeberger, M., Zhang, H., Field, B.C., Renier, N., Azevedo, E., Patel, B., Liang, Y., Mitra, S., Tessier-Lavigne, M., et al. (2017). Identification of a Brainstem Circuit Controlling Feeding. *Cell* 170, 429–442.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.045>.
  39. Schneeberger, M., Brice, N.L., Pellegrino, K., Parolari, L., Shaked, J.T., Page, K.J., Marchildon, F., Barrows, D.W., Carroll, T.S., Topilko, T., et al. (2022). Pharmacological targeting of glutamatergic neurons within the brainstem for weight reduction. *Nat. Metab.* 4, 1495–1513. <https://doi.org/10.1038/s42255-022-00677-8>.
  40. Wang, X.-Y., Jia, W.-B., Xu, X., Chen, R., Wang, L.-B., Su, X.-J., Xu, P.-F., Liu, X.-Q., Wen, J., Song, X.-Y., et al. (2023). A glutamatergic DRN-VTA pathway modulates neuropathic pain and comorbid anhedonia-like behavior in mice. *Nat. Commun.* 14, 5124. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40860-3>.
  41. Hioki, H., Nakamura, H., Ma, Y.-F., Konno, M., Hayakawa, T., Nakamura, K.C., Fujiyama, F., and Kaneko, T. (2010). Vesicular glutamate transporter 3-expressing nonserotonergic projection neurons constitute a subregion in the rat midbrain raphe nuclei. *J. Comp. Neurol.* 518, 668–686. <https://doi.org/10.1002/cne.22237>.
  42. Senft, R.A., Freret, M.E., Sturrock, N., and Dymecki, S.M. (2021). Neurochemically and Homologically Distinct Ascending VGLUT3 versus Serotonin Subsystems Comprise the r2-Pet1 Median Raphe. *J. Neurosci.* 41, 2581–2600. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1667-20.2021>.
  43. Franklin, K.B.J., and Paxinos, G. (2008). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates Third Edition 2008* (Elsevier).
  44. Ulrich-Lai, Y.M., and Herman, J.P. (2009). Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 397–409. <https://doi.org/10.1038/nrn2647>.
  45. Sulaman, B.A., Wang, S., Tyan, J., and Eban-Rothschild, A. (2023). Neuro-orchestration of sleep and wakefulness. *Nat. Neurosci.* 26, 196–212. <https://doi.org/10.1038/s41593-022-01236-w>.
  46. Kaur, S., Pedersen, N.P., Yokota, S., Hur, E.E., Fuller, P.M., Lazarus, M., Chamberlin, N.L., and Saper, C.B. (2013). Glutamatergic signaling from the parabrachial nucleus plays a critical role in hypercapnic arousal. *J. Neurosci.* 33, 7627–7640. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0173-13.2013>.
  47. Eban-Rothschild, A., Rothschild, G., Giardino, W.J., Jones, J.R., and de Lecea, L. (2016). VTA dopaminergic neurons regulate ethologically relevant sleep-wake behaviors. *Nat. Neurosci.* 19, 1356–1366. <https://doi.org/10.1038/nn.4377>.
  48. Luo, Y.-J., Li, Y.-D., Wang, L., Yang, S.-R., Yuan, X.-S., Wang, J., Cherasse, Y., Lazarus, M., Chen, J.-F., Qu, W.-M., and Huang, Z.L. (2018). Nucleus accumbens controls wakefulness by a subpopulation of neurons expressing dopamine D1 receptors. *Nat. Commun.* 9, 1576. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03889-3>.
  49. Fasanò, C., Rocchetti, J., Pietrajtis, K., Zander, J.-F., Manseau, F., Sakaie, D.Y., Marcus-Sells, M., Ramet, L., Morel, L.J., Carrel, D., et al. (2017). Regulation of the Hippocampal Network by VGLUT3-Positive

- CCK- GABAergic Basket Cells. *Front. Cell. Neurosci.* 11, 140. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00140>.
50. Murray, N.M., Buchanan, G.F., and Richerson, G.B. (2015). Insomnia Caused by Serotonin Depletion is Due to Hypothermia. *Sleep* 38, 1985–1993. <https://doi.org/10.5665/sleep.5256>.
  51. Meerlo, P., and Turek, F.W. (2001). Effects of social stimuli on sleep in mice: non-rapid-eye-movement (NREM) sleep is promoted by aggressive interaction but not by sexual interaction. *Brain Res.* 907, 84–92. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(01\)02603-8](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(01)02603-8).
  52. Yu, X., Zhao, G., Wang, D., Wang, S., Li, R., Li, A., Wang, H., Nollet, M., Chun, Y.Y., Zhao, T., et al. (2022). A specific circuit in the midbrain detects stress and induces restorative sleep. *Science* 377, 63–72. <https://doi.org/10.1126/science.abn0853>.
  53. Geisler, S., Derst, C., Veh, R.W., and Zahm, D.S. (2007). Glutamatergic afferents of the ventral tegmental area in the rat. *J. Neurosci.* 27, 5730–5743. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0012-07.2007>.
  54. Niu, M., Kasai, A., Tanuma, M., Seiriki, K., Igarashi, H., Kuwaki, T., Nagayasu, K., Miyaji, K., Ueno, H., Tanabe, W., et al. (2022). Claustrum mediates bidirectional and reversible control of stress-induced anxiety responses. *Sci. Adv.* 8, eabi6375. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abi6375>.
  55. Houdouin, F., Cespuglio, R., and Jouvet, M. (1991). Effects induced by the electrical stimulation of the nucleus raphe dorsalis upon hypothalamic release of 5-hydroxyindole compounds and sleep parameters in the rat. *Brain Res.* 565, 48–56. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)91735-j](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)91735-j).
  56. Lkhagvasuren, B., Nakamura, Y., Oka, T., Sudo, N., and Nakamura, K. (2011). Social defeat stress induces hyperthermia through activation of thermoregulatory sympathetic premotor neurons in the medullary raphe region. *Eur. J. Neurosci.* 34, 1442–1452. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07863.x>.
  57. Machado, N.L.S., Abbott, S.B.G., Resch, J.M., Zhu, L., Arrigoni, E., Lowell, B.B., Fuller, P.M., Fontes, M.A.P., and Saper, C.B. (2018). A Glutamatergic Hypothalamomedullary Circuit Mediates Thermogenesis, but Not Heat Conservation, during Stress-Induced Hyperthermia. *Curr. Biol.* 28, 2291–2301.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.05.064>.
  58. Fabre, V., Krystal, A., and Bonnavion, P. (2021). Serotonin and sleep. In *Principles and Practice of Sleep Medicine, 7th edition.*, M.H. Kryger, T. Roth, C.A. Goldstein, and W.C. Dement, eds. (Elsevier), pp. 497–505.
  59. Varin, C., Luppi, P.-H., and Fort, P. (2018). Melanin-concentrating hormone-expressing neurons adjust slow-wave sleep dynamics to catalyze paradoxical (REM) sleep. *Sleep* 41, zsy068. <https://doi.org/10.1093/sleep/zsy068>.
  60. Traut, J., Mengual, J.P., Meijer, E.J., McKillop, L.E., Alfonsa, H., Hoerder-Suabedissen, A., Song, S.M., Molnár, Z., Akerman, C.J., Vyazovskiy, V.V., et al. (2022). Effects of clozapine-N-oxide and compound 21 on sleep in laboratory mice. Preprint at bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2022.02.01.478652>.
  61. Fazekas, C.L., Szabó, A., Török, B., Bánrévi, K., Correia, P., Chaves, T., Daumas, S., and Zelena, D. (2022). A New Player in the Hippocampus: A Review on VGLUT3+ Neurons and Their Role in the Regulation of Hippocampal Activity and Behaviour. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 790. <https://doi.org/10.3390/ijms23020790>.
  62. Domonkos, A., Nikitidou Ledri, L., Laszlovszky, T., Cserép, C., Borhegyi, Z., Papp, E., Nyíri, G., Freund, T.F., and Varga, V. (2016). Divergent in vivo activity of non-serotonergic and serotonergic VGLUT3-neurons in the median raphe region. *J. Physiol.* 594, 3775–3790. <https://doi.org/10.1113/JP272036>.
  63. Marinesco, S., Bonnet, C., and Cespuglio, R. (1999). Influence of stress duration on the sleep rebound induced by immobilization in the rat: a possible role for corticosterone. *Neuroscience* 92, 921–933. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(99\)00045-7](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(99)00045-7).
  64. Fujii, S., Kaushik, M.K., Zhou, X., Korkutata, M., and Lazarus, M. (2019). Acute Social Defeat Stress Increases Sleep in Mice. *Front. Neurosci.* 13, 322. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00322>.
  65. Cohen, J.Y., Amoroso, M.W., and Uchida, N. (2015). Serotonergic neurons signal reward and punishment on multiple timescales. *Elife* 4, e06346. <https://doi.org/10.7554/eLife.06346>.
  66. Matthews, G.A., Nieh, E.H., Vander Weele, C.M., Halbert, S.A., Pradhan, R.V., Yosafat, A.S., Glober, G.F., Izadmehr, E.M., Thomas, R.E., Lacy, G.D., et al. (2016). Dorsal Raphe Dopamine Neurons Represent the Experience of Social Isolation. *Cell* 164, 617–631. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.040>.
  67. Groessl, F., Munsch, T., Meis, S., Griessner, J., Kaczanowska, J., Pilota, P., Kargl, D., Badurek, S., Kraitsy, K., Rassoulpour, A., et al. (2018). Dorsal tegmental dopamine neurons gate associative learning of fear. *Nat. Neurosci.* 21, 952–962. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0174-5>.
  68. Paquelet, G.E., Carrion, K., Lacefield, C.O., Zhou, P., Hen, R., and Miller, B.R. (2022). Single-cell activity and network properties of dorsal raphe nucleus serotonin neurons during emotionally salient behaviors. *Neuron* 110, 2664–2679.e8. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.05.015>.
  69. Lin, R., Liang, J., Wang, R., Yan, T., Zhou, Y., Liu, Y., Feng, Q., Sun, F., Li, Y., Li, A., et al. (2020). The Raphe Dopamine System Controls the Expression of Incentive Memory. *Neuron* 106, 498–514.e8. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.02.009>.
  70. Hokari, S., Chikahisa, S., Shiuchi, T., Nakayama, Y., Konishi, M., Nishino, S., Itoh, N., and Séi, H. (2022). Social stress alters sleep in FGF21-deficient mice. *Brain Res. Bull.* 191, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2022.10.005>.
  71. Koehl, M., Bouyer, J.J., Darnaudéry, M., Le Moal, M., and Mayo, W. (2002). The effect of restraint stress on paradoxical sleep is influenced by the circadian cycle. *Brain Res.* 937, 45–50. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(02\)02463-0](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(02)02463-0).
  72. Meerlo, P., Easton, A., Bergmann, B.M., and Turek, F.W. (2001). Restraint increases prolactin and REM sleep in C57BL/6J mice but not in BALB/cJ mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 281, R846–R854. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2001.281.3.R846>.
  73. Vazquez-Palacios, G., and Velazquez-Moctezuma, J. (2000). Effect of electric foot shocks, immobilization, and corticosterone administration on the sleep-wake pattern in the rat. *Physiol. Behav.* 71, 23–28. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(00\)00285-7](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(00)00285-7).
  74. Bush, B.J., Donnay, C., Andrews, E.-J.A., Lewis-Sanders, D., Gray, C.L., Qiao, Z., Brager, A.J., Johnson, H., Brewer, H.C.S., Sood, S., et al. (2022). Non-rapid eye movement sleep determines resilience to social stress. *Elife* 11, e80206. <https://doi.org/10.7554/eLife.80206>.
  75. Feng, X., Zhao, H.-Y., Shao, Y.-J., Lou, H.-F., Zhu, L.-Y., Duan, S., and Yu, Y.-Q. (2020). Anxiolytic Effect of Increased NREM Sleep after Acute Social Defeat Stress in Mice. *Neurosci. Bull.* 36, 1137–1146. <https://doi.org/10.1007/s12264-020-00473-y>.
  76. Nagai, M., Nagai, H., Numa, C., and Furuyashiki, T. (2020). Stress-induced sleep-like inactivity modulates stress susceptibility in mice. *Sci. Rep.* 10, 19800. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76717-8>.
  77. Goldstein, A.N., and Walker, M.P. (2014). The role of sleep in emotional brain function. *Annu. Rev. Clin. Psychol.* 10, 679–708. <https://doi.org/10.1146/annurev-clinpsy-032813-153716>.
  78. Wassing, R., Lakbila-Kamal, O., Ramautar, J.R., Stoffers, D., Schalkwijk, F., and Van Someren, E.J.W. (2019). Restless REM Sleep Impedes Overnight Amygdala Adaptation. *Curr. Biol.* 29, 2351–2358.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.06.034>.
  79. Aime, M., Calcini, N., Borsa, M., Campelo, T., Rusterholz, T., Sattin, A., Fellin, T., and Adamantidis, A. (2022). Paradoxical somatodendritic decoupling supports cortical plasticity during REM sleep. *Science* 376, 724–730. <https://doi.org/10.1126/science.abc2734>.
  80. Popa, D., Duvarci, S., Popescu, A.T., Léna, C., and Paré, D. (2010). Coherent amygdalocortical theta promotes fear memory consolidation



- during paradoxical sleep. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 6516–6519. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913016107>.
81. Boyce, R., Glasgow, S.D., Williams, S., and Adamantidis, A. (2016). Causal evidence for the role of REM sleep theta rhythm in contextual memory consolidation. *Science* 352, 812–816. <https://doi.org/10.1126/science.aad5252>.
82. Balázsfi, D., Fodor, A., Török, B., Ferenczi, S., Kovács, K.J., Haller, J., and Zelena, D. (2018). Enhanced innate fear and altered stress axis regulation in VGLUT3 knockout mice. *Stress Amst. Neth.* 21, 151–161. <https://doi.org/10.1080/10253890.2017.1423053>.
83. de Almeida, C., Chabbah, N., Eyraud, C., Fasano, C., Bernard, V., Pie-trancosta, N., Fabre, V., El Mestikawy, S., and Daumas, S. (2023). Absence of VGLUT3 expression leads to impaired fear memory in mice. *eNeuro* 10. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0304-22.2023>.
84. Cardozo Pinto, D.F., Yang, H., Pollak Dorocic, I., de Jong, J.W., Han, V.J., Peck, J.R., Zhu, Y., Liu, C., Beier, K.T., Smidt, M.P., and Lammel, S. (2019). Characterization of transgenic mouse models targeting neuro-modulatory systems reveals organizational principles of the dorsal raphe. *Nat. Commun.* 10, 4633. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12392-2>.
85. Sengupta, A., and Holmes, A. (2019). A Discrete Dorsal Raphe to Basal Amygdala 5-HT Circuit Calibrates Aversive Memory. *Neuron* 103, 489–505.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.05.029>.
86. Gullino, L.S., Fuller, C., Dunn, P., Collins, H.M., El Mestikawy, S., and Sharp, T. (2024). Evidence for a Role of 5-HT-glutamate Co-releasing Neurons in Acute Stress Mechanisms. *ACS Chem. Neurosci.* 15, 1185–1196. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.3c00758>.
87. Sakai, K. (2011). Sleep-waking discharge profiles of dorsal raphe nucleus neurons in mice. *Neuroscience* 197, 200–224. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.09.024>.
88. Andrade, T.G., Zangrossi, H., and Graeff, F.G. (2013). The median raphe nucleus in anxiety revisited. *J. Psychopharmacol.* 27, 1107–1115. <https://doi.org/10.1177/0269881113499208>.
89. Bernabe, C.S., Caliman, I.F., de Abreu, A.R.R., Molosh, A.I., Truitt, W.A., Shekhar, A., and Johnson, P.L. (2024). Identification of a novel perifornical-hypothalamic-area-projecting serotonergic system that inhibits innate panic and conditioned fear responses. *Transl. Psychiatry* 14, 60. <https://doi.org/10.1038/s41398-024-02769-3>.
90. Urbain, N., Creamer, K., and Debonnel, G. (2006). Electrophysiological diversity of the dorsal raphe cells across the sleep-wake cycle of the rat. *J. Physiol.* 573, 679–695. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.108514>.
91. Oishi, Y., Xu, Q., Wang, L., Zhang, B.-J., Takahashi, K., Takata, Y., Luo, Y.-J., Cherasse, Y., Schiffmann, S.N., de Kerchove d'Exaerde, A., et al. (2017). Slow-wave sleep is controlled by a subset of nucleus accumbens core neurons in mice. *Nat. Commun.* 8, 734. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00781-4>.
92. Carter, M.E., Brill, J., Bonnavion, P., Huguenard, J.R., Huerta, R., and de Lecea, L. (2012). Mechanism for Hypocretin-mediated sleep-to-wake transitions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, E2635–E2644. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202526109>.
93. Anaclet, C., Pedersen, N.P., Ferrari, L.L., Venner, A., Bass, C.E., Arrigoni, E., and Fuller, P.M. (2015). Basal forebrain control of wakefulness and cortical rhythms. *Nat. Commun.* 6, 8744. <https://doi.org/10.1038/ncomms9744>.
94. Krone, L.B., Yamagata, T., Blanco-Duque, C., Guillaumin, M.C.C., Kahn, M.C., van der Vinne, V., McKillop, L.E., Tam, S.K.E., Peirson, S.N., Akerman, C.J., et al. (2021). A role for the cortex in sleep-wake regulation. *Nat. Neurosci.* 24, 1210–1215. <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00894-6>.
95. Hasegawa, E., Miyasaka, A., Sakurai, K., Cherasse, Y., Li, Y., and Sakurai, T. (2022). Rapid eye movement sleep is initiated by basolateral amygdala dopamine signaling in mice. *Science* 375, 994–1000. <https://doi.org/10.1126/science.abl6618>.
96. Fuller, P.M., Sherman, D., Pedersen, N.P., Saper, C.B., and Lu, J. (2011). Reassessment of the structural basis of the ascending arousal system. *J. Comp. Neurol.* 519, 933–956. <https://doi.org/10.1002/cne.22559>.
97. Yu, X., Li, W., Ma, Y., Tossell, K., Harris, J.J., Harding, E.C., Ba, W., Miracca, G., Wang, D., Li, L., et al. (2019). GABA and glutamate neurons in the VTA regulate sleep and wakefulness. *Nat. Neurosci.* 22, 106–119. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0288-9>.
98. Berton, O., McClung, C.A., Dileone, R.J., Krishnan, V., Renthal, W., Russo, S.J., Graham, D., Tsankova, N.M., Bolanos, C.A., Rios, M., et al. (2006). Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science* 311, 864–868. <https://doi.org/10.1126/science.1120972>.
99. Mang, G.M., and Franken, P. (2012). Sleep and EEG Phenotyping in Mice. *Curr Protoc Mouse Biol.* 2, 55–74. <https://doi.org/10.1002/9780470942390.mo110126>.
100. Zhuang, X., Masson, J., Gingrich, J.A., Rayport, S., and Hen, R. (2005). Targeted gene expression in dopamine and serotonin neurons of the mouse brain. *J. Neurosci. Methods* 143, 27–32. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2004.09.020>.
101. Roth, B.L. (2016). DREADDs for Neuroscientists. *Neuron* 89, 683–694. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.01.040>.
102. Srinivas, S., Watanabe, T., Lin, C.S., William, C.M., Tanabe, Y., Jessell, T.M., and Constantini, F. (2001). Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. *BMC Dev. Biol.* 7, 4.
103. Bimpisidis, Z., König, N., Stagkourakis, S., Zell, V., Vček, B., Dumas, S., Giros, B., Broberger, C., Hnasko, T.S., and Mackenzie, Å. (2019). The NeuroD6 Subtype of VTA Neurons Contributes to Psychostimulant Sensitization and Behavioral Reinforcement. *eNeuro* 6. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0066-19.2019>.
104. Dumas, S., and Wallén-Mackenzie, Å. (2019). Developmental Co-expression of Vglut2 and Nurr1 in a Mes-Di-Encephalic Continuum Precedes Dopamine and Glutamate Neuron Specification. *Front. Cell Dev. Biol.* 7, 307. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00307>.
105. Serra, G.P., Guillaumin, A., Dumas, S., Vček, B., and Wallén-Mackenzie, Å. (2021). Midbrain Dopamine Neurons Defined by TrpV1 Modulate Psychomotor Behavior. *Front. Neural Circ.* 15, 726893. <https://doi.org/10.3389/fncir.2021.726893>.
106. Bonnavion, P., Bernard, J.-F., Harmon, M., Adrien, J., and Fabre, V. (2010). Heterogeneous distribution of the serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptor mRNA in chemically identified neurons of the mouse rostral brainstem: Implications for the role of serotonin in the regulation of wakefulness and REM sleep. *J. Comp. Neurol.* 518, 2744–2770. <https://doi.org/10.1002/cne.22331>.

STAR★METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
<b>Antibodies</b>		
Rabbit polyclonal anti-c-Fos	Abcam	Cat# 190289; RRID: AB_2737414
Chicken polyclonal anti-GFP	Aves Labs	Cat# 1020; RRID: AB_10000240
Mouse monoclonal (WH-3) anti-TPH2	Sigma-Aldrich	Cat# T0678; RRID:AB_261587
Mouse monoclonal (CL2990) anti-TPH2	Abcam	Cat# 211528-1001; RRID: AB_2313773
Biotinylated anti-rabbit IgG	Vector Laboratories	Cat#PI-1000; RRID: AB_2313606
Alexa Fluor 594 anti-rabbit IgG	Thermo Fisher Scientific	Cat# A-21207; RRID: AB_141637
Alexa Fluor 488 anti-chicken IgY	Thermo Fisher Scientific	Cat# A32931; RRID: AB_2762843
Abberior-Star 635P anti-mouse IgG	Abberior	Cat# ST635-1001; RRID: AB_2893232
HRP conjugated anti-fluorescein antibody	Roche, Mannheim	Cat# 11426346910; RRID: AB_840257
HRP anti-DIG Fab fragments	Roche, Mannheim	Cat# 11207733910; RRID: AB_514500
Alkaline phosphatase anti-Dig antibody	Roche, Mannheim	Cat# 11093274910; RRID: AB_514497
<b>Bacterial and virus strains</b>		
AAV-DIO-hM3D(Gq)-mCh	UZH Vector Facility	Cat# V89
AAV-DIO-mCh	UZH Vector Facility	Cat# V84
ssAAV-retro/2-hSyn1-dlox-EGFP(rev)-dlox-WPRE-hGHp(A)	UZH Vector Facility	Cat# V115-Retro
AAV-Cre-eGFP	Penn Vector Core	Cat# AV-1-PV2004
AAV-eGFP	Penn Vector Core	Cat# AV-1-PV0101
AAV-Flex-tdTomato	Penn Vector Core	Cat# AV-1-ALL864
<b>Chemicals, peptides, and recombinant proteins</b>		
Clozapine-N-oxide (CNO)	Tocris	Cat# 4936
<b>Experimental models: Organisms/strains</b>		
Mouse: VGLUT3 <sup>lox/lox</sup> ; C57BL/6N-Slc17a8tm2Selm	Generated by lab of El Mestikawy <sup>36</sup>	RRID: <a href="#">IMSR_EM:05733</a>
Mouse: VGLUT3 <sup>Cre</sup>	This paper	
Mouse: SERT <sup>Cre</sup> ; B6.129(Cg)-Slc6a4tm1(cre)Xz/J	The Jackson Laboratory	JAX #01455
Mouse: VIAAT <sup>Cre</sup> ; Slc32a1tm2(cre)Lowl/J	The Jackson Laboratory	JAX #016962
Mouse: ChAT <sup>Cre</sup> ; B6.129S6-Chattm2(cre)Lowl/J	The Jackson Laboratory	JAX #006410
Mouse: R26-stop-EYFP; B6.129X1-Gt(ROSA)26Sortm1(EYFP)Cos/J	The Jackson Laboratory	JAX #006148
<b>Oligonucleotides</b>		
HIS probe 1 VGLUT3 forward AATTAACCCTCACTAAAGGG AGAAAACAGGACTGGGCTGACCC	eurogentech	N/A
HIS probe 1 VGLUT3 reverse TAATACGACTCACTATAGGGA GAGAGACCAAGTCCATATTCCC	eurogentech	N/A
HIS probe 2 VGLUT3 forward AATTAACCCTCACTAAAGGG AGGAGACTCGCTGGGCATC T	eurogentech	N/A
HIS probe 2 VGLUT3 reverse TAATACGACTCACTATAGGGC AGCTGCAGTCACAGATGTACCG	eurogentech	N/A
HIS probe TPH2 forward AATTAACCCTCACTAAAG GGACAAAGAGCCCGCAAAGGCG	eurogentech	N/A

(Continued on next page)

**Continued**

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
HIS probe TPH2 reverse TAATACGACTCACTATAGGGC TGCTCCATACGCCCGCAGT	eurogentech	N/A
HIS probe Cre forward AATTAACCCTCAC TAAAGGGATCTGTCGTTTGCCTGCGTG	eurogentech	N/A
HIS probe Cre reverse TAATACGACTCACT ATAGGTTGTCCAGCCACCAGCTGCG	eurogentech	N/A

**Software and algorithms**

Somnologica-3	EMBLA, Medcare Flaga	Mang et al. <sup>99</sup>
NDP.view2 Image viewing software	Hamamatsu Photonics	<a href="https://nanozoomer.hamamatsu.com/">https://nanozoomer.hamamatsu.com/</a>
FLIR-Tools Software	West Malling	RRID:SCR_016330; <a href="https://www.flir.fr/">https://www.flir.fr/</a>
Fiji	ImageJ2	RRID:SCR_002285; <a href="https://imagej.net/software/fiji/">https://imagej.net/software/fiji/</a>
GraphPad Prism 7.0	GraphPad Software	RRID:SCR_002798; <a href="https://www.graphpad.com/">https://www.graphpad.com/</a>
QuPath v0.5		RRID:SCR_018257; <a href="https://qupath.github.io/">https://qupath.github.io/</a>
EthoVision XT	Noldus	RRID:SCR_000441; <a href="https://www.noldus.com/ethovision">https://www.noldus.com/ethovision</a>
Photoshop	Adobe Systems	RRID:SCR_014199; <a href="https://www.adobe.com/">https://www.adobe.com/</a>
Adobe Illustrator	Adobe Systems	RRID:SCR_010279; <a href="https://www.adobe.com/">https://www.adobe.com/</a>

**RESOURCE AVAILABILITY****Lead contact**

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the lead contact, Véronique Fabre ([veronique.fabre@inserm.fr](mailto:veronique.fabre@inserm.fr)).

**Materials availability**

Unique resources and reagents generated in this study are available from the [lead contact](#) with a completed Material Transfer Agreement.

**Data and code availability**

- All data reported in this paper will be shared by the [lead contact](#) upon request.
- This paper does not report original code.
- Any additional information required to reanalyze the data reported in this work paper is available from the [lead contact](#) upon request.

**EXPERIMENTAL MODEL AND STUDY PARTICIPANT DETAILS****Ethical issues**

All experiments were conducted in compliance with the ARRIVE guidelines.

**Animals**

All experiments were performed in strict conformity with the European Union legislation for animal experimentation (European Committee Council Directive 2010/63/EU) and approved by the “Charles Darwin” Ethical Committee (authorization #6345–2016080822399698; committee Darwin CEEA #5). Mice were housed up to five per cage under standard conditions (12:12 h light-dark cycle; lights on at 7:00 a.m. and off at 7:00 p.m. referred to as zeitgeber time ZT0 and ZT12, respectively; 22 ± 2°C ambient temperature; 60% relative humidity) with food and water available *ad libitum*.

Mice were 8–20 weeks old, males, and weighted 23–30 g at the beginning of the experiments. Mice carrying two copies of the floxed allele of the exon 2 of *Slc17a8* (VGLUT3<sup>lox/lox</sup>; RRID: [IMSR\\_EM:05733](#); C57BL/6N background) were produced as previously described.<sup>49</sup> A knock-in mouse line expressing the Cre recombinase in VGLUT3 expressing neurons was generated at Cyagen (Santa Clara, CA) and was thereafter named VGLUT3<sup>Cre</sup>. An internal ribosome entry site IRES-Cre cassette was placed downstream of the TAA stop codon of *Slc17a8* allowing Cre gene expression to be under the control of *Slc17a8* regulatory sequences in C57BL/6J mice. We additionally used heterozygous mice expressing the Cre recombinase only in neurons producing the 5-HT transporter (SERT<sup>Cre</sup> mice<sup>100</sup>), the vesicular inhibitory amino acid transporter (VIAAT<sup>Cre</sup> mice, strain #016962; The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME), or

the choline acetyltransferase (ChAT<sup>Cre</sup> mice, strain #006410; The Jackson Laboratory). R26-stop-EYFP (Enhanced Yellow Fluorescent Protein) reporter line was obtained from The Jackson Laboratory (strain #006148). Adult male Swiss CD1 mice (12–20 weeks-old, body weight: 30–35 g) were obtained from Janvier Labs (Le Genest St. Isle, France). Genotypes of mice were determined by Polymerase Chain Reaction and electrophoresis before and after the end of the protocol.

#### Viral vectors

The following Adeno-Associated Viruses (AAVs) were produced by the Viral Vector Facility of the Neuroscience Center Zurich (Zentrum für Neurowissenschaften Zürich, ZurichSwitzerland): AAV-2/2-hSyn1-dlox-hM3D(Gq)-mCherry(rev)-dlox-WPRE-hGHp [AAV-DIO-hM3D(Gq)-mCh; 2.0e12 genome copies per mL (GC/mL)], AAV-2/2-hSyn1-dlox-mCherry(rev)-dlox-WPRE-hGHp (AAV-DIO-mCh; 5.6e12 GC/ml) and ssAAV-retro/2-hSyn1-dlox-EGFP(rev)-dlox-WPRE-hGHp(A) [rAAV-dlox-GFP; 4.5e12 genome copies per mL (GC/mL)]. The following AAVs: AAV2/1.CMV.HI.eGFP-Cre.WPRE (AAV-Cre-eGFP; 0.06–1.18e13 GC/ml), AAV2/1.CMV.PI.eGFP.WPRE.bGH (AAV-eGFP; 0.22–4.36e13 GC/ml), and AAV2/1.CAG.Flex.tdTomato.WPRE.bGH (AAV-Flex-tdTomato; 8.52e12 GC/ml) were obtained from Penn Vector Core (Philadelphia, PA) and were made available by Dr. Hongkui Zeng of the Allen Institute for Brain Science (Seattle, WA).

#### METHOD DETAILS

##### Experimental design

To delete VGLUT3 in the DR of adult mice, a virus expressing the Cre recombinase (AAV-Cre-eGFP) was infused in the DR of VGLUT3<sup>lox/lox</sup> mice. An AAV expressing the enhanced green fluorescent protein (AAV-eGFP) was used for control condition.

Conditional knock-out mice lacking VGLUT3 in 5-HT, GABAergic or cholinergic neurons were obtained by crossing VGLUT3<sup>lox/lox</sup> female mice to SERT<sup>Cre</sup>, VIAAT<sup>Cre</sup>, or ChAT<sup>Cre</sup> male mice, respectively. Mutant SERT<sup>Cre/+</sup>VGLUT3<sup>lox/lox</sup> (named SERT<sup>VGLUT3.cKO</sup>), VIAAT<sup>Cre/+</sup>VGLUT3<sup>lox/lox</sup> (named VIAAT<sup>VGLUT3.cKO</sup>) and ChAT<sup>Cre/+</sup>VGLUT3<sup>lox/lox</sup> (named ChAT<sup>VGLUT3.cKO</sup>) mice were compared with VGLUT3<sup>lox/lox</sup> and SERT<sup>Cre</sup>, VIAAT<sup>Cre</sup>, or ChAT<sup>Cre</sup> littermates, respectively.

A virus enabling conditional expression of the excitatory hM3 DREADD (Designer receptors exclusively activated by Designer Drugs<sup>101</sup>) receptor [AAV-DIO-hM3D(Gq)-mCh] was infused in the DR of VGLUT3<sup>Cre</sup>, SERT<sup>Cre</sup> and SERT<sup>VGLUT3.cKO</sup> mice to chemogenetically activate DR<sup>VGLUT3</sup> neurons, and DR<sup>5-HT</sup> neurons expressing VGLUT3 or not, respectively. Control non-DREADD-expressing mice were obtained by injecting an AAV enabling conditional expression of the fluorescent protein mCherry (AAV-DIO-mCh).

To map the targets of DR<sup>VGLUT3</sup> neurons, a virus that enables conditional expression of the fluorescent protein tdTomato (AAV-Flex-tdTomato) was infused in the DR of VGLUT3<sup>Cre</sup> mice.

To identify DR<sup>VGLUT3</sup> neurons projecting to the ventral tegmental area (VTA), a retrograde virus that enables conditional expression of the fluorescent protein GFP (rAAV-dlox-GFP) was infused in the VTA of VGLUT3<sup>Cre</sup> mice.

To identify VGLUT3 expressing neurons, conditional expression of the fluorescent protein EYFP in VGLUT3 expressing neurons was enabled by crossing VGLUT3<sup>Cre</sup> male mice with ROSA26-stop-EYFP reporter female mice.<sup>102</sup>

##### Stereotaxic AAV injection

Mice were anesthetized with a mix of ketamine/xylazine [100 and 10 mg/kg, respectively, intraperitoneal (i.p.) injection] and fixed on a stereotaxic apparatus. Coordinates were adapted from the mouse brain atlas.<sup>43</sup> For conditional deletion of VGLUT3 and DREADD experiments, a dual injection of AAVs was done to target the whole DR [800 nL; from bregma, in mm: –4.8 (500 nL) and –4.3 (300 nL) anteroposterior, +0.9 lateral to the midline, –2.8 ventral from brain surface, 15° angle]. To map projections from DR<sup>VGLUT3</sup> neurons, a single AAV injection was performed (200–500nL; from bregma, in mm: –4.5 anteroposterior, +0.9 lateral to the midline, –2.8 ventral from brain surface, 15° angle). To map DR<sup>VGLUT3</sup> neurons projecting to the VTA, a bilateral AAV injection was performed (300 nL; from bregma, in mm: –3.1 anteroposterior, +0.5 and –0.5 lateral to the midline, –4.1 ventral from brain surface). A 10  $\mu$ L Hamilton syringe with a microinjection needle was used to infuse AAVs at a rate of 100 nL/min. The needle was kept at the injection site for 5 min before removal. Mice were allowed to recover at least 3 weeks for tracing experiments prior to perfusion.

##### EEG and EMG surgical procedures

After removal of the microinjection needle used for AAV infusion, mice were instrumented for polygraphic sleep monitoring. Implantation of electrodes (enameled nichrome wires, 150  $\mu$ m in diameter) was performed as described previously.<sup>2</sup> Briefly, two EEG electrodes were placed onto the dura over the right parietal cortex (from bregma, 2 mm caudal and 2 mm lateral to midline) and the cerebellum (from bregma, 5 mm caudal and at midline), two electrooculogram (EOG) electrodes were located subcutaneously on each side of the orbit and two electromyogram (EMG) electrodes were inserted into the neck muscles. All electrodes were soldered to a miniconnector (Antelec, La Queue en Brie, France) and anchored to the skull with dental acrylic. Polysomnographic recordings were performed at least 3 weeks later for DREADD experiments and 6 weeks later for conditional deletion of VGLUT3 in the DR.

##### Pharmacogenetic manipulation

Mice were habituated to manipulation and i.p. injections (7 days). Clozapine-N-oxide (CNO) was injected i.p. at the dose of 1 mg/kg (Tocris Bioscience, Bio-Techne, Minneapolis, MN; catalog # 4936). CNO was suspended in a minimal volume of DMSO



(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and saline (0.9%) was added to achieve a final 0.25% (v/v) DMSO in saline solution. There was at least a 2-day washout period between two CNO injections. To control for off targets effects of CNO, we included CNO-injected non-DREADD-expressing control mice, i.e., mice injected with the AAV-DIO-mCh.

### Stress protocols

Acute social defeat stress (SD) was performed by placing an experimental mouse in a cage containing an aggressive resident male CD1 mouse for 5 min of physical defeat. Then, mice remained in the same cage but were physically separated by a perforated divider for the next 20 min, enabling sensory but not physical contact. The SD session started at 09:30 a.m. and lasted 25 min. The protocol was adapted from Challis et al. (2013).<sup>24</sup> Aggressive CD1 male mice were selected according to published methods<sup>98</sup> and kept in large cages (19 × 35 × 14 cm<sup>3</sup>) for the rest of the experiment. Acute restraint stress (RS) was performed by wrapping each mouse in a nylon-covered metal mesh for 90 min, from 5:30 to 7:00 p.m., as previously described.<sup>1</sup>

### Sleep/wake monitoring

Mice were placed in individual recording chambers [custom-made Plexiglas cages (19 × 19 × 30 cm<sup>3</sup>)] and connected to the recording system with a light-weight cable and a swivel enabling free movements. Mice were acclimated to the recording conditions for 4 days before starting the recordings.

Baseline sleep recordings were performed for 24 h starting at dark onset (7:00 p.m.). To assess the impact of stress on sleep, mice were placed back into their home cage after RS or SD, connected back to the recording cables, and immediately recorded. Each mouse was used as its own control. In the SD protocol, matched control recordings were obtained from baseline sleep recordings. In the RS protocol, matched control recordings (sham condition) were obtained one or two days prior to the stress session: mice were woken up at the two time-points corresponding to the beginning and the end of stress procedure (5:30 p.m. and 7:00 p.m.). The two stress sessions were performed at least one week apart. For DREADD experiments, mice were injected at 10:00 a.m. with saline (control matched recording) or CNO (1 mg/kg) and recorded for 21 h.

### Infrared thermography

Thermal imaging was performed in single-housed mice following CNO injection (1 mg/kg at 10:00 a.m.), SD (25 min session ending at 10:00 a.m.) or RS (90 min session ending at 7:00 p.m.). Matched control thermal images were obtained just before the stress session. Skin temperature at the lumbar back and at the level of the intrascapular brown adipose tissue (BAT) were imaged with an infrared camera (B335: Compact-Infrared-Thermal-Imaging-Camera; FLIR; West Malling, Kent, UK) and analyzed with an FLIR-Tools Software (FLIR; West Malling). For each image, the area at the most caudal part of the back or the area of the intrascapular BAT was delimited, in which the maximal temperature was selected. For each mouse and experimental condition, the maximal temperature is the average of five images.

### Behavioral tests

Mice were placed in the experimental room at least 45 min before the beginning of the tests. The tests were performed between ZT6 and ZT6. For chemogenetic experiments, mice were injected with CNO (1 mg/kg) and tested 30 min later.

### Locomotor activity

Locomotor activity was tested in an open field. The open field test was performed in a white Perspex arena (43 × 43 × 26 cm<sup>3</sup>) with 40 lux intensity light in the center. The virtual central zone measured 20 × 20 cm<sup>2</sup>. Mice were introduced into one corner of the arena and allowed to freely explore the open field for 600 s. The distance traveled in the arena was evaluated by video tracking (Ethovision XT 14.0, Noldus, Wageningen, Netherlands) as an index of locomotor activity.

### Anxiety-like behavior

The light/dark box test was performed in a two compartmented arena. One compartment is a black closed chamber deprived of light (15 × 21 × 21 cm<sup>3</sup>) and the other is white exposed to a 120 lux intensity light (30 × 21 × 21 cm<sup>3</sup>, anxiogenic zone) linked by a rectangular opening (7 × 5 cm<sup>2</sup>). Mice were introduced into the dark compartment and allowed to freely explore the arena for 360 s. The time, and distance traveled in the light zone were evaluated by video tracking (Ethovision XT 14.0) as an index of an anxiety-related response.

### Anatomical validation of AAV injections

After experiments, histological analysis was performed to control for location of AAV injection and expression. Mice that did not show viral expression (tdTomato, mCherry or eGFP fluorescence) or proper targeting were not included in subsequent data analysis. In addition, Cre-driven recombination of the floxed exon 2 of *Slc17a8* was validated using *in situ* hybridization (ISH).

### *In situ* hybridization (ISH)

To estimate the proportion of 5-HT neurons expressing VGLUT3 in the mouse anterior raphe nuclei, we used a digoxigenin (DIG)-labeled probe directed against VGLUT3 mRNA (*Slc17a8*; GenBank: NM\_182959.3; corresponding to nucleotides 1899–2320) and a fluorescein-labeled probe to detect the mRNA encoding TPH2 (tryptophan hydroxylase type 2; GenBank: NM\_173391.3; corresponding to nucleotides 270–1262), a marker of 5-HT neurons.

To control that Cre expression is restricted to VGLUT3 expressing neurons in VGLUT3<sup>Cre</sup> mice, we used a DIG-labeled probe directed against the Cre recombinase (GenBank: AB\_449974.1; corresponding to nucleotides 245–1060) and a fluorescein-labeled probe to detect the mRNA encoding VGLUT3.

To validate reduced VGLUT3 expression mediated by AAV-Cre injection in the DR, we used a DIG-labeled Probe (Probe 1, corresponding to nucleotides 425–595) for detection of exon 2. Probe 1 identifies cells expressing the wild-type VGLUT3 mRNA while recombined cells lack Probe 1 labeling. We additionally labeled TPH2 mRNA by using a fluorescein-labeled probe (see above).

To validate SERT<sup>VGLUT3.cKO</sup> mice, a two-probe approach was implemented to identify cells expressing the VGLUT3 mRNA missing exon 2 generated by the Cre-driven recombination of the floxed *Slc17a8*. DIG-labeled Probe 1 (corresponding to nucleotides 425–595) was designed for detection of exon 2 and fluorescein-labeled Probe 2 (corresponding to nucleotides 1899–2320) for detection of exon 12 of VGLUT3 mRNA, respectively. Recombined cells can thus be identified based on lack of Probe 1 labeling and presence of probe 2 labeling as previously described for the gene encoding the vesicular monoamine transporter 2.<sup>103</sup> To further assess whether recombination occurs in 5-HT neurons, we additionally labeled TPH2 mRNA by using a fluorescein-labeled probe (see above).

Mice were euthanized and brains were quickly removed, frozen in isopentane chilled at –30°C and stored at –20°C. The frozen brains were cut into three series of 14- $\mu$ m-thick coronal sections at the level of the DR using a cryostat (CM3050S; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) and thaw-mounted onto poly-L-lysine-coated glass slides (Superfrost Plus, Menzel Glaser, Braunschweig, Germany). The collected sections were stored at –80°C before being processed for ISH labeling.

Dual fluorescent ISH (FISH) was performed as described previously.<sup>104</sup> Briefly, complementary RNA probes were synthesized with DIG- or fluorescein-labeled ribonucleoside tri-phosphate (Sigma-Aldrich). The specificity of the probes was verified using NCBI blast. Cryosections were air-dried, fixed in 4% paraformaldehyde and acetylated in 0.25% acetic anhydride/100 mM triethanolamine (pH = 8). Sections were hybridized for 18 h at 65°C in 100  $\mu$ L of formamide-buffer containing 1  $\mu$ g/mL DIG-labeled riboprobe and 1  $\mu$ g/mL fluorescein-labeled riboprobe. Sections were washed at 65°C with SSC buffers of decreasing strength, and blocked with 20% fetal bovine serum (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) and 1% blocking solution (Sigma-Aldrich). Fluorescein epitopes were detected with horseradish peroxidase (HRP) conjugated anti-fluorescein antibody at 1:5000 (Roche, Mannheim, Germany; Cat# 11426346910, RRID: AB\_840257) and revealed using Cy2-tyramide at 1:250. HRP-activity was stopped by incubation of sections in 0.1 M glycine followed by a 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. DIG epitopes were detected with HRP anti-DIG Fab fragments at 1:3000 (Roche, Mannheim, Germany; Cat# 11207733910, RRID: AB\_514500) and revealed using Cy3 tyramide at 1:100. At the end of these procedures, sections were coverslipped with Fluoromount-G mounting medium (Southern Biotech, Birmingham, AL) and stored in the dark at 4°C before microscopy and imaging. For combined FISH and brightfield ISH, the protocol was the same as described above until revelation as described previously.<sup>105</sup> Briefly, fluorescein epitopes were detected with HRP conjugated anti-fluorescein antibody at 1:5000 and revealed using Cy2 tyramide at 1:250. DIG epitopes were detected with alkaline phosphatase conjugated anti-Dig antibody at 1: 1000 (Roche, Mannheim, Germany. Cat# 11093274910, RRID: AB\_514497) and signal developed with NBT/BCIP (*p*-nitroblue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate; 1/100).

### Immunohistochemistry (IHC)

To identify whether VGLUT3 terminals originating from the DR display a mixed glutamate/5-HT phenotype, we performed 5-HT immunolabeling in VGLUT3<sup>Cre</sup> mice injected with an AAV-Flex-tdTomato in the DR.

To study the effects of chemogenetic activation of DR<sup>VGLUT3</sup> neurons, mice were injected with CNO (1 mg/kg) and perfused 90 min later. Brains were processed for c-Fos immunolabeling.

To assess stress-induced c-Fos expression in DR<sup>VGLUT3</sup> neurons, VGLUT3<sup>EYFP</sup> male mice were perfused at the end of the 90-min RS or 1 h after the 25-min SD. Brains were processed for triple Fos/EYFP/TPH2 immunolabeling. To assess stress-induced c-Fos expression in DR<sup>VGLUT3</sup> neurons projecting to the VTA, VGLUT3<sup>Cre</sup> male mice injected with a rAAV-dlox-GFP in the VTA were perfused 1 h after the 25-min SD. Brains were processed for triple c-Fos/GFP/TPH2 immunolabeling. Control groups consist of unstressed mice left in their home cage and briefly manipulated before being perfused 90 min later.

Mice were sedated with sodium pentobarbital (80 mg/kg, i.p.) and perfused intracardially with 50 mL of 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 154 mM NaCl, pH 7.4). The brains were removed and post-fixed overnight. Then, three series of 35  $\mu$ m-thick coronal brain sections were cut using a vibratome (VT-1000, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), and stored in PBS-azide (0.02%) solution at 4°C before use.

Brain sections were incubated at 4°C for 48 h with primary antibodies in PBS containing 0.3% Triton X-100 (Sigma Aldrich) and 4% normal horse serum (Thermo Fisher Scientific). 5-HT was detected with a rabbit polyclonal anti-5-HT (1:5000; Sigma-Aldrich; #S5545, Lot #075K4779; RRID: AB\_477522). A rabbit polyclonal anti-c-Fos antiserum was used to detect c-Fos (1:2000; Abcam, Cambridge, UK; #190289, Lot #GR3244475-2 and #GR1065369-1, RRID: AB\_2737414). EYFP and GFP were detected with a chicken polyclonal anti-GFP (1:2000; Aves Labs, Portland, OR, USA; #1020, Lot #3717982; RRID: AB\_10000240). TPH2 was detected with a mouse monoclonal anti-TPH2 (1:1000; Sigma-Aldrich; #T0678, Lot #064M4815V; RRID: AB\_261587 or Abcam; #211528-1001, Lot #GR3344910-18).

For single c-Fos immunolabeling, sections were then rinsed in PBS supplemented with 0.1% Triton X-100 and incubated for 2 h with biotinylated anti-rabbit IgG (1:200 dilution; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA; #PI-1000, RRID: AB\_2313606) in PBS containing 4% BSA and 0.1% Triton X-100. Additional rinses were followed by incubation with avidin-biotin-horseradish peroxidase solution (ABC Vectastain Elite kit; Vector Laboratories) for 1 h, and c-Fos immunoreactivity was visualized as a brown reaction



product after incubation of the sections with 0.04% (w/v) of 3,3'-diaminobenzidine (DAB; Sigma-Aldrich) in PBS, supplemented with increasing concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (from 0.00015 to 0.0048%). Stained sections were mounted on poly-L-lysine-coated glass slides, dehydrated, and coverslipped with Eukitt mounting medium (Thermo Fisher Scientific).

For dual c-Fos/EYFP or c-Fos/GFP immunolabeling, sections were rinsed after incubation with primary antibodies in PBS and incubated for 1 h with anti-rabbit IgG coupled to Alexa Fluor 594 (1/1000; Thermo Fisher Scientific; Cat# A-21207; RRID: AB\_141637), and anti-chicken IgY coupled to Alexa Fluor 488 (1:1000; Thermo Fisher Scientific; Cat# A32931, RRID: AB\_2762843). For triple c-Fos/EYFP/TPH2 or Fos/GFP/TPH2 immunolabeling, sections were rinsed after incubation with primary antibodies in PBS and incubated for 1 h with anti-rabbit IgG coupled to Alexa Fluor 594 (1/1000; Thermo Fisher Scientific; Cat# A-21207; RRID: AB\_141637), anti-chicken IgY coupled to Alexa Fluor 488 (1:1000; Thermo Fisher Scientific; Cat# A32931, RRID: AB\_2762843) and anti-mouse IgG coupled to abberior STAR 635P (1/1000, Abberior GmbH, Göttingen, Germany; Cat# ST635-1001).

After rinses, sections were coverslipped with Fluoromount-G mounting medium (Thermo Fisher Scientific) and stored in the dark at 4°C before microscopy and imaging.

#### Nomenclature and abbreviations

The nomenclature used to describe the raphe nuclei was adopted, for the most part, from subsequent reports in the mouse brain.<sup>16,106</sup> We distinguished the B9 group and 5-HT neurons in the interpeduncular complex (IP), the median raphe nucleus (MnR, that includes the B8 and B5 cell groups), the dorsal raphe nucleus (DR; B7 [rostral part] and DRc; B6 [caudal part] groups). The DR was further subdivided into the ventral (DRv) part, the lateral (DRl) part and the dorsal part (DRd).

Other abbreviations used include anterior commissure (aca); aqueduct (aq); basal forebrain (BF); basolateral amygdala (BLA); diagonal band nucleus (NDB); fourth ventricle (4V); locus coeruleus (LC); magnocellular nucleus (MA); medial forebrain bundle (mfb); mesencephalic trigeminal nucleus (me5); nucleus accumbens (NAc); parabrachial region (PB); external lateral parabrachial subnucleus (PBel); prelimbic cortex (PL); superior cerebellar peduncle (scp); tryptophan hydroxylase type 2 (TPH2); ventral tegmental area (VTA); vesicular glutamate transporter type 3 (VGLUT3).

#### QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

##### Sleep analysis

EMG and EEG signals were recorded with Somnologica software (Medcare, Reykjavik, Iceland), amplified, analog-to-digital converted (2 kHz) and down-sampled at 100 Hz (EMG) or 200 Hz (EEG), and digitalized by an AddLife A/D Module. Polygraphic sleep recordings were visually scored offline every 10 s as wake (W), non-REMS (NREMS) and REMS following classical criteria using the Somnologica software (Medcare). Vigilance states amounts for each animal were expressed as minutes per 3 h, 6 h or 12 h intervals. The sleep architecture was assessed by calculating the mean duration and frequency of vigilance states bouts (a bout could be as short as one epoch).

##### Image acquisition and processing

For FISH and tracing experiments and single c-Fos labeling, slides were scanned on a NanoZoomer 2.0-HT (Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japan) at 20× resolution. Laser intensity and time of acquisition were set separately for each labeling. Image microphotographs were analyzed using the NDP2.view software (Hamamatsu Photonics). For dual/triple fluorescent immunolabeling, images were acquired using confocal laser scanning microscope (Leica TCS SP5 with LCS Leica software). For illustration purposes, the images were exported in TIFF format and were then corrected for contrast, cropped and assembled on Photoshop CS2 (version 9.0; Adobe Systems, Mountain View, CA, USA). Finally, additional indications and/or anatomical landmarks were incorporated.

##### Quantification of labeling

Dual FISH was imaged using the NanoZoomer 2.0-HT. All single VGLUT3-, TPH2-, and double VGLUT3/TPH2-mRNA labeled neurons in the different raphe nuclei were counted in 2–6 different brain sections, 85 μm apart, without considering the intensity of the staining. For each mouse, the number of labeled cells of each type was then averaged.

Single c-Fos immunolabeling was imaged using the NanoZoomer 2.0-HT. Brain regions of interest were delineated using the mouse brain atlas.<sup>43</sup> For each region, c-Fos positive cells were counted in 2–4 sections per mouse, 105 μm apart, without considering the intensity of the signal. For each mouse, the number of labeled cells for a given structure was then averaged.

Fluorescent immunolabeling was imaged using a confocal laser scanning microscope (Leica TCS SP5 with LCS Leica software). Cell counts were performed using the Fiji ImageJ software and QuPath v0.5. For dual labeling, all single EYFP and double EYFP/c-Fos labeled neurons in the DR were counted in two different brain sections, 105 μm apart, at 2 different Z-stacks without considering the intensity of the staining. For triple labeling, all single EYFP (or GFP), double EYFP (or GFP)/c-Fos labeled neurons TPH2 immunonegative (TPH2-) and triple EYFP (or GFP)/c-Fos TPH2 immunopositive (TPH2+) labeled neurons in the DR were counted in two different brain sections, 105 μm apart, at 2 different Z-stacks without considering the intensity of the staining. Neurons expressing VGLUT3 were identified by the presence of an EYFP/GFP signal visible within both the soma and nuclei of neurons. VGLUT3/TPH2-positive neurons were identified by the presence of overlapping EYFP/GFP and TPH2 signals. VGLUT3/c-Fos positive neurons exhibited a confined c-Fos signal within the nucleus of neurons displaying EYFP/GFP signal. VGLUT3/c-Fos/TPH2+ neurons exhibited a confined c-Fos



signal within the nucleus of neurons exhibiting overlapping EYFP/GFP and TPH2 signals within the soma. For each mouse, the number of labeled cells of each type was then averaged.

To control for Cre-LoxP-mediated deletion of *Slc17a8* mediated by AAV-Cre injection in the DR of VGLUT3<sup>lox/lox</sup> mice, single VGLUT3 mRNA labeling in the raphe nuclei was assessed in 5 different brain sections, 85  $\mu$ m apart. Quantifications of VGLUT3-positive signal were performed using ImageJ software, taking into account the cells with immunofluorescence above a threshold chosen to obtain optimal signal-to-noise ratio. Intensity of the staining was then evaluated after background subtraction. For each mouse, total VGLUT3 amounts were assessed in the DR and the MnR. Results are presented as normalized over the averaged total VGLUT3 amounts of control mice (-Cre).

#### Statistics

Data are presented as mean  $\pm$  SEM. All data were analyzed using Prism 9.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Normality assumptions were first verified prior to the use of any parametric tests (D'Agostino & Pearson normality test or Shapiro-Wilk normality test). In case of violation of normality assumption, non-parametric tests were used or data were log transform. We performed two-way analysis of variance (ANOVA) and repeated measure two-way analysis of variance (RM ANOVA). If significant effects were observed, post-hoc t-tests with Bonferroni corrections for multiple comparisons were performed. We also performed one-way ANOVA or Mann-Whitney test to compare group means. Statistical analyses are described in [Table S6](#). Data were considered to be statistically significant when  $p < 0.05$ . All tests were performed on raw data.

2. Article : Pinto et al. (2024), Journal of Cell Biology

« Microglial TNF $\alpha$  controls daily changes in synaptic GABAARs and sleep slow waves »

ARTICLE

# Microglial TNF $\alpha$ controls daily changes in synaptic GABA $_A$ Rs and sleep slow waves

Maria Joana Pinto<sup>1</sup>, Lucy Bizien<sup>1</sup>, Julie M.J. Fabre<sup>1</sup>, Nina Đukanović<sup>1</sup>, Valentin Lepetz<sup>1</sup>, Fiona Henderson<sup>2</sup>, Marine Pujol<sup>2</sup>, Romain W. Sala<sup>1</sup>, Thibault Tarpin<sup>1</sup>, Daniela Popa<sup>1</sup>, Antoine Triller<sup>1</sup>, Clément Léna<sup>1</sup>, Véronique Fabre<sup>2</sup>, and Alain Bessis<sup>1</sup>

**Microglia sense the changes in their environment. How microglia actively translate these changes into suitable cues to adapt brain physiology is unknown. We reveal an activity-dependent regulation of cortical inhibitory synapses by microglia, driven by purinergic signaling acting on P2RX7 and mediated by microglia-derived TNF $\alpha$ . We demonstrate that sleep induces microglia-dependent synaptic enrichment of GABA $_A$ Rs in a manner dependent on microglial TNF $\alpha$  and P2RX7. We further show that microglia-specific depletion of TNF $\alpha$  alters slow waves during NREM sleep and blunt memory consolidation in sleep-dependent learning tasks. Together, our results reveal that microglia orchestrate sleep-intrinsic plasticity of synaptic GABA $_A$ Rs, sculpt sleep slow waves, and support memory consolidation.**

## Introduction

Microglia, the immune cells of the brain, tune neuronal networks in the healthy brain by finely modulating synapses (Kettenmann et al., 2013). They can sculpt developing circuits and remodel neuronal connectivity in adulthood by adjusting synapse density, function, and plasticity (Favuzzi et al., 2021; Nguyen et al., 2020; Parkhurst et al., 2013; Schafer et al., 2012; Wang et al., 2020). Microglia accomplish these functions either by direct interaction with synaptic elements (Miyamoto et al., 2016a; Schafer et al., 2012) or through the release of factors (Lewitus et al., 2016; Parkhurst et al., 2013). Many of the latter, such as prostaglandin, BDNF, IL-1 $\beta$ , or TNF $\alpha$ , control synaptic plasticity and were independently shown to regulate sleep (Porkka-Heiskanen, 2013). Recent work highlights the ability of microglia to control sleep duration (Corsi et al., 2022; Liu et al., 2021); however, whether and how microglia-released factors shape sleep remains unclear.

TNF $\alpha$  not only regulates synaptic strength by supporting glutamatergic gliotransmission (Santello et al., 2011) but also controls the homeostasis of synaptic strength during synaptic scaling by adapting synaptic trafficking of AMPARs (Stellwagen and Malenka, 2006; Beattie et al., 2002). The role of TNF $\alpha$  in sleep was demonstrated by the administration of exogenous TNF $\alpha$  which promotes non-rapid eye movement (NREM) sleep (Fang et al., 1997; Yoshida et al., 2004) whereas inhibition of endogenous TNF $\alpha$  reduces NREM sleep (refs in Rockstrom et al.,

2018). Similarly, intracerebral or intraperitoneal injection of TNF $\alpha$  (Shoham et al., 1987) suppresses rapid eye movement (REM) sleep, which is increased in TNF $\alpha$  KO mice (Szentirmai and Kapás, 2019). Of note, transcriptomic analysis showed a near-exclusive expression of TNF $\alpha$  by microglia in the brain (Zamanian et al., 2012; Zeisel et al., 2018). Nevertheless, it remains unclear whether microglial TNF $\alpha$  is involved in sleep-associated synaptic plasticity and sleep regulation.

Sleep drives the plasticity of excitatory synapses. In the cortex, spine turnover during sleep is associated with learning and memory (Yang et al., 2014; Li et al., 2017) and, in parallel, wake-associated strengthening of excitatory synapses is downscaled during sleep (Diering et al., 2017; Vyazovskiy et al., 2008). These studies only focus on excitatory synapses, and the regulation of inhibitory synapses during sleep has barely been studied (Bridi et al., 2020). The likely, yet unknown, contribution of inhibitory plasticity is highlighted by the fact that cortical GABAergic inhibition regulates sleep oscillations including slow waves (Funk et al., 2017; Niethard et al., 2018) and that modulators of GABA $_A$ Rs are commonly used as sleeping pills (Dixon et al., 2015). Here, we uncover the molecular pathway underlying sleep-intrinsic microglia-dependent modulation of synaptic GABA $_A$ R in light versus dark periods. We then demonstrate that microglial TNF $\alpha$  shapes sleep slow waves and supports memory consolidation.

<sup>1</sup>Institut de Biologie de l'École Normale Supérieure (IBENS), École Normale Supérieure, CNRS, INSERM, Université PSL, Paris, France; <sup>2</sup>Neurosciences Paris Seine—Institut de Biologie Paris Seine (NPS—IBPS), CNRS, INSERM, Sorbonne Universités, Paris, France.

Correspondence to Alain Bessis: [alain.bessis@bio.ens.psl.eu](mailto:alain.bessis@bio.ens.psl.eu); Clément Léna: [clement.lena@bio.ens.psl.eu](mailto:clement.lena@bio.ens.psl.eu); Véronique Fabre: [veronique.fabre@inserm.fr](mailto:veronique.fabre@inserm.fr).

© 2024 Pinto et al. This article is distributed under the terms of an Attribution-Noncommercial-Share Alike-No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.rupress.org/terms/>). After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution-Noncommercial-Share Alike 4.0 International license, as described at <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>).

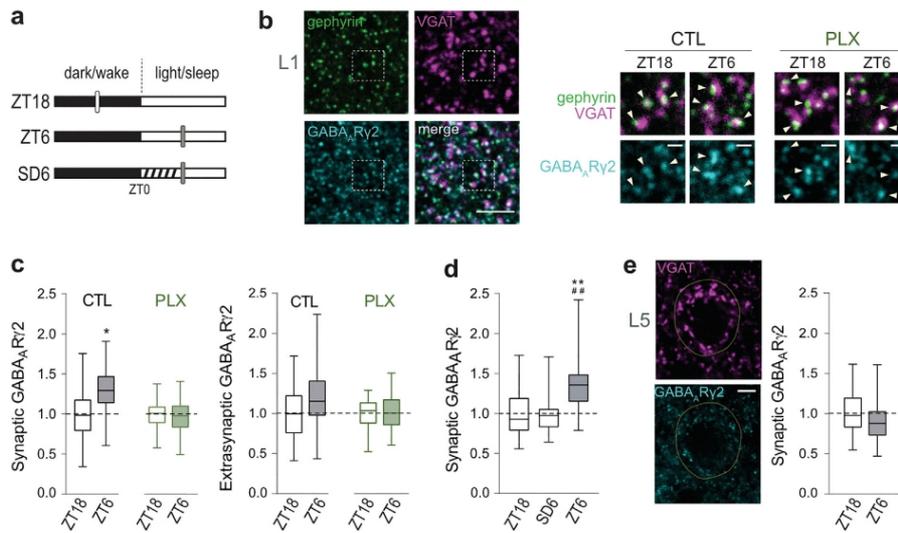
Rockefeller University Press

J. Cell Biol. 2024 Vol. 223 No. 7 e202401041



<https://doi.org/10.1083/jcb.202401041>

1 of 17



**Figure 1. Plasticity of GABA<sub>A</sub>R in light versus dark is sleep- and microglia-dependent.** (a) Experimental groups: mice in dark phase (ZT18), mice in light phase (ZT6), and mice submitted to sleep deprivation (dashed) in the light phase (SD6). Vertical bars: time of perfusion. (b) Representative images showing enrichment of GABA<sub>A</sub>R2 (cyan) at cortical L1 inhibitory synapses in the light phase (ZT6). Arrowheads: GABA<sub>A</sub>R2 clusters at gephyrin<sup>+</sup>VGAT<sup>+</sup> synapses in control (CTL) or PLX3397-treated mice (PLX). Scale bars, 5 and 1 μm. The dashed box corresponds to CTL at ZT18. (c and d) Mean intensity of GABA<sub>A</sub>R2 clusters at gephyrin<sup>+</sup>VGAT<sup>+</sup> synapses (synaptic) and at extrasynaptic sites normalized to ZT18. *n* = 48–65 fields of view (FOVs) from 4 to 5 mice per group. \**P* < 0.05, nested two-tailed *t* test; \*\**P* < 0.01 compared with ZT18 and \*\*\**P* < 0.01 compared with SD6, nested one-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparison test. (e) Left: Representative confocal images of VGAT and GABA<sub>A</sub>R2 in cortical L5. Yellow line delineates soma identified by NeuN staining. Scale bar, 5 μm. Right: Mean intensity of GABA<sub>A</sub>R2 at somatic VGAT<sup>+</sup> clusters in L5 normalized to ZT18. *n* = 60 FOVs from five mice per group. No statistical significance by nested two-tailed *t* test. (c–e) Results are presented as minimum to maximum box plots.

## Results

### Daily modulation of GABA<sub>A</sub>Rs in a sleep- and microglia-dependent manner

We first analyzed the modulation of synapses in the frontal cortex in light versus dark by measuring the synaptic content of neurotransmitter receptors (Figs. 1, S1, and S2). Mice sleep more during the light phase and spend most of the dark phase awake. Therefore, we compared the brains of mice at Zeitgeber time 18 (ZT18; dark/middle of wake phase) and at ZT6 (light/middle of sleep phase; Fig. 1a). We focused on cortical layer 1 (L1) which is a key node for wide-scale cortical computation (Schuman et al., 2021). Consistent with the well-established downscaling of excitatory synapses during sleep (Diering et al., 2017), synaptic accumulation of the AMPA receptor subunit GluA2 was modestly but significantly decreased at ZT6 as compared with ZT18 (Fig. S1). Of note, this level of change is comparable with previous analysis of daily changes in synaptic AMPARs (Diering et al., 2017; Noya et al., 2019). Yet, analysis of L1 inhibitory synapses revealed an increased enrichment of synaptic, but not extra-synaptic, GABA<sub>A</sub>R-γ2 and -α1 subunits at ZT6 (Fig. 1, a–c and Fig. S2, b–d), as well as an enhanced proportion of inhibitory synapses containing a GABA<sub>A</sub>R cluster (Fig. S2 e). No changes were observed in the total signal of GABA<sub>A</sub>Rs (Fig. S2 g), supportive of redistribution of the receptors rather than changes in

expression. In contrast, in layer 5 (L5), the synaptic content of GABA<sub>A</sub>R2 did not significantly differ between ZT6 and ZT18 (Fig. 1 e and Fig. S2 f). These results reveal a novel form of regulation of GABAergic synapses in light versus dark periods with synaptic enrichment of GABA<sub>A</sub>Rs in L1 during the light phase (ZT6), which likely contributes to the upregulation of inhibitory transmission in the upper cortex during this phase (Bridi et al., 2020).

To discriminate between a sleep-intrinsic or time-of-day-dependent regulation of synaptic GABA<sub>A</sub>R in L1, mice were forced to stay awake during their normal sleep period (sleep deprivation from ZT0 to ZT6, SD6; Fig. 1 a). The synaptic content of GABA<sub>A</sub>R was not different between mice at ZT18 and mice sleep-deprived in the light phase (SD6; Fig. 1 d), showing that modulation of synaptic GABA<sub>A</sub>R in L1 is driven by sleep-dependent mechanisms. Sleep deprivation has previously been shown to increase GABA<sub>A</sub>Rs located around excitatory somas at cortical layers 2–6 (Del Cid-Pellitero et al., 2017). In our study, we focused on cortical L1, where most of the inhibitory synapses are dendritic (Tremblay et al., 2016). Together, this suggests that the expression of GABA<sub>A</sub>Rs is differentially regulated by sleep depending on their subcellular localization.

We have previously shown that microglia control the accumulation of receptors at inhibitory synapses in the spinal cord

Pinto et al.

Microglial TNFα controls synaptic GABA<sub>A</sub>Rs

Journal of Cell Biology

2 of 17

<https://doi.org/10.1083/jcb.202401041>

(Cantaut-Belarif et al., 2017). This prompted us to investigate the involvement of microglia in the modulation of synaptic GABA<sub>A</sub>R in light versus dark periods. Strikingly, microglia depletion by feeding mice with the CSF1R antagonist PLX3397 (Elmore et al., 2014) (PLX; Fig. S2, a and b) completely prevented the changes in synaptic GABA<sub>A</sub>Rs content between ZT6 and ZT18 (Fig. 1 c and Fig. S2, b and e). Importantly, as already shown (Corsi et al., 2022; Liu et al., 2021), microglia depletion does not alter sleep during the light phase (Fig. S2, h and i; and Table S1), discarding the possibility that lack of synaptic GABA<sub>A</sub>Rs enrichment upon PLX3397 treatment results from perturbed sleep during the light phase. This shows that the sleep-dependent modulation of synaptic GABA<sub>A</sub>R in L1 requires microglia. Moreover, microglia depletion also reversed the reduction of synaptic AMPA receptor subunit GluA2 at ZT6 (Fig. S1), which agrees with the recent demonstration that light/dark changes in excitatory synaptic strength are microglia-dependent (Corsi et al., 2022), a function that has been attributed to CX3CR1 signaling (Corsi et al., 2022) and that was not further explored in this study.

#### Modulation of synaptic GABA<sub>A</sub>R by microglial P2RX7-TNFα signaling via CaMKII

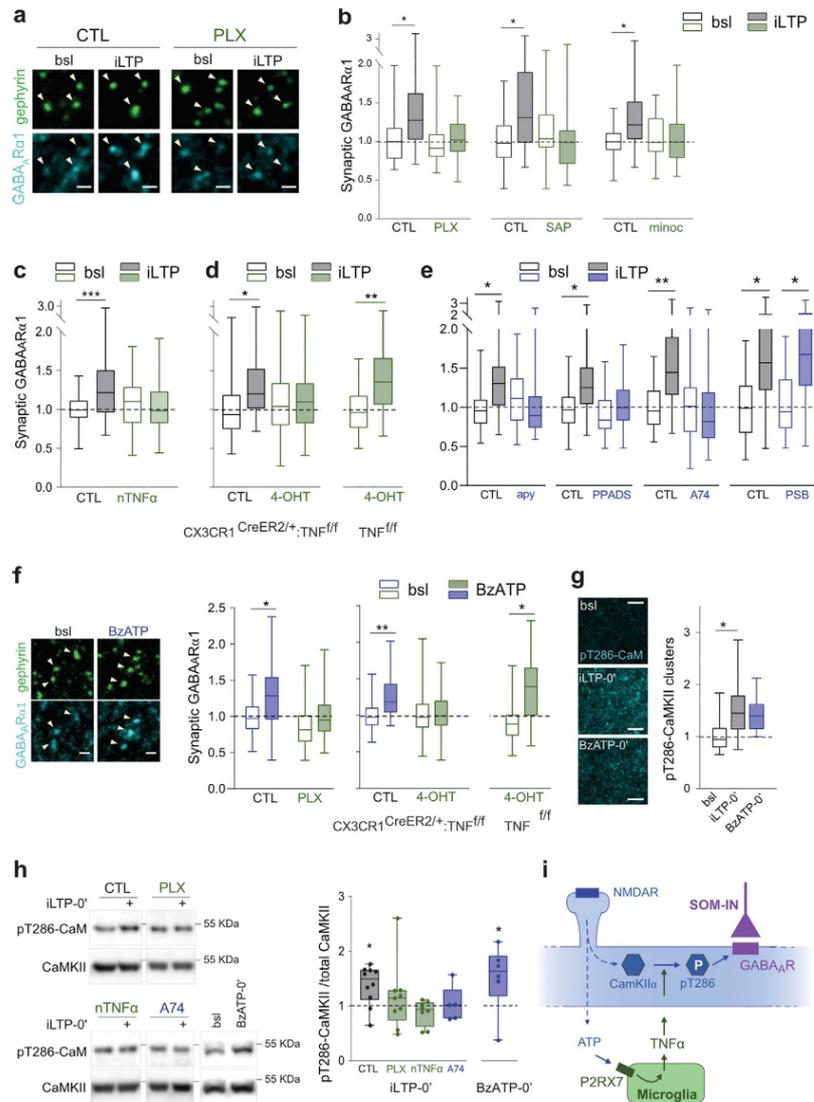
We next sought to identify the molecular pathway underlying this novel microglia-dependent synaptic regulation. To accomplish so, we identified the molecular candidates regulating synaptic GABA<sub>A</sub>Rs enrichment in an ex vivo paradigm of plasticity (Fig. 2) and subsequently validated these candidates in vivo (Fig. 3). During sleep, excitatory synaptic plasticity is triggered by NMDAR-dependent dendritic calcium spikes in L1 (Li et al., 2017). We thus selected an NMDA-induced GABAergic plasticity protocol, known as inhibitory long-term potentiation (iLTP). This form of plasticity, known to drive depression of excitatory synapses (Lee et al., 1998), also leads to upregulation of synaptic GABA<sub>A</sub>Rs (Petrini et al., 2014) in pyramidal neurons specifically at somatostatin interneurons inputs (SOM-IN) (Chiu et al., 2018), which are mainly located in L1 (Tremblay et al., 2016) (Fig. S3). In agreement with the SOM-IN topographical organization, NMDA-induced iLTP in brain organotypic slices led to specific synaptic enrichment of GABA<sub>A</sub>Rs in L1 but not in L5 somatic synapses (Fig. 2, a and b; and Fig. S4, b-d). This protocol thus mimics ex-vivo the synaptic regulations occurring in light versus dark, and we used it to identify the actors of the L1-restricted sleep-dependent synaptic enrichment of GABA<sub>A</sub>Rs (Fig. 1). We further demonstrated that this form of GABA<sub>A</sub>R plasticity was completely abolished when microglia were depleted by PLX (Fig. 2, a and b; and Fig. S4, a and c). We ruled out possible secondary effects of PLX by showing the same effect upon microglia depletion using Mac1-Saporin (SAP) (Fig. S4 a) or inactivation using minocycline (Fig. 2 b).

Microglia produce a broad repertoire of signaling molecules that regulate synaptic function (Kettenmann et al., 2013). TNFα, which is mostly if not exclusively produced by microglia in the brain (Zeisel et al., 2018), controls basal synaptic strength (Santello et al., 2011), neurotransmitter receptors' dynamics, and homeostatic synaptic plasticity (Stellwagen and Malenka, 2006). We thus hypothesized that microglial TNFα controls the activity-dependent regulation of synaptic GABA<sub>A</sub>R. Indeed,

neutralization of TNFα by specific antibodies (Fig. 2 c) as well as conditional microglia-specific TNFα depletion (Fig. 2 d and Fig. S5 a) prevented the enrichment of synaptic GABA<sub>A</sub>R upon iLTP. Soluble TNFα derives from the cleavage of a membrane form of TNFα by the TNFα-converting enzyme (TACE) (Black et al., 1997). Both forms can signal through TNFR1, whereas TNFR2 is only activated by membrane TNFα (Hollbrook et al., 2019). The increase of synaptic GABA<sub>A</sub>Rs on iLTP-treated slices was prevented by TAPI-1, a TACE inhibitor, and by a TNFR1-but not by a TNFR2-neutralizing antibody (Fig. S5 b). Finally, we showed that recombinant TNFα and activation of TNFR1 were sufficient to increase synaptic accumulation of GABA<sub>A</sub>Rα1 (Fig. S5, c-f). These experiments show that microglial soluble TNFα acting through TNFR1 mediates the activity-dependent regulation of GABA<sub>A</sub>Rs in L1.

We next identified the signaling pathway between neurons and microglia leading to TNFα release upstream of GABA<sub>A</sub>Rs regulation. We first demonstrated that the well-established neuronal CX<sub>3</sub>CL1-microglial CX<sub>3</sub>CR1 signaling, with known roles in synaptic plasticity (Rogers et al., 2011), is not involved (Fig. S4 e). Microglia behavior is finely tuned by ATP via an array of purinergic receptors (Madry and Attwell, 2015). Microglial cells rapidly react to ATP following the activation of neurons by glutamate and NMDA (Li et al., 2012; Dissing-Olesen et al., 2014; Badimon et al., 2020), and the stimulation of microglial P2RX7 promotes the release of TNFα (Suzuki et al., 2004). We thus investigated whether NMDA-induced release of ATP causes microglia-mediated modulation of synaptic GABA<sub>A</sub>R. Indeed, apyrase, a promoter of ATP hydrolysis, PPADS, a broad P2RX antagonist, or A740003, a specific P2RX7 antagonist, prevented the increase of synaptic GABA<sub>A</sub>R upon iLTP. In contrast, PSB0739, a specific inhibitor of P2RY12 (Hoffmann et al., 2009), had no effect on synaptic GABA<sub>A</sub>R upon iLTP, suggesting that P2RY12 is not involved in this regulation (Fig. 2 e). Moreover, BzATP, a P2RX7 agonist (Surprenant et al., 1996), was sufficient to increase postsynaptic GABA<sub>A</sub>Rα1 in L1 (Fig. 2 f; and Fig. S6, a and b) but not in L5 (Fig. S6 c). Of note, BzATP had no effect when microglia were depleted or when TNFα was specifically inactivated in microglia (Fig. 2 f). Thus, ATP/P2RX7 signaling acts upstream of microglial TNFα release to modulate synaptic accumulation of GABA<sub>A</sub>R.

Finally, we explored the intracellular signaling downstream of microglial TNFα. CaMKIIα is a central neuronal mediator of postsynaptic plasticity whose activity is triggered by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin and can be prolonged in a Ca<sup>2+</sup>-independent manner by its autophosphorylation at Thr286 (Bayer and Schulman, 2019). Upon iLTP, Thr286-autophosphorylated CaMKIIα leads to the insertion of GABA<sub>A</sub>Rs at synapses (Marsden et al., 2010). We reasoned that TNFα may modulate CaMKIIα Thr286-phosphorylation, as observed in non-neuronal cells (Defer et al., 2007). Indeed, Thr286-phosphorylation of CaMKII was increased in L1 upon iLTP (Fig. 2 g), and this increase was abolished by microglial depletion and by blocking P2RX7 or TNFα signaling (Fig. 2 h). In agreement, BzATP, which upregulates the synaptic content of GABA<sub>A</sub>Rs via a microglial relay, was sufficient to enhance CaMKII Thr286-phosphorylation (Fig. 2, g and h). The finding that CaMKII Thr286 phosphorylation,



**Figure 2. Microglial P2RX7-TNF $\alpha$  signaling drives GABA $_A$ Rs synaptic enrichment through CaMKII $\alpha$  phosphorylation.** (a) Representative confocal images showing increase of GABA $_A$ R $\alpha$ 1 (cyan) at gephyrin $^+$  clusters (arrowheads) upon NMDA-induced inhibitory long-term potentiation (iLTP: 2 min 20  $\mu$ M NMDA/10  $\mu$ M CNQX plus 20 min recovery) in organotypic slices cortical L1 (CTL: control; bsl: baseline). Scale bars, 1  $\mu$ m. (b-e) Mean intensity of GABA $_A$ R $\alpha$ 1 clusters at gephyrin $^+$  cluster normalized to CTL at bsl.  $n$  = FOVs/independent experiments: (b)  $n$  = 44–69/5–6; (c)  $n$  = 47–53/5–7; (d)  $n$  = 66–102/5–7; (e)  $n$  = 49–68/7–9. \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01 and \*\*\* $P$  < 0.001, nested one-way ANOVA followed by Sidak’s multiple comparison test. iLTP-induced synaptic GABA $_A$ R enrichment is abolished by: b, microglia depletion/inactivation (PLX: PLX3397; SAP: Mac1-saporin; minoc: minocycline); c, neutralization of TNF $\alpha$  (nTNF $\alpha$ ); d, microglia-specific TNF $\alpha$  deletion through 4-hydroxy-tamoxifen (4-OHT)-induced recombination on CX3CR1<sup>CreERT2/+</sup>;TNF<sup>fl/fl</sup> but not on a TNF<sup>fl/fl</sup> background; e, ATP hydrolysis (apy), P2RX7 antagonist (PPADS) and P2RX7 antagonist (A74), but not P2Y12R inhibitor (PSB). (f) Left: Confocal images of GABA $_A$ R $\alpha$ 1 (cyan) at gephyrin $^+$  clusters (arrowheads) in bsl and upon BzATP treatment. Scale bars, 1  $\mu$ m. Right: Mean intensity of GABA $_A$ R $\alpha$ 1 clusters at gephyrin $^+$  clusters normalized to CTL at bsl.  $n$  = 49–63/5–6. \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, nested one-way ANOVA followed by Sidak’s multiple comparison test. (g) Left: Thr286-

Pinto et al.  
Microglial TNF $\alpha$  controls synaptic GABA $_A$ Rs

Journal of Cell Biology 4 of 17  
<https://doi.org/10.1083/jcb.202401041>

phosphorylated CaMKII is enhanced in L1 at the induction phase of plasticity (iLTP0' or BzATP0'). Scale bars, 5  $\mu$ m. Right: Mean intensity of Thr286-phosphorylated CaMKII puncta normalized to bsl.  $n = 25$  to 33 FOVs from three independent experiments. \* $P < 0.05$ , one-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparison test. (h) Left: Western blot analysis showing iLTP0'-induced CaMKII Thr286-phosphorylation. Right: Ratio between Thr286-phosphorylated CaMKII and total CaMKII normalized to the respective iLTP-free control.  $n = 5-9$  independent experiments. \* $P < 0.05$  compared with respective control, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test. (b-h) Results are presented as minimum to maximum box plots. (i) Model. ATP released downstream NMDA-induced neuronal activity activates microglial P2RX7 which triggers the release of microglial TNF $\alpha$ . TNF $\alpha$  signaling gates CaMKII $\alpha$  autophosphorylation which controls the enrichment of synaptic GABA $_A$ Rs in pyramidal neurons. Source data are available for this figure: SourceData F2.

and therefore its activity, is gated by microglial TNF $\alpha$  downstream neuronal activity emphasizes a cardinal position of microglia in fine-tuning synapses.

Collectively, our results support a bidirectional neuron-microglia crosstalk underlying activity-driven GABAergic potentiation in L1 (Fig. 2 i): ATP released downstream neuronal activity activates microglial P2RX7 with concomitant release of TNF $\alpha$  which modulates CaMKII autophosphorylation and thereby enrichment of synaptic GABA $_A$ Rs. Noteworthy, our results do not exclude the possible involvement of other cell types acting between neurons and microglia.

#### Sleep-dependent modulation of synaptic GABA $_A$ R driven by P2RX7 and microglial TNF $\alpha$

Having shown that the microglial P2RX7/TNF $\alpha$  pathway controls L1 activity-dependent GABA $_A$ R plasticity via CaMKII autophosphorylation ex-vivo, we examined the involvement of this pathway in the sleep-dependent modulation of synaptic GABA $_A$ R in light versus dark (Fig. 1). We first showed that CaMKII Thr286-phosphorylation, but not total CaMKII levels, was increased in L1 at ZT6 (Fig. 3, a and b). Notably, such regulation was not found in L5 (Fig. S7 b). Next, we showed that Thr286-phosphorylation of CaMKII, as well as the synaptic content of GABA $_A$ Rs in L1, was not enhanced at ZT6 in mice with microglia-specific TNF $\alpha$  depletion (micTNF $\alpha$ -KO, Fig. S5 a) and in P2rx7-KO mice (Fig. 3, a-c; and Fig. S7, c and d). Importantly, loss of enhancement at ZT6 is likely not attributed to disturbed sleep since deletion of P2RX7 (Krueger et al., 2010) or deletion of microglial TNF $\alpha$  (as discussed in the next section, Fig. 4) do not cause major changes in baseline sleep (Table S2). This shows

that P2RX7 and microglial TNF $\alpha$  are required for daily fluctuations of CaMKII Thr286-phosphorylation and synaptic GABA $_A$ R in cortical L1, which occur in a manner dependent on sleep in the light phase.

#### NREM slow waves shaped by microglial TNF $\alpha$

The results above show that microglial TNF $\alpha$  is required for a novel sleep-dependent regulation of inhibitory synapses in cortical L1. TNF $\alpha$  is an established sleep factor; however, the contribution of microglial TNF $\alpha$  to physiological sleep remains unknown. Sleep is an alternation of REM and NREM sleep periods, which are hallmarked by major EEG oscillatory patterns (Adamantidis et al., 2019). During NREM sleep, slow waves in the delta frequency band (0.1-4 Hz), quantified as slow wave activity (SWA), result from the synchronous alternation of active (up) and silent (down) states of cortical neurons. Cortical GABAergic inhibition is a major actor of NREM sleep slow waves (Hay et al., 2021; Lemieux et al., 2015). We thus set out to explore the contribution of microglial TNF $\alpha$  in regulating sleep and shaping SWA. Sleep was analyzed using EMG and epidural EEG recordings, and we concentrated our analysis in the frontal cortex, where slow waves are predominant (Vyazovskiy et al., 2006). We first showed that microglial TNF $\alpha$  has limited effects on sleep-wake patterns as shown by the lack of major alterations in the amounts of wake, NREM, and REM sleep between micTNF $\alpha$ -KO and tCTL mice along a light/dark cycle (Fig. 4 a).

We then analyzed the spectral density of the EEG during sleep (Fig. 4 b). In agreement with a role of microglial TNF $\alpha$  in the regulation of SWA, we found a shift in the EEG spectral density toward lower frequency activity during NREM sleep

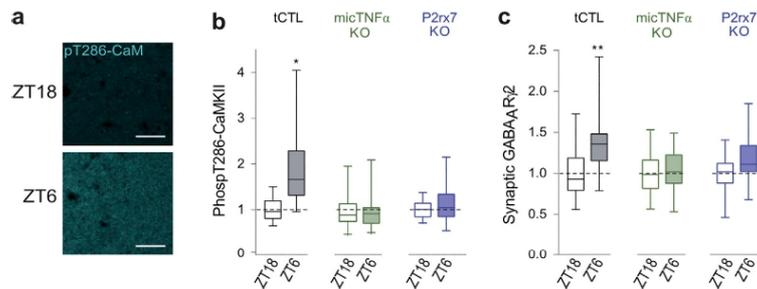


Figure 3. **P2RX7 and microglial TNF $\alpha$  promote daily changes in synaptic GABA $_A$ R content and CaMKII phosphorylation.** (a) Representative confocal images of Thr286-phosphorylated CaMKII immunoreactivity in L1 show higher intensity at ZT6 than ZT18 in transgenic control mice (tCTL). Scale bars, 20  $\mu$ m. (b) Mean intensity of Thr286-phosphorylated CaMKII signal in L1 normalized to ZT18 for tCTL, microglia-specific TNF $\alpha$  depletion (micTNF $\alpha$ -KO) and P2rx7-KO mice.  $n = 37-50$  FOVs from four to five mice per group. (c) Mean intensity of GABA $_A$ R $\beta$ 2 clusters at gephyrin<sup>+</sup>VGAT<sup>+</sup> synapses normalized to ZT18.  $n = 48$  to 65 FOVs from four to five mice per group. (b and c) \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ , nested two-tailed t-test. Results are presented as minimum to maximum box plots.

Pinto et al.

Microglial TNF $\alpha$  controls synaptic GABA $_A$ Rs

Journal of Cell Biology

5 of 17

<https://doi.org/10.1083/jcb.202401041>

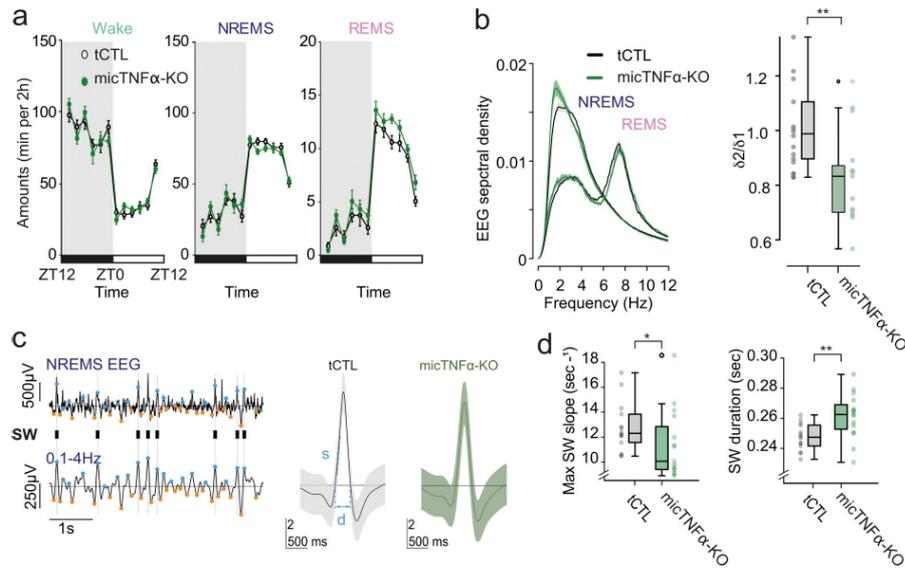


Figure 4. **Microglial TNF $\alpha$  modulates slow waves during NREMS.** (a) Amounts of vigilance states over 24 h reported by 2-h segments. Wake, NREMS, and REMS are not significantly different between tCTL and micTNF $\alpha$ -KO mice ( $n = 15$  mice per group; two-way RM-ANOVA,  $P = 0.1490$ ;  $P = 0.2784$ ,  $P = 0.6838$  respectively). (b) Left: Average spectral density (top) of tCTL and micTNF $\alpha$ -KO (lines: means; shaded area: SEM). Right: Ratio between power in faster delta frequencies ( $\delta_2$ , waves from 2.5 to 3.5 Hz) and slower delta frequencies ( $\delta_1$ , waves from 0.75 to 1.75 Hz) in NREM sleep (Mann-Whitney  $W = 169$ ,  $P = 0.0043$ ). (c) Left: Examples of EEG and 0.1–4 Hz filtered EEG during NREMS from a transgenic control tCTL; the positive and negative peaks of the delta-filtered signal are indicated by orange and blue points, respectively. Ticks on gray lines indicate large positive deflections corresponding to slow waves (SW). Right: Grand average SW for tCTL (black) showing duration (d) and maximum slope (s), and micTNF $\alpha$ -KO (green). (d) Characteristics of SW in a 24-h time period. micTNF $\alpha$ -KO mice exhibit significantly shorter peak onset slopes and longer SW duration than tCTL mice. Mann-Whitney  $W = 42$   $P = 0.005$  and  $W = 153$ ,  $P = 0.37$  respectively.  $n = 14$  tCTL and 15 micTNF $\alpha$ -KO respectively. (b [right] and d) Results are presented as minimum to maximum boxplots with the individual values of each mouse represented as datapoints.

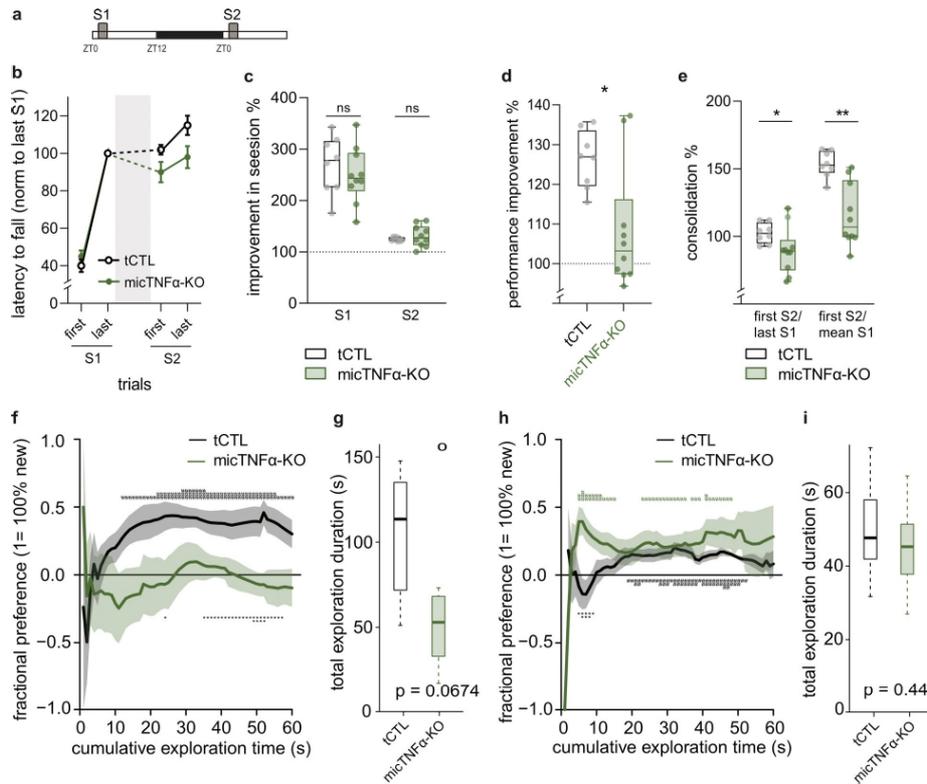
with a slower peak frequency in the delta range in micTNF $\alpha$ -KO as compared with tCTL with no change in the delta power (Wilcoxon test:  $W = 67$ ,  $P = 0.06$ ) (Fig. 4 b). More precisely, a significant difference between the fraction of total EEG spectral density in the  $\delta_1$  band (waves from 0.75 to 1.75 Hz; tCTL:  $0.123 \pm 0.004$ , micTNF $\alpha$ -KO:  $0.148 \pm 0.008$ ; mean  $\pm$  SEM; Wilcoxon statistics = 48,  $P$  value = 0.0120), but not in the  $\delta_2$  band (2.5–3.5 Hz; tCTL:  $0.122 \pm 0.002$ , micTNF $\alpha$ -KO:  $0.119 \pm 0.003$ ; mean  $\pm$  SEM; Wilcoxon statistics = 122,  $P$  value = 0.4773) was observed in micTNF $\alpha$ -KO resulting in a decreased ratio of  $\delta_2$  over  $\delta_1$  power (Fig. 4 b right).

There were no detectable differences in the other frequency ranges nor in REM sleep (Fig. 4 b). Finally, we explored how microglial TNF $\alpha$  shapes the properties of individual slow waves during NREM sleep. Slow waves were identified in the epidural EEG as an alternation of large transient negative and positive deflections in the 0.1–4 Hz filtered EEG (Fig. 4 c). We verified that these deflections correspond to up and down states, respectively (Fig. S8) (Nir et al., 2011). Remarkably, the maximum ascending slope of the slow waves, which coincides with the onset of the cortical positive deflection (downstate; Fig. S8 c), was decreased (~17% decrease in micTNF $\alpha$ -KO as compared

with tCTL, Fig. 4 d left), and the duration of the SW down state (Fig. S8, a and b) was increased in mice depleted of microglial TNF $\alpha$  as compared with controls (Fig. 4 d). These results indicate that microglial TNF $\alpha$  shapes slow waves during NREM sleep by favoring transition into the down states.

#### Microglial TNF $\alpha$ supports memory consolidation of specific learning tasks

Slow waves are known to play a causal role in the consolidation of memory during sleep (Fattinger et al., 2017; Marshall et al., 2006). To assess the role of microglial TNF $\alpha$  in the memory consolidation processes, we compared the consolidation of different learning tasks known to be sleep-dependent (Nagai et al., 2017; Miyamoto et al., 2016b; Rolls et al., 2011) in micTNF $\alpha$ -KO and tCTL mice. In a first learning paradigm (Nagai et al., 2017), mice learned to run on top of a complex wheel attached to an accelerating rotarod in a first 20-trial session (S1). After one day of ad libitum sleep, performance on the complex wheel was assessed on a second 20-trial session by measuring the latency to fall (S2; Fig. 5, a and b). We first confirmed that the learning, evaluated as the improvement of performance within each session, was not different between tCTL and micTNF $\alpha$ -KO



**Figure 5. Microglial TNF $\alpha$  required for memory consolidation in sleep-dependent learning tasks.** (a) Experimental design: Mice learn to run on the complex wheel (session 1, S1) and consolidation of memory is tested the following day (session 2, S2). Between S1 and S2, mice are left undisturbed in their cages. (b) Average latency to fall off the complex wheel in the first three and the last three trials of S1 and S2 from tCTL and micTNF $\alpha$ -KO. Gray area represents undisturbed sleep-wake cycle. Dashed line represents S1 to S2 consolidation. 8 tCTL and 10 micTNF $\alpha$ -KO mice. The data represent mean  $\pm$  SEM. (c) Improvement within each session was measured as the ratio between the mean of the best three trials and first three trials. No statistical significance (ns) by unpaired two-tailed Mann-Whitney test. (d) Performance improvement across sessions was measured as the ratio between the mean of S2 and S1 trials. \* $P < 0.05$ , unpaired two-tailed Mann-Whitney test. (e) Consolidation of motor learning across sessions was measured in two ways: the ratio between the mean of the first three trials of S2 and mean of the last three trials of S1 (first S2/last S1) or ratio between mean of first three trials of S2 and mean of S1 trials (first S2/mean S1). \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ , unpaired two-tailed Mann-Whitney test. (c-e) 8 tCTL and 10 micTNF $\alpha$ -KO mice. Results are presented as minimum to maximum box-plots with the individual values of each mouse represented as datapoints. (f and h) Novelty preference in the novel floor-texture recognition (FTR) (f) or the Novel Object Recognition (NOR) task (h). Fractional preference is expressed as a function of cumulative time of exploration (see Materials and Methods). The data represent the mean  $\pm$  SEM of the preference for the object placed on the novel floor texture (f) or for the novel object (h) computed for each animal. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$  preference for one object versus no preference and \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$  CTL versus micTNF $\alpha$ -KO. Unpaired t tests. The fractional preference is equal to 1 or -1 when the animal only explored respectively the object placed on the novel or familiar floor texture in the FTR and the novel or familiar object in the NOR, and 0 when the animal spent exactly the same amount of time on the two objects. (g and i) Total duration of exploration of the novel floor (FTR; g) and of the novel object (NOR; i). Boxes represent quartiles and whiskers correspond to the range of data; points are singled as outliers if they deviate more than 1.5  $\times$  inter-quartile range from the nearest quartile. (g) \* $P = 0.0674$  CTL versus micTNF $\alpha$ -KO, Unpaired t tests. (i)  $P = 0.44$  CTL versus micTNF $\alpha$ -KO. Unpaired t tests; (f-i)  $n = 11$  tCTL and 8 (f and g) or 16 (h and i) micTNF $\alpha$ -KO mice.

(Fig. 5 c). This shows that lack of microglial TNF $\alpha$  did not alter complex motor learning, which is known to be sleep-independent (Nagai et al., 2017). We further showed that it does not impair locomotor activity and does not induce anxiety-like behavior as assessed in an open-field task (Fig. S9). We next measured the improvement of performance in the complex

motor learning task between S1 and S2 and found that it was higher in tCTL as compared with micTNF $\alpha$ -KO (Fig. 5 d). Finally, we tested the memory consolidation by comparing performance at the beginning of the second session (First S2) with either the last or the mean performance of the first session (Last S1 or Mean S1). Memory consolidation was impaired in mice lacking

microglial TNF $\alpha$  as compared with controls (Fig. 5 e). In this complex motor learning task, the improvement of performance between sessions and memory consolidation are both known to be sleep-dependent processes (Nagai et al., 2017).

To confirm the involvement of microglial TNF $\alpha$  in memory consolidation, tCTL and micTNF $\alpha$ -KO mice performed a floor-texture recognition task, which was known to depend on cortical activity during NREM sleep (Miyamoto et al., 2016b). Mice first explored an arena with a single floor-texture (training session, smooth or rough) and containing two identical objects on each side. After 1 day of ad libitum sleep, mice explored the same arena containing the same two objects which were placed either on a familiar or on a novel floor-texture (testing session, smooth or rough). As expected (Miyamoto et al., 2016b), tCTL mice spent more time exploring the object located on the novel floor-texture during the testing session (Fig. 5 f). In contrast, micTNF $\alpha$ -KO mice explored significantly less the object located on the novel floor-texture (Fig. 5, f and g), confirming the impairment of memory consolidation on these mice.

Finally, tCTL and micTNF $\alpha$ -KO mice were tested in the novel-object recognition task (Fig. 5, h and i). During the sampling session, mice explored two identical objects, and the next day (testing session), one of the original objects was replaced by a novel object. The amount of time taken to explore the novel object during the testing session provides a quantification of memory consolidation. Noteworthy, however, both genotypes exhibited a larger amount of time spent exploring the novel object (Fig. 5 i), indicating normal consolidation for this test.

## Discussion

Microglia, the principal immune cells of the brain, are now acknowledged as instrumental in the perception of the external environment (Thion et al., 2018). How microglia actively translate their external sensing into suitable cues to adapt circuitries in the healthy brain is yet unknown. Our results favor a model in which microglia sense neuronal activity through an ATP/P2RX7 signaling pathway and respond to it by releasing TNF $\alpha$ . Microglial TNF $\alpha$  then gates the phosphorylation of neuronal CaMKII that modulates GABA $_A$ R content at layer 1 cortical synapses (Fig. 2). In the light period, microglia act through TNF $\alpha$  to upregulate synaptic GABA $_A$ R content in L1 (Figs. 1 and 3), which likely contributes to the strengthening of inhibitory transmission in the upper cortex (Bridi et al., 2020). In line with the prominent role of inhibition in the generation of slow waves (Funk et al., 2017; Hay et al., 2021; Lemieux et al., 2015; Niethard et al., 2018; Zucca et al., 2017), microglial TNF $\alpha$  shapes slow waves by controlling transition into down states (Fig. 4). We finally demonstrate that microglial TNF $\alpha$  is determinant for memory consolidation in learning tasks previously shown to occur in a sleep-dependent manner (Nagai et al., 2017; Miyamoto et al., 2016b) (Fig. 5).

Our results were obtained from experiments performed both *in vivo* and in organotypic slices. The latter system closely mimics the *in vivo* brain by preserving tissue architecture and cellular composition. In these slices, microglia retain their 3D ramified morphology and their functional properties (De Simoni

et al., 2008; Delbridge et al., 2020; Weinhard et al., 2018). They further conserve their ability to regulate synapses (Cantaut-Belarif et al., 2017; Pascual et al., 2012). This indicates that functional interactions between neurons and microglia are conserved in organotypic slices. Indeed, in this work, we have identified microglial TNF $\alpha$ , ATP/P2RX7, and CaMKII as molecular actors of synaptic GABA $_A$ R $\alpha$  regulation in organotypic slices, and we have further confirmed their role *in vivo* in the light versus dark regulation of GABA $_A$ R $\alpha$  plasticity. Notably, our work does not exclude the possible involvement of other cell types such as astrocytes which have already been shown to be TNF $\alpha$ -dependent regulators of synaptic transmission (Santello et al., 2011).

Excitatory synapses are scaled down during sleep through the removal of AMPA receptors to compensate for potentiation due to ongoing learning during wake. Microglia may contribute to downscaling during sleep by eliminating excitatory synapses (Choudhury et al., 2019), a behavior presumably tuned down during wake by noradrenaline (Liu et al., 2019; Stowell et al., 2019). More recently, microglial CX3CRI signaling was shown to differentially regulate excitatory synaptic transmission along the light/dark cycle (Corsi et al., 2022). We now show that microglia tune a sleep-dependent regulation of inhibitory synapses restricted to cortical layer 1 via mobilization of the P2RX7/TNF $\alpha$  signaling and regulation of synaptic GABA $_A$ R content. Noteworthy, comparable amplitude of changes in the GABA $_A$ R were found in the sleep/wake cycle analysis of the proteome of forebrain synaptosomes (Noya et al., 2019). The layer 1 versus layer 5 specificity may arise from the molecular difference of GABAergic synapses across the somato-dendritic arbor as proposed (Chiu et al., 2018). Alternatively but not exclusively, it may result from a differential expression of TNF-R1 along the cortical layers and/or from layer-specific behavior of microglia (Stogsdill et al., 2022). Altogether, microglia are arising as active players in excitatory and inhibitory synapse remodeling along the sleep/wake cycle, likely to underlie daily oscillations in synaptic strength (Bridi et al., 2020; Tononi and Cirelli, 2019; Vyazovskiy et al., 2008).

Our study suggests that microglia can target specific sets of synapses by acting locally in a sleep-dependent manner; however, the mechanisms supporting this spatiotemporal specificity have remained elusive. Microglia expression of TNF $\alpha$  mRNA peaks in the middle of the light phase (Fonken et al., 2015), when sleep is maximal. Specificity could be achieved by differential microglial production of TNF $\alpha$ ; however, our attempt to visualize the distribution of TNF $\alpha$  protein in the cortex at sleep and wake states failed due to the unreliability of anti-TNF $\alpha$  antibodies (not shown). Dynamics of TNF $\alpha$  release by microglia along a light/dark cycle in specific sleep states thus await the advent of suitable tools. Another potential source of specificity may come from sleep-specific patterns of neuronal activity and downstream ATP release that can then engage local microglia. For instance, intense calcium spikes occur during sleep on the apical dendrites of pyramidal neurons inducing plasticity in upper cortical layers (Li et al., 2017). ATP levels in the frontal cortex actually peak in the light period in a sleep-dependent manner (Dworak et al., 2010). Resolving the mechanism

promoting spatiotemporal specificity of microglia functions during sleep would give great insight into microglia-neuronal crosstalk in the physiological brain.

TNF $\alpha$  has long been known as a sleep factor. Administration of exogenous TNF $\alpha$  promotes SWA and NREM sleep (Fang et al., 1997; Yoshida et al., 2004), whereas inhibition of endogenous TNF $\alpha$  reduces NREM sleep (refs in Rockstrom et al., 2018). Similarly, intracerebral or intraperitoneal injection of TNF $\alpha$  (Shoham et al., 1987) suppresses REM sleep, which is increased in a dark period-specific manner in TNF $\alpha$  KO mice (Szentirmai and Kapás, 2019). These results seem to partially contradict our results showing no difference in NREM sleep amount and no dark-specific increased REM sleep in mice with microglia-specific TNF $\alpha$  depletion. However, TNF $\alpha$  injection either directly in the brain (Yoshida et al., 2004) or intraperitoneally (Fang et al., 1997) leads to concentrations that are likely higher than the physiological concentration (Garé et al., 2017), with putative widespread diffusion and off-target and indirect effects. Furthermore, the studies using TNF $\alpha$  or TNF $\alpha$  receptors knock-out have not used cell-specific and inducible inactivation, and it is thus difficult to discriminate between a microglial-specific effect to indirect effects due to non-microglial TNF $\alpha$  and/or secondary developmental alterations. Finally, TNF $\alpha$  is also a major mediator of inflammation, which induces sleep dysfunction by yet elusive mechanisms (Irwin, 2019). Our work now provides possible molecular and cellular links between sleep and inflammation.

Cortical inhibition is involved in the control of SWA during NREM sleep (Funk et al., 2017; Zucca et al., 2017; Zielinski et al., 2019) with a prominent role in the onset of down states (Chen et al., 2012; Lemieux et al., 2015). Such control is likely achieved through inhibitory networks in the upper layers of the cortex. Thalamic drive onto LI inhibitory neurogliaform cells induces transition into down states (Hay et al., 2021). In addition, SOM-IN densely targets LI, and their firing precedes entry into down states (Niethard et al., 2018). Accordingly, SOM-IN chemoactivation increases by about 17% the slope of slow waves and triggers down states (Funk et al., 2017). We found that depletion of microglial TNF $\alpha$  leads to a 17% decrease in the slope of slow waves to down states. Remarkably, the slope of slow waves is under homeostatic control. Indeed, sleep deprivation increases the slope of slow waves (Funk et al., 2017; Hubbard et al., 2020), and in early sleep, when sleep need is high, the slope of the slow waves is steeper by 15% above the average (Vyazovskiy et al., 2007). Therefore, the decrease in slow wave slope in micTNF $\alpha$ -KO mice aligns with our earlier finding that these mice exhibit reduced expression of sleep need (Pinto et al., 2023).

In this study, we show that LI inhibitory synapses are modulated by microglia in a sleep-dependent manner. Our data favor the possibility that the microglia-targeted GABAergic synapses arise from SOM-IN. However, inhibition on LI also originates from local axonal arbors of neurogliaform and canopy cells (Schuman et al., 2021), and the identity of the presynaptic neurons remains to be established. In line with their ability to modulate inhibitory synapses in cortical LI, yet without ruling out their possible involvement in other brain regions and/or by other mechanisms, microglia are regulators of slow waves

during NREM sleep through TNF $\alpha$ . A causative link between microglia modulation of inhibitory synapses and sleep slow waves awaits future studies. Together with evidence of astrocytic involvement in SWA (Szabó et al., 2017; Vaidyanathan et al., 2021), our work offers insight into how local glial modulation of neuronal networks may tune brain oscillations. Local modifications in SWA within cortical regions involved in learning processes are crucial for learning consolidation and performance improvement (Huber et al., 2004; Hanlon et al., 2009). Our work suggests that microglia could play a role in facilitating the necessary adjustments in SWA during NREM sleep that accompany the intense recruitment of neural networks during learning episodes.

Cortical inhibition controls sleep-dependent memory consolidation (Zielinski et al., 2019), which itself critically depends on slow waves (Fattinger et al., 2017; Marshall et al., 2006). It has even been proposed that one of the major physiological roles of sleep is to allow memory consolidation (Klinzing et al., 2019). We now show that mice lacking microglial TNF $\alpha$  display impaired memory consolidation when tested in a complex rotarod motor learning task or in the floor-texture recognition (FTR) task. In these two tasks, memory consolidation was shown to be sleep-dependent (Nagai et al., 2017; Miyamoto et al., 2016b). However, no deficiency was observed in micTNF $\alpha$ -KO mice when tested on the novel object recognition test. Specific involvement of microglial TNF $\alpha$  in texture but not in object recognition memory suggests that distinct brain circuits may be involved in these distinct recognition tasks. Accordingly, memory consolidation in the FTR task is dependent on the secondary motor cortex S2 inputs to the S1 sensory cortex hind paw area, unlike the object-location recognition task (Miyamoto et al., 2016b). Furthermore, mice lacking neuronal nitric oxide synthase in cortical somatostatin neurons exhibit the same deficit in FTR but not in novel object recognition tasks, providing additional evidence for a region-specific effect (Zielinski et al., 2019).

Finally, this work adds to the yet limited knowledge of microglia functions in the healthy adult brain (Parkhurst et al., 2013; Wang et al., 2020) and establishes microglia as genuine regulators of inhibitory synapses, brain oscillations, and memory in the healthy brain. Noteworthy, microglial regulation likely occurs through the control of CaMKII $\alpha$ , which is a cardinal regulator of synaptic plasticity (Bayer and Schulman, 2019). It may occur on SOM-IN inputs, which are not only involved in the control of complex behaviors such as sleep but also in decision-making and learning (Adler et al., 2019). Finally, this work demonstrates that microglia tune slow waves and support memory consolidation probably by acting during sleep (Klinzing et al., 2019). We thus anticipate a far wider involvement of microglia in other forms of plasticity and higher brain functions.

## Materials and methods

### Animals and housing

Mice were housed under standard conditions (12 h light/dark cycle; lights on at 7:00 A.M.). All experiments were performed in conformity with the European Committee Council Directive 86/609/EEC and were approved by the local Charles Darwin Ethical

Committee (Ce5-2014-001; 1339-2015073113467359 and 2018022121466547). CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP</sup> (Jung et al., 2000); CX<sub>3</sub>CR1<sup>CreERT2</sup> (Yona et al., 2013); TNF<sup>fllox</sup> (Grivennikov et al., 2005); P2rx7-KO (Solle et al., 2001); SOM<sup>iCre</sup> (Taniguchi et al., 2011); and Ai9 (Madisen et al., 2010) mouse lines were housed at the animal facility of Institut de Biologie de l'ENS or the animal facility of Institut Biologie Paris Seine (Paris, France). CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP</sup>, CX<sub>3</sub>CR1<sup>CreERT2</sup>, and Ai9 were kindly provided by Sonia Garel (Institut de Biologie de l'École Normale Supérieure, Paris, France), TNF<sup>fllox</sup> by Etienne Audinat (Institute of Functional Genomics, Montpellier, France), and P2X7R-KOs by François Rassendren (Institute of Functional Genomics, Montpellier, France). C57BL/6J pregnant females and wild-type males were obtained from Janvier Labs.

#### Brain organotypic slices

Brain organotypic slices were prepared as previously described (Hill et al., 2014). Brains were removed from P3–P7 C57BL/6J mice (wild-type, CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/-</sup>:TNF<sup>fl/f</sup> or CX<sub>3</sub>CR1<sup>CreERT2/+</sup>:TNF<sup>fl/f</sup>), and the hemispheres were separated in a dissection medium (33 mM glucose in PBS). Coronal slices (350 μm) were cut using a McIlwain tissue chopper (Mickle Laboratory) and placed on Millicell cell culture inserts (Millipore, PICM03050) (two to three slices per insert). Slices were maintained at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>/air for 14–21 days in MEM (21090-022; GIBCO) supplemented with 20% heat-inactivated horse serum (16050-122; GIBCO), 2 mM glutamine, 10 mM glucose, 20 mM HEPES, 10 U/ml penicillin, and 10 μg/ml streptomycin. The culture medium was changed three times per week.

#### Adult primary microglia cultures

Isolation of primary microglia from adult mouse brain was performed as previously described (Lee and Tansey, 2013). In brief, adult mice were anesthetized by inhalation of isoflurane and transcardially perfused with 10 ml PBS. Brains were individually dissociated in a solution containing 30–40 U papain (LK003176; Worthington), 7.2 U dispase II (D4693; Sigma-Aldrich), and 10 mg/ml DNase (DN25; Sigma-Aldrich), followed by mechanical dissociation. Microglia were isolated by collecting the 70–37% interphase of a Percoll gradient (P4937; Sigma-Aldrich) and plated on poly-ornithine-coated plates in DMEM/F12 (31331-028; GIBCO) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (10500-064; GIBCO), 10 U/ml penicillin, and 10 μg/ml streptomycin.

#### Spleen cultures

Adult mice were anesthetized by inhalation of isoflurane and transcardially perfused with 10 ml PBS, followed by dissection of the spleen and its dissociation in 150 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, and 0.1 mM EDTA solution. Spleen cells were kept in culture in DMEM (61965-026; GIBCO) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (10500-064; GIBCO), 1 mM sodium pyruvate, 10 U/ml penicillin, and 10 μg/ml streptomycin.

#### Treatments

The drugs and neutralizing or activating antibodies used in this study are listed in Table S3. Treatments to brain organotypic

slices in culture were performed as follows. For long-term treatment with PLX3397 (7–9 days), Mac1-saporin (7 days) and 4-hydroxytamoxifen (12–15 days), the drug and vehicle, respectively, were added to the culture medium at each medium change. All other treatments were performed between days in vitro (DIV) 16–20 in prewarmed artificial cerebrospinal fluid (aCSF; 125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES, 33 mM glucose, pH 7.3). To guarantee rapid penetration of the drugs into the tissue, slices were immersed in aCSF during treatments (final volume of 2 ml, 1 ml under, and 1 ml inside the insert). Induction of iLTP was accomplished by a 2-min treatment with NMDA and CNQX followed by 20 min recovery in NMDA/CNQX-free aCSF. BzATP treatment followed the same temporal pattern as iLTP. Whenever indicated, drugs were added before (preincubation of 15 min [for A740003, apyrase, fluoroacetate, KN62, minocycline, and neutralizing and activating antibodies, PPADS and PSB0739] or 40 min [TAPI-1]) and during iLTP or BzATP treatment. For drugs diluted in DMSO, a 1,000× concentrated stock was used, and an equal volume of DMSO was added to the controls. To remove contaminating K<sup>+</sup> from apyrase (Madry et al., 2018), dialysis was done in 0.025 μm pore nitrocellulose membranes (VSWP01300; Millipore).

For immunohistochemistry purposes, brain organotypic slices were fixed in 2% PFA (15710-S; Electron Microscopy Sciences) in PBS for 1 h at 4°C and washed three times with PBS. For immunostainings of synaptic markers, organotypic slices were cryopreserved on 20% sucrose for at least 24 h at 4°C and cut on a cryostat to 14 μm-thick sections. Following the normal flattening of organotypic slices in culture, slices were ~150–200 μm thick at the time of fixation, allowing us to cut between 9 and 12 cryostat 14 μm-thick sections per each organotypic slice.

#### Analysis of sleep–wake synaptic plasticity

Sleep–wake experiments were carried out in 12- to 15-wk-old C57BL/6J males kept on a 12 h:12 h light/dark cycle. Wild-type mice were fed with normal or PLX3397-containing food (290 mg PLX3397 in 1 kg standard chow, formulated by SSNIFF, S9555-P710) for 2 wk. Microglia-TNFα depleted mice (micTNFα-KO, CX3CR1<sup>CreERT2/+</sup>:TNF<sup>fl/f</sup>) and transgenic controls (tCTL, CX3CR1<sup>GFP/+</sup>:TNF<sup>fl/f</sup>) were fed with tamoxifen-containing food (1,000 mg tamoxifen citrate in 1 kg of chow, formulated by SSNIFF, A115-T71000) for 6 days. Sleep–wake experiments were performed 2 wk after tamoxifen feeding to allow the repopulation of short-lived peripheral CX3CR1<sup>+</sup> cells, thus restricting recombination to microglia (Yona et al., 2013; Goldmann et al., 2013). ZT6 and ZT18 mice were kept undisturbed in their cages and taken in the middle of the light period and the middle of the dark period, respectively. Enforced wake was accomplished by gentle introduction of novel objects inside the cage and gentle tapping of the cage for 6 h starting at the onset of the light period (Colavito et al., 2013). At the indicated times, mice were collected and rapidly anesthetized by inhalation of isoflurane, followed by transcardial perfusion with 2% PFA. Brains were dissected, postfixed at RT for 6 h in 2% PFA (15710-S; Electron Microscopy Sciences), and cryopreserved on 20% sucrose for 5 days at 4°C. Brains were rapidly frozen and sagittal sections of the left

#### Pinto et al.

Microglial TNFα controls synaptic GABA<sub>A</sub>Rs

hemisphere were cut on a cryostat at 9  $\mu\text{m}$  thickness for further immunostaining. To guarantee a good sampling, six sagittal sections (distancing at least 100  $\mu\text{m}$  in the brain tissue) were collected per brain onto the same slide and used for imaging.

#### Immunohistochemistry (IHC)

Cryostat sections were submitted to blocking and permeabilization in 0.25% gelatin–0.1% triton and incubated with primary antibodies at 4°C overnight with shaking. Slices were washed in PBS–0.1% triton (4  $\times$  15 min) and then incubated with secondary antibodies at RT for 3 h with shaking. All secondary antibodies conjugated to fluorophores (Alexa Fluor 488, Cy3 or Alexa Fluor 647) used were from Jackson ImmunoResearch and diluted 1:500. Slices were washed in PBS–0.1% Triton (4  $\times$  15 min) and mounted on Vectashield mounting medium (H-1000; Vector Laboratories) containing DAPI (D3571; Invitrogen).

Whenever indicated (see Table S4), decloaking chamber-based heat-induced epitope retrieval (HIER) was performed before immunostaining. Sections were processed in a decloaking chamber (model DC2008INTL; Biocare Medical) at 110°C for 20 min in an antigen decloaker solution (CB910M; Biocare Medical), incubated at RT for 15 min with 15% methanol 0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  in PBS, and incubated at RT for 40 min in 1% sodium borohydrate in PBS (solution prepared fresh between 45 min and 2 h before use) with shaking. Slices were then immunostained as previously described.

The antibodies and immunohistochemical methods used in this study are listed in Table S4.

#### Confocal imaging and quantitative analysis

For imaging of synaptic clusters in organotypic slices, a Leica SP8 inverted confocal microscope equipped with a 63 $\times$  glycerol objective (1.4 NA), a hybrid detector, and the Leica Application Suite X (LAS X) software was used. Single confocal plane images were taken to cortical L1 or putative cortical L5 with a 3 $\times$  zoom factor applied (512  $\times$  512 pixels, pixel size of 120 nm). Images were taken of three to five cryostat sections obtained from two to three organotypic slices for each condition of an independent experiment. For imaging of synaptic clusters in adult brain tissue, a Leica SP5 upright confocal microscope equipped with a 63 $\times$  oil objective (1.4 NA), a hybrid detector, and the Leica Application Suite X (LAS X) software was used. Images taken were 1  $\mu\text{m}$  z-stacks of three confocal planes (z resolution 0.5  $\mu\text{m}$ ) with a 4 $\times$  (at L1) or 5 $\times$  (at L5) zoom factor applied. Images were taken to the frontal cortex (between 0.5 and 2 mm lateral to midline and >2 mm anterior to bregma) from six cryostat sections for each brain. All imaging was performed at room temperature in a bidirectional manner at 200 Hz speed.

Double or triple colocalization analysis of synaptic clusters was performed automatically on ICY software (de Chaumont et al., 2012) by a custom-built protocol. Analysis was done on either images of a single confocal plane (organotypic slices) or sum projections of z-stacks (adult brain). First, clusters in each channel were detected by the Spot Detector block (Olivo-Marín, 2002), which extracts spots based on an undecimated wavelet transform detector (size of spots set to scales two or three; threshold values kept constant for each experiment).

Identification of colocalization events between detected clusters was accomplished by the object-based colocalization Studio block using the Statistical Object Distance Analysis (SODA) software. In brief, a fixed distance (set to between 500 and 600 nm) from the center of mass of each detected cluster is used to detect colocalization events with clusters from another channel (Lagache et al., 2018). For each channel, detected clusters were then pooled into colocalized and non-colocalized, and their total number and individual intensity values were extracted. In triple-colocalization, a cluster is considered as colocalized when colocalization was detected with the two other channels individually. For instance, a GABA<sub>A</sub>R cluster is considered synaptic when colocalized with gephyrin clusters or both gephyrin and VGAT clusters for double or triple colocalization, respectively. A GABA<sub>A</sub>R cluster is considered extrasynaptic when it shows no colocalization with any of the synaptic markers used. To reduce variability due to uneven background intensity, local background subtraction was applied to each individual cluster.

#### ELISA for TNF $\alpha$

Following 4-hydroxytamoxifen treatment, CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/+</sup>:TNF<sup>f/f</sup> or CX<sub>3</sub>CR1<sup>CreERT2/+</sup>:TNF<sup>f/f</sup> organotypic slices were treated with LPS for 3 h in aCSF, lysed in cell extraction buffer (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 0.1% SDS supplemented fresh with 1 mM NaF, 2 mM Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub> and protease inhibitor cocktail [05056489001; Roche]) by mechanical dissociation, centrifuged for 10 min at 16,000  $g$  at 4°C, and the supernatant was collected. Adult primary microglia were plated in 96-well plates (40,000 cells per well) and stimulated with LPS or BzATP for 6 h. Spleen cells were plated in 24-well plates (3,000,000 cells per well), allowed to deposit for 2 h, and stimulated with LPS for 24 h. For both microglia and spleen cells, the medium was collected and centrifuged for 5 min at 10,000  $g$  at 4°C, and the supernatant was collected. Levels of TNF $\alpha$  in the samples were determined by the mouse TNF $\alpha$  uncoated ELISA kit (88-7324; Invitrogen).

#### Western blot

For Western blot analysis of CaMKII phosphorylation, organotypic slices were homogenized in cell extraction buffer by mechanical dissociation, centrifuged for 10 min at 16,000  $g$  at 4°C, and the supernatant was collected. Total protein concentration was determined by the Pierce BCA protein assay kit (23225; Thermo Fisher Scientific). Samples (40  $\mu\text{g}$  of protein) were denatured at 95°C for 5 min in a denaturing buffer (125 mM Tris-HCl, 10% glycerol, 2% SDS, bromophenol blue, and 5%  $\beta$ -mercaptoethanol added fresh), resolved by SDS-PAGE in 8% polyacrylamide gel, and transferred to PVDF membranes. Membranes were blocked in 5% dry milk and incubated with primary antibody against phosphoT286-CamKII (1:1,000, abI71095; Abcam) at 4°C overnight. Membranes were incubated with HRP-conjugated secondary antibody at RT for 1 h. Proteins were visualized by chemiluminescence using SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity substrate (34095; Thermo Fisher Scientific) and scanned on an ImageQuant LAS 4000 imaging system (GE Healthcare). Membranes were stripped with 0.2 M NaOH for 40 min, reprobed for total CamKII (1:1,000, ab22609;

Pinto et al.

Microglial TNF $\alpha$  controls synaptic GABA<sub>A</sub>Rs

Journal of Cell Biology

11 of 17

<https://doi.org/10.1083/jcb.202401041>

Abcam), and resolved with Lumi-Light Western blotting substrate (I2015196001; Roche). Quantification was performed on ImageJ.

#### Electrode implantations for sleep monitoring

Mice were anesthetized with ketamine/xylazine before being fixed in a stereotaxic apparatus. All coordinates were adapted from the mouse brain atlas (Franklin and Paxinos, 2008).

Mice were implanted with the classical set of electrodes (made of enameled nichrome wire, 150  $\mu\text{m}$  in diameter) for polygraphic sleep monitoring (Henderson et al., 2017). Briefly, two electrodes were positioned epidurally in holes perforated into the skull: one electrode was inserted over the frontal cortex (2 mm lateral to midline and 2 mm anterior to bregma; left hemisphere), and one electrode was inserted over the cerebellum. Two electrodes were inserted into the neck muscles. This configuration provided a frontal electroencephalogram (EEG) derivation and an electromyogram (EMG) derivation. All electrodes were soldered to a miniconnector (Antelec). Dental acrylic cement was used to anchor the electrodes to the skull. Mice were allowed to recover for 14 days before starting the administration of tamoxifen-containing food for 6 days or PLX3397-containing food for 2 wk. Mice were placed in individual recording chambers and connected to the recording system with a light-weight cable and a swivel allowing free movements. Recordings started 2 wk after tamoxifen administration.

#### Sleep recording and analysis

A 24-h baseline (BL) recording starting at dark onset was done to analyze sleep-wake stages in (1) CX3CRI<sup>CreER2</sup>:TNF<sup>f/f</sup> (micTNF $\alpha$ -KO) and CX3CRI<sup>GFP/+</sup>:TNF<sup>f/f</sup> (control) mice and (2) wild-type mice fed with normal or PLX3397-containing food for 2 wk. EEG and EMG signals were amplified (2,000 $\times$ ), filtered, digitized at 2,000 Hz, and subsequently downsampled to 200 Hz by an Embla Module acquisition hardware and the Somnologia acquisition software (Medcare). Polysomnographic recordings were visually scored offline for consecutive 10-s epochs as wake, non REM sleep (NREMS), or REM sleep (REMS) as previously described (Henderson et al., 2017). Briefly, wake was defined by low-amplitude/high-frequency EEG activity and elevated EMG tone. NREMS was defined by high-amplitude/low-frequency (<4 Hz) EEG activity and low EMG tone. REMS was characterized by an EEG activity with theta oscillations and a complete absence of EMG tone with occasional twitches. Bouts were defined as consecutive 10-s epochs of similar vigilance state and could be as short as one epoch. Vigilance states amounts for each animal were expressed as minutes per 2- or 12-h intervals or 24-h. Sleep architecture was assessed by calculating the bout mean duration and number for each vigilance state.

#### Spectral analysis

A spectrogram was first computed using the modulus of the Fast Fourier Transform of 512 EEG samples at 200 Hz (bouts of 2.56 s) multiplied by a Hanning window; the spectral density for each vigilance state was taken as the median of the spectrogram for all EEG bouts belonging to the vigilance state.

#### Slow-waves analysis

Slow waves were analyzed along the 24 h time period. The EEG was first band-pass filtered using a 0-phase Butterworth filter (0.1–4 Hz, order 2). The slow waves (SW) were defined as NREMS events accompanied by a large and slow positive deflection of the EEG measured against a reference placed over the cerebellum. We first identified as slow positive peaks of the band-pass filtered signal with the 0-crossings surrounding the peaks of the filtered signal separated by more than 0.4 s and <2 s. Amongst these peaks, the SW were selected as the positive oscillations in NREMS larger than a threshold corresponding to  $m+3s$ , where  $m$  is the median of the positive peaks of the filtered EEG during wake and  $s$  is the difference between the quantiles 0.5 and 0.84 of these peaks;  $m$  and  $s$  coincide with the mean and the standard deviation if the peak amplitude values would be normally distributed, but this threshold is less sensitive to occasional recording artifacts in the EEG during wake. The relevance of this definition to track events associated with cortical down-states is confirmed in Fig. S8.

The average SW traces were obtained by averaging the EEG centered on the peaks of filtered EEG; the duration of the positive peaks was derived from the time delay between the downward and upward 0-crossing of the filtered EEG around the peaks.

#### Linear trans-cortical electrodes

To confirm the correspondence between the SW as detected by the procedure above with cortical down-states, we implanted 64 channel linear electrodes (ASSY-156-H3; Cambridge Neurotech, 64 channels interspaced by 20  $\mu\text{m}$ ) in the motor cortex of two C57Bl/6J mice. The operations were carried out under isoflurane anesthesia with the aid of an operating microscope. The body temperature was maintained constant during the surgery (36°C) using a heating pad controlled by a rectal thermometer. General analgesia was assured by subcutaneous injection of buprenorphine (3 mg/kg), whereas local analgesia of the skin and skull was provided via subcutaneous injection of lidocaine (0.5 ml of 2 mg/ml solution). Lidocaine spray (10%) was used for the ears, before setting the mouse in the stereotaxic frame (Kopf Instruments). After the povidone-iodine (100 mg/ml) and ethanol (70%) disinfection of the surgical area, a sagittal incision of the scalp was performed. Following exposure of the skull, burr holes were drilled above the studied structures. All coordinates (medio-lateral and antero-posterior) were taken relative to bregma, while the depth was measured starting from the dura mater. The electrode was lowered perpendicular to the cortical surface at the coordinates AP: 1.1 mm, ML: -0.9 mm, z: -1.28 mm, and the surface was covered with Dura-Gel (Cambridge NeuroTech), the rest of the implant is cemented with dental cement onto the skull after having applied a thin layer of superbond on it. A miniature stainless steel screw was implanted over the cerebellum, serving as an electrical reference and ground. The skin ridges were sutured around the connector, and mice were allowed to recover in their home cage for at least 7 days. The implanted mice were housed individually in standard cages. Mice were recorded with the Intan RHD USB interface board as a recording setup (at sampling frequency 30 kHz) in a round

Pinto et al.

Micglial TNF $\alpha$  controls synaptic GABA $_A$ Rs

Journal of Cell Biology

12 of 17

<https://doi.org/10.1083/jcb.202401041>

openfield (40 × 40 cm) where the nest of the home cage was transferred during 2 h at noon.

#### Linear electrodes processing

The signal from the linear electrodes was decomposed offline in LFP using forward and reverse pass filtering with a low-pass filter (0.1–150 Hz Butterworth filter of order 2) and in multiunit activity. The SWs were identified using the same procedure as for EEG applied to the LFP signal from the surface channel of the linear electrodes. The multiunit activity was extracted offline by first performing a forward and reverse pass of filtering with a high-pass filter (500 Hz–8 kHz, Butterworth filter of order 2), and second, extracting the multiunit spikes selected as the transient negative events deviating more than six times the standard deviation of the high-pass filtered signal. The peak of the SW LFP traces was detected from the delta-filtered signal.

#### Open-field test

Mice were placed at the center of an open-field arena (50 × 50 cm) and were allowed to explore it for 15 min. The open-field was divided into a central area (17 × 17 cm) and a peripheral area. Mice were video-tracked with Ethovision software 14.0 by Noldus and the distance moved, velocity, and time spent in the central area were analyzed for 15 min.

#### Complex wheel task

Sleep-dependent consolidation of motor learning was assessed by the complex wheel task as previously described (Nagai et al., 2017). A complex wheel with missing rungs (bar pattern as in Nagai et al., 2017) was mounted on a rotarod. tCTL and micTNF $\alpha$ -KO mice with no habituation or pretraining on the rotarod were used. Two learning sessions (S1 and S2) were done 24 h apart at ZT1, the beginning of the light period. S1 and S2 consisted of 20 and 19 trials, respectively, on the complex wheel with an acceleration increasing from 0 to 40 rpm in 10 min. Mice were allowed a 5 min rest in their cages between each 10 trials. For each trial, the latency to fall corresponds to the time the mouse kept running on the complex wheel without falling. For each mouse, latency to fall off the complex wheel in each S1 and S2 trials was normalized to the average of the last three trials in S1. The normalized values were used to plot the graphs in Fig. 5. Considering that memory consolidation of mice with poorer performances on the complex wheel is less impacted by sleep deprivation than skilled learners (Nagai et al., 2017), only the best learners within each group were taken into consideration for the analysis. Within each group (tCTL and micTNF $\alpha$ -KO), the best learners correspond to the mice that on S1 performed better than the median of the average performance in all trials. The experimenter was blind to the genotypes.

#### Memory recognition tasks

Sleep-dependent consolidation of recognition memory (Miyamoto et al., 2016b; Rolls et al., 2011) was assessed by the novel floor-texture recognition (FTR) and novel object recognition (NOR) tasks. FTR and NOR tasks were performed in a square open field (42 cm) and started at ZT3. Both tasks were based on innate novelty preference in mice. Habituation

consisted of (1) a 30-min exploration period of the open field with cagemates (Day1), (2) a 15-min period during which each mouse was placed individually in the empty open field (Day2), and (3) a 15-min period during which the mice were placed in the open-field with two identical objects (Day3). The tests were executed in the following order: the FTR task was performed on days 4 and 5 and the NOR test on days 6 and 7. On the FTR training session (Day4), mice were allowed to explore two new identical objects in the arena containing a single floor texture (smooth or rough plexiglas) for a 5-min period. This was repeated 2 times (3 × 5-min exploration period in total). On the testing session (Day5), the mice were tested for the FTR paradigm (5 min) during which the arena contains the same two objects but two floor-textures (smooth and rough) on opposing halves of the floor. On the NOR training session (Day 6), mice were allowed to explore two new identical objects for a 5-min period. This was repeated two times (3 × 5-min exploration period in total). On the testing session (Day 7), the mice were tested for the NOR paradigm (5 min) during which one of the original objects was replaced with a new object. At the end of each session, mice were replaced and remained in their home cage for 24 h. Mice that did not accumulate 10 s of total inspection time per object over two training sessions in the FTR or the NOR tests were excluded.

Since novelty preference may take some time to become visible (e.g., if the animal takes some time to begin the exploration of one of the two options available) but shall decay along extended exploration (when the novel situation becomes familiar), we chose to examine the object preference as a function of the cumulative time of exploration in the session. For this purpose, we first assessed the amount of time spent exploring each object per 10-s epochs using the Ethovision software 14.0. Then, we computed the object preference as a function of the cumulative time of exploration. For each animal,  $v_{nov}(t_i)$  and  $v_{fam}(t_i)$  correspond to the amount of time the mouse, at the time in the session  $t_i$ , spent exploring respectively the object placed on the novel or familiar floor texture in the FTR and the novel or familiar object in the NOR. For each epoch, we compute the cumulative time of exploration  $T_j$ ,  $T_j = \sum_{t_i < t_0} v_{nov}(t_i) + v_{fam}(t_i)$  and the object preference  $p(T_j)$  as  $p(T_j) = \left( \sum_{t_i < t_0} v_{nov}(t_i) - v_{fam}(t_i) \right) / T_j$  which value shall be 1 or -1 if the animal only explored respectively the object placed on the novel or familiar floor texture in the FTR and the novel or familiar object in the NOR, and 0 if the animal spent exactly the same amount of time on the two objects. The object preference values are linearly interpolated by a step of 1 s (of cumulated exploration time) to compute the average/SEM across animals.

#### Statistical analysis

Statistical significance was defined as follows: ns, not significant ( $P > 0.05$ ); \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\* $P < 0.01$ ; and \* $P < 0.05$ .

#### GABA $_A$ R plasticity

Results are presented as minimum to maximum box plots. Graphs and statistical analysis were performed in Prism 8.0

Pinto et al.

Micglial TNF $\alpha$  controls synaptic GABA $_A$ Rs

Journal of Cell Biology

13 of 17

<https://doi.org/10.1083/jcb.202401041>

(GraphPad software). Statistical significance was assessed by nonparametric tests or by nested statistical analysis. For the latter, data distribution was assumed to be normal, but this was not formally tested. For comparisons of changes between two groups, nested two-tailed *t* test or Kolmogorov–Smirnov test (for cumulative distributions) was performed. For comparisons between multiple groups, nested one-way ANOVA followed by Sidak’s multiple comparison test or Kruskal–Wallis test followed by Dunn’s multiple comparisons test was used.

#### Sleep recordings

Sleep data were analyzed using Prism 9.3 (GraphPad Software). Normality and homoscedasticity assumptions were verified prior to the use of any parametric tests (D’Agostino–Pearson normality test or Shapiro–Wilk test and equality of variances *F*-test). Data violating normality were log transformed. Statistics was performed with repeated measures two-way ANOVAs to test the significance between genotypes (tCTL and micTNF $\alpha$ -KO) or treatment (normal or PLX3397-containing food) and time (repeated measures over 2-h segments) for wake, REMS, and NREMS. When appropriate, ANOVAs were followed by the Sidak’s multiple comparisons test between genotypes. Two-tailed unpaired *t* test or Mann–Whitney test were also employed to assess the significance of the effects of the genotype or treatment on the different variables (amounts, bout mean durations, numbers of bouts) per 12- or 24-h.

#### Online supplemental material

**Fig. S1** shows the modulation of synaptic and extrasynaptic AMPARs across the light/dark cycle in the frontal cortex. **Fig. S2** shows the effects of microglial depletion by PLX3397 on microglial density as well as on GABA $_A$ Rs and the amount of vigilance states. **Fig. S3** shows that the somatostatin-positive inputs are similarly distributed in the adult brain and organotypic slices. **Fig. S4** shows that microglia are required for the iLTP-induced increase in synaptic GABA $_A$ Rs but no requirement of CX3CL1 signaling. **Fig. S5** confirms the involvement of TNF $\alpha$  in the control of GABA $_A$ Rs plasticity. **Fig. S6** shows that BzATP increases synaptic GABA $_A$ R in a microglia- and CaMKII-dependent manner. **Fig. S7** supports the notion that microglia control synaptic GABA $_A$ R and CaMKII phosphorylation fluctuations throughout the light/dark cycle. **Fig. S8** shows that slow waves coincide with cortical down-states and that the peak upward slope of the slow waves corresponds to the onset of down-states. **Fig. S9** shows no alteration in locomotor activity and anxiety-like behaviors in micTNF $\alpha$ -KO mice. Table S1 shows sleep and wake characteristics in control and PLX3397 treated mice. Table S2 shows sleep and wake characteristics in control and micTNF $\alpha$ -KO mice. Table S3 is the list of the drugs and neutralizing or activating antibodies that were used in this study. Table S4 shows the list of antibodies and immunohistochemical methods used in this study.

#### Data availability

The data underlying all images and graphs are available from the corresponding authors upon request.

#### Pinto et al.

Microglial TNF $\alpha$  controls synaptic GABA $_A$ Rs

#### Acknowledgments

We are grateful to Amandine Delecourt, Eleonore Touzalin, and Deborah Souchet for their excellent technical assistance. We thank Sonia Garel (IBENS, Paris), Etienne Audinat (Institut de génomique fonctionnelle, Montpellier), and Lauriane Ulmann and François Rassendren (Institut de génomique fonctionnelle, Montpellier) for providing CX $_3$ CR1<sup>CreERT2</sup> and Ai9; TNF<sup>fllox</sup> and P2rx7<sup>-</sup>KOs respectively. We are grateful to the IBPS Animal facility for breeding and care, the IBPS-NPS Phenotypic core facility, and particularly Jean Vincent.

This work was funded by: Agence nationale pour la recherche: SYNTRACK -R17096DJ (A. Triller); Agence nationale pour la recherche: EXPECT 17-CE37-0022-2 (C. Léna, D. Popa); European Research Council: PLASTINHIB Project No: 322821 and MICROCOPS (A. Triller); Human Brain Project: HBP SGA2-OPE-2018-0017 (A. Triller); and EMBO fellowship: ALTF 362-2017 (M.J. Pinto). We gratefully acknowledge Astou Tangara, Benjamin Mathieu, and the IBENS imaging facility (IMACHEM-IBISA), member of the French National Research Infrastructure France-BioImaging (ANR-10-INBS-04), which received support from the “Fédération pour la Recherche sur le Cerveau—Rotary International France” (2011) and from the program « Investissements d’Avenir » ANR-10-LABX-54 MEMOLIFE.

Author contributions: Conceptualization: A. Bessis, A. Triller, C. Léna, D. Popa, M.J. Pinto, V. Fabre. Formal Analysis: C. Léna, M.J. Pinto, and V. Fabre. Funding acquisition: A. Bessis, A. Triller, C. Léna, D. Popa, and V. Fabre. Investigation: J.M.J. Fabre, F. Henderson, L. Bizien, M.J. Pinto, N. Đukanović, V. Fabre, A. Bessis, M. Pujol, R.W. Sala, and T. Tarpin. Software: C. Léna, V. Lepetz, and M.J. Pinto. Writing—original draft: A. Bessis, M.J. Pinto. Writing—review & editing: A. Bessis, A. Triller, C. Léna, D. Popa, M.J. Pinto, V. Fabre, and R.W. Sala.

Disclosures: The authors declare no competing financial interests.

Submitted: 19 January 2024

Revised: 18 March 2024

Accepted: 28 March 2024

#### References

- Adamantidis, A.R., C. Gutierrez Herrera, and T.C. Gent. 2019. Oscillating circuitries in the sleeping brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 20:746–762. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0223-4>
- Adler, A., R. Zhao, M.E. Shin, R. Yasuda, and W.-B. Gan. 2019. Somatostatin-expressing interneurons enable and maintain learning-dependent sequential activation of pyramidal neurons. *Neuron*. 102:202–216.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.01.036>
- Badimon, A., H.J. Strasburger, P. Ayata, X. Chen, A. Nair, A. Ikegami, P. Hwang, A.T. Chan, S.M. Graves, J.O. Uweru, et al. 2020. Negative feedback control of neuronal activity by microglia. *Nature*. 586:417–423. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2777-8>
- Bayer, K.U., and H. Schulman. 2019. CaM kinase: Still inspiring at 40. *Neuron*. 103:380–394. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.05.033>
- Beattie, E.C., D. Stellwagen, W. Morishita, J.C. Bresnahan, B.K. Ha, M. Von Zastrow, M.S. Beattie, and R.C. Malenka. 2002. Control of synaptic strength by glial TNF $\alpha$ . *Science*. 295:2282–2285. <https://doi.org/10.1126/science.1067859>
- Black, R.A., C.T. Rauch, C.J. Kozlosky, J.J. Peschon, J.L. Slack, M.F. Wolfson, B.J. Castner, K.L. Stocking, P. Reddy, S. Srinivasan, et al. 1997. A

- metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- $\alpha$  from cells. *Nature*. 385:729–733. <https://doi.org/10.1038/385729a0>
- Bridi, M.C.D., F.-J. Zong, X. Min, N. Luo, T. Tran, J. Qiu, D. Severin, X.-T. Zhang, G. Wang, Z.-J. Zhu, et al. 2020. Daily oscillation of the excitation-inhibition balance in visual cortical circuits. *Neuron*. 105: 621–629.e4. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.11.011>
- Cantaut-Belarif, Y., M. Antri, R. Pizzarelli, S. Colasse, I. Vaccari, S. Soares, M. Renner, R. Dallel, A. Triller, and A. Bessis. 2017. Microglia control the glycinergic but not the GABAergic synapses via prostaglandin E2 in the spinal cord. *J. Cell Biol.* 216:2979–2989. <https://doi.org/10.1083/jcb.201607048>
- Chen, J.-Y., S. Chauvette, S. Skorheim, I. Timofeev, and M. Bazhenov. 2012. Interneuron-mediated inhibition synchronizes neuronal activity during slow oscillation. *J. Physiol.* 590:3987–4010. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.227462>
- Chiu, C.Q., J.S. Martenson, M. Yamazaki, R. Natsume, K. Sakimura, S. Tomita, S.J. Tavalin, and M.J. Higley. 2018. Input-specific NMDAR-dependent potentiation of dendritic GABAergic inhibition. *Neuron*. 97:368–377.e3. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.12.032>
- Choudhury, M.E., K. Miyaniishi, H. Takeda, A. Islam, N. Matsuoka, M. Kubo, S. Matsumoto, T. Kunieda, M. Nomoto, H. Yano, and J. Tanaka. 2019. Phagocytic elimination of synapses by microglia during sleep. *Glia*. 68: 44–59. <https://doi.org/10.1002/glia.23698>
- Colavito, V., P.F. Fabene, G. Grassi-Zucconi, F. Pifferi, Y. Lamberty, M. Bentivoglio, and G. Bertini. 2013. Experimental sleep deprivation as a tool to test memory deficits in rodents. *Front. Syst. Neurosci.* 7:106. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2013.00106>
- Corsi, G., K. Picard, M.A. di Castro, S. Garofalo, F. Tucci, G. Chece, C. Del Percio, M.T. Golia, M. Raspa, F. Scavizzi, et al. 2022. Microglia modulate hippocampal synaptic transmission and sleep duration along the light/dark cycle. *Glia*. 70:89–105. <https://doi.org/10.1002/glia.24090>
- de Chaumont, F., S. Dallongeville, N. Chenouard, N. Hervé, S. Pop, T. Provoost, V. Meas-Yedid, P. Pankajakshan, T. Lecomte, Y. Le Montagner, et al. 2012. Icy: An open bioimage informatics platform for extended reproducible research. *Nat. Methods*. 9:690–696. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2075>
- De Simoni, A., N.J. Allen, and D. Attwell. 2008. Charge compensation for NADPH oxidase activity in microglia in rat brain slices does not involve a proton current. *Eur. J. Neurosci.* 28:1146–1156. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06417.x>
- Defer, N., A. Azroyan, F. Pecker, and C. Pavoino. 2007. TNFR1 and TNFR2 signaling interplay in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 282:35564–35573. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704003200>
- Del Cid-Pellitero, E., A. Plavski, L. Mainville, and B.E. Jones. 2017. Homeostatic changes in GABA and glutamate receptors on excitatory cortical neurons during sleep deprivation and recovery. *Front. Syst. Neurosci.* 11: 17. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2017.00017>
- Delbridge, A.R.D., D. Huh, M. Brickelmaier, J.C. Burns, C. Roberts, R. Challa, N. Raymond, P. Cullen, T.M. Carlile, K.A. Ennis, et al. 2020. Organotypic brain slice culture microglia exhibit molecular similarity to acutely isolated adult microglia and provide a platform to study neuroinflammation. *Front. Cell. Neurosci.* 14:592005. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.592005>
- Diering, G.H., R.S. Nirujogi, R.H. Roth, P.F. Worley, A. Pandey, and R.L. Huganir. 2017. Homer1a drives homeostatic scaling-down of excitatory synapses during sleep. *Science*. 355:511–515. <https://doi.org/10.1126/science.aai8355>
- Dissing-Olesen, L., J.M. LeDuc, R.L. Rungta, J.K. Hefendehl, H.B. Choi, and B.A. MacVicar. 2014. Activation of neuronal NMDA receptors triggers transient ATP-mediated microglial process outgrowth. *J. Neurosci.* 34: 10511–10527. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0405-14.2014>
- Dixon, C.L., N.L. Harrison, J.W. Lynch, and A. Keramidas. 2015. Zolpidem and eszopiclone prime  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$  GABA receptors for longer duration of activity. *Br. J. Pharmacol.* 172:3522–3536. <https://doi.org/10.1111/bph.13142>
- Dworak, M., R.W. McCarley, T. Kim, A.V. Kalinchuk, and R. Basheer. 2010. Sleep and brain energy levels: ATP changes during sleep. *J. Neurosci.* 30: 9007–9016. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1423-10.2010>
- Elmore, M.R.P., A.R. Najafi, M.A. Koike, N.N. Dagher, E.E. Spangenberg, R.A. Rice, M. Kitazawa, B. Matusow, H. Nguyen, B.L. West, and K.N. Green. 2014. Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain. *Neuron*. 82:380–397. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.02.040>
- Fang, J., Y. Wang, and J.M. Krueger. 1997. Mice lacking the TNF 55 kDa receptor fail to sleep more after TNF $\alpha$  treatment. *J. Neurosci.* 17: 5949–5955. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-15-05949.1997>
- Fattinger, S., T.T. de Beukelaar, K.L. Ruddy, C. Volk, N.C. Heyse, J.A. Herbst, R.H.R. Hahnloser, N. Wenderoth, and R. Huber. 2017. Deep sleep maintains learning efficiency of the human brain. *Nat. Commun.* 8: 15405. <https://doi.org/10.1038/ncomms15405>
- Favuzzi, E., S. Huang, G.A. Saldi, L. Binan, L.A. Ibrahim, M. Fernández-Otero, Y. Cao, A. Zeine, A. Sefah, K. Zheng, et al. 2021. GABA-receptive microglia selectively sculpt developing inhibitory circuits. *Cell*. 184: 4048–4063.e32. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.06.018>
- Fonken, L.K., M.G. Frank, M.M. Kitt, R.M. Barrientos, L.R. Watkins, and S.F. Maier. 2015. Microglia inflammatory responses are controlled by an intrinsic circadian clock. *Brain Behav. Immun.* 45:171–179. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.11.009>
- Franklin, K.B., and G. Paxinos. 2008. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Compact Third edition. Elsevier, Amsterdam, Netherlands.
- Funk, C.M., K. Peelman, M. Bellei, W. Marshall, C. Cirelli, and G. Tononi. 2017. Role of somatostatin-positive cortical interneurons in the generation of sleep slow waves. *J. Neurosci.* 37:9132–9148. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1303-17.2017>
- Garré, J.M., H.M. Silva, J.J. Lafaille, and G. Yang. 2017. CX3CR1<sup>+</sup> monocytes modulate learning and learning-dependent dendritic spine remodeling via TNF- $\alpha$ . *Nat. Med.* 23:714–722. <https://doi.org/10.1038/nm.4340>
- Goldmann, T., P. Wieghofer, P.F. Müller, Y. Wolf, D. Varol, S. Yona, S.M. Bredecke, K. Kierdorf, O. Staszewski, M. Datta, et al. 2013. A new type of microglia gene targeting shows TAK1 to be pivotal in CNS autoimmune inflammation. *Nat. Neurosci.* 16:1618–1626. <https://doi.org/10.1038/nn.3531>
- Grivennikov, S.I., A.V. Tumanov, D.J. Liepinsh, A.A. Kruglov, B.I. Marakusha, A.N. Shakhov, T. Murakami, L.N. Drutskaya, I. Förster, B.E. Clausen, et al. 2005. Distinct and nonredundant in vivo functions of TNF produced by t cells and macrophages/neutrophils: Protective and deleterious effects. *Immunity*. 22:93–104. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.11.016>
- Hanlon, E.C., U. Faraguna, V.V. Vyazovskiy, G. Tononi, and C. Cirelli. 2009. Effects of skilled training on sleep slow wave activity and cortical gene expression in the rat. *Sleep*. 32:719–729. <https://doi.org/10.1093/sleep/32.6.719>
- Hay, Y.A., N. Deperrois, T. Fuchsberger, T.M. Quarrell, A.-L. Koerling, and O. Paulsen. 2021. Thalamus mediates neocortical down state transition via GABA<sub>B</sub>-receptor-targeting interneurons. *Neuron*. 109:2682–2690.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.06.030>
- Henderson, F., V. Vialou, S. El Mestikawy, and V. Fabre. 2017. Effects of social defeat stress on sleep in mice. *Front. Behav. Neurosci.* 11:227. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2017.00227>
- Hill, R.A., J. Medved, K.D. Patel, and A. Nishiyama. 2014. Organotypic slice cultures to study oligodendrocyte dynamics and myelination. *J. Vis. Exp.* 90:e51835. <https://doi.org/10.3791/51835>
- Hoffmann, K., Y. Baqi, M.S. Moreira, M. Glänzel, C.E. Müller, and I. von Kügelgen. 2009. Interaction of new, very potent non-nucleotide antagonists with Arg256 of the human platelet P2Y12 receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 331:648–655. <https://doi.org/10.1124/jpet.109.156687>
- Holbrook, J., S. Lara-Reyna, H. Jarosz-Griffiths, and M. McDermott. 2019. Tumour necrosis factor signalling in health and disease. *F1000Res*. 8: F1000 Faculty Rev-111. <https://doi.org/10.12688/f1000research.17023.1>
- Hubbard, J., T.C. Gent, M.M.B. Hoekstra, Y. Emmenegger, V. Mongrain, H.-P. Landolt, A.R. Adamantidis, and P. Franken. 2020. Rapid fast-delta decay following prolonged wakefulness marks a phase of wake-inertia in NREM sleep. *Nat. Commun.* 11:3130. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16915-0>
- Huber, R., M.F. Ghilardi, M. Massimini, and G. Tononi. 2004. Local sleep and learning. *Nature*. 430:78–81. <https://doi.org/10.1038/nature02663>
- Irwin, M.R. 2019. Sleep and inflammation: Partners in sickness and in health. *Nat. Rev. Immunol.* 19:702–715. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0190-z>
- Jung, S., J. Aliberti, P. Graemmel, M.J. Sunshine, G.W. Kreutzberg, A. Sher, and D.R. Littman. 2000. Analysis of fractalkine receptor CX3CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol. Cell Biol.* 20:4106–4114. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.11.4106-4114.2000>
- Kettenmann, H., F. Kirchhoff, and A. Verkhratsky. 2013. Microglia: New roles for the synaptic stripper. *Neuron*. 77:10–18. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.023>
- Klinzing, J.G., N. Niethard, and J. Born. 2019. Mechanisms of systems memory consolidation during sleep. *Nat. Neurosci.* 22:1598–1610. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0467-3>

Pinto et al.

Microglial TNF $\alpha$  controls synaptic GABA<sub>A</sub>Rs

Journal of Cell Biology

15 of 17

<https://doi.org/10.1083/jcb.202401041>

- Krueger, J.M., P. Taishi, A. De, C.J. Davis, B.D. Winters, J. Clinton, E. Szentirmai, and M.R. Zielinski. 2010. ATP and the purine type 2 X7 receptor affect sleep. *J. Appl. Physiol.* 109:1318–1327. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00586.2010>
- Lagache, T., A. Grassart, S. Dallonveville, O. Faklaris, N. Sauvonnnet, A. Dufour, L. Danglot, and J.-C. Olivo-Marin. 2018. Mapping molecular assemblies with fluorescence microscopy and object-based spatial statistics. *Nat. Commun.* 9:698. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03053-x>
- Lee, J.K., and M.G. Tansey. 2013. Microglia isolation from adult mouse brain. *Methods Mol. Biol.* 1041:17–23. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-520-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-520-0_3)
- Lee, H.-K., K. Kameyama, R.L. Huganir, and M.F. Bear. 1998. NMDA induces long-term synaptic depression and dephosphorylation of the GluR1 subunit of AMPA receptors in hippocampus. *Neuron.* 21:1151–1162. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80632-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80632-7)
- Lemieux, M., S. Chauvette, and I. Timofeev. 2015. Neocortical inhibitory activities and long-range afferents contribute to the synchronous onset of silent states of the neocortical slow oscillation. *J. Neurophysiol.* 113: 768–779. <https://doi.org/10.1152/jn.00858.2013>
- Lewitus, G.M., S.C. Konefal, A.D. Greenhalgh, H. Pribrig, K. Augereau, and D. Stellwagen. 2016. Microglial TNF- $\alpha$  suppresses cocaine-induced plasticity and behavioral sensitization. *Neuron.* 90:483–491. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.03.030>
- Li, Y., X.F. Du, C.S. Liu, Z.L. Wen, and J.L. Du. 2012. Reciprocal regulation between resting microglial dynamics and neuronal activity in vivo. *Dev. Cell.* 23:1189–1202. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.10.027>
- Li, W., L. Ma, G. Yang, and W.-B. Gan. 2017. REM sleep selectively prunes and maintains new synapses in development and learning. *Nat. Neurosci.* 20: 427–437. <https://doi.org/10.1038/nn.4479>
- Liu, Y.U., Y. Ying, Y. Li, U.B. Eyo, T. Chen, J. Zheng, A.D. Umpierre, J. Zhu, D.B. Bosco, H. Dong, and L.-J. Wu. 2019. Neuronal network activity controls microglial process surveillance in awake mice via norepinephrine signaling. *Nat. Neurosci.* 22:1771–1781. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0511-3>
- Liu, H., X. Wang, L. Chen, L. Chen, S.E. Tsirka, S. Ge, and Q. Xiong. 2021. Microglia modulate stable wakefulness via the thalamic reticular nucleus in mice. *Nat. Commun.* 12:4646. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24915-x>
- Madisen, L., T.A. Zwingman, S.M. Sunkin, S.W. Oh, H.A. Zariwala, H. Gu, L.L. Ng, R.D. Palmiter, M.J. Hawrylycz, A.R. Jones, et al. 2010. A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat. Neurosci.* 13:1333–1340. <https://doi.org/10.1038/nn.2467>
- Madry, C., and D. Attwell. 2015. Receptors, ion channels, and signaling mechanisms underlying microglial dynamics. *J. Biol. Chem.* 290: 12443–12450. <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.637157>
- Madry, C., L.L. Arancibia-Carcamo, V. Kyrargyri, V.T.T. Chan, N.B. Hamilton, and D. Attwell. 2018. Effects of the ecto-ATPase apyrase on microglial ramification and surveillance reflect cell depolarization, not ATP depletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 115:E1608–E1617. <https://doi.org/10.1073/pnas.1715354115>
- Marsden, K.C., A. Shemesh, K.U. Bayer, and R.C. Carroll. 2010. Selective translocation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin protein kinase IIalpha (CaMKIIalpha) to inhibitory synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107:20559–20564. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010346107>
- Marshall, L., H. Helgadottir, M. Mölle, and J. Born. 2006. Boosting slow oscillations during sleep potentiates memory. *Nature.* 444:610–613. <https://doi.org/10.1038/nature05278>
- Miyamoto, A., H. Wake, A.W. Ishikawa, K. Eto, K. Shibata, H. Murakoshi, S. Koizumi, A.J. Moorhouse, Y. Yoshimura, and J. Nabekura. 2016a. Microglia contact induces synapse formation in developing somatosensory cortex. *Nat. Commun.* 7:12540. <https://doi.org/10.1038/ncomms12540>
- Miyamoto, D., D. Hirai, C.C.A. Fung, A. Inutsuka, M. Odagawa, T. Suzuki, R. Boehringer, C. Adai, K. C. Matsubara, N. Matsuki, et al. 2016b. Top-down cortical input during NREM sleep consolidates perceptual memory. *Science.* 352:1315–1318. <https://doi.org/10.1126/science.aaf0902>
- Nagai, H., L. de Vivo, M. Bellesi, M.F. Ghilardi, G. Tononi, and C. Cirelli. 2017. Sleep consolidates motor learning of complex movement sequences in mice. *Sleep.* 40:zsw059. <https://doi.org/10.1093/sleep/zsw059>
- Nguyen, P.T., L.C. Dorman, S. Pan, I.D. Vainchtein, R.T. Han, H. Nakao-Inoue, S.E. Taloma, J.J. Barron, A.B. Molofsky, M.A. Kheirbek, and A.V. Molofsky. 2020. Microglial remodeling of the extracellular matrix promotes synapse plasticity. *Cell.* 182:388–403.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.050>
- Niethard, N., H.-V.V. Ngo, I. Ehrlich, and J. Born. 2018. Cortical circuit activity underlying sleep slow oscillations and spindles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 115:E9220–E9229. <https://doi.org/10.1073/pnas.1805517115>
- Nir, Y., R.J. Staba, T. Andrillon, V.V. Vyazovskiy, C. Cirelli, I. Fried, and G. Tononi. 2011. Regional Slow Waves and Spindles in Human Sleep. *Neuron.* 70:153–169. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.02.043>
- Noya, S.B., D. Colameo, F. Brüning, A. Spinnler, D. Mircsof, L. Opitz, M. Mann, S.K. Tyagarajan, M.S. Robles, and S.A. Brown. 2019. The fore-brain synaptic transcriptome is organized by clocks but its proteome is driven by sleep. *Science.* 366:eaav2642. <https://doi.org/10.1126/science.aav2642>
- Olivo-Marin, J.-C. 2002. Extraction of spots in biological images using multiscopic products. *Pattern Recognit.* 35:1989–1996. [https://doi.org/10.1016/S0031-3203\(01\)00127-3](https://doi.org/10.1016/S0031-3203(01)00127-3)
- Parkhurst, C.N., G. Yang, I. Ninan, J.N. Savas, J.R. Yates III, J.J. LaFaille, B.L. Hempstead, D.R. Littman, and W.-B. Gan. 2013. Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell.* 155:1596–1609. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.030>
- Pascual, O., S. Ben Achour, P. Rostaing, A. Triller, and A. Bessis. 2012. Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109:E1977–E2005. <https://doi.org/10.1073/pnas.1111098109>
- Petrini, E.M., T. Ravasenga, T.J. Hausrat, G. Iurilli, U. Olcese, V. Racine, J.-B. Sibarita, T.C. Jacob, S.J. Moss, F. Benfenati, et al. 2014. Synaptic recruitment of gephyrin regulates surface GABA<sub>A</sub> receptor dynamics for the expression of inhibitory LTP. *Nat. Commun.* 5:3921. <https://doi.org/10.1038/ncomms4921>
- Pinto, M.J., L. Cottin, F. Dingli, V. Laigle, L.F. Ribeiro, A. Triller, F. Henderson, D. Loew, V. Fabre, and A. Bessis. 2023. Microglial TNF $\alpha$  orchestrates protein phosphorylation in the cortex during the sleep period and controls homeostatic sleep. *EMBO J.* 42:e11485. <https://doi.org/10.15252/embj.202211485>
- Porkka-Heiskanen, T. 2013. Sleep homeostasis. *Curr. Opin. Neurobiol.* 23: 799–805. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2013.02.010>
- Rockstrom, M.D., L. Chen, P. Taishi, J.T. Nguyen, C.M. Gibbons, S.C. Veasey, and J.M. Krueger. 2018. Tumor necrosis factor alpha in sleep regulation. *Sleep Med. Rev.* 40:69–78. <https://doi.org/10.1016/j.smrv.2017.10.005>
- Rogers, J.T., J.M. Morganti, A.D. Bachstetter, C.E. Hudson, M.M. Peters, B.A. Grimmig, E.J. Weeber, P.C. Bickford, and C. Gemma. 2011. CX3CR1 deficiency leads to impairment of hippocampal cognitive function and synaptic plasticity. *J. Neurosci.* 31:16241–16250. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3667-11.2011>
- Rolls, A., D. Colas, A. Adamantidis, M. Carter, T. Lanre-Amos, H.C. Heller, and L. de Lecea. 2011. Optogenetic disruption of sleep continuity impairs memory consolidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108:13305–13310. <https://doi.org/10.1073/pnas.1015633108>
- Santello, M., P. Bezzi, and A. Volterra. 2011. TNF $\alpha$  controls glutamatergic gliotransmission in the hippocampal dentate gyrus. *Neuron.* 69: 988–1001. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.02.003>
- Schafer, D.P., E.K. Lehrman, A.G. Kautzman, R. Koyama, A.R. Martinly, R. Yamasaki, R.M. Ransohoff, M.E. Greenberg, B.A. Barnes, and B. Stevens. 2012. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron.* 74:691–705. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.026>
- Schuman, B., S. Dellal, A. Prönneke, R. Machold, and B. Rudy. 2021. Neocortical layer I: An elegant solution to top-down and bottom-up integration. *Annu. Rev. Neurosci.* 44:221–252. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-100520-012117>
- Shoham, S., D. Davenne, A.B. Cady, C.A. Dinarello, and J.M. Krueger. 1987. Recombinant tumor necrosis factor and interleukin 1 enhance slow-wave sleep. *Am. J. Physiol.* 253:R142–R149. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1987.253.1.R142>
- Solle, M., J. Labasi, D.G. Perregaux, E. Stam, N. Petrusheva, B.H. Koller, R.J. Griffiths, and C.A. Gabel. 2001. Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. *J. Biol. Chem.* 276:125–132. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006781200>
- Stellwagen, D., and R.C. Malenka. 2006. Synaptic scaling mediated by glial TNF- $\alpha$ . *Nature.* 440:1054–1059. <https://doi.org/10.1038/nature04671>
- Stogsdill, J.A., K. Kim, L. Binan, S.L. Fahri, J.Z. Levin, and P. Arlotta. 2022. Pyramidal neuron subtype diversity governs microglia states in the neocortex. *Nature.* 608:750–756. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05056-7>
- Stowell, R.D., G.O. Sipe, R.P. Dawes, H.N. Batchelor, K.A. Lordy, B.S. White-law, M.B. Stoessel, J.M. Bidlack, E. Brown, M. Sur, and A.K. Majewska. 2019. Noradrenergic signaling in the wakeful state inhibits microglial

**Pinto et al.**

Microglial TNF $\alpha$  controls synaptic GABA<sub>A</sub>Rs

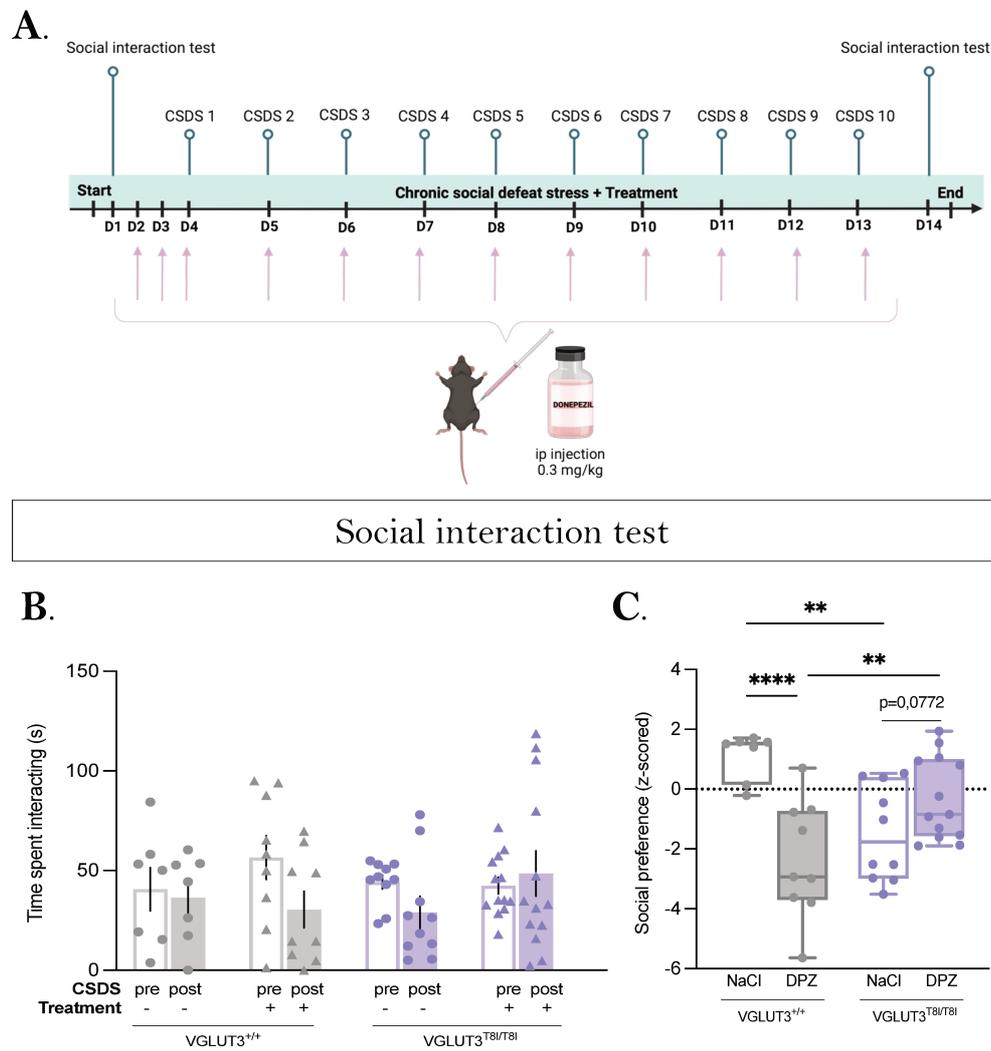
**Journal of Cell Biology**

16 of 17

<https://doi.org/10.1083/jcb.202401041>

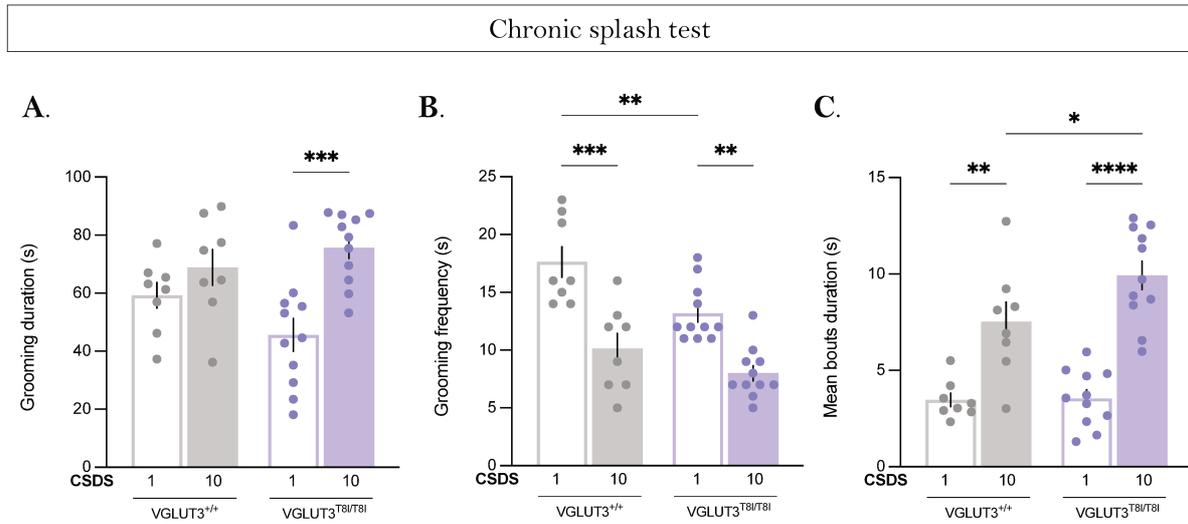
- surveillance and synaptic plasticity in the mouse visual cortex. *Nat. Neurosci.* 22:1782–1792. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0514-0>
- Suprenant, A., F. Rassenclaud, E. Kawashima, R.A. North, and G. Buell. 1996. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science*. 272:735–738. <https://doi.org/10.1126/science.272.5262.735>
- Suzuki, T., I. Hide, K. Ido, S. Kohsaka, K. Inoue, and Y. Nakata. 2004. Production and release of neuroprotective tumor necrosis factor by P2X7 receptor-activated microglia. *J. Neurosci.* 24:1–7. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3792-03.2004>
- Szabó, Z., L. Héja, G. Szalay, O. Kékesi, A. Füredi, K. Szebényi, Á. Dobolyi, T.I. Orbán, O. Kolacsek, T. Tompa, et al. 2017. Extensive astrocyte synchronization advances neuronal coupling in slow wave activity in vivo. *Sci. Rep.* 7:6018. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06073-7>
- Szentirmai, É., and L. Kapás. 2019. Sleep and body temperature in TNFα knockout mice: The effects of sleep deprivation, β3-AR stimulation and exogenous TNFα. *Brain Behav. Immun.* 81:260–271. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.06.022>
- Taniguchi, H., M. He, P. Wu, S. Kim, R. Paik, K. Sugino, D. Kvitsiani, Y. Fu, J. Lu, Y. Lin, et al. 2011. A resource of Cre driver lines for genetic targeting of GABAergic neurons in cerebral cortex. *Neuron*. 71:995–1013. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.07.026>
- Thion, M.S., F. Ginhoux, and S. Garel. 2018. Microglia and early brain development: An intimate journey. *Science*. 362:185–189. <https://doi.org/10.1126/science.aat0474>
- Tononi, G., and C. Cirelli. 2019. Sleep and synaptic down-selection. *Eur. J. Neurosci.* 51:413–421. <https://doi.org/10.1111/ejn.14335>
- Tremblay, R., S. Lee, and B. Rudy. 2016. GABAergic interneurons in the neocortex: From cellular properties to circuits. *Neuron*. 91:260–292. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.06.033>
- Vaidyanathan, T.V., M. Collard, S. Yokoyama, M.E. Reitman, and K.E. Poskanzer. 2021. Cortical astrocytes independently regulate sleep depth and duration via separate GPCR pathways. *Elife*. 10:e63329. <https://doi.org/10.7554/eLife.63329>
- Vyazovskiy, V.V., G. Ruijgrok, T. Deboer, and I. Tobler. 2006. Running wheel accessibility affects the regional electroencephalogram during sleep in mice. *Cereb. Cortex*. 16:328–336. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhi110>
- Vyazovskiy, V.V., B.A. Riedner, C. Cirelli, and G. Tononi. 2007. Sleep homeostasis and cortical synchronization: II. A local field potential study of sleep slow waves in the rat. *Sleep*. 30:1631–1642. <https://doi.org/10.1093/sleep/30.12.1631>
- Vyazovskiy, V.V., C. Cirelli, M. Pfister-Genskow, U. Faraguna, and G. Tononi. 2008. Molecular and electrophysiological evidence for net synaptic potentiation in wake and depression in sleep. *Nat. Neurosci.* 11:200–208. <https://doi.org/10.1038/mm2035>
- Wang, C., H. Yue, Z. Hu, Y. Shen, J. Ma, J. Li, X.-D. Wang, L. Wang, B. Sun, P. Shi, et al. 2020. Microglia mediate forgetting via complement-dependent synaptic elimination. *Science*. 367:688–694. <https://doi.org/10.1126/science.aaz2288>
- Weinhard, L., G. di Bartolomei, G. Bolasco, P. Machado, N.L. Schieber, U. Neniszkyte, M. Exiga, A. Vadisiute, A. Raggioli, A. Schertel, et al. 2018. Microglia remodel synapses by presynaptic trogocytosis and spine head filopodia induction. *Nat. Commun.* 9:1228. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03566-5>
- Yang, G., C.S.W. Lai, J. Cichon, L. Ma, W. Li, and W.-B. Gan. 2014. Sleep promotes branch-specific formation of dendritic spines after learning. *Science*. 344:1173–1178. <https://doi.org/10.1126/science.1249098>
- Yona, S., K.-W. Kim, Y. Wolf, A. Mildner, D. Varol, M. Breker, D. Strauss-Ayali, S. Viukov, M. Guilliams, A. Misharin, et al. 2013. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity*. 38:79–91. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.12.001>
- Yoshida, H., Z. Peterfi, F. García-García, R. Kirkpatrick, T. Yasuda, and J.M. Krueger. 2004. State-specific asymmetries in EEG slow wave activity induced by local application of TNFα. *Brain Res.* 1009:129–136. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.02.055>
- Zamanian, J.L., L. Xu, L.C. Foo, N. Nouri, L. Zhou, R.G. Giffard, and B.A. Barres. 2012. Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J. Neurosci.* 32:6391–6410. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6221-11.2012>
- Zeisel, A., H. Hochgerner, P. Lönnerberg, A. Johnsson, F. Memic, J. van der Zwan, M. Häring, E. Braun, L.E. Borm, G. La Manno, et al. 2018. Molecular architecture of the mouse nervous system. *Cell*. 174:999–1014.e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.021>
- Zielinski, M.R., D.N. Atochin, J.M. McNally, J.T. McKenna, P.L. Huang, R.E. Strecker, and D. Gerashchenko. 2019. Somatostatin+/nNOS+ neurons are involved in delta electroencephalogram activity and cortical-dependent recognition memory. *Sleep*. 42:zs143. <https://doi.org/10.1093/sleep/zsz143>
- Zucca, S., G. D'Urso, V. Pasquale, D. Vecchia, G. Pica, S. Bovetti, C. Moretti, S. Varani, M. Molano-Mazón, M. Chiappalone, et al. 2017. An inhibitory gate for state transition in cortex. *Elife*. 6:e26177. <https://doi.org/10.7554/eLife.26177>

### 3. Données complémentaires: Étude Donépézil



**Figure 51. Données complémentaires pour l'étude du variant p.T8I chez les mâles dans la réponse au chronic social defeat stress (CSDS).** (A) Design expérimental du traitement chronique au donépézil (DPZ) pendant le CSDS. Voir section Matériels et Méthodes, Pharmacologie, pour plus de détails. (B) Temps passés dans la zone d'interaction pour chaque groupe (VGLUT3<sup>+/+</sup> – NaCl ou DPZ ; VGLUT3<sup>T8I/T8I</sup> – NaCl ou DPZ) pre- et post-CSDS (Génotype (G) :  $F(1,35)=5.6$ ,  $p=0.9940$  ; Traitement (T) :  $F(1,35)=0.9429$ ,  $p=0.3382$  ; Stress (S) :  $F(1,35)=3.184$ ,  $p=0.0831$  ; GxT :  $F(1,35)=0.07337$ ,  $p=0.7881$  ; GxS :  $F(1,35)=0.9255$ ,  $p=0.3426$  ; TxS :  $F(1,35)=0.00066$ ,  $p=0.9795$  ; GxTxS :  $F(1,35)=3.804$ ,  $p=0.0592$  ; 3-way ANOVA). (C) Z-scores des préférences sociales post-CSDS par rapport à pré-CSDS (Génotype :  $F(1,35)=0.2776$ ,  $p=0.6016$  ; Traitement :  $F(1,35)=5.222$ ,  $p=0.0285$  ; GxT :  $F(1,35)=21.33$  ;  $p<0.0001$  ; Two-way ANOVA).

## 4. Données complémentaires: Étude compulsion



**Figure 52. Données complémentaires pour l'étude comportementale du variant p.T8I chez les mâles.** Voir section Matériels et Méthodes, Tests comportementaux, pour plus de détails (A) Temps de toilettage (Génotype :  $F(1,17)=0.5197$ ,  $p=0.4808$  ; Temps :  $F(1,17)=13.17$ ,  $p=0.0021$  ; GxT :  $F(1,17)=3.519$ ,  $p=0.0780$  ; Two-way RM ANOVA), (B) nombres de toilettages (Génotype :  $F(1,17)=16.24$ ,  $p=0.0009$  ; Temps :  $F(1,17)=31.69$ ,  $p<0.0001$  ; GxT :  $F(1,17)=1.059$ ,  $p=0.317$  ; Two-way RM ANOVA), et (C) durée moyenne de toilettage (Génotype :  $F(1,17)=3.347$ ,  $p=0.0849$  ; Temps :  $F(1,17)=58.88$ ,  $p<0.0001$  ; GxT :  $F(1,17)=2.898$ ,  $p=0.1069$  ; Two-way RM ANOVA), aux jours 1 et 10 du protocole de splash test chronique.

Le stress représente un facteur de risque majeur dans le développement des troubles psychiatriques et des troubles du sommeil. La diversité des réponses émotionnelles au stress résulte de l'influence conjointe de facteurs environnementaux et génétiques. Le noyau accumbens (NAc) joue un rôle central dans la susceptibilité au stress et récemment, son implication dans la régulation du sommeil a été mise en évidence. Les adaptations comportementales liées à la résilience ou la susceptibilité au stress sont modulées par les transmissions dopaminergique et cholinergique au sein du NAc. L'acétylcholine (ACh) provient principalement des interneurons cholinergiques (CINs), qui communiquent à la fois avec du glutamate (Glut) et de l'ACh, respectivement grâce au transporteur vésiculaire du glutamate de type 3 (VGLUT3) et au transporteur vésiculaire d'acétylcholine (VAChT). L'équipe a récemment montré que le variant allélique p.T8I-VGLUT3 entraîne une diminution de la transmission cholinergique dans le striatum, sans affecter le transport du Glut.

Ainsi, l'objectif de ma thèse a été de caractériser le rôle du variant allélique p.T8I dans la réponse au stress en caractérisant le comportement et le sommeil ainsi que les transmissions d'ACh et de DA associées dans le NAc d'un modèle murin.

Pour cela, j'ai évalué le comportement social, de type anxieux et dépressif, ainsi que les cycles veille-sommeil des souris VGLUT3<sup>T8I/T8I</sup> et témoins mâles et femelles avant et après un stress chronique de défaite sociale (CSDS). Afin d'étudier le rôle de l'ACh et de la DA dans ces comportements, j'ai enregistré leur dynamique de libération par photométrie de fibre à l'aide de biosenseurs fluorescents dans ce modèle murin.

Les données obtenues montrent que le variant p.T8I est associé à un évitement social accru dépendant de la cible sociale, et de niveaux élevés d'anxiété, accompagnés d'une architecture du sommeil distincte en réaction au stress. De plus, ces comportements sont corrélés à une libération réduite d'ACh en réponse au stress chez les mâles. Ces travaux permettent ainsi de mettre en évidence la relation entre le variant p.T8I, les transmissions d'ACh et de DA, et la réponse au stress chronique social, impliquée dans la susceptibilité au stress.

Stress is a risk factor for the development of psychiatric conditions such as generalized anxiety and major depressive disorder which are often associated with sleep disturbances. The behavioral adaptation to stress is influenced by a combination of environmental and genetic factors, leading to significant variability among individuals. The nucleus accumbens (NAc) plays a critical role in stress susceptibility and sleep regulation. In the NAc, the behavioral adaptations associated with resilience or susceptibility to stress are modulated by dopamine (DA) and acetylcholine (ACh) signals. The latter is predominantly released by cholinergic interneurons (CINs). Notably, CINs have the ability to signal with both ACh and glutamate through the expression of vesicular acetylcholine transporter (VAChT) and vesicular glutamate transporter 3 (VGLUT3). Our lab recently showed that the VGLUT3-p.T8I allelic variant results in a reduced ACh release from CINs without affecting glutamate release.

The objective of my PhD was to elucidate the role of the p.T8I variant in shaping behavioral and sleep responses to stress as well as the stress-associated neuronal ACh and DA dynamics in the NAc.

To address these questions, I took advantage of a mouse line carrying the p.T8I variant (VGLUT3<sup>T8I/T8I</sup>) to study social, anxiety- and depressive-like behaviors as well as sleep-wake patterns in male and female mice both before and after chronic social defeat stress (CSDS) exposure. Then, I measured *in vivo* ACh and DA dynamics in the NAc using fiber photometry coupled with fluorescent biosensors to assess their release in response to stress.

The findings indicate that the p.T8I variant is associated with enhanced social cue discrimination characterized by high target-dependent social avoidance, and elevated anxiety-like levels, accompanied by distinct acute stress-induced sleep changes. Moreover, these behaviors are associated with reduced stress-induced ACh release in the NAc in male mice. Together, these findings reveal the intricate relationship between the p.T8I variant, diminished cholinergic transmission within the NAc and susceptibility to stress.